

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

***Leptochloa virgata* (L.) P. Beauv.
RESISTENTE A GLIFOSATO**

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

DANIEL FELIPE RINCÓN GALVIS



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DIRECCIÓN DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES

Bajo la supervisión de: Dr. ANDRÉS BOLAÑOS ESPINOZA

Chapingo, Estado de México, diciembre de 2016

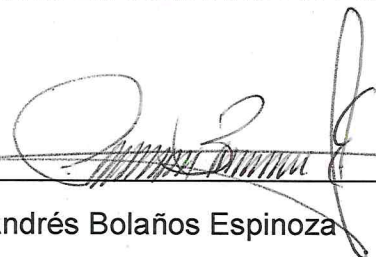


***Leptochloa virgata* (L.) P. Beauv. resistente a glifosato**

Tesis realizada por **DANIEL FELIPE RINCÓN GALVIS** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

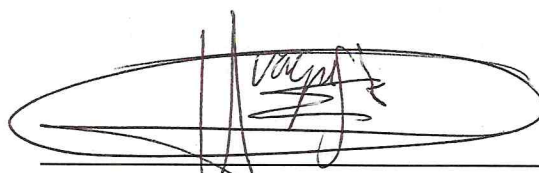
DIRECTOR:


Dr. Andrés Bolaños Espinoza

ASESOR:


M. C. J. Antonio Tafoya Razo

ASESOR:


Dr. Mateo Vargas Hernández

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN GENERAL	11
REVISIÓN DE LITERATURA.....	13
1.1 Herbicidas	14
1.1.1 Glifosato	14
1.1.2 Resistencia a herbicidas.....	18
1.2 <i>Leptochloa virgata</i>	21
1.3 LITERATURA CITADA	23
EFFECTO DE LA LUZ Y EL NITRATO DE POTASIO EN LA GERMINACIÓN DE <i>Leptochloa virgata</i> (L.) P. Beauv.....	26
1.1 INTRODUCCIÓN.....	27
1.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
1.2.1 Recolección de carióspsides	27
1.2.2 Prueba de germinación.....	28
1.2.3 Diseño experimental y análisis estadístico.....	28
1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
1.4 CONCLUSIONES.....	31
1.5 LITERATURA CITADA	32
<i>Leptochloa virgata</i> (L.) P. Beauv. RESISTENTE A GLIFOSATO Y ALTERNATIVAS DE CONTROL.....	34
1.1 INTRODUCCIÓN.....	35
1.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
1.2.1 Recolección de semillas	36
1.2.2 Prueba de dosis respuesta	36
1.2.3 Acumulación de shikimato	38
1.2.4 Extracción, amplificación y secuenciación de ADN	39
1.2.5 Absorción y translocación de glifosato- ¹⁴ C.....	40
1.2.6 Metabolismo de glifosato- ¹⁴ C.....	41
1.2.7 Alternativas de control a glifosato	42
1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43

1.3.1	Prueba de dosis respuesta	43
1.3.2	Acumulación de shikimato	46
1.3.3	Extracción de ADN, amplificación y secuenciación.....	48
1.3.4	Absorción y translocación de glifosato- ¹⁴ C.....	49
1.3.5	Metabolismo de glifosato- ¹⁴ C.....	51
1.3.6	Alternativas de control a glifosato	52
1.4	CONCLUSIONES.....	54
1.5	AGRADECIMIENTOS.....	54
1.6	LITERATURA CITADA	55
ANEXOS		58
Anexo 1. Análisis químico de la mezcla de suelo		58
Anexo 2. Soluciones utilizadas en el ensayo de acumulación de shikimato		59
Anexo 3. Composición de la solución de mezcla de sal basal de Hoagland, MP Biomedicals®		61

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Características físicas y químicas del glifosato (Shaner, 2014)	16
Cuadro 2. Clasificación de herbicidas según modo y sitio de acción.....	20
Cuadro 3. Germinación promedio de cariósides de <i>Leptochloa virgata</i>	29
Cuadro 4. Datos recolectados en los puntos de muestreo de <i>Leptochloa virgata</i> en el estado de Veracruz, México.	37
Cuadro 5. Componentes de la mezcla de PCR por muestra.	40
Cuadro 6. Herbicidas utilizados como alternativas de control a glifosato en <i>Leptochloa virgata</i>	43
Cuadro 7. Daño visual (%) en plantas de <i>Leptochloa virgata</i> tratadas con glifosato con respecto a un testigo sin tratamiento.	44
Cuadro 8. Acumulación de shikimato ($\mu\text{g cm}^{-2}$) 16 h DDA en hojas de tejido joven de <i>Leptochloa virgata</i> susceptible (Al1) y resistentes (Ca, Cu2, M4 y M6) a glifosato.....	47
Cuadro 9. Translocación de glifosato- ^{14}C 48 h DDA en plantas de <i>Leptochloa virgata</i> susceptibles y resistentes al herbicida	50
Cuadro 10. Promedio de reducción de peso (%) 14 DDA sobre plantas de <i>Leptochloa virgata</i> con respecto a un testigo sin tratamiento.	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del ácido de glifosato	16
Figura 2. Vía del ácido shikímico. Biosíntesis de aminoácidos aromáticos. EPSP, 5-enolpiruvato ácido shikímico 3-fosfato; *, EPSP sintasa. Glifosato inhibe la síntesis de aminoácidos aromáticos esenciales por inhibición competitiva con la enzima 5-enolpiruvilshikimico 3-fosfato sintasa (EPSPS) (Cobb y Reade, 2010).	18
Figura 3. Número de especies con reportes de resistencia por sitio de acción (Heap, 2016).	21
Figura 4. <i>Leptochloa virgata</i> . (1) Base de la planta, sección del culmo, inflorescencia y espiguilla (Yucatán), (2) espiguilla, inflorescencia y base de la planta (Tabasco) (Beetle et al., 1991).	22
Figura 5. Cariópsides de <i>Leptochloa virgata</i> (izq.) cubierta con lema y palea, (der.) cariósipide.	28
Figura 6. Germinación de <i>Leptochloa virgata</i> en interacción de poblaciones × presencia (K+) o ausencia (K-) de nitrato de potasio y poblaciones × presencia (L+) o ausencia (L-) de luz. Barras señaladas con mayúscula y la misma letra no son significativamente diferentes entre niveles de luz. Barras con minúscula y la misma letra no son significativamente diferentes entre niveles de nitrato de potasio.	30
Figura 7. Dosis requeridas para obtener reducciones en el 50% del crecimiento en cada población (ED ₅₀) con respecto a un testigo sin tratamiento. Los números sobre las barras indican el valor del índice FR (FR=ED ₅₀ R/ED ₅₀ S). Las barras representan el error estándar ± de la media.	45
Figura 8. Curvas de dosis respuesta de <i>Leptochloa virgata</i> para la población susceptible (AI1) y la de mayor resistencia (N2) a glifosato.	46
Figura 9. Alineación parcial de nucleótidos del gen de EPSPS en poblaciones de <i>Leptochloa virgata</i> susceptibles y resistentes a glifosato. Los nucleótidos resaltados señalan la mutación de CCA (prolina) a TCA (serina) en la posición 106 en tres muestras de la población M4.	48
Figura 10. Promedio de absorción de glifosato en poblaciones susceptibles y resistentes de <i>Leptochloa virgata</i> . Barras con la misma letra indica que no son estadísticamente diferentes determinado por la prueba de Tukey con nivel de significancia al 5%. Las barras verticales representan el error estándar de la media (n = 5).	50
Figura 11. Cromatogramas mostrando la presencia de glifosato en (A) Ca1, (B) Cu2, (C) M4, (D) M6, (E) AI1 y (F) canola HyCLASS® 955 Roundup® Ready.	51

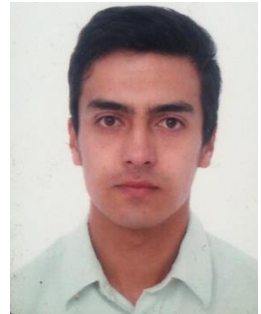
DEDICATORIA

Por toda su paciencia a mis papás María Yolanda y Luis Fernando, a mi hermano David.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), a mis profesores, compañeros y amigos de la Universidad Autónoma Chapingo, a Jesús Torres por su apoyo en el área de biología molecular, a mis compañeros de estancia en el Hanson Lab de la Universidad de California, Davis, especialmente a Bradley Hanson, Sarah Morran y Caio Brunharo.

DATOS BIOGRÁFICOS



Datos personales

Nombre: Daniel Felipe Rincón Galvis

Fecha de nacimiento: 21 de octubre de 1988

Lugar de nacimiento: Bogotá, D.C., Colombia

CURP: RIGD881021HNENLN03

Profesión: Ingeniero Agrónomo

Desarrollo académico

Bachillerato: Colegio Agustiniiano Norte, Bogotá, D.C., Colombia.

Licenciatura: Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

RESUMEN GENERAL

Leptochloa virgata es un pasto perenne que crece en campos de cultivo, praderas y bordes de corrientes de agua, localizable desde los Estados Unidos hasta Argentina. Se determinaron las condiciones ambientales adecuadas para la germinación de semillas recolectadas en Veracruz (México). Las semillas fueron sometidas a condiciones de presencia y ausencia de luz y de nitrato de potasio en la solución de imbibición. Se encontró diferencia estadísticamente significativa ($P=0.05$) entre la germinación bajo presencia de luz respecto a aquella en ausencia de luz (95 y 43%, respectivamente), el efecto del nitrato de potasio en la solución incrementó significativamente ($P=0.05$) la germinación con respecto a la solución sin nitrato de potasio (77 y 61%, respectivamente). Se llevaron a cabo ensayos de dosis respuesta para determinar el grado de resistencia de *L. virgata*. Se determinó que 15 de las 18 poblaciones recolectadas presentaron resistencia a glifosato. Las poblaciones resistentes exhibieron factores de resistencia (FR) entre 3.0 y 16.5. Se estableció que la población susceptible presenta significativamente mayor ($P=0.05$) acumulación de shikimato con respecto a las poblaciones resistentes tratadas con glifosato. Una de las poblaciones resistentes presentó la mutación Pro106Ser en el gen que codifica para la 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS). No se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P=0.05$) en absorción ni

GENERAL SUMMARY

Leptochloa virgata is a perennial grass that grows in agricultural fields, pastures, and on ditch banks, it is reachable from the United States to Argentina. Adequate environmental conditions for the germination of *L. virgata* seeds collected in Veracruz (Mexico) were determined. Seeds were exposed to presence and absence of light and potassium nitrate in the imbibition solution. Statistically significant difference ($P=0.05$) between germination with light and the absence thereof (95 and 43%, respectively) was found. The effect of potassium nitrate in the solution significantly ($P=0.05$) increased germination compared to the solution without it (77 and 61%, respectively). Dose-response assays were conducted to determine the degree of resistance of *L. virgata*. It was determined that 15 of the 18 collected populations showed resistance to glyphosate. Resistant populations showed a resistance factor (RF) from 3.0 to 16.5. It was determined that the susceptible population has significantly ($P=0.05$) higher shikimate accumulation than the glyphosate-treated resistant populations. One of the resistant populations presented Pro106Ser mutation in the gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS). Neither absorption nor translocation of ^{14}C -glyphosate showed statistically significant differences ($P=0.05$) between susceptible and resistant populations. The assay of metabolism conducted through High Performance Liquid Chromatography (HPLC) showed that there was little or no metabolism of glyphosate in extracts

en translocación de glifosato-¹⁴C entre la población susceptible con respecto a las resistentes. En el estudio de metabolismo realizado por medio de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) hubo poco o nada de metabolismo de glifosato tanto en plantas susceptibles como en resistentes. Con base en estos resultados se concluye que la absorción, la translocación y el metabolismo no están asociados con la resistencia a glifosato en las poblaciones de *L. virgata* recolectadas. Como alternativas de manejo a la resistencia se propone el uso en rotación de paraquat, glufosinato y fluazifop/clethodim.

Palabras clave: dormancia, maleza, pasto, cítricos, herbicida.

from tissues of either resistant or susceptible plants. Based on these results, it is concluded that absorption, translocation and metabolism are not associated with glyphosate resistance in collected *L. virgata* populations. As management alternatives to the glyphosate resistance, the use in rotation of paraquat, glufosinate and fluazifop/clethodim is proposed.

Key words: dormancy, weed, grass, citrus, herbicide.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Las malezas son la principal causa biótica en la reducción de los rendimientos de los cultivos desde los orígenes de la agricultura (Délye *et al.*, 2013), a nivel global, representan el mayor potencial de pérdidas (34%), mientras que las plagas animales y patógenos tienen menor importancia (pérdidas de 18 y 16%, respectivamente) (Oerke, 2006). En México se estima que el surgimiento de malezas afecta, en promedio, el 30% del rendimiento, pero las pérdidas pueden elevarse hasta un 70% e, incluso, ser totales (UNAM, 2010).

En el pasado, el manejo de malezas se centró en la dedicación de intensas jornadas laborales que fueron moderadamente efectivas hasta que en los años 1940s inició la comercialización de herbicidas (Oerke, 2006), este hecho fue uno de los mayores impulsos para la intensificación de los sistemas de producción agrícola, caracterizado principalmente por un gran incremento de la productividad de la mano de obra. De esta forma, el control químico de malezas evolucionó rápidamente como el enfoque estándar, haciendo menos importantes las otras opciones de manejo de malezas (Bastiaans *et al.*, 2008). La importancia del

control químico de malezas ha sido tal, que para la décima edición del Herbicide Handbook de la Weed Science Society of America (WSSA) se incluyeron 230 ingredientes activos.

La intensificación en el uso de herbicidas dio lugar en 1957 a la aparición de los primeros casos de malezas resistentes, con reportes en Hawaii y Canadá (Hilton, 1957; Switzer, 1957). Actualmente se cuentan 473 casos (especie x sitio de acción) de resistencia a nivel global, con 251 especies (146 dicotiledóneas y 105 monocotiledóneas) (Heap, 2016). La evolución de poblaciones de malezas resistentes a herbicidas es una respuesta natural a la presión de selección impuesta por las actividades de manejo de la agricultura moderna. Frente a esta situación, las dos principales claves para el manejo de la resistencia son (1) la reducción de la intensidad en la presión de selección y (2) prevención de la reproducción de los individuos resistentes que sobreviven (Norsworthy *et al.*, 2012).

Estudiar la resistencia de malezas a herbicidas es el primer paso para proponer alternativas de manejo a esta problemática. En el presente documento se muestran los resultados sobre dos investigaciones, en primer lugar, un estudio de germinación de cariósides de *Leptochloa virgata*, en el que se planteó como hipótesis que la presencia o ausencia de luz y de nitrato de potasio ejercen un efecto significativo en la tasa de germinación. La segunda parte de la investigación trata la problemática de resistencia de *L. virgata* a glifosato, el objetivo fue determinar si existe presencia de resistencia en las poblaciones recolectadas y, en caso positivo, estimar el grado de resistencia. Se llevó a cabo una prueba de acumulación de shikimato, con el fin de determinar si se presenta mayor acumulación de esta molécula entre las poblaciones de *L. virgata*. Se realizó la secuenciación parcial del gen que codifica para la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) con el objetivo de definir si existe resistencia asociada al sitio blanco del herbicida. Se adelantó un estudio de absorción y translocación de glifosato-¹⁴C para determinar la cantidad de herbicida que penetra y se mueve en la planta, lo cual permite definir si la baja efectividad del herbicida está relacionada con su no disponibilidad en el sitio de

acción. Se presentan resultados del estudio de metabolismo de glifosato-¹⁴C, el cual tuvo como objetivo definir si el herbicida está siendo transformado a un metabolito. Se realizó un ensayo de alternativas de control, que tiene como finalidad proponer soluciones químicas diferentes a glifosato para el control de esta especie.

REVISIÓN DE LITERATURA

Desde el principio de la historia de la agricultura, las malezas o arvenses han sido componentes de los ambientes intervenidos por el hombre que, en la mayoría de los casos, no tienen una amable bienvenida. Se han proporcionado diferentes definiciones de lo que es una maleza, tales como planta no deseada, planta que crece en lugares no deseados, en la cantidad inadecuada, en el momento equivocado e, incluso, que son plantas cuyas virtudes no han sido descubiertas. Son innumerables las definiciones que se han elaborado, pero con el fin de unificar el concepto, Cobb y Reade (2010) sugieren que las malezas son plantas adaptadas a hábitats en los que tiene influencia el hombre y que causan interferencia con el uso de esos hábitats, Baker (1974) enumeró las características específicas de una “maleza ideal”. Dicha interferencia se refleja en la competencia entre plantas por recursos, cuyo suministro se encuentra por debajo de la suma de la cantidad demandada por los organismos implicados Zimdahl (2004), dando lugar a reducciones de rendimientos y calidad de los cultivos junto con retrasos y otras afectaciones en las cosechas (Naylor, 2002). Para contrarrestar la influencia de las malezas sobre los sistemas de producción agrícola es indispensable un manejo integrado de malezas (MIM), que incluya la aplicación de diferentes tipos de tecnología y conocimiento que brinden apoyo en la selección, ejecución y administración de un MIM correcto, basado en consideraciones sobre sus alcances en los ámbitos económico, ambiental y social. Las estrategias fundamentales del MIM dentro del sistema son (1) exploración, para tener claridad sobre la identidad de las especies presentes, su densidad, cobertura, ubicación e información adicional que permita su

caracterización biológica y ecológica, (2) prevención, con el fin de limitar el ingreso de material vegetal nuevo y la producción de semillas de maleza dentro del lote, (3) prácticas mecánicas como la labranza, escardas, inundación, etc. (4) prácticas culturales, como la selección del cultivo y sus variedades, fecha de siembra, densidad, fertilización, riego, etc., (5) control biológico, con el uso de organismos que reduzcan la densidad y cobertura de las poblaciones de malezas, además, uso de coberturas vegetales y, (6) control químico (Monaco *et al.*, 2002). En el presente documento se hará énfasis sobre una situación derivada de esta última estrategia: la problemática de resistencia de malezas a herbicidas.

1.1 Herbicidas

Según Shaner (2014), los herbicidas son sustancias químicas u organismos biológicos cultivados usados para matar o suprimir el crecimiento de plantas. Su uso por parte del hombre se remonta a la Antigua Grecia, sin embargo, los herbicidas modernos surgieron en 1941, con la síntesis de 2,4-D (Zimdahl, 2007) como primer compuesto selectivo (Cobb y Reade, 2010), a partir de ese año, la producción y comercialización de herbicidas se incrementó hasta alcanzar los 230 ingredientes activos incluidos en la décima edición del Herbicide Handbook de la WSSA, con diferentes efectos fisiológicos y de selectividad, permitiendo mayor control en más cultivos (Håkansson, 2003). Cuando un herbicida entra en contacto con una planta, su acción es influenciada por la morfología, anatomía, procesos fisiológicos y bioquímicos en la absorción, translocación, destino molecular del herbicida en la planta y, por último, en el efecto del herbicida sobre el metabolismo de la planta (Monaco *et al.*, 2002).

1.1.1 Glifosato

1.1.1.1 Historia

La molécula de glifosato fue sintetizada por primera vez en 1950 por Henri Martin, perteneciente a Cilag, una industria farmacéutica suiza, pero no fue evaluado ni

patentado como herbicida (Duke y Powles, 2008). John Franz, un químico de Monsanto, lo descubrió y se desarrolló como herbicida de 1969 a 1971, en 1974 recibió una patente para el uso de derivados de ácidos fosfónicos como herbicidas no selectivos (Monaco *et al.*, 2002).

Por dos décadas su consumo creció de manera constante en áreas donde los agricultores buscaban acabar con toda la comunidad de plantas o como desecante, especialmente en cultivos de granos. En 1996 se aprobó la comercialización de variedades de soya, maíz y algodón tolerantes a glifosato obtenidas por ingeniería genética en una tecnología denominada “Roundup-Ready”, esto permitió el uso de glifosato como postemergente al cultivo e incidió para que su consumo mundial pasara de 67,078 t de ingrediente activo (ia) en 1995 a 825,804 t de ia en 2014 (Benbrook, 2016).

1.1.1.2 Características y uso

La molécula de glifosato (Figura 1) se deriva del aminoácido glicina y del ácido fosfónico, el nombre químico IUPAC del glifosato es N-(fosfonometil)-glicina, algunas de sus características físicas y químicas se citan en el Cuadro 1. Es aniónico a niveles de pH fisiológicos y activo como sal con varios cationes (e. g. sodio o sal de isopropilamina) (Duke y Powles, 2008). Debido a su no selectividad, es usado de forma limitada para control de malezas durante el periodo de crecimiento activo de los cultivos, sin embargo, se usa ampliamente en el manejo de malezas dado su amplio espectro, actividad herbicida sistémica, rápida inactivación y descomposición en el suelo, produciendo dióxido de carbono, amonio y fosfato, no presenta toxicidad a especies animales, especies acuáticas ni de aves, se adsorbe fuertemente a los coloides del suelo y no contamina aguas subterráneas (Edwards *et al.*, 2003).

Puede ser usado en presembrado o preemergencia (PRE) de 0.21 a 2.24 kg de equivalente ácido (ea) ha⁻¹ para control de las malezas emergidas en la siembra en ciertos cultivos anuales sembrados bajo labranza de conservación; postemergente (POST) de 0.84 a 4.2 kg ea ha⁻¹ o de 0.5 a 5% (v/v) de un producto

de 360 g L⁻¹ para el control general de la vegetación áreas no cultivadas como, por ejemplo, zonas industriales. En POST dirigida de 0.84 a 4.2 kg ea ha⁻¹ en árboles y viñedos. Se requiere el uso de un surfactante no iónico para incrementar la eficacia (Shaner, 2014).

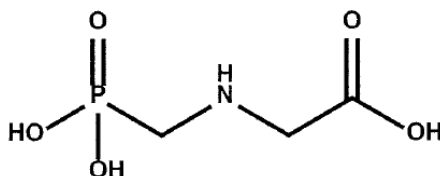


Figura 1. Estructura del ácido de glifosato

Cuadro 1. Características físicas y químicas del glifosato (Shaner, 2014)

Característica	Valor
Fórmula molecular	Ácido C ₃ H ₈ NO ₅ P; sal de isopropialmina (IPA) C ₆ H ₁₇ N ₂ O ₅ P; sal de trimetilsulfonio (TMS) C ₆ H ₁₆ NO ₅ PS
Peso molecular	Ácido 169.97 g/mole; sal de IPA 228,19 g/mole; sal de TMS 245.23 g/mole
Descripción	Ácido sólido blanco, inodoro; sal de TMS líquido ámbar a amarillo; y ligero olor a azufre como grado técnico acuoso al 70% (la sal de TMS pura y seca es altamente higroscópica y difícil de mantener, así, se utiliza al 70% de solución acuosa como material de grado técnico)
Densidad	Ácido 1.74 g/mL; suspensión acuosa de sal de trimetilsulfonio 70%
Punto de fusión	200 C
Punto de ebullición	Ácido NA; suspensión acuosa de sal de trimetilsulfonio 70% 109 C (2.13 x 10 ⁻⁴ Pa)
Presión de vapor	Ácido 2.45 x 10 ⁻⁸ Pa (45 C); suspensión acuosa de sal de trimetilsulfonio 70% 3.99 x 10 ⁻⁵ Pa (25 C)
Temperatura de descomposición	de 199°C ± 1°C
Solubilidad en agua	Ácido 15,700 mg/L (pH 7, 25 C); 11,600 mg/L (pH 2.5, 25 C); sal de IPA 900,000 mg/L (pH 7, 25 C) (estimado) 786,000 mg/L (pH 4.06, 25 C); sal de TMS 4,300,000 mg/L (pH 7 25 C)
Kow	0.0006 – 0.0017
Hidrólisis	Hidrolíticamente estable a pH 3, 6 y 9 a 5 o 35°C, vida media: 30 días.
Fotólisis	No se identifican cambios después de 24 h de exposición a luz.

1.1.1.3 Modo y mecanismo de acción

Jaworski (1972) identificó que la molécula de glifosato interfiere en la ruta metabólica de producción de los aminoácidos aromáticos de *Lemna* sp., Steinrücken y Amrhein (1980) indican que el mecanismo de acción de glifosato corresponde a la inhibición de la síntesis de 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) (E.C. 2.5.1.19, (IUBMB, 2015)), una enzima que se localiza principalmente en el cloroplasto (Reade y Cobb, 2002) catalizando la transferencia del grupo funcional carboxivinil de fosfoenol piruvato (PEP) a shikimato 3-fosfato (S3P), para producir fósforo inorgánico y EPSP como productos de la reacción (Edwards *et al.*, 2003) lo cual permite la posterior biosíntesis de triptófano, fenilalanina, tirosina (

Figura 2) y los subsecuentes productos secundarios de los vegetales. La molécula de glifosato es la única que se conoce como altamente efectiva en la inhibición de EPSPS (Duke y Powles, 2008).

La inhibición por parte de glifosato en la reacción de EPSPS ocurre por la formación de un complejo ternario con S3P o EPSP y la enzima. Glifosato es un inhibidor competitivo con respecto a PEP e inhibidor no competitivo con respecto a S3P. Sin embargo, no es un análogo estructural de PEP porque no inhibe ninguna otra reacción dependiente de PEP. Aparentemente, glifosato se une fuera del sitio activo de EPSPS en un sitio alostérico putativo y tiene poca afinidad con la enzima libre, pero es “atrapado” por la enzima en la presencia de EPSP (Cobb y Reade, 2010).

La causa que lleva a la muerte de plantas tratadas con glifosato no es completamente clara, al respecto se han elaborado dos hipótesis: (1) se asume que el efecto primario es la producción insuficiente de aminoácidos aromáticos para mantener la síntesis de proteínas necesaria, esto es consistente con el lento desarrollo de síntomas y (2) que el incremento en el flujo de carbono a la vía del shikimato por la desregulación de la vía a causa de la inhibición de la EPSPS da lugar a escasez de carbono para otras vías esenciales (Duke y Powles, 2008).

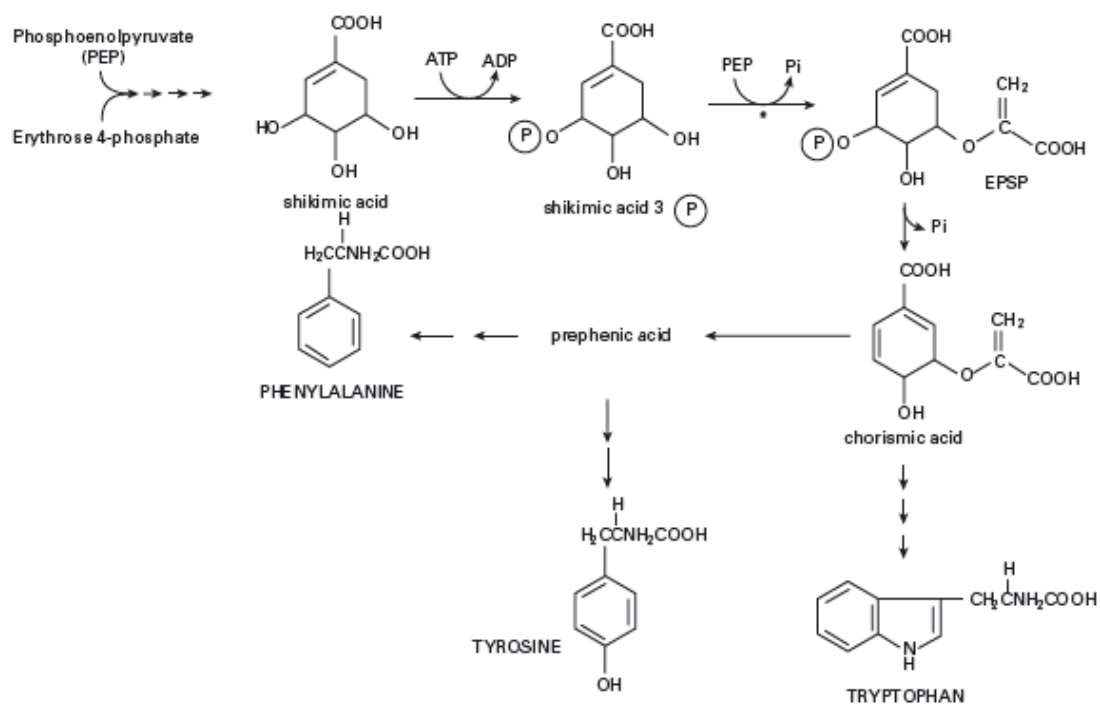


Figura 2. Vía del ácido shikímico. Biosíntesis de aminoácidos aromáticos. EPSP, 5-enolpiruvato ácido shikímico 3-fosfato; *, EPSP sintasa. Glifosato inhibe la síntesis de aminoácidos aromáticos esenciales por inhibición competitiva con la enzima 5-enolpiruvilshikímico 3-fosfato sintasa (EPSPS) (Cobb y Reade, 2010).

1.1.2 Resistencia a herbicidas

De acuerdo con la WSSA, la resistencia es la habilidad heredada de una planta de sobrevivir y reproducirse después de la exposición a una dosis de herbicida normalmente letal para el tipo silvestre. En contraste, la tolerancia a herbicidas es la habilidad heredada de una especie para sobrevivir o reproducirse luego de un tratamiento con herbicida, sin previa selección o manipulación genética para hacer a la planta tolerante.

En condiciones normales, después de las primeras aplicaciones de herbicida en una población, se presenta un alto número de plantas susceptibles que, tras ser sucesivamente aplicadas en un número de generaciones, hará más abundantes

los genes que confieren resistencia al herbicida en la medida en que las plantas resistentes se reproducen y las plantas susceptibles son eliminadas en un ejemplo de evolución por selección, donde el agente selectivo es el herbicida y hace parte del MIM (Cousens y Mortimer, 1995), la velocidad en la evolución de la resistencia depende de la genética y biología de la maleza, la química del herbicida, su efecto sobre la fisiología de la planta y la relación con el ambiente (Powles y Yu, 2010).

Hoy en día se alcanza la cifra de 478 casos únicos de resistencia (especies x sitio de acción) con 252 especies con resistencia (147 dicotiledóneas y 105 monocotiledóneas), las malezas han evolucionado a la resistencia de 23 de los 26 sitios de acción conocidos de herbicidas y en 161 diferentes herbicidas. Las malezas resistentes a herbicidas han sido reportadas en 91 cultivos y 67 países (Heap, 2016).

La resistencia puede ocurrir naturalmente o ser inducida por técnicas de ingeniería genética o selección de variantes producidas por cultivo de tejidos o mutagénesis (Vencill *et al.*, 2012). Existen dos tipos de resistencia (1) en el sitio blanco, que puede ocurrir por mutaciones puntuales en los genes que provocan cambios en los aminoácidos de una enzima blanco, evitando o reduciendo la unión del herbicida a dicha enzima (Yu y Powles, 2014) o, (2) diferente al sitio blanco, en la cual un mecanismo o a una combinación de mecanismos ajenos al sitio blanco evitan el alcance de una dosis letal de herbicida a dicho sitio (Powles y Yu, 2010).

Para el manejo de malezas resistentes a herbicidas se han desarrollado clasificaciones que tienen por objetivo la protección de los rendimientos y de la calidad de los cultivos, en primer lugar, la desarrollada por la Weed Science Society of America (WSSA), utilizada en Estados Unidos y Canadá y, segundo lugar, la del Herbicide Resistance Action Committee (HRAC), utilizada en la mayoría de los países restantes. Ambas tienen en común la clasificación de acuerdo con los sitios de acción sobre los cuales actúan los herbicidas (Cuadro 2).

Cuadro 2. Clasificación de herbicidas según modo y sitio de acción.

Modo de acción	Sitio de acción	WSSA	HRAC
Inhibición de síntesis de lípidos	ACCasa	1	A
	No ACCasa	8	N
	VLCFAs	15	K3
Inhibición de síntesis de aminoácidos	AHAS	2	B
	EPSPS	9	G
	Glutamina	10	H
Inhibición de fotosíntesis	FDS	12	C1
	HPPD	27	C2
	Desconocido	11	C3
Destrucción de membranas celulares	PSI	22	D
	PPO	14	E
Inhibición síntesis de pigmentos	FDS	12	F1
	HPPD	27	F2
	Desconocido	11	F3
Inhibición de división celular	Tubulina	3	K1
	Huso mitótico	23	K2
	DHP	18	I
Reguladores de crecimiento	Auxinas sintéticas	4	O
Desconocido	Arsenicales orgánicos	17	Z

1.1.2.1 Resistencia a glifosato

Una clasificación por sitio de acción permite definir que el glifosato (perteneciente a la familia química de las glicinas) cuenta con reportes de resistencia demostrada en 36 especies (Figura 3) y 264 poblaciones, de las cuales dos han tenido lugar en México, una de *Leptochloa virgata* identificada en el año 2010 en el estado de Veracruz y otra de *Bidens pilosa* en el Golfo de México en 2014 (Heap, 2016).

La resistencia a glifosato puede deberse a tres tipos de mecanismos, (1) alteraciones en el sitio blanco, con un primer caso encontrado en Malasia en poblaciones de *Eleusine indica* para las cuales Baerson *et al.* (2002), encontraron sensibilidad reducida de EPSP sintasa a glifosato, basados en el hallazgo de que la concentración de glifosato requerida para inhibir el 50% (ED₅₀) de la actividad de EPSPS en poblaciones resistentes fue 3 veces mayor en comparación con

una susceptible. Ng *et al.* (2002) identificaron que la causa asociada fue una mutación del aminoácido Pro106Ser, (2) la expresión amplificada de EPSPS se ha demostrado en individuos de *Amaranthus palmeri* que presentaron en promedio 77 veces mayor número de copias del gen que codifica para la EPSPS, 35 veces mayor en expresión de ARNm de EPSPS y aproximadamente 20 veces mayor en expresión de la proteína EPSPS, (3) la translocación reducida en accesiones de *Conyza canadiensis* resistentes a glifosato indica que éste puede ser rápidamente secuestrado en la vacuola, reduciendo su transporte por vía floema a través de la planta (Ge *et al.*, 2010).

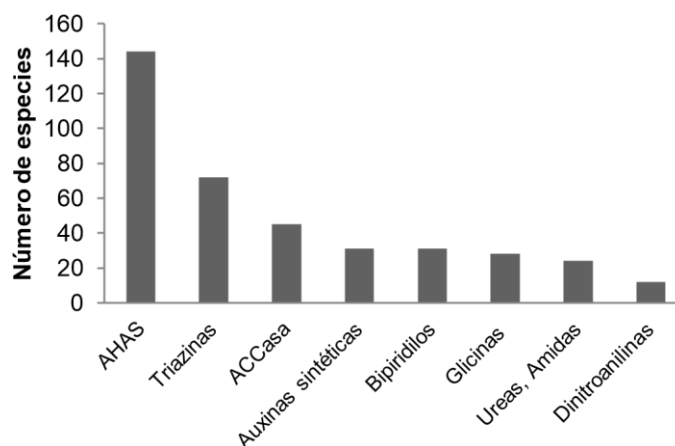


Figura 3. Número de especies con reportes de resistencia por sitio de acción (Heap, 2016).

1.2 *Leptochloa virgata*

De acuerdo con Tropicos.org (2015), basado en el 2009 Angiosperm Phylogeny Group (APGIII), la clasificación taxonómica de *L. virgata* es:

Clase: Equisetopsida C. Agardh

Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.

Superorden: Lilianae Takht.

Orden: Poales Small

Familia: Poaceae Barnhart

Género: *Leptochloa* P. Beauv.

Pohl y Davidse (1971) reportan que es una planta perenne, cespitosa, de culmo erecto, 40-110 cm de longitud, 2-3 mm de diámetro, la lígula es una membrana ciliolada de 0,3 a 0,7 cm longitud, lámina foliar de 10-20 cm de longitud y 7-10 mm de ancho (Clayton *et al.*, 2006 en adelante) (Figura 4).

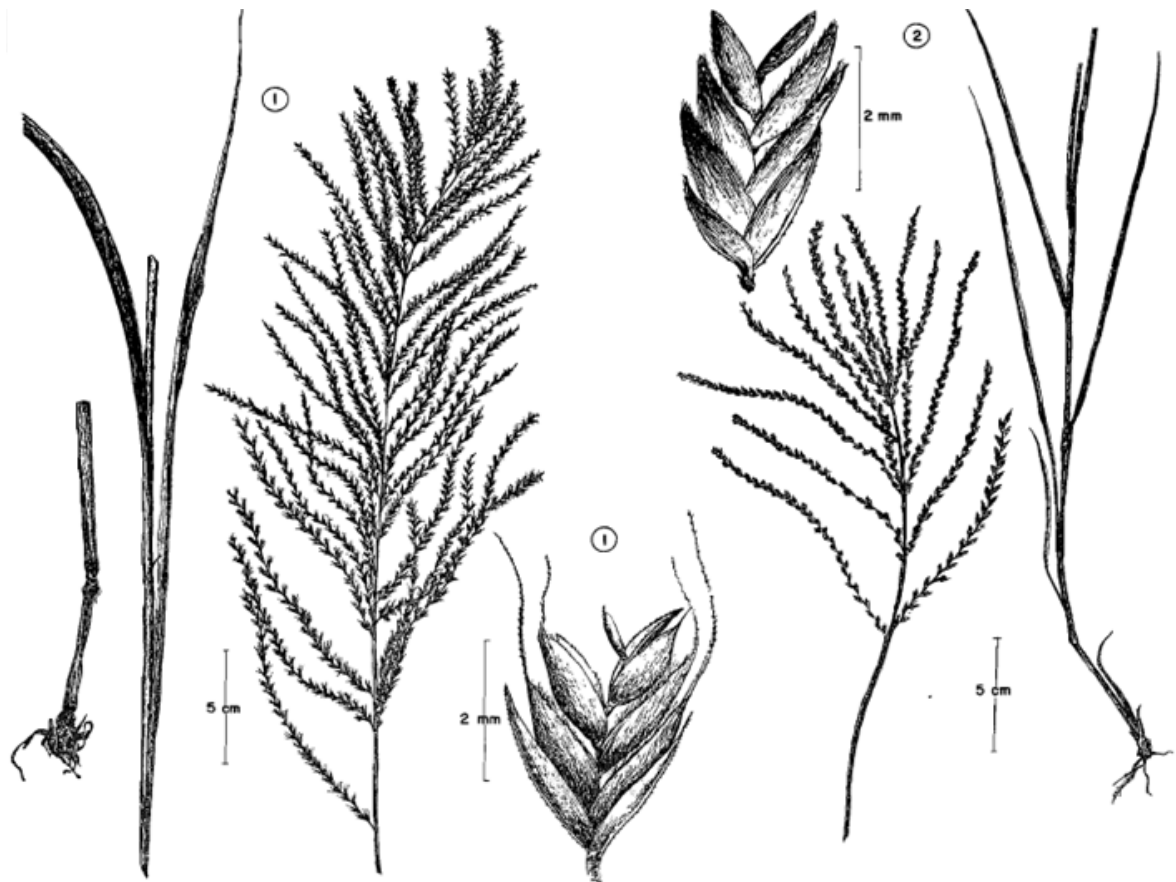


Figura 4. *Leptochloa virgata*. (1) Base de la planta, sección del culmo, inflorescencia y espiguilla (Yucatán), (2) espiguilla, inflorescencia y base de la planta (Tabasco) (Beetle *et al.*, 1991).

La inflorescencia se compone de racimos, pedúnculo 5-18 cm de longitud. Racimos de 5-20, se originan a partir del eje central, flexuoso, unilateral, 7-10 cm de longitud, eje de la inflorescencia central de 10-22 cm de longitud, raquis semiterete, empaquetamiento de la espiguilla girado hacia el raquis, contiguo, regular, con en 2 filas. Espiguillas solitarias, espiguillas fértiles pediceladas, las

espiguillas comprenden de 3-5 floretes, con floretes disminuidos en el ápice, espiguillas oblongas, lateralmente comprimidas, 2.5-3.0 mm de longitud, rompiéndose en la madurez, desarticulándose debajo de cada florete fértil. Brácteas persistentes, más cortas que la espiguilla, la gluma inferior es lineal o lanceolada, de 1.2-1.6 mm de longitud, gluma superior con 0.66 mm de longitud, membranosa, vena primaria de la gluma inferior escabriúscula, con una vena, gluma inferior con venas laterales ausentes y ápice agudo, gluma superior lanceolada, 1.8-2.3 mm de longitud, vena primaria de la gluma superior escabriúscula. Venas laterales en la gluma superior ausentes. Ápice agudo en la gluma superior (Clayton *et al.*, 2006 en adelante).

Lemma superior es ovada, 1.8-2.2 mm de longitud, membranosa, con tres venas. Lemma con vena media sin cilios. Venas laterales de la lemma cercanas a los márgenes. Márgenes pubescentes en cara superior. Lemma con ápice emarginado. Lado de lema 0-2.2 mm de longitud general. Palea con dos venas. Floretes estériles apicales semejantes a las fértiles aunque subdesarrolladas. Flor con dos anteras; 0,2-0.3 mm de longitud (Clayton *et al.*, 2006 en adelante).

Se distribuye en Asia tropical: Malasia y Papuasias. Pacífico: norte-central. Norte América: centro sur y sureste de Estados Unidos, México. América Central. Sur América: Caribe, norte y oeste de Suramérica, Brasil y sur de Suramérica (Clayton *et al.*, 2006 en adelante).

Algunos de sus nombres comunes en Veracruz son “gigante”, “zacate gigante” (Rodríguez y Mendoza, 2013) y “zacate cola de zorra”, en Yucatán se conoce como “pata de gallina” (Beetle *et al.*, 1991).

1.3 LITERATURA CITADA

- Baerson, S., Rodríguez, D., Tran, M., Feng, Y., Biest, N., & Dill, G. (2002). Glyphosate-resistant goosegrass. Identification of a mutation in the target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *Plant Physiology*, 129, 1265 – 1275.
- Baker, H. 1974. The evolution of weeds. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 5: 1-24.
- Bastiaans, L., Paolini, R. & Baumann, D. (2008). Focus on ecological weed management: what is hindering adoption? *Weed Research*, 48, 481 – 491.

- Beetle, A., E. Manrique, J. Miranda, V. Jaramillo, A. Chimal y A. Rodríguez. 1991. Las Gramíneas de México, Tomo III. SARH-COTECOCA. México, D.F. 332 p.
- Clayton W., Vorontsova, M., Harman, K. & Williamson, H. (2006 en adelante). Online World grass flora. The Board of Trustees, Royal Botanic Gardens; onwards. <http://www.kew.org/data/grasses-db.html>.
- Cobb, A. & Reade, J. (2010). Herbicides and Plant Physiology. 2a. ed. John Wiley and Sons. West Sussex, Reino Unido. 286 p.
- Cousens, R. & Mortimer, M. (1995). Dynamics of weed populations. Cambridge University Press. Cambridge, Estados Unidos. 332 p.
- Duke, S. & Powles, S. (2008). Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science*, 64: 319 – 325.
- Edwards, J., Kishore, G. & Stark, D. (2003). Genetic engineering, plants. p. 657-658. En: *Encyclopedia of Agrochemicals*. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey.
- FAO, 2001. FAO specifications and evaluations for plant protection products, Glyphosate. Tomado de: http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/glypho01.pdf, marzo 9, 2015.
- Ge, X., d'Avignon, D., Ackerman, J., & Douglas, R. (2010). Rapid vacuolar sequestration: the horseweed glyphosate resistance mechanism. *Pest Management Science*, 66, 345 – 348.
- Gutteridge, S. & Thompson, M. (2012). Acetohydroxyacid Synthase Inhibitors (AHAS/ALS). En: *Modern crop protection compounds*. 2ª ed. Volumen 1. Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, Weinheim, Alemania. p. 29 – 162.
- Håkansson, S. 2003. Weeds and weed management on arable land: An ecological approach. CABI Publishing. Wallingford, Reino Unido. 274 p.
- Heap, I. 2016. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds [Online] Internet. Disponible en www.weedscience.org, consulta: noviembre 6.
- Hernández, F. 2011. Evaluación de la resistencia de poblaciones de *Ischaemum rugosum* Salisb. a bispiribac sodio en lotes arroceros de la zona del Ariari, Meta. Tesis de maestría. Escuela de Posgrados. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.
- Hilton, H. (1957). Herbicide tolerant strains of weeds. *Hawaiian Sugar Planters Association Annual Report*, Hawaiian Sugar Planters Association. pp. 69 – 72.
- IUBMB, 2015. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC2/5/1/19.html>
- Jaworski, E. 1972. Mode of action of N-phosphonomethylglycine: Inhibition of aromatic amino acid biosynthesis. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 20, 1195 – 1198.
- Monaco, T., Weller, S., & Ashton, F. (2002). Weed science: principles and practices. 4ª ed. John Wiley & Sons, Inc. Nueva York. 671 p.
- Naylor, R. 2002. Weed management handbook. 9ª ed. Blackwell Science para el British Crop Protection Council. Oxford. 423 p.
- Norsworthy, J., Ward, S. Shaw, D., Llewellyn, R., Nichols, R., Webster, T., Bradley, K. Frisvold, G., Powles, S., Burgos, N., Witt, W. & Barrett, M.

- (2012). Reducing the Risks of Herbicide Resistance: Best Management Practices and Recommendations. *Weed Science*, Special Issue: 31 – 62.
- Ng, C., Wickesnari, R., Salmiajah, S., Teng, Y. & Ismail, B. (2003). Gene polymorphisms in glyphosate-resistant biotypes of *Eleusine indica* from Malaysia. *Weed Research*, 43: 108-115.
- Oerke, E. (2006). Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Science*, 144, 31 – 43.
- Pohl, R. & Davidse, G. 1971. Chromosome numbers of Costa Rican Grasses. *Brittonia*, 23 (3): 293-324.
- Powles, S. & Yu, Q. (2010). Evolution in action: plants resistant to herbicides. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 317 – 347.
- Reade, J. & Cobb, A. (2002). Herbicides: Modes of action and metabolism. En: Naylor, R. Weed management handbook. 9ª ed. Blackwell Science para el British Crop Protection Council. Oxford. 423 p.
- Rodríguez, B. y S. Mendoza. (2013). Gramíneas y leguminosas de Veracruz. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 394 pp.
- Seefeldt, S., J. Jensen, y E. Fuerst. (1995). Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationships. *Weed Technology*, 9, 218-227.
- Shaner, D. 2014. Herbicide Handbook. 10ª edición, Weed Science Society of America. Lawrence, 513 pp.
- Steinrücken, H. & Amrhein, N. (1980). The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-evolpyruvyl-shikimic acid-3-phosphate synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 94, 1207-1212.
- Tropicos.org. (2015). Missouri Botanical Garden. Consultado en línea el 26 de mayo <<http://www.tropicos.org/Name/25512136>>
- UNAM. (2010). Provoca maleza, pérdidas de hasta 70 por ciento en rendimiento de cultivos. Boletín UNAM-DGCS-177. Ciudad de México, México. Recuperado de http://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2010_177.html
- Valverde, B., Riches, C. & Caseley, J. (2000). Prevención y manejo de malezas resistentes a herbicidas en arroz: experiencias en América Central con *Echinochloa colona*. Editorial Teresa Oñoro. San José, Costa Rica. 118 p.
- Vencill, W., Nichols, R., Webster, T., Soteres, J., Mallory-Smith, C., Burgos, N., Johnson, W. & McClelland, M. (2012). Herbicide resistance: Toward an understanding of resistance development and the impact of herbicide-resistant crops. *Weed Science*, 60, Edición especial: 2 – 30.
- Switzer, C. (1957). The existence of 2,4-D resistance strains of wild carrot. *Proc. Northeast Weed Control. Conf.*, 11: 315 – 318.
- Yu, Q. y S. Powles. (2014). Resistance to AHAS inhibitors herbicides: current understanding. *Pest Management Science*. Vista previa a ser incluida en una edición.
- Zimdahl, R. 2004. Weed-crop competition: a review. 2ª ed. Blackwell Publishing. 220 p.
- Zimdahl, R. 2007. Fundamentals of weed science. Academic Press. 657 p.

EFFECTO DE LA LUZ Y EL NITRATO DE POTASIO EN LA GERMINACIÓN DE *Leptochloa virgata* (L.) P. Beauv.

EFFECT OF LIGHT AND POTASSIUM NITRATE ON THE GERMINATION OF *Leptochloa virgata* (L.) P. Beauv.

Resumen¹: *Leptochloa virgata* es una planta perenne que crece en campos de cultivo, praderas y bordes de corrientes de agua, localizable desde Estados Unidos hasta Argentina. En el presente estudio se determinaron las condiciones ambientales adecuadas para la germinación de semillas de siete poblaciones de *L. virgata*, recolectadas en sistemas de producción de limón persa (*Citrus latifolia* Tanaka) en los municipios de Carrillo Puerto y Cuitláhuac, así como maleza ruderal en el municipio de Tierra Blanca (Veracruz, México). Las semillas fueron sometidas a condiciones de luz por un periodo de 12 h seguida inmediatamente de 12 h de ausencia de luz o ausencia absoluta de luz, en todo caso bajo un régimen de temperaturas de 30/20 °C variable cada 12 h, además, se evaluó la presencia y ausencia de nitrato de potasio en la solución de imbibición. Se presentó diferencia estadísticamente significativa ($P=0.05$) entre la germinación bajo presencia de luz respecto a aquella en ausencia de luz (95 y 43%, respectivamente), el efecto del nitrato de potasio en la solución incrementó significativamente ($P=0.05$) la germinación con respecto a la solución sin nitrato de potasio (77 y 61%, respectivamente).

Palabras clave: dormancia, maleza, luz, pasto, limón persa.

Summary: *Leptochloa virgata* is a perennial plant that grows in agricultural fields, pastures, and on ditch banks reachable from the United States to Argentina. In this study adequate environmental conditions were determined for the germination of seven populations of *L. virgata* collected in Persian lime (*Citrus latifolia* Tanaka) plantations in the municipalities of Carrillo Puerto and Cuitlahuac, as well as a ruderal weed in the municipality of Tierra Blanca (Veracruz, Mexico). Seeds were exposed to light for 12 h, followed immediately by 12 h of absence of light or complete absence of light, always under temperatures of 30/20 °C changing every 12 h; in addition, presence and absence of potassium nitrate in the imbibition solution was tested. Statistically significant ($P=0.05$) difference between germination with light compared to the absence thereof (95 and 43%, respectively) was found. The effect of potassium nitrate in the solution significantly ($P=0.05$) increased germination compared to the solution without it (77 and 61%, respectively).

Key words: dormancy, weed, light, grass, Persian lime.

¹ Tesis de Maestría en Ciencias, Posgrado en Protección Vegetal, Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo

Autor: Ing. Agr. Daniel Felipe Rincón Galvis

Director de tesis: Dr. Andrés Bolaños Espinoza

1.1 INTRODUCCIÓN

Leptochloa virgata (L.) P. Beauv es un pasto de hábito perenne que crece en campos de cultivo, pasturas y bordes de corrientes de agua, localizable desde Estados Unidos hasta Argentina, en Asia y Oceanía. En México se le reconoce como una de las especies arvenses más generalizadas y perjudiciales (Cruz-Hipolito *et al.*, 2011), su presencia se asocia con frecuencia a sistemas de producción de cítricos en el estado de Veracruz.

El establecimiento de la plántula a partir de la semilla es un proceso riesgoso ya que es, probablemente, una de las etapas más vulnerables dentro de su ciclo de vida, por esa razón las prácticas de manejo integrado de malezas se enfocan en esta fase (Batlla y Benech-Arnold, 2014), sin embargo, no se conocen reportes sobre germinación de *L. virgata*, pero si en otras especies del mismo género como *L. panicoides*, *L. fusca* (Baskin y Chester, 1999) y *L. chinensis* (Benvenuti, Dinelli y Bonetti, 2004; Chauhan y Johnson, 2008). El objetivo del estudio fue determinar los efectos de la luz y el nitrato de potasio en la germinación de cariósides de *L. virgata*.

1.2 MATERIALES Y MÉTODOS

1.2.1 Recolección de cariósides

En el estado de Veracruz (México) se recolectaron muestras de cariósides de *L. virgata* (Figura 5) en mayo de 2015 dentro de seis sistemas de producción de limón persa (*Citrus latifolia* Tanaka), de los cuales cinco pertenecen al municipio de Cuitláhuac (Cu1: N 18°46'989" W 96°40'753", Cu2: N 18°45'397" W 96°41'946", Cu3: N 18°46'921" W 96°38'978", Cu4: N 18°46'796" W 96°38'576" y Cu5: N 18°45'0" W 96°32'1"), uno de Carrillo Puerto (Ca1: N 18°47'5176" W 96°41'246696") y una muestra de una zona ruderal de Tierra Blanca (T1: N 18°30'57" W 96°15'29"). Las muestras se secaron durante dos días bajo invernadero en el Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo (Texcoco, Edo. de México).



Figura 5. Cariópsides de *Leptochloa virgata* (izq.) cubierta con lema y palea, (der.) cariópside.

1.2.2 Prueba de germinación

En agosto de 2015 en el Laboratorio de Investigación de Malezas de este mismo Departamento se colocaron 25 cariópsides por caja Petri sobre papel filtro (Whatman Cat No 1001 110), se agregaron 5 mL de agua destilada por caja Petri y se introdujeron en cámara de crecimiento (APT.line® KBWF E5.2, Binder, Tuttlingen, Alemania), cada población fue sometida a las siguientes condiciones ambientales: i) presencia de luz (L+) por 12 h seguidas por 12 h de ausencia de luz o ii) ausencia de luz (L-) por 24 h, además, se evaluó i) la presencia de nitrato de potasio (K+) (1% p/v) en solución y, ii) ausencia de nitrato de potasio (K-), en todos los casos bajo un régimen de temperaturas de 30/20°C variable cada 12 h y humedad relativa de 75%.

1.2.3 Diseño experimental y análisis estadístico

La variable evaluada fue el número de cariópsides germinadas. Cada caja Petri se consideró como una unidad experimental. El diseño de tratamientos se obtuvo como un factorial $7 \times 2 \times 2$ (poblaciones, condiciones de luz y contenido de nitrato de potasio, respectivamente), generándose 28 tratamientos, los cuales se arreglaron en un diseño experimental completamente al azar, con tres repeticiones. El análisis estadístico se realizó utilizando el software SAS versión 9.4 (SAS Institute, Inc, Cary, NC) con el procedimiento PROC GLIMMIX, usando como función de probabilidades base la distribución Poisson y como función de enlace (Link) al Log. La media μ_{ijkl} se expresa como una función de los efectos

principales y las interacciones dobles con base en el siguiente modelo estadístico:

$$\mu_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + e_{ijkl}$$

$$i = 1, 2, \dots, a \quad j = 1, 2, \dots, b \quad k = 1, 2, \dots, c \quad l = 1, 2, \dots, r$$

Donde $\mu = \bar{\mu}$ es la media general, α , β y γ son los efectos principales: poblaciones, luz y nitrato de potasio, respectivamente, en cada uno de sus a, b o c niveles en r repeticiones, los efectos de las interacciones dobles son $(\alpha\beta)_{ij}$, $(\alpha\gamma)_{ik}$ y $(\beta\gamma)_{jk}$ y, por último, e_{ijkl} es el error experimental aleatorio.

1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tanto los efectos principales como los efectos de las interacciones influyeron de forma estadísticamente significativa ($Pr < 0.0001$) en el porcentaje de germinación de cariósides de *L. virgata*. Teniendo en cuenta todos los niveles de nitrato de potasio y luz, el máximo promedio total de germinación ocurrió para la población Ca1 (Cuadro 3), mientras que el menor nivel de germinación lo presentó la población Cu1, con una reducción del 47% en la germinación con respecto a Ca1.

Cuadro 3. Germinación promedio de cariósides de *Leptochloa virgata*

Población	Germinación promedio (%) ^a
Ca1	80 a
Cu1	33 e
Cu2	73 b
Cu3	51 d
Cu4	62 c
Cu5	54 d
T1	69 b

^a Promedios con la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas, obtenido por el método de la Diferencia Significativa Honesta (DSH) de Tukey, con nivel de significancia al 5%.

Se presentó una diferencia estadísticamente significativa ($Pr < 0.0001$) entre la germinación promedio (48%) de los tratamientos con agua destilada sin nitrato de potasio con respecto a los tratamientos que involucraron agua destilada y nitrato de potasio (70%). Se observó diferencia estadísticamente significativa ($Pr < 0.0001$) en la germinación promedio de los tratamientos en ausencia de luz

(36%) con respecto a los tratamientos en presencia de luz (94%). Los cuatro niveles de la interacción contenido de nitrato de potasio × luz mostraron diferencia estadísticamente significativa ($Pr < 0.0001$) entre sí, siendo el nivel nitrato de potasio más luz el que presentó mayor germinación promedio (99%), seguido por luz sin nitrato de potasio (89%), nitrato de potasio y ausencia de luz (49%) y, por último, ausencia de luz sin nitrato de potasio (26%). Los promedios de germinación bajo las interacciones poblaciones × nitrato de potasio y poblaciones × luz se muestran en la Figura 6. Los efectos de las interacciones de poblaciones con luz dieron lugar a los máximos niveles de germinación promedio registrados, con excepción de la interacción de luz con la población Cu5, la interacción poblaciones × nitrato de potasio (K+) presentó niveles de germinación medios a altos, seguido de los niveles bajos a medios presentados en las interacciones poblaciones × nitrato de potasio (K-) y poblaciones × luz (L-).

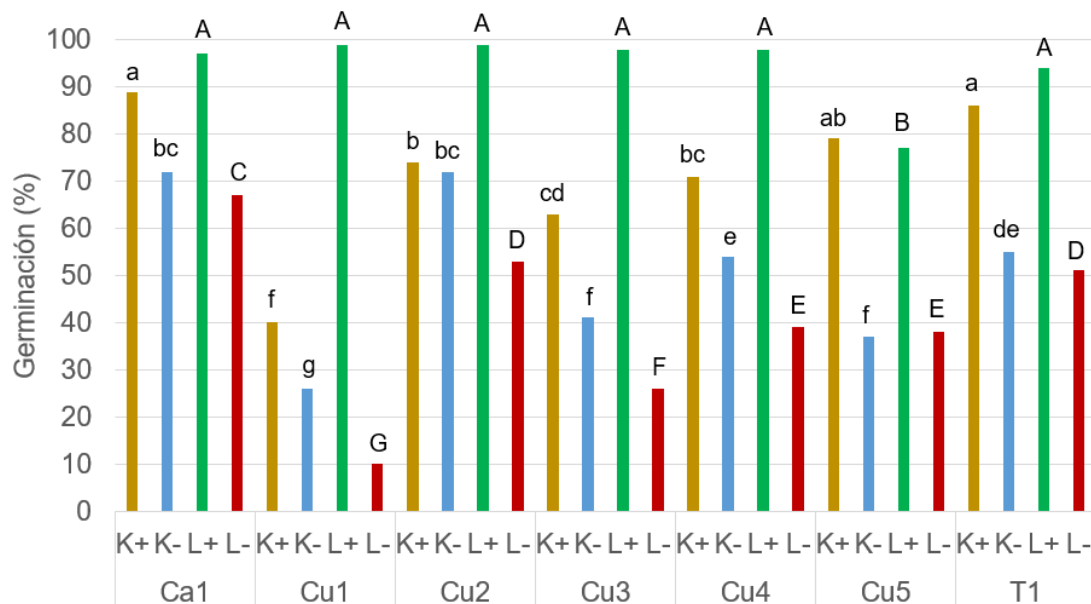


Figura 6. Germinación de *Leptochloa virgata* en interacción de poblaciones × presencia (K+) o ausencia (K-) de nitrato de potasio y poblaciones × presencia (L+) o ausencia (L-) de luz. Barras señaladas con mayúscula y la misma letra no son significativamente diferentes entre niveles de luz. Barras con minúscula y la misma letra no son significativamente diferentes entre niveles de nitrato de potasio.

Las plantas obtienen información del medioambiente que las rodea y de esta forma ajustan su crecimiento y desarrollo para maximizar sus oportunidades de sobrevivir y reproducirse (Lau y Deng, 2010). El letargo de las semillas es controlado por diversos factores como luz, temperatura y duración del almacenamiento (Koornneef *et al.*, 2002). Cuando los fotorreceptores de las semillas se activan por la presencia de luz, se da lugar a la modulación del transcriptoma (Jiao *et al.*, 2007) que activa diversas vías hormonales (Schäfer y Nagy, 2006), dando lugar a los cambios en crecimiento y desarrollo (Quail, 2002). En *Arabidopsis thaliana*, se conocen, entre otros, al PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR-LIKE 5 (PIF5)/PIF1 que actúa como integrador de la comunicación entre las señalizaciones de luz y hormonas, mientras que el ácido abscísico (ABA) reprime la germinación, el ácido giberélico la promueve (Lau y Deng, 2010). La luz blanca y la roja, junto con el fitocromo B son factores cruciales en la inducción de la germinación de semillas, mientras que el fitocromo A tiene menor incidencia sobre la germinación, por su parte, la luz roja lejana parece ser inhibidora parcial de la germinación (Shinomura *et al.*, 1994). El nitrato actúa como una señal y no como nutriente reduciendo el letargo de las semillas al disminuir los contenidos de ácido abscísico de semillas en imbibición (Matakiadis *et al.*, 2008). En *A. thaliana* se ha demostrado que la germinación inducida por el fitocromo A es afectada por la aplicación de nitratos y en menor medida se afectó el fitocromo B (Batak *et al.*, 2002). El óxido nítrico (Liu *et al.*, 2009) y el nitrato (Matakiadis *et al.*, 2009) disminuyeron el contenido de ABA en semillas de *Arabidopsis* por el incremento de la actividad de expresión de transcripción del gen *CYP707A2* se indicó que la expresión de este gen catabólico de ABA fue regulada por nitrato exógeno.

1.4 CONCLUSIONES

En todas las poblaciones de *L. virgata*, se evidenció que la presencia de luz ejerció un efecto de incremento estadísticamente significativo en la germinación de semillas ya que bajo esta condición se obtuvieron germinaciones del 77 al 99% con un promedio de 95%. Mientras que la condición de ausencia de luz dio

lugar a germinaciones del 10 al 67% con promedio de 38%. Por su parte, la presencia de nitrato de potasio incrementó significativamente la germinación en todas las poblaciones, con excepción de Cu₂, en presencia de nitrato de potasio, la germinación varió de 71 a 89% con promedio de 80%, mientras que, sin nitrato de potasio, la germinación varió de 37 a 72% con promedio de 46%. La población que presentó una mayor tasa de germinación significativamente más alta fue Ca₁, mientras que Cu₃ y Cu₅ presentaron las más bajas.

1.5 LITERATURA CITADA

- Baskin, C. C., Baskin, J. M., & Chester, E. W. (1999). Seed germination ecology of the annual grass *Leptochloa panicea* ssp *mucronata* and a comparison with *L-panicoides* and *L-fusca*. *Acta Oecologica-International Journal of Ecology*, 20(5), 571–577. [http://doi.org/10.1016/S1146-609X\(00\)86624-2](http://doi.org/10.1016/S1146-609X(00)86624-2)
- Batak, I., Dević, M., Giba, Z., Grubisić, a., Poff, K. L., & Konjević, R. (2002). The effects of potassium nitrate and NO-donors on phytochrome A- and phytochrome B-specific induced germination of *Arabidopsis thaliana* seeds. *Seed Science Research*, 12 (4), 253–259. <http://doi.org/10.1079/SSR2002118>
- Batlla, D. & Benech-Arnold, R. 2014. Weed seed germination and the light environment: Implications for weed management. *Weed Biology and Management*, 14: 77 - 87.
- Benvenuti, S., Dinelli, G., & Bonetti, A. (2004). Germination ecology of *Leptochloa chinensis*: a new weed in the Italian rice agro-environment. *Weed Research*, 44, 87–96. <http://doi.org/10.1111/j.1365-3180.2003.00376.x>
- Chauhan, B. S., & Johnson, D. E. (2008). Germination Ecology of Chinese Sprangletop (*Leptochloa chinensis*) in the Philippines. *Weed Science*, 56(6), 820–825. <http://doi.org/10.1614/WS-08-070.1>
- Cruz-Hipolito, H., Rojano-Delgado, A., Domínguez-Valenzuela, J., Heredia, A., de Castro, M. D. L., & De Prado, R. (2011). Glyphosate tolerance by *Clitoria ternatea* and *Neonotonia wightii* plants involves differential absorption and translocation of the herbicide. *Plant and Soil*, 347, 221–230. <http://doi.org/10.1007/s11104-011-0840-9>
- Jiao, Y., Lau, O. S., & Deng, X. W. (2007). Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nature Reviews Genetics*, 8, 217–230. <http://doi.org/10.1038/nrg2049>
- Koornneef, M., Bentsink, L., & Hilhorst, H. (2002). Seed dormancy and germination. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(1), 33–36. [http://doi.org/10.1016/S1369-5266\(01\)00219-9](http://doi.org/10.1016/S1369-5266(01)00219-9)
- Lau, O. S., & Deng, X. W. (2010). Plant hormone signaling lightens up: integrators of light and hormones. *Current Opinion in Plant Biology*, 13(5), 571–577. <http://doi.org/10.1016/j.pbi.2010.07.001>

- Liu, Y., Shi, L., Ye, N., Liu, R., Jia, W., & Zhang, J. (2009). Nitric oxide-induced rapid decrease of abscisic acid concentration is required in breaking seed dormancy in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 183(4), 1030–1042. <http://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02899.x>
- Matakiadis, T., Alboresi, a., Jikumaru, Y., Tatematsu, K., Pichon, O., Renou, J.-P., ... Truong, H.-N. (2009). The *Arabidopsis* Absciscic Acid Catabolic Gene CYP707A2 Plays a Key Role in Nitrate Control of Seed Dormancy. *Plant Physiology*, 149(February), 949–960. <http://doi.org/10.1104/pp.108.126938>
- Quail, P. H. (2002). Photosensory perception and signalling in plant cells: new paradigms? *Current Opinion in Cell Biology*, 14, 180–188. [http://doi.org/10.1016/S0955-0674\(02\)00309-5](http://doi.org/10.1016/S0955-0674(02)00309-5)
- Schäfer, E., & Nagy, F. (2006). *Photomorphogenesis in Plants and Bacteria: Function and Signal Transduction Mechanisms*. *Photomorphogenesis in Plants and Bacteria: Function and Signal Transduction Mechanisms*. Retrieved from <http://www.amazon.com/dp/1402038100> <http://www.amazon.com/Photomorphogenesis-Plants-Bacteria-Transduction-Mechanisms/dp/1402038100>
- Shinomura, T., Nagatani, a., Chory, J., & Furuya, M. (1994). The Induction of Seed Germination in *Arabidopsis thaliana* Is Regulated Principally by Phytochrome B and Secondarily by Phytochrome A. *Plant Physiology*, 104(2), 363–371. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=159207&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

***Leptochloa virgata* (L.) P. Beauv. RESISTENTE A GLIFOSATO Y ALTERNATIVAS DE CONTROL**

GLYPHOSATE-RESISTANT *Leptochloa virgata* (L.) P. Beauv. AND CONTROL ALTERNATIVES

Resumen²: *Leptochloa virgata* es una maleza asociada con sistemas de producción de cítricos en el estado de Veracruz (México), en donde es común el uso de glifosato para el control de esta especie. Se llevaron a cabo ensayos de dosis respuesta para determinar el grado de resistencia de *L. virgata*. Se determinó que la dosis de campo (726 g ea ha⁻¹) causa daño visual superior al 80% en siete de 18 poblaciones. Además, 15 de las 18 poblaciones recolectadas presentaron resistencia. Las dosis para disminuir el 50% del peso seco de las plantas (ED₅₀) fueron 28 y 469 g ea ha⁻¹ para la población susceptible (A1) y la más resistente (N2), respectivamente. Las poblaciones resistentes exhibieron factores de resistencia (FR) entre 3.0 y 16.5. Se encontró acumulación de shikimato significativamente mayor (P=0.05) en las muestras de la población susceptible con respecto a las poblaciones resistentes tratadas con glifosato en dosis de 400, 1000 y 2000 µM. Una de las poblaciones resistentes presentó en el gen que codifica para la 5-enolpiruvil 3-fosfato sintasa (EPSPS) la mutación Pro106Ser, asociada con la resistencia a glifosato. No se presentaron diferencias estadísticamente significativas (P=0.05) en absorción ni en

Summary: *Leptochloa virgata* is a weed associated with citrus production systems in the state of Veracruz (Mexico), where the use of glyphosate is common for the control of this species. Dose-response assays were conducted to determine the degree of resistance of *L. virgata*. It was determined that the field rate (726 g ae ha⁻¹) results in visual injury exceeding 80% in only seven of the 18 tested populations. In addition, 15 of the 18 collected populations showed resistance to glyphosate. The required dose to reduce 50% of the dry weight of the plants was 28 and 469 g ae ha⁻¹ for the susceptible (A1) and the most resistant (N2) population, respectively. Resistant populations showed a resistance factor (RF) from 3.0 to 16.5. Significantly (P=0.05) higher shikimate accumulation was found in the samples of the susceptible population relative to the resistant populations at glyphosate-doses of 400, 1000 and 2000 µM. One of the resistant populations showed the Pro106Ser mutation in the gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS), associated with glyphosate resistance. Neither absorption nor translocation of ¹⁴C-glyphosate showed statistically significant differences (P=0.05) between

² Tesis de Maestría en Ciencias, Posgrado en Protección Vegetal, Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo

Autor: Ing. Agr. Daniel Felipe Rincón Galvis

Director de tesis: Dr. Andrés Bolaños Espinoza

translocación de glifosato-¹⁴C entre la población susceptible con respecto a las resistentes, en promedio se recuperó el 78.40% del glifosato-¹⁴C aplicado, del cual, el 77.35% fue absorbido por la planta. En el estudio de metabolismo realizado por medio de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) hubo poco o nada de metabolismo de glifosato tanto en plantas susceptibles como en plantas resistentes. Con base en estos resultados se concluye que la absorción, la translocación y el metabolismo no están asociados con la resistencia a glifosato en *L. virgata*. Como alternativas de manejo a la resistencia se propone el uso en rotación de paraquat, glufosinato y fluazifop/clethodim.

Palabras clave: malezas, cítricos, herbicida, pasto.

susceptible and resistant populations. On average, the overall radioactivity recovered was 78.40%, of which 77.35% was absorbed by the plant. The assay of metabolism conducted through High Performance Liquid Chromatography (HPLC) showed that there is little or no metabolism of glyphosate in extracts from tissues of either resistant or susceptible plants. Based on these results, the final conclusion is that uptake, translocation and metabolism are not associated with glyphosate resistance in *L. virgata*. As management alternatives to the issue of glyphosate resistance, the use in rotation of paraquat, glufosinate and fluazifop/clethodim is proposed.

Key words: weeds, citrus, herbicide, grass.

1.1 INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la resistencia a herbicidas en malezas es un proceso evolutivo (Jasienuk *et al.*, 1996). La velocidad en la evolución de la resistencia depende de la genética y biología de la maleza, la química del herbicida, su efecto sobre la fisiología de la planta y la relación con el medio ambiente (Powles y Yu, 2010). Desde 1996, año en el cual se realizó el primer reporte de resistencia a glifosato, hasta 2014, el número de especies con casos de resistencia a glifosato se elevó a 32 (Heap, 2016), en este mismo periodo el consumo de este herbicida se incrementó más de 10 veces a nivel mundial, especialmente debido a la comercialización de las variedades de cultivo de soya, maíz y algodón que han sido obtenidas por ingeniería genética para tolerar el efecto del herbicida (Benbrook, 2016).

Leptochloa virgata (L.) P. Beauv. es un pasto perenne que crece en campos de cultivo, praderas y zonas ruderales, localizable de Estados Unidos a Argentina, en Asia y Oceanía. En México se conoce como una de las arvenses más

generalizadas y perjudiciales (Cruz-Hipolito *et al.*, 2011), su presencia como maleza se asocia frecuentemente a sistemas de producción de cítricos en el estado de Veracruz, en donde los agricultores reportan bajos controles por parte de glifosato.

El objetivo de la investigación fue determinar si existe presencia de resistencia a glifosato en poblaciones de *L. virgata*, estimar el grado de resistencia y en caso positivo a resistencia, determinar si existe diferencia en la acumulación de shikimato entre poblaciones susceptibles y resistentes, definir si la resistencia se explica por mutaciones en el gen de la EPSPS, por diferencias en absorción y/o translocación de glifosato o por su metabolismo.

1.2 MATERIALES Y MÉTODOS

1.2.1 Recolección de semillas

En campos de cultivo de cítricos donde los productores manifestaron la baja efectividad de glifosato para el control de esta especie, se recolectaron cariósides de *L. virgata* provenientes de ocho municipios del estado de Veracruz (México) (Cuadro 4), además, se tomaron muestras en otros sistemas agrícolas y no agrícolas.

1.2.2 Prueba de dosis respuesta

En un invernadero de la Universidad de California, Davis, se sembraron las cariósides recolectadas de *L. virgata* tanto susceptibles como con sospecha de resistencia a glifosato en macetas plásticas con un volumen de 200 mL, las cuales contenían una mezcla de suelo (Anexo 1) con arena gruesa, turba de musgo y compost (viruta de madera roja y estiércol de pavo), en proporción de 1:1:1 y 0.62 kg de dolomita por cada metro cúbico de la mezcla de suelo, pH de 6.6 y salinidad de 1.7 dS/m. Las plantas germinaron y crecieron bajo regímenes de temperatura que variaron de 16 a 33 C y humedad relativa de 44 a 91%. Cuando las plantas presentaron las primeras macollas, se asperjaron con

glifosato (Roundup® Power Max, 540 g e.a. L⁻¹) en dosis de 0, 181, 363, 726, 1452, 2904, 5808 y 11616 g e.a. ha⁻¹. Se agregó Activator® 90 (0.25% v/v) como surfactante no iónico. Las mezclas de herbicida fueron aplicadas en una cámara equipada con una boquilla de abanico plano (TeeJet® 8002 EVS, Spraying System, Wheaton, IL, EE. UU.), calibrada para una descarga de agua correspondiente a 200 L ha⁻¹ a presión constante de 37 PSI y velocidad de aspersión de 4.0 km h⁻¹. Las plantas se trasladaron nuevamente al invernadero, no se realizó riego dos días después de la aplicación (DDA) y a partir de ese momento las plantas fueron irrigadas diariamente. Pasados 14 DDA se determinó el daño visual de las plantas tratadas con glifosato con respecto a los testigos sin tratamiento en una escala de 0 (sin diferencias con respecto al testigo) a 100% (planta muerta), la parte aérea de las plantas fue cosechada a partir del nivel del suelo y secada por siete días en una cámara de calor a 50 C para determinar su peso (mg planta⁻¹).

Cuadro 4. Datos recolectados en los puntos de muestreo de *Leptochloa virgata* en el estado de Veracruz, México.

Población	Municipio	Altitud (msnm)	Sistema	Coordenadas geográficas
Cu1	Cuitláhuac	254	Limón	N18°46'989"W96°40'753"
Cu2	Cuitláhuac	249	Limón	N18°45'397"W96°41'946"
Cu3	Cuitláhuac	256	Limón	N18°46'921"W96°38'978"
Cu4	Cuitláhuac	249	Limón	N18°46'796"W96°38'576"
Cu5	Cuitláhuac	145	Limón	N18°45'0" W96°32'1"
Ca1	Carrillo Puerto	316	Limón	N18°47'5176"W96°41'24"
T1	Tierra Blanca	42	Ruderal	N18°30'57" W96°15'29"
M2	Martínez de la Torre	86	Naranja	N20°06'15.7" 97°02'57.9"
M3	Martínez de la Torre	86	Naranja	N20°06'15.7" 97°02'57.9"
M4	Martínez de la Torre	87	Naranja	N20°9'26.3" 97°04'06.1"
M5	Martínez de la Torre	58	Naranja	N20°12'02.4" 97°04'07.7"
M6	Martínez de la Torre	83	Naranja	N20°10'37.5" 97°03'35.2"
M7	Martínez de la Torre	81	Naranja	N20°08'55.2" 97°03'57.7"
S1	San Rafael	24	Ruderal	N20°15'06.7" 96°59'22.3"
N2	Nautla	6	Ruderal	N20°10'38.1" 96°43'58.1"
Al1	Alto Lucero	10	Cañaveral	N19°51'11.9" 96°27'31.5"
A1	Actopan	22	Cañaveral	N19°30'55.8" 96°24'1.5"
A2	Actopan	22	Papaya	N19°30'53.3" 96°24'00.8"

La unidad experimental consistió en cada maceta con una planta. Se establecieron cuatro repeticiones por tratamiento por población en un diseño completamente aleatorizado (DCA). El ensayo se realizó en dos ocasiones. El análisis estadístico de los datos fue llevado a cabo por el programa R, usando el paquete “drc” (*dose-response curve*), los datos se ajustaron a un modelo de regresión no lineal de tres parámetros:

$$Y = 0 + ((d - 0) \exp(-\exp(b(\log(x) - e))))$$

donde Y es la reducción de peso seco en comparación con un testigo sin aplicación, d es un coeficiente que indica el límite asintótico menor, b es la pendiente de la curva, x es la dosis de herbicida y e es la dosis de herbicida (ED_{50}) en el punto de inflexión medio entre la asíntota superior e inferior. El factor de resistencia (FR) se calculó como la relación entre el ED_{50} de cada población con respecto al ED_{50} de la población susceptible.

1.2.3 Acumulación de shikimato

Con base en el protocolo modificado de Shaner *et al.*, (2005), se utilizaron plantas en macollamiento, de las cuales se tomaron cuatro discos (diámetro 4 mm) por cada hoja, correspondiente a las repeticiones de cada tratamiento, cinco hojas completamente expandidas de tejido nuevo por planta sin tomar la hoja bandera, y tres plantas por población. Los discos fueron puestos en placas de titulación con pozos que contenían 100 μ L de buffer fosfato 20 mM (Anexo 2), los tratamientos de glifosato aplicados fueron 0, 100, 400, 1000 y 2000 μ M (Roundup® PowerMAX, Monsanto, St. Louis, MO, EE. UU.). La placa de titulación se selló con parafilm y se dejó bajo luz por 16 h a una temperatura de 25 C. Al cabo de dicho tiempo, se agregaron 25 μ L de HCl 0.25 M a cada pozo, se selló con parafilm y se almacenó a temperatura de -20 C hasta la congelación del contenido de los pozos, luego se trasladó a un incubador a 60 C hasta la descongelación. Estos dos últimos pasos se repitieron al punto de observar una

coloración amarillo-café en el tejido. Se transfirieron 25 μ L del contenido de cada pozo a nuevas placas. Se vertieron 25 μ L de soluciones estándares de ácido shikímico a nuevas placas. Se agregaron 100 μ L de solución de ácido periódico por pozo y se dejó en incubación a temperatura ambiental por 1 h. Se agregaron 100 μ L de buffer Quench por pozo. Se registró la absorbancia a 380 nm utilizando el espectrofotómetro Dynex MRX II (Dynex Technologies, Chantilly, VA, EE. UU.). Se obtuvieron curvas estándares de 0, 1, 2.5 y 5 μ M de ácido shikímico para determinar la acumulación de ácido shikímico en las muestras. La densidad óptica medida de los tratamientos de glifosato fue ajustada sustrayendo la densidad óptica de las muestras de control. La lectura de los datos se realizó utilizando el programa Revelation®. Los resultados se expresaron en términos de ng de shikimato cm^{-2} de tejido foliar. El experimento se llevó a cabo en dos ocasiones. Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo usando el programa R y el paquete “drc”.

1.2.4 Extracción, amplificación y secuenciación de ADN

Con base en el procedimiento de Stewart y Via (1993), fueron tomadas cinco muestras de cinco poblaciones (Al1, Ca1, Cu2, M4 y M6), se maceraron en nitrógeno líquido aproximadamente 80 mg de tejido vegetal hasta obtener un polvo fino, luego se agregó 1 mL of CTAB betametcaptoetanol por muestra y se llevaron a incubación por 1.5 h a 60 °C, se agitaron por 15 min en el incubador, se agregaron 600 μ L de cloroformo:etanol (24:1), se centrifugaron a 7000 rpm por 15 min, se recuperó el sobrenadante y se agregaron 600 μ L de isopropanol, se almacenó a -20 °C por 30 min, se centrifugaron a 9000 rpm por 10 min, se eliminó el sobrenadante, se agregó 1 mL of etanol (70%) para purificar el DNA, se centrifugaron a 8000 rpm por 5 min y se evaporó el sobrenadante en thermoblot, se suspendió la pasta en 100 μ L de agua destilada y se almacenó a -20 °C.

De acuerdo con Ng *et al.*, (2003) se definió como primer forward a 5'-GCGGTAGTTGGCTGTGGTG-3' y primer reverse a 5'-

TCAATCCGACAACCAAGTCGC-3'. La mezcla para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se muestra en el

Cuadro 5. El programa de amplificación constó de tres etapas, (1) un ciclo de desnaturalización (4 min a 94 °C), (2) 35 ciclos de desnaturalización (1 min a 94 °C), alineamiento (1 min a 57 °C) y extensión (1 min a 72 °C) y (3) un ciclo de extensión (10 min a 72 °C). Al cabo de este programa se mantuvo una temperatura constante de 4 C. La secuenciación de las muestras se hizo por el método de Sanger en MacroGen® (Seúl, Corea del Sur).

Cuadro 5. Componentes de la mezcla de PCR por muestra.

Ítem	Volumen (µL)
Agua	13.6
MgCl ₂ (25 mM)	3
Buffer	5
dNTPs (10 mM)	1
Primer forward (10 mM)	1
Primer reverse (10 mM)	1
Enzima Taq	0.2
DNA suspendido	0.2

1.2.5 Absorción y translocación de glifosato-¹⁴C

Se utilizaron cinco plántulas por cada una de las poblaciones tanto susceptible (Al1) como resistentes (Ca1, Cu2, M4 y M6), sembradas en la misma mezcla de suelo utilizada para los ensayos de dosis respuesta y posteriormente transplantadas en contenedores de vidrio con volumen de 42 mL, en cuyo interior se vertió una solución de mezcla de sal basal de Hoagland (Anexo 3) para crecimiento hidropónico. Cuando las plántulas desarrollaron 3 hojas completamente expandidas fueron tratadas con una solución de glifosato- (fosfometil-¹⁴C) (actividad específica 1850 MBq mmol⁻¹, American Radiolabeled Chemicals, Inc., Saint Louis, MO, EE. UU.) en mezcla con glifosato comercial. La solución aplicada presentó una actividad específica de 1,68 KBq y una concentración de glifosato de 550 g ea ha⁻¹ (2.75 g ea L⁻¹) y como surfactante no iónico se agregó Activator® 90 (0.25% v/v). Utilizando una micropipeta se aplicó 1 µL planta⁻¹ de la solución en la superficie adaxial de la primera o segunda

hoja y se demarcó la hoja aplicada. Las plantas se dejaron en una cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16 h y temperatura de 25 °C por 48 h. Las plantas fueron removidas del contenedor hidropónico, se obtuvo la hoja tratada, se sumergió en 10 mL de agua milli-Q y se agitó por 10 seg, esta solución se conservó, la hoja se retiró cuidadosamente y se almacenó en un cono flexible de combustión. Cada muestra se dividió en cinco submuestras (1) hoja tratada, (2) el resto de la parte aérea de la planta, (3) raíz, (4) la solución de lavado foliar y (5) 5 mL de la solución hidropónica de Hoagland. Cada una de las partes en las que se dividió la planta se almacenó separadamente en conos flexibles de combustión dentro de un horno de secado a 50 °C por 5 días. Las muestras fueron combustionadas en un oxidador (Model 307, Packard Instruments, Meriden, CT, EE. UU.), el CO₂ liberado fue capturado en un contenedor con volumen de 10 mL de un cóctel de centelleo (Carbo-Sorb® y Permafluor® (1:1 v/v), Perkin Elmer, Boston, MA, EE. UU.). Las muestras se leyeron en un contador de centelleo (LS-6500, Beckman Instruments, Fullerton, CA, EE. UU.). Las muestras de la solución de lavado y del medio de crecimiento de Hoagland fueron llevadas a una cámara de flujo con un evaporador con base de arena sobre la cual se dispusieron los contenedores a una temperatura de 190 °C hasta que se evaporó su contenido, luego se agregaron 10 mL de cóctel de centelleo (Ultima Gold®, Perkin Elmer, Boston, MA, EE. UU.) por muestra y se leyó en el contador de centelleo.

1.2.6 Metabolismo de glifosato-¹⁴C

Se utilizaron plantas con cuatro hojas completamente expandidas, cuatro días antes de la aplicación de herbicida, se transplantaron de la mezcla de suelo descrita en la prueba de dosis respuesta a una solución de sal basal de Hoagland y se mantuvieron bajo luz a una temperatura de 25 °C. En la hoja más joven completamente expandida se aplicó 1 µL de la mezcla de glifosato-(fosfometil-¹⁴C) (actividad específica 1850 MBq mmol⁻¹, American Radiolabeled Chemicals, Inc., Saint Louis, MO, EE. UU.) y glifosato comercial en dosis de 495 g e.a ha⁻¹

(2.47 g e.a. L⁻¹). Pasadas 48 horas DDA, las muestras se maceraron con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino y se almacenaron a una temperatura de -20 °C. Se aplicaron 10 mL de una solución de agua milli-Q y NaOH 1 M (pH 9). Las muestras se dejaron a 65 °C por 45 min en sonicador (VWR® Symphony®, Mississauga, ON, Canadá), se centrifugaron (Sorvall Legend XTR, Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) a 1000 rpm por 10 min a 4 °C, se aplicaron 5 mL de diclorometano, se centrifugó a 4700 rpm por 45 min a temperatura de 4 °C. Se tomaron 5 mL del sobrenadante de cada muestra y se introdujeron en un evaporador (Rapid Vap®, Labconco Corp., Kansas City, MO, EE. UU.). Cuando las muestras se secaron, se agregaron 500 µL de agua milli-Q y se hizo lectura en HPLC (1220 Infinity LC, Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania).

1.2.7 Alternativas de control a glifosato

En un invernadero de la Universidad de California, Davis, se sembraron las cariósides recolectadas de *L. virgata* tanto susceptibles como resistentes a glifosato bajo las mismas condiciones descritas en la sección de la prueba de dosis respuesta. Los tratamientos consistieron en la aplicación de seis herbicidas y un testigo sin aplicación (Cuadro 6). La aspersión se realizó cuando las plantas alcanzaron el estado de macollamiento. Pasados 14 DDA se determinó el daño visual de las plantas tratadas con respecto a los testigos sin tratamiento en una escala de 0 (sin diferencias con respecto al testigo) a 100% (planta muerta), la parte aérea de las plantas fue cosechada a partir del nivel del suelo y secada por siete días en una cámara de calor a una temperatura de 50 °C para determinar su peso (mg planta⁻¹).

La unidad experimental consistió en cada maceta con una planta. Se establecieron cuatro repeticiones por tratamiento por población en un diseño completamente aleatorizado (DCA). El ensayo se realizó en dos ocasiones. El análisis estadístico se realizó en SAS® versión 9.0.

Cuadro 6. Herbicidas utilizados como alternativas de control a glifosato en *Leptochloa virgata*.

Tratamiento	Grupo HRAC ^a	Producto formulado ^b	Dosis g ia ha ⁻¹
Clethodim	A	Envoy [®] Plus	177
Fluazifop	A	Fusilade [®] DX	187
Glufosinato	H	Rely [®] 280	630
Oxyfluorfen	E	Goal [®] Tender	144
Paraquat	D	Gramoxone [®] SL	828
Rimsulfuron	B	Matrix [®] SG	11.25

^a Herbicide Resistance Action Committee

^b Manufactura de los productos: Envoy[®] Plus, Valent Corporation, Walnut Creek, CA, U.S.A.; Fusilade[®] DX y Gramoxone[®] SL, Syngenta Crop Protection, Greensboro, NC, U.S.A.; Rely[®] 280, Research Triangle Park, NC, U.S.A.; Goal[®] Tender, Dow AgroSciences, Indianápolis, IN, U.S.A., Matix[®] DG, Wilmington, DE, U.S.A.

1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.3.1 Prueba de dosis respuesta

En la dosis de 726 g ea ha⁻¹ seis de las poblaciones mostraron daño visual comercialmente aceptable en campo, es decir, superior a 80%, mientras que, bajo el tratamiento de 1452 g ea ha⁻¹, la mayoría de las poblaciones presentaron daño mayor al 80% (Cuadro 7).

Las tres dosis más altas dieron lugar a un control igual o mayor a 96% en todas las poblaciones. Se evidenció que 15 de las 18 poblaciones evaluadas presentaron un FR mayor a 2, lo cual significa que, de acuerdo con Valverde, Riches y Caseley (2000), presentan resistencia a glifosato (Figura 7). Todas las muestras recolectadas en el municipio de Martínez de la Torre exhiben resistencia. Las poblaciones M3, M4, M5, M6 y M7 manifestaron FRs iguales o superiores a 11.4, mientras que el municipio del que se recolectaron las muestras resistentes y con menores FRs fue Cuitláhuac.

Cuadro 7. Daño visual (%) en plantas de *Leptochloa virgata* tratadas con glifosato con respecto a un testigo sin tratamiento.

Población	Dosis (g ea ha ⁻¹)						
	181	363	726	1452	2904	5808	11616
Cu1	33 ± 6 d	52 ± 8 c	82 ± 4 b	96 ± 3 ab	99 ± 0 ab	100 ± 0 a	100 ± 0 a
Cu2	14 ± 2 d	61 ± 3 c	74 ± 1 b	97 ± 2 a	100 ± 0 a	100 ± 0 a	100 ± 0 a
Cu3	24 ± 3 d	55 ± 4 c	72 ± 1 b	99 ± 1 a	99 ± 0 a	100 ± 0 a	100 ± 0 a
Cu4	42 ± 3 c	70 ± 7 b	86,2 ± 2 a	98 ± 1 a	100 ± 0 a	100 ± 0 a	100 ± 0 a
Cu5	47 ± 3 d	65 ± 2 c	82 ± 2 b	100 ± 0 a	100 ± 0 a	100 ± 0 a	100 ± 0 a
Ca1	9 ± 9 c	41 ± 4 b	76 ± 9 a	91 ± 5 a	99 ± 0 a	99 ± 1 a	100 ± 0 a
T1	59 ± 12 c	73 ± 9 bc	86 ± 3 ab	100 ± 0 a	100 ± 0 a	100 ± 0 a	100 ± 0 a
M2	35 ± 4 c	75 ± 6 b	97 ± 1 a	100 ± 0 a	100 ± 0 a	100 ± 0 a	100 ± 0 a
M3	7 d ± 3	40 ± 3 c	52 ± 3 c	80 ± 7 b	99 ± 0 a	100 ± 0 a	100 ± 0 a
M4	20 ± 8 c	64 ± 9 b	66 ± 2 b	85 ± 6 ab	100 ± 0 a	100 ± 0 a	100 ± 0 a
M5	29 ± 2 d	55 ± 2 c	70 ± 2 b	98 ± 2 a	100 ± 0 a	100 ± 0 a	100 ± 0 a
M6	7 ± 4 e	35 ± 3 d	54 ± 2 c	79 ± 2 b	96 ± 2 a	100 ± 0 a	100 ± 0 a
M7	5 ± 2 e	43 ± 3 d	67 ± 3 c	87 ± 5 b	97 ± 2 ab	100 ± 0 a	100 ± 0 a
N2	16 ± 3 e	50 ± 2 d	68 ± 2 c	86 ± 2 b	97 ± 2 a	99 ± 1 a	100 ± 0 a
S1	14 ± 2 c	71 ± 8 b	74 ± 2 b	99 ± 0 a	100 ± 0 a	100 ± 0 a	100 ± 0 a
A1	18 ± 4 e	48 ± 3 d	67 ± 1 c	79 ± 4 b	98 ± 1 a	100 ± 0 a	100 ± 0 a
A2	57 ± 19 b	89 ± 11 ab	100 ± 0 a	97 ± 1 ab	99 ± 1 a	100 ± 0 a	100 ± 0 a
Al1	91 ± 2 b	99 ± 1 a	100 ± 0 a	100 ± 0 a	100 ± 0 a	100 ± 0 a	100 ± 0 a

^a Columnas con la misma letra indican que no hay diferencia estadísticamente significativa según la prueba de Tukey a un 5% de probabilidad. Los valores ± indican el error estándar de la media.

No sólo las poblaciones recolectadas dentro de cultivos de cítricos presentan resistencia, este rasgo también se registró en las muestras obtenidas en zonas ruderales (T1, S1 y N2), así como la proveniente de un cultivo de papaya (A2) y una de las poblaciones recolectadas en un cañaveral (A1). Las dosis requeridas para obtener los ED₅₀ de las poblaciones susceptibles fueron 11, 28 y 37 g ea ha⁻¹ para Cu4, Al1 y Cu5, respectivamente, mientras que para las poblaciones de mayor resistencia fueron de 437, 465 y 469 g ea ha⁻¹ para M6, M3 y N2, respectivamente.

En la población Al1 (susceptible) se observó una reducción de peso seco cercana al 80% al aplicar la dosis de 363 g ea ha⁻¹, mientras que la población N2 (máxima

resistencia), requeriría más de 11616 g ea ha⁻¹ para disminuir su peso seco en niveles semejantes (Figura 8).

En otras investigaciones basadas en el estudio de resistencia de *L. virgata* a glifosato, Pérez-López *et al.* (2014) obtuvieron valores de FR de 2.3 y 3.0, con ED₅₀ de 126.7, 381.2 y 304.0 g ha⁻¹ para la población susceptible y dos resistentes, respectivamente. Mientras que, Alcántara-de la Cruz *et al.* (2016), obtuvieron valores de FR de 2.2 a 4.8 y ED₅₀ de 145.8 y 515.8 g ha⁻¹ para la población susceptible y la de mayor resistencia, respectivamente. Powles *et al.* (1998) obtuvieron valores de FR de 7 a 11 en poblaciones de *Lolium rigidum*. Para otra población de esta misma especie, Yu *et al.* (2007) obtuvieron un FR de 14, mientras que Salas *et al.* (2015) encontraron FRs en *Lolium multiflorum* que variaron de 7 a 19.

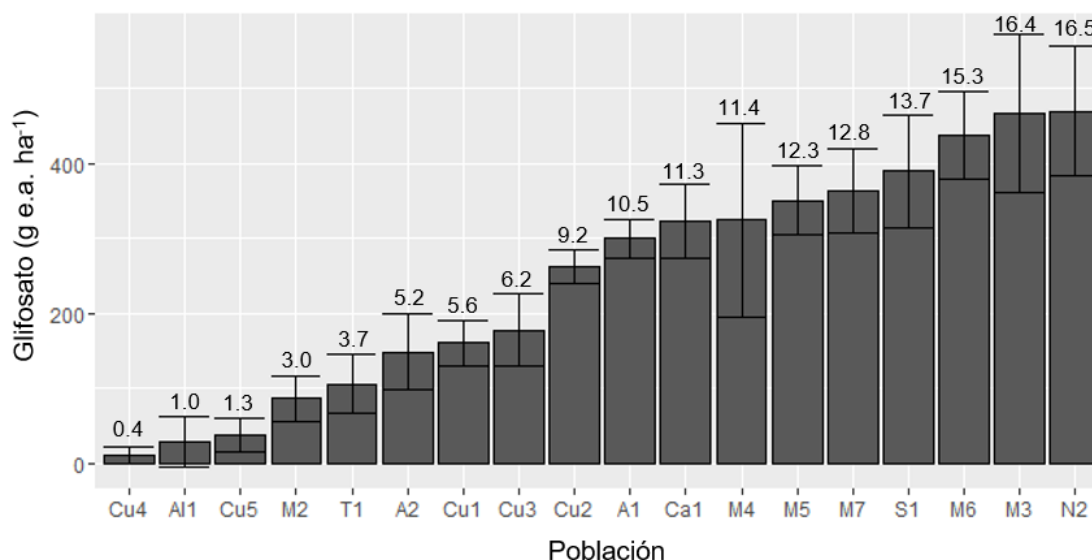


Figura 7. Dosis requeridas para obtener reducciones en el 50% del crecimiento en cada población (ED₅₀) con respecto a un testigo sin tratamiento. Los números sobre las barras indican el valor del índice FR (FR=ED₅₀R/ED₅₀S). Las barras representan el error estándar $\pm$ de la media.

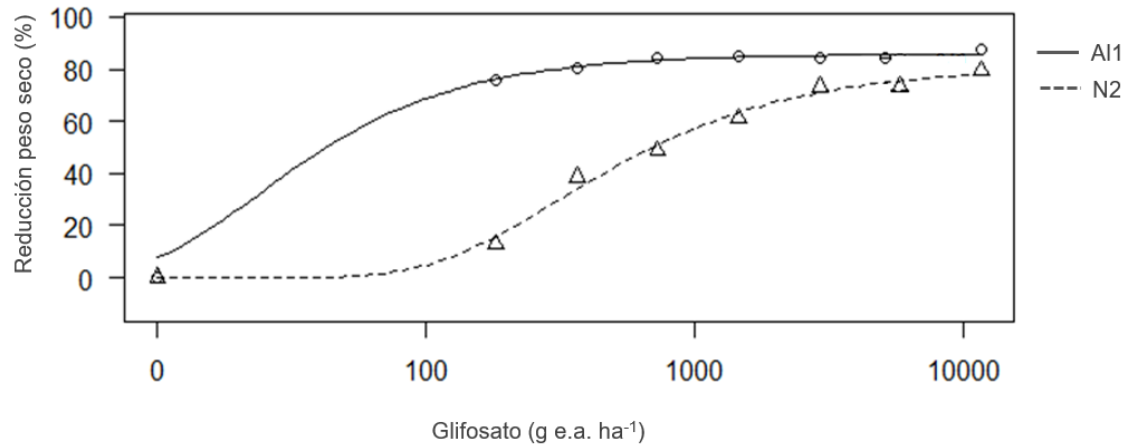


Figura 8. Curvas de dosis respuesta de *Leptochloa virgata* para la población susceptible (AI1) y la de mayor resistencia (N2) a glifosato.

1.3.2 Acumulación de shikimato

Después de 16 h de la aplicación de glifosato, fueron significativamente mayores las acumulaciones de shikimato en el tejido proveniente de plantas susceptibles en las dosis de 400, 1000 y 2000 μM con respecto a las poblaciones resistentes. En las dos dosis menores (0 y 100 μM) no se registró diferencia significativa en la acumulación de shikimato entre poblaciones (Figura 8). En la dosis de 400 μM no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras de poblaciones resistentes, mientras que, bajo la dosis de 1000 μM la acumulación en las muestras de Ca1 y Cu2 fueron significativamente menores con respecto a M4 y M6, en la dosis de 2000 μM hubo diferencia entre la población susceptible y tres de las resistentes (M6, M5 y Ca1), pero no con respecto a una de las resistentes (Cu2). Otras investigaciones señalan que cuando se incrementa la concentración de glifosato en las plantas, la acumulación de shikimato tiende a igualarse en plantas susceptibles y resistentes (Koger *et al.* 2005; Perez-Jones, Park, Colquhoun, Mallory-Smith, Shaner, 2005).

Cuadro 8. Acumulación de shikimato ($\mu\text{g cm}^{-2}$) 16 h DDA en hojas de tejido joven de *Leptochloa virgata* susceptible (Al1) y resistentes (Ca, Cu2, M4 y M6) a glifosato.

Población	Glifosato (μM) ^a				
	0	100	400	1000	2000
Al1	4,3 $\pm$ 1,2 a	3,8 $\pm$ 1,6 a	22,4 $\pm$ 3,2 a	36,1 $\pm$ 2,0 a	39,0 $\pm$ 3,2 a
Ca1	5,5 $\pm$ 2,0 a	1,1 $\pm$ 0,8 a	2,9 $\pm$ 1,3 b	13,8 $\pm$ 2,5 c	22,0 $\pm$ 1,6 c
Cu2	2,4 $\pm$ 1,2 a	0,1 $\pm$ 0,1 a	10,3 $\pm$ 1,6 b	14,0 $\pm$ 0,6 c	33,7 $\pm$ 2,3 ab
M4	2,8 $\pm$ 0,9 a	3,0 $\pm$ 1,7 a	3,4 $\pm$ 1,3 b	22,1 $\pm$ 1,9 b	27,6 $\pm$ 3,0 bc
M6	2,4 $\pm$ 1,0 a	1,2 $\pm$ 0,5 a	7,0 $\pm$ 1,3 b	25,2 $\pm$ 1,1 b	25,5 $\pm$ 1,6 bc

^a Valores por columnas con la misma letra no son significativamente diferentes a un nivel del 5% determinado por la prueba de la diferencia significativa honesta (DSH) de Tukey. Los valores con el $\pm$ son los errores estándares de la media.

Steinrücken y Amrhein (1980) señalan que el glifosato inhibe competitivamente a la enzima ácido 5-enolpiruvil 3-fosfato sintasa (EPSPS) debido a la ocupación de sitio de unión del fosfoenolpiruvato (PEP), lo cual evita que ocurra el paso enzimático de ácido shikímico a ácido corísmico, que en condiciones de no inhibición debería dar lugar a la biosíntesis de aminoácidos aromáticos. La inhibición en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos evita la biosíntesis de varias biomoléculas esenciales para la fisiología vegetal como las auxinas, flavonoides, antocianinas, suberina, lignina, tocoferoles, entre otras (Maeda y Dudareva, 2012). De acuerdo con las observaciones de Feng *et al.* (2004), los resultados aquí presentados indican que la inhibición de la eficiencia en la inhibición de la EPSPS por parte de glifosato fue menor en poblaciones resistentes que en la susceptible en las tres concentraciones de herbicida más altas. Investigaciones sobre resistencia a glifosato indican la mayor acumulación de shikimato en plantas susceptibles con respecto a plantas resistentes tras las aplicación de glifosato (Cruz-Hipolito *et al.* 2011; Dinelli *et al.* 2006; Pérez-Jones *et al.* 2007) lo cual ha permitido que la acumulación de shikimato sea usada como marcador para la sensibilidad a glifosato de la EPSP en plantas (Mueller *et al.*, 2008).

1.3.3 Extracción de ADN, amplificación y secuenciación

El producto obtenido de la secuenciación presentó una longitud de 221 pb, en la posición que traduce para el aminoácido 106 (prolina) se identificó una mutación de CCA a TCA, en tres de cinco muestras secuenciadas de la población M4, codificando un aminoácido diferente (serina) en la posición 106, las demás muestras presentaron el codón CCA (Figura 9).

Consensus	C	T	G	G	A	A	C	T	G	C	A	A	T	G	C	G	A	C	C	A	T	T	G	A	C	A	G	C	A	G	C	C	G	T	A	A	C
1. Eleusine indica (S)	C	T	G	G	A	A	C	T	G	C	A	A	T	G	C	G	A	C	C	A	T	T	G	A	C	A	G	C	A	G	C	C	G	T	A	A	C
2. Eleusine indica (R)	C	T	G	G	A	A	C	T	G	C	A	A	T	G	C	G	A	C	C	A	T	T	G	A	C	A	G	C	A	G	C	C	G	T	A	A	C
3. M4	C	T	G	G	A	A	C	T	G	C	A	A	T	G	C	G	A	C	C	A	T	T	G	A	C	A	G	C	A	G	C	C	G	T	A	A	C
4. M4	C	T	G	G	A	A	C	T	G	C	A	A	T	G	C	G	A	C	C	A	T	T	G	A	C	A	G	C	A	G	C	C	G	T	A	A	C
5. M4	C	T	G	G	A	A	C	T	G	C	A	A	T	G	C	G	A	C	C	A	T	T	G	A	C	A	G	C	A	G	C	C	G	T	A	A	C
6. M4	C	T	G	G	A	A	C	T	G	C	A	A	T	G	C	G	A	C	C	A	T	T	G	A	C	A	G	C	A	G	C	C	G	T	A	A	C
7. M4	C	T	G	G	A	A	C	T	G	C	A	A	T	G	C	G	A	C	C	A	T	T	G	A	C	A	G	C	A	G	C	C	G	T	A	A	C
8. M6	C	T	G	G	A	A	C	T	G	C	A	A	T	G	C	G	A	C	C	A	T	T	G	A	C	A	G	C	A	G	C	C	G	T	A	A	C
9. M6	C	T	G	G	A	A	C	T	G	C	A	A	T	G	C	G	A	C	C	A	T	T	G	A	C	A	G	C	A	G	C	C	G	T	A	A	C
10. M6	C	T	G	G	A	A	C	T	G	C	A	A	T	G	C	G	A	C	C	A	T	T	G	A	C	A	G	C	A	G	C	C	G	T	A	A	C
11. M6	C	T	G	G	A	A	C	T	G	C	A	A	T	G	C	G	A	C	C	A	T	T	G	A	C	A	G	C	A	G	C	C	G	T	A	A	C
12. AI1	C	T	G	G	A	A	C	T	G	C	A	A	T	G	C	G	A	C	C	A	T	T	G	A	C	A	G	C	A	G	C	C	G	T	A	A	C
13. AI1	C	T	G	G	A	A	C	T	G	C	A	A	T	G	C	G	A	C	C	A	T	T	G	A	C	A	G	C	A	G	C	C	G	T	A	A	C
14. AI1	C	T	G	G	A	A	C	T	G	C	A	A	T	G	C	G	A	C	C	A	T	T	G	A	C	A	G	C	A	G	C	C	G	T	A	A	C
15. AI1	C	T	G	G	A	A	C	T	G	C	A	A	T	G	C	G	A	C	C	A	T	T	G	A	C	A	G	C	A	G	C	C	G	T	A	A	C
16. AI1	C	T	G	G	A	A	C	T	G	C	A	A	T	G	C	G	A	C	C	A	T	T	G	A	C	A	G	C	A	G	C	C	G	T	A	A	C
17. Ca1	C	T	G	G	A	A	C	T	G	C	A	A	T	G	C	G	A	C	C	A	T	T	G	A	C	A	G	C	A	G	C	C	G	T	A	A	C
18. Ca1	C	T	G	G	A	A	C	T	G	C	A	A	T	G	C	G	A	C	C	A	T	T	G	A	C	A	G	C	A	G	C	C	G	T	A	A	C
19. Ca1	C	T	G	G	A	A	C	T	G	C	A	A	T	G	C	G	A	C	C	A	T	T	G	A	C	A	G	C	A	G	C	C	G	T	A	A	C
20. Ca1	C	T	G	G	A	A	C	T	G	C	A	A	T	G	C	G	A	C	C	A	T	T	G	A	C	A	G	C	A	G	C	C	G	T	A	A	C
21. Cu2	C	T	G	G	A	A	C	T	G	C	A	A	T	G	C	G	A	C	C	A	T	T	G	A	C	A	G	C	A	G	C	C	G	T	A	A	C
22. Cu2	C	T	G	G	A	A	C	T	G	C	A	A	T	G	C	G	A	C	C	A	T	T	G	A	C	A	G	C	A	G	C	C	G	T	A	A	C
23. Cu2	C	T	G	G	A	A	C	T	G	C	A	A	T	G	C	G	A	C	C	A	T	T	G	A	C	A	G	C	A	G	C	C	G	T	A	A	C
24. Cu2	C	T	G	G	A	A	C	T	G	C	A	A	T	G	C	G	A	C	C	A	T	T	G	A	C	A	G	C	A	G	C	C	G	T	A	A	C

Figura 9. Alineación parcial de nucleótidos del gen de EPSPS en poblaciones de *Leptochloa virgata* susceptibles y resistentes a glifosato. Los nucleótidos resaltados señalan la mutación de CCA (prolina) a TCA (serina) en la posición 106 en tres muestras de la población M4.

Los fragmentos obtenidos se sometieron a BLAST en NCBI y presentaron una identidad máxima del 97% con la accesión AJ417033.1 del gen de EPSPS de *Eleusine indica* resistente a glifosato, del 95% con la accesión EF575795.1 de *Oryza sativa*, del 94% con de *Digitaria insularis* accesiones susceptibles y resistentes a glifosato (KX108900.1 y KX108894.1, respectivamente), entre otras especies. Alcántara-de la Cruz (2016) identificó la misma mutación en una población de *L. virgata* resistente a glifosato. Otros autores han señalado esta mutación en *Lolium rigidum* (Simarmata y Penner, 2008) y *Eleusine indica* (Baerson *et al.*, 2002). Otra mutación que se reporta como causante de

resistencia a glifosato es la sustitución de prolina por treonina en la posición 106 en *Lolium rigidum* (Wakelin y Preston, 2006).

1.3.4 Absorción y translocación de glifosato-¹⁴C

La absorción de glifosato-¹⁴C 48 h DDA en las plantas varió entre poblaciones en un rango promedio de 58.95 a 68.12% (Figura 10) con un promedio de 62,87%, siendo ligeramente mayor con respecto a la absorción reportada por Alcántara-de la Cruz (2016) en *L. virgata*. Estadísticamente no se presentaron diferencias significativas entre poblaciones en términos de absorción de glifosato-¹⁴C por población. Tampoco se presentaron diferencias estadísticamente significativas en la translocación de glifosato-¹⁴C en las partes de la planta entre poblaciones (Cuadro 6). En promedio, la parte de la planta que presentó mayor acumulación de glifosato-¹⁴C fue la hoja tratada, registrando el 71.63% del total absorbido, mientras que 23.27% se detectó en el resto de parte aérea y 5.09% en la raíz.

Estos resultados difieren con los presentados por Alcántara-de la Cruz (2016) quien señaló que dos poblaciones de *L. virgata* resistentes absorbieron una cantidad significativamente mayor de glifosato-¹⁴C con respecto a una población susceptible. Sin embargo, su investigación coincide al señalar que 48 h DDA no se presentan diferencias estadísticamente significativas en la translocación de glifosato en *L. virgata* en las hojas tratadas con glifosato de una población susceptible y una resistente. De la misma forma, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el resto de la parte aérea de la planta. Pero al analizar el contenido de glifosato-¹⁴C en la raíz, identificó diferencia significativa de una de las poblaciones resistentes que presenta una reducción del 5.3% en la translocación de glifosato-¹⁴C con respecto a una población susceptible.

Feng *et al.* (1999) encontraron que la absorción y translocación de glifosato no están asociados con la resistencia de *Lolium rigidum* al herbicida, a una dosis 0.28 kg ha⁻¹, el contenido de glifosato-¹⁴C en la hoja tratada fue de 26.4 ± 6.1 y 28.8 ± 7.0%, para una población susceptible y una resistente, respectivamente,

en el resto de la parte aérea fue de 22.6 ± 2.2 y $19.3 \pm 3.3\%$ para una población susceptible y una resistente, respectivamente y en la raíz se registró 15.7 ± 4.6 y $15.8 \pm 2.6\%$ para una población susceptible y una resistente, respectivamente.

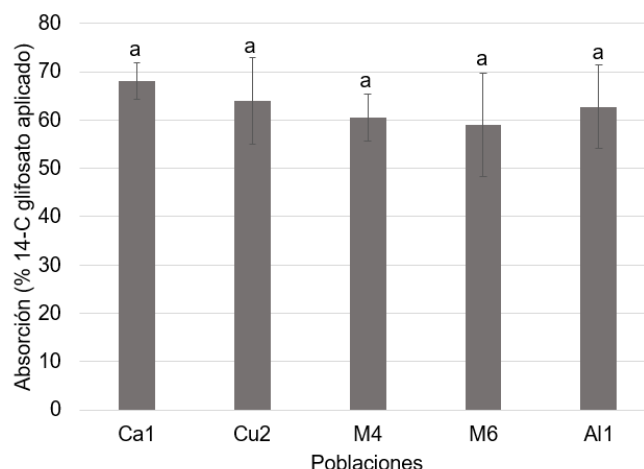


Figura 10. Promedio de absorción de glifosato en poblaciones susceptibles y resistentes de *Leptochloa virgata*. Barras con la misma letra indica que no son estadísticamente diferentes determinado por la prueba de Tukey con nivel de significancia al 5%. Las barras verticales representan el error estándar de la media (n = 5).

Cuadro 9. Translocación de glifosato- ^{14}C 48 h DDA en plantas de *Leptochloa virgata* susceptibles y resistentes al herbicida

Población	Translocación (% del total absorbido) ^a		
	Hoja tratada	Resto de la planta	Raíz
Ca1	69,76 a	24,38 a	5,83 a
Cu2	71,11 a	24,20 a	4,69 a
M4	75,19 a	20,46 a	4,36 a
M6	71,83 a	21,79 a	6,39 a
Al1	70,28 a	25,53 a	4,19 a

^a Medias con la misma letra por columnas no son estadísticamente diferentes determinado por la prueba de Tukey con nivel de significancia al 5% (n = 5).

1.3.5 Metabolismo de glifosato-¹⁴C

No se evidenció degradación metabólica de glifosato tanto en las poblaciones resistentes como en la susceptible, por tanto, esta no es la razón en la cual se fundamenta la resistencia de las poblaciones de *L. virgata*. En la Figura 11 (A – E) se observan picos máximos asociados con la presencia de glifosato en un tiempo de retención entre 6 y 7 minutos, el pico de menor tamaño puede estar asociado a la degradación del herbicida a ácido aminometil fosfónico (AMPA) que puede ocurrir en el almacenamiento del glifosato-¹⁴C (Feng *et al.*, 1999). Con el fin de hacer una comparación, en la Figura 11 (F) se observa el cromatograma del metabolismo de glifosato ocurrido en una muestra de variedad comercial de canola HyCLASS® 955, en la cual se observa un pico principal en un tiempo de retención entre 3 y 4 minutos correspondiente al AMPA.

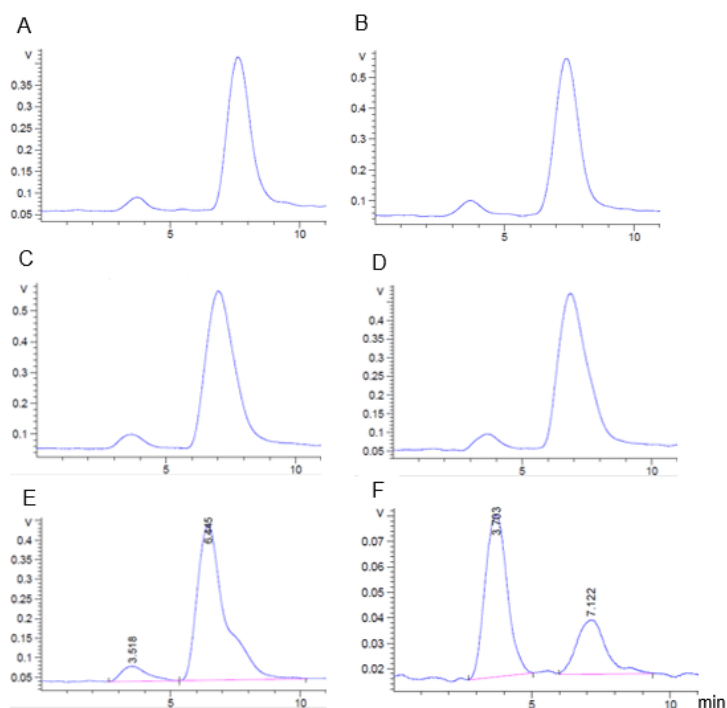


Figura 11. Cromatogramas mostrando la presencia de glifosato en (A) Ca1, (B) Cu2, (C) M4, (D) M6, (E) Al1 y (F) canola HyCLASS® 955 Roundup® Ready.

La metabolización de glifosato a AMPA en esta variedad ocurre debido a la inserción del gen *cp4 epsps*, derivado de la cepa CP4 de *Agrobacterium*, la cual codifica para la enzima CP4 EPSPS y el gen *gox* de *Ochrobactrum anthropi*, que codifica para glifosato oxidasa (GOX). Los productos de ambos genes confieren resistencia a glifosato. La CP4 EPSPS tiene una tolerancia natural alta al glifosato y la producción de aminoácidos aromáticos continúa. Además, la proteína GOX cataliza la ruptura de glifosato en ácido glicílico y AMPA (Monsanto, 2002).

1.3.6 Alternativas de control a glifosato

El tratamiento que significativamente ejerció mayor control en promedio para todas las poblaciones de *L. virgata* fue paraquat al provocar una disminución en el peso promedio del 90%. No se presentó diferencia estadísticamente significativa entre los controles por parte de los tratamientos de glufosinato, fluazifop y clethodim, cuya reducción de peso promedio con respecto al testigo fue de 79, 77 y 72%, respectivamente. Los tratamientos de oxyfluorfen y rimsulfuron presentaron el control más bajo (9 y 6%, respectivamente) y no tuvieron diferencia estadísticamente significativa entre sí. El tratamiento de rimsulfuron no presentó diferencias estadísticamente significativas con respecto al testigo sin tratamiento (Cuadro 10. Promedio de reducción de peso (%) 14 DDA sobre plantas de *Leptochloa virgata* con respecto a un testigo sin tratamiento. Cuadro 10).

Un programa alternativo de manejo de resistencia sobre las poblaciones evaluadas debe incluir la rotación de herbicidas con diferentes mecanismos de acción, esta prueba permite considerar como opciones adecuadas el uso en rotación de paraquat, glufosinato y clethodim/fluazifop, no se incluye el uso de oxyfluorfen ni rimsulfuron, que, de acuerdo con los resultados de la prueba, mostraron bajo efecto sobre esta especie. Al1 fue la única población en los que oxyfluorfen y rimsulfuron exhibieron diferencias significativas con respecto al control. T1 presentó diferencia significativa entre el tratamiento de oxyfluorfen con respecto al testigo, sin embargo, se mostró que los demás herbicidas siempre muestran mayor efecto en el control de la maleza. Para M3 no se recomienda el

uso de clethodim, por no mostrar diferencias estadísticamente significativas con respecto a los tratamientos de control bajo y al testigo.

Cuadro 10. Promedio de reducción de peso (%) 14 DDA sobre plantas de *Leptochloa virgata* con respecto a un testigo sin tratamiento.

Pob.	Promedio de reducción de peso (%) respecto a testigo ^a							
	Testigo		Clethodim	Fluazifop	Glufosinato	Oxyfluorfen ^b	Paraquat	Rimsulfuron ^b
Al1	0	a	80 c	81 c	85 C	47 b	92 c	45 b
Ca1	0	a	73 b	78 b	66 B	4 a	87 b	-12 a
Cu1	0	a	79 b	84 b	76 B	-7 a	93 b	-10 a
Cu2	0	a	76 b	69 b	64 B	-21 a	86 b	9 a
Cu3	0	a	82 b	85 b	81 B	28 a	92 b	11 a
Cu4	0	a	76 b	86 b	87 B	34 a	96 b	28 a
Cu5	0	a	79 b	87 b	83 B	31 a	92 b	5 a
M2	0	a	65 b	72 b	73 B	2 a	91 b	9 a
M3	0	a	44 ab	69 b	83 B	-4 a	82 b	-12 a
M4	0	a	69 b	77 b	84 B	14 a	87 b	13 a
M5	0	a	74 b	74 b	80 B	28 a	91 b	-6 a
M6	0	a	75 b	72 b	80 B	-13 a	92 b	-6 a
M7	0	a	71 b	68 b	85 B	-5 a	92 b	8 a
N2	0	a	74 b	76 b	78 B	-22 a	88 b	-11 a
S1	0	a	61 b	72 b	76 B	-4 a	85 b	6 a
T1	0	a	80 c	79 c	84 C	28 b	94 c	23 ab

^a Columnas con la misma letra indican que no hay diferencia estadísticamente significativa según la prueba de Tukey a un nivel de significancia al 5%.

^b Los valores promedio negativos indican que las plantas tratadas presentaron mayor peso promedio que el testigo.

La prueba de alternativas de control realizada por Pérez-López *et al.* (2014) para el manejo en un huerto de cítricos en el municipio de Cuitláhuac con bajo control de glifosato sobre *Leptochloa virgata* mostró que la mezcla de paraquat + diuron dio lugar a controles visuales del 97.3, 93.2 y 93.0 a los 15, 30 y 60 DDA, mientras que la aplicación de glufosinato permitió controles de 96.2, 85.3, y 78.0 en las mismas fechas de evaluación. Christoffoleti *et al.* (2005) probaron diferentes herbicidas como alternativas de manejo a una población de *Lolium multiflorum* resistente a glifosato, determinaron que la mezcla de paraquat + diuron (500 + 250 g i.a. ha⁻¹) aplicada en cada uno de las tres etapas de desarrollo evaluadas (cinco y doce macollas y floración temprana) y clethodim (96 g i.a. ha⁻¹) y paraquat

+ diuron (300 + 500 g i.a. ha⁻¹) en los estado iniciales de desarrollo hasta prefloración fueron excelentes alternativas para el manejo de la población, con controles que alcanzaron el 100% a los 21 DDA. Widderick *et al.* (2013) encontraron que paraquat (250 o 500 g i.a. ha⁻¹) resultó ser la opción más efectiva y confiable para el control de poblaciones de *Echinochloa colona* tanto susceptibles como resistentes a glifosato.

1.4 CONCLUSIONES

- Se identificaron 15 poblaciones de *L. virgata* resistentes a glifosato con factores de resistencia que variaron de 3.0 a 16.5 Todas las muestras provenientes del municipio de Martínez de la Torre (Veracruz, México) presentaron resistencia a glifosato.
- Se demostró que bajo tres concentraciones de glifosato, la población susceptible AI1 acumuló cantidades significativamente superiores de shikimato con respecto a las poblaciones resistentes.
- Se identificaron muestras de la población M4 con mutación en Pro106Ser en la secuencia del gen que codifica para la EPSPS. No se identificaron mutaciones en las demás poblaciones evaluadas.
- No se presentaron diferencias entre la absorción y la translocación de glifosato-¹⁴C entre la población susceptible y las resistentes.
- No se encontró metabolismo de glifosato en las muestras analizadas.
- Como alternativa al uso de glifosato y para un manejo adecuado de *L. virgata* se propone el uso en rotación de paraquat, glufosinato, y fluazifop/clethodim.

1.5 AGRADECIMIENTOS

A Jesús Torres por su apoyo en el área de biología molecular. A Bradley Hanson, Sarah Morran y Caio Brunharo del Hanson Lab de la Universidad de California, Davis, por su permanente apoyo. Esta investigación fue financiada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), la Universidad Autónoma Chapingo y el Hanson Lab de la Universidad de California, Davis.

1.6 LITERATURA CITADA

- Alcántara-de la Cruz, R. (2016). Mecanismos fisiológicos, bioquímicos y moleculares de tolerancia/resistencia a glifosato en especies de México. Tesis doctoral. Universidad de Córdoba. Departamento de Química Agrícola y Edafología.
- Alcántara-de la Cruz, R., Romano, Y., Osuna-Ruíz, M., Domínguez-Valenzuela, J., Menéndez, J., De Prado, R. (2016a) Genetic relationships between tropical sprangletop (*Leptochloa virgata*) populations from Mexico: Understanding glyphosate resistance spread. *Weed Science*, DOI: 10.1614/WS-D-15-00183.1
- Baerson, S., Rodríguez, D., Tran, M., Feng, Y., Biest, N. & Dill, G. (2002). Glyphosate-resistant goosegrass identification of a mutation in the target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *Plant Physiology*, 129, 1265 – 1275.
- Benbrook, C. (2016). Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environmental Sciences Europe*, 28, 1 – 15.
- Christoffoleti, P., Trentin, R., Tocchetto, S., Marochi, A., Batista, J., López-Ovejero, R. & Nicolai, M. (2005). Alternative herbicides to manage Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam) resistant to glyphosate at different phenological stages. *Journal of Environmental Science and Health*, B40, 59 – 67.
- Cruz-Hipolito, H.; Rojano, A., Domínguez-Valenzuela, J., Heredia, A., Luque, M., De Prado, R. (2011). Glyphosate tolerance by *Clitoria ternatea* and *Neonotonia wightii* plants involves differential absorption and translocation of the herbicide. *Plant Soil*, 347, 221-230.
- Dinelli, G., Marotti, I., Bonetti, A., Minelli, M., Catizone, P. & Barnes, J. 2006. Physiological and molecular insight on the mechanisms of resistance to glyphosate in *Conyza canadiensis* (L.) Conq. biotypes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 86, 30 – 41.
- Feng, P., Pratley, J. & Bohn, J. (1999) Resistance to glyphosate in *Lolium rigidum*. II. Uptake, translocation and metabolism. *Weed Science*, 47, 412 – 415.
- Feng, P., Tran, M., Chiu, T., Sammons, D., Heck, G. & CaJacob, C. (2004). Investigations into glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*): retention, uptake, translocation and metabolism. *Weed Science*, 52, 498 – 505.
- Koger, C., Shaner, D., Henry, W., Nadler-Hassar, T., Thomas, W. & Wilcut, J. (2005). Assessment of two nondestructive assays for detecting glyphosate resistance in horseweed (*Conyza canadensis*). *Weed Science*, 53, 438 – 445.
- Heap, I. (2016). The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Disponible en línea: <http://www.weedscience.com/>
- Jasienuk, M., Brûle-Babel, A. & Morrison, I. (1996). The evolution and genetics of herbicide resistance in weeds. *Weed Science*, 44, 176 – 193.

- Maeda, H. & Dudareva, N. 2012. The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 63, 73 – 105.
- Monsanto. (2002) Safety assessment of Roundup Ready® canola event GT73. Recuperado de: http://www.monsanto.com/products/documents/safety-summaries/canola_pss.pdf consulta: noviembre 7, 2016.
- Mueller, T., Ellis A., Beeler, J., Sharma, S. & Singh, M. (2008). Shikimate accumulation in nine weedy species following glyphosate application. *Weed Research*, 48: 455 – 460.
- Ng, C., Wickneswary, R., Salmijah, S., Teng, Y., & Ismail, B. (2003) Gene polymorphisms in glyphosate-resistant and –susceptible biotypes of *Eleusine indica* from Malaysia. *Weed Research*, 43, 108 – 115.
- Perez-Jones, A., Park, K., Colquhoun, J., Mallory-Smith, C. & Shaner, D. (2005). Identification of glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) in Oregon. *Weed Science*, 53, 775 – 779.
- Pérez-Jones, A., Park, K., Polge, N., Colquhoun, J. & Mallory-Smith, C. (2007). Investigating the mechanisms of glyphosate resistance in *Lolium multiflorum*. *Planta*, 226, 395 – 404.
- Pérez-López M., González-Torralva, F., Cruz-Hipólito, H., Santos, F., Domínguez-Valenzuela, J. & De Prado, R. (2014). Characterization of glyphosate-resistant tropical sprangletop (*Leptochloa virgata*) and its alternative chemical control in Persian lime orchard in Mexico. *Weed Science*, 62, 441 – 450.
- Powles, S., Lorraine-Colwill, D., Dellow, J. & Preston, C. (1998). Evolved resistance to glyphosate in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) in Australia. *Weed Science*, 46, 604 – 607.
- Powles, S., & Yu, Q. (2010). Evolution in action: plants resistant to herbicides. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 317 – 347.
- Salas, R., Scott, R., Dayan, F. & Burgos, N. (2015). EPSPS Gene amplification in glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium perenne* ssp. *multiflorum*) populations from Arkansas, USA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, DOI: 10.1021/acs.jafc.5b00018.
- Simarmata, M. & Penner, D. (2008). The basis for glyphosate resistance in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) from California. *Weed Science*, 56, 181 – 188.
- Shaner, D., Nadler-Hassar, T. Henry, W. & Koger, C. (2005). A rapid in vivo shikimate accumulation assay with excised leaf discs. *Weed Science*, 53, 769 – 774.
- Steinrücken, H., & N. Amrhein. (1980). The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimate acid-3-phosphate synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 94, 1207 – 1212.
- Stewart, C. & Via, L. (1993). A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *BioTechniques*, 14(5), 748 - 749.
- Valverde, B. Riches, C., Caseley, J. (2000). Prevención y manejo de malezas resistentes a herbicidas en arroz: experiencias en América Central con *Echinochloa colona*. Cámara de Insumos Agropecuarios. Primera edición. San José, Costa Rica. 136p.

- Widderick, M., Bell, K., Boucher, L. & Walker, S. Control by glyphosate and its alternatives of glyphosate-susceptible and glyphosate-resistant *Echinochloa colona* in the fallow phase of crop rotations in subtropical Australia. *Weed Biology and Management*, 13, 89 – 97.
- Yu, Q., Cairns, A. & Powles, S. (2007). Glyphosate, paraquat and ACCase multiple herbicide resistance evolved in a *Lolium rigidum* biotype. *Planta*, 225, 499 – 513.

ANEXOS

Anexo 1. Análisis químico de la mezcla de suelo



Soil & Plant Laboratory, Inc.
 Leaders in Soil & Plant Testing Since 1946

4741 E. Hunter Ave, Suite A Anaheim, CA 92807 714-262-8777 (phone) 714-262-8575 (fax)
 www.soilandplantlaboratory.com

SOIL ANALYSIS

Send To : University of California at Davis One Shields Ave. Davis CA 95616	Project : New Media	Report No : 13-086-0062 Cust No : 01047 Date Printed : 04/04/2013 Date Received : 03/27/2013 Page : 1 of 2 Lab Number : 22487
--	------------------------	--

Sample Id : **New Media - Pasteurized**

SATURATION EXTRACT - PLANT SUITABILITY

Test	Result	Effect on Plant Growth				
		Negligible	Sensitive Crops Restricted	Many Crops Restricted	Only Tolerant Crops Satisfactory	Few Crops Survive
Salinity (ECe)	1.7 dS/m					
Sodium Adsorption Ratio (SAR) *	2.44					
Boron (B)	0.51 ppm					
Sodium (Na)	4.9 meq/L					
Chloride (Cl)						
Carbonate (CO ₃)						
Bicarbonate (HCO ₃)						
Fluoride (F)						

* Structure and water infiltration of mineral soils potentially adversely affected at SAR values higher than 6.

Test	Result	Strongly Acidic	Moderately Acidic	Slightly Acidic	Neutral	Slightly Alkaline	Moderately Alkaline	Strongly Alkaline	Qualitative Lime
pH	6.6 s.u.								None

EXTRACTABLE NUTRIENTS

Test	Result	Sufficiency Factor	SOIL TEST RATINGS					NO ₃ -N
			Very Low	Low	Medium	Optimum	Very High	
Available-N	125 ppm	0.9						6 ppm
Phosphorus (P) - Olsen	46 ppm	0.5						NH ₄ -N
Potassium (K)	759 ppm	2.4						119 ppm
Potassium - sat. ext.	4.9 meq/L							Total Exchangeable Cations (TEC)
Calcium (Ca)	1041 ppm	0.5						114 meq/kg
Calcium - sat. ext.	3.0 meq/L							
Magnesium (Mg)	578 ppm	2.0						
Magnesium - sat. ext.	5.0 meq/L							
Copper (Cu)	7.6 ppm	5.1						
Zinc (Zn)	13 ppm	2.2						
Manganese (Mn)	58 ppm	4.6						
Iron (Fe)	57 ppm	1.0						
Boron (B) - sat. ext.	0.51 ppm	1.7						
Sulfate - sat. ext.	5.7 meq/L	1.9						
Exch Aluminum								

Cu, Zn, Mn and Fe were analyzed by DTPA extract.

PARTICLE SIZE ANALYSIS

Half Sat		Organic Matter	Weight Percent of Sample Passing 2mm Screen						USDA Soil Classification
			Gravel Coarse 5-12	Gravel Fine 2-5	Very Coarse 1-2	Sand Coarse 0.5-1	Med. to Very Fine 0.05-0.5	Silt .002-.05	
71	%								

Graphical interpretation is a general guide. Optimum levels will vary by crop and objectives.

Anexo 2. Soluciones utilizadas en el ensayo de acumulación de shikimato

Búffer fosfato 20 mM. Fosfato dipotasio (K_2HPO_4) + fosfato monopotasio (KH_2PO_4)

Stocks de 0.1 M 1.74 g de K_2HPO_4 en 100 mL de agua destilada + 1.36 g KH_2PO_4 .

Mezcla de stock 0.1 M a pH 7: 6.15 mL de K_2HPO_4 0.1 M + 3.85 mL de KH_2PO_4 0.1 M.

Mezcla de stock 20 mM a pH 7:

10 mL de volumen total: 2 mL de la mezcla de stock a 0.1 M + 8 mL de agua destilada.

50 mL de volumen total: 10 mL de mezcla de stock 0.1 M + 40 mL de agua destilada.

HCl 0.25 M. HCl concentrado (32% p/p) PM: 36.4 g; densidad = 1.16 g/mL.

Molaridad de HCl concentrado: 32 g de HCl/ (100 g/1.16 g/mL) = 10.18 M.

Volumen total de 250 mL: 6.14 mL de HCl concentrado + 243.86 mL de agua destilada.

Volumen total de 50 mL: 1.23 mL de HCl concentrado + 48.77 mL de agua destilada.

Solución de ácido periódico. Ácido periódico (H_5IO_6) 0.25% + metaperiodato de sodio ($NaIO_4$) 0.25%.

Volumen total de 10 mL: 25 mg H_5IO_6 + 25 mg ($NaIO_4$) + 10 mL de agua destilada.

Volumen total de 50 mL: 125 mg H_5IO_6 + 125 mg ($NaIO_4$) + 50 mL de agua destilada.

Solución Quench

Hidróxido de sodio (NaOH) 0.6 M + Sulfito de sodio (Na_2SO_3) 0.22 M

Estable por un mes almacenado a 4 C

Volumen total de 50 mL: 1.2 g NaOH + 1.38 g Na_2SO_3 en 50 mL de agua destilada

Volumen total de 100 mL: 2.4 g NaOH + 2.77 g Na_2SO_3 en 100 mL de agua destilada.

Stock de glifosato 2 mM

Glifosato, peso molecular = 169.08; pH (a 500 μ M) = 6.1

Roundup 450 g.i.a. L^{-1} 18.8 μ L en 25 mL de agua destilada

Roundup 570 g.i.a. L^{-1} 18.7 μ L en 25 mL de agua destilada

Para un volumen total de 2 mL

Estándar (μM)	Stock (μL)	Agua destilada (mL)
0	0	2
100	100	1.9
400	400	1.6
1000	1000	1
2000	2000	0

Estándares de ácido shikímico

Stock de 100 mM 0.017 g de ácido shikímico por mL de HCl 0.25 M

Stock de 100 μM 20 μL del stock de 100 mM + 180 μL de HCl 0.25 M

Conc. estándar (μM)	Vol. de stock 100 μM (μL)	Vol. de HCl 0.25 M (μL)	Ácido shikímico (nM) / 25 μL	Ácido shikímico (μg) / 25 μL
0	0	1000	0	0
1	10	990	0.025	0.00435375
2.5	25	975	0.05	0.0087075
5	50	950	0.1	0.017415
10	100	900	0.2	0.03483
25	250	750	0.5	0.087075
50	500	500	1	0.17415

Anexo 3. Composición de la solución de mezcla de sal basal de Hoagland, MP Biomedicals®

Información técnica

Apariencia física: polvo blanco a ligeramente amarillo.

Solubilidad: soluble en agua (claro, sin color a ligero color amarillo en solución).

Formulación

Componente	Cantidad (mg L ⁻¹)	Concentración (molar)
Fosfato de amonio	115.03	1 mM
Ácido bórico	2.86	460 µM
Nitrato de calcio	656.4	4 mM
Sulfato cúprico •5H ₂ O	0.08	0.32 µM
Na 2-EDTA	33.534	90.1 µM
Sulfato ferroso •7H ₂ O	25.02	90 µM
Sulfato de magnesio	240.76	2 mM
Cloruro de magnesio •4H ₂ O	1.81	9.2 µM
Nitrato de potasio	606.6	6 mM
Sulfato de zinc •7H ₂ O	0.22	0.77 µM
Gramos de la mezcla en polvo para preparar 1 L de solución	1.63	