

"Enseñar la explotación de la
tierra, no la del hombre"

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

SELECCIÓN Y MULTIPLICACIÓN *in vitro* DE CALABAZAS (*Cucurbita spp.*) RESISTENTES A HERBICIDAS USADOS EN MAÍZ

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

EN HORTICULTURA

PRESENTA:

FRANCISCO BAUTISTA REYES



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

CHAPINGO, ESTADO DE MÉXICO, MARZO DE 2004



SELECCIÓN Y MULTIPLICACIÓN *in vitro* DE CALABAZAS (*Cucurbita spp.*) RESISTENTES A HERBICIDAS USADOS EN MAÍZ

Tesis realizada por **Francisco Bautista Reyes** bajo la dirección del comité asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

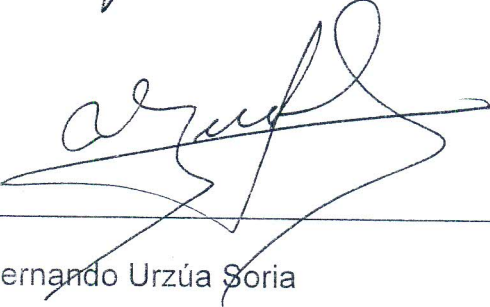
DIRECTOR: _____


Dr. Clemente Villanueva Verduzco

ASESOR: _____


Dr. Aureliano Peña Lomelí

ASESOR: _____


M.C. Fernando Urzúa Soria

AGRADECIMIENTOS

A DIOS, por darme todavía la oportunidad de seguir adelante en los momentos más difíciles.

A la Universidad Autónoma Chapingo, en especial al Programa de Maestría en Ciencias en Horticultura del Departamento de Fitotecnia, por darme una oportunidad más para seguir con mis estudios de Maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo brindado durante la realización de mis estudios de maestría.

A THE McKNIGHT FOUNDATION por su valioso financiamiento al desarrollo de esta investigación.

Al Dr. Clemente Villanueva Verduzco, por su invaluable dedicación, por su apoyo en mi formación académica y su amistad.

Al Dr. Aureliano Peña Lomelí y al M.C. Fernando Urzúa Soria, por su apoyo y sugerencias hechas al presente trabajo de investigación y su amistad.

A la Ing. Irma Sánchez Cabrera, por su invaluable apoyo en la fase de cultivo de tejidos y valiosa amistad.

Al M.C. Isaías Gil Vázquez, por su gran apoyo y sugerencias durante la fase de cultivo de tejidos realizada en su laboratorio.

A los Técnicos Maximino Ramírez Ayala y J. Vicente Carrillo Solano, por sus valioso apoyo en la fase de campo.

A los grupos once y diecisiete de segundo grado de preparatoria agrícola ciclo escolar 2003-2004 por su apoyo en la fase de campo.

A todos los amigos de la generación por apoyarme para seguir adelante y compartir momentos agradables.

A todos y cada uno de los amigos que siempre estuvieron cerca.

DEDICATORIA

A una gran mujer, mi **MADRE: Abundia Reyes Torres**

Por darme la oportunidad de conocer la vida, cuidado, cariño y porque has dedicado tu vida a nosotros, tu familia, luchando siempre para seguir adelante, por darme aliento hasta obtener este logro que también es tuyo, Muchas gracias Mamá.

A un hombre trabajador e inteligente, de quien estoy orgulloso y que con su ejemplo nos ha inculcado el trabajo y la lucha por nuestros objetivos. Ese hombre que no se vence hasta ver logradas sus metas, a ese hombre que es mi **PADRE: Esteban Bautista Hernández.**

A mis **HERMANOS** con quienes he compartido momentos de la vida. Les agradezco el apoyo que me han brindado. Les deseo una vida plena, llena de éxito y felicidad.

A mis **SOBRINOS:** Flor, Nato, Gely, Yaya, Mario, Benja, David, Daniel, Fer, Arely, Lizbeth y Kary. Quienes dan alegría a la familia. A ustedes les deseo que en un futuro alcancen el éxito en todos los ámbitos de la vida.

A todos mis **AMIGOS.** Gracias por el tiempo que han compartido conmigo, el apoyo que me han dado y sobre todo por su agradable amistad.

Comparto una meta más hacia con ustedes.

Sinceramente

Francisco Bautista Reyes

DATOS BIOGRÁFICOS

El autor, nació en Cuatlimax Tlanchinol Hidalgo, zona de transición entre la Sierra y Huasteca Hidalguense. Al terminar la telesecundaria, ingresó a la Universidad Autónoma Chapingo en 1993, donde realizó sus estudios de Preparatoria y Licenciatura, recibiendo el título de Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia en el año 2000. Tanto la tesis de licenciatura como maestría forman parte del proyecto THE McKNIGHT FOUNDATION conservation of genetic diversity and improvement of crop production in Mexico, a farmer approach. Egresando trabajó en diseño y mantenimiento de jardines en la zona hotelera de Cancún, Quintana Roo, más tarde trabajó apoyando a la Dirección de Desarrollo Rural del Municipio de Acapulco, Guerrero. En el año 2002 ingresó al Programa de Maestría en Ciencias en Horticultura en la Universidad Autónoma Chapingo. Durante su estancia en la Universidad tanto en licenciatura como en maestría obtuvo certificados de conocimiento del Idioma Japonés por parte de la Fundación Japón y la Asociación Internacional de Educación Japón. Actualmente ha sido becado por el Ministro de Educación, Cultura, Deporte, Ciencia y Tecnología del Gobierno Japonés (Monbukagakusho: MEXT) para seguir con sus estudios de Posgrado en la Universidad de Agricultura y Tecnología de Tokyo (TOKYO NOKODAIGAKU) y la Universidad de Agricultura de Tokyo (TOKYO NOGYO DAIGAKU) Japón a partir del mes de abril de 2004.

ÍNDICE

Pág.

ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
2. SELECCIÓN Y MULTIPLICACIÓN <i>in vitro</i> DE CALABAZA (<i>Cucurbita pepo</i> L.)	
RESISTENTE A ATRAZINA, LINURON Y SIMAZINA	2
2.1. RESUMEN	2
2.2. ABSTRACT	3
2.3. INTRODUCCIÓN	4
2.4. MATERIALES Y MÉTODOS	5
2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	9
2.6. CONCLUSIÓN	15
2.7. LITERATURA CITADA.....	16
3. SELECCIÓN Y MICROPROPAGACION DE “CALABAZA DE DULCE” (<i>Cucurbita</i>	
<i>moschata</i> Duch.) RESISTENTE A ATRAZINA, LINURON Y SIMAZINA.....	18
3.1. RESUMEN	18
3.2. ABSTRACT	19
3.3. INTRODUCCIÓN	20
3.4. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
3.6. CONCLUSIÓN	30
3.7. LITERATURA CITADA.....	31

4. SELECCIÓN Y MULTIPLICACIÓN <i>in vitro</i> DE PLANTAS DE CALABAZA PIPIANA	
(<i>Cucurbita argyrosperma</i> Huber var. <i>stenosperma</i>) RESISTENTES A ATRAZINA,	
LINURON Y SIMAZINA.....	33
4.1. RESUMEN	33
4.2. ABSTRACT	34
4.3. INTRODUCCIÓN	35
4.4. MATERIALES Y MÉTODOS	36
4.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
4.6. CONCLUSIÓN	45
4.7. LITERATURA CITADA.....	46
5. RESISTENCIA DE CHILACAYOTE (<i>Cucurbita ficifolia</i> Bouché) A ATRAZINA,	
LINURON Y SIMAZINA Y SU PROPAGACION <i>in vitro</i>	48
5.1. RESUMEN	48
5.2. ABSTRACT	49
5.3. INTRODUCCIÓN	50
5.4. MATERIALES Y MÉTODOS	51
5.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
5.6. CONCLUSIÓN	60
5.7. LITERATURA CITADA.....	61
6. CONCLUSIONES GENERALES	63

ÍNDICE DE CUADROS

SELECCIÓN Y MULTIPLICACIÓN *in vitro* DE CALABAZA (*Cucurbita pepo* L.) RESISTENTE A ATRAZINA, LINURON Y SIMAZINA

Pág.

Cuadro 1. Comparaciones múltiples de medias de cinco variables de calabaza (<i>Cucurbita pepo</i> L.) en respuesta a la aplicación de tres herbicidas selectivos usados en maíz. Chapingo, México. 2003.	13
Cuadro 2. Número y porcentaje de plantas resistentes de calabaza (<i>Cucurbita pepo</i> L.) a herbicidas selectivos usados en maíz. Chapingo, México. 2003.	13

SELECCIÓN Y MICROPROPAGACIÓN DE “CALABAZA DE DULCE” (*Cucurbita moschata* Duch.) RESISTENTE A ATRAZINA, LINURON Y SIMAZINA

Pág.

Cuadro 1. Comparaciones múltiples de medias de cinco variables de “calabaza de dulce” (<i>Cucurbita moschata</i> Duch.) en respuesta a la aplicación de tres herbicidas selectivos usados en maíz. Chapingo, México. 2003.	28
Cuadro 2. Número y porcentaje de plantas resistentes de “calabaza de dulce” (<i>Cucurbita moschata</i> Duch.) a herbicidas selectivos usados en maíz. Chapingo, México. 2003.	29

**SELECCIÓN Y MULTIPLICACIÓN *in vitro* DE PLANTAS DE CALABAZA PIPIANA
(*Cucurbita argyrosperma* Huber var. *stenosperma*) RESISTENTES A ATRAZINA,
LINURON Y SIMAZINA**

Pág.

Cuadro 1. Comparaciones múltiples de medias de cinco variables de calabaza pipiana (<i>Cucurbita argyrosperma</i> Huber var. <i>stenosperma</i>) en respuesta a la aplicación de tres herbicidas selectivos usados en maíz. Chapingo, México. 2003.	43
Cuadro 2. Número y porcentaje de plantas resistentes de calabaza pipiana (<i>Cucurbita argyrosperma</i> Huber var. <i>stenosperma</i>) a herbicidas selectivos usados en maíz. Chapingo, México.2003.	44

**RESISTENCIA DE CHILACAYOTE (*Cucurbita ficifolia* Bouché) A ATRAZINA,
LINURON Y SIMAZINA Y SU PROPAGACIÓN *in vitro***

Pág.

Cuadro 1. Comparaciones múltiples de medias de cinco variables de chilacayote (<i>Cucurbita ficifolia</i> Bouché) en respuesta a la aplicación de tres herbicidas selectivos usados en maíz. Chapingo, México. 2003.	58
Cuadro 2. Número y porcentaje de plantas resistentes de chilacayote (<i>Cucurbita ficifolia</i> Bouché) a herbicidas selectivos usados en maíz. Chapingo, México.2003.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

SELECCIÓN Y MULTIPLICACIÓN *in vitro* DE CALABAZA (*Cucurbita pepo* L.) RESISTENTE A ATRAZINA, LINURON Y SIMAZINA

Pág.

- Figura 1. Porcentaje de germinación en calabaza (*Cucurbita pepo* L.) a los 15 días después de la siembra. Barras con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey con $P \leq 0.05$). Diferencia mínima significativa (DMS %).9
- Figura 2. Dinámica de la altura de planta (a), el número de hojas maduras (b) y el número de hojas inmaduras (c) en calabaza (*Cucurbita pepo* L.). Cada punto representa el promedio de 25 plantas muestreadas por tratamiento. 10
- Figura 3. Dinámica del daño en planta (a) y grosor de hipocotilo (b) en calabaza (*Cucurbita pepo* L.). Cada punto representa el promedio de 25 plantas muestreadas por tratamiento. 12
- Figura 4. Tasa de multiplicación de calabaza (*Cucurbita pepo* L.) en cultivo *in vitro*. 14

SELECCIÓN Y MICROPROPAGACION DE “CALABAZA DE DULCE” (*Cucurbita moschata* Duch.) RESISTENTE A ATRAZINA, LINURON Y SIMAZINA

Pág.

- Figura 1. Porcentaje de germinación en “calabaza de dulce” (*Cucurbita moschata* Duch.) a los 15 días después de la siembra. Barras con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey con $P \leq 0.05$). Diferencia mínima significativa (DMS %). 25

Figura 2. Dinámica de la altura de planta (a), el número de hojas maduras (b) y el número de hojas inmaduras (c) en “calabaza de dulce” (<i>Cucurbita moschata</i> Duch.). Cada punto representa el promedio de 25 plantas muestreadas por tratamiento.....	26
Figura 3. Dinámica del daño en planta (a) y grosor de hipocotilo (b) en “calabaza de dulce” (<i>Cucurbita moschata</i> Duch.). Cada punto representa el promedio de 25 plantas muestreadas por tratamiento.....	27
Figura 4. Tasa de multiplicación de “calabaza de dulce” (<i>Cucurbita moschata</i> Duch.) en cultivo <i>in vitro</i>	30

SELECCIÓN Y MULTIPLICACIÓN *in vitro* DE PLANTAS DE CALABAZA PIPIANA (*Cucurbita argyrosperma* Huber var. *stenosperma*) RESISTENTES A ATRAZINA, LINURON Y SIMAZINA

Pág.

Figura 1. Porcentaje de germinación en calabaza pipiana (<i>Cucurbita argyrosperma</i> Huber var. <i>stenosperma</i>) a los 15 días después de la siembra. Barras con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey con $P \leq 0.05$). Diferencia mínima significativa (DMS %).	40
Figura 2. Dinámica de la altura de planta (a), el número de hojas maduras (b) y el número de hojas inmaduras (c) en calabaza pipiana (<i>Cucurbita argyrosperma</i> Huber var. <i>stenosperma</i>). Cada punto representa el promedio de 25 plantas muestreadas por tratamiento.	41

Figura 3. Dinámica del daño en planta (a) y grosor de hipocotilo (b) en calabaza pipiana (<i>Cucurbita argyrosperma</i> Huber var. <i>stenosperma</i>). Cada punto representa el promedio de 25 plantas muestreadas por tratamiento.....	42
Figura 4. Tasa de multiplicación de calabaza pipiana (<i>Cucurbita argyrosperma</i> Huber var. <i>stenosperma</i>) en cultivo <i>in vitro</i>	44

RESISTENCIA DE CHILACAYOTE (*Cucurbita ficifolia* Bouché) A ATRAZINA, LINURON Y SIMAZINA Y SU PROPAGACION *in vitro*

Pág.

Figura 1. Porcentaje de germinación en chilacayote (<i>Cucurbita ficifolia</i> Bouché) a los 15 días después de la siembra. Barras con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey con $P \leq 0.05$). Diferencia mínima significativa (DMS %).....	55
Figura 2. Dinámica de la altura de planta (a), el número de hojas maduras (b) y el número de hojas inmaduras (c) en chilacayote (<i>Cucurbita ficifolia</i> Bouché). Cada punto representa el promedio de 25 plantas muestreadas por tratamiento.....	56
Figura 3. Dinámica del daño en planta (a) y grosor de hipocotilo (b) en chilacayote (<i>Cucurbita ficifolia</i> Bouché). Cada punto representa el promedio de 25 plantas muestreadas por tratamiento.	57
Figura 4. Tasa de multiplicación de chilacayote (<i>Cucurbita ficifolia</i> Bouché) en cultivo <i>in vitro</i>	60

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

La familia Cucurbitaceae es un grupo vegetal que existe principalmente en las regiones tropicales del mundo. Dentro de esta familia hay 118 géneros y aproximadamente 825 especies (Lira,1995). Varias especies cultivadas y numerosas especies silvestres pertenecientes a géneros de algunas de las subfamilias y tribus de cucurbitacea, han representado parte fundamental de la dieta y otros aspectos de la vida del hombre en todo el mundo. De las especies cultivadas se consumen como verdura sus flores, partes tiernas de guías y frutos tiernos; sus semillas tostadas y molidas se añaden a gran diversidad de platillos y su pulpa madura es consumida como verdura o dulce.

Un factor limitante de principal importancia en el sistema de cultivo maíz- calabaza en asociación, es el control de maleza, el cual se debe realizar mecánicamente debido a que los herbicidas existentes no son compatibles para ambas especies. Esto ha limitado altamente la posibilidad de la siembra de la asociación maíz-calabaza en la agricultura extensiva, provocando la reducción y erosión de los recursos genéticos de calabaza, por lo que seleccionar calabazas resistentes a herbicidas selectivos a maíz puede contribuir a reincorporar la calabaza para su cultivo en asociación. Con base en lo anterior se plantea como objetivo seleccionar plantas de calabaza (*Cucurbita* spp.) resistentes a herbicidas pre-emergentes y selectivos usados en maíz (atrazina, linuron y simazina) y micropropagarlas, con la idea de contribuir a reestablecer la asociación maíz-calabaza con control químico de maleza.

2. SELECCIÓN Y MULTIPLICACIÓN *in vitro* DE CALABAZA (*Cucurbita pepo* L.) RESISTENTE A ATRAZINA, LINURON Y SIMAZINA

F. Bautista-Reyes¹; C. Villanueva-Verduzco²; A. Peña-Lomeli³; F. Urzúa-Soria⁴; J. Sahagún-Castellanos³; L. Channing-Merrick⁵

2.1. RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue obtener y micropropagar germoplasma de calabaza resistente a herbicidas selectivos usados en maíz, con la idea utilizarlos en el sistema asociación maíz-calabaza para el control químico de maleza, uno de los principales problemas en este sistema de cultivo. El diseño usado fue el completamente al azar, con cuatro tratamientos: atrazina (1800 g i.a. ha⁻¹), linuron (1250 g i.a. ha⁻¹), simazina (1800 g i.a. ha⁻¹) y un testigo, con 30, 10, 30 y 5 repeticiones respectivamente. Las variables estudiadas fueron; porcentaje de germinación, altura de planta, número de hojas maduras, número de hojas inmaduras, grosor de hipocotilo, porcentaje de daño, porcentaje de plantas resistentes y tasa de multiplicación *in vitro*. Se logró obtener plantas resistentes a atrazina (2.072%), linuron (0.264%) y simazina (1.231%) y fueron autopolinizadas artificialmente. La tasa promedio de reproducción en cultivo *in vitro* fue de 3.42 plantas por explante por periodos de 21 días usando medio MS.

PALABRAS CLAVE: cucurbitáceas, herbicidas, resistencia, cultivo de tejidos.

¹ Resumen de la tesis que presenta el autor como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Horticultura.

² Director de tesis: Profesor-Investigador de tiempo completo del Depto. de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo (UACH). Chapingo, México. C.P. 56230

³ Asesor de tesis: Profesor-Investigador de tiempo completo del Depto. de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo (UACH). Chapingo, México. C.P. 56230

⁴ Asesor de tesis: Profesor-Investigador de tiempo completo del Depto. de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo (UACH). Chapingo, México. C.P. 56230

⁵ Agronomy Department, Iowa State University, U.S.A.

SELECTION AND MULTIPLICATION *in vitro* OF RESISTANT SQUASH (*Cucurbita pepo* L.) TO ATRAZINE, LINURON AND SIMAZINE

2.2. ABSTRACT

The objective of this work was to obtain and to micropropagate squash germplasm (*C. pepo* L.) resistant to selective herbicides used in maize, with the idea to be used under the maize-squash association system with chemical weed control, a main problem in this crop system. The experimental design was completely randomized, with four treatments: atrazine (1800 g a.i. ha⁻¹), linuron (1250 g a.i. ha⁻¹), simazine (1800 g a.i. ha⁻¹) and a control, with 30, 10, 30 and 5 replications, respectively. The variables studied were: germination percentage, plant height, number of mature leaves, number of immature leaves, hypocotyle thickness, percentage of damage, percent of resistant plants and propagation rate under *in vitro* culture. Plants resistant to atrazine (2.072%), linuron (0.264%) and simazine (1.231%) were obtained and were artificially autopollinated. The average propagation rate under *in vitro* culture was 3.42 plants per explant for periods of 21 days using MS medium.

KEY WORDS: cucurbitacea, herbicides, resistance, tissue culture.

2.3. INTRODUCCIÒN

La diversidad genética de calabazas es muy amplia en México, principalmente en especies, forma, tamaño, color de fruto, cantidad de semilla, calidad y grosor de pulpa, tolerancia a enfermedades y precocidad, entre otras características (Montes, 1991).

Los avances en la ingeniería genética de plantas han permitido la transferencia por métodos moleculares de características de importancia agronómica tales como resistencia a virus, a insectos, y a herbicidas. La resistencia a herbicida puede ser lograda por tres diferentes mecanismos: sobreproducción de un sitio bioquímico sensible al herbicida; alteración estructural de un punto bioquímico, resultando en una reducida afinidad con el herbicida; o degradación-destoxificación del herbicida antes de que alcance el sitio bioquímico clave dentro de la célula de la planta (Stalker *et al.*, 1988).

La evolución hacia la resistencia en respuesta a la presión de selección del herbicida es influenciada por varios factores: la naturaleza de cada herbicida, maleza, y mezcla resistente que influirán en gran medida la efectividad de la estrategia de manejo del cultivo (Christoffers, 1999). De Prado *et al.* (1989) en especies de *Chenopodium album*, *Conyza bonariensis* y *Setaria glauca* aplicaron 5 kg de i.a. ha⁻¹ de atrazina o simazina, y realizaron ensayos en la reacción de Hill, donde resultó que algunos biotipos mostraron alta resistencia a atrazina y simazina. Sobre la resistencia de *Poa annua* L. a simazina y diuron, Steven *et al.* (1999) encontraron que secuenciando una porción del gene *psbA* del cloroplasto detectaron una mutación de la serina 264 a glicina, la cual reduce la afinidad del herbicida triazina en el punto de unión de Q_B en la proteína D1 en el fotosistema II.

A pesar que México es uno de los principales poseedores de diversidad genética, no ha sido capaz de generar sus variedades de calabaza (*Cucurbita pepo* L.), más acordes a las necesidades de los agricultores en sus diferentes regiones agrícolas. Así en el presente trabajo se planteó como objetivo satisfacer una de las necesidades existentes en diferentes lugares del país, donde se siembra maíz-calabaza en asociación y existe el problema del control químico de maleza con herbicidas (atrazina, linuron y simazina), debido a que no son selectivos para ambas especies. Al seleccionar plantas de calabaza (*C. pepo* L.) resistentes a estos herbicidas y usando la técnica de cultivo de tejidos, se podrá disponer de semilla de materiales resistentes en corto tiempo.

2.4. MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de plantas resistentes

Siembra

El experimento se estableció bajo el diseño completamente al azar el día 21 de febrero del año 2003, en un invernadero de la Universidad Autónoma Chapingo, localizado a 19°29' de latitud norte y 98°53' de longitud oeste a una altura de 2250 msnm, con un clima Cb(wo)(i')g, que es templado subhúmedo, temperatura media anual de 15.2°C, con lluvias en verano y una precipitación media anual de 636.5 mm (García, 1988).

Se utilizó germoplasma de calabaza (*Cucurbita pepo* L.) del cuarto ciclo de selección familiar combinada de medios hermanos maternos (SFCMHM4-2001) en una población denominada intercolectas, porque proviene de la recombinación de 120 colectas realizadas en la Sierra Norte de Puebla y Valle de Chalco, Estado de México.

Tratamientos

Cuatro tratamientos fueron aplicados: Atrazina 1800 g i.a. ha⁻¹(Gesaprim®); Linuron 1250 g i.a. ha⁻¹(Lorox 50 DF®); Simazina 1800 g i.a. ha⁻¹(Simanex 50SC®) y Testigo. Se utilizaron 30, 10, 30 y 5 repeticiones respectivamente, debido a que se esperaba un bajo porcentaje de plantas resistentes y a que no se disponía de la misma cantidad de semilla. La unidad experimental (UE) fue una charola de plástico, donde se sembraron 200 semillas. Las dimensiones de las charolas fueron de 45 X 35 X 11cm, y se usaron sin perforaciones para evitar pérdidas del herbicida. A cada contenedor se le adicionaron en promedio 850 g de Peat-Moss®, con pH de 5.8, alcanzando una profundidad de 8 cm en la charola. Previo a la siembra, la semilla se desinfectó con hipoclorito de sodio al 5% (v/v) por 15 minutos, se enjuagó tres veces con abundante agua y ya escurrida, se sembró en surquillos colocando las semillas en posición vertical con el extremo más delgado hacia abajo conservando la misma posición, profundidad y distancia.

Riegos.

Ya sembrado, se dio un riego a capacidad de campo (CC) y con una aspersora manual se aplicó el herbicida en húmedo usando una boquilla tipo abanico plano Teejet 8004. El sustrato se mantuvo a 85% de la CC. Durante los primeros 15 días, se regó con agua proveniente de pozo; del día 16 al 30 se regó con una solución nutritiva tipo Steiner (1984) al 50% y posteriormente la misma solución, pero al 100%.

Transplante

Las plantas resistentes se transplantaron en campo abierto a los 67 días después de la siembra (28 de abril de 2003), en surcos separados a una distancia de 1.5 m. Al

momento del transplante a cada planta se le dejó el sustrato que contenía en la charola para que continuara presente y haciendo efecto el herbicida.

Manejo del cultivo

A cada planta se le aplicaron 100 g de fertilizante Triple-17® a los 15 días después del transplante. Durante el ciclo del cultivo se presentaron dos granizadas severas, por lo que después de cada granizada a cada planta se le aplicaron 1.5 kg de vermicomposta para lograr la recuperación y un número aceptable de frutos por planta. En adelante los deshierbes se realizaron manualmente. Todas las flores femeninas de las plantas fueron autopolinizadas artificialmente, para fijar la característica de resistencia a las siguientes generaciones, y cubiertas con bolsas de glacyne para evitar la contaminación con polen externo, ya fuera por insectos o el viento.

Las variables evaluadas fueron: porcentaje de germinación a los 15 días después de la siembra (DDS); altura de planta (cm), número de hojas maduras, número de hojas inmaduras y grosor de hipocotilo a los 15, 30 y 45 DDS (cm); porcentaje de daño, que se evaluó en 25 plantas por unidad experimental utilizando una escala adaptada de la fórmula para calificación visual de Scott y Hollins (1974); porcentaje de plantas resistentes, aquellas que sobrevivieron al final de cada tratamiento, y tasa reproductiva *in vitro* cada 21 días después de haberse sembrado los explantes en medio de cultivo en el laboratorio.

Los resultados se analizaron con el programa estadístico SAS (Statistical Analysis System).

Multiplicación *in vitro*

Obtención de explantes

De las plantas resistentes se obtuvieron explantes a partir de las puntas tiernas de las plantas para llevarlas al laboratorio de cultivo de tejidos.

Desinfección

En el laboratorio de cultivo de tejidos, a las puntas tiernas de las plantas resistentes se les cortaron las hojas y se lavaron en agua jabonosa y se les enjuagó con agua corriente limpia durante 30 minutos. Luego se sumergieron en una solución con $1 \text{ g}\cdot\text{litro}^{-1}$ de cada uno de los fungicidas Benlate®, Captán® y Tecto 60® por 45 minutos. El material se llevó a la campana de flujo laminar y ahí se colocó en una solución de hipoclorito de sodio al 10 % (v/v) adicionado con 20 gotas de Microdín® y 2 gotas de Tween 20® durante 10 minutos. Después se le cambió a una solución de peróxido de hidrógeno al 3% durante 30 minutos. Al final se enjuagó tres veces con agua esterilizada, quedando estériles y listos para la siembra.

Medio de cultivo

El medio de cultivo básico usado fue el de Murashige y Skoog (1962) (MS) suplementado con 3% de sacarosa, solidificándolo con $6 \text{ g}\cdot\text{litro}^{-1}$ de agar, ajustando el pH a 5.7 ± 0.1 con soluciones de HCl 1N y 0.1N; NaOH 1N y 0.1N en caso de requerirse un ajuste grande y pequeño, respectivamente. El medio de cultivo se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a $15 \text{ lb}\cdot\text{pulg}^{-2}$ a 121° C .

Siembra *in vitro*

Al material estéril se le cortaron las hojas. Se usaron como explantes las yemas laterales tiernas con un segmenteo de tallo de 1 cm de longitud. Una vez terminada la siembra de explantes en los frascos, haciendo uso de la campana de flujo laminar,

éstos se incubaron a un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, a temperatura de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Cada 21 días se realizaron subcultivos usando el mismo medio de cultivo, hasta que de las yemas desarrollaron brotes de una altura promedio de 4 cm (3 yemas laterales además de la yema apical). De esta manera se multiplicaba el número de yemas que luego se sometían a multiplicación.

2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Germinación. Los resultados obtenidos reflejaron que ninguno de los herbicidas aplicados (atrazina, linuron y simazina) interfirió la germinación, ya que no existieron diferencias estadísticas entre tratamientos (Figura 1). Esto era de esperarse debido a que su modo de acción es inhibiendo el flujo de electrones en la fotosíntesis y las plantas mueren por ser incapaces de fotosintetizar (Xiong, *et al.*, 1998), siendo claro que estos herbicidas no interfieren la germinación y por lo tanto no afectan a las plántulas mientras estas dependan exclusivamente de las reservas de la semilla, pero si las afectan a partir de que deben sintetizar sus propios alimentos.

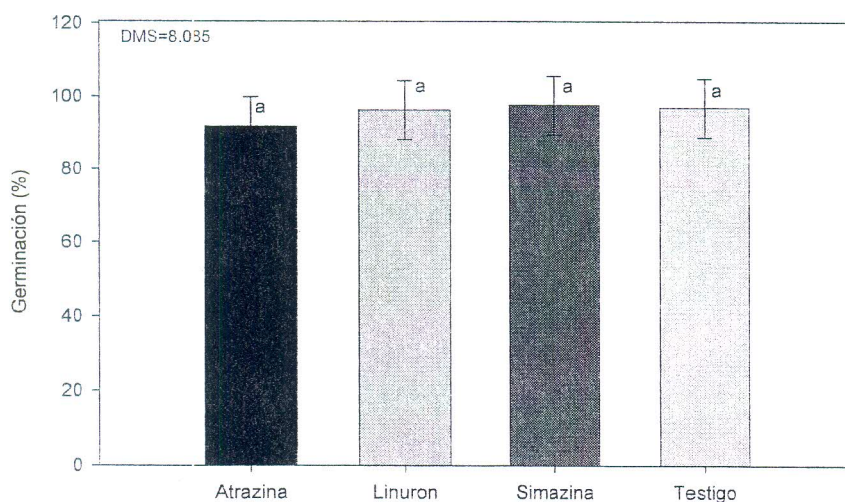


Figura 1. Porcentaje de germinación en calabaza (*Cucurbita pepo* L.) a los 15 días después de la siembra. Barras con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey con $P \leq 0.05$). Diferencia mínima significativa (DMS %).

Crecimiento. En la Figura 2 se observa el comportamiento de las variables altura de planta, número de hojas maduras y número de hojas inmaduras.

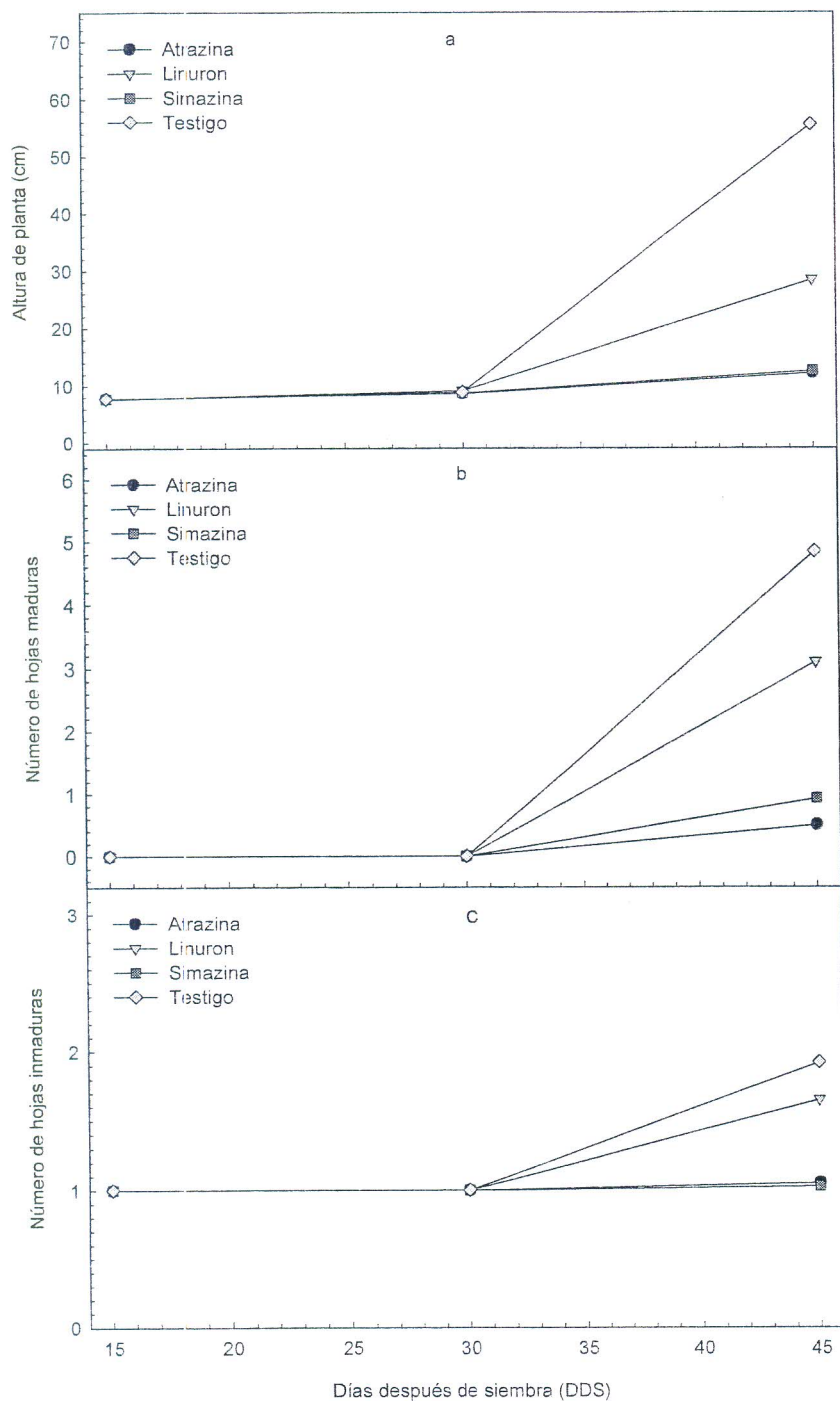


Figura 2. Dinámica de la altura de planta (a), el número de hojas maduras (b) y el número de hojas inmaduras (c) en calabaza (*Cucurbita pepo* L.). Cada punto representa el promedio de 25 plantas muestreadas por tratamiento.

En los primeros 15 y 30 días, los tratamientos fueron iguales sobre el crecimiento vegetativo en congruencia con lo encontrado por Remer y Kropff (1999) en *Solanum nigrum*.

En altura de planta y número de hojas maduras e inmaduras el mayor daño lo ocasionaron la atrazina y simazina porque indujeron plantas más pequeñas, las cuales mostraron los daños a partir de los primeros 30 días. El daño se hizo visible a los 45 días después de la siembra, siendo en esa fecha cuando existió mayor diferencia entre los tratamientos.

Al analizar el porcentaje de daño en plantas y el grosor que alcanzó el hipocotilo, se observa (Figura 3) que el daño más severo y rápido lo ocasionaron la atrazina y la simazina. El daño con linuron progresó más lentamente pero al final del experimento todos los herbicidas causaron la muerte de las plantas. El grosor de hipocotilo a los 45 días en el tratamiento con linuron fue mayor. Esto pudo deberse a que las plantas sobrevivientes en la primera etapa detuvieron su crecimiento para tratar de recuperarse de los daños causados por el herbicida (Siminszky *et al.*, 2000), acumulando carbohidratos en sus partes basales, pero al final casi todas murieron. Las plantas resistentes continuaron su crecimiento y el engrosamiento del hipocotilo normalmente, similar al testigo, debido a que siguieron usando sus fotosintatos para un crecimiento sin alteraciones. La simazina y la atrazina ocasionaron el mayor daño en plántulas, pues éstas presentaron el menor grosor de tallo a los 45 días de la simazina (Figura 3).

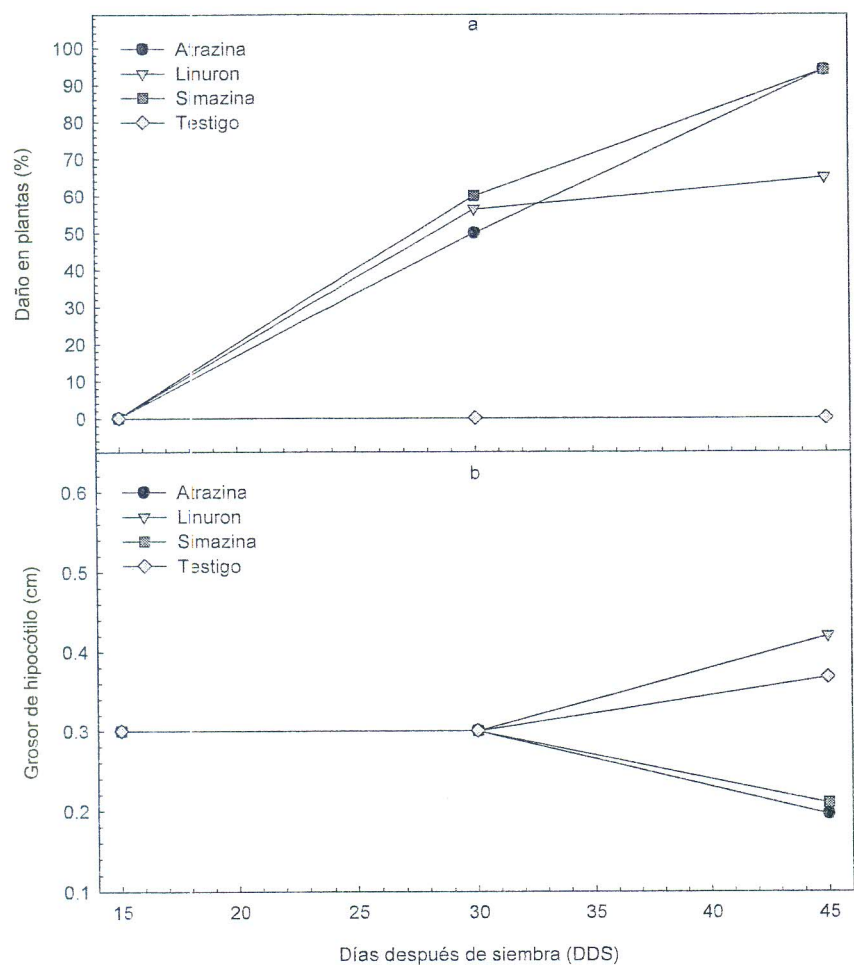


Figura 3. Dinámica del daño en planta (a) y grosor de hipocotilo (b) en calabaza (*Cucurbita pepo* L.). Cada punto representa el promedio de 25 plantas muestreadas por tratamiento.

En general, se aprecia que durante los primeros 30 días el crecimiento vegetativo de las plantas resistentes y susceptibles es similar, lo que es consistente con lo encontrado por Darmency *et. al.* (1992) en especies resistentes a atrazina de *Chenopodium album*, *Brassica napus* y *Setaria italica*, donde no hubo diferencias en estado de plántula.

La atrazina y la simazina causaron daño similar a los 45 días; mientras que el daño del linuron fue más paulatino (Cuadro 1).

Cuadro 1. Comparaciones múltiples de medias de cinco variables de calabaza (*Cucurbita pepo* L.) en respuesta a la aplicación de tres herbicidas selectivos usados en maíz. Chapingo, México. 2003.

Tratamiento	Altura de planta (cm)	Número de hojas maduras	Número de hojas inmaduras	Grosor de hipocotilo (cm)	Daño (%)
Atrazina 1800 g i.a. ha ⁻¹	12.15 c ^z	0.50 c	1.05 c	0.20 b	94.0 a
Linuron 1250 g i.a. ha ⁻¹	28.32 b	3.10 b	1.65 b	0.42 a	56.4 b
Simazina 1800 g i.a. ha ⁻¹	12.49 c	0.92 c	1.02 c	0.21 b	94.0 a
Testigo	55.46 a	4.84 a	1.92 a	0.37 a	0.0 c
DMS	6.89	0.61	0.23	0.08	6.02

^z Valores con la misma letra dentro de columnas son estadísticamente iguales de acuerdo con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).
DMS: Diferencia mínima significativa.

Presencia de resistencia. Los herbicidas fueron un intenso agente selectivo. La variabilidad genética para la respuesta a los tres herbicidas manifestó la existencia de resistencia genética en la población. Estos resultados respaldan a lo establecido por Diggle y Neve (2001) en el sentido que la velocidad de la evolución de la resistencia a los herbicidas depende de la dinámica de la población en presencia del herbicida. La atrazina es el herbicida más usado en maíz, seguido de la simazina y el linuron. En ese orden decreciente resultó el porcentaje de resistencia, siendo en atrazina 41% mayor que en simazina y este a su vez un 41% más alto que en linuron (Cuadro 2).

Cuadro 2. Número y porcentaje de plantas resistentes de calabaza (*Cucurbita pepo* L.) a herbicidas selectivos usados en maíz. Chapingo, México. 2003.

Tratamiento	Dosis (g i.a. ha ⁻¹)	Semillas tratadas	Semillas germinadas	Número de plantas resistentes	Plantas resistentes (%)
Atrazina	1800	7000	6419	133	2.072
Linuron	1250	2000	1924	7	0.364
Simazina	1800	7000	6825	84	1.231
Testigo	-	1000	968	-	-

Las plantas resistentes fueron autopolinizadas con el propósito de fijar los genes de resistencia y estar en posibilidades de estudiar sus generaciones avanzadas. Algo similar a lo realizado en *Chenopodium album* (Bettini *et al.*, 1987), donde pocas plantas sobrevivientes fueron autopolinizadas y en su descendencia se encontraron plantas resistentes a altas concentraciones de atrazina (mayor a $40 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$), a las que se les encontró la mutación *psbA* en el aminoácido 264.

Tasa de multiplicación *in vitro*.

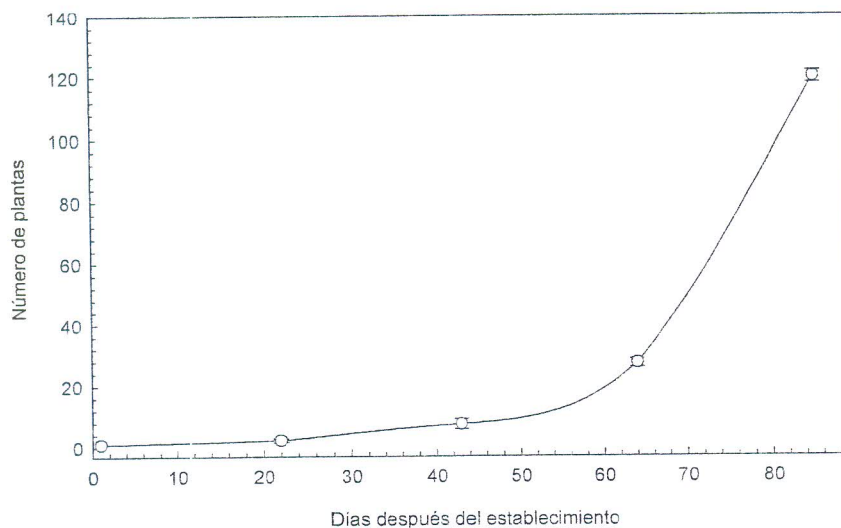


Figura 4. Tasa de multiplicación de calabaza (*Cucurbita pepo* L.) en cultivo *in vitro*.

Las plantas resistentes se propagaron *in vitro* y la tasa de multiplicación (Figura 4) fue de 2.2, 3.4, 3.7 y 4.4 plantas por explante durante el 1er, 2do, 3er y 4to subcultivo, respectivamente, teniendo como promedio 3.42 plantas por explante por periodo de 21 días, independientemente del herbicida al que haya resultado resistente. Con ello se puede proyectar la cantidad de plantas a obtener en un determinado tiempo, para programar el incremento de semilla de plantas resistentes, con fines de uso comercial, en el sistema de asociación maíz-calabaza, o para usarse como fuente de resistencia en programas de mejoramiento genético de calabaza (*C. pepo* L.).

2.6. CONCLUSIÓN

Se obtuvieron plantas de calabaza (*Cucurbita pepo* L.) resistentes a herbicidas, con 2.072, 0.364 y 1.231 %, para atrazina, linuron y simazina, respectivamente. A través del cultivo de tejidos fue posible micropropagar las plantas resistentes a una tasa promedio de multiplicación de 3.42 plantas por explante por periodo de 21 días.

2.7. LITERATURA CITADA

- BETTINI, P.; MCNALLY, S.; SEVIGNAC, M.; DARMENCY, H.; GASQUEZ, J.; DRON M. 1987. Atrazine resistance in *Chenopodium album*. Low and high levels of resistance to the herbicide related to the same chloroplast *psbA* gene mutation. *Plant Physiology*, 84:1442-1446.
- CHRISTOFFERS, M. 1999. Genetic aspects of herbicide-resistant weed management. *Weed Technology* 13:647-652.
- DARMENCY, H.; CHAUVEL, B.; GASQUEZ, J.; MATEJICEK, A. 1992 Variation of chlorophyll *a/b* ratio in relation to population polymorphism and mutation of triazine-resistance. *Plant Physiology Biochemistry* 30(1):57-63.
- DE PRADO, R.; DOMÍNGUEZ, C.; TENA, M. 1989. Characterization of triazine-resistant biotypes of common lambsquarters (*Chenopodium album*), Hairy fleabane (*Conyza bonaerensis*), and yellow foxtail (*Setaria glauca*) found in Spain. *Weed Science* 37:1-4.
- DIGGLE, A.; NEVE, P.; SMITH, F. 2003. Herbicides used in combination can reduce the probability of herbicide resistance in finite weed populations. *Weed Research* 43:371-382.
- GARCIA, M. E. 1988. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen. 4ta edición. Instituto de Geografía. UNAM. México. 219p.
- LIRA S., R. 1995. Estudios Taxonómicos y Ecogeográficos de las Cucurbitaceae Latinoamericanas de Importancia Económica. Instituto de Biología. UNAM. México. 241 p.

- MONTES H., S. 1991. Calabazas (*Cucurbita spp.*). pp. 239-250. In: Avances en el Estudio de los Recursos Fitogenéticos de México. Ed Ortega P., Palomino H., R. Castillo G., F., González H., V. A. y Livera M., M. Sociedad Mexicana de Fitogenética. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México.
- MURASHIGE, T; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant* 15:473-497.
- REMER, E. K.; KROPFF, M. J. 1999. Comparative growth of triazine-susceptible and resistant biotypes of *Solanum nigrum* at different light levels. *Annals of Botany* 83:637-644.
- SCOTT, P. R.; HOLLINS, T. W. 1974. Effects of eyespot on the yield of winter wheat. *Annals of Applied Biology* 78:269-279.
- SIMINSZKY, B.; SHELDON, B. S.; CORBIN, F. T.; DEWEY, R. E. 2000. A cytochrome P450 monooxygenase cDNA (CYP71A10) confers resistance to linuron in transgenic *Nicotiana tabacum*. *Weed Science* 48:291-295.
- STALKER, D. M.; McBRIDE, K. E; MALYJ, L. D. 1988. Herbicide resistance in transgenic plants expressing a bacterial detoxification gene. *Science* 242:419-423.
- STEINER, A. A. 1984. The universal nutrient solution. *Proceedings International Congress on Soilless Culture* 6:633-650.
- STEVEN, T.; NELLY, G.; EUDEL, C., ; DAWN S., L. 1999. Mode of resistance of triazine-resistant annual bluegrass (*Poa annua* L.). *Weed Technology* 13:747-752.
- XIONG, J.; SUBRAMANIAN, S.; GOVINDJEE. 1998. A knowledge-based three dimensional model of the photosystem II reaction center of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynthesis Research* 56:229-254.

3. SELECCIÓN Y MICROPROPAGACION DE “CALABAZA DE DULCE” (*Cucurbita moschata* Duch.) RESISTENTE A ATRAZINA, LINURON Y SIMAZINA

F. Bautista-Reyes¹; C. Villanueva-Verduzco²; A. Peña-Lomelí³; F. Urzúa-Soria⁴; J. Sahagún-Castellanos³; L. Channing-Merrick⁵

3.1. RESUMEN

Este estudio se realizó con el objetivo de obtener e incrementar plantas de calabaza resistentes a herbicidas selectivos usados en maíz, para hacer posible el cultivo en asociación maíz-calabaza con control químico de maleza. Se utilizó el diseño experimental completamente al azar, con cuatro tratamientos: atrazina (1800 g i.a. ha⁻¹), linuron (1250 g i.a. ha⁻¹), simazina (1800 g i.a. ha⁻¹) y un testigo, con 10, 10, 10 y 5 repeticiones, respectivamente. Las variables evaluadas fueron: porcentaje de germinación, altura de planta, número de hojas maduras, número de hojas inmaduras, grosor de hipocotilo, porcentaje de daño, porcentaje de plantas resistentes y tasa de multiplicación *in vitro*. Se obtuvo un 0.418%, 0.104% y 0.153% de plantas resistentes a atrazina, linuron y simazina, respectivamente, mismas que fueron autopolinizadas. La tasa promedio de multiplicación *in vitro* fue de 2.9 plantas por explante por periodo de 21 días, usando medio MS.

PALABRAS CLAVE: herbicidas, resistencia, maíz-calabaza, cultivo de tejidos, micropropagación.

¹ Resumen de la tesis que presenta el autor como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Horticultura.

² Director de tesis: Profesor-Investigador de tiempo completo del Depto. de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo (UACH). Chapingo, México. C.P. 56230

³ Asesor de tesis: Profesor-Investigador de tiempo completo del Depto. de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo (UACH). Chapingo, México. C.P. 56230

⁴ Asesor de tesis: Profesor-Investigador de tiempo completo del Depto. de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo (UACH). Chapingo, México. C.P. 56230

⁵ Agronomy Department. Iowa State University. U.S.A.

SELECTION AND MICROPROPAGATION OF RESISTANT “CALABAZA DE DULCE” (*Cucurbita moschata* Duch.) TO ATRAZINE, LINURON AND SIMAZINE

3.2. ABSTRACT

This work was carried out with the aim to obtain and to increase resistant squash plants to selective maize herbicides, in order to make possible maize-squash association with chemical weed control. The experimental design was completely randomized, with four treatments: atrazine (1800 g a.i. ha⁻¹), linuron (1250 g a.i. ha⁻¹), simazine (1800 g a.i. ha⁻¹) and a control; with 10, 10, 10 and 5 replications, respectively. The variables analyzed were: germination percentage, plant height, number of mature leaves, number of immature leaves, hypocotyle thickness, percentage of damage, percent of resistant plants and propagation rate *in vitro* culture. There were obtained 0.418%, 0.104% and 0.153% plants resistant to atrazine, linuron and simazine respectively, and samely were autopollinated. The average multiplication rate *in vitro* was 2.9 plants per explant for periods of 21 days, using MS medium.

KEY WORDS: herbicides, resistance, maize-squash, tissue culture, micropropagation

3.3. INTRODUCCIÓN

El cultivo de la calabaza ha tenido primordial importancia en el desarrollo de las primeras civilizaciones de América, siendo muy popular en México y en la mayoría de los países americanos donde existen variedades criollas para cada región (Pérez *et al.*, 1997). Esto ha sido posible porque un mismo cultivar, al desarrollarse en distintas áreas, puede mostrar diferentes respuestas de crecimiento local (Robinson y Decker-Walters, 1997).

El control químico de maleza en el cultivo de maíz se ha convertido una práctica cotidiana, ya sea en aplicación preemergente o postemergente (Lemieux *et al.*, 2003).

Solymosi y Kostyal (1985) encontraron que el *Amaranthus retroflexus* L. resistente a atrazina parece estarse extendiendo tanto en cultivos de maíz, como alrededor de este, en cultivos rotativos y aún en caminos y áreas rurales. Es sabido que después de un periodo de 7 años de aplicar triazinas en maíz en monocultivo se puede encontrar hasta un 81% de individuos maleza resistentes. Ryan (1970) demostró que plántulas de *Senecio vulgaris* L. obtenidas de semilla colectada de campos donde se había aplicado atrazina y simazina una o dos veces al año por un periodo de 10 años, no se controlaron con atrazina y simazina a dosis de 17.92 kg.ha⁻¹ en preemergencia. Mediante la secuenciación de una porción del gene *psbA* del cloroplasto, se estableció que la resistencia de *Poa annua* L. a simazina y diuron se debe a una mutación de la serina 264 a glicina, el cual reduce la afinidad de los herbicidas triazina en el punto de unión de Q_B en la proteína D1 en el fotosistema II (Steven *et al.*, 1999).

Dada la enorme variabilidad genética de calabazas disponible a México, se planteó como objetivo obtener plantas de “calabaza de dulce” (*Cucurbita moschata* Duch.) resistentes a atrazina, linuron y simazina; y clonarlas mediante de cultivo de tejidos para

incrementar la cantidad de semilla en poco tiempo y con ello poderlas reincorporar al cultivo de la asociación maíz-calabaza con control químico de maleza.

3.4. MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de plantas resistentes

Siembra

El experimento se estableció el día 21 de febrero del año 2003, en un invernadero ubicado en el campus sede de la Universidad Autónoma Chapingo, localizado a los 19°29' de latitud norte y 98°53' de longitud oeste, a una altura de 2250 msnm, con un clima Cb(wo)(i')g, que es templado subhúmedo, con temperatura media anual de 15.2°C, con lluvias en verano y una precipitación media anual de 636.5 mm (García, 1988).

Se utilizó semilla de calabaza (*Cucurbita moschata* Duch.) de una población con cuatro ciclos de adaptación (selección natural) a las condiciones de Chapingo, constituidas originalmente por la recombinación genética de 38 colectas provenientes de Guanajuato, Michoacán, Yucatán, Campeche, Veracruz y Oaxaca.

Tratamientos

El diseño experimental fue completamente al azar con cuatro tratamientos: Atrazina 1800 g i.a. ha⁻¹(Gesaprim®), Linuron 1250 g i.a. ha⁻¹(Lorox 50 DF®), Simazina 1800 g i.a. ha⁻¹(Simanex 50SC®) y Testigo, con 10, 10, 10 y 5 repeticiones, respectivamente. Se utilizó una charola de plástico de 45 X 35 X 11cm, sin perforaciones para evitar pérdidas del herbicida como unidad experimental (UE), se sembraron 200 semillas por contenedor. A cada charola se le adicionaron en promedio 850 g de Peat-Moss®, con pH de 5.8, con lo que alcanzó un espesor de 8 cm en la charola. Antes de la siembra, la

semilla se trató con hipoclorito de sodio al 5% (v/v) durante 15 minutos; se enjuagó tres veces con abundante agua y se dejó escurrir. Las semillas se sembraron dejando el extremo más delgado hacia la parte inferior en surquillos equidistantes en los sentidos longitudinal y transversal.

Riegos.

Después de la siembra se regó a capacidad de campo (CC) y con una aspersora manual se aplicó el tratamiento correspondiente de herbicida, usando una boquilla tipo abanico plano Teejet 8004. El sustrato se mantuvo a 85% de la CC. Durante los primeros 15 días, se regó con agua proveniente de pozo; del día 16 al 30 se regó con una solución nutritiva tipo Steiner (1984) al 50% y posteriormente se usó la misma solución al 100%.

Transplante

Una vez que las plantas seleccionadas en invernadero por resistencia aportaron sus explantes para cultivo *in vitro*, se llevaron a campo abierto a los 67 días después de la siembra (28 de abril de 2003), donde se transplantaron en surcos separados a 1.5 m, dejándoles una parte del sustrato para que continuara haciendo efecto el herbicida.

Manejo del cultivo

Se aplicó 100 g de fertilizante Triple-17® a cada planta, a los 15 días después del trasplante. Después de cada una de dos granizadas severas que se presentaron durante el ciclo del cultivo, se aplicaron 1.5 kg de vermicomposta por planta, para obtener un número aceptable de frutos. El cultivo se mantuvo mecánicamente libre de maleza. Todas las flores femeninas de las plantas fueron autopolinizadas artificialmente para fijar la característica de resistencia a las siguientes generaciones, y cubiertas con bolsas de glacyne para evitar contaminación de polen externo por insectos o el viento.

Las variables evaluadas fueron: porcentaje de germinación a los 15 días después de la siembra (DDS); altura de planta (cm), número de hojas maduras, número de hojas inmaduras y grosor de hipocotilo a los 15, 30 y 45 DDS (cm); porcentaje de daño, que se evaluó en una muestra aleatoria de 25 plantas por unidad experimental utilizando una escala adaptada de la fórmula para calificación visual de Scott y Hollins (1974); y porcentaje de plantas resistentes, registrada como las plantas que sobrevivieron al final de cada tratamiento y que completaron su ciclo de vida y produjeron fruto maduro y semilla. De estas plantas se obtuvieron explantes para multiplicar *in vitro* e incrementar en laboratorio el número de plantas resistentes y la semilla cosechable a partir de la fuente original de resistencia.

Para el análisis de los resultados, se utilizó el programa estadístico SAS (Statistical Analysis System).

Multiplicación *in vitro*

Obtención de explantes

De las plantas resistentes conseguidas y crecidas en invernadero se obtuvieron segmentos apicales de 10 cm, se les quitaron las hojas y se llevaron a micropropagación en el laboratorio de cultivo de tejidos.

Desinfección

Otras puntas tiernas de las plantas resistentes transplantadas en el campo, también se usaron como explantes para propagarlas, las cuales primero se lavaron en agua jabonosa (60 minutos) y se les enjuagó con agua corriente limpia por 30 minutos y al final se enjugaron con agua destilada. Después se sumergieron en una solución preparada con $1 \text{ g} \cdot \text{litro}^{-1}$ de cada uno de los fungicidas Benlate®, Captán® y Tecto 60® durante 60 minutos, llevando el material a la campana de flujo laminar donde se

transfirió a peróxido de hidrógeno al 10% por 10 minutos, y luego en una solución de hipoclorito de calcio al 5 % adicionado con antioxidante (ac. cítrico $150 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$ + ac. ascórbico $100 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$) y 2 gotas de Tween 20® por 10 minutos. Al final se enjuagaron con agua esterilizada por tres veces, quedando los explantes estériles y listos para la siembra.

Medio de cultivo

El medio de cultivo básico fue el de Murashige y Skoog (1962) (MS) suplementado con 3% de sacarosa, solidificándolo con $6 \text{ g}\cdot\text{litro}^{-1}$ de agar, a pH de 5.7 ± 0.1 regulado con soluciones de HCl 1N y 0.1N; NaOH 1N y 0.1N según fuera requerido un ajuste grande y pequeño, respectivamente. Antes de la siembra el medio de cultivo se esterilizó en una autoclave durante 20 minutos a $15 \text{ lb}\cdot\text{pulg}^{-2}$ a 121° C .

Siembra *in vitro*

Al material esterilizado sin hojas se le cortaron las yemas y ápices para sembrarse en medio de cultivo. Una vez realizada la siembra de explantes en los frascos, éstos se incubaron a un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, a $26 \pm 2^\circ \text{ C}$, para lograr el desarrollo y alargamiento de un brote a partir de cada yema (explante) sembrada. Después, para obtener yemas nuevas a partir de los brotes alargados, cada 21 días se realizaron subcultivos usando el mismo medio de cultivo.

3.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Germinación. Se encontró que ninguno de los herbicidas aplicados (atrazina, linuron y simazina) interfirió con la germinación debido a que no hubo diferencia estadística entre tratamientos (Figura 1). Esto era de esperarse ya que su modo de acción es inhibiendo el flujo de electrones en la fotosíntesis y las plantas mueren por ser incapaces de fotosintetizar (Xiong, *et al.*, 1998), siendo claro que estos herbicidas no interfieren la germinación y por lo tanto no afectan a las plántulas mientras estas dependan exclusivamente de las reservas de la semilla, pero si las dañan a partir de que deben sintetizar sus propios alimentos.

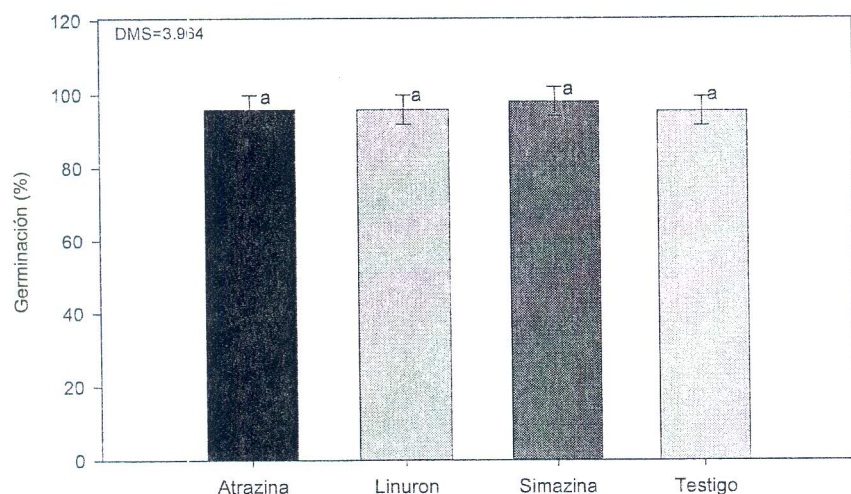


Figura 1. Porcentaje de germinación en “calabaza de dulce” (*Cucurbita moschata* Duch.) a los 15 días después de la siembra. Barras con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey con $P \leq 0.05$). Diferencia mínima significativa (DMS %).

Crecimiento. Al analizar las variables altura de planta, número de hojas maduras y número de hojas inmaduras (Figura 2), se observa que el comportamiento fue similar para los diferentes tratamientos en estado de plántula durante los primeros 15 y 30

días, resultado que fue parecido al encontrado por Darmency *et al.* (1992) en especies de *Brassica napus*, *Setaria italica* y *Chenopodium album*.

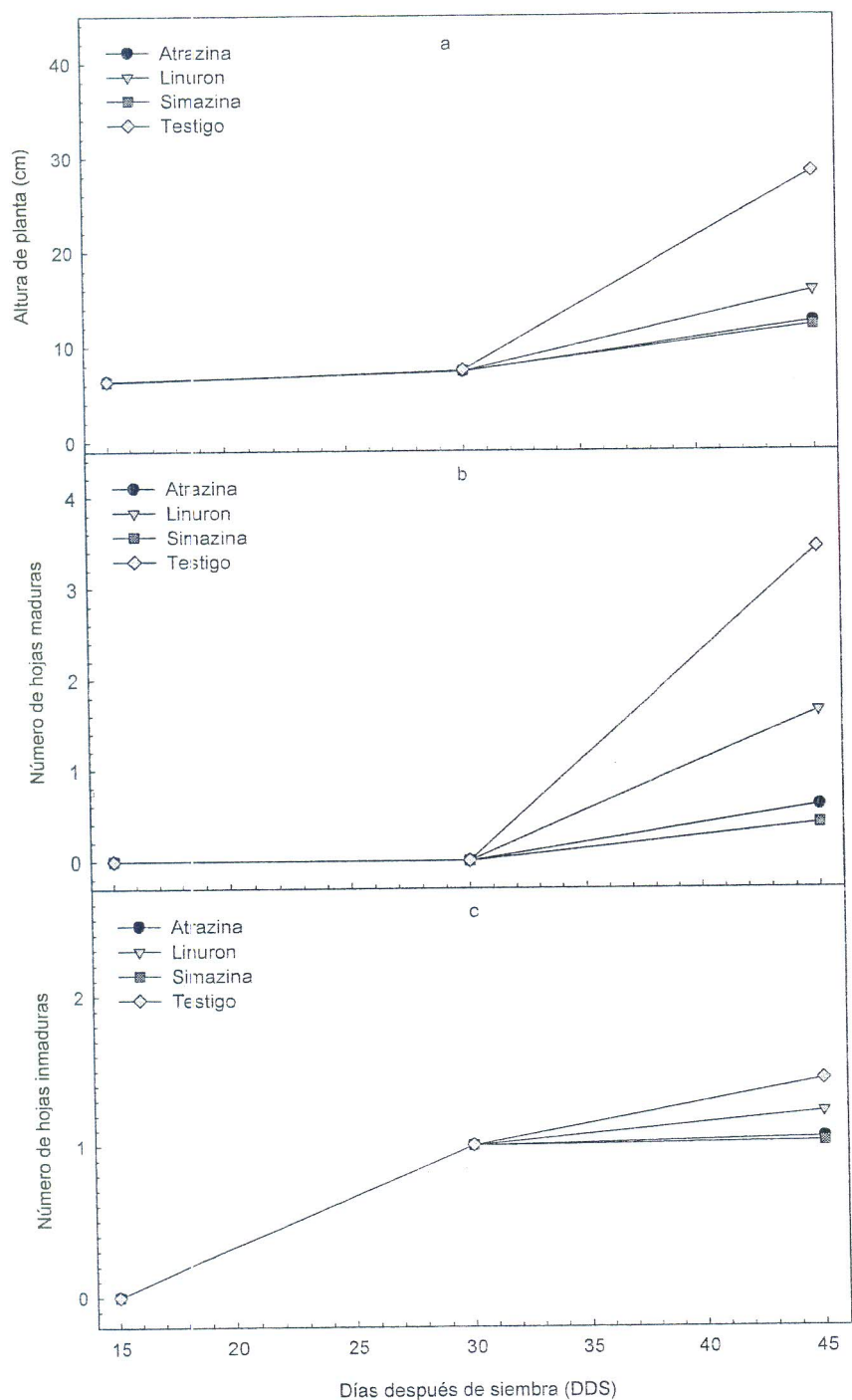


Figura 2. Dinámica de la altura de planta (a), el número de hojas maduras (b) y el número de hojas inmaduras (c) en “calabaza de dulce” (*Cucurbita moschata* Duch.). Cada punto representa el promedio de 25 plantas muestreadas por tratamiento.

En el crecimiento medido por altura de planta y número de hojas maduras e inmaduras, el mayor daño lo ocasionaron la atrazina y simazina, que ocasionaron que las plantas fueran más pequeñas y con menos hojas, las que mostraron daños a partir de los primeros 30 días. El mayor daño se hizo visible a los 45 días dds por el linuron, siendo en esta fecha cuando existió mayor diferencia entre los tratamientos.

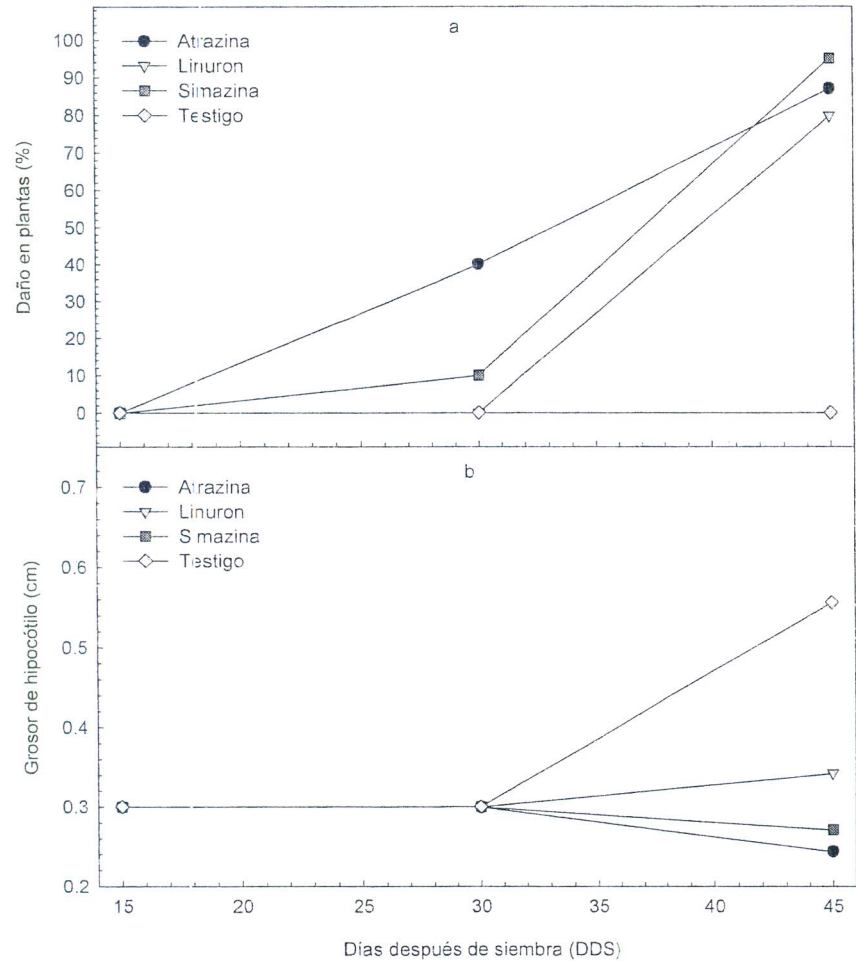


Figura 3. Dinámica del daño en planta (a) y grosor de hipocotilo (b) en “calabaza de dulce” (*Cucurbita moschata* Duch.). Cada punto representa el promedio de 25 plantas muestreadas por tratamiento.

La Figura 3 muestra que el daño más severo y rápido lo provocaron los tratamientos con atrazina y simazina. El daño con el tratamiento con linuron fue más lento, pero al final del experimento todos los herbicidas mataron las plantas.

Se aprecia que el grosor del hipocotilo (Figura 3) fue mayor en el tratamiento con linuron a los 45 dds, debido a que las plantas que sobrevivieron temporalmente detuvieron su crecimiento, para tratar de recuperarse de los daños causados por el herbicida acumulando carbohidratos en sus partes basales (Siminszky *et al.*, 2000), aunque al final murieron. Las plantas resistentes continuaron su crecimiento normal; por lo que el grosor del hipocotilo a los 45 dds fue un poco parecido al testigo (Cuadro 1) debido a que las plantas siguieron usando sus fotosintatos para su crecimiento vegetativo normal.

En la primera etapa, se observa que el crecimiento de las plantas resistentes y susceptibles es igual, lo que podría tener implicaciones para la habilidad competitiva y dinámica de la población con biotipos resistentes en el caso de que fueran maleza, tal como lo señalan Remer y Kropff (1999).

El Cuadro 1 muestra que la atrazina y simazina causaron daño similar y que con el linuron el daño fue más lento.

Cuadro 1. Comparaciones múltiples de medias de cinco variables de “calabaza de dulce” (*Cucurbita moschata* Duch.) en respuesta a la aplicación de tres herbicidas selectivos usados en maíz. Chapingo, México. 2003.

Tratamiento	Altura de planta (cm)	Número de hojas maduras	Número de hojas inmaduras	Grosor de hipocotilo (cm)	Daño (%)
Atrazina 1800 g i.a. ha ⁻¹	12.55 bc ^z	0.60 c	1.05 b	0.24 c	87.00 b
Linuron 1250 g i.a. ha ⁻¹	15.83 b	1.65 b	1.22 ab	0.34 b	79.80 c
Simazina 1800 g i.a. ha ⁻¹	12.14 c	0.40 c	1.02 b	0.27 bc	95.00 a
Testigo	28.33 a	3.44 a	1.44 a	0.56 a	0.00 d
DMS	3.40	0.56	0.23	0.10	6.43

^z Valores con la misma letra dentro de columnas son estadísticamente iguales de acuerdo con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).
DMS: Diferencia mínima significativa.

Resistencia a herbicidas.

Con la metodología aplicada se obtuvieron plantas resistentes, como lo muestra el Cuadro 2, debido a que la población base de calabaza usada tenía amplia variabilidad genética. Entre las posibles bases metabólicas de la resistencia encontrada, están la sobreproducción de un sitio bioquímico sensible a herbicida, resultando en una reducida afinidad con el herbicida (Christoferris, 1999); o la degradación-destoxificación del herbicida antes de que alcance el sitio bioquímico clave dentro de la célula de la planta (Stalker *et al.*, 1988)

Cuadro 2. Número y porcentaje de plantas resistentes de “calabaza de dulce” (*Cucurbita moschata* Duch.) a herbicidas selectivos usados en maíz. Chapingo, México. 2003.

Tratamiento	Dosis (g i.a. ha ⁻¹)	Semillas tratadas	Semillas germinadas	Número de plantas resistentes	Plantas resistentes (%)
Atrazina	1800	2000	1916	8	0.418
Linuron	1250	2000	1916	2	0.104
Simazina	1800	2000	1960	3	0.153
Testigo	-	1000	954	-	-

La diferencia en el porcentaje de resistencia a favor de la atrazina puede deberse a que éste es el herbicida más usado en maíz, seguido de simazina y linuron. Por lo mismo, en ese orden descendente apareció el porcentaje de resistencia, siendo el de atrazina 63% mayor a simazina, y este un 12% mayor que linuron (Cuadro 2).

Las plantas resistentes fueron autopolinizadas debido a que de esta manera se pueden fijar en estado homocigótico genes de resistencia. En algunas especies como en *Chenopodium album* (Bettini *et al.*, 1987) la autopolinización conllevó otras ventajas, ya que en la progenie encontraron plantas resistentes a mayores dosis (mayor a 40 kg·ha⁻¹ de atrazina) y tener la mutación *psbA* en el aminoácido 264.

Tasa de multiplicación *in vitro*

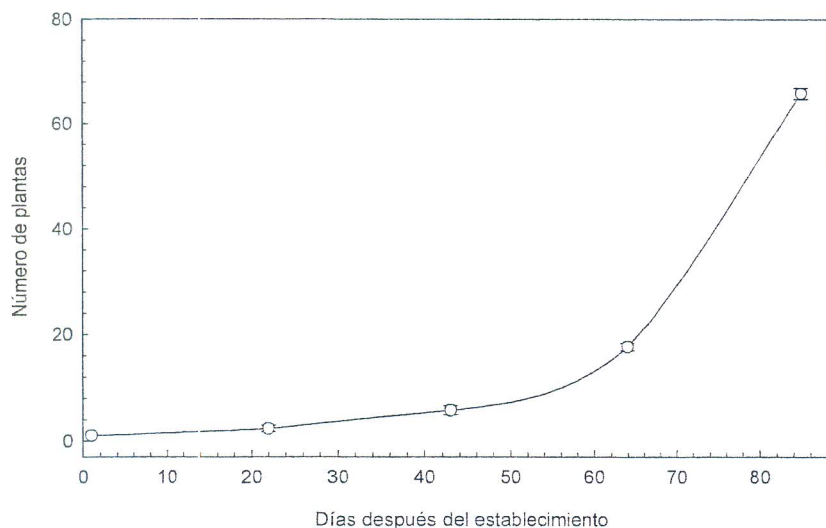


Figura 4. Tasa de multiplicación de “calabaza de dulce” (*Cucurbita moschata* Duch.) en cultivo *in vitro*.

Las plantas resistentes se multiplicaron *in vitro* lográndose una tasa de incremento (Figura 4) de 2.3, 2.5, 3.1 y 3.7 plantas por explante en el 1er, 2do, 3er y 4to subcultivo, respectivamente, con un promedio de 2.90 plantas por explante por periodo de 21 días, independientemente del herbicida al que hayan sido resistentes, indicando que se puede proyectar el número de plantas resistentes a clonar por unidad de tiempo.

3.6. CONCLUSIÓN

Con la metodología usada sobre una población de “calabaza de dulce” especialmente obtenida para lograr amplia variabilidad genética, fue posible obtener plantas de calabaza (*Cucurbita moschata* Duch.) resistentes a herbicidas. El porcentaje de plantas resistentes fue de 0.418%, 0.153% y 0.153% para atrazina, linuron y simazina, respectivamente. La tasa de multiplicación lograda *in vitro* fue de 2.90 plantas por explante por periodo de 21 días, independientemente del herbicida al que resultaron resistentes.

3.7. LITERATURA CITADA

- BETTINI, P.; MCNALLY, S.; SEVIGNAC, M.; DARMENCY, H.; GASQUEZ, J.; DRON M. 1987. Atrazine resistance in *Chenopodium album*. Low and high levels of resistance to the herbicide related to the same chloroplast *psbA* gene mutation. Plant Physiology 84:1442-1446.
- CHRISTOFFERS, M. 1999. Genetic aspects of herbicide-resistant weed management. Weed Technology 13:647-652.
- DARMENCY, H.; CHAUVEL, B.; GASQUEZ, J.; MATEJICEK, A. 1992. Variation of chlorophyll *a/b* ratio in relation to population polymorphism and mutation of triazine-resistance. Plant Physiology Biochemistry 30(1):57-63.
- GARCIA, M. E. 1988. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen. 4ta edición. Instituto de Geografía. UNAM. México. 219 p.
- LEMIEUX, C.; VALLEE, L.; VANASSE, A. 2003. Predicting yield loss in maize fields and developing decision support for post-emergence herbicide applications. Weed Research 43:323-332.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiology Plant 15:473-497.
- PEREZ G., M.; MARQUEZ S., F.; PEÑA L., A. 1997. Mejoramiento Genético de Hortalizas. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo. México. 380p.
- REMER, E. K.; KROPFF, M. J. 1999. Comparative growth of triazine-susceptible and resistant biotypes of *Solanum nigrum* at different light levels. Annals of Botany 83:637-644.

- ROBINSON, R. W.; DECKER-WALTERS, D.S. 1997. Cucurbits. CAB International. University Press, Cambridge.UK. 226p.
- RYAN, G. F. 1970. Resistance of common groundsel to simazine and atrazine. *Weed Science* 18(5):614-616.
- SCOTT, P. R.; HOLLINS, T. W. 1974. Effects of eyespot on the yield of winter wheat. *Annals of Applied Biology* 78:269-279.
- SIMINSZKY, B.; SHELDON, B. S.; CORBIN, F. T.; DEWEY, R. E. 2000. A cytochrome P450 monooxygenase cDNA (CYP71A10) confers resistance to linuron in transgenic *Nicotiana tabacum*. *Weed Science* 48:291-295.
- SOLYMOSI, P.; KOSTYAL, S. 1985. Mapping of atrazine resistance for *Amaranthus retroflexus* L. in Hungary. *Weed Research* 25:411-414.
- STALKER, D. M.; McBRIDE, K. E; MALYJ, L. D. 1988. Herbicide resistance in transgenic plants expressing a bacterial detoxification gene. *Science* 242:419-423.
- STEINER, A. A. 1984. The universal nutrient solution. *Proceedings International Congress on Soilless Culture* 6:633-650.
- STEVEN, T.; NELLY, G.; EUEL, C.; DAWN S., L. 1999. Mode of resistance of triazine-resistant annual bluegrass (*Poa annua* L.). *Weed Technology* 13:747-752.
- XIONG, J.; SUBRAMANIAN, S.; GOVINDJEE. 1998. A knowledge-based three dimensional model of the photosystem II reaction center of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynthesis Research* 56:229-254.

4. SELECCIÓN Y MULTIPLICACIÓN *in vitro* DE PLANTAS DE CALABAZA PIPIANA (*Cucurbita argyrosperma* Huber var. *stenosperma*) RESISTENTES A ATRAZINA, LINURON Y SIMAZINA

F. Bautista-Reyes¹; C. Villanueva-Verduzco²; A. Peña-Lomelí³; F. Urzúa-Soria⁴; J. Sahagún-Castellanos³; T. Valdez-Hernández³; L. Channing-Merrick⁵

4.1. RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue obtener y micropropagar plantas de calabaza pipiana resistentes a herbicidas selectivos usados en maíz, para ser utilizadas en el sistema asociación maíz-calabaza con control químico de maleza. El diseño experimental fue completamente al azar, con cuatro tratamientos: atrazina (1800 g i.a. ha⁻¹), linuron (1250 g i.a. ha⁻¹), simazina (1800 g i.a. ha⁻¹) y un testigo, con 10, 10, 10 y 5 repeticiones, respectivamente. Las variables analizadas fueron porcentaje de germinación, altura de planta, número de hojas maduras, número de hojas inmaduras, grosor del hipocotilo, porcentaje de daño, porcentaje de plantas resistentes y tasa de multiplicación *in vitro*. Se obtuvieron plantas resistentes a atrazina (0.548 %), linuron (0.673 %) y simazina (1.541 %), las cuales fueron autopolinizadas para fijar la resistencia. La tasa de propagación en cultivo *in vitro* fue de 3.25 plantas por explante por periodo de 21 días en medio de cultivo básico MS.

PALABRAS CLAVE: cucurbitáceas, herbicidas, resistencia, cultivo de tejidos.

¹ Resumen de la tesis que presenta el autor como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Horticultura.

² Director de tesis: Profesor-Investigador de tiempo completo del Depto. de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo (UACH). Chapingo. México. C.P. 56230

³ Asesor de tesis: Profesor-Investigador de tiempo completo del Depto. de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo (UACH). Chapingo. México. C.P. 56230

⁴ Asesor de tesis: Profesor-Investigador de tiempo completo del Depto. de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo (UACH). Chapingo. México. C.P. 56230

⁵ Agronomy Department. Iowa State University. U.S.A.

SELECTION AND *in vitro* MULTIPLICATION OF RESISTANT PIPIANA SQUASH
PLANTS (*Cucurbita argyrosperma* Huber var. *stenosperma*) TO ATRAZINE,
LINURON AND SIMAZINE

4.2. ABSTRACT

The objective of this work was to obtain and micropropagate resistant pipiana squash plants to selective herbicides used in maize, to be utilized in the maize-squash association system with chemical weed control. The experimental design used was completely randomized, with four treatments: atrazine (1800 g a.i. ha⁻¹), linuron (1250 g a.i. ha⁻¹), simazine (1800 g a.i. ha⁻¹) and a control, with 10, 10, 10 and 5 replications, respectively. The variables analyzed were: germination percentage, plant height, number of mature leaves, number of immature leaves, hypocotyle thickness, percentage of damage, percent of resistant plants and propagation rate *in vitro* culture. Plants resistant to atrazine (0.548 %), linuron (0.673 %) and simazine (1.541 %) were obtained and which were autopollinated to fix the resistance. The propagation rate *in vitro* culture was 3.25 plants per explant for periods of 21 days in MS basic medium.

KEY WORDS: cucurbittacea, herbicides, resistance, tissue culture

4.3. INTRODUCCIÓN

La diversidad genética de calabazas es muy amplia en México, principalmente en especies, forma, tamaño, color de fruto, cantidad de semilla, calidad y grosor de pulpa, tolerancia a enfermedades y precocidad, entre otras características (Montes, 1991).

La evolución hacia la resistencia genética en respuesta a la presión de selección ejercida por algún herbicida, es influenciada por varios factores: la naturaleza de cada herbicida, la maleza, y su combinación, que influirán en gran medida la efectividad de la estrategia de manejo del cultivo (Christoffers, 1999). De Prado *et al.* (1989) encontraron en plantas de las especies *Chenopodium album*, *Conyza bonaerensis* y *Setaria glauca* que las aplicaciones de 5 kg de i.a. ha⁻¹ de atrazina o simazina, produjeron biotipos altamente resistentes a los herbicidas. La resistencia de *Poa annua* L. a simazina y diuron se debe a una mutación de la serina 264 a glicina, la cual reduce la afinidad de los herbicidas triazina en el punto de unión de Q_B en la proteína D1 en el fotosistema II; esto se encontró secuenciando una porción del gene *psbA* del cloroplasto (Steven *et al.*, 1999). A pesar que México es uno de los principales países poseedores de diversidad genética, no ha sido capaz de generar variedades de calabaza pipiana (*Cucurbita argyrosperma* Huber var *stenosperma*) propias y acordes a las necesidades de los agricultores en sus diferentes regiones agrícolas. Con la variabilidad genética de calabazas disponibles a México y conociendo la existencia de algunas especies vegetales silvestres resistentes a herbicidas usados en maíz, se planteó como objetivo del presente trabajo encontrar plantas de calabaza pipiana resistentes a los herbicidas atrazina, linuron y simazina, para hacer posible la siembra maíz-calabaza en asociación con control químico de maleza, y usar la técnica de cultivo de tejidos para incrementar

masivamente el germoplasma resistente, para disponer de mayor cantidad de semilla en corto tiempo.

4.4. MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de plantas resistentes

Siembra

El experimento se estableció el día 21 de febrero del año 2003, en un invernadero ubicado en el campus sede de la Universidad Autónoma Chapingo, localizado a los 19°29' de latitud norte y 98°53' de longitud oeste, a una altura de 2250 msnm, con un clima Cb(wo)(i')g, que es templado subhúmedo, temperatura media anual de 15.2°C, con lluvias en verano y una precipitación media anual de 636.5 mm (García, 1988).

El germoplasma de calabaza pipiana (*Cucurbita argyrosperma* Huber var. *stenosperma*) usado como base, fue una población proveniente del cuarto ciclo de selección natural para adaptación a las condiciones de Chapingo México, constituida originalmente por 40 colectas procedentes de los Estados de Morelos, Veracruz, Guanajuato, Guerrero, Yucatán y Campeche, recombinados libremente.

Tratamientos

El diseño experimental fue completamente al azar con cuatro tratamientos: Atrazina 1800 g i.a. ha⁻¹(Gesaprim®), Linuron 1250 g i.a. ha⁻¹(Lorox 50 DF®), Simazina 1800 g i.a. ha⁻¹(Simanex 50SC®) y Testigo con 10, 10, 10 y 5 repeticiones, respectivamente. Debido a que se esperaba un bajo porcentaje de plantas resistentes, la unidad experimental (UE) fue una charola de plástico de 45 X 35 X 11cm, sin perforaciones para evitar pérdidas del herbicida, en donde se sembraron 200 semillas. A cada

contenedor se le adicionaron en promedio 850 g de Peat-Moss®, con pH de 5.8, con lo que alcanzó un espesor de 8 cm en la charola.

Previo a la siembra, la semilla se desinfectó con hipoclorito de sodio al 5% (v/v) por 15 minutos, se enjuagó con abundante agua y se dejó escurrir. Las semillas se dispusieron de tal manera que el extremo más delgado quedara de forma vertical, garantizando la misma posición, profundidad y distancia.

Riegos

Una vez sembrado, se aplicó un riego a capacidad de campo (CC) y con una aspersora manual se aplicó el herbicida correspondiente, usando una boquilla tipo abanico plano Teejet 8004. El sustrato se mantuvo a 85% de la CC. Durante los primeros 15 días, se regó con agua proveniente de pozo profundo. Del día 16 al 30 se utilizó una solución nutritiva tipo Steiner (1984) al 50% y posteriormente se regó con la misma solución al 100%.

Transplante

De las plantas resistentes seleccionadas en invernadero se obtuvieron las partes apicales tiernas, con las que se hizo micropropagación en un laboratorio de cultivo de tejidos. Las plantas resistentes donadoras de explantes se llevaron a campo abierto a los 67 días después de la siembra (28 de abril de 2003), donde se transplantaron en surcos separados a una distancia de 1.5 m, dejándoles una parte del sustrato para que siguiera haciendo efecto el herbicida.

Manejo del cultivo

Se aplicaron 100 g de fertilizante Triple-17® (17-17-17) por planta a los 15 días después del trasplante. Después de cada una de dos granizadas severas que se presentaron durante su ciclo de cultivo, se suministró 1.5 kg de vermicomposta a cada

planta, para garantizar su recuperación, obteniéndose un número aceptable de frutos por planta. Asimismo, se mantuvieron mecánicamente libres de maleza. Todas las flores femeninas de las plantas fueron autopolinizadas y cubiertas con bolsas de glacyne para evitar contaminación de polen externo por insectos o por el viento.

Las variables evaluadas fueron: porcentaje de germinación a los 15 días después de la siembra (DDS); altura de planta (cm), número de hojas maduras, número de hojas inmaduras y grosor de hipocotilo (cm) a los 15, 30 y 45 DDS; y porcentaje de daño. El porcentaje de daño se evaluó en una muestra aleatoria de 25 plantas por UE, utilizando una escala adaptada de la fórmula para calificación visual de Scott y Hollins (1974). El porcentaje de plantas resistentes se calculó con aquellas plantas que sobrevivieron hasta el final de cada tratamiento. La tasa de reproducción *in vitro* se cuantificó cada 21 días después de haberse sembrado los explantes en medio de cultivo en el laboratorio. Para el análisis de los resultados, se utilizó el programa estadístico SAS (Statistical Analysis System).

Multiplicación *in vitro*

Obtención de explantes

De las plantas resistentes se obtuvo el material para los explantes, a partir de las puntas tiernas a las que se les quitaron las hojas (3 de abril de 2003). Previa desinfección, los explantes obtenidos consistieron de un segmento de tallo (1.5 cm) con una yema lateral, las que se propagaron en el laboratorio de cultivo de tejidos.

Desinfección

En el laboratorio de cultivo de tejidos, las puntas de guía de las plantas resistentes primero se lavaron en agua jabonosa y se enjuagaron con agua corriente limpia durante 30 minutos. Luego fueron sumergidas en una solución preparada con $1 \text{ g} \cdot \text{litro}^{-1}$ de cada

uno de los fungicidas Benlate®, Captán® y Tecto 60® en mezcla, por 45 minutos. Ya lavadas, el material se trasladó a la campana de flujo laminar y ahí se colocó en una solución de hipoclorito de sodio al 10 % (v/v) adicionado con 20 gotas de Microdín® y 2 gotas de Tween 20® durante 10 minutos, después se cambiaron a una solución de peróxido de hidrógeno al 3% durante 30 minutos. Finalmente se enjuagaron tres veces con agua esterilizada, quedando el material fuente de explantes estéril y listo para la siembra.

Medio de cultivo

Los explantes usados fueron segmentos apicales de tallo de 1.5 cm de longitud con una yema lateral en el punto medio. Se establecieron en medio de cultivo básico de Murashige y Skoog (1962) (MS) sólido ($6 \text{ g} \cdot \text{litro}^{-1}$ de agar) suplementado con 3% de sacarosa, a pH de 5.7 ± 0.1 , ajustado con soluciones de HCl 1N y 0.1N; NaOH 1N y 0.1N según se requiriera un ajuste grande y pequeño, respectivamente. El medio de cultivo se esterilizó en una autoclave durante 20 minutos a $15 \text{ lb} \cdot \text{pulg}^{-2}$ y a 121° C .

Siembra *in vitro*

Como explante de siembra se utilizaron segmentos de tallo (1.5 cm) de las plantas de guías con yemas laterales. Una vez terminada la siembra *in vitro*, se incubó a un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, a temperatura de $26 \pm 2^\circ \text{ C}$. Cada 21 días se realizaron subcultivos en el mismo tipo de medio de cultivo, pero fresco.

4.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Germinación. Ninguno de los herbicidas aplicados (atrazina, linuron y simazina) interfirió con la germinación, debido a que no se encontró diferencia estadística entre tratamientos (Figura 1). Esto fue así porque actúan inhibiendo el flujo de electrones en la fotosíntesis (Xiong, *et al.*, 1998), proceso ausente durante la germinación.

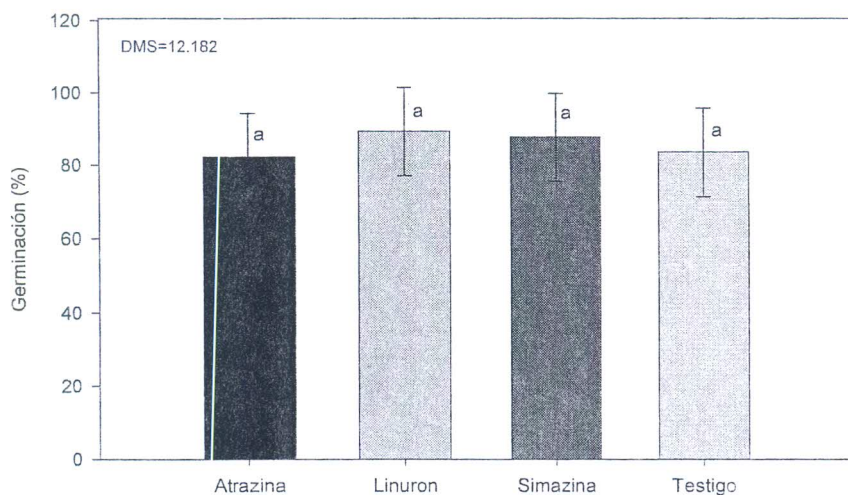


Figura 1. Porcentaje de germinación en calabaza pipiana (*Cucurbita argyrosperma* Huber var. *stenosperma*.) a los 15 días después de la siembra. Barras con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey con $P \leq 0.05$). Diferencia mínima significativa (DMS %).

Crecimiento. Los tratamientos afectaron de manera similar el crecimiento de las plántulas, a juzgar por el comportamiento las variables altura de planta, número de hojas maduras y número de hojas inmaduras (Figura 2) durante los primeros 15 y 30 días, resultado congruente con lo encontrado por Darmency *et al.* (1992) en plantas de las especies *Brassica napus*, *Setaria italica* y *Chenopodium album*.

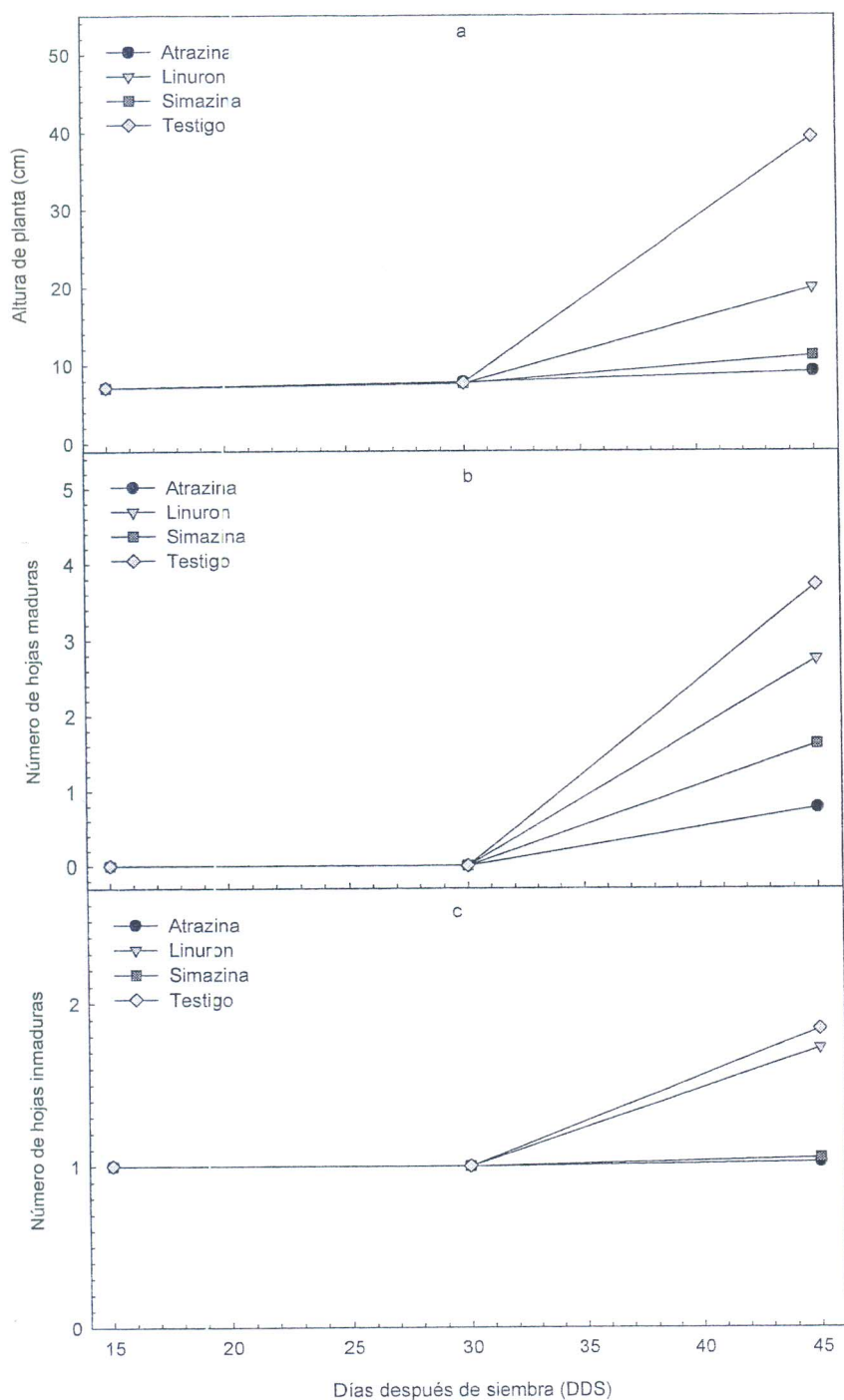


Figura 2. Dinámica de la altura de planta (a), el número de hojas maduras (b) y el número de hojas inmaduras (c) en calabaza pipiana (*Cucurbita argyrosperma* Huber var. *stenosperma*). Cada punto representa el promedio de 25 plantas muestreadas por tratamiento.

El porcentaje de daño en las plantas a los 45 dds y el grosor que alcanzó el hipocotilo (Figura 3) indicó que el daño más severo y rápido ocurrió con atrazina y simazina; en

tanto que con linuron el daño fue más lento. Después de 60 días la mayoría de las plantas murieron, excepto aquellas resistentes y las del testigo.

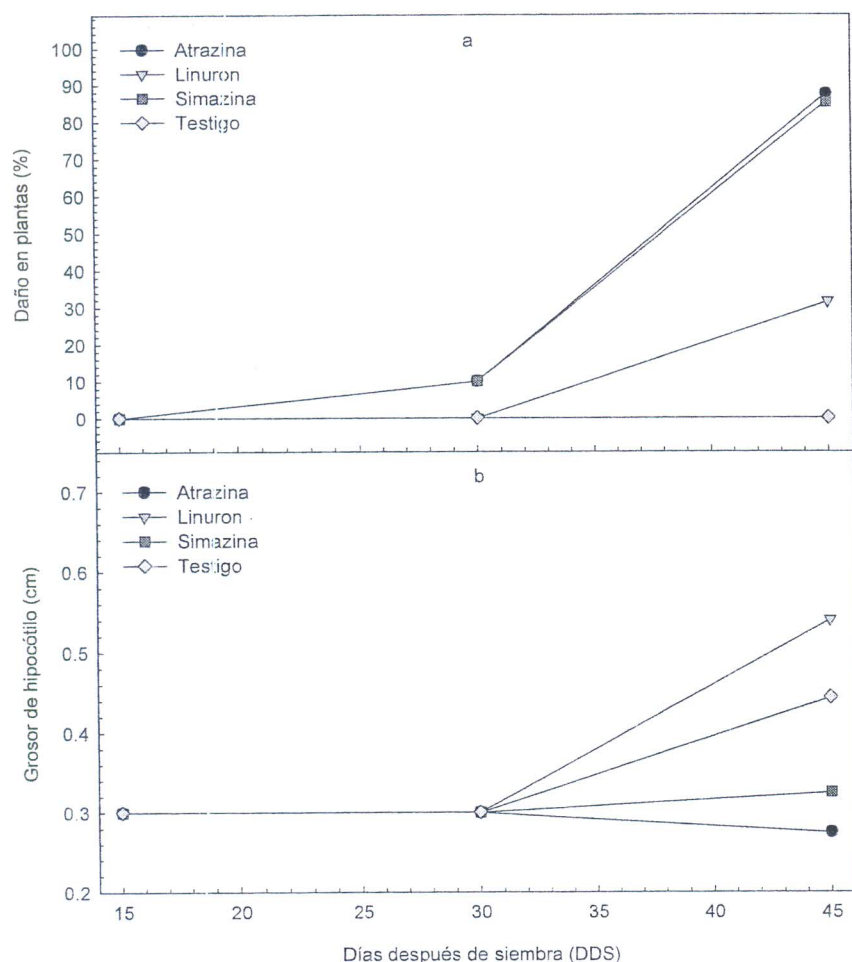


Figura 3. Dinámica del daño en planta (a) y grosor de hipocotilo (b) en calabaza pipiana (*Cucurbita argyrosperma* Huber var. *stenosperma*.). Cada punto representa el promedio de 25 plantas muestreadas por tratamiento.

El grosor de hipocotilo alcanzado con el tratamiento de linuron fue mayor. Esto pudo deberse a que las plantas sobrevivientes detuvieron su crecimiento para tratar de recuperarse de los daños causados por el herbicida (Siminszky *et al.*, 2000), acumulando carbohidratos en sus partes basales, aunque al final las plantas susceptibles murieron y las resistentes continuaron su crecimiento normal. Las plantas

del tratamiento testigo presentaron menor grosor de hipocotilo debido a que continuaron usando sus fotosintatos para su crecimiento vegetativo normal. La atrazina ocasionó el mayor daño en plántulas, pues éstas presentaron el menor diámetro de tallo (Figura 3), en contraste con el efecto producido por linuron.

En los primeros 30 días el crecimiento vegetativo de las plantas resistentes y susceptibles fue similar (Figura 2 y 3) lo que podría tener implicaciones en la habilidad competitiva y en la dinámica de la población de calabaza frente a biotipos de maleza también resistentes al herbicida (Remer y Kropff, 1999).

La atrazina y simazina causaron daño similar y en linuron éste fue más paulatino comparado con el testigo (Figuras 2, 3; Cuadro 1).

Cuadro 1. Comparaciones múltiples de medias de cinco variables de calabaza pipiana (*Cucurbita argyrosperma* Huber var. *stenosperma*) en respuesta a la aplicación de tres herbicidas selectivos usados en maíz. Chapingo, México. 2003.

Tratamiento	Altura de planta (cm)	Número de hojas maduras	Número de hojas inmaduras	Grosor de hipocotilo (cm)	Daño (%)
Atrazina 1800 g i.a. ha ⁻¹	9.17 c ^z	0.77 d	1.02 b	0.27 b	87.40 a
Linuron 1250 g i.a. ha ⁻¹	19.86 b	2.75 b	1.72 a	0.54 a	31.40 b
Simazina 1800 g i.a. ha ⁻¹	11.17 c	1.62 c	1.05 b	0.32 b	85.20 a
Testigo	37.27 a	3.72 a	1.84 a	0.44 a	0.0 c
DMS	4.83	0.57	0.31	0.11	8.05

^z Valores con la misma letra dentro de columnas son estadísticamente iguales de acuerdo con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).
DMS: Diferencia mínima significativa.

Resistencia a los herbicidas

Debido a que la población de calabaza estudiada tenía amplia variabilidad genética, derivada de la evolución ocurrida como resultado de la selección y la mutación, se obtuvieron plantas resistentes (Cuadro 2). Queda pendiente estudiar la naturaleza de la resistencia encontrada, misma que podría ser una sobreproducción de un sitio

bioquímico sensible al herbicida, resultando en un reducida afinidad con el herbicida (Christoffers, 1999); o en la degradación-destoxificación del herbicida antes de que alcance el sitio bioquímico clave dentro de la célula de la planta (Stalker *et al.*, 1988).

Cuadro 2. Número y porcentaje de plantas resistentes de calabaza pipiana (*Cucurbita argyrosperma* Huber var. *stenosperma*) a herbicidas selectivos usados en maíz. Chapingo, México.2003.

Tratamiento	Dosis (g i.a. ha ⁻¹)	Semillas tratadas	Semillas germinadas	Número de plantas resistentes	Plantas resistentes (%)
Atrazina	1800	2000	1642	9	0.548
Linuron	1250	2000	1784	12	0.673
Simazina	1800	2000	1752	27	1.541
Testigo	-	1000	835	-	-

Las plantas resistentes fueron autopolinizadas para fijar en estado homocigotico los genes de resistencia. Con la autopolinización pueden obtenerse algunas otras ventajas, como se ha observado en *Chenopodium album* (Bettini *et al.*, 1987) donde las pocas plantas sobrevivientes por su resistencia a herbicidas se autopolinizaron y en su descendencia se encontraron plantas resistentes a altas dosis de atrazina (mayor a 40 kg·ha⁻¹), debido a que presentaron la mutación *psbA* en el aminoácido 264.

Tasa de multiplicación *in vitro*.

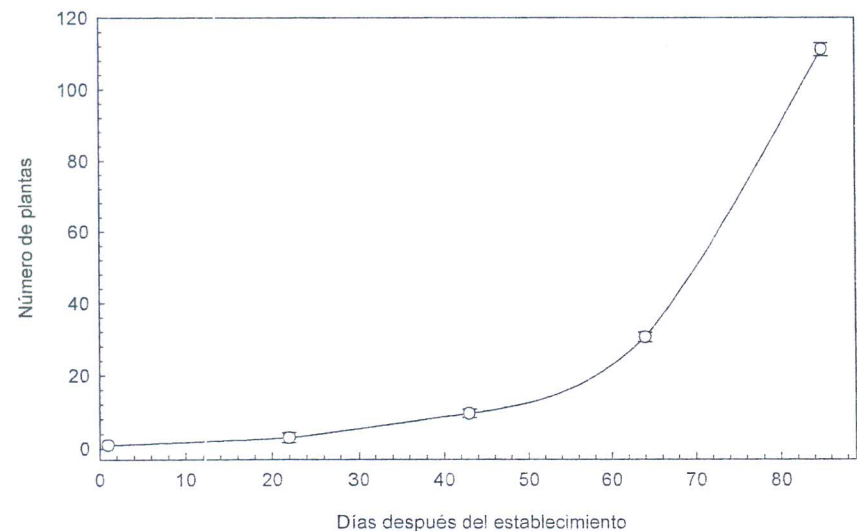


Figura 4. Tasa de multiplicación de calabaza pipiana (*Cucurbita argyrosperma* Huber var. *stencsperma*) en cultivo *in vitro*.

De las plantas resistentes se obtuvieron los segmentos tiernos apicales para tener explantes y llevarlos a cultivo *in vitro*. La tasa de multiplicación lograda (Figura 4) fue de 3.0, 3.2, 3.2, 3.6 plantas por explante durante el 1ro, 2do, 3er y 4to subcultivo, respectivamente, teniendo un promedio fue de 3.26 plantas por explante por periodo de 21 días, sin importar el herbicida al que haya resultado resistente la planta. Esta especie presentó 12.4 % más plantas por explante que *C. moschata* y fue menor en un 6.4 % y 15 % de *C. pepo* y *C. ficifolia*, respectivamente. Esto indica que se puede proyectar la cantidad de plantas deseadas por un determinado tiempo.

4.6. CONCLUSIÓN

Se logró obtener plantas de calabaza pipiana (*Cucurbita argyrosperma* Huber var. *stenosperma*) resistentes a atrazina, linuron y simazina, con un 0.548, 0.673 y 1.541 %, respectivamente. Los resultados indicaron que es posible multiplicar plantas resistentes y que través de la propagación *in vitro* estas pueden micropropagarse vegetativamente, con una tasa de incremento de 3.25 plantas por explante por periodo de 21 días.

4.7. LITERATURA CITADA

- BETTINI, P.; MCNALLY, S.; SEVIGNAC, M.; DARMENCY, H.; GASQUEZ, J.; DRON M. 1987. Atrazine resistance in *Chenopodium album*. Low and high levels of resistance to the herbicide related to the same chloroplast *psbA* gene mutation. *Plant Physiology* 84:1442-1446.
- CHRISTOFFERS, M. 1999. Genetic aspects of herbicide-resistant weed management. *Weed Technology* 13:647-652.
- DARMENCY, H.; CHAUVEL, B.; GASQUEZ, J.; MATEJICEK, A. 1992. Variation of chlorophyll *a/b* ratio in relation to population polymorphism and mutation of triazine-resistance. *Plant Physiology. Biochemistry* 30(1):57-63.
- DE PRADO, R.; DOMÍNGUEZ, C.; TENA, M. 1989. Characterization of triazine-resistant biotypes of common lambsquarters (*Chenopodium album*), Hairy fleabane (*Conyza bonariensis*), and yellow foxtail (*Setaria glauca*) found in Spain. *Weed Science* 37:1-4.
- GARCIA, M. E. 1988. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen. 4ta edición. Instituto de Geografía. UNAM. México. 219p.
- MONTES H., S. 1991. Calabazas (*Cucurbita spp.*). pp. 239-250. In: Avances en el Estudio de los Recursos Fitogenéticos de México. Ed Ortega P., Palomino H., R. Castillo G., F., González H., V. A. y Livera M., M. Sociedad Mexicana de Fitogenética. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México.
- MURASHIGE, T; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant* 15:473-497.

- REMER, E. K.; KROPFF, M. J. 1999. Comparative growth of triazine-susceptible and resistant biotypes of *Solanum nigrum* at different light levels. *Annals of Botany* 83:637-644.
- SCOTT, P. R.; HOLLINS, T. W. 1974. Effects of eyespot on the yield of winter wheat. *Annals of Applied Biology* 78:269-279.
- SIMINSZKY, B.; SHELDON, B. S.; CORBIN, F. T.; DEWEY, R. E. 2000. A cytochrome P450 monooxygenase cDNA (CYP71A10) confers resistance to linuron in transgenic *Nicotiana tabacum*. *Weed Science* 48:291-295.
- SOLYMOSI, P.; KOSTYAL, S. 1985. Mapping of atrazine resistance for *Amaranthus retroflexus* L. in Hungary. *Weed Research* 25:411-414.
- STALKER, D. M.; McBRIDE, K. E; MALYJ, L. D. 1988. Herbicide resistance in transgenic plants expressing a bacterial detoxification gene. *Science* 242:419-423.
- STEINER, A. A. 1984. The universal nutrient solution. *Proceedings International Congress on Soilless Culture* 6:633-650.
- STEVEN, T.; NELLY, G.; EUDEL, C., ;DAWN S., L. 1999. Mode of resistance of triazine-resistant annual bluegrass (*Poa annua* L.). *Weed Technology* 13:747-752.
- XIONG, J.; SUBRAMANIAN, S.; GOVINDJEE. 1998. A knowledge-based three dimensional model of the Photosystem II reaction center of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynthesis Research* 56:229-254.

5. RESISTENCIA DE CHILACAYOTE (*Cucurbita ficifolia* Bouché) A ATRAZINA, LINURON Y SIMAZINA Y SU PROPAGACION *in vitro*

F. Bautista-Reyes¹; C. Villanueva-Verduzco²; A. Peña-Lomeli³; F. Urzúa-Soria⁴; J. Sahagún-Castellanos³; T. Valdez-Hernández³; L. Channing-Merrick⁵

5.1. RESUMEN

En este estudio el objetivo fue obtener y multiplicar plantas de chilacayote resistentes a tres herbicidas usados en cultivos de maíz, para ser utilizados en la asociación maíz-chilacayote con control químico de maleza, uno de los principales problemas en este sistema de cultivo. Se utilizó el diseño experimental completamente al azar, con cuatro tratamientos: atrazina (1800 g i.a. ha⁻¹), linuron (1250 g i.a. ha⁻¹), simazina (1800 g i.a. ha⁻¹) y un testigo, con 10, 10, 10 y 5 repeticiones, respectivamente. Las variables se registraron cada 5 días de los 15 a los 45 días después de la siembra y fueron: porcentaje de germinación, altura de planta, número de hojas maduras, número de hojas inmaduras, grosor de hipocotilo, porcentaje de daño, porcentaje de plantas resistentes y tasa de multiplicación *in vitro*. Se obtuvieron plantas resistentes a atrazina (3.273 %), linuron (0.313 %) y simazina (1.651 %) y fueron autopolinizadas para fijar en estado homocigótico los genes de resistencia. La tasa de multiplicación *in vitro* fue de 3.68 plantas por explante por periodo de 21 días en medio de cultivo básico MS.

PALABRAS CLAVE: cucurbitáceas, herbicidas, resistencia, cultivo de tejidos.

¹ Resumen de la tesis que presenta el autor como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Horticultura.

² Director de tesis: Profesor-Investigador de tiempo completo del Depto. de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo (UACH). Chapingo. México. C.P. 56230

³ Asesor de tesis: Profesor-Investigador de tiempo completo del Depto. de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo (UACH). Chapingo. México. C.P. 56230

⁴ Asesor de tesis: Profesor-Investigador de tiempo completo del Depto. de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo (UACH). Chapingo. México. C.P. 56230

⁵ Agronomy Department. Iowa State University. U.S.A.

RESISTANCE OF FIG-LEAF GOURD (*Cucurbita ficifolia* Bouché) TO ATRAZINE, LINURON AND SIMAZINE AND ITS *in vitro* PROPAGATION

5.2. ABSTRACT

In this study the objective was to obtain and to multiply fig-leaf gourd plants resistant to three herbicides used in maize crops, to be used on the maize-fig-leaf gourd association system with chemical weed control, because it is a main problem in this crop system. Completely randomized experimental design was used with four treatments: atrazine (1800 g a.i. ha⁻¹), linuron (1250 g a.i. ha⁻¹), simazine (1800 g a.i. ha⁻¹) and a control, with 10, 10, 10 and 5 replications, respectively. The variables studied were registered each 5 days since 15 to 45 days after showing and they were: germination percentage, plant height, number of mature leaves, number of immature leaves, hypocotyle thickness, percentage of damage, percent of resistant plants and propagation rate *in vitro* culture. Plants resistant to atrazine (3.273%), linuron (0.313%) and simazine (1.651%) were obtained and were autopollinated in order to fix the resistant genes in homocigous stage. The multiplication rate *in vitro* was 3.68 plants per explant for periods of 21 days in basic MS medium culture.

KEY WORDS: cucurbitacea, herbicides, resistance, tissue culture.

5.3. INTRODUCCIÓN

La agrobiodiversidad de calabazas es muy amplia en México, principalmente en especies, forma, tamaño, color de fruto, cantidad de semilla, calidad y grosor de pulpa, tolerancia a enfermedades y precocidad, entre otras características (Montes, 1991).

La resistencia en respuesta a la presión de selección ejercida por algún herbicida ha evolucionado influenciada por varios factores: la naturaleza de cada herbicida, maleza, y su combinación, lo que afecta en gran medida la efectividad de la estrategia de manejo del cultivo (Christoffers, 1999). De Prado *et al.* (1989) encontraron en *Chenopodium album*, *Conyza bonaerensis* y *Setaria glauca* que las aplicaciones de 5 kg de i.a. ha⁻¹ de atrazina o simazina, produjeron biotipos altamente resistentes a estos herbicidas. Secuenciando una porción del gene *psbA* del cloroplasto, la resistencia de *Poa annua* L. a simazina y diuron se debe a una mutación de la serina 264 a glicina, la cual reduce la afinidad de los herbicidas triazina en el punto de unión de Q_B en la proteína D1 en el fotosistema II (Steven *et al.*, 1999).

En México, pese a que es uno de los principales poseedores de la diversidad genética, no existen variedades mejoradas de chilacayote (*Cucurbita ficifolia* Bouché) acordes a las necesidades de los agricultores en las diferentes regiones agrícolas. Así que el objetivo del presente trabajo fue contribuir a satisfacer dicha necesidad del país, mediante la selección y multiplicación de plantas de chilacayote resistente a los herbicidas selectivos usados en maíz con el propósito de usarlas donde se cultiva maíz-chilacayote en asociación y es importante el control de maleza con herbicidas (atrazina, linuron y simazina), debido a que no son selectivos a ambas especies. El uso de la

técnica de cultivo de tejidos permitirá incrementar el germoplasma resistente para disponer de semilla utilizable en corto tiempo.

5.4. MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de plantas resistentes

Siembra

El día 21 de febrero del año 2003 se estableció un experimento para seleccionar plantas resistentes a herbicidas selectivos usados en maíz. Se utilizó un invernadero ubicado en el campus sede de la Universidad Autónoma Chapingo, localizado a 19°29' de latitud norte y 98°53' de longitud oeste a una altura de 2250 msnm, con un clima Cb(wo)(i')g, que es templado subhúmedo, temperatura media anual de 15.2°C, con lluvias en verano y una precipitación media anual de 636.5 mm (García, 1988).

La población básica de chilacayote (*Cucurbita ficifolia* Bouché.) utilizada fue el compuesto de una población recombinada con 70 colectas de los Estados de México, Puebla, Tlaxcala y Morelos, en su segundo ciclo de adaptación a Chapingo (Valdez *et al.*, 1998). De esa población se obtuvieron nueve familias de medios hermanos maternos seleccionadas por alto potencial de rendimiento. Los tipos de chilacayote corriente son usados para consumo de fruto maduro, ya sea como dulces cristalizados típicos o como forraje para ganado.

Tratamientos

Se usó el diseño experimental completamente al azar con cuatro tratamientos: Atrazina 1800 g i.a. ha⁻¹(Gesaprim®), Linuron 1250 g i.a. ha⁻¹(Lorox 50 DF®), Simazina 1800 g i.a. ha⁻¹(Simanex 50SC®) y Testigo, se utilizaron 10, 10, 10 y 5 repeticiones,

respectivamente. La unidad experimental (UE) fue una charola de plástico de 45 X 35 X 11cm sin perforaciones para evitar pérdidas del herbicida, donde se sembraron 200 semillas. A cada contenedor se le adicionaron 850 g de Peat-Moss®, con pH de 5.8, con lo que alcanzó un espesor de 8 cm de sustrato en la charola.

Antes de la siembra, las semillas se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 5% (v/v) por 15 minutos, luego se enjuagaron con abundante agua y se dejaron escurrir. Las semillas se sembraron dispuestas en surquillos equidistantes, de tal manera que el extremo más angosto se orientara hacia abajo al colocarla de forma vertical, manteniendo la misma posición, profundidad y distancia.

Las dimensiones de las charolas de plástico fueron de 45 X 35 X 11cm, sin perforaciones para evitar pérdidas del herbicida. A cada contenedor se le adicionó en promedio 850 g de Peat-Moss®, con pH de 5.8.

Riegos

Después de la siembra se regó a capacidad de campo (CC) y con una aspersora manual se aplicó el herbicida correspondiente, usando una boquilla tipo abanico plano Teejet 8004. El sustrato se mantuvo a 85% de su CC. Durante los primeros 15 días se regó con agua limpia proveniente de pozo profundo. Del día 16 al 30 se utilizó una solución nutritiva tipo Steiner (1984) al 50% y posteriormente los riegos fueron con la misma solución al 100% de concentración.

Transplante

Una vez que se obtuvo el material fuente para los explantes a sembrar *in vitro*, de las plantas resistentes, dichas plantas se transplantaron en campo abierto a los 67 días después de la siembra a una distancia entre surcos y plantas de 1.5 metros y dejándole el sustrato para que continuara haciendo efecto el herbicida.

Manejo del cultivo

Se aplicaron 100 g de fertilizante Triple-17® (17-17-17) por planta a los 15 días después del trasplante. Después de cada una de dos granizadas severas que se presentaron durante su desarrollo, se suministró 1.5 kg de vermicomposta a cada planta, para obtener un número aceptable de frutos por planta. Estuvieron libres de maleza mediante control mecánico. Todas las flores femeninas de las plantas fueron autopolinizadas y se cubrieron usando bolsas de glacyne para evitar contaminación de polen externo por insectos o por el viento.

Las variables evaluadas fueron: porcentaje de germinación (%) a los 15 días después de la siembra (DDS); altura de planta (cm), número de hojas maduras, número de hojas inmaduras y grosor de hipocotilo (cm) a los 15, 30 y 45 DDS; porcentaje de daño (%) evaluado en una muestra aleatoria de 25 plantas por UE, utilizando una escala adaptada de la fórmula para calificación visual de Scott y Hollins (1974); porcentaje de plantas resistentes, calculada con plantas que sobrevivieron al final de cada tratamiento y tasa de multiplicación *in vitro*, evaluada con el número de explantes obtenidos cada 21 días después de haberse sembrado los explantes en medio de cultivo.

El análisis de los resultados, se realizó con el programa estadístico SAS (Statistical Analysis System).

Multiplicación *in vitro*

Obtención de explantes

En el laboratorio de cultivo de tejidos, las puntas tiernas de las plantas resistentes se sometieron a desinfección para usarlas como fuente de explantes (3 de abril de 2003).

Desinfección

Primero se lavaron en agua jabonosa y luego se les enjuagó con abundante agua corriente limpia durante 30 minutos. Después se sumergieron en una solución preparada mezclando 1 g·litro⁻¹ de los fungicidas Benlate®, Captán® y Tecto 60® por 45 minutos. En la campana de flujo laminar se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio cloralex® al 10% (v/v) adicionado con 20 gotas de Microdín® y 2 gotas de Tween 20® por 10 minutos. Luego fueron cambiados a una solución de peróxido de hidrógeno al 3% durante 30 minutos. Finalmente se enjuagaron tres veces con agua esterilizada, quedando el material fuente, estéril y listo para obtener explantes de 1.5 cm de longitud con una yema axilar, y proceder a la siembra.

Medio de cultivo

Los explantes se establecieron en el medio de cultivo básico de Murashige y Skoog (1962) (MS), suplementado con 3% de sacarosa y solidificado con 6 g·litro⁻¹ de agar. El pH se ajustó a 5.7 ± 0.1 con soluciones de HCl 1N y 0.1N, NaOH 1N y 0.1N según si el ajuste requerido era grande o pequeño, respectivamente. Previo a la siembra el medio de cultivo se esterilizó en una autoclave durante 20 minutos a 15lb·pulg⁻² y a 121° C.

Siembra *in vitro*

En la siembra se utilizaron yemas laterales con un segmento de tallo (1.5 cm) como explantes. Terminada la siembra de explantes en los frascos con medio de cultivo, éstos se incubaron a un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, a temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$. Cada 21 días, se realizaron subcultivos usando el mismo medio de cultivo fresco.

5.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Germinación. Los herbicidas atrazina, linuron y simazina no interfirieron en la germinación puesto que no se encontraron diferencias estadísticas entre tratamientos (Figura 1). De antemano se sabe que su modo de acción es mediante la inhibición del flujo de electrones en la fotosíntesis, por eso la plántula muere cuando se le agotan las reservas de la semilla y debe empezar a producir sus propios alimentos (Xiong *et al.*, 1998).

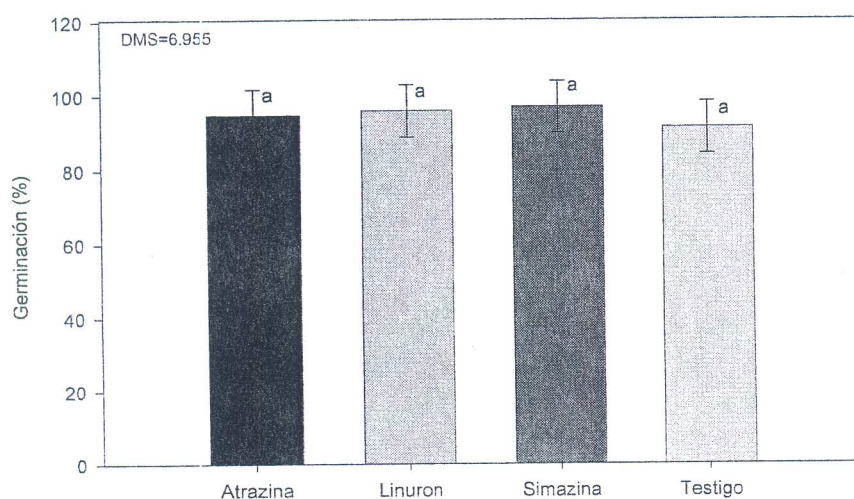


Figura 1. Porcentaje de germinación en chilacayote (*Cucurbita ficifolia* Bouché) a los 15 días después de la siembra. Barras con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey con $P \leq 0.05$). Diferencia mínima significativa (DMS %).

Crecimiento. A juzgar por las variables altura de planta, número de hojas maduras y número de hojas inmaduras, los tratamientos afectaron el crecimiento de las plantas de manera similar durante los primeros 15 y 30 días (Figura 2 y 3). Es resultado congruente a lo encontrado por Darmency *et al.* (1992) en especies de *Brassica napus*, *Setaria italica* y *Chenopodium album*.

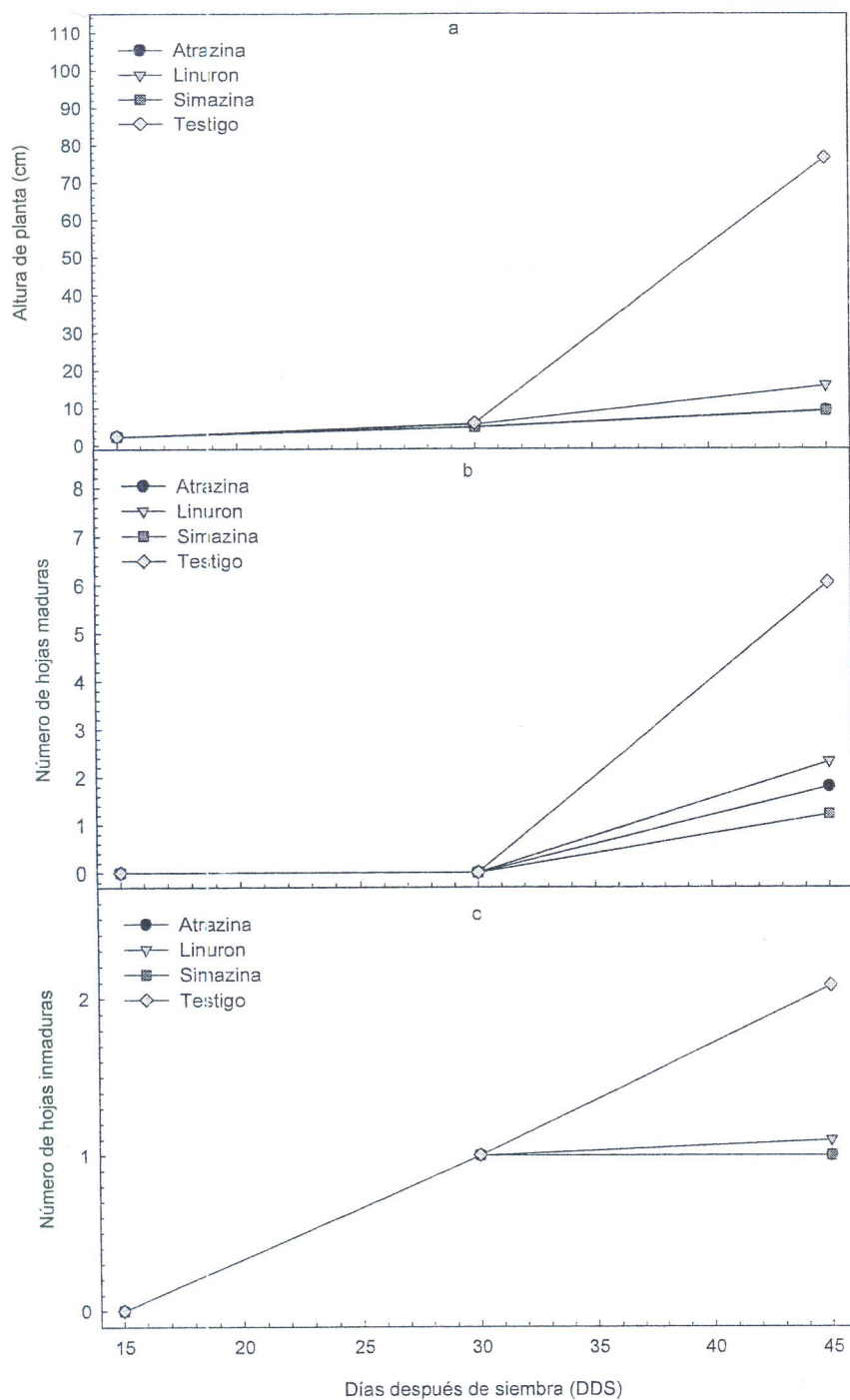


Figura 2. Dinámica de la altura de planta (a), el número de hojas maduras (b) y el número de hojas inmaduras (c) en chilacayote (*Cucurbita ficifolia* Bouché). Cada punto representa el promedio de 25 plantas muestreadas por tratamiento.

En altura de planta y número de hojas maduras e inmaduras el mayor daño lo ocasionó la atrazina y simazina porque las plantas fueron más pequeñas y con menos hojas que

se dañaron durante los primeros 30 días y el daño causado por el linuron fue paulatino. A los 45 días existió mayor diferencia entre los tratamientos causados por los herbicidas debido a la inhibición del flujo de electrones durante la fotosíntesis y el testigo continuó su crecimiento normal.

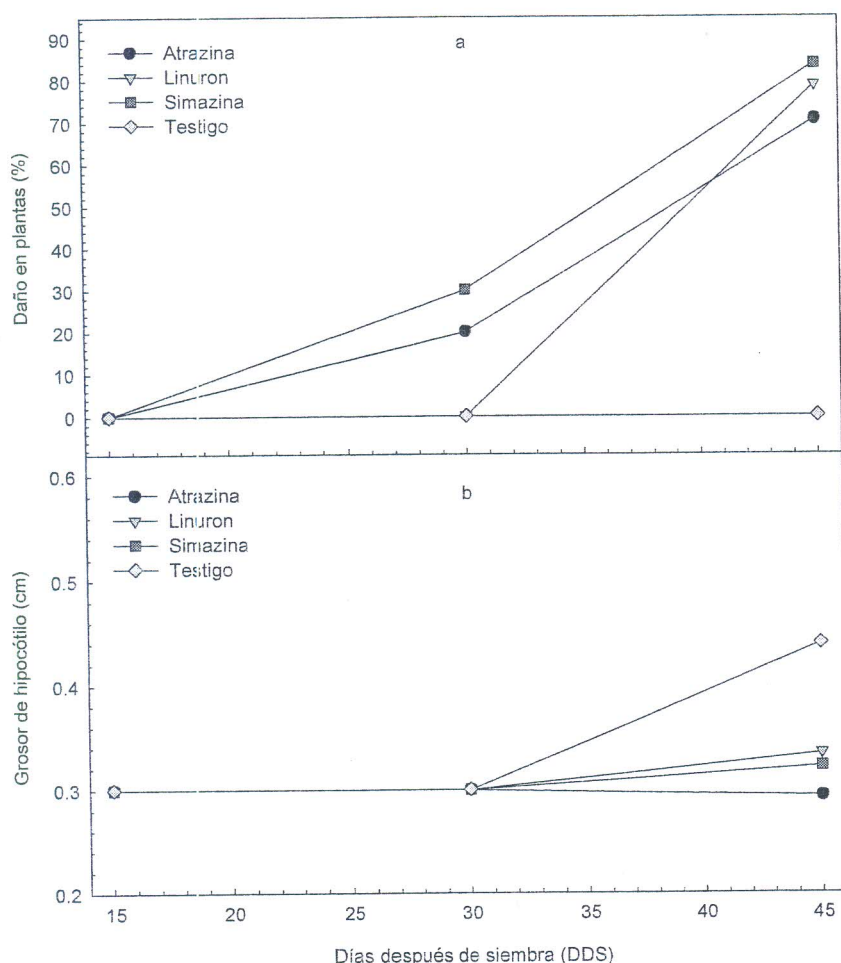


Figura 3. Dinámica del daño en planta (a) y grosor de hipocotilo (b) en chilacayote (*Cucurbita ficifolia* Bouché). Cada punto representa el promedio de 25 plantas muestreadas por tratamiento.

En la Figura 3 se observa que el daño más severo y rápido correspondió a los tratamientos con atrazina y simazina, y en el tratamiento con linuron el daño fue más lento, aunque al final del experimento todas las plantas susceptibles murieron, excepto

en el testigo. Esto porque las plantas alcanzaron menor grosor de hipocotilo (45 dds) y el porcentaje de daño fue mayor.

El grosor del hipocotilo a los 45 dds (Figura 3) fue mayor en el tratamiento de linuron, debido a que las plantas temporalmente sobrevivientes detuvieron su crecimiento para tratar de recuperarse de los daños causados por el herbicida (Siminszky *et al.*, 2000) acumulando carbohidratos en sus partes basales, pero al final murieron, en tanto que las plantas resistentes continuaron su crecimiento normal, mostrando un grosor de hipocotilo equivalente al del testigo porque las plantas siguieron usando sus fotosintatos de manera normal.

Durante los primeros 30 días, se observó que el crecimiento vegetativo de las plantas resistentes y susceptibles fue igual (Figuras 2 y 3) lo que podría tener implicaciones en la habilidad competitiva y en la dinámica de la población de chilacayote frente a biotipos de maleza también resistentes al herbicida, tal como lo señalan Remer y Kropff (1999). Los herbicidas atrazina y simazina causaron daño similar. En el caso de linuron su efecto de daño fue paulatino comparado con el testigo (Figuras 2, 3; Cuadro 1).

Cuadro 1. Comparaciones múltiples de medias de cinco variables de chilacayote (*Cucurbita ficifolia* Bouché) en respuesta a la aplicación de tres herbicidas selectivos usados en maíz, Chapingo, México. 2003.

Tratamiento	Altura de planta (cm)	Número de hojas maduras	Número de hojas inmaduras	Grosor de hipocotilo (cm)	Daño (%)
Atrazina 1800 g i.a. ha ⁻¹	7.24 b ^z	1.80 bc	1.00 b	0.29 b	70.40 c
Linuron 1250 g i.a. ha ⁻¹	15.80 b	2.32 b	1.10 b	0.33 ab	78.60 b
Simazina 1800 g i.a. ha ⁻¹	9.10 b	1.22 c	1.00 b	0.32 b	83.60 a
Testigo	76.42 a	6.04 a	2.08 a	0.44 a	0.00 d
DMS	7.95	0.65	0.16	0.11	4.91

^z Valores con la misma letra dentro de columnas son estadísticamente iguales de acuerdo con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).
DMS: Diferencia mínima significativa.

Resistencia a los herbicidas.

Con la metodología aplicada se obtuvieron plantas resistentes como lo muestra el Cuadro 2 debido a que la población base de chilacayote usada tenía amplia agrobiodiversidad y probablemente a que el germoplasma ha crecido en suelos con estos herbicidas residuales. Entre las posibles bases metabólicas de la resistencia encontrada están la sobreproducción de un sitio bioquímico sensible a herbicida, resultando en una reducida afinidad con el herbicida (Christoferris, 1999); o la degradación-destoxificación del herbicida antes de que alcance el sitio bioquímico clave dentro de la célula de la planta (Stalker *et al.*, 1988), aunque no se descarta encontrar un nuevo mecanismo de resistencia cuando se hagan los estudios específicos necesarios.

Cuadro 2. Número y porcentaje de plantas resistentes de chilacayote (*Cucurbita ficifolia* Bouché) a herbicidas selectivos usados en maíz. Chapingo, México. 2003.

Tratamiento	Dosis (g i.a. ha ⁻¹)	Semillas tratadas	Semillas germinadas	Número de plantas resistentes	Plantas resistentes (%)
Atrazina	1800	2000	1894	62	3.273
Linuron	1250	2000	1918	6	0.313
Simazina	1800	2000	1938	32	1.651
Testigo	-	1000	914	-	-

Se autopolinizaron artificialmente las plantas resistentes para fijar en estado homocigótico los genes de resistencia y estar en posibilidad de encontrar genotipos con resistencia acentuada en las generaciones avanzadas, tal como se ha observado en *Chenopodium album* (Bettini *et al.*, 1987) donde pocas plantas sobrevivientes a herbicida se autopolinizaron y entre sus descendientes se encontraron plantas resistentes a altas cantidades de atrazina (mayor a 40 kg·ha⁻¹) debido a la mutación *psbA* en el aminoácido 264.

Tasa de multiplicación *in vitro*

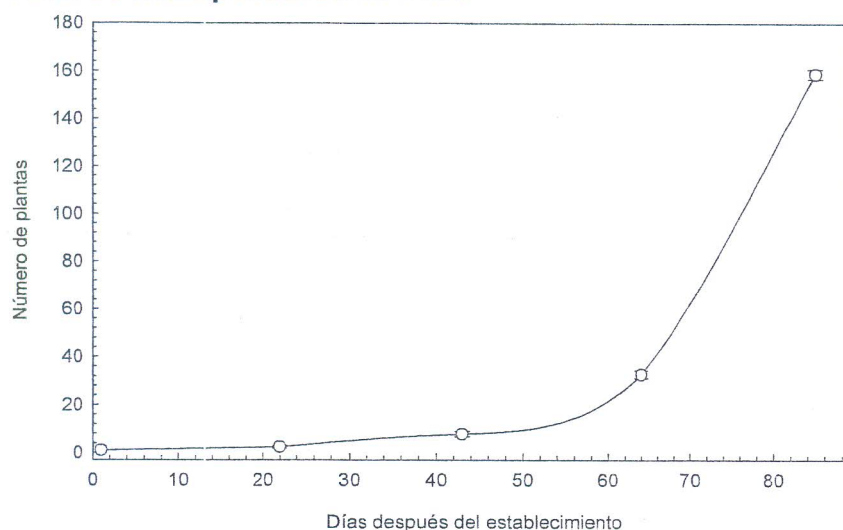


Figura 4. Tasa de multiplicación de chilacayote (*Cucurbita ficifolia* Bouché) en cultivo *in vitro*.

Las plantas resistentes se llevaron a micropropagación en cultivo *in vitro* y la tasa de multiplicación alcanzada (Figura 4) fue de 2.4, 3.3, 4.2 y 4.9 plantas por explante durante el 1er, 2do, 3er y 4to subcultivo, teniendo como promedio 3.68 plantas por periodo de 21 días sin importar el herbicida al que fueran resistentes las plantas, indicando que se puede proyectar la cantidad de plantas y semilla deseadas en un determinado periodo de tiempo.

5.6. CONCLUSIÓN

Fue posible obtener plantas de chilacayote (*Cucurbita ficifolia* B.) resistentes a herbicidas. La magnitud de la frecuencia de plantas resistentes a atrazina, simazina y linuron resultó de 3.273, 1.651 y 0.313 %, respectivamente. Los resultados indicaron y que través de la micropropagación es posible predecir la cantidad de plantas a obtener por unidad de tiempo, teniendo una tasa de multiplicación de 3.68 plantas por explante por periodo de 21 días.

5.7. LITERATURA CITADA

- BETTINI, P.; MCNALLY, S.; SEVIGNAC, M.; DARMENCY, H.; GASQUEZ, J.; DRON M. 1987. Atrazine resistance in *Chenopodium album*. Low and high levels of resistance to the herbicide related to the same chloroplast *psbA* gene mutation. *Plant Physiology* 84:1442-1446.
- CHRISTOFFERS, M. 1999. Genetic aspects of herbicide-resistant weed management. *Weed Technology* 13:647-652.
- DARMENCY, H.; CHAUVEL, B.; GASQUEZ, J.; MATEJICEK, A. 1992. Variation of chlorophyll *a/b* ratio in relation to population polymorphism and mutation of triazine-resistance. *Plant Physiology Biochemistry* 30(1):57-63.
- DE PRADO, R.; DOMÍNGUEZ, C.; TENA, M. 1989. Characterization of triazine-resistant biotypes of common lambsquarters (*Chenopodium album*), hairy fleabane (*Conyza bonaerensis*), and yellow foxtail (*Setaria glauca*) found in Spain. *Weed Science* 37:1-4.
- GARCIA, M. E. 1988. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen. 4ta edición. Instituto de Geografía. UNAM. México. 219 p.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant* 15:473-497.
- REMER, E. K.; KROPFF, M. J. 1999. Comparative growth of triazine-susceptible and resistant biotypes of *Solanum nigrum* at different light levels. *Annals of Botany* 83:637-644.
- SCOTT, P. R.; HOLLINS, T. W. 1974. Effects of eyespot on the yield of winter wheat. *Annals of Applied Biology* 78:269-279.

- SIMINSZKY, B.; SHELDON, B. S.; CORBIN, F. T.; DEWEY, R. E. 2000. A cytochrome P450 monooxygenase cDNA (CYP71A10) confers resistance to linuron in transgenic *Nicotiana tabacum*. *Weed Science* 48:291-295.
- STALKER, D. M.; McBRIDE, K. E; MALYJ, L. D. 1988. Herbicide resistance in transgenic plants expressing a bacterial detoxification gene. *Science* 242:419-423.
- STEINER, A. A. 1984. The universal nutrient solution. *Proceedings International Congress on Soilless Culture* 6:633-650.
- STEVEN, T.; NELLY, G.; EUCL, C.; DAWN S., L. 1999. Mode of resistance of triazine-resistant annual bluegrass (*Poa annua* L.). *Weed Technology* 13:747-752.
- VALDEZ-HERNANDEZ, T.; C. MERRICK, L.; VILLANUEVA-VERDUZCO, C.1998. Horticultural characterization and biodiversity of chilacayote (*Cucurbita ficifolia* Bouché), a high-altitude-adapted squash. p.70-72. *In: Cucurbitacea'98 Evaluation and Enhancement of Cucurbit Germplasm*. McCreight, J.D. (Ed). Pacific Grove, Calif. USA.
- XIONG, J.; SUBRAMANIAN, S.; GOVINDJEE. 1998. A knowledge-based three dimensional model of the photosystem II reaction center of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynthesis Research* 56:229-254.

6. CONCLUSIONES GENERALES

En las cuatro especies de calabazas estudiadas (*Cucurbita pepo* L., *C. argyrosperma* Huber var. *stenosperma*, *C. moschata* Duch. y *C. ficifolia* Bouché) fue posible obtener plantas resistentes a las dosis comerciales de herbicidas atrazina ($1800 \text{ g i.a.ha}^{-1}$), linuron ($1200 \text{ g i.a.ha}^{-1}$) y simazina ($1800 \text{ g i.a.ha}^{-1}$) usadas en maíz, debido a la amplia variabilidad genética existente, indicando que es posible reincorporar el cultivo de la calabaza en asociación con maíz. La tasa promedio de multiplicación *in vitro* para *Cucurbita ficifolia* Bouché., *C. pepo* L., *C. argyrosperma* Huber var. *stenosperma* y *C. moschata* Duch. fue 3.68, 3.41, 3.25 y 2.89 plantas por explante por periodo de 21 días, respectivamente.