

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 522 588**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.01.2008** **E 08700137 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.08.2014** **EP 2102654**

54 Título: **Método y kit para detectar la resistencia a herbicidas en plantas**

30 Prioridad:

07.01.2007 DK 200700024

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

17.11.2014

73 Titular/es:

**AARHUS UNIVERSITET (100.0%)
NORDRE RINGGADE 1
8000 AARHUS C, DK**

72 Inventor/es:

**RAVN, HELLE WEBER;
KUDSK, PER NIELSEN y
MATHIASSEN, SOLVEJG K.**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 522 588 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método y kit para detectar la resistencia a herbicidas en plantas

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método y a un kit para someter a prueba la presencia de resistencia en organismos vivos. Especialmente, la invención se refiere a un método y un kit para someter a prueba la presencia de resistencia en plantas en un momento temprano. Más específicamente, la invención se refiere a un método sencillo y rápido para detectar resistencia usando compuestos bioquímicos en organismos vivos que han desarrollado resistencia a herbicidas antes y/o después de la exposición a estrés químico tal como pesticidas (herbicidas). El kit y el método se correlacionan con el tipo de compuestos bioquímicos, por ejemplo, compuestos fitoquímicos en plantas y/o el nivel de los compuestos bioquímicos en un organismo vivo expuesto a pesticidas con la presencia de compuestos bioquímicos relacionados con resistencia. El kit proporciona un método sencillo y rápido para detectar la existencia de resistencia, por ejemplo, para detectar la resistencia a herbicidas en plantas de malas hierbas o predice el tiempo en que una planta desarrolla resistencia, por ejemplo, el tiempo en que una planta de malas hierbas desarrolla resistencia a un herbicida. También es posible detectar plantas de cultivo que son tolerantes a herbicidas y que pueden estar presentes en campos cultivados con otra planta de cultivo.

Antecedentes de la invención

Las plantas, los animales y otros organismos vivos incluyendo los hongos están expuestos a estrés de manera continua o temporal en la totalidad de su vida. Se sabe que diferentes tipos de estrés, diferentes tiempos de exposición y diferentes cantidades de un solo tipo de estrés pueden influir de diferente manera dependiendo de la especie de, por ejemplo, plantas o animales. Si el estrés se debe a compuestos químicos tales como pesticidas, algunos de los organismos individuales pueden desarrollar resistencia a este o estos pesticidas.

Cuando uno o unos cuantos individuos de una población desarrollan resistencia con respecto a un pesticida, estos individuos ven favorecido su crecimiento en entornos en los que los tratamientos con pesticidas se realizan frecuentemente. Con el tiempo, la población del organismo vivo se desarrollará para incluir más individuos que son resistentes a los tratamientos con pesticidas.

La resistencia en un organismo vivo, especialmente en un organismo que es dañino o perjudicial para, por ejemplo, plantas de cultivo y que reduce de ese modo el rendimiento de los cultivos puede tener consecuencias de gran alcance y, por tanto, es una ventaja que el desarrollo de resistencia pueda detectarse en una etapa temprana, siendo esto bastante antes de que un tratamiento con pesticidas haya perdido el efecto en una mayor parte de la población del organismo vivo.

La resistencia a un pesticida significa que el organismo ya no es sensible al pesticida o bien debido a una mutación que da como resultado un sitio diana insensible (también denominado "resistencia de sitio diana") o bien el organismo se ha vuelto capaz de metabolizar el pesticida, lo que da como resultado un efecto reducido y de corta duración del pesticida (también denominado "resistencia metabólica"). En este contexto, "resistencia de sitio diana" no se debe necesariamente sólo a una sola mutación dentro del organismo, sino que puede estar provocada por dos o más mutaciones en el genoma del organismo.

La resistencia a herbicidas a nivel mundial es un problema cada vez peor. Desde 1960 el número de casos únicos ha aumentado hasta más de 300.

En el plazo de los últimos 10 años particularmente, el número de casos de resistencia a inhibidores de ALS y ACCasa ha aumentado y de la manera más reciente, se ha notificado resistencia a glifosato.

El documento WO 03/031937 describe la identificación de marcadores polimórficos de la resistencia a herbicidas en plantas mediante el aislamiento de ADN genómico de una planta susceptible a herbicidas y una planta resistente a herbicidas de la misma especie y la realización de análisis genético con el ADN para identificar los marcadores polimórficos de la resistencia a herbicidas. Los marcadores polimórficos son para identificar malas hierbas resistentes a herbicidas y susceptibles a herbicidas.

El documento WO 01/86303 describe una detección de la polipéptido glutatión S-transferasa en una mala hierba. El polipéptido está relacionado con la resistencia de la mala hierba a herbicidas. El polipéptido se detecta mediante un antisuero que se une con el polipéptido. El antisuero unido puede visualizarse, por ejemplo, mediante ELISA.

En la presente invención, se usan las diferencias en la composición química de organismos vivos y especialmente de la composición fitoquímica de plantas de malas hierbas para desarrollar un nuevo método sencillo para detectar resistencia en plantas de malas hierbas y otros organismos vivos. El método y kit pueden usarse por agricultores o asesores para determinar si un control insatisfactorio de malas hierbas en un campo se debe al desarrollo de resistencia a herbicidas en la especie de mala hierba. El agricultor podrá ajustar el método de control de malas hierbas en relación con el resultado de prueba.

Se han usado compuestos fitoquímicos como biomarcadores para obtener un patrón de biomarcadores en plantas expuestas a estrés (documento WO 01/92879). Un patrón de biomarcadores en plantas se define como los cambios en la composición y el contenido de compuestos fitoquímicos detectados en plantas después de la exposición a estrés tal como herbicidas.

- 5 Para poder impedir o retardar el desarrollo de resistencia en un organismo vivo es importante identificar la resistencia en una etapa temprana. Una detección temprana de la existencia de resistencia en, por ejemplo, malas hierbas, plagas y/u hongos patógenos es de especial interés para el sector agrario, principalmente para reducir el riesgo de usar pesticidas que ya no tienen ningún efecto. Una detección temprana de resistencia es también de interés en otros campos tales como en el control de insectos que viven en o cerca de seres humanos o que influyen en la salud de seres humanos, por ejemplo, con respecto a piojos, mosquitos y ratas.

10 La presente invención da a conocer un método sencillo, rápido y sumamente sensible para someter a prueba la existencia de resistencia en un organismo vivo hacia productos químicos tales como en plantas poco tiempo después de la exposición a productos químicos tales como pesticidas. El método se aprovecha de un cambio en la composición de compuestos químicos cuando se exponen organismos vivos a estrés, y estos compuestos pueden usarse como biomarcadores en el material procedente de un organismo vivo cuando se expone a estrés. Particularmente, la presente invención se refiere a un método de prueba para determinar la presencia de resistencia en plantas de malas hierbas expuestas a tratamiento químico con herbicidas.

Sumario de la invención

En un aspecto principal, la invención se refiere a un método según la reivindicación 1.

- 20 Otro aspecto de la invención se refiere a un método para proporcionar una escala de visualización convencional para material procedente de una planta viva específica que se ha expuesto o no a un herbicida específico según la reivindicación 10.

En un aspecto, la invención se refiere a un kit de ensayo para someter a prueba la resistencia en una planta viva según la reivindicación 13.

25 Descripción de los dibujos

Figura 1. El desarrollo de factores de resistencia en diferentes biotipos de la planta *Stellaria media* expuesta a tratamientos con herbicidas que incluyen los componentes activos yodosulfurón, tribenurón y florasulam.

- Figura 2. En un experimento con *Papaver rhoeas*/Hussar OD, una mezcla de I₁, A₁ AD_{α1} (1:1:1) 4 gotas + 10 gotas de extracto de la planta (50 mg/ml extraídos con agua) + 15 gotas de ácido sulfúrico conc. presentan la fotografía a color de la figura 2. Los colores son (de izquierda a derecha) PANTONE® n.º 535 (gris azulado); n.º 452 (gris verdoso); n.º 7544 (gris), n.º 415 (verde grisáceo).

Figura 3. Cromatografía en capa fina (CCF) de extracto de *Papaver rhoeas* no expuesta y expuesta a Hussar. CCF 1): placa: gel de sílice 60; disolvente: tolueno: acetato de etilo: dietilamina (70:20:10). Más información en los ejemplos.

- Figura 4. Cromatografía en capa fina (CCF) de extracto de *Papaver rhoeas* no expuesta y expuesta a Hussar. CCF 2): placa: celulosa; disolvente: ácido acético al 15% en agua. Más información en los ejemplos.

Figura 5. Cromatografía en capa fina (CCF) de extracto de *Papaver rhoeas* no expuesta y expuesta a Hussar. CCF 3) placa: gel de sílice 60; disolvente: n-butanol : metanol : agua (30:30:40). Más información en los ejemplos.

- Figura 6. Cromatografía en capa fina (CCF) de extracto de *Papaver rhoeas* no expuesta y expuesta a Hussar. CCF 4) placa: celulosa; disolvente: isopropanol : ácido acético : agua (70:5:25). Más información en los ejemplos.

Figura 7. Cromatografía en capa fina (CCF) de extracto de *Papaver rhoeas* no expuesta y expuesta a Hussar. CCF 5) placa: celulosa; disolvente: ácido acético al 2% en agua. Más información en los ejemplos.

Figura 8. Análisis mediante cromatografía en capa fina (CCF) de *Stellaria media* no expuesta o expuesta a Hussar. (CCF 1): placa: celulosa; disolvente: S1; Aq y Et, T = luteolina. Más información en los ejemplos.

- Figura 9. Análisis mediante cromatografía en capa fina (CCF) de *Stellaria media* no expuesta o expuesta a Hussar. CCF 2): placa: celulosa; disolvente: S2. Más información en los ejemplos.

Figura 10. Análisis mediante cromatografía en capa fina (CCF) de *Stellaria media* no expuesta o expuesta a Hussar. CCF 3) placa: celulosa; disolvente S3. Aq y Et. Más información en los ejemplos.

- Figura 11. Análisis mediante cromatografía en capa fina (CCF) de *Stellaria media* no expuesta o expuesta a Hussar. CCF 4) Placa: sílice; disolvente: S4; Aq y Et. Más información en los ejemplos.

Figura 12. Análisis mediante cromatografía en capa fina (CCF) de *Stellaria media* no expuesta o expuesta a Hussar. CCF 5) Placa: sílice; disolvente S5; Aq. T = glucosa y ramnosa (azul). Más información en los ejemplos.

Figura 13. Análisis mediante cromatografía en capa fina (CCF) de *Stellaria media* no expuesta o expuesta a Hussar. CCF 6) Placa: celulosa; disolvente S6; Aq. T = apigenina. Más información en los ejemplos.

5 Descripción detallada de la invención

Mediante la presente invención se ha vuelto posible detectar si un organismo vivo ha desarrollado resistencia, por ejemplo, a un compuesto químico tal como un pesticida aplicando un método de prueba sencillo y sumamente sensible. Un organismo vivo incluyendo plantas puede producir diferentes cantidades y/o diferentes tipos de compuestos químicos tras la exposición a efectos de estrés en comparación con el organismo vivo en un entorno sin estrés. Estos compuestos químicos en un organismo vivo no expuesto a estrés y en un organismo vivo expuesto a estrés pueden usarse como biomarcadores para determinar la presencia de resistencia.

Especialmente, se ha vuelto posible detectar resistencia a pesticidas en plantas, plagas y hongos antes de la aplicación de los pesticidas o tras la aplicación de un pesticida cuando el efecto de un tratamiento con pesticidas ha sido ninguno o sólo un pequeño efecto. La invención se refiere a un método de campo sencillo y rápido para detectar compuestos bioquímicos en un organismo vivo o compuestos fitoquímicos en plantas expuestas a estrés químico tal como tratamiento con pesticidas. El nivel y/o tipo de compuestos químicos/fitoquímicos del organismo vivo puede correlacionarse con el desarrollo de compuestos bioquímicos que se detectan como factores de resistencia en el organismo vivo.

Un aspecto de la invención se refiere a un método para detectar resistencia en un organismo vivo, comprendiendo dicho método

- obtener al menos un organismo vivo, que se ha expuesto a un pesticida o exponer dicho al menos un organismo vivo a un pesticida,

- después de un periodo de tiempo determinado a partir del tiempo de la exposición al pesticida, seleccionar al menos una parte de uno de los organismos vivos que no está muerto debido a la exposición a dicho pesticida,

- proporcionar una forma que puede someterse a ensayo de dicha parte de un organismo vivo, comprendiendo dicha forma que puede someterse a ensayo de material procedente de organismo vivo al menos un grupo de compuestos químicos,

- visualizar dicho al menos un grupo de compuestos químicos opcionalmente mediante una detección visual y/o con luz UV,

- correlacionar dicha visualización de al menos un grupo de compuestos bioquímicos con una escala de visualización convencional de dicho al menos un grupo de compuestos químicos,

- evaluar si dicho organismo vivo ha desarrollado resistencia hacia dicho pesticida.

Un aspecto de la invención se refiere a un método para detectar resistencia en un organismo vivo sin exposición de herbicida, comprendiendo dicho método

- obtener al menos un organismo vivo,

- proporcionar una forma que puede someterse a ensayo de dicha parte de un organismo vivo, comprendiendo dicha forma que puede someterse a ensayo de material procedente de organismo vivo al menos un grupo de compuestos químicos,

- visualizar dicho al menos un grupo de compuestos químicos opcionalmente mediante una detección visual y/o con luz UV,

- correlacionar dicha visualización de al menos un grupo de compuestos químicos con una escala de visualización convencional de dicho al menos un grupo de compuestos químicos,

evaluando si dicho organismo vivo ha desarrollado resistencia hacia dicho pesticida.

Por el término "organismo vivo" ha de entenderse que el organismo estaba vivo al menos hasta el momento en que se recogió el organismo vivo o una parte de un organismo vivo para utilizarse para una prueba según el método descrito en el presente documento. Un organismo vivo puede tener un signo visual de crecimiento reducido, por ejemplo, algunos de los signos descritos en otra parte en el presente documento, aunque también pueden estar presentes otros signos de no ser un organismo sano en un organismo vivo. Con respecto a plantas, un organismo vivo ha de entenderse como cualquier parte de planta que no se reconozca que está muerta.

Por "obtener, proporcionar o seleccionar al menos un organismo vivo" ha de entenderse que también pueden usarse

partes de este organismo vivo con respecto a organismos cuando esto sea posible. Con respecto a plantas, la prueba puede desarrollarse con partes de planta y pueden realizarse las pruebas sólo con una parte de un organismo vivo.

5 En una realización, el método antes de la visualización del al menos un grupo de compuestos bioquímicos comprende además,

- proporcionar al menos un reactivo químico aplicable para una reacción química con dicho al menos un grupo de compuestos químicos, y
- provocar una reacción química entre dichos reactivos químicos y compuestos químicos de dicho material procedente de organismo vivo, y

10 en el que dicha visualización de al menos un grupo de compuestos químicos es una detección de un resultado de dicha reacción química.

Si no se sabe si las plantas que van a someterse a prueba para determinar la presencia de resistencia se tratan con herbicidas, también es posible realizar la prueba en dos etapas:

15 1. Realizar un análisis que dé como resultado un color del extracto, por ejemplo, hacer reaccionar un extracto de la planta con un compuesto químico tal como se describe en otra parte en el presente documento y obtener un color del extracto que se hace reaccionar. Basándose en el color es posible determinar si la planta es resistente o es una planta sensible que se ha expuesto al herbicida. Si el resultado indica que la planta es resistente es posible comprobar si esto es cierto realizando una segunda etapa:

20 2. Un análisis basado en hacer reaccionar un extracto de la planta con otro compuesto químico distinto al usado en la etapa 1. De ese modo, es posible determinar si la planta es una planta resistente y no una planta que no se ha expuesto al herbicida.

25 Por "reactivo químico" ha de entenderse una o más sustancias químicas que pueden reaccionar con uno o más compuestos químicos del organismo vivo. El reactivo químico puede realizar una sola reacción química con uno o más compuestos químicos del organismo vivo, o pueden realizarse múltiples reacciones químicas, o bien simultáneamente o bien una tras otra. El/los reactivo(s) químico(s) puede(n) proporcionarse como una sola disolución o una sola materia seca, por ejemplo, como sal o polvo y/o como más de una disolución y/o más de una materia seca. Se prefiere(n) reactivo(s) químico(s) proporcionado(s) como una sola disolución o una sola materia seca.

30 Las sustancias químicas pueden disolverse todas o cada una en al menos un disolvente, por ejemplo, un disolvente orgánico. Diferentes sustancias químicas pueden obtenerse en diferentes disolventes.

El al menos un organismo vivo puede ser una población de un organismo vivo. El al menos un organismo vivo también puede ser uno o más organismos vivos de un pequeño grupo de individuos ubicados en una zona. El al menos un organismo vivo también puede ser un organismo u organismos individuales que viven en una zona, y en el que no es necesario considerar que el número de dichos organismos vivos en dicha zona consiste en una población.

35 El organismo vivo puede seleccionarse de, pero no se limita a, el grupo de plantas, hongos y animales. También pueden someterse a prueba organismos vivos tales como insectos, bacterias, ácaros, nematodos, roedores y virus según la presente invención.

40 Los organismos vivos desarrollan especialmente resistencia frente a compuestos químicos tales como pesticidas. Los pesticidas pueden seleccionarse del grupo de herbicidas, insecticidas, fungicidas, bactericidas, acaricidas, nematocidas, rodenticidas y viricidas. Sin embargo, los organismos vivos también pueden desarrollar resistencia a otros factores de estrés distintos a pesticidas tales como resistencia a fármacos y resistencia a antibióticos, por ejemplo, la capacidad de un microorganismo para resistir los efectos de los antibióticos; resistencia a fármacos antivirales, por ejemplo, la capacidad de una población de virus para resistir los efectos de un fármaco antiviral.; sistema inmunitario, el sistema en organismos que proporciona resistencia a enfermedades; resistencia a enfermedades en frutas y verduras; resistencia sistémica adquirida, una respuesta en plantas que se produce tras la exposición a un patógeno.

En la totalidad de este documento, se ilustra la invención mediante plantas como organismos vivos y herbicidas como el factor de inducción de estrés. Ha de entenderse que la planta y el herbicida pueden sustituirse por otros organismos vivos y otros factores de inducción de estrés, respectivamente.

50 En una realización, la invención se refiere además a un método para someter a prueba efectos pesticidas en plantas, que comprende la etapa de:

- proporcionar al menos una planta viva, opcionalmente tratada con un pesticida,
- obtener material procedente de dicha al menos una planta viva,

- proporcionar una forma que puede someterse a ensayo de al menos una parte de dicha planta viva,
 - proporcionar reactivos químicos para una reacción química con un grupo de compuestos fitoquímicos de dicho material vegetal,
 - detectar una reacción química obtenida poniendo en contacto dicho material vegetal y dichos reactivos químicos,
- 5 - correlacionar dicha reacción química (color e intensidad) obtenida sobre un soporte sólido, por ejemplo, sobre una varilla o disco con una escala de resultados convencional,
- evaluar si dicho organismo vegetal vivo ha desarrollado resistencia hacia dicho pesticida.

Los términos “escala de resultados convencional”, “patrón/escala de biomarcadores convencional”, “patrón/escala de colores convencional” y “escala de visualización convencional” pueden usarse todos para describir una escala o patrón convencional obtenido a partir de varios organismos vivos similares o casi similares (por ejemplo, biotipos de plantas) que se someten al mismo nivel de estrés, a diferentes niveles de estrés, por ejemplo, al mismo nivel o diferentes niveles de un pesticida. La escala indica las respuestas obtenidas dentro de los organismos vivos con respecto a modificaciones en la producción de diferentes compuestos bioquímicos incluyendo la producción de nuevos compuestos bioquímicos en comparación con organismos vivos no sometidos a estrés o en comparación con un organismo sensible al estrés. Por organismos vivos similares o casi similares quiere decirse que no es necesario que estos organismos vivos sean una variedad o un clon, pero se acepta la variedad genética, por ejemplo, los organismos vivos pueden ser biotipos de plantas. Ejemplos de organismos vivos similares o casi similares pueden ser una población de una especie vegetal, por ejemplo, de una especie de mala hierba; una población de un hongo, por ejemplo, especies de un hongo patógeno. Ejemplos adicionales de organismo vivo que va a analizarse para el desarrollo de una escala convencional son varios biotipos del organismo específico, por ejemplo, al menos dos biotipos de una especie vegetal. Para obtener un resultado convencional para el biotipo sensible, debe incluirse al menos un biotipo sensible cuando se desarrolla la escala convencional.

Una escala convencional que va a usarse para determinar si un organismo vivo ha desarrollado resistencia, puede desarrollarse sometiendo a prueba o analizando compuestos químicos en diferentes biotipos del organismo vivo. Las diferentes respuestas químicas obtenidas a partir de los biotipos pueden correlacionarse con las diferencias en la respuesta a pesticidas.

El término “biotipos” ha de entenderse como subespecies o subgrupos de organismos que son morfológicamente similares pero fisiológicamente diferentes de otros miembros de la especie, es decir, fisiológicamente diferentes de otros biotipos de la especie. Un biotipo es, por tanto, una cepa de una especie o variedad que tiene determinados caracteres biológicos que la separan de otros individuos de esa especie.

El número de biotipos usados para desarrollar una escala convencional para una especie vegetal específica con respecto a un herbicida específico puede ser de al menos dos biotipos, tal como al menos tres biotipos, por ejemplo, al menos cuatro biotipos, tal como al menos cinco biotipos, por ejemplo, al menos seis biotipos, tal como al menos siete biotipos, por ejemplo, al menos ocho biotipos, tal como al menos nueve biotipos, por ejemplo, al menos diez biotipos, tal como al menos 12 biotipos, por ejemplo, al menos 14 biotipos, tal como al menos 16 biotipos, por ejemplo, al menos 18 biotipos, tal como al menos 20 biotipos, por ejemplo, al menos 22 biotipos, tal como al menos 24 biotipos, por ejemplo, al menos 26 biotipos, tal como al menos 28 biotipos, por ejemplo, al menos 30 biotipos.

Se prefiere que al menos uno de los biotipos usados cuando se desarrolla la escala convencional sea un biotipo sensible. La sensibilidad a un herbicida específico de cada biotipo puede someterse a prueba determinando la cantidad de herbicida necesaria para reducir la biomasa hasta el 50% de las plantas no tratadas del mismo biotipo. Cuando se compara la sensibilidad entre biotipos, puede usarse el “factor de resistencia” para caracterizar la sensibilidad.

Se usa el “factor de resistencia” para caracterizar el grado de susceptibilidad y resistencia de una especie a un herbicida. Los factores de resistencia se representan normalmente como una razón de valores de DE_{50} para diferentes biotipos. Se usan los valores de DE_{50} para describir la cantidad de herbicida requerida para reducir un parámetro de crecimiento en el 50%. El factor de resistencia expresa, por tanto, el aumento en la dosis de herbicida requerida para reducir un parámetro de crecimiento a la mitad en un biotipo resistente en comparación con uno susceptible, y así es una medida cuantitativa del grado de resistencia.

El método de la presente invención puede basarse en visualizar, identificar o medir un grupo reunido o no separado de compuestos químicos o fitoquímicos obtenidos, por ejemplo, en extractos de una planta o un organismo vivo en el que este grupo no separado de compuestos químicos se identifica mediante una sola señal, por ejemplo, mediante una sola mancha y/o un solo color. El color puede determinarse visualmente sobre un soporte sólido, por ejemplo, una varilla o un disco. Diferentes colores reflejan diferente patrón de biomarcadores del organismo y, por tanto, indican la diferencia en la sensibilidad del organismo al estrés tal como la sensibilidad de plantas a un herbicida.

El grupo de compuestos bioquímicos en el organismo vivo también puede separarse en subgrupos y/o compuestos individuales del grupo y estos subgrupos y/o compuestos individuales se vuelven parte del resultado visualizado,

identificado o medido, de ese modo, por ejemplo, varias manchas coloreadas pueden visualizar los compuestos químicos del organismo vivo. De ese modo el patrón de biomarcadores de las plantas se visualiza mediante los resultados obtenidos, por ejemplo, como un patrón de colores sobre un soporte sólido, o como la cantidad de diferentes grupos y/o subgrupos de diferentes compuestos químicos del organismo, por ejemplo, productos fitoquímicos de plantas. Comparando, por ejemplo, un patrón de colores u otro patrón obtenido con respecto a una sola planta o un grupo de plantas con un patrón de colores convencional u otro patrón, es posible determinar si la planta o el grupo de plantas han desarrollado resistencia a un herbicida específico.

En una realización preferida, se realiza una reacción química con el grupo de compuestos químicos obtenidos a partir del organismo vivo. También se prefiere que esta reacción química se realice antes de la visualización, identificación o medición de los compuestos químicos obtenidos a partir del organismo vivo o bien como un grupo no separado o bien como un grupo separado. La reacción química puede realizarse directamente con material triturado del organismo vivo o puede realizarse con extracto obtenido cuando se filtra material triturado. La reacción química puede realizarse antes de que se ponga el extracto o el material triturado en contacto con un soporte sólido o después de que se ponga el extracto o el material triturado en contacto con un soporte sólido.

Cuando la forma que puede someterse a ensayo de un organismo vivo es material triturado o un extracto, ésta puede incluir compuestos químicos o fitoquímicos que se someten a ensayo juntos en una etapa sin separar el grupo de compuestos en compuestos individuales. Uno o más grupos de compuestos químicos o fitoquímicos obtenidos a partir de un organismo vivo tal como en un material triturado o extracto y que no se separan en subgrupos de compuestos o en compuestos individuales pueden indicarse como “compuestos químicos reunidos”, “compuestos químicos no separados” o “compuestos químicos agrupados”. “Químico” puede sustituirse por “fitoquímico” cuando los compuestos químicos se obtienen a partir de o están presentes en plantas.

Los compuestos bioquímicos no separados obtenidos a partir de un organismo vivo pueden depender de la cantidad real y los tipos de compuestos químicos tienen algunas características únicas, que pueden usarse para determinar el nivel de estrés impuesto sobre así como la resistencia del organismo vivo. Puede usarse cualquier método de detección utilizable para distinguir entre diferentes muestras de compuestos químicos no separados o de compuestos químicos separados.

Para simplificar la descripción de la presente invención, el siguiente texto se referirá a material para el que se ejemplifica el organismo vivo mediante plantas y el método de detección de los compuestos fitoquímicos no separados o separados se ejemplifica mediante la reacción de color que puede detectarse con luz visible o con luz ultravioleta (luz UV). El término “compuestos químicos” o “compuestos bioquímicos” se ejemplifica mediante compuestos fitoquímicos. Además, la invención da a conocer particularmente el uso de compuestos fitoquímicos en plantas para detectar resistencia en estas plantas hacia herbicidas, aunque también puede someterse a prueba la resistencia de otros organismos vivos y a otros productos químicos mediante la presente invención.

Cuando los compuestos fitoquímicos no separados o separados se obtienen a partir de una planta, éstos pueden hacerse reaccionar con un reactivo químico y puede detectarse una reacción de color o bien con luz visible o con luz UV y semicuantificarse usando la intensidad del color. En una realización preferida, se visualiza el color sobre un soporte sólido. En una realización más preferida, se visualiza el color sobre una varilla o un disco compuesto por un material que puede retener los compuestos fitoquímicos opcionalmente junto con líquido que comprende extracto de la planta, disolventes y/o un reactivo químico.

El color y la intensidad de los compuestos fitoquímicos que se hacen reaccionar cuando se aplican sobre el soporte sólido es diferente dependiendo del estrés impuesto sobre la planta, por ejemplo, depende de la dosis de un pesticida o herbicida y/o el color depende de la sensibilidad de la planta a un pesticida. El color y la intensidad de color pueden correlacionarse con una escala de colores o de visualización convencional para determinar la presencia de resistencia. El extracto obtenido a partir de una planta no expuesta a un estrés tal como pesticidas/herbicidas tiene un color y/o una intensidad de color diferente en comparación con extractos de plantas expuestas a pesticidas/herbicidas.

Una escala de colores y la intensidad de color obtenida, por ejemplo, sobre un soporte sólido puede obtenerse cuando se someten a prueba y/o analizan grupos de productos fitoquímicos obtenidos a partir de diferentes plantas de tipo similar, por ejemplo, de diferentes biotipos que responden de diferente manera a un pesticida. La escala de colores obtenida basándose en productos fitoquímicos extraídos de plantas de diferentes biotipos indica la presencia de resistencia. El extracto de diferentes biotipos puede distinguirse sobre un soporte sólido debido a diferentes colores y/o diferente intensidad de color. Las pruebas pueden desarrollarse para el uso de productos fitoquímicos no separados o separados de la planta.

Por productos fitoquímicos no separados ha de entenderse que sustancialmente todos los grupos de productos fitoquímicos presentes en una parte de planta que va a someterse a prueba también están presentes en el material vegetal sometido a prueba, por ejemplo, en material vegetal triturado o en extracto obtenido a partir de material vegetal triturado. Cuando se realiza una simple filtración de material vegetal triturado, se obtiene un extracto. Se considera que este extracto comprende productos fitoquímicos no separados, ya que se espera que no se pierdan grupos de productos fitoquímicos ni desaparezcan del material durante los procedimientos de trituración y filtración.

Una simple filtración puede ser una filtración a través de papel de filtro, tal como, por ejemplo, un filtro de nitrocelulosa o papel Whatman.

En una realización, la invención se refiere a un método para someter a prueba efectos pesticidas en plantas, que comprende las etapas de:

- 5 - proporcionar al menos una planta viva, opcionalmente tratada con un pesticida,
- obtener material procedente de dicha al menos una planta viva,
- proporcionar una forma que puede someterse a ensayo de al menos una parte de dicha planta viva, comprendiendo dicha forma que puede someterse a ensayo productos fitoquímicos no separados o separados;
- 10 - proporcionar al menos un reactivo químico para una reacción química con uno o más grupos de compuestos fitoquímicos que se sabe que están presentes o que se espera que están presentes en dichos productos fitoquímicos no separados o separados del material vegetal,
- detectar al menos una reacción química obtenida poniendo en contacto un volumen de dicho material vegetal y dicho al menos un reactivo químico,
- 15 - correlacionar dicha reacción química (color e intensidad) obtenida sobre un soporte sólido, por ejemplo, sobre al menos una varilla o un disco con una escala de resultados convencional prevista con respecto a dichos productos fitoquímicos no separados o separados,
- evaluar si dicho organismo vegetal vivo ha desarrollado resistencia hacia dicho pesticida.

La presente invención se basa en el reconocimiento de que los compuestos fitoquímicos en plantas expuestas a estrés, tal como pesticidas, están relacionados con y dependen de los pesticidas usados y sus modos de acción en la planta. El inventor ha encontrado reacciones de color únicas y reproducibles de composición separada y no separada de grupos de compuestos fitoquímicos en plantas después de la exposición a un factor de estrés, tal como un pesticida, siendo dichas reacciones de color únicas para el factor de estrés específico y el nivel de estrés aplicado, y únicas para la familia de plantas individuales, más preferido la especie vegetal individual, o biotipos de plantas. La reacción de color única puede considerarse como una huella digital del efecto de un pesticida específico en la planta en cuestión, es decir la planta específica que va a someterse a prueba. Por tanto, la presente invención ofrece una oportunidad para evaluar/determinar si una planta ha desarrollado resistencia a un pesticida.

Determinados nuevos compuestos químicos pueden producirse en la planta después de la exposición a estrés, o puede cambiar la concentración de compuestos ya existentes, por ejemplo, mediante una acumulación de determinados compuestos químicos en las plantas. Además, el color obtenido basándose en compuestos químicos no separados o separados también puede relacionarse con una disminución o incluso una eliminación de compuestos químicos en las plantas después de la exposición a estrés. Estos cambios de concentración de compuestos, eliminación de compuestos y/o producción de nuevos compuestos después de la exposición a estrés pueden deberse a cambios en las rutas bioquímicas de las plantas.

Por consiguiente, un color obtenido basándose en un solo grupo de compuestos químicos no separados es una huella digital única de la composición de compuestos fitoquímicos, es decir compuestos producidos de manera endógena, en la planta después de la exposición a un factor de estrés, es decir una exposición externa, y dicha huella digital es única para cada tipo de factores de estrés, tales como pesticidas, o para un grupo de factores de estrés.

También los colores obtenidos basándose en al menos un grupo de productos fitoquímicos de compuestos químicos separados son una huella digital única de la composición de compuestos fitoquímicos en la planta después de la exposición a un factor de estrés, y dicha huella digital es única para cada tipo de factores de estrés. La separación de productos fitoquímicos puede ser en algunos o todos los grupos de productos fitoquímicos presentes en el material vegetal. Los grupos de productos fitoquímicos pueden seleccionarse de los grupos de ácidos orgánicos, lípidos, compuestos reductores, compuestos fenólicos, compuestos generales, aminoácidos, aminoácidos aromáticos, N-compuestos, alcaloides, aminas, flavonoides, fitosteroles, cetosas, glucolípidos, cationes, diazepinas, aldehídos, hidratos de carbono, glicósidos, lípidos, fosfolípidos, esteroides y/o S-compuestos.

Los compuestos fitoquímicos también pueden asociarse con el compuesto químico o partes de los compuestos químicos usados como estrés químico para las plantas, por ejemplo, descomposición del compuesto químico que va a desintoxicarse de las plantas mediante una reacción con los grupos reactivos de los compuestos fitoquímicos.

En un aspecto de la invención, los compuestos presentes en las plantas después de la exposición son los mismos que antes de exposición, pero la concentración de los compuestos individuales es diferente, mediante lo cual ha surgido una nueva huella digital de los compuestos fitoquímicos después de la exposición.

En un aspecto de la invención, la presencia de cambios fitoquímicos y el grado de sensibilidad de la planta a la exposición a estrés pueden depender de la edad de la planta. Las plantas jóvenes tienden a ser más sensibles a la

exposición de estrés, tal como herbicidas, que las plantas de más edad. Esto significa que puede detectarse una huella digital de los compuestos fitoquímicos en una etapa más temprana después del tiempo de exposición en una planta joven en oposición a la etapa posterior de detección de una huella digital de los compuestos fitoquímicos en una planta de más edad. Debido a su alta sensibilidad, las plantas jóvenes muestran menor estabilidad de los cambios bioquímicos, es decir la huella digital de los compuestos fitoquímicos es más estable en plantas de más edad y puede observarse en la totalidad de la vida restante de la planta de más edad. Sin embargo, plantas más jóvenes tienen una mayor sensibilidad a estrés y también una mayor tasa de mortalidad. Menos especies de plantas jóvenes sobrevivirán a la exposición a estrés las primeras semanas después de la emergencia, mientras que plantas de más edad se ven menos afectadas.

- 10 Por consiguiente, la presente invención se aprovecha de varios parámetros, tales como las respuestas bioquímicas o fitoquímicas y el tiempo después de la exposición a estrés con los que se producen, los efectos fisiológicos, los tipos, números y concentraciones de compuestos biosintetizados en plantas después de la exposición a pesticidas.

- 15 En una realización de la invención, la huella digital de los compuestos fitoquímicos de la composición de planta puede referirse a un grupo de productos fitoquímicos, tales como hasta al menos 2 grupos de productos fitoquímicos. En otra realización de la invención, la huella digital de los compuestos fitoquímicos de la composición se refiere a al menos 3 grupos de productos fitoquímicos, tales como al menos 4 grupos de productos fitoquímicos, por ejemplo, al menos 5 grupos de productos fitoquímicos, tales como al menos 6 grupos de productos fitoquímicos, por ejemplo, al menos 7 grupos de productos fitoquímicos, tales como al menos 8 grupos de productos fitoquímicos, por ejemplo, al menos 9 grupos de productos fitoquímicos, tales como al menos 10 grupos de productos fitoquímicos. Los grupos de productos fitoquímicos pueden determinarse con o sin una reacción química tal como se describe en otra parte.

- 25 Por el término "escala de colores convencional" quiere decirse una escala de colores de la composición de compuestos presentes en diferentes plantas, por ejemplo, diferentes biotipos que representan diferente constitución genética de las plantas y de ese modo una posible diferente sensibilidad a pesticidas. Según la invención, la huella digital que se relaciona con uno o más grupos de compuestos fitoquímicos de una planta o biotipo que va a someterse a prueba para determinar la presencia de resistencia, es decir la respuesta de color descrita anteriormente de esta planta o biotipo se correlaciona con una escala de colores convencional. Para interpretar la huella digital relacionada con compuestos fitoquímicos de material de prueba que se ha expuesto a pesticidas, es un requisito previo proporcionar escalas de colores convencionales. La reacción de color o huella digital relacionada con compuestos fitoquímicos de material de prueba puede correlacionarse entonces con escalas de colores convencionales. Las escalas de colores convencionales pueden obtenerse para un factor de estrés particular o para una combinación de al menos dos factores de estrés diferentes.

Es posible preparar una escala de visualización/colores/biomarcadores convencional para material procedente de un organismo vivo, que comprende las etapas de:

- 35 - someter al menos un organismo vivo a tipos conocidos y cantidades conocidas de un pesticida o no someterlo a pesticidas,
 - obtener material procedente de dicho organismo vivo,
 - determinar las respuestas químicas de dicho material procedente de dicho organismo vivo para cada tipo de pesticida y/o para cada cantidad de pesticida, y
 40 - obtener al menos un resultado convencional relacionado con dicho tipo de pesticida y/o con dicha cantidad de pesticida.

También es posible preparar una escala de visualización/colores/biomarcadores convencional para material procedente de un organismo vivo usando diferentes biotipos del organismo vivo, que comprende las etapas de:

- 45 - obtener biotipos de al menos un organismo vivo, por ejemplo, de diferentes zonas donde vive, sometándose opcionalmente dichas zonas donde vive a tratamiento con pesticidas,
 - obtener material procedente de dicho organismo vivo,
 - determinar las respuestas químicas de dicho material procedente de dicho organismo vivo para cada biotipo, y
 - obtener al menos un resultado convencional relacionado con dicho pesticida y con la resistencia de dichos biotipos de organismo vivo.

- 50 En una realización preferida, la respuesta química de un organismo vivo se basa en compuestos en el organismo vivo que se correlacionan con la aparición de resistencia en dicho organismo vivo.

La descripción en el presente documento se aplica tanto a un método para proporcionar una escala de colores convencional relacionada con compuestos fitoquímicos de plantas expuestas a tratamiento con pesticidas que tiene diferente efecto sobre las plantas así como a un método de prueba si el material procedente de un organismo vivo

ha desarrollado resistencia al pesticida.

El material con el que se realizan las pruebas puede proceder de cualquier material vivo, tal como de animales, por ejemplo, mamíferos, invertebrados e insectos de tierra, o de talofitas, tales como hongos o algas. Sin embargo, en una realización preferida de la invención, el material procedente de un organismo vivo es material vegetal.

5 En otra realización preferida, el material se selecciona de plantas, hongos o algas.

Lo siguiente es una descripción de una realización de la invención, en la que el material procedente de un organismo vivo se origina a partir de plantas. La descripción de esta realización de la invención usando plantas, también se refiere a otras realizaciones de la invención, en las que el material procedente de un organismo vivo no es material vegetal.

10 Por tanto, en una realización de la invención, el método de prueba es para determinar la huella digital química relacionada con compuestos fitoquímicos después de la exposición a pesticidas para someter a prueba la presencia de resistencia en la planta. Basándose en las pruebas de diferentes biotipos y una selección de con respecto a qué grupo o grupos de compuestos fitoquímicos ha de desarrollarse la prueba, se desarrolla la escala convencional proporcionando una escala de diferentes huellas digitales o diferente patrón de colores o diferentes colores o
15 diferente intensidad de color, indicando cada uno la sensibilidad del material vegetal.

El método y kit de prueba según la presente invención pueden aplicarse para detectar resistencia a pesticidas en, por ejemplo, malas hierbas, hongos patógenos y plagas en cultivos agrícolas y hortícolas.

20 Las plantas reaccionan a la exposición a estrés de herbicidas. Se produce un cambio en la composición fitoquímica y la concentración de los compuestos en planta (un patrón de biomarcadores) cuando se exponen plantas a herbicidas.

Los individuos resistentes son normalmente desde 3-4 veces hasta 1000 veces menos sensibles con respecto a un pesticida en comparación con los individuos sensibles. De ese modo se obtiene un efecto insuficiente de un tratamiento con pesticidas cuando se trata con una dosis recomendada y los organismos resistentes sobrevivirán al tratamiento. Ha resultado que los biotipos resistentes no se ven afectados por herbicidas al menos no cuando se
25 trata de la reducción en biomasa, y pueden obtenerse diferencias significativas en el patrón de biomarcadores entre los biotipos susceptibles y resistentes.

Cuando se usa el método y el kit de prueba, se realiza una medición de la respuesta fitoquímica (bioquímica) de organismos que sobreviven a un tratamiento con pesticidas. Comparando esta respuesta con la respuesta convencional de los biotipos susceptibles y resistentes de esa mala hierba, plaga u hongo patógeno específico es
30 posible decidir si una respuesta insatisfactoria puede relacionarse con resistencia a pesticidas o está provocada por otros factores. El patrón de biomarcadores convencional del kit de prueba puede desarrollarse usando una colección de biotipos susceptibles y resistentes.

La composición y/o el contenido de compuestos naturales en biotipos susceptibles o de resistencia de los organismos son diferentes. Este es también el caso con organismos expuestos a productos químicos. Comparando
35 el contenido y la composición de los compuestos químicos naturales en los organismos, es posible detectar diferencias que se usan para identificar los biotipos. Las diferencias en la composición y el contenido de compuestos naturales dentro de los diferentes biotipos que se exponen y no se exponen a productos químicos se usan para definir los compuestos químicos naturales globales que van a usarse para preparar una escala de biomarcadores/visualización convencional y para desarrollar el kit de prueba tal como se describe en el presente documento.
40

También pueden usarse métodos histoquímicos para detectar las diferencias en la composición y/o el contenido en compuestos químicos naturales en los diferentes biotipos. Pueden usarse diferentes partes de los organismos, por ejemplo, todas las diferentes partes de las plantas: tallo, hoja, pétalos, etc. para detectar los compuestos naturales o fitoquímicos directamente al microscopio antes de, es decir sin, o después de un tratamiento químico para realizar
45 una reacción química. Las partes del organismo pueden usarse directamente o cortarse en pequeños trozos, por ejemplo, secciones. Una reacción química entre compuestos químicos del organismo y un reactivo químico puede detectarse como una reacción de color con luz blanca o mediante luz UV con o los compuestos químicos del organismo, es decir, los biomarcadores del organismo pueden detectarse sin usar productos químicos.

50 En una realización preferida, la prueba es un ensayo cualitativo que proporciona al usuario una respuesta de sí o no a la pregunta de si se obtiene un efecto insatisfactorio tras el uso de una dosis de pesticida que se espera generalmente que destruya la mala hierba, la plaga o el hongo patógeno específico. De ese modo, se desarrolla la prueba para distinguir entre compuestos químicos, es decir, patrón de biomarcadores del organismo que morirá debido al tratamiento químico y el organismo que sobrevivirá al tratamiento químico.

55 La prueba puede detectar tanto resistencia de sitio diana, es decir resistencia provocada por una mutación que da como resultado un sitio diana insensible, y resistencia metabólica, es decir una mutación que permite que la mala hierba, los hongos patógenos o la plaga metabolicen el pesticida lo más rápidamente posible para biotipos

susceptibles.

Puede desarrollarse un kit de prueba específico para cada caso de resistencia a pesticida, es decir, por ejemplo, para cada combinación de herbicida y malas hierbas, fungicidas y hongos patógenos e insecticidas y plagas. Si se encuentran diferentes mecanismos de resistencia en la misma mala hierba, hongo patógeno o plaga, pueden desarrollarse diferentes kits de prueba.

Pueden recogerse las malas hierbas, los hongos patógenos o las plagas supervivientes cuando es obvio que éstos sobrevivirán a un tratamiento con pesticidas y pueden someterse a prueba según la invención descrita en el presente documento. Determinados pesticidas, particularmente insecticidas pero también algunos herbicidas, tienen un efecto de silenciamiento inmediato, así pueden recogerse los individuos supervivientes ya 1-3 días después del tratamiento. Para otros pesticidas, particularmente herbicidas y fungicidas, los síntomas se desarrollan más lentamente y no puede determinarse si un individuo sobrevivirá hasta 10-14 días después del tratamiento con pesticidas. El momento de recogida puede ser específico para cada combinación de pesticida y mala hierba/hongos patógenos/plaga.

El material vegetal de la invención puede seleccionarse entre cualquier planta o célula vegetal. El material vegetal puede elegirse de plantas vasculares, pteridofitas, plantas de semillas, las gimnospermas, las angiospermas, mono y dicotiledóneas. En una realización preferida de la invención, el material vegetal se elige de, pero no se limita a dicotiledóneas o monocotiledóneas. También se prefiere material vegetal elegido de plantas que se considera que son una mala hierba, especialmente es de interés una mala hierba en plantas de cultivo. La mala hierba se considera como una planta que compite con la planta de cultivo de manera que la planta de cultivo se ve influida de manera negativa o bien en el crecimiento y/o bien en la composición.

Se han documentado dos tipos de resistencia a herbicidas en plantas. Éstos son resistencia de sitio diana y metabolismo mejorado.

Resistencia de sitio diana:

- El herbicida no se une al sitio diana
- Frecuentemente de herencia monogénica
- La alta presión de selección aumentará la proporción de los biotipos resistentes en la población
- A menudo resistencia cruzada a herbicidas con el mismo modo de acción.

Metabolismo mejorado:

- Aumento del metabolismo del herbicida
- Se supone que es de herencia poligénica
- No está bien establecida la relación entre la presión de selección y la acumulación de los biotipos resistentes en la población
- A menudo resistencia cruzada a herbicidas con diversos modos de acción.

Estos dos tipos de resistencia pueden detectarse con el método y kit de la presente invención.

Según la invención las plantas dicotiledóneas pueden seleccionarse de las familias de *Asteraceae*, *Brassicaceae*, *Lamiaceae*, *Polygonaceae*, *Papaveraceae*, *Primulaceae*, *Plantaginaceae*, *Convolvulaceae*, *Umbelliferae*, *Oenotheraceae*, *Papilionaceae*, *Violaceae*, *Malvaceae*, *Euphorbiaceae*, *Geraniaceae*, *Cruciferae*, *Fumariaceae*, *Urticaceae*, *Caryophyllaceae*, *Portulacaceae*, *Amaranthaceae*, *Cnecopodiaceae*, *Ranunculaceae*, *Boraginaceae*, *Labiatae*, *Solanaceae*, *Rubiaceae*, *Compositae* y *Scrophulariaceae* y las plantas monocotiledóneas pueden seleccionarse de las familias de *Poaceae*/Graminea, *Cyperaceae*, *Alismataceae*, *Lemnaceae*, *Potamogetonaceae*, *Hydrocharitaceae*, *Juncaceae*, *Liliaceae*, *Convallariaceae*, *Iridaceae*.

En una realización preferida, la planta se selecciona de una planta del género de *Apera*, *Alopecurus*, *Lolium*, *Bromus*, *Setaria*, *Echinochloa*, *Stellaria*, *Papaver*, *Polygonum*, *Galeopsis*, *Sinapis*, *Amaranthus*, *Brassica*, *Tripleurospermum*, *Matricaria* y *Poa*.

En una realización preferida adicional, la planta se selecciona del grupo de especies vegetales *Apera spica-venti*, *Alopecurus myosuroides*, *Avena fatua*, *Lolium perenne*, *Bromus hordeaceus*, *Poa annua*, *Stellaria media*, *Tripleurospermum inodorum*, *Chenopodium album*, *Amaranthus retroflexus*, *Galeopsis sp.*, *Papaver rhoeas*, *Lolium sp.*, *Setaria sp.*, *Echinochloa crus-galli* y *Conyza canadensis*.

Ejemplos no limitativos de kits de prueba desarrollados para la detección de resistencia son:

- En malas hierbas:

- Herbicidas de sulfonilurea y *Stellaria media*, *Galeopsis sp.*, *Papaver rhoeas*, *Tripleurospermum inodorum*, *Avena fatua*, *Apera spica-venti*, *Alopecurus myosuroides*, *Lolium sp.*
- Inhibidores de ACCasa y *Alopecurus myosuroides*, *Lolium sp.*, *Setaria sp.*, *Echinochloa crus-galli*
- Glicinas y *Conyza canadensis*, *Lolium sp.*

- En hongos patógenos:

- estrobilurinas y *Mycosphaerella graminicola*, *Blumeria graminis f. sp. tritici y hordei* y *Drehsiera tritica repentis* (DTR)
- Inhibidores de la biosíntesis de esteroides y *Mycosphaerella graminicola*, *Blumeria graminis f. sp. tritici y hordei*

- En plagas:

- Organofosfatos/carbamatos y *Myzus persicae*
- Piretroides sintéticos y *Meligetes aeneus*

Según la invención, el material vegetal usado para realizar el método de prueba puede ser la planta completa o puede ser al menos una zona seleccionada de cualquier parte de la planta. La zona seleccionada de la planta puede ser una zona tal como procedente al menos de flores, brotes, hojas, tallos, raíces, semillas, polen, rizomas, estambres, sépalos, pétalos, carpelos, estilos, estigmas, microsporangios, anteras, frutos, cotiledones, hipocótilos, epicótilos, xilemas y/o floemas (madera), peridermis (corteza), yemas, botones florales, piñas, escamas de piñas, tubérculos, bulbos, nudosidades de la raíz, resina o savia, o una combinación de los mismos.

Se prefiere material vegetal obtenido a partir de una flor. También se prefiere material vegetal obtenido a partir de un brote. También se prefiere material vegetal obtenido a partir de una hoja. Además se prefiere material vegetal obtenido a partir de un tallo. Aún más se prefiere material vegetal obtenido a partir de una raíz. También se prefiere material vegetal obtenido a partir de una semilla.

El kit de prueba puede desarrollarse para someter a prueba plantas en de la etapa o fase 12 (2 hojas) a la etapa o fase 23 (arborescente). La etapa/fase también puede ser 10, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 24, 25, 26.

Una vez que se obtiene una muestra del material vegetal, comienza una segunda etapa en el método según la invención. Es un objeto de la presente invención proporcionar un método de prueba, en el que el material vegetal usado está en una forma adecuada para ensayo. Una forma de este tipo puede ser una forma líquida, por ejemplo, una suspensión líquida. Una suspensión líquida del material vegetal puede obtenerse aplicando disolventes de extracción, tales como agua o etanol al material vegetal. El disolvente puede garantizar que se extraen todos los compuestos de uno o más grupos químicos presentes en el material vegetal. El material vegetal que puede someterse a ensayo puede ser fresco o no fresco.

En una realización preferida de la invención, el material vegetal es fresco. El material fresco puede usarse para análisis inmediatamente después de cosechar dicho material o puede usarse para análisis hasta unos pocos minutos después de cosecharse. El material fresco puede analizarse en el plazo de al menos 15 min, tal como 30 min, por ejemplo, 45 min, tal como 1 hora, por ejemplo, 2 horas, tal como 3 horas. Se prefiere que el material fresco se use lo antes posible después de cosecharse para evitar procesos de descomposición, tales como actividad enzimática.

En una realización, el material vegetal está congelado. El material vegetal congelado puede estar congelado hasta el punto de análisis, tal como congelado durante un periodo de al menos 5 años y puede ser descongelarse antes de realizar la prueba. Sin embargo, se prefiere que el material vegetal congelado se use para análisis inmediatamente después de retirarse del almacenamiento frío. Puede usarse cualquier proceso de congelación para congelar el material vegetal. Se prefiere cuando el material vegetal se somete al proceso de congelación inmediatamente después de la cosecha, por ejemplo, en el plazo de 5 min, tal como en el plazo de 15 min, por ejemplo, en el plazo de 30 min, tal como en el plazo de 45 min, por ejemplo, en el plazo de 60 min, tal como en el plazo de 75 min, por ejemplo, en el plazo de 90 min, tal como en el plazo de 105 min, por ejemplo, en el plazo de 120 min.

En otra realización de la invención, el material vegetal está seco. El proceso de secado puede representarse mediante aire, o nitrógeno, o puede ser un proceso de secado por congelación, tales como secado con nitrógeno. Adicionalmente, el material vegetal puede estar seco con calor, tal como secado al sol. El material vegetal puede estar sustancialmente seco, y la duración del proceso de secado depende del tipo de material vegetal. El secado al aire puede ser a aproximadamente 20°C y, por ejemplo, sin calor ni luz. El calor y la luz podrían destruir los compuestos del material.

La duración del periodo de tiempo antes de que las plantas reaccionen a la exposición a pesticidas y la sensibilidad de la especie vegetal al pesticida pueden depender de diferentes factores, tales como la especie y la edad de la planta. Las diversas especies vegetales tienen diferente sensibilidad a un tipo de pesticidas, por ejemplo, la especie vegetal *Lolium perenne* es más sensible al herbicida de sulfonilurea, yodosulfurón que *Apera spica-venti* o *Poa annua*. Por tanto, puede detectarse una menor dosis del herbicida expuesto a *Lolium perenne* que a *Apera spica-venti* o *Poa annua*, como respuesta fitoquímica correspondiente a una mayor biomasa reducida para *Lolium perenne* que para *Apera spica-venti* o *Poa annua*. Con respecto a la edad, las plántulas puede ser más sensibles que plantas de más edad a los herbicidas y por tanto las plántulas son más sensibles al herbicida.

En una realización, se desarrollan el método y kit con respecto a un organismo vivo mencionado en otra parte en el presente documento en al menos una etapa de desarrollo seleccionada de las escalas de crecimiento principales 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ó 9 que representan las etapas de germinación, formación de brotes, desarrollo de yemas, desarrollo de hojas, formación de brotes laterales/ahijamiento, alargamiento del tallo o crecimiento de rosetas, desarrollo de brotes (brote principal), desarrollo de partes vegetativas cosechables de plantas u órganos con propagación vegetativa/embuche (brote principal), emergencia de inflorescencia (brote principal)/espigazón, floración (brote principal), desarrollo de frutos, maduración o madurez de frutos y semillas, senescencia, comienzo de latencia. Se describen además escalas de crecimiento en "Growth stages of mono- and dictyodonous plants", BBCH Monograph, 2ª edición 2001. Editado por Uwe Meier, Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry.

En una realización, se desarrollan el método y kit para que puedan utilizarse con una especie o variedad vegetal en un periodo de tiempo que dura al menos más que el tiempo que el organismo tiene para crecer en una escala de crecimiento. De ese modo el método y kit pueden desarrollarse para usarse en, por ejemplo, la escala de crecimiento 0 y 1 (parcial o totalmente), o la escala de crecimiento 1 y 2 (parcial o totalmente); la escala de crecimiento 2 y 3 (parcial o totalmente); la escala de crecimiento 3 y 4 (parcial o totalmente). También pueden cubrirse más de dos escalas de crecimiento por el método y kit, por ejemplo, la escala de crecimiento 0 a 2 (parcial o totalmente), la escala de crecimiento 1 a 3 (parcial o totalmente), la escala de crecimiento 2 a 4 (parcial o totalmente), la escala de crecimiento 0 a 3 (parcial o totalmente), la escala de crecimiento 1 a 4 (parcial o totalmente), la escala de crecimiento 0 a 4 (parcial o totalmente).

La detección del efecto fitoquímico puede ser posible siempre que la planta esté viva. Esto puede ser entre menos de un día y hasta 21 días después de la exposición, tal como entre 1-20 días después de la exposición, por ejemplo, entre 4-7 días después de la exposición.

En una realización, el método se desarrolla para usarse para someter a prueba material vegetal antes de o sin exposición a un herbicida o al menos 1 día después de la exposición, por ejemplo, al menos 2 días, tal como al menos 3 días, por ejemplo, al menos 4 días, tal como al menos 5 días, por ejemplo, al menos 6 días, tal como al menos 7 días, por ejemplo, al menos 8 días, tal como al menos 9 días, por ejemplo, al menos 10 días, tal como al menos 11 días, por ejemplo, al menos 12 días, tal como al menos 13 días, por ejemplo, al menos 14 días, tal como al menos 15 días, por ejemplo, al menos 16 días, tal como al menos 17 días, por ejemplo, al menos 18 días, tal como al menos 19 días, por ejemplo, al menos 20 días, tal como al menos 21 días, por ejemplo, al menos 22 días, tal como al menos 23 días, por ejemplo, al menos 24 días, tal como al menos 25 días, por ejemplo, al menos 26 días, tal como al menos 27 días, por ejemplo, al menos 28 días, tal como al menos 29 días, por ejemplo, al menos 30 días, tal como al menos 35 días después de la exposición.

En una realización, el método de prueba para determinar la resistencia se refiere a todos los pesticidas que representan grupos con diferente modo de acción, por ejemplo, glifosato y herbicidas de tipo glifosato o herbicidas de sulfonilurea.

La detección de una huella digital en una planta puede servir, en una realización de la invención, para el fin de una señal de "advertencia temprana" de iniciación del desarrollo de resistencia en la planta antes de que se notifique que un determinado pesticida ha perdido su efecto.

Se ha notificado que cuando se exponen plantas a estrés, pueden reaccionar cambiando su composición fitoquímica (bioquímica). La presente invención presenta un método mediante el que se obtiene una huella digital reproducible relacionada con compuestos fitoquímicos, proporcionando por tanto herramientas analíticas para el establecimiento de la exposición a y la identificación de compuestos conocidos así como desconocidos. Existe una variedad de factores de estrés que pueden tener todos un impacto sobre la composición química de plantas. La planta puede estar expuesta a más de un factor de estrés, en el que en una realización, el efecto de la exposición es sinérgico y, por tanto, da como resultado una huella digital relacionada con compuestos fitoquímicos que refleja el efecto sinérgico de los factores de estrés individuales. En otra realización, en la que la planta puede estar expuesta a más de un factor de estrés, la huella digital resultante relacionada con compuestos fitoquímicos refleja el efecto antagonista de los factores de estrés individuales. Está dentro del alcance de la invención desarrollar una huella digital convencional relacionada con compuestos fitoquímicos para cualquier combinación de factores de estrés tales como para combinaciones de pesticidas, por ejemplo, combinaciones de herbicidas.

La especie vegetal usada en la invención puede tratarse con al menos un herbicida, tal como al menos dos

herbicidas, por ejemplo, al menos tres herbicidas, tal como al menos cuatro herbicidas, por ejemplo, al menos cinco herbicidas, tal como al menos seis herbicidas, por ejemplo, al menos siete herbicidas, tal como al menos ocho herbicidas, por ejemplo, al menos nueve herbicidas, tal como al menos diez herbicidas. Los herbicidas usados pueden ser cualquiera adecuado para tratar la especie vegetal, o pueden seleccionarse entre los herbicidas mencionados en el presente documento, de manera que se da a conocer cualquier combinación de los herbicidas mencionados en los números facilitados anteriormente.

Según la invención uno de los factores de estrés es abiótico, tal como estrés químico y/o estrés físico.

En el presente contexto, estrés químico puede estar provocado por pesticidas, tales como herbicidas. Los herbicidas están todos diseñados para destruir plantas alterando y afectando a la homeostasis bioquímica de las células vegetales. Las plantas reaccionan a la exposición de herbicidas produciendo o descomponiendo los compuestos fitoquímicos. También pueden reaccionar cambiando la concentración de compuesto(s) ya existente(s). El efecto resultante sobre las plantas depende del modo de acción individual del herbicida.

En una realización de la invención, el método de prueba para determinar la exposición de pesticidas se refiere a herbicidas y/o pesticidas que comprenden componentes activos seleccionados del grupo que consiste en herbicidas de sulfonilurea, herbicidas inhibidores de ACCasa, herbicidas de glicina, fungicidas de estrobilurina, fungicidas inhibidores de la biosíntesis de esteroides, insecticidas de organofosfato, insecticidas de carbamato e insecticidas de piretroides sintéticos o una combinación de los mismos.

En otra realización, el método es para someter a prueba la resistencia a azoxistrobina (fungicidas de estrobilurina) o pirimicarb (insecticida de carbamato).

El pesticida/herbicida también puede seleccionarse del grupo que consiste en glifosato, bromoxinil, pendimetalina, metsulfurón metilo, prosulfocarb, clodinafop-propargilo, fenoxaprop-p-etilo, yodosulfurón, mesosulfurón, sulfosulfurón y flupirsulfurón o una combinación de los mismos.

Los componentes activos pueden representar todos diferentes modos de acción sobre las plantas diana. Los pesticidas/herbicidas con los componentes activos descritos anteriormente se usan todos ampliamente en Norteamérica y Europa Occidental para el control de, por ejemplo, hierbas y plantas latifoliadas. Otros pesticidas distintos a los mencionados anteriormente también están dentro del alcance de la invención. Pueden ser los descritos en The Pesticide Manual, British Crop Protection Council. Por ejemplo, insecticidas, acaricidas, nematocidas/vermicidas, rodenticidas y fungicidas pueden ser los factores de inducción de estrés.

El glifosato (GLY) es un herbicida no selectivo que controla hierbas y plantas latifoliadas perennes y anuales emergentes. El glifosato inhibe la actividad de la enzima EPSP (5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato) de la ruta de biosíntesis de ácidos aromáticos en plantas. Se absorbe a través de la cutícula cerosa en las hojas y se produce una rápida translocación a través del floema hasta las raíces, rizomas y meristemos apicales. Se degrada mediante una rápida acción microbiana, con una semivida de 3-5 semanas. Es no volátil y no se degrada fotoquímicamente. La solubilidad en agua es de 11,6 g/l a 25°C. Se une fuertemente a partículas de tierra y de ese modo es inmóvil a menos que se transporte con la tierra.

El bromoxinil (BRY) es un herbicida selectivo con cierta actividad sistemática. El herbicida se absorbe por el follaje a través de penetración cuticular. El bromoxinil destruye mediante inhibición de la fotosíntesis y la respiración de la planta en plantas latifoliadas anuales. Se degrada rápidamente en la mayoría de los tipos de tierra, con una semivida del orden de dos semanas que puede reducirse de manera considerable a bajas temperaturas. Es soluble en agua (130 mg/l), potencialmente perjudicial para peces e invertebrados acuáticos para los que es tóxico si alcanza masas de agua.

La pendimetalina (PEN) es un herbicida selectivo que inhibe el crecimiento celular inhibiendo la división celular de todas y cada una de las células vegetales actuando como una toxina mitótica. Se absorbe por las raíces y hojas, pero inicialmente limita el crecimiento radicular, tal como el desarrollo de raíces laterales o secundarias. La pendimetalina es de moderadamente persistente en suelo franco-arenoso húmedo (semivida de 50 días) a altamente persistente en suelo limoso húmedo (semivida de 140 días) y en suelo franco-arcilloso limoso seco (250 días). Es un herbicida muy estable excepto cuando se volatiliza de superficies de tierra húmeda. La solubilidad en agua es de 0,3 mg/l a 20°C. Por tanto, es probable que se transfiera a otros compartimentos ambientales aunque puede moverse con partículas de tierra hasta masas de agua en las que es tóxica para los peces.

El metsulfurón metilo (METS) es un potente inhibidor del crecimiento vegetal usado con cultivos de trigo y cebada para el control de especies latifoliadas y la supresión de algunas hierbas. El herbicida se capta por el follaje o las raíces y se transloca a través del xilema y floema. El metsulfurón metilo es un herbicida selectivo que actúa inhibiendo la enzima acetolactato sintasa (ALS) que cataliza la síntesis de los tres aminoácidos de cadena ramificada valina, leucina e isoleucina. El mecanismo de acción preciso se desconoce, pero poco después de la aplicación del herbicida, se detiene rápidamente la división de células vegetales, y se produce la muerte en el plazo de una a tres semanas. La acumulación de sustratos de ALS (por ejemplo α -cetobutirato) en hojas puede ser responsable del cese del crecimiento de la planta con una disminución de la producción de nuevas hojas y órganos reproductores. El metsulfurón metilo es móvil en la mayor parte de suelos y la movilidad se potencia a medida que

aumenta el pH.

Todos los herbicidas mencionados anteriormente se aplican actualmente a cultivos importantes, tales como maíz, trigo, cebada, soja, avenas, guisantes, patatas y tomates. Cuando se aplican herbicidas a un campo cultivado de cultivos adyacentes a zonas que no son objetivo, puede verse afectado por herbicidas también. La presente invención puede usarse para someter a prueba si malas hierbas u hongos patógenos o plagas, por ejemplo, en plagas de insectos en cultivos tratados con pesticidas han desarrollado resistencia. La invención también puede usarse para someter a prueba si plantas en una zona que no es objetivo se ven afectadas por un tratamiento en un campo cultivado adyacente y por tanto se desarrolla resistencia o para someter a prueba si un cultivo convencional se ha contaminado con un cultivo tolerante a herbicidas modificado genéticamente.

Además, en la presente invención, el método de prueba puede aplicarse a plantas que están potencialmente expuestas a y que desarrollan mecanismos de defensa frente al estrés físico, tal como temperatura, viento, luz UV, daño físico, cualidad del suelo y humedad del suelo, sal etc.

En otra realización, los factores de estrés pueden ser biótico, tal como estrés biológico y/o alelopatía. El término "estrés biológico" se entiende como estrés y posiblemente daño visual provocado por herbívoros, patógenos de plantas y/o competencia con otras plantas. Esta última también puede denominarse alelopatía, tal como competencia con otras plantas y/o compuestos químicos de otras plantas que afectan/someten a estrés a la planta con la que se realiza una prueba para detectar si la planta ha cambiado en la sensibilidad a este estrés biológico, por ejemplo, se ve menos influida.

El término "fitoquímico" tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier producto químico o compuesto o nutriente o compuesto fundamental presente en las plantas. Existe un amplio número de compuestos presentes en plantas. Algunos de los compuestos pueden detectarse fácilmente en circunstancias en las que las plantas no están expuestas a pesticidas. Sin embargo, si se exponen plantas a pesticidas las rutas bioquímicas dentro de las células vegetales pueden verse afectadas. La influencia de pesticidas sobre rutas bioquímicas puede conducir a un aumento o cambio, tal como eliminación en la concentración de compuestos ya existentes, o puede conducir a la producción de compuestos no presentes normalmente en plantas no expuestas a pesticidas.

En una realización de la invención, se determina la composición de compuestos fitoquímicos de al menos un tipo y/o grupo.

En una realización de la invención, el compuesto fitoquímico es una sustancia, o al menos parte de una sustancia, o un derivado de los grupos aminoácidos, aminos, azúcares, flavonoides, compuestos fenólicos, saponinas, saponinas, iridoides, glicósidos, alcaloides, alcaloides alcalinos, compuestos que contienen C, compuestos que contienen N, compuestos que contienen S, compuestos que contienen P, compuestos que contienen O, cualquier elemento fundamental, terpenoides, lípidos, esteroides, carotenoides, quinonas, cumarinas y nutrientes, tales como cualquier compuesto necesario para que sobreviva la planta, por ejemplo, sales.

En otra realización, al menos dos de los grupos mencionados se hacen reaccionar de manera simultánea en una muestra de extracto o con diferentes muestras de extracto para preparar una escala de colores convencional y para realizar la prueba. Ejemplos no limitativos de los dos grupos son: aminoácidos y aminos, azúcares y flavonoides, compuestos fenólicos y saponinas, saponinas e iridoides, glicósidos y alcaloides, alcaloides alcalinos y compuestos que contienen C, compuestos que contienen N y compuestos que contienen S, compuestos que contienen P y compuestos que contienen O, cualquier elemento fundamental y terpenoides, lípidos y esteroides, carotenoides y quinonas, cumarinas y aminoácidos, aunque ha de entenderse como dada a conocer cualquier otra combinación.

Por el término elementos fundamentales quiere decirse cualquier compuesto representado en el sistema periódico.

El análisis químico de pesticidas es muy difícil cuando la presencia del pesticida en el entorno es baja. Además, es muy costoso realizar exámenes químicos para determinar compuestos químicos, tales como pesticidas y/o sus compuestos de descomposición y/o adyuvantes presentes en pesticidas. Mediante la presente invención ahora es posible determinar la resistencia a compuestos químicos, tales como pesticidas mediante un método de prueba sencillo y asequible.

En una realización de la invención, el método de prueba comprende las siguientes etapas:

- poner en contacto una forma que puede someterse a ensayo de material vegetal con un soporte para recibir al menos una parte de dicho material vegetal,
- someter dicho soporte a un disolvente,
- opcionalmente secar dicho soporte,
- opcionalmente poner en contacto dicho soporte con un reactivo químico,
- obtener una huella digital relacionada con compuestos fitoquímicos de dicha forma que puede someterse a ensayo.

La huella digital obtenida puede basarse en uno o más grupos separados y/o no separados de compuestos químicos o fitoquímicos. En una realización preferida, la prueba se realiza con grupos no separados de compuestos químicos o fitoquímicos.

- 5 En el presente contexto, una forma que puede someterse a ensayo puede ser un líquido, o un líquido mezclado con sólidos, tal como líquidos mezclados con sales. Una forma que puede someterse a ensayo de un organismo también puede ser material comprimido opcionalmente filtrado para retirar componentes del material comprimido, es decir, un ejemplo de una forma que puede someterse a ensayo del organismo es un filtrado.

- 10 En otra realización, las pruebas que comprenden etapas similares tal como se describió anteriormente pero la reacción química se realiza antes de que la forma que puede someterse a ensayo del material vegetal se ponga en contacto con un soporte, de ese modo no es necesario someter el soporte a disolvente.

Cuando se somete a prueba usando uno o más grupos no separados de compuestos químicos o fitoquímicos, el soporte sólido puede estar parcial o totalmente incluido en un extracto del organismo. También puede realizarse la determinación de color sobre un soporte sólido que ha absorbido parte de o todo el volumen del extracto u otra forma que puede someterse a ensayo del organismo.

- 15 Obtener una huella digital relacionada con compuestos fitoquímicos puede ser en forma de una reacción de color con el soporte, tal como una o más manchas coloreadas, por ejemplo, con diferentes colores y/o diferente intensidad de color.

- 20 En una realización, el reactivo químico y/o disolvente se basa en uno o más de los compuestos seleccionados del grupo de rojo de clorofenol, rojo de metilo, rojo de etilo, azul de bromotimol, sal de sodio de 2,6-diclorofenolindofenol, púrpura de bromocresol, ninhidrina, vainillina + hidróxido de potasio, glucosa, 4-cloro-7-nitrobenzofurazano, 2,4-dinitrofenilhidrazina, cloroformiato de 9-fluorenilmetilo, hidróxido de tetrabutilamonio, yodo + yoduro de potasio, nitrato de bismuto (III), sulfato de amonio y hierro (III), 2-metoxi-2,4-difenil-3(2H)furanona (MDPF), difenilborinato de 2-aminoetilo, cloruro de hierro (III), cloruro de aluminio, cloruro de berberina dihidratado, sal de sodio de 1,2-naftoquinon-4-sulfona, antrona, 8-hidroxiquinolona, 2-aminodifenil(bifenil-2-amina), orcinol, urea, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido 4-aminobenzoico, ácido molibdatofosfórico, 2',7'-diclorofluoresceína, sal de amonio del ácido 8-anilinaftalin-1-sulfónico, rodamina, yodo, yoduro de potasio, molibdato de amonio-cloruro de estaño (II), cloruro de cobalto (II), cloruro de paladio (II), nitrato-yoduro de potasio, vainillina, ácido sulfúrico, naftoresorcinol, azul de metileno, β-naftol, timol, fluoresceína, amoniaco, verde de bromocresol, azul de bromofenol, permanganato de potasio, 2,7-diclorofluoresceína, rodamina 6G, éster 2-aminoetilico del ácido difenilbórico, ácido fosfórico, yodo, yoduro de potasio, molibdato de amonio-cloruro de estaño (II), cloruro de cobalto (II), cloruro de paladio (II), 1-naftol, ninhidrina, nitrato de bismuto (III)-yoduro de potasio, ácido molibdatofosfórico, rodamina B, (p- y o-) anisaldehído, nitrato de plata, cloruro de hierro (III) y cloruro de zinc y productos químicos o mezclas de los mismos. El reactivo químico necesario para la reacción es 0,001 - 10 mg/ml de extracto dependiendo del mecanismo de reacción, las condiciones y productos químicos complementarios.

- 35 El soporte para recibir el material puede ser un material sólido, soporte sólido o un material menos sólido, tal como un material blando, por ejemplo, un material líquido. El soporte puede pretratarse con una sustancia que puede promover reacciones cuando se pone en contacto con el material vegetal. Dichas reacciones pueden detectarse, por ejemplo, mediante métodos visuales, radiactivos, fluorescentes o inmunológicos. Se prefiere cuando el soporte sólido está compuesto por un material adecuado de función como papel de filtro, tal como, por ejemplo, nitrocelulosa o papel Whatman u otro material que puede absorber partes de líquido de la forma que puede someterse a ensayo del organismo.

En una realización preferida, el material sólido o soporte sólido está en forma de una varilla o un disco. También se prefiere una varilla o un disco compuesto por un tejido que puede absorber al menos una parte de la disolución con los productos fitoquímicos que han reaccionado opcionalmente con un reactivo químico.

- 45 El soporte sólido está opcionalmente en el kit descrito en otra parte en el presente documento. El color del extracto de la planta o el extracto que se hace reaccionar con un reactivo químico puede determinarse colocando un recipiente con el extracto y con o sin un soporte sólido dentro del recipiente cerca de la escala de colores convencional o un resultado convencional y determinarse el color del extracto de la planta o el extracto que se hace reaccionar con un reactivo químico. El soporte sólido también puede retirarse del recipiente antes de comparar el color del soporte sólido con los colores de la escala de colores convencional.

- 50 El soporte sólido puede usarse para poner en contacto el extracto que se hace reaccionar, pero también puede usarse para obtener un fondo con un color convencional detrás de un recipiente que contiene una muestra coloreada procedente de una planta, tal como un extracto coloreado. Cuando el soporte sólido se usa como color de fondo, por ejemplo, un color blanco, éste minimiza el riesgo de una determinación errónea del color del extracto dentro de un recipiente.

55 En una realización, la escala de colores convencional puede ser parte integral del soporte sólido o los medios de contención que comprenden el soporte sólido. El soporte sólido puede comprender una sección para aplicar el extracto o extracto que se hace reaccionar del material que va a someterse a prueba y otra sección del soporte

sólido puede comprender una escala de colores convencional. Los medios de contención pueden ser un casete, por ejemplo, que encierra un soporte sólido y una escala de colores convencional puede unirse al casete y/o al soporte sólido encerrado.

5 El soporte sólido también puede funcionar como una varilla o un disco que se coloca dentro del recipiente con el extracto. El soporte sólido puede absorber parte de o todo el volumen del extracto o puede sumergirse dentro del extracto. El color del soporte sólido o del extracto puede determinarse cuando el soporte sólido ha absorbido parte de o todo el extracto o cuando el soporte sólido se sumerge dentro del extracto, también el color puede detectarse cuando un volumen del extracto se absorbe sólo sobre una parte del soporte sólido. En este último caso, el extracto puede aspirarse por el soporte sólido, por ejemplo, introduciendo el soporte sólido en el extracto o aplicando extracto sobre el soporte sólido. Por extracto quiere decirse extracto en bruto del organismo que va a someterse a prueba, extracto en un disolvente, por ejemplo, en agua o extracto que se ha sometido a una reacción, por ejemplo, una reacción química y/o una reacción de color.

En una realización, el uso de reactivos químicos y soporte sólido, por ejemplo, varilla/discos para determinar la presencia de resistencia en un organismo vivo comprende las siguientes etapas:

- 15 - poner en contacto una forma que puede someterse a ensayo de dicho organismo vivo, por ejemplo, material vegetal con al menos un reactivo químico,
- proporcionar una reacción química entre la forma que puede someterse a ensayo de material procedente del organismo vivo y el al menos un reactivo químico,
- 20 - poner en contacto un soporte sólido con el material procedente del organismo vivo que se hace reaccionar químicamente con el al menos un reactivo químico, de ese modo
- obtener un soporte sólido con un color (detección visual o con luz UV)
- comparar el color y la intensidad de color con una escala de visualización convencional,
- evaluar la existencia de resistencia en dicho organismo vivo.

La escala de visualización convencional se obtiene tal como se describe en otra parte en el presente documento.

25 En el presente contexto, el término “disolvente” se entiende que cubre una sustancia o una combinación de dos o más sustancias, en la que el disolvente puede ser una combinación de sustancias líquidas y/o gaseosas. Un disolvente puede ser un reactivo, un eluyente o un medio de extracción. Estos tres últimos pueden estar en un estado físico sólido o líquido, o pueden estar en forma de un gas.

30 En una realización de la invención, está previsto un extracto de material procedente de una planta. La extracción puede realizarse a temperaturas frías o calientes, tal como por medio de ultrasonidos o agitación.

El disolvente de extracción puede ser cualquier disolvente utilizable. Ejemplos no limitativos son agua con o sin productos químicos sólidos, líquidos o gaseosos diluidos, alcohol, ácido, éter, petróleo o una combinación de los mismos. Los disolventes mencionados pueden estar en cualquier concentración, tal como, por ejemplo, el 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o el 100%.

35 Ejemplos de disolventes son disolventes de éter de petróleo, ácido acético al 10% en etanol al 96%, etanol al 75%. La extracción puede realizarse con material vegetal fresco o no fresco, por ejemplo, con material congelado con o sin un proceso de descongelación antes de iniciar el proceso de extracción.

Según la invención, los disolventes y el soporte pueden tener diferentes polaridades, tales como entre -0,1-10, por ejemplo, entre 2-8, tal como entre 4-6 según se define por Snyder, (1974).

40 En un aspecto de la invención, el patrón de biomarcadores se detecta mediante el uso de técnicas disponibles comercialmente conocidas por el experto en la técnica, tales como cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) o cromatografía de gases o espectrometría de masas (EM), o una combinación de métodos analíticos. Por ejemplo, puede emplearse una evaluación densitométrica de cromatogramas en capa fina usando un escáner densitométrico/exploración de vídeo. Es importante que el mismo método de análisis se aplique cuando se detecta tanto el patrón de biomarcadores convencional, como el patrón de biomarcadores que resulta de la planta que va a someterse a prueba para determinar la existencia de resistencia.

45 En una realización preferida el patrón de biomarcadores se detecta como un sistema de colores, por ejemplo, como un solo color del extracto o del extracto que se hace reaccionar con al menos un producto químico. Diferentes reacciones a un pesticida pueden visualizarse mediante diferentes colores y/o diferentes tonos de color del extracto o del extracto que se hace reaccionar.

50 En una realización de la invención, el patrón de biomarcadores se detecta mediante el uso de cromatografía en capa fina (CCF). La CCF es un método de separación cromatográfica sencillo y bien conocido. La ventaja técnica de usar

técnicas de CCF en comparación con, por ejemplo, HPLC, es la reacción de color visual del biomarcador de planta. Adicionalmente, la CCF es un análisis más económico en comparación con otros análisis analíticos. En una realización de la invención, el método de CCF es circular.

- 5 Otros métodos de detección de biomarcadores relevantes dentro del alcance de la invención son espectrofotometría de infrarrojos, espectrofotometría, refractometría, resonancia magnética nuclear y electroforesis. Pueden usarse compuestos radiactivos en dichos métodos. Por ejemplo, puede colocarse una "película" de radiactividad sobre una placa de CCF, tras lo cual un patrón de biomarcadores emerge donde se colocan los compuestos radiactivos.

Cuando se usa el método de prueba mediante cromatografía en capa fina según la invención, comprende las siguientes etapas:

- 10 - poner en contacto una forma que puede someterse a ensayo de dicho material vegetal con una placa de CCF,
 - someter dicha placa de CCF a un disolvente,
 - opcionalmente secar dicha placa de CCF,
 - opcionalmente poner en contacto dicha placa de CCF con un reactivo químico,
 - obtener un patrón de biomarcadores de dicha forma que puede someterse a ensayo.
- 15 En un aspecto adicional, los biomarcadores se separan por medio de anticuerpos posiblemente unidos a un soporte o anticuerpos en el disolvente.

- 20 Para verificar las formas de la huella digital de la composición, es decir, el cambio de la composición de los biomarcadores o cambios fitoquímicos (bioquímicos), pueden usarse diferentes placas de CCF, disolventes y reactivos químicos. Esto da como resultado diferentes reacciones de color, que pueden inspeccionarse visualmente. Las placas de CCF usadas en la prueba de la invención pueden ser placas de CCF disponibles comercialmente, y pueden estar compuestas por celulosa o gel de sílice. Los tipos de placas de CCF elegidas para la prueba se seleccionan según la especie vegetal sometida a prueba, y según los compuestos específicos de los que se desea determinar su existencia o ausencia en el material vegetal.

- 25 Una vez que se ha colocado el extracto del material vegetal sobre una placa de CCF, la placa de CCF puede colocarse en una cámara de CCF que contiene un eluyente químico. El eluyente se absorbe por el material de la placa y esto inicia el desarrollo de la prueba. Los compuestos biomarcadores reaccionan con el material de la placa y el eluyente. Todos los biomarcadores tienen diferente afinidad por el material de la placa y por el eluyente. Por tanto, los biomarcadores aparecerán en diferentes posiciones sobre el material de la placa. Cuanto mayor sea la afinidad que tienen los biomarcadores por el eluyente, más lejos migrarán sobre la placa de CCF. La primera etapa de "desarrollo" de la placa, es decir la reacción del material vegetal con el material de la placa y el elemento puede ser un periodo de 120 minutos, tal como 90 minutos, por ejemplo, 60 minutos.

En una realización de la invención, el disolvente comprende la fase superior de n-butanol y ácido fórmico en una razón de 2:1. El disolvente puede ser sólo estable durante hasta 1 día y por tanto tiene que renovarse diariamente.

- 35 En otra realización, el disolvente comprende n-butanol, ácido acético y agua en una razón de (4:1:5). El disolvente es estable durante varios días y se almacena preferiblemente en un lugar fresco.

- 40 La placa de CCF puede entonces secarse al aire y un reactivo químico puede ponerse en contacto con la placa de CCF, tal como mediante pulverización. El tipo de reactivo de la invención puede variar según el tipo de placa de CCF y el tipo de biomarcador. Como el reactivo de la invención se aplica a la placa de CCF secada. Se desarrolla una reacción de color única y reproducible. Según la invención, la reacción de color puede confirmar o rechazar la presencia de biomarcadores específicos después de la exposición a estrés, tal como herbicidas.

Por consiguiente, un fin de la invención es proporcionar un método de prueba, en el que el patrón de biomarcadores se obtiene como resultado de la combinación específica de parámetros, tales como dicho soporte, por ejemplo, placas de CCF, dicho disolvente y dicho reactivo químico.

- 45 Un objeto de la presente invención es proporcionar un kit de ensayo para someter a prueba la resistencia en un organismo vivo, comprendiendo el kit

- al menos un disolvente y/o reactivo,
- al menos una escala de colores convencional,
- al menos un recipiente/vidrio
- opcionalmente al menos un soporte sólido (por ejemplo varillas y/o discos).

- 50 El disolvente y/o reactivo puede ser disolvente y/o reactivo tal como se describe en otra parte en el presente

documento. La cantidad de disolvente/reactivo puede ser entre unas pocas gotas, por ejemplo, mantenido sobre un soporte sólido o en un matraz hasta 100 ml. Se prefiere un volumen de disolvente/reactivo de menos de 75 ml, por ejemplo, menos de 50 ml, tal como menos de 25 ml, por ejemplo, menos de 15 ml. También se prefiere un volumen de disolvente y/o reactivo de entre 0,5 y 5 ml, tal como de 5-10 ml, por ejemplo, de 10-15 ml, por ejemplo, de 15-20 ml. El volumen de disolvente y reactivo pueden ser diferentes. Por tanto pueden seleccionarse volúmenes preferidos para cada disolvente/reactivo entre los mencionados anteriormente.

El volumen preferido de extracto en bruto puede ser de entre 0,1 ml y 5 ml, tal como de entre 0,15 ml y 4 ml, por ejemplo, de entre 0,2 ml y 3 ml, tal como de entre 0,25 ml y 2 ml, por ejemplo, de entre 0,3 ml y 1 ml, tal como de entre 0,35 ml y 0,8 ml, por ejemplo, de entre 0,4 ml y 0,5 ml.

Puede obtenerse un extracto mediante la extracción de una cantidad de material vegetal en un disolvente, la razón entre el peso de material vegetal y el volumen de disolvente puede ser de entre 1:100 y 1:1, tal como al menos 1:80, por ejemplo, al menos 1:60, tal como al menos 1:40, por ejemplo, al menos 1:30, tal como al menos 1:25, por ejemplo, al menos 1:20; tal como al menos 1:15, por ejemplo, al menos 1:10, tal como al menos 1:5, por ejemplo, al menos 1:2. Un ejemplo que ilustra la razón descrita es de 0,2 mg de material vegetal extraídos con 3,5 ml de disolvente.

El extracto puede diluirse además con el mismo disolvente usado para la extracción o con otro disolvente. La razón final entre el peso de material vegetal usado inicialmente para la extracción y el volumen total de disolvente opcionalmente antes de realizar ninguna reacción adicional del extracto puede ser de entre 1:400 y 1:1, tal como al menos 1:300, por ejemplo, al menos 1:250, tal como al menos 1:200, por ejemplo, al menos 1:150, tal como al menos 1:100, por ejemplo, al menos 1:80; tal como al menos 1:70, por ejemplo, al menos 1:60, tal como al menos 1:50, por ejemplo, al menos 1:40. Un ejemplo que ilustra la razón descrita es de 0,2 mg de material vegetal extraído con 3,5 ml de disolvente y diluido además con 10 ml de disolvente.

La al menos una escala de colores convencional también puede ser una descripción de los colores que pueden ser los colores para la determinación, es decir, posibles colores del extracto y entre los que ha de distinguir el usuario. La escala de colores convencional puede comprender al menos dos colores y/o tonos de colores, tales como al menos tres colores y/o tonos de colores, por ejemplo, al menos cuatro colores y/o tonos de colores, tales como al menos cinco colores y/o tonos de colores, por ejemplo, al menos seis colores y/o tonos de colores, tales como al menos siete colores y/o tonos de colores, por ejemplo, al menos ocho colores y/o tonos de colores, tales como al menos nueve colores y/o tonos de colores, por ejemplo, al menos diez colores y/o tonos de colores, tales como al menos 11 colores y/o tonos de colores, por ejemplo, al menos 12 colores y/o tonos de colores, tales como al menos 13 colores y/o tonos de colores, por ejemplo, al menos 14 colores y/o tonos de colores, tales como al menos 15 colores y/o tonos de colores, por ejemplo, al menos 16 colores y/o tonos de colores, tales como al menos 17 colores y/o tonos de colores, por ejemplo, al menos 18 colores y/o tonos de colores, tales como al menos 19 colores y/o tonos de colores, por ejemplo, al menos 20 colores y/o tonos de colores.

El disolvente y/o reactivo descrito en otra parte en el presente documento pueden sustituirse por anticuerpos contra sustancias en uno o más de los grupos de compuestos mencionado en otra parte en el presente documento. Los anticuerpos cuando se unen a productos fitoquímicos pueden detectarse mediante métodos conocidos en la técnica.

En una realización, el kit comprende:

- al menos un soporte sólido (por ejemplo varillas y/o discos),
- al menos un disolvente,
- al menos un medio de compresión,
- opcionalmente al menos una escala de colores convencional,
- al menos un vidrio/recipiente.

El kit de ensayo puede comprender además uno o más de los componentes seleccionados del grupo de:

- al menos un reactivo químico,
- al menos un mortero con mano de mortero y/o al menos una caja con bolas para agitar y/o al menos una prensa manual
- al menos una pipeta,
- al menos una lámpara UV,
- al menos un calentador y/o al menos una cubierta caliente compuesta por reactivos químicos y disolventes,
- al menos una balanza,

- al menos unas tijeras,
- al menos un par de pinzas,
- al menos una bolsa de plástico,
- al menos una información de identificación para identificar la especie vegetal,

- 5
- al menos unas instrucciones que describen cómo usar el kit de ensayo,
 - al menos una jeringa,
 - al menos un filtro.

Los ejemplos de elementos incluidos adicionalmente en el kit comprenden una de las combinaciones, aunque cualquier combinación de los elementos enumerados anteriormente pretende estar descrita:

- 10
- al menos un reactivo químico, mortero con mano de mortero y/o bolas para agitar y/o prensa manual, pipeta.
 - al menos un reactivo químico, calentador y/o cubierta caliente compuesta por reactivos químicos y disolventes, información de identificación para identificar la especie vegetal.
- 15
- al menos un reactivo químico, mortero con mano de mortero y/o bolas para agitar y/o prensa manual, calentador y/o cubierta caliente compuesta por reactivos químicos y disolventes, jeringa, filtro.
 - calentador y/o cubierta caliente compuesta por reactivos químicos y disolventes, balanza, tijeras, información de identificación para identificar la especie vegetal, instrucciones que describen cómo usar el kit de ensayo.
- 20
- al menos un reactivo químico, mortero con mano de mortero y/o bolas para agitar y/o prensa manual, pipeta, calentador y/o cubierta caliente compuesta por reactivos químicos y disolventes, tijeras, par de pinzas, información de identificación para identificar la especie vegetal, instrucciones que describen cómo usar el kit de ensayo, jeringa, filtro.

En una realización preferida, el kit comprende los siguientes componentes:

- 3 soportes sólidos (por ejemplo varillas y/o discos),
- 25
- 3 cajas con tapas y cada una con 4 bolas de vidrio
 - 6 vidrios,
 - 3 jeringas cada una con 13,5 ml de disolvente,
 - 1-3 recipiente con reactivos químicos,
 - 3 pipetas,
- 30
- 1 balanza,
 - 1 tijera,
 - 1 par de pinzas,
 - 3 bolsas de plástico,
 - 1 información de identificación para identificar la especie vegetal,
- 35
- 1 instrucciones que describen cómo usar el kit de ensayo incluyendo una escala de colores convencional,
 - 3 filtros.

Los componentes del kit pueden estar ubicados en una caja. La caja puede ser de cartón y/o plástico o cualquier otro material adecuado.

- 40
- El kit de prueba puede incluir componentes y reactivos para realizar tres pruebas. Con respecto a un campo de cultivo tratado con herbicida, se prefiere que se recojan tres muestras de plantas de malas hierbas en tres diferentes lugares en el campo tratado. Cada muestra puede ser de, por ejemplo, 20-25 plantas. El kit de prueba también puede incluir componentes para más de 3 pruebas, por ejemplo, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o incluso más.

Las bolas de vidrio del kit pueden tener cualquier tamaño adecuado tal como entre 1 mM y 3 cM de diámetro, por ejemplo, entre 1,1 mM y 1 cM, tal como entre 1,2 mM y 9 mM, por ejemplo, entre 1,3 mM y 8 mM, tal como entre 1,4 mM y 7 mM, por ejemplo, entre 1,5 mM y 6 mM, tal como entre 1,6 mM y 6 mM, por ejemplo, entre 1,7 mM y 5 mM, tal como entre 1,8 mM y 4 mM, por ejemplo, entre 1,9 mM y 3 mM, tal como entre 2 mM y 2,5 mM.

- 5 Las bolas de vidrio se usan para aplastar o comprimir el material vegetal mediante agitación en un recipiente cerrado que contiene las bolas de vidrio junto con material vegetal y opcionalmente un disolvente.

El filtro del kit puede ser un papel de filtro usado para filtrar el extracto o puede ser un cartucho de filtro que incluye el filtro, en el que el cartucho de filtro puede conectarse a una jeringa. La jeringa puede usarse para forzar al extracto o extracto que se hace reaccionar a través del filtro.

- 10 Los recipientes con reactivos químicos pueden tener cualquier tamaño adecuado, por ejemplo, un tamaño de entre 0,5 y 30 ml. Los recipientes pueden incluir un volumen de reactivo químico correspondiente a varias pruebas que van a realizarse, por ejemplo, para 2, 3, 4, 5, 6 o más pruebas.

- 15 Los disolventes y/o reactivos químicos de un recipiente o jeringa pueden usarse dividiendo el volumen de manera que el material vegetal se comprima en una parte del disolvente, por ejemplo, 3,5 ml, por ejemplo, agitando durante, por ejemplo, aproximadamente 2 minutos y luego de nuevo durante aproximadamente ½ minuto cuando, por ejemplo, se añaden 10 ml de disolvente.

En una realización, el ensayo comprende componentes, en el que algunos son para usarse varias veces y algunos componentes son desechables.

- 20 En una realización, los componentes que pueden reutilizarse son medios de compresión, por ejemplo, mortero con mano de mortero y/o al menos una caja con bolas para agitar y/o al menos una prensa manual, escala de colores convencional, vidrio/recipiente, pipeta, lámpara UV, calentador, balanza, tijeras, par de pinzas, información de identificación para identificar la especie vegetal, instrucciones que describen cómo usar el kit de ensayo, jeringa, filtro.

- 25 En otra realización, los componentes que pueden reutilizarse son medios de compresión, por ejemplo, mortero con mano de mortero y/o al menos una caja con bolas para agitar y/o al menos una prensa manual, escala de colores convencional, lámpara UV, calentador, balanza, tijeras, par de pinzas, información de identificación para identificar la especie vegetal, instrucciones que describen cómo usar el kit de ensayo.

- 30 En una realización, los componentes desechables pueden ser soporte sólido (por ejemplo varillas y/o discos), disolvente, medios de compresión, por ejemplo, mortero con mano de mortero y/o al menos una caja con bolas para agitar y/o al menos una prensa manual, escala de colores convencional, vidrios, reactivo químico, pipeta, lámpara UV, calentador y/o al menos una cubierta caliente compuesta por reactivos químicos y disolventes, tijeras, par de pinzas, bolsa de plástico, información de identificación para identificar la especie vegetal, instrucciones que describen cómo usar el kit de ensayo, jeringa, filtro.

- 35 En otra realización, los componentes desechables pueden ser soporte sólido (por ejemplo varillas y/o discos), disolvente, medios de compresión, por ejemplo, mortero con mano de mortero y/o al menos una caja con bolas para agitar y/o al menos una prensa manual, vidrios, reactivo químico, pipeta, calentador y/o al menos una cubierta caliente compuesta por reactivos químicos y disolventes, bolsa de plástico, jeringa, filtro.

El kit de ensayo puede restablecerse con componentes desechables después de al menos un uso, de ese modo el kit está listo para usarse de nuevo.

- 40 Es un fin de la invención reducir los costes y el tiempo del procedimiento de prueba, y al mismo tiempo proporcionar un método de prueba que tenga excelente sensibilidad. El kit de ensayo de la invención puede usarse, para todos los fines prácticos, como una prueba de campo, o como una prueba de laboratorio. Un objeto de la invención es tener una prueba fácilmente accesible para usarse comercialmente o a escala privada. Por tanto, el kit de ensayo de la invención es, en una realización, práctico y de tamaño portátil y fácil de operar. El material de prueba se pone en contacto con un sólido para recibir dicho material. El material de prueba está en una forma que puede someterse a ensayo, por ejemplo, en forma de una suspensión líquida.

- 50 En una realización, el kit de prueba del ensayo se produce como un sistema práctico y móvil que puede ser total o parcialmente desechable tal como se describe en otra parte. La etapa individual de la prueba puede realizarse en el campo, y no es necesario requerir ninguna experiencia técnica particular de la persona que realiza la prueba. La prueba puede completarse en menos de 3 horas desde que se obtiene el organismo vivo, tal como en menos de 2 horas, por ejemplo, menos de 1 hora, tal como menos de 45 min, por ejemplo, menos de 30 min, tal como menos de 15 minutos.

En una realización, el método de prueba de la invención se realiza con las siguientes etapas:

- Se recoge material vegetal (material de prueba),

- Se corta el material de prueba en pequeños trozos con las tijeras y se pesa en la balanza,
 - Se pone el material en contacto con un disolvente,
 - El mortero con una mano de mortero, o una caja con bolas para agitar, junto con un disolvente, extrae mediante aplastado la savia del material vegetal y/o puede usarse una prensa manual para extraer por prensado la savia del material vegetal.
 - Se filtra la suspensión a través de un filtro.
 - Se pone el extracto en contacto con reactivos químicos
 - Después de una reacción química se obtiene el extracto, se pone en contacto con un soporte sólido, por ejemplo, una varilla o un disco.
 - Aparecerá un color sobre el soporte sólido,
 - El color sobre el soporte sólido se compara con una escala de colores convencional, a partir de esta comparación puede determinarse el tipo de estrés y/o el efecto del estrés sobre la planta y de ese modo puede determinarse si la planta es resistente al estrés, por ejemplo, un pesticida o herbicida.
- En una realización, el kit de prueba comprende recipientes con disolvente y/o reactivos, tales como disolventes y/o reactivos descritos en otra parte en el presente documento. Los recipientes pueden estar en forma de, por ejemplo, matraces, vidrios y jeringas. Los recipientes pueden tener una tapa.
- En otra realización, el kit de ensayo comprende recipientes en los que se realizan las reacciones químicas. Este/estos recipiente(s) puede(n) ser recipiente(s) con disolvente y/o reactivo.
- En una realización, todos los componentes del kit de ensayo están contenidos en un recinto, siendo esto opcionalmente como una unidad de tamaño bolsillo.
- En una realización de la invención, el kit de ensayo se usa con materiales procedentes de plantas, y puede comprender:
- Placas de cromatografía en capa fina (CCF),
 - eluyentes,
 - reactivos,
 - prensa manual,
 - micropipetas,
 - opcionalmente una lámpara UV,
 - opcionalmente un calentador,
 - al menos un patrón de biomarcadores convencional,
 - opcionalmente al menos un patrón convencional.
- En una realización, el kit de ensayo usado con material vegetal comprende al menos una placa de CCF. El material de prueba se pone en contacto con un soporte sólido, tal como una placa de CCF que comprende un material adsorbente que puede separar la mezcla de compuestos del material de prueba. Puede usarse una prensa manual para extraer por prensado la savia del material vegetal. El kit de ensayo también comprende recipientes de disolventes, tales como disolventes descritos en otra parte. Los recipientes, por ejemplo, un recipiente en forma de botella con un cabezal de pulverización, que contiene reactivos pulverizados sobre la(s) placa(s) de CCF son también parte del presente kit de prueba. En otra realización, el kit de ensayo comprende recipientes que contienen agentes en los que se colocan las placas de CCF. Los recipientes pueden variar de tamaño dependiendo del tipo de aplicación en cuestión. Para pruebas repetitivas, pueden preferirse recipientes más grandes. En un aspecto, el kit de ensayo es desechable, es decir los componentes individuales en el kit de ensayo se usan sólo una vez. Sin embargo, en otro aspecto, uno o más de los componentes individuales del kit de ensayo se reciclan. Se prevén diferentes realizaciones del kit de ensayo de la invención. En una realización, todos los componentes del kit de ensayo están contenidos en una unidad de tamaño bolsillo. En otra realización, la lámpara UV y/o el calentador de la invención se separan del kit de ensayo como una unidad. En otra realización de la invención, la lámpara UV y/o el calentador se excluyen del kit de ensayo y método como un todo. Además, micropipetas que incluyen soportes están incluidas opcionalmente en la unidad del kit de ensayo. Las reacciones de color desarrolladas sobre los soportes sólidos, tales como placas de CCF del kit de ensayo se comparan con uno o más comparadores de color, tales como el patrón de biomarcadores convencional y/o el patrón convencional de la invención. Los comparadores de

color pueden estar en forma de una carpeta de diagramas de color encerrados en el kit de ensayo, y se prefiere que el tamaño de los comparadores de color (patrones de biomarcadores convencionales y/o patrones convencionales) sean de igual tamaño que el soporte sólido, tal como la(s) placa(s) de CCF.

En aún otro aspecto de la invención, se usa una prueba inmunológica, tal como una "varilla de inmersión".

- 5 Tal como se estableció anteriormente, un aspecto de la invención es el uso del método y kit para someter a prueba si organismos vivos han desarrollado resistencia. En una realización, los organismos vivos son plantas.

En otra realización, la invención puede usarse por un agricultor para determinar la presencia de resistencia a pesticidas, por ejemplo, herbicidas.

- 10 El kit puede usarse para determinar la presencia de biotipos de malas hierbas resistentes a herbicidas antes o tras una aplicación de herbicida.

En una realización, el método o kit pueden usarse para detectar la resistencia a pesticidas en malas hierbas, plagas y enfermedades fúngicas en productos agrícolas.

- 15 El uso del método y/o ensayo tal como se describe en el presente documento también puede ser para someter a prueba si plantas en un campo son plantas modificadas genéticamente que son resistentes a un herbicida específico.

El kit de prueba que incluye la escala de colores convencional puede diseñarse para responder con una respuesta de sí o no y opcionalmente también con una respuesta de quizás con respecto a si la planta es resistente a un herbicida predeterminado.

- 20 El método de las pruebas descritas en el presente documento también puede diseñarse para estar basado en un valor de punto de corte mediante el cual un desarrollo de color indica una respuesta, por ejemplo, plantas resistentes y en el que el no desarrollo de color indica otra respuesta, por ejemplo, plantas sensibles. Esto puede tener valor especialmente cuando se realiza una prueba para determinar una "respuesta de sí o no" tal como se describe en otra parte en el presente documento tal como, por ejemplo, si una planta es resistente a un herbicida. El color que indica el valor por encima o por debajo de un color de punto de corte puede realizarse mediante el color del propio extracto que se hace reaccionar opcionalmente con uno o más reactivos químicos.

- 25 En otro aspecto, la invención puede usarse en el control de la distribución geográfica de la resistencia a pesticidas. Los hábitats que no son diana adyacentes a campos cultivados pueden verse afectados por pesticidas durante la aplicación. Esta exposición puede producirse debido a una pulverización excesiva, o a través de una desviación de la pulverización con respecto a la aplicación en cultivos diana adyacentes a hábitats silvestres. También pueden provenir de pesticidas que se han sometido a escorrentía o lavado. Los pesticidas pueden desplazarse distancias considerables por el aire, o bien mediante corrientes o bien mediante volatilización.

Descripción detallada de los dibujos

- 35 Figura 1. Factores de resistencia de seis biotipos diferentes de la planta *Stellaria media* expuestos a los componentes activos como herbicidas yodosulfurón, tribenurón y florasulam. El factor de resistencia es la razón del valor de DE_{50} de los biotipos resistentes y susceptibles. Si la DE_{50} de un biotipo susceptible es de 0,5 kg de herbicida ha^{-1} y la DE_{50} de un biotipo resistente es de 20 kg de herbicida ha^{-1} , entonces el factor de resistencia del biotipo resistente es de 40. En la figura 1, sólo se muestran los biotipos resistentes. El factor de resistencia del biotipo susceptible es de 1.

Experimentos

- 40 Ejemplo 1

Resistencia a herbicidas

- 45 En Dinamarca, se ha documentado la resistencia a inhibidores de ALS en *Stellaria media* (11 ubicaciones) y *Galeopsis sp.* (1 ubicación) y un biotipo de *Papaver rhoeas* (7 ubicaciones) que está sometiéndose a prueba. Se incluyen los resultados de un estudio con 6 biotipos *Stellaria media* resistentes a SU (resistentes a sulfonilurea). El factor resistente de los biotipos resistentes a SU de *Stellaria media* con respecto a tribenurón y yodosulfurón varió entre 27 y 77 (figura 1). Se encontró una buena correlación entre los niveles resistentes a los dos herbicidas de SU pero no pudo confirmarse la resistencia cruzada al inhibidor de ALS, florasulam.

- 50 Se ha documentado resistencia a inhibidores de ACC-asa en 17 biotipos de *Alopecurus myosuroides*. De los 17 biotipos, se mostró que 13 presentaban resistencia de sitio diana, mientras que 4 revelaron un patrón de resistencia cruzada típico para un metabolismo mejorado.

Resultados

Se detectó un patrón de biomarcadores de 8 biomarcadores de tipo A en extractos de plantas de *Stellaria media* no expuestas. Se detectó también el mismo patrón en plantas expuestas 4, 7 y 14 días después de la exposición.

Se detectó un patrón de biomarcadores de 7 biomarcadores de tipo B en extractos de plantas susceptibles 7 y 14 días después de la exposición. Se detectaron cinco de estos biomarcadores 4 días después de la exposición.

5 Estudio preliminar

Plantas/Herbicida

Se cultivaron en exterior un biotipo susceptible a SU y uno resistente a SU de *Stellaria media* en macetas de 2 litros. En la etapa de 4-5 hojas, se expusieron las plantas a yodosulfurón (IOD) aplicado en mezcla con un aceite vegetal metilado (Renol). Se aplicó yodosulfurón al 50% de la dosis de campo recomendada. Se cosecharon las plantas 4, 7 y 14 días después de la exposición. Inmediatamente después de la cosecha, se congelaron las plantas y se secaron por congelación.

Preparación de muestras

Se extrajo material vegetal secado por congelación (50 mg por ml de etanol al 75%) en baño ultrasónico con hielo durante dos horas. Se centrifugaron los extractos antes del análisis.

15 Biomarcadores

Se detectó un patrón de biomarcadores como cambios fitoquímicos en extractos de planta. Se muestra una comparación de los extractos de un biotipo susceptible no tratado (biotipo 1) y un biotipo resistente no tratado (biotipo 2) de *Stellaria media* como tipo A de biomarcadores. Véase además la descripción en el ejemplo 3.

Se muestra una comparación de extractos de los mismos biotipos expuestos a yodosulfurón como tipo B de biomarcadores. Véase además la descripción en el ejemplo 3.

Se usaron sistemas de cromatografía plana de alta resolución (HPPC) para detectar los dos tipos de biomarcadores.

Conclusiones

Pudo detectarse un patrón de biomarcadores único en extractos de plantas de *Stellaria media* resistentes no expuestas (biotipo 2) en comparación con plantas susceptibles (biotipo 1) y este patrón no cambió 4, 7 ó 14 días después de la exposición a yodosulfurón.

Se detectó un patrón de biomarcadores único en extractos del biotipo susceptible de *Stellaria media* 4, 7 y 14 días después de la exposición a yodosulfurón. Este patrón de biomarcadores estaba ausente en el biotipo resistente a SU.

Ejemplo 2

30 Desarrollo de un kit de prueba para determinar sensibilidad/resistencia de plantas con respecto a herbicidas

Se presenta un sistema de colores de varilla/disco para visualizar la sensibilidad de plantas a herbicidas (plantas no expuestas y expuestas) en comparación con resistencia (plantas no expuestas y expuestas) como un sistema de examen. Se usan las diferencias en el color de varilla/disco para identificar especies vegetales resistentes en el campo o bien antes de la exposición o bien después de la exposición a un herbicida. En conclusión, se detecta un color para plantas sensibles que no están expuestas al herbicida, otro color para las plantas sensibles expuestas a herbicidas y se obtiene aún otro color si las plantas son resistentes (diana o metabólicas) y están expuestas a herbicidas. Los biotipos sensibles y resistentes de la especie vegetal mostraron un patrón de colores estable cuando se analizó el material vegetal. Puede realizarse la determinación de sensibilidad o resistencia, por ejemplo, de siete a catorce días después de que la planta se exponga a herbicidas.

40 Estudio de semicampo

Se hicieron crecer biotipos sensibles y resistentes de determinadas especies vegetales en macetas en exterior (semicampo). Tras el tratamiento con herbicidas, pudo detectarse una relación entre el color de varilla/disco y la sensibilidad/resistencia de las plantas 14 días después de la exposición.

La reacción de plantas a estrés de herbicidas

Generalmente las plantas reaccionan al estrés. En el desarrollo del método usado en la presente invención, se observó que especies vegetales sensibles o resistentes a herbicidas específicos reaccionan de diferente manera al estrés realizado como, por ejemplo, exposición a herbicidas. Puede observarse la reacción al estrés como una respuesta bioquímica. Se desarrollan herbicidas para afectar a mecanismos generales o específicos en plantas con el resultado de que se perturbarán las plantas sensibles en el crecimiento y eventualmente la planta puede morir. Cuando se perturban los mecanismos normales en las plantas, naturalmente la planta reaccionará cambiando la

concentración de compuestos ya presentes, producirá nuevos compuestos o detendrá la producción de compuestos. Los cambios específicos dependen del modo de acción del herbicida y la dosis usada.

Una planta tiene un contenido natural de compuestos fitoquímicos. El contenido de los compuestos fitoquímicos varía en diferentes especies vegetales y la composición es diferente si las plantas son sensibles o resistentes a herbicidas. Las plantas sensibles y resistentes reaccionan de diferente manera al estrés de herbicidas y de ese modo cuando se realiza una prueba según la invención, estará presente un color diferente para la reacción química con el extracto de la planta. Pueden observarse los diferentes colores aun cuando las especies vegetales sometidas a prueba son partes de la misma familia. Cuando se realiza un tratamiento con herbicidas de las plantas, la composición y concentración fitoquímicas de esta composición cambian en las plantas. Ha resultado que estos cambios pueden detectarse de manera muy sencilla. Los cambios en la composición y concentración fitoquímicas en las plantas después de la exposición a estrés de herbicidas se denominan biomarcadores. El método con biomarcadores acumula un patrón de biomarcadores desarrollado en plantas expuestas a herbicidas.

Las investigaciones preliminares realizadas en invernadero y en el campo, subrayan el método. Pudieron detectarse cambios significativos en la composición y el contenido fitoquímicos en plantas mono y dicotiledóneas silvestres tan pronto como cuatro días después de la exposición a herbicidas de hasta el 1% de la dosis de campo recomendada de los herbicidas. Pueden detectarse los cambios en biomarcadores mucho antes de que aparezcan los signos visuales. En plantas expuestas a glifosato (nombre comercial Roundup Bio), pudieron detectarse cambios fitoquímicos en la composición y el contenido (patrón de biomarcadores) cuatro horas después de la exposición a herbicidas.

Se han realizado investigaciones adicionales con 16 especies vegetales silvestres diferentes (tanto mono como dicotiledóneas) y se detectó un claro patrón de biomarcadores para cuatro herbicidas diferentes con cuatro modos de acción diferentes. Los resultados mostraron que cuanto mayor era la concentración de los herbicidas, más corto era el tiempo después de la exposición en que pudieron detectarse los biomarcadores.

Investigaciones preliminares con plantas jóvenes y plantas de más edad mostraron que las plantas jóvenes reaccionaron más rápido después de la exposición a herbicidas que las plantas de más edad.

La presente invención consiste en un método que utiliza la diferente composición fitoquímica antes de y después de la exposición a herbicidas para identificar plantas resistentes directamente en el campo. Se visualiza la composición fitoquímica mediante una reacción de color en un kit. Los ejemplos muestran que el kit puede usarse para someter a prueba si una planta es sensible (se sometió a prueba con plantas no expuestas y expuestas) o resistente (si hay respuesta definitiva con plantas expuestas y probablemente la identificación también de plantas resistentes no tratadas).

Plantas

Las especies vegetales usadas para los estudios son todas las plantas de malas hierbas comunes en cultivos en Dinamarca. Las especies vegetales fueron: espiga de viento (*Apera spica-venti* L., Beauv), cola de zorra (*Alopecurus myosuroides* Hudson), pamlina (*Stellaria media* L. (Will.) y amapola común (*Papaver rhoeas* L.).

Herbicidas

Los herbicidas sometidos a prueba fueron: Hussar OD (yodosulfurón + mefenpir-dietilo, (100 + 300) g/l, Bayer CropScience A/S); Atlantis WG (mesosulfurón + yodosulfurón + mefenpir-dietilo, (30 + 6 + 90) g/kg, Bayer CropScience A/S); Primera Super (fenoxaprop + el 0,2% de Isoblette o el 0,1% de Contact) Bayer CropScience A/S). La tabla 1 presenta una visión general de especies vegetales, biotipos, herbicidas y tratamientos de los estudios.

Tabla 1: Visión general de los estudios, especies vegetales, biotipos, herbicidas y tratamientos.

Código	Especie vegetal, etapas y biotipos	Herbicida	Tratamiento	Fresco/ congelado / Secado por congelación
952/06	<i>Apera spica-venti</i> (5-6 hojas, 2-3 hijuelos) 5 biotipos (2 sensibles, 3 resistentes diana)	Atlantis 1 N = 20 g de a.i./ha (+ 0,5 l/ha de Renol)	Semicampo	Congelado fresco
905/07	<i>Stellaria media</i> (6 hojas), 3 biotipos (1 sensible, 2 resistentes diana)	Hussar OD 1 N = 0,07 g de a.i./ha (+ 0,5 l/ha de Renol)	Semicampo	Congelado fresco
905/07	<i>Papaver rhoeas</i> (6-8 hojas) 4 biotipos (1 sensible, 3 resistentes)	Hussar OD 1 N = 0,2 g de a.i./ha (+ 0,5 l/ha de Renol)	Semicampo	Congelado fresco

905/07	<i>Alopecurus myosuroides</i> (4 hojas), 3 biotipos (1 sensible, 1 resistente diana, 1 resistente metabólico)	Primera Super 1 N = 0,2 l/ha = 13,8 g de a.i./ha	Semicampo	Congelado fresco
941/07	<i>Apera spica-venti</i> (4 hojas, 1 hijuelo) 7 biotipos (2 sensibles, 5 resistentes diana)	Hussar OD 1 N = 24 g de a.i./ha	Semicampo	Congelado fresco

Estudio de semicampo - Cultivo y exposición de especies vegetales

Se sembraron las especies de malas hierbas en macetas de 2 l en una mezcla de tierra del campo, arena y esgfagno (2:1:1 por ciento en peso). Después de la siembra, se colocaron las macetas sobre mesas en exterior, en las que se regaron varias veces al día. Después de la emergencia, se entresacaron las plantas en las macetas hasta el mismo número de plantas en todas las macetas. Se aplicaron los herbicidas cuando las plantas estaban en la etapa de crecimiento definido (véase la tabla 1). Se aplicaron los herbicidas en agua desionizada usando un pulverizador de macetas de laboratorio dotado de dos boquillas de tipo abanico plano según la norma ISO F-02-110 que suministran un volumen de pulverización de 145 l por Ha con una presión en 3 bar.

La dosis normal (1 N) usada varía entre los estudios dependiendo de la sensibilidad de la especie de mala hierba y la etapa de crecimiento de las plantas. Se expusieron todos los biotipos de las plantas a una dosis 1 N (véase la tabla 1) y para las plantas resistentes diana, también se usó 8 N (941/07 y 941/07) y 10 N (952/06) para confirmar la resistencia en los diferentes biotipos. Puesto que el fin de los estudios era principalmente identificar la resistencia a herbicidas en plantas, se compararon la reacción de color sobre la varilla de los biotipos sensibles y resistentes a herbicidas para tratamientos con una dosis 0 N (no tratado) y normal (1 N).

En los experimentos, se cosecharon las plantas usadas para la prueba de biomarcadores 14 días después de la exposición a los herbicidas. Se cortaron las plantas en la superficie del suelo y se congelaron inmediatamente mediante el uso de hielo seco. Antes de la cosecha, se realizó una evaluación visual del efecto (cambios morfológicos), esto se describe adicionalmente a continuación. En la tabla 2, se describe la escala usada para la evaluación de los cambios morfológicos. Excepto para el estudio 941/07, se realizaron determinaciones de biomasa cosechando biomasa vegetal 21 días después de la aplicación de herbicida, tal como se describe más adelante. Antes de la cosecha de biomasa, se realizó una evaluación visual del efecto.

Evaluación visual del efecto

Se evaluó el efecto visual sobre las plantas antes de la toma de muestra usando la escala mostrada en la tabla 2 en la que 0 es sin efecto sobre las plantas y 9 indica plantas muertas (Hamil *et al.*, 1977; Boutin *et al.*, 1993).

Tabla 2: Evaluación del efecto visual. La escala se usa para evaluar los efectos visuales de plantas expuestas a herbicidas

VE: Efecto visual sobre plantas expuestas a herbicidas (0-9):	
Escala	Descripción detallada
0	Sin efecto
1	Efecto traza: aspecto normal con un crecimiento ligeramente estimulado
2	Efecto débil
3	Efecto moderado: plantas del 75% del tamaño de las plantas no tratadas (reducido en un 25%)
4	Daño: plantas de más del 50% del tamaño de las plantas no tratadas y con lesiones marcadas en las hojas y los tallos
5	Daño por lesión: plantas de la mitad del tamaño de las plantas no tratadas, hojas curvadas, partes de planta deformadas y con alteración del color
6	Efecto herbicida: plantas del 25% del tamaño de las plantas no tratadas, hojas curvadas, partes de planta deformadas y con alteración del color
7	Buen efecto herbicida: plantas muy pequeñas, hojas curvadas, partes de planta deformadas y con alteración del color
8	Casi muertas: sólo quedan unas pocas partes de planta verdes
9	Muertas

Evaluación de la biomasa

En los estudios de semicampo, se realizó la determinación de biomasa 21 días después de la aplicación de herbicidas. Se calculó el peso fresco como la media de 3 réplicas para cada tratamiento. Se registró el peso seco después de que se secase al aire el material vegetal a 80° C durante 18 horas.

Técnicas usadas para el desarrollo del método

Se usó cromatografía en capa fina (CCF) para separar y seleccionar biomarcadores y grupos de biomarcadores relevantes (véanse los informes del Apéndice 1).

Recogida de plantas de malas hierbas

- 5 Se recogieron las plantas de cada maceta (tres réplicas) 14 días después de la exposición con el herbicida. Se congelaron inmediatamente las plantas con hielo seco y se mantuvieron congeladas a -18°C hasta el análisis.

Color

- 10 Se compararon el color y la intensidad de color de varillas de la prueba de plantas de los estudios de semicampo con una escala no estucada de paleta de colores PANTONE® formula guide y también se analizaron usando equipo analítico de fotografía CAMAG avanzado para documentación (véase el Apéndice 2).

Los colores que se refieren como colores PANTONE son tal como aparecen en la paleta de colores PANTONE Formula Guide/ Solid Uncoated ISBN 978-1-590650-63-9, cuarta edición, segunda impresión.

Preparación de extracto vegetal

- 15 Se cortó material vegetal fresco o congelado en pequeños trozos con una tijera. Se pesaron 2,00 g/1,00 g de material vegetal fresco en una balanza de bolsillo 60-2N de KERN (máx. = 60 g, d = 0,01g) y se trituró en un mortero (diámetro interno = 5,2 cm) con 40,00 ml de agua desionizada. Se filtró el extracto a través de un filtro de 0,45 µm GMF w/GMF de WHATMAN. Se usó este extracto filtrado para examen.

Método de examen

- 20 Se examinaron extractos vegetales (tanto 50 mg/ml como 25 mg/ml) de las plantas sensibles (no expuestas y expuestas) en el programa de examen. Se evaluaron los resultados y se eligió la concentración de los extractos para las plantas resistentes. El factor más importante para la elección de extractos fue una diferencia nítida en el color de los extractos de las plantas expuestas en comparación con los extractos de las plantas no expuestas. La concentración de los extractos resultó ser un factor importante.

Resultados y discusión

- 25 El desarrollo del kit de prueba se realizó en cuatro fases.

Fase 1: Examen de los extractos de planta en el nuevo sistema de examen; fase 2: selección del sistema y desarrollo adicional del método; fase 3: desarrollo del kit de prueba; fase 4: validación del kit de prueba.

- 30 En primer lugar, en la fase 1, se realizó la comparación entre los colores de la prueba química para extractos obtenidos a partir de la planta no expuesta y expuesta de un biotipo sensible. Se seleccionaron el método de prueba y la cantidad de extracto que va a someterse a prueba de manera que estuviera presente una clara diferencia en la reacción de color para la comparación. De ese modo, es posible evaluar si la reacción se basa en plantas sensibles a herbicidas, que no se han pulverizado, en lugar de biotipos con resistencia a los herbicidas después de la pulverización. La siguiente comparación es una clara diferencia en el color entre los biotipos sensibles de plantas expuestas y los biotipos resistentes de plantas expuestas. De ese modo, pueden detectarse las plantas resistentes a herbicidas. Finalmente, si se detectan las diferencias en los colores entre las plantas sensibles, no expuestas y expuestas, y las plantas resistentes a herbicidas que no estuvieron expuestas y expuestas, puede desarrollarse un kit de prueba para usarse antes de y después de la exposición a herbicidas en el campo. Es aceptable que la resistencia a herbicidas en las plantas sólo pueda identificarse después de la exposición, mientras que se requieren las diferencias en los colores de plantas sensibles, no expuestas y expuestas y plantas resistentes expuestas.

- 40 En la tabla 3, se presentan una visión general de los diferentes biotipos de planta y herbicidas.

Tabla 3. Especies vegetales, biotipos y herbicidas usados en el desarrollo del método y kit de prueba. Los números ID se refieren a números de identificación en el banco de semillas en Dept. of Integrated Pest Management. El código se refiere al número de ensayo.

<i>Monocotiledóneas</i>				Código
<i>Apera spica-venti</i>/Atlantis				DJF 952/06
Biotipo 1	Biotipo 2	Biotipo 4	Biotipo 5	Biotipo 3
ID 100	ID 452	ID 454	ID 455	ID 453
Sensible	Sensible	Sensible	Resistente metabólico	Resistente diana

<i>Alopecurus myosuroides</i> /Primera Super + Isoblette				DJF 905/07
Biotipo 7	Biotipo 8	Biotipo 9		
ID 85	ID 31	ID 19		
Sensible	Resistente diana	Resistente metabólico		
<i>Dicotiledóneas</i>				
<i>Stellaria media</i> /Hussar OD + Renol				DJF 905/07
Biotipo 1	Biotipo 2	Biotipo 3		
ID 1	ID 9	ID 102		
Sensible	Resistente diana	Resistente diana		
<i>Papaver rhoeas</i> /Hussar OD + Renol				DJF 905/07
Biotipo 4	Biotipo 5	Biotipo 6	Biotipo 12	
ID 150	ID397	ID 248	ID 406	
Sensible	Resistente diana	Resistente diana	Resistente diana	

En la tabla 4, se presenta esta comparación para el sistema de examen para combinaciones de biotipos de las cuatro especies vegetales y herbicidas. Los números en la tabla indican el color diferente. Véase el Apéndice 3 para los códigos de los reactivos.

5 Tabla 4. Comparación de resultados de examen de varios reactivos con biotipos de *A. spica-venti* expuestos a Atlantis, *A. myosuroides* expuestos a Primera S + Isoblette, *S. media* expuestos a Hussar + Renol y *P. rhoas* expuestos a Hussar + Renol. Los números en la tabla indican el color diferente. Véase la tabla en el ejemplo 6 para una descripción de los códigos de los reactivos.

Código de reactivo	<i>Apera spica-venti</i> Atlantis	<i>Alopecurus myosuroides</i> Primera S	<i>Stellaria media</i> Hussar OD	<i>Papaver rhoeas</i> Hussar OD
N ₁			5	
CE ₁			5	
CG ₁				
CH ₁			5	
CI ₁			5	8
CF ₁	1		6	
DE ₁	3	2		9
DF ₁				
DP ₁			7	
A ₁		2		10
I ₁	1	3	5	8
C ₁	1		5	8
AK ₁				10
CC ₁	1	2		9
DL ₁	1	2		
DM ₁	1	2		9
DN ₁	3	2	6	10
DO ₁		2	6	9
BC ₁				8
E ₁				
CD ₁	1	2		

DC ₁		3		2			10
DI ₁							
B ₁		2		2			8
V ₁		2		2			
D ₁				2			8
DA ₁							
DB ₁		3		2			8
DG ₁		1		2			8
DD ₁		3		2			9
DJ ₁				2			10
AD _{α1}		1		3		5	9
AD _{β1}		1		3		5	9
AA ₁		3		2		5	10
AE ₁		1		3		5	10
AI ₁		2		3		6	8
U ₁		1		2		5	8
CK ₁		3		2		6	9
DK ₁		1		2		6	10
F ₁ ^{...}		1		2			8
AV ₁							
AY ₁							
DH ₁		3		2		6	9
AA ₁							
AF ₁		4					
1	Sólo para plantas resistentes diana en comparación con sensibles expuestas						
2	Sin diferencia entre biotipos resistentes diana y metabólicos de plantas en comparación con plantas sensibles expuestas						
3	Diferencia entre biotipos resistentes diana y metabólicos de plantas en comparación con plantas sensibles expuestas						
4	Sólo biotipos resistentes metabólicos de plantas en comparación con plantas sensibles expuestas						
5	Diferencia entre el biotipo diana 1 y el biotipo diana 2 en comparación con plantas sensibles expuestas						
6	Sin diferencia entre el biotipo diana 1 y el biotipo diana 2 en comparación con plantas sensibles expuestas						
7	Sólo el biotipo diana 2 en comparación con plantas sensibles expuestas						
8	Sin diferencia entre el biotipo diana 1, el biotipo diana 2 y el biotipo diana 3 en comparación con plantas sensibles expuestas						
9	Diferencia entre el biotipo diana 1 y el biotipo diana 2 + el biotipo diana 3 en comparación con plantas sensibles expuestas						

	10	Diferencia entre el biotipo diana 1, el biotipo diana 2 y el biotipo diana 3 en comparación con plantas sensibles expuestas
---	----	---

La tabla 5 resume las respuestas para las cuatro especies vegetales a los reactivos más potenciales.

Tabla 5: Respuestas de cuatro combinaciones de especies vegetales y herbicidas a los reactivos más potenciales

Código de reactivo	<i>Apera spica-venti</i> Atlantis	<i>Alopecurus myosuroides</i> Primera S	<i>Stellaria media</i> Hussar OD	<i>Papaver rhoeas</i> Hussar OD
I ₁	1	3	5	8
DN ₁	3	2	6	10
AD _{α1}	1	3	5	9
AD _{β1}	1	3	5	9
AA ₁	3	2	5	10
AE ₁	1	3	5	10
AI ₁	2	3	6	8
U ₁	1	2	5	8
CK ₁	3	2	6	9
DK ₁	1	2	6	10
DH ₁	3	2	6	9
1	Sólo para plantas resistentes diana en comparación con sensibles expuestas			
2	Sin diferencia entre biotipos resistentes diana y metabólicos de plantas en comparación con plantas sensibles expuestas			
3	Diferencia entre biotipos resistentes diana y metabólicos de plantas en comparación con plantas sensibles expuestas			
5	Diferencia entre el biotipo diana 1 y el biotipo diana 2 en comparación con plantas sensibles expuestas			
6	Sin diferencia entre el biotipo diana 1 y el biotipo diana 2 en comparación con plantas sensibles expuestas			
8	Sin diferencia entre el biotipo diana 1, el biotipo diana 2 y el biotipo diana 3 en comparación con plantas sensibles expuestas			
9	Diferencia entre el biotipo diana 1, el biotipo diana 2 y el biotipo diana 3 en comparación con plantas sensibles expuestas			
10	Diferencia entre el biotipo diana 1 y el biotipo diana 2 + el biotipo diana 3 en comparación con plantas sensibles expuestas			

- 5 Puesto que ninguno de los reactivos pareció ser óptimo para el desarrollo de un sistema común para todas las especies vegetales y herbicidas, se decidió realizar una lista de prioridad para el desarrollo de métodos: 1) resistencia en *Papaver rhoeas*; 2) resistencia en *Apera spica-venti*; 3) resistencia en *Stellaria media*, todas con resistencia a sulfonilureas.

Se decidió además continuar con los reactivos con los códigos: I₁, A₁, AD_{α1}, AD_{β1}, AE₁, AI₁, DG₁ y DM₁.

- 10 Se mezclaron diferentes combinaciones de estos reactivos y se investigaron para incluirse en un kit de prueba para identificar la resistencia a herbicidas en plantas.

Un ejemplo:

Una mezcla de 4 gotas de I₁, A₁, AD_{α1} (1:1:1) + 10 gotas de extracto de la planta (50 mg/ml extraído con agua) + 15 gotas de ácido sulfúrico conc. presenta la fotografía a color de la figura 2.

- 15 La diferencia de color óptima es teniendo cuatro diferentes colores. Los colores son (de izquierda a derecha) PANTONE® n.º 535 (gris azulado); n.º 452 (gris verdoso); n.º 7544 (gris); n.º 415 (verde grisáceo). La prueba final puede incluir dos etapas. Etapa 1: el resultado es una planta resistente. Para confirmar que la planta es resistente y no es sólo una planta no expuesta, se realiza la etapa 2. La etapa 1 y la etapa 2 incluyen diferente combinación de reactivos.

- 20 Referencias

Boutin, C.; Freemark, K.E. & Keddy, C.J. (1993): Proposed guidelines for registration of chemical pesticides: Nontarget plant testing and evaluation. Informe técnico con n.º de serie 145. 1-91. Ottawa. Canadian Wildlife Service. Environment Canada.

- 5 Hamil, A.I.; Marriage, P.B. & Friesen, G. (1977): A method for assessing herbicide performance in small plot experiments. Weed Sciences. 25. 386-389.

Snyder, L.R (1974) Journal of Chromatography A, 92, 2, 233-230.

Ejemplo 3

Análisis mediante cromatografía en capa fina (CCF) de *Papaver rhoeas* (Papaveraceae)

Planta, biotipos y extractos

- 10 S_0 = ID 150 biotipo 4, control sensible
 S_1 = ID 150 biotipo 4, sensible expuesta a Hussar OD 1 N+0,5 l/ha de Renol
 R_0 = ID 397 biotipo 5, control resistente diana
 R_1 = ID 397 biotipo 5, resistente diana expuesta a Hussar OD 1 N + 0,5 l/ha de Renol
 R_{10} = ID 397 biotipo 5, resistente diana expuesta a Hussar OD 10 N + 0,5 l/ha de Renol
15 R_{20} = ID 248 biotipo 6, control resistente diana expuesta
 R_{21} = ID 248 biotipo 6, resistente diana expuesta a Hussar OD 1 N + 0,5 l/ha de Renol
 R_{210} = ID 248 biotipo 6, resistente diana expuesta a Hussar OD 10 N + 0,5 l/ha de Renol
 R_{30} = ID 406 biotipo 12, control resistente diana expuesta
 R_{31} = ID 406 biotipo 12, resistente diana expuesta a Hussar OD 1 N + 0,5 l/ha de Renol
20 R_{310} = ID 406 biotipo 12, resistente diana expuesta a Hussar OD 10 N + 0,5 l/ha de Renol

Extractos

Se extrajeron 100 mg de material vegetal secado por congelación (*Papaver rhoeas* (Papaveraceae) en 4,00 ml de etanol al 80% durante 20 min en baño ultrasónico (Réalisation Etudes Ultra Son (RE-US), 16, allée des Cystes, 06390 Contes, Francia). Se filtró el extracto a través de filtro GHP Agrodisc 13 de 0,45 µm de GELMAN.

- 25 Cromatografía en capa fina (CCF)

Se aplicaron los extractos (20 µl) sobre gel de sílice 60 de Merck 1.05721 (10x20 cm) o (10 µl) celulosa-aluminio de Merck 1.05552.0001 junto con la referencia papaverina 10/00 en etanol usando un aparato de toma de muestras para CCF A automático, Automatic TLC Sampler III.

S_0 R_0 R_{20} R_{30}	S_1 R_1 R_{21} R_{31}	R_{10} R_{210} R_{310}
Control	Expuesta a 1 N	Expuesta a 10 N

Resultados

- 30 CCF 1): placa: gel de sílice 60; disolvente: tolueno:acetato de etilo:dietilamina (70:20:10). Se muestran los resultados en la figura 3.

Se observa la detección visual en la figura 3a.

Se observa la detección con UV a 366 nm en la figura 3b.

Se observa la detección con UV a 366 nm después de la derivatización con: NEU al 1% y PEG al 5% en la figura 3c.

- 35 CCF 2): placa: celulosa; disolvente: ácido acético al 15% en agua. Se muestran los resultados en la figura 4.

Se observa la detección con UV a 366 nm en la figura 4a.

Se observa la detección con UV a 366 nm después del tratamiento con borinato de 2-aminodifenilo al 1% en metanol (NEU) y polietilenglicol 4000 al 5% en etanol al 50% (PEG) en las figuras 4b y 4c.

CCF 3) placa: gel de sílice 60; disolvente: n-butanol:metanol:agua (30:30:40). Pueden observarse los resultados en la figura 5.

Se observa la detección visual después de la derivatización con Dragendorff* (Merck n.º 197) en la figura 5.

- 5 * Dragendorff (Merck n.º 197) = disolvente principal: 14 g de IK + 6 ml de HCl 4 N + 36 ml de agua, después de calentar, se añaden 3 g de nitrato de bismuto, después de enfriar, se añaden 3 g de I. Se diluye 1:1 con agua. Disolvente usado: 2 ml de disolvente principal + 8 ml de HCl al 25%.

CCF 4) placa: celulosa; disolvente: isopropanol:ácido acético:agua (70:5:25). Pueden observarse los resultados en la figura 6.

Detección: Se observa con UV 366 nm antes de la derivatización en la figura 6a.

- 10 Se observa después de la derivatización con ninhidrina** (Merck n.º 179) en la figura 6b.

**Ninhidrina (Merck n.º 179) = I: 100 mg de ninhidrina + 10 ml de ácido acético + 2 ml de colidina + 250 mg de acetato de cadmio en 50 ml de etanol (absoluto); II: nitrato de cobre = al 1% en etanol absoluto. I + II : 10 ml + 0,6 ml. Después de la pulverización, calor durante 3 minutos a 100°C.

CCF 5) placa: celulosa; disolvente: ácido acético al 2% en agua. Pueden observarse los resultados en la figura 7.

- 15 Detección: Se observa con UV 366 nm antes de la derivatización en la figura 7a.

Detección: Se observa con UV 366 nm después de la derivatización con NEU + PEG en la figura 7b.

Evaluación

CCF 1:

- 20 El sistema de CCF es muy eficaz para la separación y detección de clorofila y carotenoides. Se detectaron diferencias entre biotipos de las plantas sensibles y resistentes diana. Se detectaron compuestos en los biotipos de las plantas resistentes y no se detectaron en las plantas sensibles. Sin embargo, se observaron los mejores resultados para las plantas expuestas. Una tendencia de planta sensible expuesta es similar a la de resistente diana expuesta a Hussar OD 10 N + Renol. Esto también se refiere a los compuestos fenólicos en la línea base (detección UV a 366 nm).

- 25 CCF 2:

- 30 El sistema de CCF después de la derivatización con NEU y PEG fue el mejor. Se detectó una diferencia en el contenido de flavonoides y compuestos fenólicos entre los biotipos de las plantas sensibles y resistentes diana no expuestas y expuestas. Sin embargo, el biotipo de la planta sensible expuesta parece tener el mismo contenido que para las plantas resistentes diana expuestas a 10 N. Los compuestos fenólicos de color blanco azulado a $R_f = 0,36$ sólo están presentes en la planta sensible y las plantas resistentes diana expuestas a 10 N. También los compuestos fenólicos de color blanco azulado a $R_f = 0,61$ y $0,64$ están presentes en una mayor cantidad en los biotipos de plantas resistentes diana expuestas en comparación con las plantas sensibles. El flavonoide a $R_f = 0,27$ está presente en todos los biotipos pero en menor cantidad el biotipo sensible no expuesto y el resistente diana n.º 406.

- 35 CCF 3:

- 40 Se realizó este análisis puesto que se detectó una reacción interesante en las investigaciones histoquímicas para el mismo reactivo. Se detectaron alcaloides en todos los biotipos a $R_f = 0,88$. La papaverina de referencia tiene el mismo valor de R_f , pero el color es diferente de la papaverina, que es de color naranja oscuro con el reactivo de Dragendorff. La papaverina es de color amarillo ligero en UV antes de la derivatización y no se detectó con reactivo de ninhidrina.

CCF 4:

- 45 Con referencia a los aminoácidos, la composición de las plantas sensibles no expuestas era diferente de las plantas resistentes diana no expuestas y expuestas. Sin embargo, las plantas sensibles no expuestas en comparación con las plantas expuestas sensibles son muy diferentes. Las plantas sensibles expuestas parecen tener la misma composición que las plantas resistentes diana expuestas con 10 N. Esto también se observó para los compuestos fenólicos. Dos compuestos a $R_f = 0,12$ y $R_f = 0,52$ sólo están presentes en los biotipos resistentes diana y en el biotipo sensible expuesto. Una identificación de los aminoácidos sería interesante para el desarrollo adicional de este aspecto.

CCF 5:

- 50 Se detecta un flavonoide muy notable (mancha amarilla) para la planta sensible expuesta a yodosulfurón. Se pone el

flavonoide tal como se muestra por la parte superior de la flecha. No están presentes los compuestos como verbascósido (V) amarillo. Sin embargo, están presentes compuestos de tipo clorogénico en las plantas en gran cantidad en el biotipo sensible expuesto y los biotipos diana expuestos con 10 N (tal como se observa en otros sistemas de CCF).

5 Conclusión

El contenido de compuestos fenólicos como compuestos fenólicos simples y flavonoides es interesante para el desarrollo adicional del proyecto, puesto que está presente un nuevo flavonoide en la planta sensible expuesta a yodosulfurón. Este compuesto no está presente en los biotipos de las plantas resistentes diana.

10 La composición de aminoácidos también puede ser importante para la identificación de plantas resistentes diana no expuestas y expuestas.

Ejemplo 4

Análisis mediante cromatografía en capa fina (CCF) de *Stellaria media* (Caryophyllaceae)

Planta, biotipos y extractos

S_0 = ID 1 biotipo 1, control sensible

15 S_1 = ID 1 biotipo 1, sensible expuesta a Hussar OD 1 N + 0,5 l/ha de Renol

R_{10} = ID 9 biotipo 2, control resistente diana

R_{11} = ID 9 biotipo 2, resistente diana expuesta a Hussar OD 1 N + 0,5 l/ha de Renol

R_{110} = ID 9 biotipo 2, resistente diana expuesta a Hussar OD 10 N + 0,5 l/ha de Renol

R_{20} = ID 102 biotipo 3, control resistente diana expuesta

20 R_{21} = ID 102 biotipo 3, resistente diana expuesta a Hussar OD 1 N + 0,5 l/ha de Renol

R_{210} = ID 102 biotipo 3, resistente diana expuesta a Hussar OD 10 N + 0,5 l/ha de Renol

Extractos

E_t = 100 mg de material vegetal secado por congelación en 4,00 ml de etanol al 80% extraídos durante 20 min en baño ultrasónico (Réalisation Etudes Ultra Son (REUS), 16, allée des Cystes, 06390 Contes, Francia).

25 A_q = 50 mg de material vegetal secado por congelación en 4,00 ml de etanol al 80% extraídos durante 20 min en baño ultrasónico (Réalisation Etudes Ultra Son (REUS), 16, allée des Cystes, 06390 Contes, Francia) + 200 μ l de EtOH después de filtración.

Se filtró el extracto a través de un filtro GHP Agrodisc 13 de 0,45 μ m de GELMAN.

Cromatografía en capa fina (CCF)

30 Se aplicaron los extractos (10 μ l) sobre gel de sílice 60 de Merck 1.05721 (10x20 cm) o (5 μ l) celulosa-aluminio de Merck 1.05552.0001 junto con la referencia T = 10/00 X en etanol usando un aparato de toma de muestras para CCF automático, Automatic TLC Sampler III.

Posición sobre las placas de CCF:

0-T = referencias

35 1- S_{0Aq}

2- S_{0Et}

3- S_{1Aq}

4- S_{1Et}

5- R_{10Aq}

40 6- R_{10Et}

7- R_{11Aq}

- 8-R_{11Et}
- 9-R_{110Aq}
- 10-R_{110Et}
- 11-R_{20Aq}
- 5 12-R_{20Et}
- 13-R_{21Aq}
- 14-R_{21Et}
- 15-R_{210Aq}
- 16-R_{210Et}
- 10 Disolventes (eluyentes)/tipo de placas de CCF:
- S1 = ácido acético al 2% en agua/celulosa
- S2 = diclorometano:ácido acético:agua (50:45:15)/celulosa
- S3 = 2-propanol:ácido acético:agua (70:5:25)/celulosa
- S4 = acetato de etilo:ácido fórmico:ácido acético:agua (100:11:11:25)
- 15 S5 = 2-propanol:acetato de etilo:agua (7:2:1)/sílice
- S6 = ácido acético al 15% en agua/celulosa
- Reactivos de derivatización:
- A = Neu/PEG = difenilborinato de 2-aminoetilo al 1% en MeOH, se seca la placa y se pulveriza con polietilenglicol 4000 en EtOH al 50% en agua
- 20 B = Ninhidrina = ninhidrina al 8% en EtOH. Calentar a 100°C durante 3-5 min.
- C = p-anisaldehído = se mezclan 100 µl con 2,00 ml de ácido acético, 17 ml de MeOH y 1,00 ml de ácido sulfúrico. Calentar a 100°C durante 3-5 min.
- D = TTZ = trifeniltetrazolio al 4% en MeOH:NaOH 1 N en agua (calentar a 100°C durante 3-5 min. Coloración de azúcares simples).
- 25 E = Naftorresorcinol = 0,2 g de naftorresorcinol en 95,00 ml de EtOH abs. 8 ml de de esta disolución + 2,00 ml de ácido fosfórico. Calentar a 100°C durante 3-5 min.
- F = Benedict (tipo de flavonoides: apigenina) = 1,73 g de CuSO₄(5H₂O) + 17,3 g de citrato de sodio + 10 g de CO₃Na₂ en 200 ml de agua.
- Resultados
- 30 CCF 1): placa: celulosa; disolvente: S₁; Aq & Et, T = luteolina. Pueden observarse los resultados en la figura 8.
- 1a: Se observa la detección con UV 366 nm en la figura 8a.
- 1b: Se observa la detección con UV 366 después de la derivatización con A en la figura 8b.
- CCF 2): placa: celulosa; disolvente: S2. Pueden observarse los resultados en la figura 9.
- 2a: Se observa la detección con UV 366 (Aq & Et; T = luteolina) antes de la derivatización en la figura 9a.
- 35 2b): Se observa la detección con UV 366 (Aq & Et; T = luteolina) después del tratamiento con A en la figura 9b.
- 2c: Se observa la detección con UV 366 Aq & T= apigenina antes de la derivatización en la figura 9c.
- 2d: Se observa la detección con UV 366 Aq & T= apigenina después de la derivatización con F en la figura 9d.
- CCF 3) placa: celulosa; disolvente S3. Aq & Et. Pueden observarse los resultados en la figura 10.
- 3a: Detección: Se observa con UV 366 nm antes de la derivatización en la figura 10a.

3b: Detección: Se observa la detección visual después de la derivatización con B en la figura 10b.

CCF 4) Placa: sílice; disolvente: S4; Aq & Et. Pueden observarse los resultados en la figura 11.

4a: Detección: Se observa con UV 366 antes de la derivatización en la figura 11a.

5 4b: Detección: Se observa la detección con UV 366 nm después de la derivatización con C y calor durante 5 min en la figura 11b.

4c: Detección: Se observa la detección visual después de la derivatización con C y calor durante 15 min en la figura 11 c.

4d: Detección: Se observa la detección visual después de la derivatización con C y calor durante 30 min en la figura 11d.

10 4e: Detección: Se observa con UV 366 después de la derivatización con C y calor durante 30 min en la figura 11e.

CCF 5) Placa: sílice; disolvente S5; Aq. T = glucosa y ramnosa (azul). Pueden observarse los resultados en la figura 12.

5a: Detección: Se observa la detección visual después de la derivatización con E en la figura 12a.

5b: Detección: Se observa la detección visual después de la derivatización con D en la figura 12b.

15 CCF 6) placa: celulosa; disolvente S6; Aq. T = apigenina. Pueden observarse los resultados en la figura 13.

6a: Detección: Se observa con UV 366 antes de la derivatización en la figura 13a.

6b: Se observa con UV 366 después de la derivatización con F en la figura 13b.

Evaluación

CCF 1:

20 1a) Todos los extractos acuosos son diferentes de los extractos etanólicos. El compuesto en la línea base para 3 (el extracto acuoso sensible expuesto a 1 N) es más intenso que para los otros extractos. Se detecta clorofila sólo en los extractos etanólicos situados en la línea base. Otros compuestos pueden estar cubiertos bajo estos compuestos. El azul oscuro pueden ser flavonoides, detectados como manchas amarillas en 1 b.

25 1b) Después de la derivatización de la placa 1a, los flavonoides (bajos valores de Rf) son amarillos y los compuestos fenólicos simples de color azul claro (valores de Rf medios). El extracto 7 (R₁₁,Aq) tiene una composición diferente de la de los otros extractos acuáticos de compuestos fenólicos. El extracto acuoso de la planta sensible expuesta sí que tiene un compuesto en la línea base que no reacciona con el reactivo. Este/estos compuesto(s) es/son diferente(s) de los otros extractos acuosos.

30 Están presentes flavonoides en los extractos vegetales resistentes (expuestos y no expuestos) en comparación con los extractos vegetales sensibles. Otros compuestos como, por ejemplo, luteolina pueden estar cubiertos bajo estos compuestos. Para los extractos etanólicos de 10, 12, 14 y 16, se detecta una mancha naranja (compuesto) próxima a la línea base. Esto puede ser un flavonoide (sulfatado o glicósido) o clorofila diferente de la otra clorofila.

CCF 2:

35 2a): Tal como se mencionó anteriormente, las diferencias en la composición de los extractos acuosos/etanólicos no son muy visibles. Sin embargo, sólo se detecta clorofila en el frente de disolvente para todos los extractos etanólicos.

40 2b): Después de la derivatización, los flavonoides son amarillos y los compuestos fenólicos simples de color azul claro. Los extractos acuáticos de las plantas resistentes tienen un mayor contenido de flavonoides, que las plantas sensibles. Aun cuando el valor de Rf del flavonoide en los extractos acuáticos es próximo al de luteolina, se demuestra en CCF 1 1b, que los valores de Rf de los flavonoides están bastante lejos de la luteolina (Rf = 0).

2c y d): Sólo se presentan los extractos acuosos en las placas 2c y 2d. Se aplicó apigenina como compuesto de referencia. Este compuesto no está presente en los extractos. Se observan diferencias en la composición de los compuestos en los diferentes extractos.

CCF 3:

45 3a) Están presentes tanto extractos acuosos como etanólicos en las placas 3a y b. En 3a, las diferencias están presentes entre las plantas sensibles no expuestas y expuestas así como entre las plantas sensibles y resistentes para tanto extractos acuosos como etanólicos.

3b) En el sistema, se detectan los aminoácidos usando ninhidrina. Los aminoácidos se disuelven principalmente en agua y por tanto los extractos acuosos son los mejores. Se observa una fuerte reacción para las plantas sensibles expuestas a herbicidas y parece detectarse la misma reacción para las plantas resistentes expuestas a 10 N. Las plantas sensibles no expuestas parecen tener el mismo contenido que las plantas resistentes.

5 CCF 4:

4a) Con referencia a las manchas detectables mediante UV, se detectaron las principales diferencias para el extracto vegetal acuoso sensible expuesto en comparación con los extractos vegetales resistentes.

10 4b) En los extractos de R_{10} , R_{11} y R_{10} , se detectó una mancha a $R_f = 0,48$. Este o estos compuestos eran solubles tanto en agua como en etanol y no se detectaron para los otros extractos. Puesto que el anisaldehído detecta una gama de diferentes compuestos, no es posible identificar el tipo de compuestos.

4c, d y e) En la imagen visual de la placa en c y d, se detectó una mancha roja especial en el extracto vegetal sensible expuesto y para el extracto de R_{21} , el extracto vegetal resistente expuesto a 10 N. Esta clase de reacción con el mismo reactivo se detectó antes para la especie vegetal *Anagalis arvensis* y parece ser un importante biomarcador. De nuevo, se observa la misma composición para las plantas sensibles y expuestas a 10 N.

15 La detección UV de 4d en 4e confirma la mancha roja, sin embargo en este caso es fluorescencia naranja, pero muy visible con luz UV.

CCF 5:

20 5a y b) Se detectan compuestos de hidrato de carbono en estos dos sistemas. No se detectan glucosa ni ramnosa (compuestos azules en 5a). Esto sólo se observó en 5a, puesto que el color de los diferentes azúcares es diferente en comparación con 5b, en el que todos los compuestos son de color naranja. Se detecta una diferencia en las plantas sensibles expuestas en comparación con las plantas resistentes.

CCF 6:

25 6a y b) En 6a y b, se detecta una composición diferente para la planta sensible expuesta y R_{11} . Puesto que la apigenina presenta una mancha oscura con luz UV antes de la derivatización, no se detecta apigenina después de la derivatización en los extractos vegetales aun cuando los valores de R_f sean 0 para los compuestos. No se detecta ningún patrón general para los biomarcadores en estos sistemas.

Conclusión

El estudio confirmó que existe una diferencia en la composición de compuestos en extractos de planta sensible y resistente no expuesta o expuesta a herbicidas.

30 El contenido de compuestos fenólicos como compuestos fenólicos simples y flavonoides es interesante para el desarrollo adicional del proyecto, puesto que está presente un nuevo flavonoide en la planta sensible expuesta a yodosulfurón. Este compuesto no está presente en los biotipos de las plantas resistentes diana a concentraciones de exposición muy altas (10 N).

35 La composición de aminoácidos es también importante para la identificación de plantas resistentes diana no expuestas y expuestas. Se encuentra lo mismo para los derivados de anisaldehído, en los que se detectó una mancha roja para la planta sensible expuesta (como para las plantas altamente expuestas a 10 N).

Ejemplo 5: Un ejemplo de colores Pantone®

Tabla 6. Ejemplos de colores Pantone obtenidos con la varilla A y la varilla B

N.º Pantone	Código de colores RGB tras color bridge™	Color RGB modificado tras impre- sión	Color	Tipo de varilla
260	98-37-103	128-90-124		A
261	90-36-90	110-73-94		A

262	83-40-79	105-78-99		A
270	179-182-221	192-182-221		A
271	144-147-206	160-151-201		A
272	117-119-192	147-135-192		A
273	36-23-115	100-83-140		A
664	220-216-226	242-223-228		A
665	198-189-210	198-184-205		A
666	160-146-180	169-146-175		A
667	120-101-146	135-114-145		A
2745	38-0-120	90-70-139		A
2755	33-7-106	86-63-117		A
5245	223-212-215	245-225-222		A
7437	204-178-209	219-179-214		A
7439	179-144-187	192-149-187		A
7440	161-122-170	175-132-170		A
7445	165-162-198	180-164-196		A
7446	143-141-203	147-135-190		A
7527	218-215-203	230-220-196		A
441	190-197-194	199-214-202		B
443	148-157-158	138-147-143		B
534	38-63-106	95-99-124		B
535	146-162-189	146-160-184		B
536	164-179-201	164-179-195		B
655	0-32-76	92-90-122		B
2766	26-33-85	84-74-109		B
5517	186-199-195	186-200-191		B
5665	199-209-197	223-230-200		B

5783	169-176-137	158-159-119		B
5803	203-207-179	214-214-176		B
7542	172-192-198	179-197-194		B
7543	164-174-181	172-173-183		B
7544	137-150-160	156-160-167		B
7545	81-98-111	98-97-107		B
7546	57-74-88	85-82-89		B

Esta tabla se facilita sólo como un ejemplo. No se presentan todos los números mencionados en las siguientes tablas.

Ejemplo 6: Visión general del programa de examen de discos/varillas

Tabla 7. Grupos reactivos de plantas y reactivos que pueden usarse para obtener una reacción de color.

Código de reactivo	Grupos reactivos	Formulación	Gotas de reactivo para la prueba	Tratamiento		Conc. del extracto	
				Cubierta caliente ¹	Acido sulfúrico conc. ²	50 mg/ml	25 mg/ml
N ₁	Ácido orgánico	Verde de bromocresol al 0,5% en EtOH al 96% De amarillo a azul (pH = 3,8 - 5,4)	De 1 a 10	-	-		
CE ₁	Ácido orgánico	Rojo de clorofenol al 0,5% en EtOH al 96% Amarillo - violeta (pH = 4,8 - 6,7)	De 1 a 10	-	-		
CG ₁	Ácido orgánico	Azul de bromocresol al 0,5% en EtOH al 96% Amarillo verdoso - violeta azulado (pH = 3,0 - 4,6)	De 1 a 10	-	-		
CH ₁	Ácido orgánico	Rojo de metilo al 0,5% en EtOH al 96% Rojo - amarillo (pH = 4,4 - 6,0)	De 1 a 10	-	-		
CI ₁	Ácido orgánico	Rojo de etilo al 0,5% en EtOH al 96% Rojo - amarillo	De 1 a 10	-	-		
CF ₁	Ácido orgánico/ lipídes	Azul de bromotimol al 0,5% en EtOH al 96% Amarillo - azul (pH = 5,8 - 7,6)	De 1 a 10	-	-		
DE ₁	Ácido orgánico/ compuestos reductores	Sal de sodio de 2,6-diclorofenolindofenol al 0,5% (reactivo de Tolmanns) en EtOH al 96%	De 1 a 10	-	X		
DP ₁	Ácido orgánico/ compuestos fenólicos	Púrpura de bromocresol al 0,5% en EtOH al 50% Amarillo - rojo (pH = 5,2 - 6,8)	De 1 a 10	-	-		
DF ₁	Ácido orgánico/ compuestos fenólicos	Púrpura de bromocresol al 0,5% en EtOH al 50% (pH = 10 con NaOH 0,1 mol/l)	De 1 a 10	-	-		
A ₁	Compuestos generales	Vainillina al 5% en EtOH al 96%	De 2 a 10	-	X		
I ₁	Compuestos generales	o-Anisaldehído al 5% en EtOH al 96%	De 2 a 10	-	X		
C ₁	Aminoácidos	Ninhidrina al 8% en EtOH al 96%	De 5 a 5	X	-		
AK ₁	Aminoácidos	Vainillina al 2% + hidróxido de potasio	De 5 a 5	X	-		

CC ₁	Aminoácidos aromáticos	al 1% en EtOH al 96%	Glucosa al 19% en agua al 50% y EtOH	De 3 a 10	-	X		
DL ₁	Aminoácidos (glifosato)	4-cloro-7-nitrofurazano al 5% en EtOH al 96%		De 2 a 10	-	X		
DM ₁	Aminoácidos (glifosato)	2,4-dinitrofenilhidrazina al 5% en EtOH al 96%		De 2 a 10	-	X		
DN ₁	Aminoácidos (glifosato)	Cloroformiato de fluorenilmetilo al 5% en EtOH al 96%		De 2 a 10	-	X		
DO ₁	Aminoácidos (glifosato)	Hidróxido de tetrabutilamonio al 5% en EtOH al 96%		De 2 a 10	-	X		
BC ₁	N-compuestos	0,2 g de yodo + 0,4 g de yoduro de potasio en 100 ml de agua		De 5 a 5	-	-		
E ₁	N-compuestos	Disolvente A: 0,85 g de nitrato de bismuto (III) en 10 ml de ácido acético + 40 ml de agua. Disolvente B: 8 g de yoduro de potasio en 20 ml de agua. Partes iguales de A y B.		De 5 a 10	-	-		
CD ₁	N-compuestos, alcaloides	Sulfato de amonio y hierro (III) al 1% en agua		De 3 a 10	-	X		
DC ₁	Aminas	2-Metoxi-2,4-difenil-3(2H)furanona (MDPF) al 0,5% en EtOH al 96%		De 2 a 10	-	X		
DI ₁	N-compuestos	Yoduro de potasio al 8% en agua		De 2 a 10	-	X		
B ₁	Compuestos fenólicos	Difenilborinato de 2-aminoetilo al 2% en EtOH al 96%		De 5 a 5	-	-		
V ₁	Compuestos fenólicos	Cloruro de hierro (III) al 5% (5 g en etanol al 96% + 1 ml de HCl conc.)		De 5 a 5	-	-		
D ₁	Flavonoides	Cloruro de aluminio al 5% en EtOH al 96% (luz UV)		De 5 a 5	-	-		
DA ₁	Fitoesteroles	Cloruro de berberina dihidratado al 0,5% en EtOH al 96%		De 5 a 5	-	-		
DB ₁	Fitoesteroles	Sal de sodio de 1,2-naftoquinon-4-sulfona al 0,5% en EtOH al 96%		De 2 a 10	-	X		
DG ₁	Cetosas/ glucolípidos	300 mg de antrona en 10 ml de ácido acético conc. añadidos a 20 ml de EtOH al 96%		De 2 a 10	-	X		
DD ₁	Cationes/ diazepinas	8-Hidroxiquinolina al 0,5% en EtOH al 96%		De 2 a 10	-	X		
DJ ₁	Compuestos carbonílicos/ aldehídos	2-Aminodifenil(bifenil-2-amina) al 5% en EtOH al 96%		De 2 a 10	-	X		

	alifáticos (C8), glicolaldehídos, ácido gloxílico, 2,3- pentadiona								
AD α_1	Hidratos de carbono y glicósidos	α -naftol al 5% en EtOH al 96%	De 2 a 10	-				X	
AD β_1	Hidratos de carbono y glicósidos	β -naftol al 5% en EtOH al 96%	De 2 a 10	-				X	
AA ₁	Hidratos de carbono y glicósidos	Naftoresorcinol al 5% en EtOH al 96%	De 2 a 10	-				X	
AE ₁	Hidratos de carbono y glicósidos	Orcinol al 5% en EtOH al 96%	De 2 a 10	-				X	
Al ₁	Hidratos de carbono y glicósidos	Timol al 5% en EtOH al 96%	De 2 a 10	-				X	
U ₁	Hidratos de carbono y glicósidos	Urea al 5% en EtOH al 96%	De 2 a 10	-				X	
CK ₁	Hidratos de carbono y glicósidos	Ácido 4-hidroxibenzoico al 5% en EtOH al 96%	De 2 a 10	-				X	
DK ₁	Hidratos de carbono (mono-, di-) o ácido urónico	Ácido 4-aminobenzoico al 5% en EtOH al 96%	De 2 a 10	-				X	
F ₁	Lípidos	Ácido molibdato fosfórico al 10% en EtOH al 96%	De 2 a 10	-				X	
AV ₁	Lípidos	2',7'-diclorofluoresceína al 0,5% en EtOH al 96%	De 1 a 10	-				-	
AY ₁	Lípidos	Rodamina 6G al 0,5% en EtOH al 96%	De 1 a 10	-				-	
DH ₁	Lípidos/ fosfolípidos/ esteroides	Sal de amonio del ácido 8- anilinaftalín-1-sulfónico al 1% en agua	De 2 a 10	-				X	
AA ₁	S-compuestos	Azul de metileno al 0,5% en EtOH al 96%	De 1 a 10	-				-	
AF ₁	Compuestos reductores	Permanganato de potasio al 6% en agua	De 1 a 10	-				-	

1) Prueba con cubierta caliente:

5 En el vidrio de muestra n.º 1: extracto + reactivo (es necesario calentar para que reaccionen). Se mantuvieron los vidrios de manera oblicua hasta que se enfrió la disolución (aproximadamente 10-15 min); en el vidrio de muestra n.º 2: 0,50 ml de agua + 15 gotas (pipeta de vidrio) o 24 gotas (matraz de plástico Apodan pequeño) de ácido sulfúrico conc. y se desarrolló calor a aproximadamente 70°C. Se puso el vidrio de muestra n.º 1 inmediatamente después de prepararse el vidrio n.º 2 y se mantuvieron los vidrios de manera oblicua hasta que se enfrió la disolución (aproximadamente 10-15 min.).

2) Reacción con calor (ácido sulfúrico conc.):

10 A la muestra (que contiene 0,5 ml en total con reactivo) se le añadieron 15 gotas (pipeta de vidrio) o 24 gotas (matraz de plástico Apodan pequeño) de ácido sulfúrico conc. y se desarrolló calor a aproximadamente 70°C.

La no indicación de un tratamiento indica que no fue necesario tratamiento adicional para obtener una reacción.

Preparación de plantas de prueba para los métodos de examen

15 Fresco: Se trituraron 1500 mg de material vegetal fresco con 30,00 ml de agua fresca en un pequeño mortero. Se filtró el extracto a través de un filtro (posiblemente con algodón en un embudo), y luego a través de un filtro de 0,45 µm GMF w/GMF de Whatman. Se realizó la prueba en el plazo de ½-1 hora. El examen completo llevó 2-2,5 horas.

Secado por congelación:

20 Para varilla/disco: Se trituraron 1500 mg de material vegetal secado por congelación y se extrajo con 30,00 ml de etanol al 10% en agua al 90% durante 2 horas en baño ultrasónico con hielo. Se filtró el extracto a través de un filtro de 0,45 µm GMF w/GMF de Whatman. Se realizó la prueba en el plazo de ½-1 hora.

Usar varilla, cuando se evalúa el área/altura de área y disco cuando sólo se evalúa el color con la escala de colores de PANTONE®.

25 Varilla: Se sumerge el filtro Adventec 526 (1x4 cm, en el que 1x1 cm está libre y 3x1 cm está sumergido en parafina). Se usó con el área/altura de pico con CAMAG. Se sumergió la varilla y se evaluó el color PANTONE®. Se pusieron las varillas en un soporte con un orificio y se fotografiaron con CAMAG (con luz visible). Disco: Se usó un filtro Adventec 590 (d=2,5 cm) cuando sólo se evaluó el color PANTONE®.

Experimento 7. Un ejemplo de un examen de *Papaver rhoeas* expuesta a Hussar OD

Los números en la tabla se refieren a los números PANTONE®. Para los extractos vegetales se usaron 25 ó 50 mg de material vegetal congelado fresco por ml de agua pura.

30 1) Prueba con cubierta caliente:

35 En el vidrio de muestra n.º 1: extracto + reactivo (es necesario calentar para que reaccionen). Se mantienen los vidrios de manera oblicua hasta que se enfría la prueba (aproximadamente 10-15 min); en el vidrio de muestra n.º 2: 0,50 ml de agua + 15 gotas (pipeta de vidrio) o 24 gotas (matraz de plástico Apodan pequeño) de ácido sulfúrico conc. y se desarrolla calor a aproximadamente 70°C. Debe prestarse atención porque podría chorrear. Se pone el vidrio de muestra n.º 1 inmediatamente después de prepararse el vidrio n.º 2 y se mantienen los vidrios de manera oblicua hasta que se enfría la prueba (aproximadamente 10-15 min.).

2) Reacción con calor (ácido sulfúrico conc.):

A la muestra (que contiene 0,5 ml en total con reactivo) 15 gotas (pipeta de vidrio) o 24 gotas (matraz de plástico Apodan pequeño) de ácido sulfúrico conc. y se desarrolla calor a aproximadamente 70°C.

Tabla 8. *Papaver rhoeas* expuesta a Hussar OD. Los reactivos se describen adicionalmente en la tabla 7. Las plantas se identifican como "4", "5", "6" y "12". Los resultados indicados para las plantas son los colores Pantone obtenidos con el método descrito a continuación.

Código de reactivo	Gotas de reactivo con respecto a gotas de la muestra	Tratamiento		Conc. del extracto	4 (ID 150)		5 (ID 397)			6 (ID 248)			12 (ID 406)		
		Cubierta caliente ¹	ácido sulfúrico conc. ²		control	1 N	control	1 N	10 N	control	1 N	10 N	control	1 N	10 N
N ₁	De 1 a 10	-	-	50 mg/ml	3025	3025	3025	3025	3025	3025	3025	3025	3025	3025	3025
CE ₁	De 1 a 10	-	-	x	7508	7508	722	722	722	722	722	722	730	730	730
CG ₁	De 1 a 10	-	-	x	2725	2725	violeta M	Violeta M	Violeta M	violeta M	Violeta M	Violeta M	violeta M	Violeta M	Violeta M
CH ₁	De 1 a 10	-	-	x	472/714	714	7410	472	7410	7410	7410	486	714	714	7140
CI ₁	De 1 a 10	-	-		170	180	701	701	701	701	701	701	701	701	701
CF ₁	De 1 a 10	-	-	x	458	458	457	457	457	7403	7403	7403	7403	7403	7403
DE ₁	De 1 a 10	-	X	x	155	5025	727	155	5035	726	726	5035 ligero	726	5035 ligero	5035 ligero
DP ₁	De 1 a 10	-	-	x	145	145	145	145	145	145	145	145	145	145	145
DF ₁	De 1 a 10	-	-	x	521	521	668	668	668	668	668	668	668	668	668
A ₁	De 2 a 10	-	X	x	7514	489 ligero	7514	7514	4755	7514	7514	4755	7514	7513	4755
I ₁	De 2 a 10	-	X	x	7507	7501	7502	7501	7501	7501	7501	7500	7501	7501	7500
C ₁	De 1 a 5	X	-	x	Claro	Claro	Claro	Claro	Claro	Claro	Claro	Claro	Claro	Claro	Claro

AK ₁	De 1 a 5	X	-	x		155	7506	615	615	614	615	614	614	614	614
CC ₁	De 3 a 10	-	X	x		7508	7508	7502	7501	7502	7501	7502	7500	7500	7501
DL ₁	De 2 a 10	-	X	x		7508	7508	7502	7501	7502	7501	7502	7500	7501	7501
DM ₁	De 2 a 10	-	X	x		7508	7534	7502	7502	7501	7501	7501	7500	7501	7500 ligero
DN ₁	De 2 a 10	-	X	x		7506	7534	7501	7501	gris cálido M1	7501	7500	7500	7500	7500 ligero
DO ₁	De 2 a 10	-	X	x		7502	7534	7501	7501	7534	7501	7501	7534	7501	7500
BC ₁	De 1 a 5	-	-	x		607	Claro	7500	7500	7500	7500	7500	7500	7500	7500
E ₁	De 5 a 10	-	-	x		168	168	168	168	168	168	168	168	168	168
CD ₁	De 3 a 10	-	X	x		Claro	Claro	ligero/ claro	ligero/ claro	Claro	Claro	Claro	Claro	Claro	Claro
DC ₁	De 2 a 10	-	X	x		7501	7534	7502	7501	7502	7501	7501	7501	7501	7500 ligero
DI ₁	De 2 a 10	-	X	x		Claro	Claro	Claro	Claros	Claro	Claro	Claro	Claro	Claro	Claro
B ₁	De 1 a 5	-	-	x		7500	Claro	7500	7500	7500 ligero/ claro	7500	Claro	7500	7500	Claro
V ₁	De 1 a 5	-	-	x		609	609	617	617	617	617	617	617	617	617
D ₁	De 1 a 5	-	-	x		7500	Claro	7500 ligero	7500	7500 ligero/ claro	7500	7500 ligero	7500	7500 ligero	claro
DA ₁	De 1 a 5	-	-	x		395	395	395	395	3955	3955	3955	3955	3955	3955
DB ₁	De 2 a 10	-	X	x		7502	482	7501	7501	7501	7501	7501	7501	7501	750

[illegible]

AF ₁	De 1 a 10	-	-	x		512	512	512	512	512	512	512	512	512	512	512	512	512	512
-----------------	-----------	---	---	---	--	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

1) Prueba con cubierta caliente:

- 5 En el vidrio de muestra n.º 1: extracto + reactivo (es necesario calentar para que reaccionen). Se mantuvieron los vidrios de manera oblicua hasta que se enfrió la disolución (aproximadamente 10-15 min); en el vidrio de muestra n.º 2: 0,50 ml de agua + 15 gotas (pipeta de vidrio) o 24 gotas (matraz de plástico Apodan pequeño) de ácido sulfúrico conc. y se desarrolló calor a aproximadamente 70°C. Se puso el vidrio de muestra n.º 1 inmediatamente después de prepararse el vidrio n.º 2 y se mantuvieron los vidrios de manera oblicua hasta que se enfrió la disolución (aproximadamente 10-15 min.).

2) Reacción con calor (ácido sulfúrico conc.):

- 10 A la muestra (que contiene 0,5 ml en total con reactivo) se le añadieron 15 gotas (pipeta de vidrio) o 24 gotas (matraz de plástico Apodan pequeño) de ácido sulfúrico conc y se desarrolló calor a aproximadamente 70°C.

La no indicación de un tratamiento indica que no fue necesario tratamiento adicional para obtener una reacción.

REIVINDICACIONES

1. Método de prueba para determinar una resistencia a herbicidas específica en una planta viva específica, comprendiendo dicho método:
 - proporcionar un extracto de dicha planta viva específica, comprendiendo dicho extracto al menos un compuesto fitoquímico,
 - detectar el al menos un compuesto fitoquímico observando visualmente dicho al menos un compuesto fitoquímico sobre un soporte sólido, o visualizarlos mediante luz visible y/o UV,
 - correlacionar dicha visualización de dicho al menos un compuesto fitoquímico con una escala de visualización convencional de dicho al menos un compuesto fitoquímico de una planta resistente, que es del mismo biotipo que dicha planta viva específica, y
 - evaluar de ese modo si dicha planta viva específica ha desarrollado resistencia hacia dicho herbicida específico.
2. Método según la reivindicación 1, en el que el método antes de la etapa de proporcionar un extracto de dicha parte de una planta viva específica comprende además
 - exponer dicha al menos una planta viva específica a un herbicida específico,
 - después de un periodo de tiempo, seleccionar al menos una parte de la planta viva específica que no está muerta debido a la exposición a dicho herbicida específico.
3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que el método antes de visualizar el al menos un grupo de compuestos fitoquímicos comprende además,
 - proporcionar al menos un reactivo químico aplicable para una reacción química con dicho al menos un grupo de compuestos fitoquímicos, y
 - provocar una reacción química entre dichos reactivos químicos y compuestos fitoquímicos de dicho material vegetal vivo específico, y
 en el que dicha visualización de al menos un grupo de compuestos fitoquímicos es una detección de un resultado de dicha reacción química.
4. Método según la reivindicación 3, en el que el reactivo químico se basa en uno o más de los compuestos rojo de clorofenol, rojo de metilo, rojo de etilo, azul de bromotimol, sal de sodio de 2,6-diclorofenolindofenol, púrpura de bromocresol, ninhidrina, vainillina + hidróxido de potasio, glucosa, 4-cloro-7-nitrobenzofurazano, 2,4-dinitrofenilhidrazina, clorofenolato de 9-fluorenilmetilo, hidróxido de tetrabutilamonio, yodo + yoduro de potasio, nitrato de bismuto (III), sulfato de amonio y hierro (III), 2-metoxi-2,4-difenil-3(2H)furanona (MDPF), difenilborinato de 2-aminoetilo, cloruro de hierro (III), cloruro de aluminio, cloruro de berberina dihidratado, sal de sodio de 1,2-naftoquinon-4-sulfona, antrona, 8-hidroxiquinolona, 2-aminodifenil(bifenil-2-amina), orcinol, urea, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido 4-aminobenzoico, ácido molibdatofosfórico, 2',7'-diclorofluoresceína, sal de amonio del ácido 8-anilinaftalín-1-sulfónico, rodamina, yodo, yoduro de potasio, cloruro de amonimolibdato de estaño (II), cloruro de cobalto (II), cloruro de paladio (II), nitrato-yoduro de potasio, vainillina, ácido sulfúrico, naftoresorcinol, azul de metileno, β -naftol, timol, fluoresceína, amoniaco, verde de bromocresol, azul de bromofenol, permanganato de potasio, 2,7-diclorofluoresceína, rodamina 6G, éster 2-aminoetilico del ácido difenilbórico, ácido fosfórico, yodo, yoduro de potasio, cloruro de amonimolibdato de estaño (II), cloruro de cobalto (II), cloruro de paladio (II), ninhidrina, 1-naftol, nitrato de bismuto (III) yoduro de potasio, ácido molibdatofosfórico, rodamina B, anisaldehído, nitrato de plata, cloruro de hierro (III), cloruro de zinc y productos químicos o mezclas de los mismos.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la evaluación del método se selecciona del grupo de evaluación cualitativa y/o cuantitativa y/o semicuantitativa o una combinación de las mismas.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el uso de reactivos químicos y soporte sólido comprende las siguientes etapas:
 - poner en contacto un extracto de dicha planta viva específica con al menos un reactivo químico,
 - proporcionar una reacción química entre el extracto de material procedente de la planta viva y el al menos un reactivo químico,
 - poner en contacto un soporte sólido con el material procedente de la planta viva específica que se hace reaccionar químicamente con el al menos un reactivo químico, de ese modo

- obtener un soporte sólido con un color (detección visual o con luz UV)
 - comparar el color y la intensidad de color con una escala de visualización convencional,
 - evaluar existencia de resistencia en dicha planta viva específica.
- 5 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las pruebas se realizan separando compuestos individuales que pertenecen a dicho al menos un grupo de compuestos fitoquímicos obtenidos a partir de la planta viva.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las pruebas se realizan con al menos un grupo no separado de compuestos fitoquímicos obtenidos a partir de la planta viva específica.
- 10 9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la detección se realiza mediante un método analítico seleccionado del grupo que consiste en cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), cromatografía de gases (GC) o espectrometría de masas (MS) o una combinación de dichos métodos analíticos.
- 15 10. Método para proporcionar una escala de visualización convencional para material procedente de una planta viva específica que se ha expuesto o no se ha expuesto a un herbicida específico, comprendiendo dicho método las etapas de:
- someter al menos una planta viva específica a tipos conocidos y cantidades conocidas de un herbicida específico o no someterla a herbicida,
 - obtener material procedente de dicha planta viva,
 - determinar las respuestas fitoquímicas de dicho material procedente de dicha planta viva específica para cada tipo de herbicida específico y/o para cada cantidad de herbicida, y
 - obtener al menos un resultado convencional relacionado con dicho tipo de herbicida específico y/o con dicha cantidad de herbicida específico.
- 20 11. Método según la reivindicación 10, en el que dicha respuesta fitoquímica se basa en compuestos fitoquímicos en la planta viva que se correlacionan con la aparición de resistencia en dicha planta viva.
- 25 12. Método según cualquiera de la reivindicación 10 a 11, que incluye además las características de las reivindicaciones 1 a 9.
13. Kit de ensayo para someter a prueba la resistencia a herbicidas en una planta viva, comprendiendo dicho kit de ensayo:
- al menos un papel de filtro,
 - al menos un disolvente,
 - al menos un medio de compresión,
 - al menos una escala de visualización convencional de al menos un compuesto fitoquímico de una planta viva específica, que se ha expuesto a un herbicida específico y/o cantidades conocidas de dicho herbicida específico, para determinar si una planta ha desarrollado resistencia a herbicidas,
 - al menos un recipiente.
- 30 35 14. Kit de ensayo según la reivindicación 13, que comprende además uno o más de los componentes seleccionados del grupo de
- al menos un reactivo químico,
 - al menos un mortero con mano de mortero y/o al menos una caja con bolas para agitar y/o al menos una prensa manual
 - al menos una pipeta,
 - al menos una lámpara UV,
 - al menos un calentador y/o al menos una cubierta caliente compuesta por reactivos químicos y disolventes,
 - al menos una balanza,
- 40 45

- al menos unas tijeras,
- al menos un par de pinzas,
- al menos una bolsa de plástico,
- al menos una información de identificación para identificar la especie vegetal,
- 5 - al menos unas instrucciones que describen cómo usar el kit de ensayo,
- al menos una jeringa,
- al menos un filtro
- al menos una placa de cromatografía en capa fina.
- 15. Kit de ensayo según la reivindicación 13 ó 14, en el que dicho kit comprende
- 10 - 3 trozos de papel de filtro,
- 3 cajas con tapas y cada una con 4 bolas de vidrio
- 6 vidrios,
- 3 jeringas cada una con 13,5 ml de disolvente,
- 1-3 recipientes con reactivos químicos,
- 15 - 3 pipetas,
- 1 balanza,
- 1 tijera,
- 1 par de pinzas,
- 3 bolsas de plástico,
- 20 - 1 información de identificación para identificar la especie vegetal,
- 1 instrucciones que describen cómo usar el kit de ensayo incluyendo una escala de colores convencional,
- 3 filtros.
- 16. Uso del kit de ensayo según las reivindicaciones 12-15, para someter a prueba la resistencia a herbicidas en plantas.
- 25

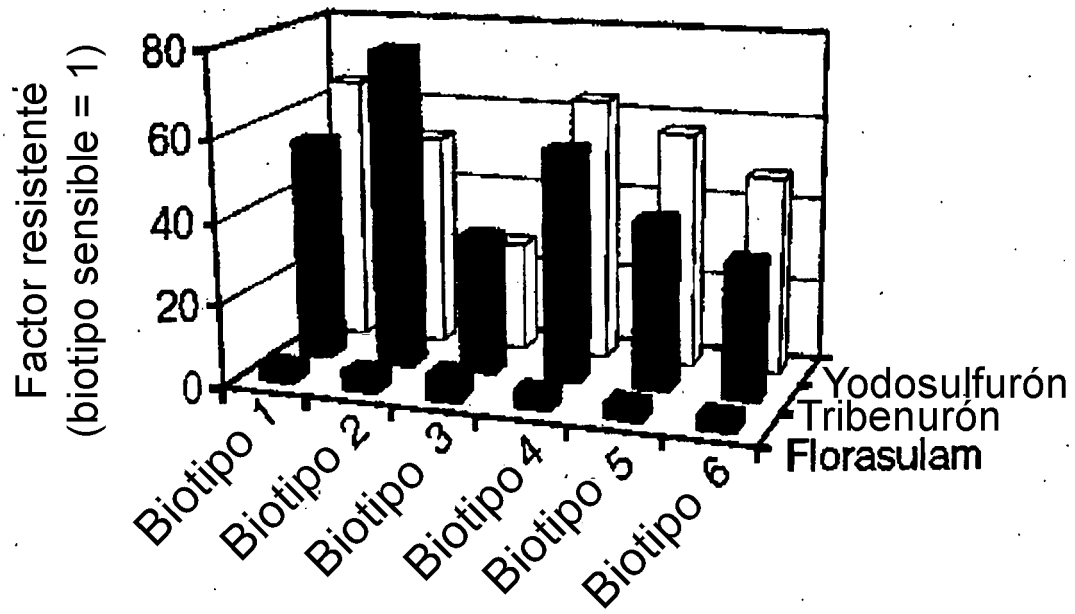


Fig. 1

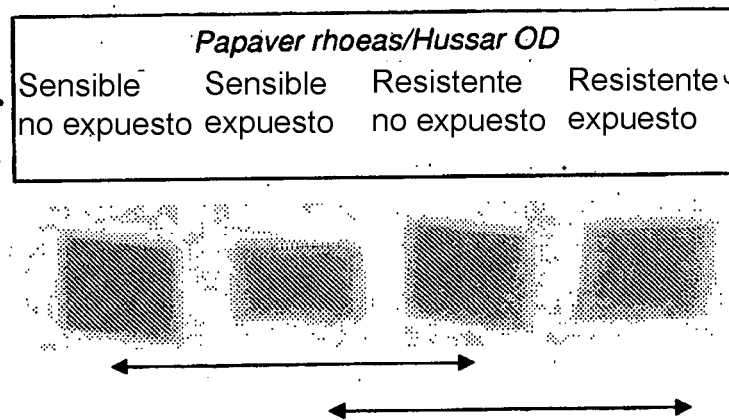


Fig. 2

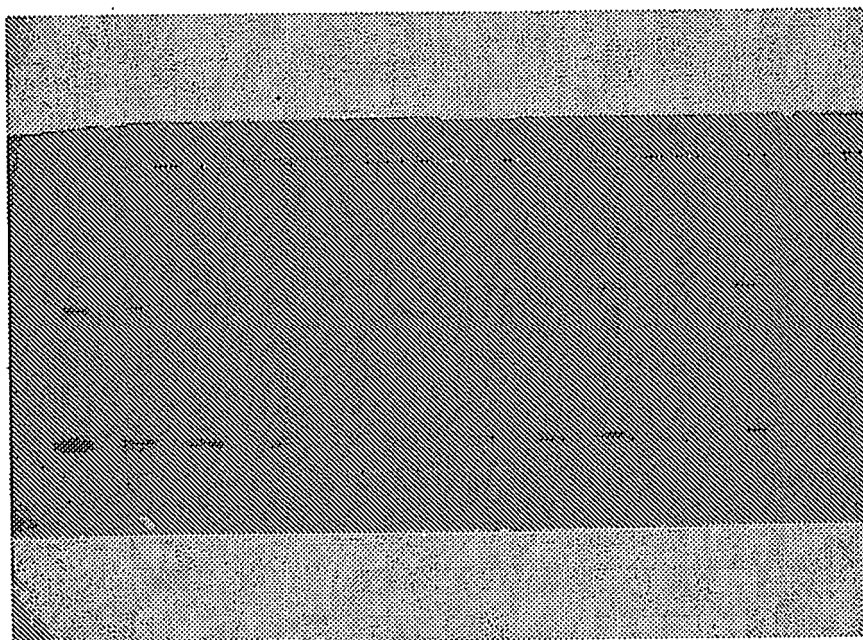


Fig. 3a

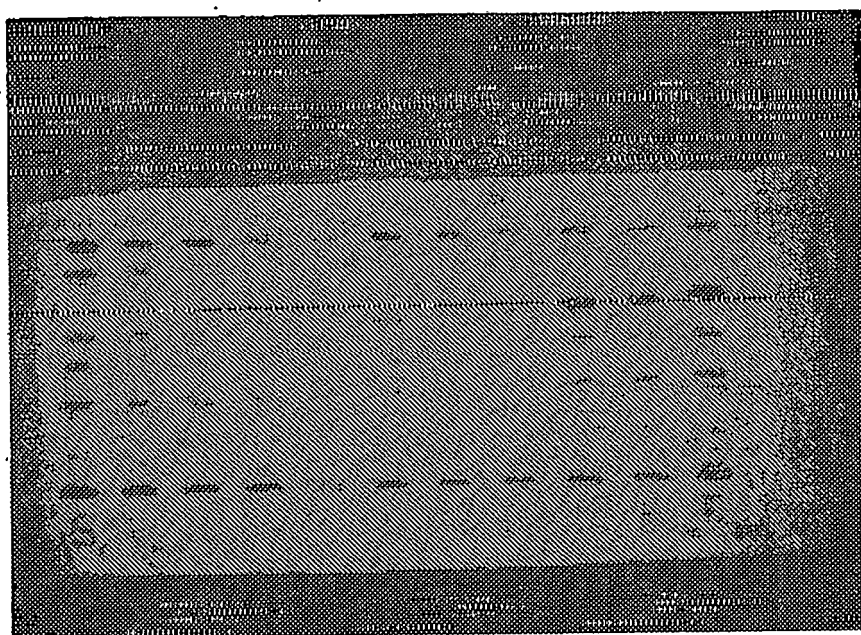


Fig. 3b

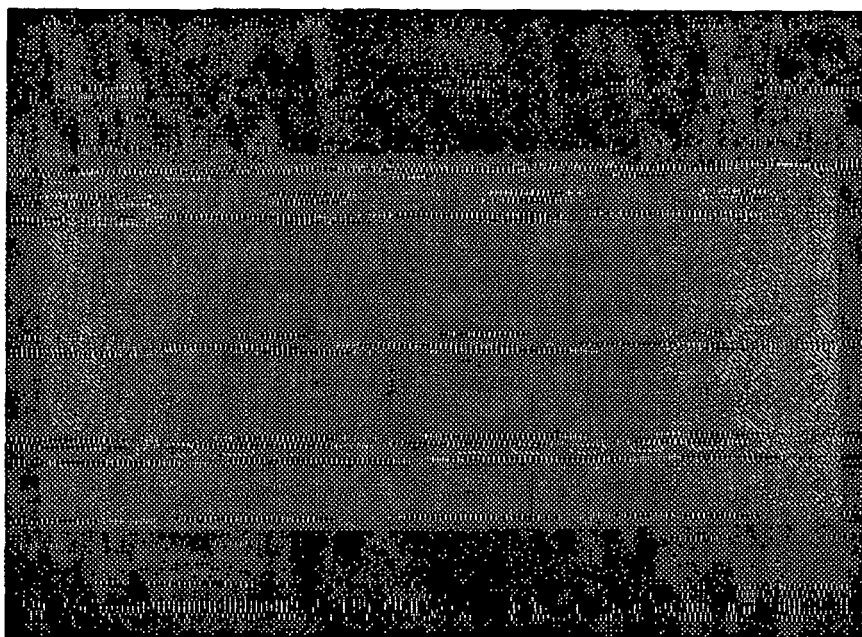


Fig 3c

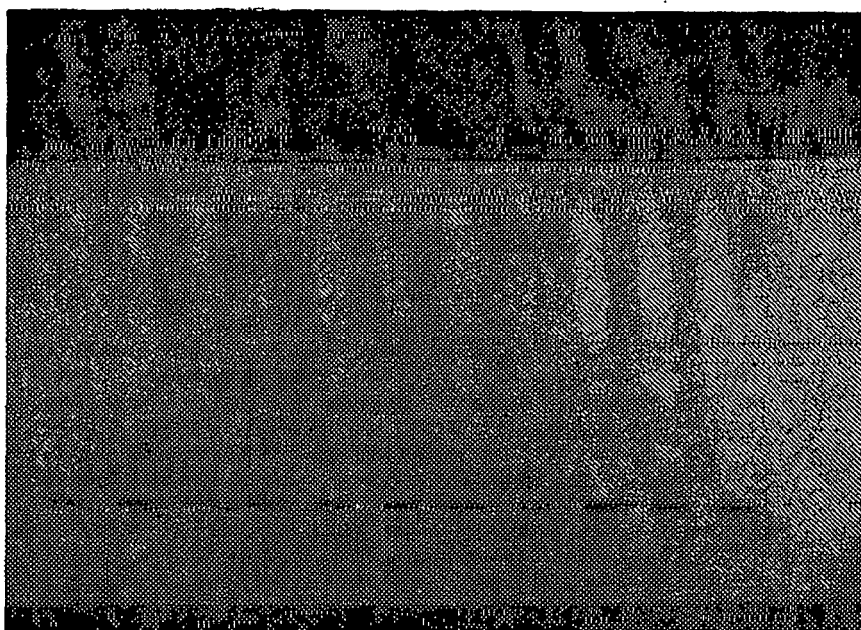


Fig 4a

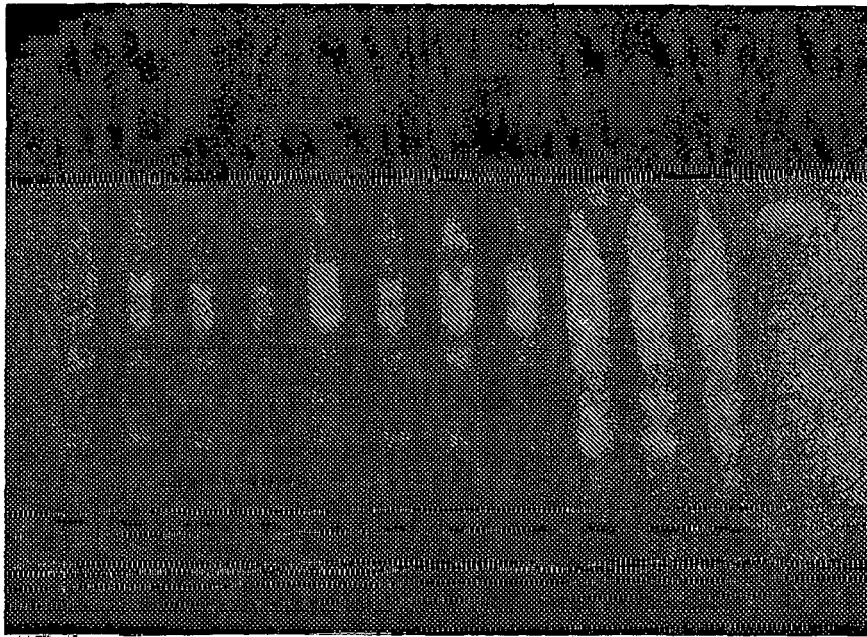


Fig 4b

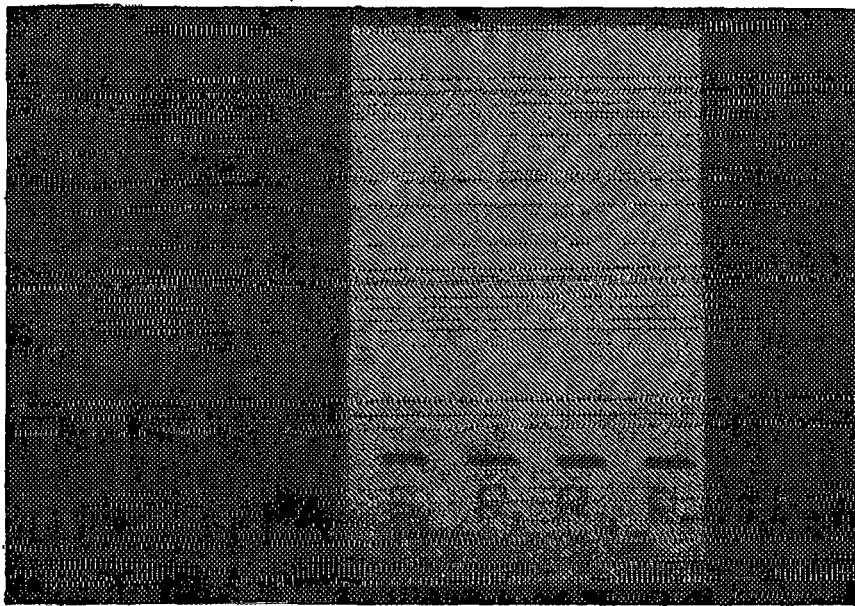


Fig 4c

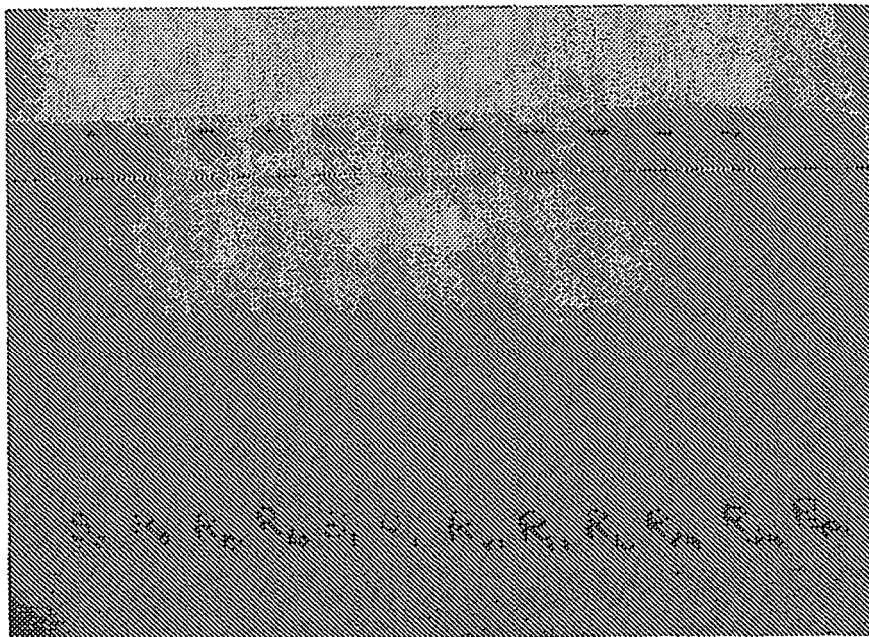


Fig 5



Fig 6a



Fig 6b

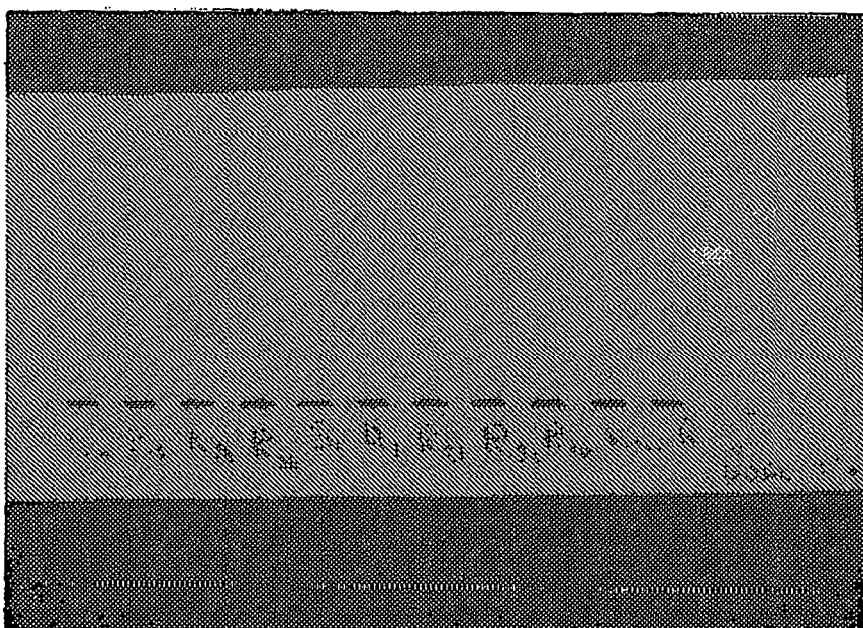


Fig 7a

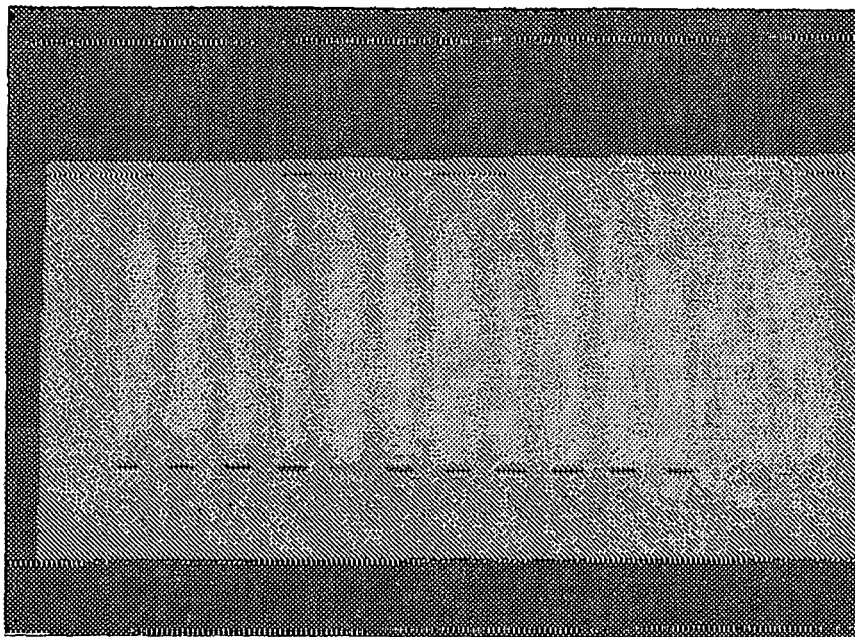


Fig 7b.

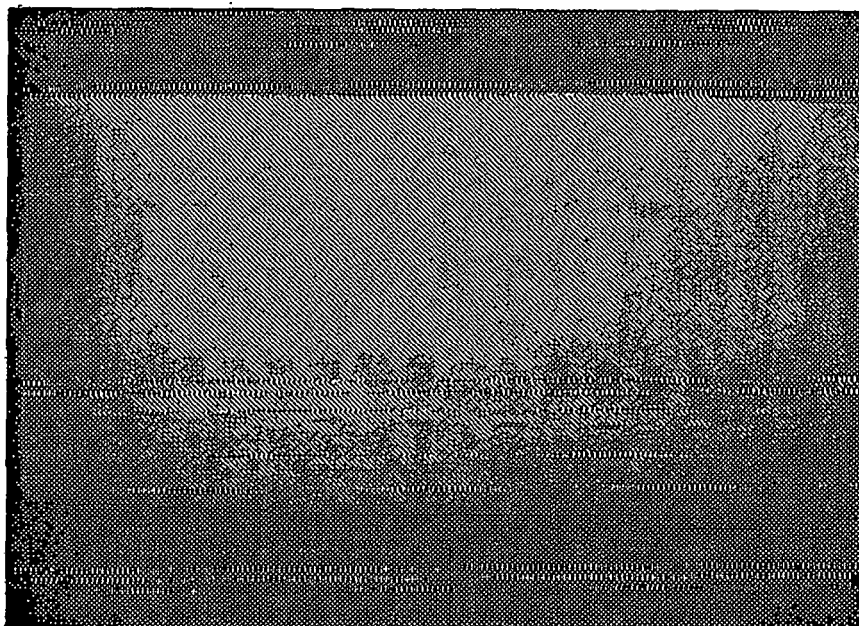


Fig 8a.

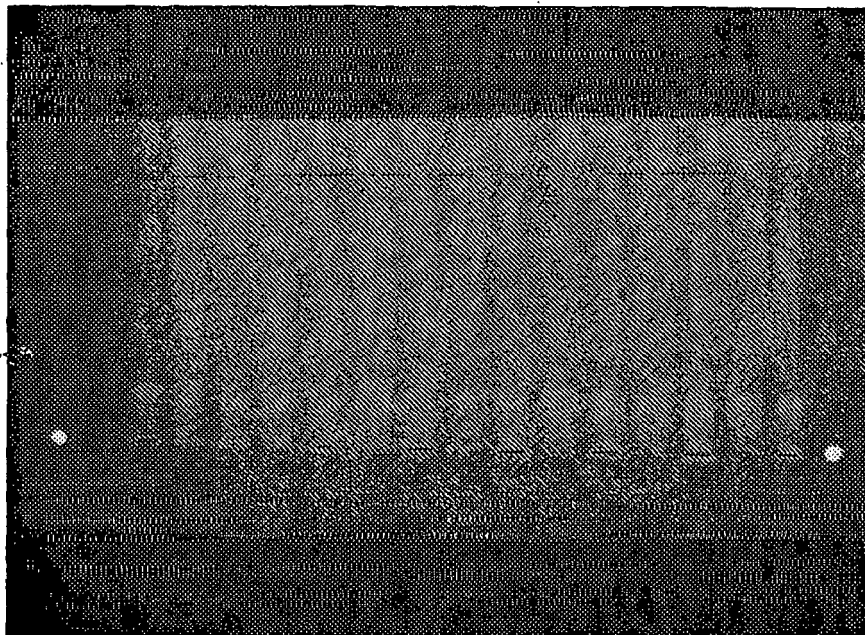


Fig 8b

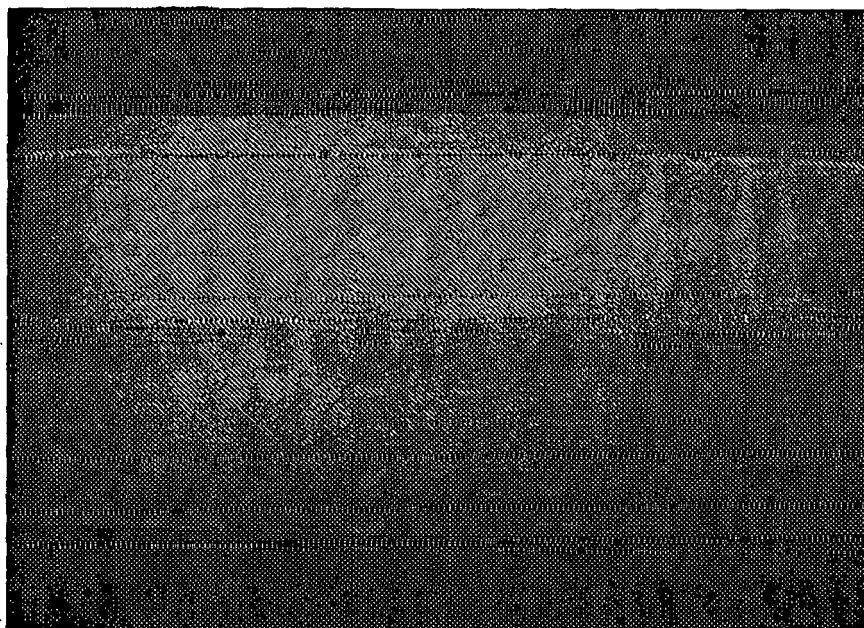


Fig 9a

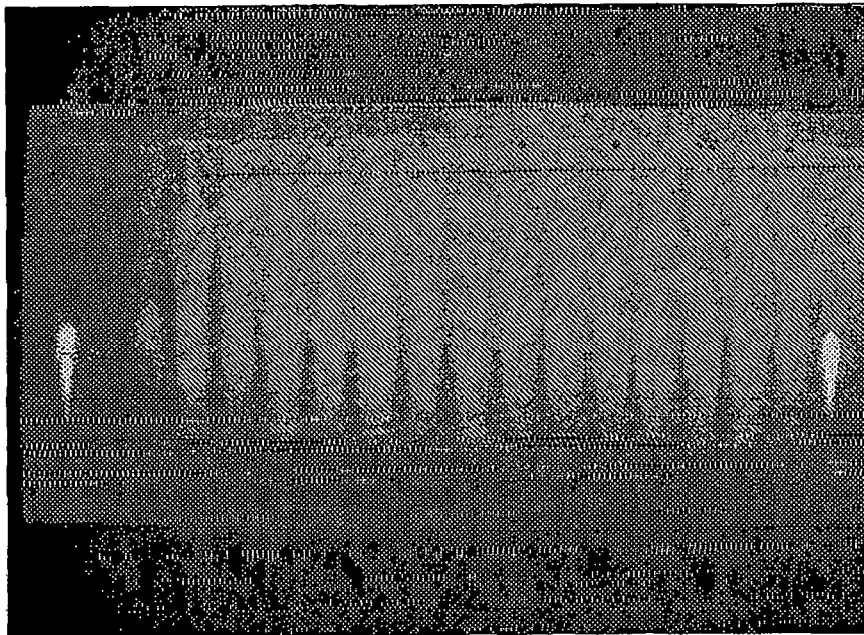


Fig 9b

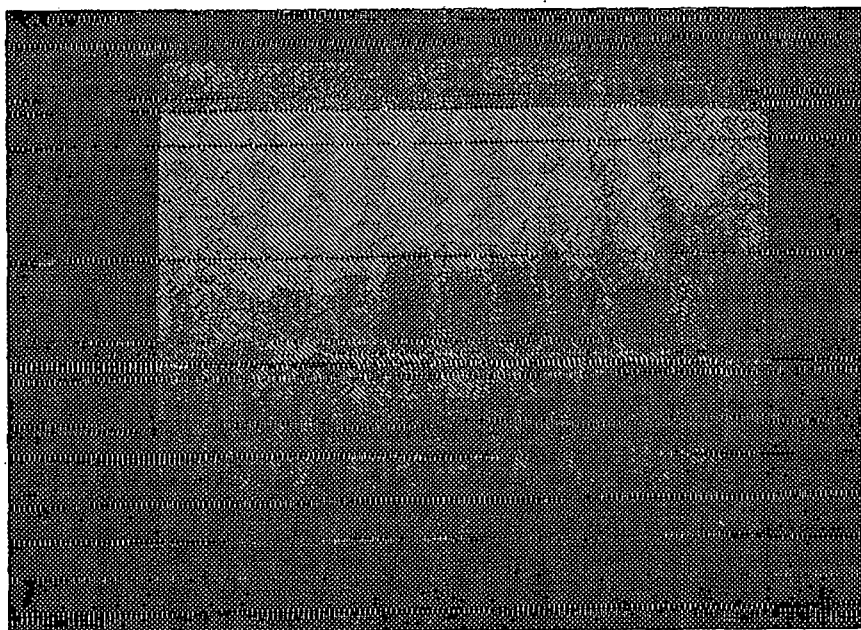


Fig 9c

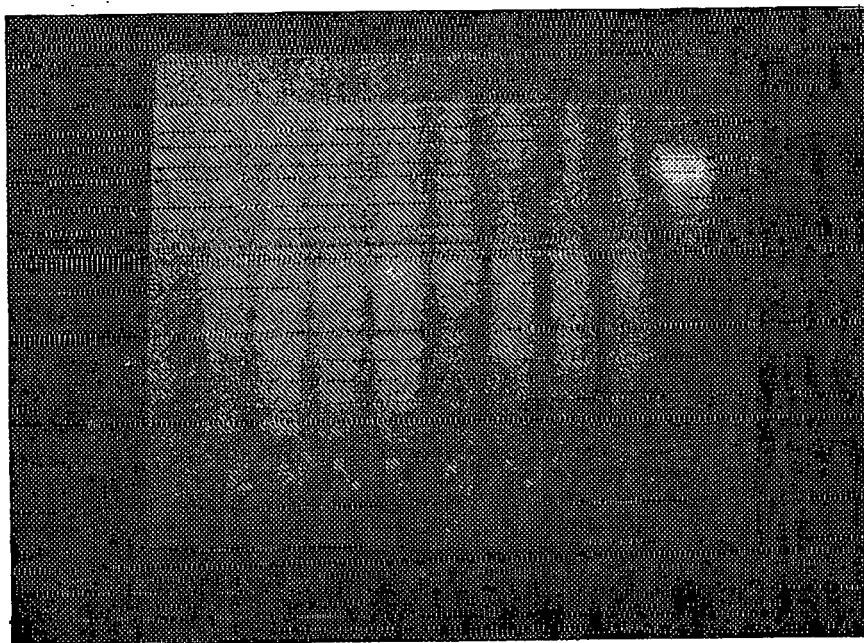


Fig 9d

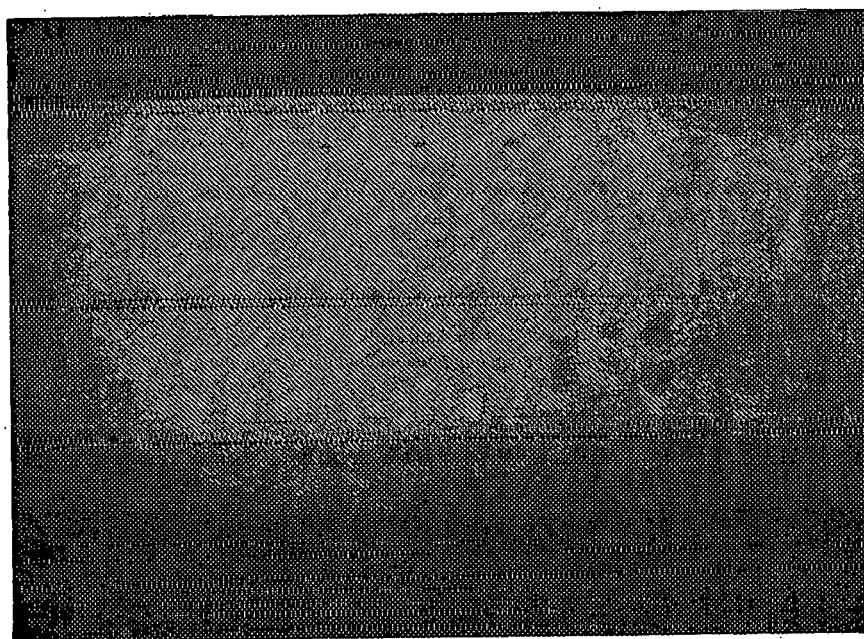


Fig 10a

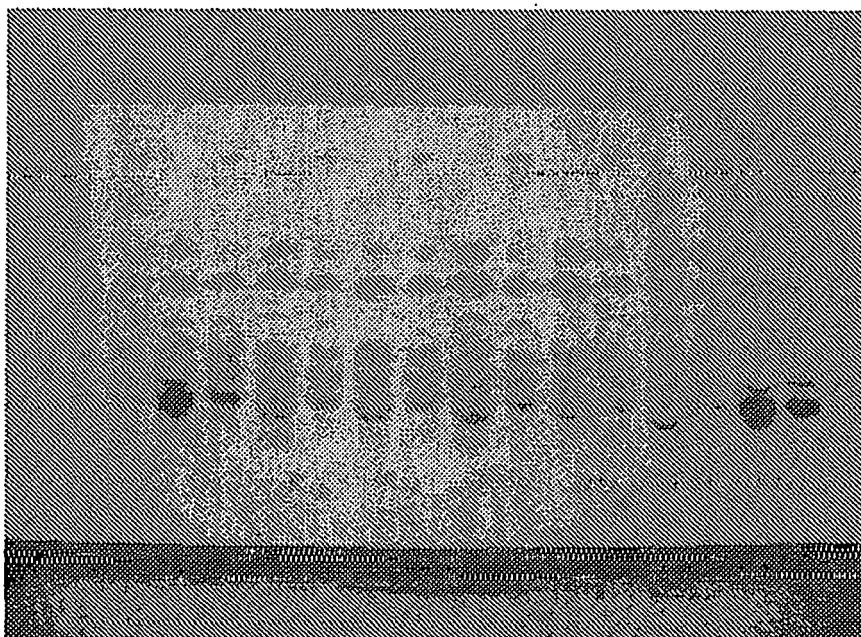


Fig 10b

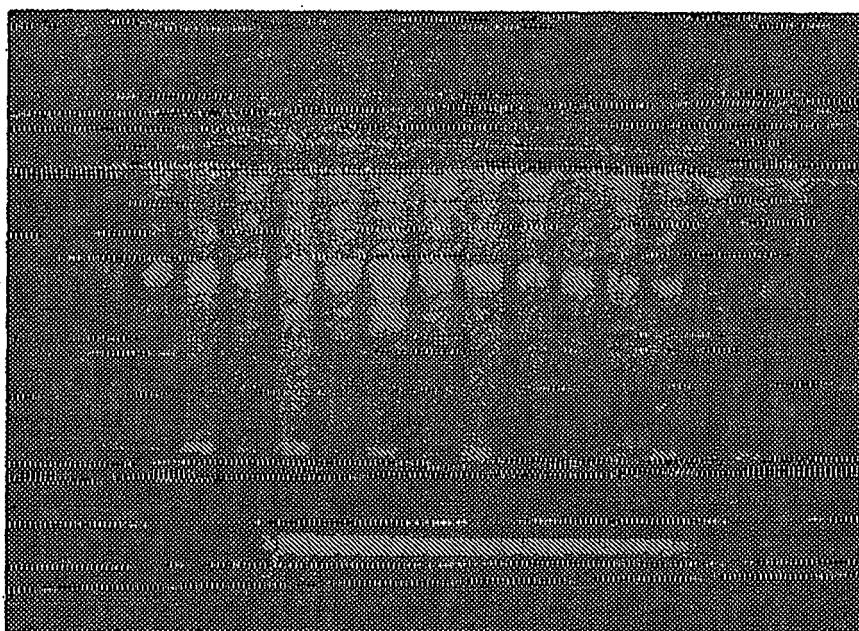


Fig 11a

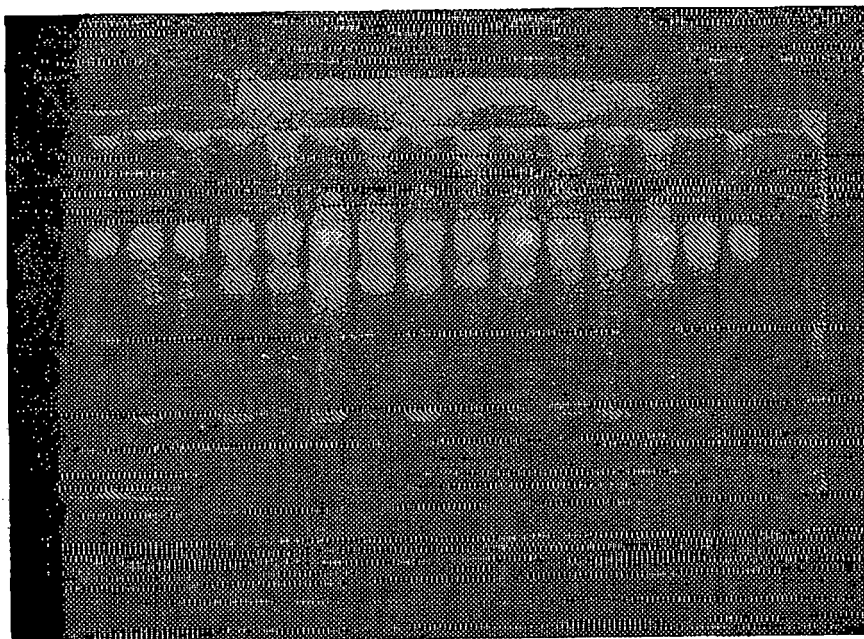


Fig 11b

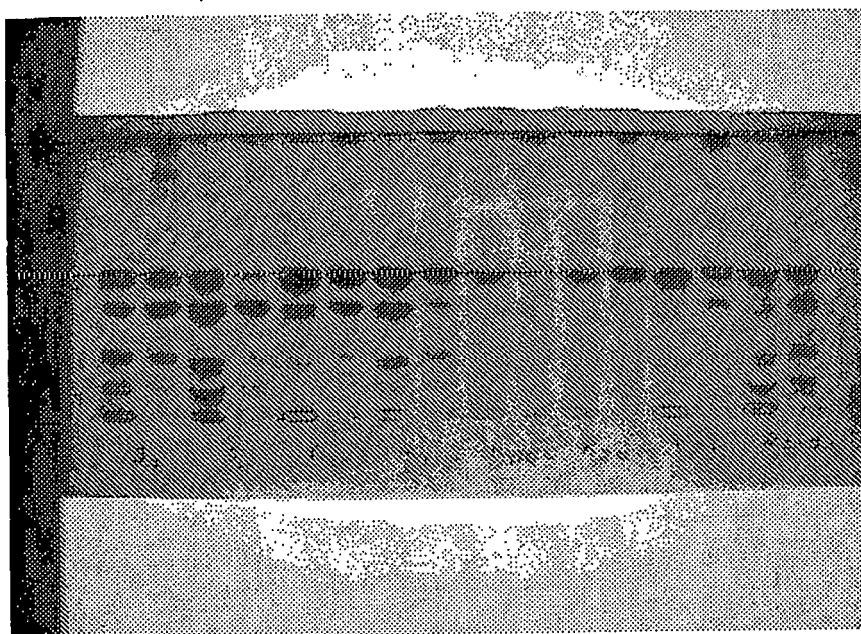


Fig 11c

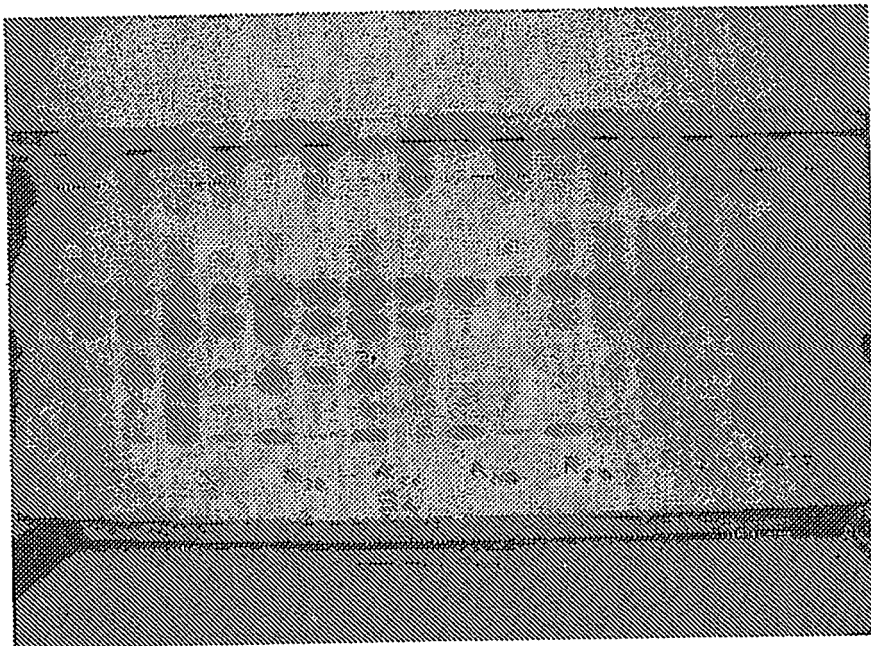


Fig 11d

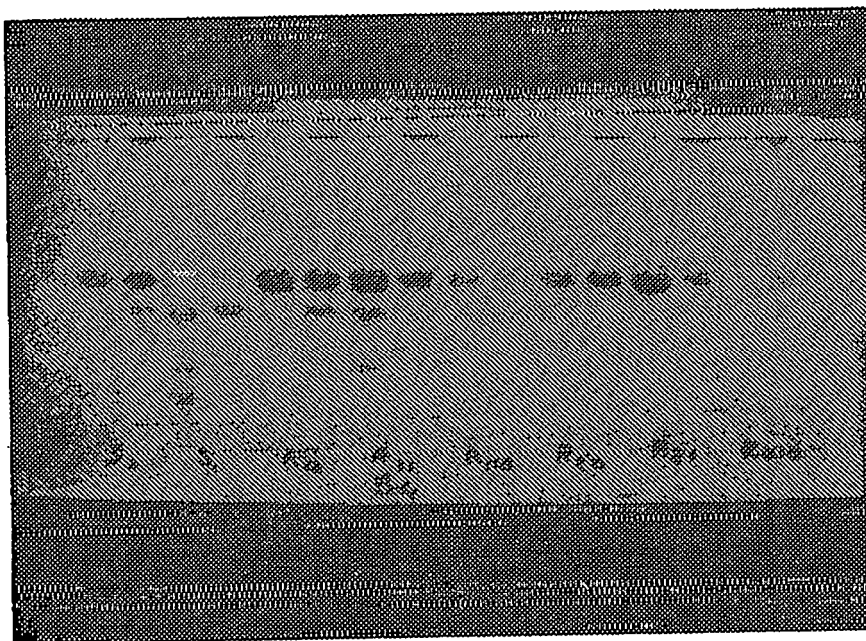


Fig 11e

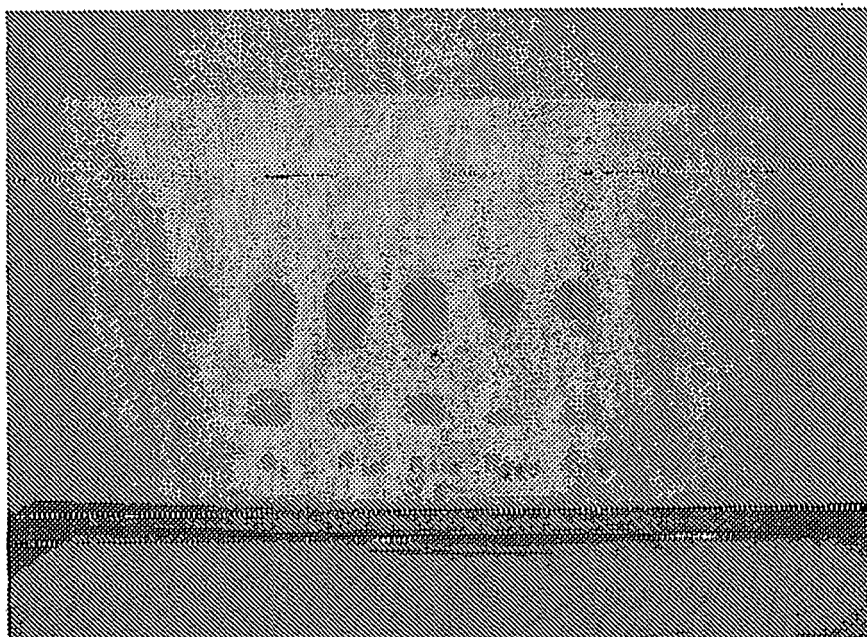


Fig 12a



Fig 12b

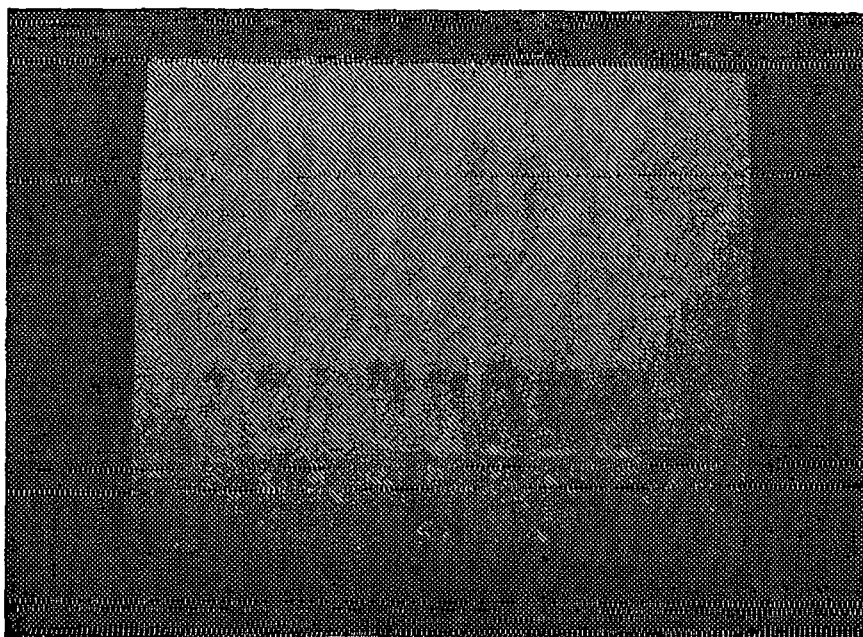


Fig 13a

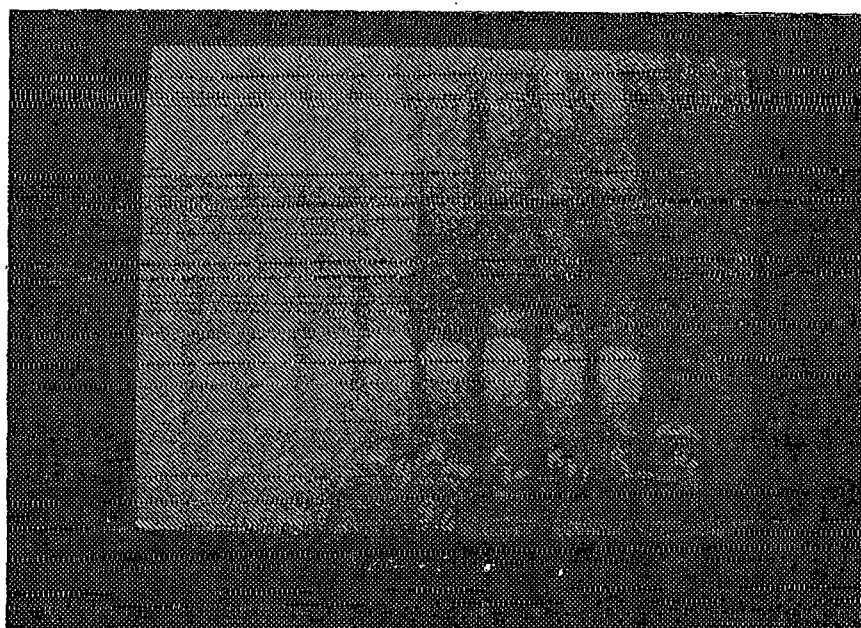


Fig 13b