

ANALISI DI SENSIBILITÀ AL GLIFOSATE IN *LOLIUM* SPP.

A. COLLAVO, M. SATTIN

Istituto di Biologia Agro-Ambientale e Forestale (IBAF) – Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro (PD)

alberto.collavo@ibaf.cnr.it

RIASSUNTO

In letteratura non è disponibile un'analisi di sensibilità per *Lolium* spp., una delle specie più prone ad evolvere biotipi resistenti. In questo studio sono state incluse 30 popolazioni di *L. multiflorum* e *L. rigidum* (e popolazioni con caratteristiche morfologiche intermedie tra le due specie) raccolte in ambienti dove il glifosate non è stato utilizzato oppure ha avuto un impiego marginale negli ultimi 10 anni, quali: aziende convenzionali e biologiche, margini di campo e margini stradali e appezzamenti incolti. Le aree dove precedentemente sono riportati casi di resistenza al glifosate sono state escluse dal campionamento. Durante il 2012 sono stati condotti due esperimenti di dose-risposta in ambiente esterno, in primavera e in autunno. Le piante sono state trattate allo stadio di accestimento precoce e ad un'altezza massima di 15 cm e con un volume d'acqua pari a 200 L/ha. Sulla base dei risultati di sopravvivenza sono state calcolate DE_{50} e DE_{90} . Nell'esperimento primaverile le DE_{50} variano da $155 \pm 5,9$ a $260 \pm 6,7$ mentre le DE_{90} da $243 \pm 20,8$ a $506 \pm 79,1$ g di acido equivalente (a.e.)/ha; nell'esperimento autunnale le DE_{50} variano da $107 \pm 10,1$ a $308 \pm 8,9$ mentre le DE_{90} da $269 \pm 49,5$ a $410 \pm 23,4$ g a.e./ha. È stato evidenziato che la tradizionale dose utilizzata per il controllo del *Lolium* (360 g a.e./ha) non è più adeguata. I dati di sopravvivenza indicano che 540 g a.e./ha di glifosate controllano tutte le popolazioni oggetto di studio. Nel caso di trattamenti allo stadio di accestimento precoce, nei trattamenti in campo non si dovrebbe scendere sotto i 700 g a.e./ha.

Parole chiave: dose-risposta, resistenza al glifosate

SUMMARY

ANALYSIS OF *LOLIUM* SPP. SENSITIVITY TO GLYPHOSATE

The availability of a reliable and realistic baseline sensitivity is critical to discriminate between susceptible and resistant populations. This study documents the susceptibility of 30 Italian populations of *Lolium* spp., most of them recently collected in agricultural environments, towards glyphosate. Sampling sites included field edges, organic farms (winter cereals), conventional farms (winter cereals, sunflower and perennial crops) and roadsides. Sampling sites cover all major Italian agricultural areas and were chosen according to the absence or scarce application of glyphosate during the last decade. Therefore, the data do not show the status of truly unexposed populations, but they rather represent the "real" susceptibility status of Italian *Lolium* spp. to glyphosate in agricultural environments. A first outdoor dose-response pot experiment was conducted during spring 2012 and a second one during autumn of the same year to assess the variability of ED_{50} , ED_{90} and slopes of the fitted non-linear curves. In the first experiment ED_{50} vary from 155 ± 5.9 to 260 ± 6.7 while ED_{90} from 243 ± 20.8 to 506 ± 79.1 g a.e./ha. During the autumn experiment ED_{50} vary from 107 ± 10.1 to 308 ± 8.9 while ED_{90} from 269 ± 49.5 to 410 ± 23.4 g a.e./ha. This study outlines that the dose of 360 g a.e./ha, used in the past for the control of *Lolium* spp., is not sufficient anymore. Survival data indicates a complete control of susceptible populations using glyphosate at 540 g a.e./ha. From these data we suggest the adoption of a dose of at least 700 g a.e./ha of glyphosate for field applications.

Keywords: glyphosate resistance, glyphosate dose-response

INTRODUZIONE

Il glifosate è l'erbicida più utilizzato, ciononostante la selezione di biotipi resistenti è stata più lenta rispetto ad erbicidi con altri meccanismi d'azione (Mda) (Neve *et al.*, 2003, Heap, 2013). I livelli di resistenza al glifosate della maggior parte delle popolazioni resistenti sono più bassi se comparati alle resistenze più diffuse (es. agli inibitori di ALS o ACCasi). I meccanismi di resistenza al glifosate più frequentemente riportati sono imputabili a differenze di assorbimento e traslocazione dell'erbicida piuttosto che a modificazione del sito bersaglio (*target-site*) o amplificazione delle copie del gene EPSPs (Powles e Yu, 2010), mentre un differente meccanismo d'azione descritto recentemente coinvolge il sequestro del glifosate a livello del vacuolo (Ge *et al.*, 2012).

Stabilire che una popolazione è resistente o meno quando si ha a che fare con bassi livelli di resistenza che vengono acquisiti con gradualità nel tempo (Busi e Powles, 2009), non è un esercizio banale in quanto la variabilità intrinseca tra gli individui delle popolazioni può mascherare i primi stadi di evoluzione della resistenza. In questi casi non è sufficiente comparare le popolazioni sospette resistenti con una qualsiasi popolazione suscettibile, ma è necessario che quest'ultima rappresenti la suscettibilità media della specie. In altri termini, è utile determinare la *baseline* della specie verso l'erbicida coinvolto e quindi scegliere una popolazione suscettibile che la rappresenti adeguatamente. La *baseline* è definita come la risposta media di una specie al variare della dose di un certo erbicida, o meglio di un certo Mda, mai utilizzato sulla specie (o sulle popolazioni) oggetto di studio. Considerato il lungo ed esteso utilizzo del glifosate, risulta impossibile avere la certezza che le popolazioni studiate non siano state precedentemente trattate con questo erbicida o la loro sensibilità influenzata dal *pollen flow* derivante da popolazioni vicine trattate.

Questo è confermato da osservazioni empiriche che sempre più spesso segnalano difficoltà di controllo del *Lolium* spp. con il glifosate utilizzato a 360 g di acido equivalente (a.e.)/ha. Mancando una *baseline* della sensibilità di *Lolium* spp. al glifosate precedente al suo esteso utilizzo, è oggi possibile determinare la sensibilità media e la sua variabilità in popolazioni campionate in ambienti agricoli. Questo studio permette anche di determinare, al 2012, la dose minima di glifosate idonea a controllare *Lolium* spp. e alla quale riferirsi in futuro per valutare una eventuale variazione di sensibilità nelle popolazioni. La dose di glifosate comunemente utilizzata ed indicata nelle etichette di numerosi prodotti commerciali per infestanti annuali entro i 20 cm di sviluppo varia da 360 a 1440 g/L di a.e.. Come già accennato, la dose minima di etichetta nel passato dava nella maggior parte dei casi un buon controllo. Tuttavia, in situazioni non ottimali, come ad es. il trattamento a stadi di sviluppo avanzati, l'efficacia non era completa e probabilmente gli individui meno sensibili sopravvivevano al trattamento e venivano quindi selezionati. È stato dimostrato che l'utilizzo di dosi sub-letali favorisce la selezione di popolazioni resistenti (Busi *et al.*, 2013; Vila-Aiub e Ghersa, 2005).

Il *Lolium* spp. è un'infestante tra le più prone ad evolvere popolazioni resistenti e a livello mondiale si stimano almeno 4 milioni di ettari infestati da popolazioni resistenti a vari gruppi di erbicidi (Heap, 2013). È un infestante altamente plastica e geneticamente variabile (Gill *et al.*, 1996), che produce molti semi con scarsa dormienza e può causare notevoli perdite produttive (Lemerle *et al.*, 2001; Steadman, 2004). Inoltre alcuni meccanismi di resistenza una volta acquisiti nella popolazione selezionata permangono nelle generazioni successive nonostante non vengano più trattati con gli erbicidi selezionatori della resistenza, come si è osservato nel caso di resistenze multiple agli inibitori di ACCasi e ALS (Collavo *et al.*, 2013). In Italia sono presenti molti casi di popolazioni resistenti agli inibitori dell'acetil-coenzimaA-

carbossilasi (ACCasi) e dell'acetolattato sintasi (ALS) ed il loro numero è in rapido aumento (Collavo *et al.*, 2013; Gasparetto *et al.*, 2003; GIRE, 2013; Sattin *et al.*, 2000).

La resistenza di *Lolium* spp. al glifosate è stata riportata per la prima volta in Australia (Powles *et al.*, 1998). In Europa le cinque specie interessate a resistenza al glifosate appartengono ai generi *Conyza* e *Lolium*. Probabilmente questo è legato al divieto europeo di coltivazione di colture OGM resistenti al glifosate. Finora i casi europei di resistenza al glifosate sono stati descritti in colture perenni quali agrumeti, oliveti, vigneti e nocchie (De Prado, 2012; GIRE, 2013). In Italia popolazioni di *L. rigidum* resistenti al glifosate sono state raccolte in oliveto (Puglia e Calabria), vigneto e nocchie (Piemonte) mentre *C. canadensis* resistente al glifosate è stata selezionata e raccolta in oliveto (Puglia) (Collavo e Sattin, 2011; GIRE, 2013). Negli ultimi anni l'esteso ricorso alle minime lavorazioni e la dipendenza da glifosate in sistemi colturali quali il frumento ha causato la selezione di popolazioni di *Lolium* spp. con ridotta sensibilità al glifosate che sono state raccolte principalmente in un'area ristretta della Toscana. In quest'area sono inoltre diffuse resistenze ad inibitori di ALS e ACCasi ed alcune popolazioni hanno resistenze multiple al glifosate (Collavo e Sattin, comunicazione personale).

Scopo di questa ricerca è stato quindi la determinazione di curve medie di dose-risposta per il binomio glifosate-*Lolium* spp. ed inferire sulla dose minima necessaria per controllare efficacemente questa infestante in ambienti agricoli.

MATERIALI E METODI

Le popolazioni oggetto di studio appartengono alle specie *L. rigidum* e *L. multiflorum* ma la maggior parte delle piante raccolte presenta *habitus* intermedio tra le due, per questo motivo nel presente lavoro ci si riferisce a *Lolium* spp. Questo genere è, infatti, caratterizzato da riproduzione strettamente allogama, ibrida facilmente tra le varie specie (Naylor, 1960) e sono noti anche incroci con generi diversi quali *Festuca* (Charmet *et al.*, 1997).

I campioni sono stati raccolti nel 2011-2012 nell'intero territorio nazionale ad eccezione delle isole e dando particolare attenzione a quei luoghi caratterizzati da elevata diffusione delle specie di *Lolium*. I luoghi di raccolta comprendono zone diversificate, quali: aree non coltivate (ma in ambiente agricolo), prati, margini di campi coltivati, frumento in biologico e non, colture perenni, erba medica e bordi stradali. È stato inoltre incluso un campione commerciale di *L. multiflorum* di una varietà da prato (Tabella 1). In totale sono stati raccolti 30 campioni di *Lolium* spp. costituiti da almeno 30 piante diverse e sono stati evitati i campionamenti nelle zone interessate da fenomeni di resistenza. Dopo la raccolta i campioni sono stati puliti e conservati in cella frigorifera (4 °C).

Al fine di rimuovere la dormienza e migliorarne così la germinazione, i semi sono stati vernalizzati a 4 °C per 2-4 giorni, in ambiente umido. I semi sono stati quindi messi in scatole Petri contenenti agar (0,6%) e queste trasferite in un germinatoio a 15-25 °C notte/giorno, con un fotoperiodo di 12 ore. Al raggiungimento di 2-4 cm di lunghezza del coleoptile, le plantule sono state trapiantate in vasi riempiti con un substrato contenente il 60% di terreno argilloso-limoso, 15% di sabbia, 15% di perlite e 10% di torba in volume, e quindi trasferite in ambiente esterno.

Gli esperimenti sono stati condotti tra aprile e maggio, su 10 popolazioni, e tra settembre ed ottobre del 2012 su 30 popolazioni (incluse le popolazioni testate in primavera). Le piante sono state allevate in vasi delle dimensioni di 15x15x20 cm posti in ambiente esterno protetto da rete antigrandine. Sono state incluse 10 dosi (da 45 a 1440 g a.e./ha) più un non trattato, 3 repliche di un vaso ciascuna e nove piante per vaso. È stato adottato uno schema sperimentale a randomizzazione completa. Per i trattamenti erbicidi è stato utilizzato un irroratore di

precisione equipaggiato con una barra avente tre ugelli a ventaglio del tipo (TeeJet® XR11015-VS), una portata di 200 L/ha, una pressione di 215 kPa ed una velocità della barra di 0,75 m/s. Le piante sono state trattate allo stadio di accestimento precoce, corrispondente allo stadio 14-21 della Extended BBCH Scale. La composizione di glifosate utilizzata corrisponde a MON 79351, 480 g a.e./L, SL, Monsanto Agricoltura Italia S.p.A.

Tabella 1. Provenienza e codifica delle popolazioni incluse nel dose-risposta. RI= *rigidum*, MU=*multiflorum*, SP=*spp.*

Specie		Codice IBAF		Origine		Coltura/
				Provincia	Comune	
LOL	RI	08	204L	PD	Legnaro	frumento
LOL	SP	08	340	LI	Collesalveti	frumento
LOL	SP	10	381	PI	Pontedera	frumento
LOL	SP	10	389	BO	Castenaso	prato
LOL	MU	11	390	PD	Legnaro	bordo campo
LOL	RI	11	395	BA	Acqua Viva delle Fonti	bordo strada
LOL	RI	11	400	BR	Torchiarolo	Set-aside
LOL	RI	11	402	CZ	Lamezia Terme	prato
LOL	RI	11	404	CZ	Lamezia Terme	oliveto
LOL		11	405	LI	Livorno	erba medica
LOL	MU	11	412	-	-	seme da prato
LOL		11	425	PI	Cascina	frumento
LOL	MU	12	426	RA	Ravenna	frumento
LOL		12	431	TS	Duino Aurisina	prato
LOL		12	432	SI	Siena	frumento
LOL		12	434	SI	Sovicille	frumento
LOL		12	444	SI	San Casciano dei Bagni	frumento
LOL	MU	12	449	PG	Marsciano	vigneto
LOL		12	455	PG	Gubbio	frumento
LOL	MU	12	458	RE	Montecchio Emilia	erba medica
LOL		12	461	RA	Brisighella	bordo strada
LOL	MU	12	462	FO	Forlì	bordo strada
LOL	MU	12	466	RN	Coriano	frumento
LOL		12	472	AN	Osimo	frumento
LOL		12	477	VR	Pozzolongo	prato
LOL		12	479	CR	Cremona	mais
LOL	MU	12	483	AL	Alessandria	prato
LOL		12	487	CN	Saluzzo	prato
LOL		12	492	VC	Cigliano	bordo campo
LOL		12	504	BS	Pontoglio	bordo strada

Fatta eccezione per il giorno durante il quale è stato eseguito il trattamento erbicida, i vasi sono stati adacquati regolarmente secondo le esigenze. Il numero di piante sopravvissute, cioè quelle che indipendentemente dal colore presentavano una crescita attiva, e il peso fresco sono state rilevate dai 30 giorni dopo il trattamento erbicida.

DE₅₀, DE₉₀, GR₅₀ e GR₉₀ e i relativi errori standard sono stati calcolati utilizzando la macro Bioassay® sviluppata da Onofri (2005) per Windows Excel. La macro si basa sulla seguente

equazione log-logistica (Streibig *et al.*, 1993): $Y = C + \{(D - C)/[1 + (x/I_{50})^b]\}$ dove Y rappresenta peso fresco o sopravvivenza, C e D rappresentano gli asintoti inferiore e superiore rispettivamente alle dosi massima e minima (pari a 0), I_{50} è la dose di erbicida che causa una riduzione del 50% in biomassa o sopravvivenza e b rappresenta la pendenza. La procedura stima l'errore standard dei parametri. I dati sono stati analizzati in un primo momento regredendo insieme le curve ed utilizzando parametri indipendenti per ciascuna curva (Seefeld *et al.*, 1995). Il modello con i parametri indipendenti per ciascuna curva è stato quindi paragonato con modelli via via più semplificati dove i parametri tra le curve sono stati accomunati. Ad ogni semplificazione è stata effettuata un'analisi "lack-of-fit F-test" terminando la semplificazione quando l'analisi indicava una differenza significativa tra le semplificazioni (Onofri *et al.*, 2010). Per ragioni biologiche e per migliorare le stime dei parametri, nell'elaborazione delle sopravvivenze gli asintoti superiore e inferiore sono stati forzati a 100 e 0 rispettivamente. Non è stata effettuata alcuna trasformazione dei dati. Sono stati calcolati gli indici di sensibilità (IS) utilizzando i parametri DE_{50} , DE_{90} , GR_{50} e GR_{90} delle popolazioni dividendo, per ciascun parametro, il valore più alto con quello più basso.

RISULTATI E DISCUSSIONE

I parametri di DE_{50} , DE_{90} , GR_{50} e GR_{90} calcolati per le varie popolazioni non hanno evidenziato valori anomali dovuti alla presenza di popolazioni resistenti o con sensibilità ridotta al glifosate, piuttosto sono distribuiti lungo un continuum come riportato nelle Figure 1 e 2.

Figura 1. Risposta di 30 popolazioni di *Lolium* spp. al glifosate stimate dalla dose capace di ridurre la crescita del 50% (GR_{50} , grafico B) e del 90% (GR_{90} , grafico A). Dati relativi al secondo esperimento. Le barre indicano gli intervalli di confidenza (al 95%). Le popolazioni sono disposte in base al parametro stimato secondo ordine crescente da sinistra a destra. La linea orizzontale rappresenta il valore medio di GR

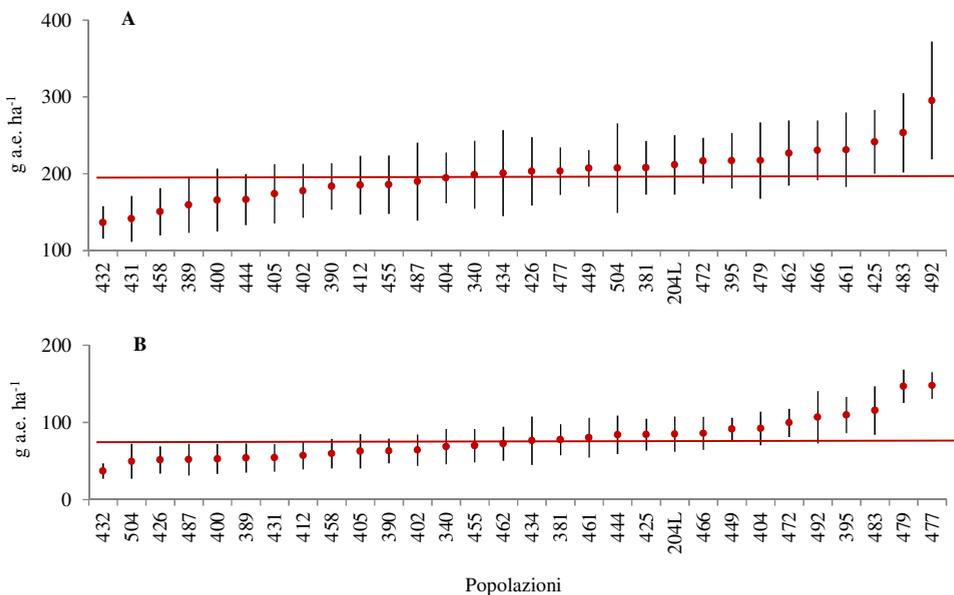
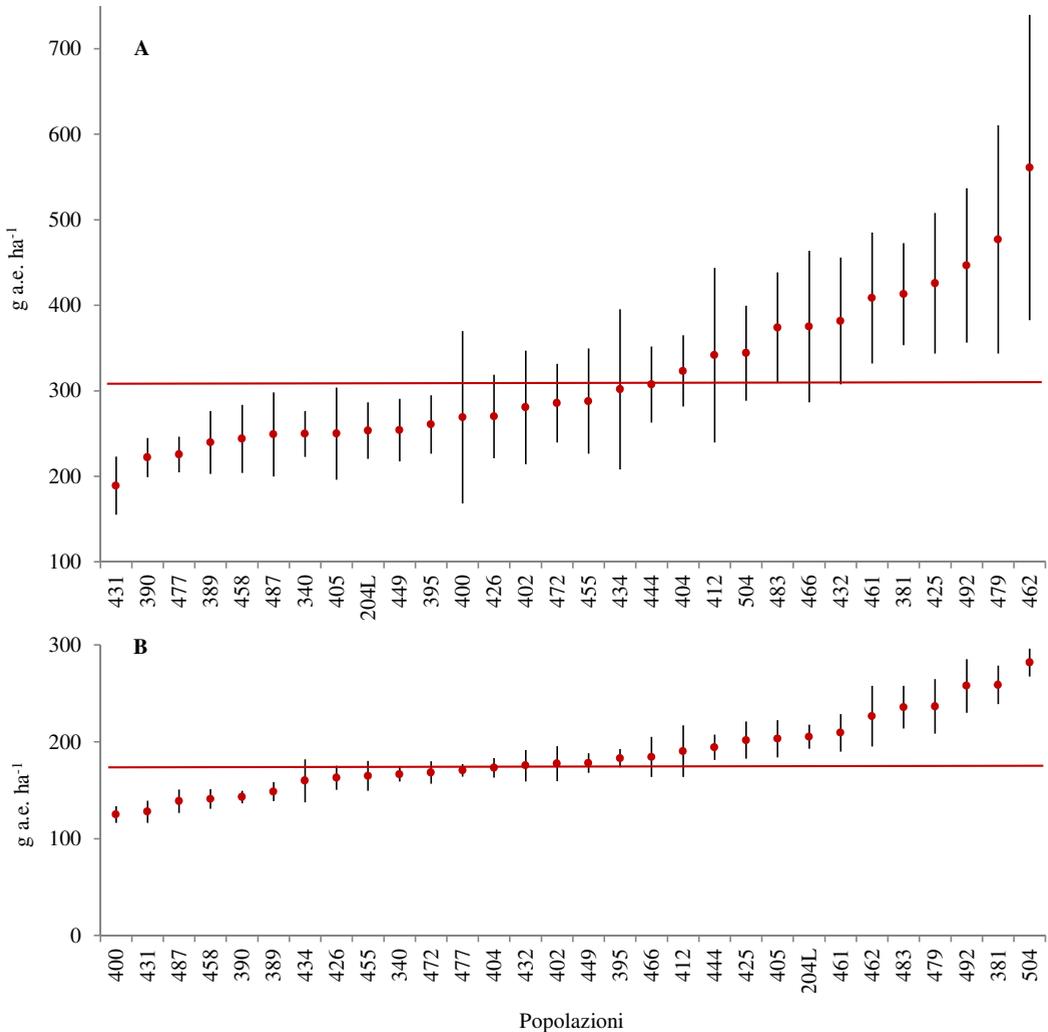


Figura 2. Risposta di 30 popolazioni di *Lolium* spp. al glifosate stimate dalla dose capace di controllare il 50% (DE₅₀, grafico in basso) ed il 90% (DE₉₀, grafico A) delle piante di ciascuna popolazione. Dati relativi al secondo esperimento. Le barre indicano gli intervalli di confidenza (al 95%). Le popolazioni sono disposte in base al parametro stimato secondo ordine crescente da sinistra a destra. La linea orizzontale rappresenta il valore medio di DE



I risultati ottenuti dal test “*lack-of-fit*” sia dei dati di sopravvivenza che di peso fresco hanno dimostrato che non è possibile semplificare le regressioni di ogni singola popolazione ad un modello che utilizzi la medesima pendenza per le curve di regressione di tutte le popolazioni. Le pendenze delle regressioni sono molto variabili e i valori si distribuiscono da 1,3 a 6,2. Anche se non è stata riscontrata alcuna relazione significativa tra valore di pendenza e livello

di sensibilità della popolazione, si è osservato che le pendenze tendono a diminuire all'aumentare delle DE_{50} . La variabilità dei due esperimenti è risultata simile. Per brevità vengono riportati i grafici solo del secondo esperimento.

Relativamente al peso fresco, il GR_{50} calcolato nel primo esperimento varia da $31 \pm 8,8$ a $98 \pm 14,7$ e il GR_{90} da $144 \pm 15,7$ a $272 \pm 26,3$ g a.e./ha; mentre utilizzando i dati di sopravvivenza la DE_{50} varia da $155 \pm 5,9$ a $260 \pm 6,7$ e la DE_{90} da $243 \pm 20,8$ a $506 \pm 79,1$ g a.e./ha. Per quanto riguarda il secondo esperimento il GR_{50} varia da $37 \pm 4,8$ a $148 \pm 8,4$ e il GR_{90} da $136 \pm 10,3$ a $348 \pm 36,8$ g a.e./ha (Figura 2); mentre utilizzando i dati di sopravvivenza la DE_{50} varia da $107 \pm 10,1$ a $308 \pm 8,9$ e la DE_{90} da $269 \pm 49,5$ a $410 \pm 23,4$ g a.e./ha (Figura 3). In entrambi gli esperimenti non sono registrate piante sopravvissute al trattamento alla dose di glifosate pari a 540 g a.e./ha.

Rispettivamente per il primo e per il secondo esperimento i valori medi di GR_{50} sono risultati pari a 64,5 e 76 g a.e./ha, quelli relativi al GR_{90} pari a 208 e 196 g a.e./ha; mentre la DE_{50} media è risultato di 207 e 186 g a.e./ha e infine la DE_{90} media pari a 375 e 309 g a.e./ha. Le differenze in termini di efficacia tra i due esperimenti sono verosimilmente attribuibili alle differenti condizioni ambientali, in particolare di temperatura, registrate durante gli esperimenti. È noto infatti che l'efficacia del glifosate è inversamente proporzionale alla temperatura (Ge *et al.*, 2011).

Gli indici di sensibilità (IS) dei quattro parametri calcolati sono: $SI(GR_{50}) = 4,0$; $SI(GR_{90}) = 2,2$; $SI(DE_{50}) = 3,0$; $SI(DE_{90}) = 2,3$. La variazione più alta si è ottenuta utilizzando i dati di GR_{50} ed indica che la popolazione meno sensibile richiede 4 volte la dose di glifosate necessaria per controllare del 50% il peso della popolazione più sensibile.

Dalla Figura 2 si osserva che maggiori sono i dati relativi alla DE_{90} maggiore è la variabilità della popolazione e si potrebbe speculare che le popolazioni meno sensibili siano anche meno omogenee in termini di sensibilità al glifosate.

Non sono state individuate differenze nella sensibilità al glifosate collegate alla provenienza geografica dei campioni oppure all'ambiente di raccolta.

CONCLUSIONI

La DE_{50} media è risultata di circa 200 g a.e./ha mentre la dose necessaria per controllare il 90% degli individui è compresa tra 309 e 375 g a.e./ha. In entrambi gli esperimenti non sono stati trovati sopravvissuti già alla dose di 450 g a.e./ha, è peraltro necessario ricordare che le popolazioni trattate erano omogenee in termini di stadio di sviluppo, condizione assai rara in campo. Per quanto riguarda gli DE_{90} , alcune delle popolazioni che in passato sono state saltuariamente trattate con erbicidi hanno evidenziato valori più elevati.

Per controllare completamente le popolazioni trattate allo stadio omogeneo di accostamento precoce (BBCH 21) è necessario utilizzare almeno 450 g a.e./ha. Si consiglia però di incrementare la dose a 700 g a.e./ha per avere un'efficacia del (o prossima al) 100 % in campo dove le piante non si trovano allo stesso stadio fenologico ed le piante trattate sono spesso ad uno stadio di sviluppo più avanzato. È risaputo, infatti, che lo stadio di crescita influisce sull'efficacia del trattamento (Preston *et al.*, 2009) quindi l'efficacia deve essere mantenuta al 100% per evitare di selezionare quei primi individui resistenti.

LAVORI CITATI

Busi R., Neve P., Powles S., 2012. Evolved polygenic herbicide resistance in *Lolium rigidum* by low-dose herbicide selection within standing genetic variation. *Evolutionary Applications* 6 (2), 231 – 241

- Busi R., Powles S.B., 2009. Evolution of glyphosate resistance in a *Lolium rigidum* population by glyphosate selection at sublethal doses. *Heredity*, 103(4), 318-25
- Charmet G., Ravel C., Balfourier F., 1997. Phylogenetic analysis in the *Festuca-Lolium* complex using molecular markers and ITS rDNA. *Theoretical and Applied Genetics*, 94 (8), 1038-1046
- Collavo A., Strek H., Beffa R., Sattin M., 2013. Management of an ACCase-inhibitor-resistant *Lolium rigidum* population based on the use of ALS inhibitors: weed population evolution observed over a 7 year field-scale investigation. *Pest Management Science* 69 (2), 200-208
- De Prado R., ed. 2012. International workshop on “Glyphosate weed resistance: European status and solutions”. Printalias, Cordoba, Spain
- Gasparetto M.A., Sattin M., Campagna C., Fili V., Innocenti M., Alberati D., 2003. Dinamica di emergenza delle infestanti del frumento duro. *L'Informatore Agrario*, 12, 77-80
- Ge X., d'Avignon D.A., Ackerman J.J.H., Duncan B., Spaur M.B., Sammons R.D., 2011. Glyphosate-resistant horseweed made sensitive to glyphosate: low-temperature suppression of glyphosate vacuolar sequestration revealed by 31P-NMR. *Pest Management Science* (67), 1215–1221
- Gill G.S., Cousens R.D., Allan M.R., 1996. Germination, growth, and development of herbicide resistant and susceptible populations of rigid ryegrass (*Lolium rigidum*). *Weed Science*, 44 (2), 252-256
- Heap I., 2013. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Online, internet, 21 Novembre 2013, disponibile in www.weedscience.org
- Lemerle D., Verbeek B., Orchard B., 2001. Ranking the ability of wheat varieties to compete with *Lolium rigidum*. *Weed Research*, 41(3), 197-209
- Naylor B., 1960. Species differentiation in the genus *Lolium*. *Heredity* 1960 (15), 219-233.
- Neve P., Diggle A.J., Smith F.P., Powles S.B., 2003. Simulating evolution of glyphosate resistance in *Lolium rigidum* I: population biology of a rare resistance trait. *Weed Research*, 43 (6), 404–417
- Onofri A., Carbonell E.A., Piepho H.-P., Mortimer A.M., Cousens R.D., 2010. Current statistical issues in Weed Research. *Weed Research*, 50 (1), 5-24
- Powles S.B., Yu Q., 2010. Evolution in action: plants resistant to herbicides. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 317–347
- Powles S.B., Lorraine-Colwill D.F., Dellow J.J., Preston C., 1998. Evolved resistance to glyphosate in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) in Australia. *Weed Science*, 46(5), 604–607.
- Preston C., Wakelin A.M., Dolman F.C., Bostamam Y., Boutsalis P., 2009. A Decade of glyphosate-resistant *Lolium* around the world: mechanisms, genes, fitness, and agronomic management. *Weed Science*, 57(4), 435-441
- Sattin M., Campagna C., Marchi A., 2000. Fenomeni di resistenza agli erbicidi in Italia. *Informatore fitopatologico*, 7-8, 33-34
- Seefeldt S., Jensen J.E., Fuerst E.P., 1995. Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationships. *Weed Technology*, 9, 218–227
- Streibig J.C., Rudemo M., Jensen J.E., 1993. Dose–response curves and statistical methods. CRC Press, Boca Raton, FL, USA
- Steadman K.J., 2004. Dormancy release during hydrated storage in *Lolium rigidum* seeds is dependent on temperature, light quality, and hydration status. *Journal of Experimental Botany*, 55 (398), 929-937
- Vila-Aiub M.M., Ghersa C.M., 2005. Building up resistance by recurrently exposing target plants to sublethal doses of herbicide. *European Journal of Agronomy*, 22(2), 195–207