



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO**

**DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA  
MAESTRÍA EN PROTECCIÓN VEGETAL**

*Sorghum halepense* (L.) Pers.

**RESISTENTE A NICOSULFURON EN MÉXICO**

**TESIS**

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL  
GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL**

**PRESENTA:**

**JOSÉ IGNACIO SAAVEDRA ÁVILA**

**BAJO LA SUPERVISIÓN DE: DR. ANDRÉS BOLAÑOS  
ESPINOZA**

PROTECCIÓN VEGETAL



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA  
COMITÉ DE SERVICIOS ESCOLARES  
COMISIÓN DE EXÁMENES PROFESIONALES

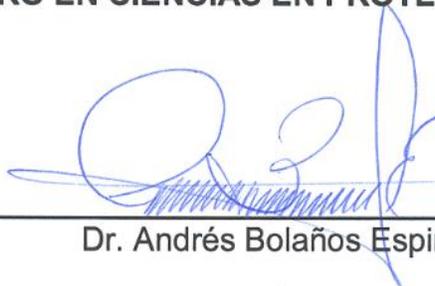
Chapingo, Estado de México, Enero de 2020

***Sorghum halepense* (L.) Pers. RESISTENTE A NICOSULFURON EN  
MÉXICO**

Tesis realizada por **JOSÉ IGNACIO SAAVEDRA ÁVILA** bajo la supervisión, del  
Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito  
parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL**

**DIRECTOR:**



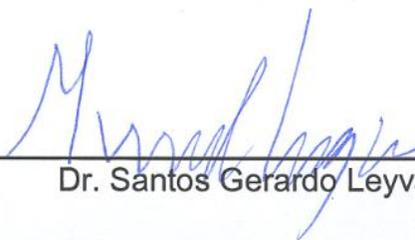
Dr. Andrés Bolaños Espinoza

**ASESOR:**



Dr. Mateo Vargas Hernández

**ASESOR:**



Dr. Santos Gerardo Leyva Mir

## CONTENIDO

GLOSARIO .....	17
1. INTRODUCCIÓN GENERAL .....	19
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	21
2.1 Importancia de las malezas .....	21
2.1.1 Ecología y periodo crítico de competencia de maíz con <i>Sorghum halepense</i> .....	21
2.1.2 Distribución.....	23
2.2 Herbicidas inhibidores de ALS.....	23
2.2.1 Sulfonilureas.....	24
2.2.2 Nicosulfuron .....	24
2.3 Resistencia de malezas a herbicidas.....	25
2.3.1 Resistencia en <i>Sorghum halepense</i> .....	25
2.4 Bioensayos de dosis respuesta .....	26
2.5 Mecanismos de Resistencia .....	28
2.6 LITERATURA CITADA .....	29
3. ARTÍCULO CIENTÍFICO.....	33
TRATAMIENTOS PRE-GERMINATIVOS PARA LA RUPTURA DE LA DORMANCIA DE SEMILLAS DE <i>Sorghum</i> spp. ....	33
3.1 INTRODUCCIÓN.....	35
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS .....	36
3.2.1 Recolección de semillas .....	36
3.2.2 Desarrollo del Experimento .....	36
3.2.3 Porcentaje de germinación (PG) .....	37
3.2.4 Índice de velocidad de germinación (IVG).....	38
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	38
3.3.1 Porcentaje de germinación.....	38
3.3.2 Índice de velocidad de germinación .....	40
3.4 CONCLUSIONES .....	42
3.6 ANEXOS.....	44
4. ARTÍCULO CIENTÍFICO.....	46
ENSAYOS PRELIMINARES DE RESISTENCIA EN BIOTIPOS DE <i>Sorghum</i> spp. A HERBICIDAS INHIBIDORES DE LA ALS, EPSPS Y 4-HPPD .....	46

4.1 INTRODUCCIÓN.....	48
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS .....	49
4.2.1 Recolección de semillas .....	49
4.2.2 Conducción del trabajo de investigación .....	49
4.2.3 Tratamientos y diseño experimental.....	50
4.2.4 Aplicación de los tratamientos.....	50
4.2.5 Variables respuesta.....	50
4.2.6 Análisis estadístico .....	51
4.3 RESULTADOS .....	51
4.3.1 Aplicaciones de glifosato en biotipos de <i>Sorghum</i> spp.....	51
4.3.1.1 Peso de materia verde .....	51
4.3.1.2 Reducción del peso fresco .....	52
4.3.2 Aplicaciones de Topramezone en biotipos de <i>Sorghum</i> spp.....	52
4.3.2.1 Peso de materia verde .....	52
4.3.2.2 Reducción del peso de materia verde .....	53
4.3.3 Aplicaciones de Nicosulfuron en biotipos de <i>Sorghum</i> spp.....	54
4.3.3.1 Peso de materia verde .....	54
4.3.3.2 Reducción del peso de materia verde .....	54
4.4 CONCLUSIONES.....	55
4.5 LITERATURA CITADA .....	56
4.6 ANEXOS.....	57
5. ARTÍCULO CIENTÍFICO.....	58
MECANISMO DE RESISTENCIA EN <i>Sorghum halepense</i> (L.) PERS. A NICOSULFURON EN MÉXICO .....	58
5.1 INTRODUCCIÓN.....	59
5.2 MATERIALES Y MÉTODOS .....	59
5.2.1 Bioensayo de dosis respuesta.....	59
5.2.2 Bioensayo de Inhibición del Citocromo P450 .....	61
5.2.3 Extracción y secuenciación de ADN.....	62
Germinación y trasplante.....	62
Extracción de ADN .....	63
Amplificación y secuenciación.....	64
5.2.4 Análisis estadístico y bioinformatico .....	65
5.3 RESULTADOS .....	65
5.3.1 Bioensayo de dosis respuesta.....	65

5.3.2 Bioensayo de Inhibición del Citocromo P450 .....	67
5.3.3 Extracción, amplificación y secuenciación de ADN .....	69
5.4 CONCLUSIONES .....	72
5.5 LITERATURA CITADA .....	72
5.6 ANEXOS.....	74

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Comparación múltiple de medias con la prueba de Tukey ( $P = 0.05$ ) para los tratamientos pre-germinativos en biotipos de <i>Sorghum</i> spp. Chapingo, México. 2018. ....	39
Cuadro 2. Comparación múltiple de medias con la prueba de Tukey ( $P = 0.05$ ) para los tratamientos pre-germinativos en biotipos de <i>Sorghum</i> spp. Chapingo, México. 2018. ....	39
Cuadro 3. Tratamientos evaluados en el bioensayo de selección de biotipos con sospechas de resistencia. ....	50
Cuadro 4. Dosis crecientes de nicosulfuron en el bioensayo de dosis-respuesta en biotipos de <i>Sorghum halepense</i> . Chapingo, México. ....	61
Cuadro 5. Tratamientos de los bioensayos de inhibición del citocromo P450 en biotipos de <i>Sorghum halepense</i> . Chapingo, México. ....	62
Cuadro 6. Secuencia de Iniciadores utilizados en la PCR, para las muestras de ADN de los biotipos de <i>Sorghum halepense</i> . Chapingo, México. 2019. ....	64
Cuadro 7. Parámetros estimados del modelo logístico, y valores de $RC_{50}$ e IR del bioanálisis de dosis respuesta para los biotipos de <i>Sorghum halepense</i> . Chapingo, México. 2019. ....	66
Cuadro 8. Reducción del peso de materia verde en biotipos de Sorhum halepense por efecto del herbicida nicosulfuron respecto al control (testigo). Chapingo, México. 2019. ....	67
Cuadro 9. Parámetros estimados del modelo logístico, y valores de $RC_{50}$ e IR del bioanálisis de dosis respuesta con y sin malation, para los biotipos Comonfort y El Marcial. Chapingo, México. 2019. ....	68
Cuadro 10. Concentración y pureza de las muestras de ADN en los biotipos de <i>Sorghum halepense</i> . UFPR, Brasil. 2019. ....	69

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Características Morfológicas de <i>Sorghum halepense</i> .....	22
Figura 2. Distribución a nivel mundial de <i>Sorghum halepense</i> (CABI, 2019)....	23
Figura 3. Biosíntesis y mecanismo de acción de los inhibidores de ALS. Elaborado en base a (Agostinetto & Vargas, 2014). .....	24
Figura 4. Incremento de la resistencia a nivel global en <i>Sorghum halepense</i> . Elaborado en base a datos de (Heap, 2019). .....	26
Figura 5. Curva de dosis respuesta correspondiente a la ecuación anterior adaptado de (Seefeldt et al., 1995). .....	27
Figura 6. Representación esquemática de los principales mecanismos de resistencia A; Resistencia en el sitio objetivo. B; Resistencia fuera del sitio objetivo, Adaptado de (Cobb & Reade, 2011). .....	29
Figura 7. Porcentaje de germinación para los diferentes biotipos de <i>Sorghum</i> spp. a los 3, 7 y 10 DDS. Barras con la misma letra por días, no son estadísticamente diferentes (Tukey, P=0.05). .....	40
Figura 8. Tratamientos mostrando el Índice de Velocidad de Germinación (IVG) en los diferentes biotipos. ....	41
Figura 9. Peso de materia verde en biotipos de <i>Sorghum</i> spp. por aplicaciones de glifosato en dosis de 2 y 4 L ha <sup>-1</sup> .....	51
Figura 10. Reducción del peso fresco en biotipos de <i>Sorghum</i> spp. por efecto de aplicaciones de glifosato. ....	52
Figura 11. Peso fresco de los diferentes biotipos de <i>Sorghum</i> spp., por efectos de topamazone a los 21 DDA. ....	53
Figura 12. Reducción del peso de materia verde en biotipos de <i>Sorghum</i> spp. por efectos de topamazone a los 21 DDA. ....	54
Figura 13. Peso de materia verde de los diferentes biotipos de <i>Sorghum</i> spp. por efecto del herbicida nicosulfuron 21 DDA. ....	54
Figura 14. Reducción del peso de materia verde en biotipos de <i>Sorghum</i> spp. por efectos de nicosulfuron a los 21 DDA. ....	55

## ANEXOS

Anexo 1. Germinación de semillas <i>Sorghum</i> spp. ....	44
Anexo 2. . Microscopia de barrido electrónico en glumas de <i>Sorghum</i> spp.....	45
Anexo 3. Biotipos de <i>Sorghum halepense</i> seleccionados para el bioensayo general de dosis respuesta con nicosulfuron. ....	57
Anexo 4. Bioensayo general de dosis respuesta y electroferograma de un biotipo resistente (Oro Verde) y uno susceptible (Comonfort) presentando el cambio de bases GAA a GAT en el gen ALS. ....	74

En memoria de  
Justina Ávila  
1961-2006

*“Tu tiempo es limitado, de modo que no lo malgastes viviendo la vida de alguien distinto. No quedes atrapado en el dogma, que es vivir como otros piensan que deberías vivir. No dejes que el ruido de las opiniones de los demás ahogue tu propia voz interior. Y, lo que es más importante, ten el coraje de seguir a tu corazón y tu intuición. De algún modo él ya sabe lo que realmente quieres llegar a ser. Todo lo demás es secundario”.*

*(Steve Jobs).*

## **DEDICATORIA**

*A Dios por permitirme llegar a este punto de mi vida.*

*A mi madre Justina Ávila, por el amor infinito y consejos que hoy me motivan a ser mejor persona "gracias mami"*

*A mi padre Feliz Saavedra por el apoyo incansable que siempre tuvo con todos sus hijos y por superar los obstáculos que la vida le puso en su camino "gracias viejo".*

*A mis hermanas Erika y Verónica Saavedra, por el cariño y apoyo moral que siempre me brindaron "gracias par de Chjampudas".*

*A Ivon Arce, por ser quien me ha impulsado a seguir adelante, te agradezco todo tu apoyo y amor incondicional durante todos estos años "gracias gorda".*

*A mi familia, amigos, profesores y personas que a lo largo de este tiempo me han apoyado personal y profesionalmente.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A México, por medio del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca para la realización de los estudios de Maestría.

A la UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO por cobijarme y brindarme todas las facilidades en el ámbito académico y personal.

Al M.C. ANTONIO SEGURA MIRANDA y MARY ESPEJEL CERVANTES por llevar adelante el programa de Maestría en Ciencias en Protección Vegetal además de la predisposición y ayuda incondicional en el ámbito académico y personal.

Al Doctor ANDRÉS BOLAÑOS ESPINOZA, por su apoyo incondicional en el trabajo de tesis, pero sobre todo por su amistad. Para usted y toda su familia reciba mis más sinceros agradecimientos.

Al Dr. MATEO VARGAS HERNÁNDEZ, por la predisposición y colaboración en la realización del trabajo de investigación.

Al Doctor BERNAL E. VALVERDE por sumarse desinteresadamente a este proyecto, aportando su valioso conocimiento en tema de investigación.

Al Ingeniero NATANAEL PRIETO CRUZ por la colaboración en la recolección del material vegetal.

A los Doctores PATRICK J. TRANEL de la Universidad de Illinois (EEUU) e HILDA VICTORIA SILVA-ROJAS (Colegio de Postgraduados, México), por las observaciones y comentarios acertados para el enriquecimiento científico de esta tesis.

A los Doctores ARTHUR ARROBAS MARTINS BARROSO y LEILA DO NASCIMENTO VIEIRA de la Universidad Federal de Paraná en Brasil por el recibimiento y colaboración en la parte molecular de esta investigación.

A mis compañeros de Maestría, por brindarme su amistad y apoyo absoluto durante mi estancia en este hermoso país. Gracias por hacerme sentir en casa.

A mi familia, amigos, profesores, y cada una de las personas que se cruzaron a lo largo de mi vida. Muchísimas gracias por su apoyo. No habría llegado hasta aquí si no fuera por la ayuda y colaboración desinteresada de cada uno de ustedes. Dios los bendiga a todos.

## DATOS BIOGRÁFICOS

### DATOS PERSONALES

Nombre: José Ignacio Saavedra Ávila

Fecha de nacimiento: 13 de septiembre de 1992

Lugar de Nacimiento: Vallegrande, Santa Cruz, Bolivia.

Profesión: Ingeniero Agrónomo



José Ignacio Saavedra Ávila nació en la provincia Vallegrande perteneciente al Departamento de Santa Cruz (Bolivia), sus estudios de preparatoria los concluyó en el Colegio Fátima obteniendo el bachillerato en 2009. En Agosto de 2010 hace su ingreso a la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma Gabriel René Moreno graduándose en 2014; en su época universitaria fue auxiliar de cátedra de la asignatura Manejo Integrado de Plagas. Su trabajo de tesis lo realizó en la empresa “Usuri” Semillas S.R.L. permitiéndole obtener su título de universitario en 2016. El mismo año ingreso como Técnico de Ventas en la Agropecuaria “Agrovet-Montero”, también impartió cátedra a nivel Técnico Superior en el Instituto Andrés Ibáñez. En 2017 hace su ingreso a la Empresa MAINTER S.R.L. desempeñando funciones de Ventas de Agroquímicos, para posteriormente asumir el cargo de Desarrollo e Investigación de agroquímicos y semillas de la misma empresa.

En enero de 2018 gracias a una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) hace su ingreso al Programa de Maestría en Ciencias en Protección Vegetal perteneciente a la Universidad Autónoma Chapingo de México; titulándose en enero de 2020.

## **<sup>1</sup>RESUMEN GENERAL**

### ***Sorghum halepense* (L.) Pers. RESISTENTE A NICOSULFURON EN MÉXICO**

*Sorghum halepense* es una de las peores malezas del mundo, se reproduce por medio de semillas y rizomas, siendo extremadamente agresiva y difícil de controlar en maíz, cultivo base de la alimentación mexicana. El control químico es común para su control; sin embargo, el uso de un mismo ingrediente activo puede traer consigo la resistencia a herbicidas. Se realizaron tres estudios; el primero acerca de los tratamientos pre-germinativos para la ruptura de la dormancia de semillas de *Sorghum* spp. (*Sorghum halepense*, *Sorghum bicolor*), en el que se evaluaron 11 tratamientos. El mejor método fue la escarificación manual, potenciando su germinación en un 64.73%, respecto al testigo absoluto. El segundo estudio consistió en realizar ensayos preliminares de resistencia en biotipos de *Sorghum* spp. a herbicidas inhibidores de la ALS, EPSPS y 4-HPPD. Los resultados mostraron una alta susceptibilidad en todos los biotipos al herbicida glifosato (EPSPS) a dosis de 2.0 y 4.0 L ha<sup>-1</sup>; todas las poblaciones de *Sorghum* spp. exhibieron tolerancia a topramezone (4-HPPD) a dosis de (100 y 200 mL ha<sup>-1</sup>). Los biotipos de *Sorghum halepense* B7, B4 y B13 presentaron las menores reducciones de su peso de materia fresca, con respecto a sus testigos, contrario a ello el biotipo 17 fue el que exhibió la mayor reducción del peso de materia verde, en su dosis de 2.5 L ha<sup>-1</sup> de nicosulfuron (Sulfoniurea-ALS). Se concluye realizar los ensayos generales de dosis respuesta con los biotipos B7, B4 y B13 con sospecha de resistencia y el biotipo 17 como susceptible. El tercer estudio se centró en realizar bioensayos de dosis-respuesta y dilucidar el mecanismo de resistencia en los biotipos B4 (Oro verde), B7 (El Marcial), B13 (Francisco Villa) y B17 (Comonfort). Los resultados mostraron resistencia a nicosulfuron en los biotipos Oro verde, El Marcial y Francisco villa, siendo 69, 34 y 92 más resistentes que el biotipo susceptible (Comonfort). Los tres biotipos resistentes mostraron un cambio de bases en los nucleótidos GAT a GGA, lo que resultó en una sustitución del aminoácido Asp (ácido aspártico) a Glu (ácido glutámico) en la posición 376 del gen ALS. Hasta donde se tiene información este es primer caso en México con esta mutación en esta especie, que otorga resistencia a nicosulfuron.

Palabras claves: Malezas, Herbicidas, Mutación.

---

<sup>1</sup> Tesis de Maestría en Ciencias, Posgrado en Protección Vegetal, Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo  
Autor: Ing. Agr. José Saavedra Ávila  
Director de tesis: Dr. Andrés Bolaños Espinoza

## **<sup>2</sup>GENERAL SUMMARY**

### ***Sorghum halepense* (L.) Pers. RESISTANT TO NICOSULFURON IN MEXICO**

*Sorghum halepense* is one of the worst weeds in the world, it reproduces through seeds and rhizomes, being extremely aggressive and difficult to control in corn, the basic crop of Mexican food. Chemical control is common for its control; however, the use of the same active ingredient can lead to herbicide resistance. Three studies were carried out; the first one about pre-germinative treatments for the rupture of the dormancy of *Sorghum* spp. seeds. (*Sorghum halepense*, *Sorghum bicolor*), in which 11 treatments were evaluated. The best method was manual scarification, increasing germination by 64.73% compared to the absolute control. The second study consisted of preliminary resistance tests in *Sorghum* spp. biotypes to ALS inhibitor herbicides, EPSPS and 4-HPPD. The results showed high susceptibility in all biotypes to the herbicide glyphosate (EPSPS) at doses of 2.0 and 4.0 L ha<sup>-1</sup>; all populations of *Sorghum* spp. exhibited tolerance to topramezone (4-HPPD) at doses of (100 and 200 mL ha<sup>-1</sup>). The biotypes of *Sorghum halepense* B7, B4 and B13 presented the smallest reductions in their weight of fresh matter, with respect to their controls, while the biotype 17 was the one that exhibited the greatest reduction in the weight of green matter, at the dose of 2.5 L ha<sup>-1</sup> of nicosulfuron (Sulfoniurea-ALS). The general dose response tests help to get the conclusion that biotypes B7, B4 and B13 with suspected resistance and biotype B17 as susceptible. The third study focused on carrying out dose-response bioassays and elucidating the resistance mechanism in biotypes B4 (Oro Verde), B7 (El Marcial), B13 (Francisco Villa) and B17 (Comonfort). The results showed resistance to nicosulfuron in the biotypes Oro verde, El Marcial and Francisco Villa, being 69, 34 and 92 more resistant than the susceptible biotype (Comonfort). The three resistant biotypes showed a change of bases in the GAT to GGA nucleotides, which resulted in a substitution of the amino acid Asp (aspartic acid) to Glu (glutamic acid) in the 376 position of the ALS gene. As far as information is available this is the first case in Mexico with this mutation in this species, which gives resistance to nicosulfuron.

Keywords: Weeds, Herbicides, Mutation.

---

<sup>2</sup> Master of Science Thesis, Postgraduate in Plant Protection, Department of Agricultural Parasitology, Universidad Autónoma Chapingo  
Author: Ing. Agr. José Saavedra Ávila  
Thesis Director: Dr. Andrés Bolaños Espinoza

## GLOSARIO

### **Aminoácido**

Elemento básico del que están formados las proteínas y péptidos (Griffiths, Miller, Suzuki, Lewontin & Gelbart, 2002).

### **Alelo**

Una de las diferentes formas de un gen que pueden darse en un único locus (Griffiths *et al.*, 2002).

### **Biotipo**

Grupo de plantas en una especie con características biológicas que no son comunes a la población como un todo. En general, los biotipos no presentan características morfológicas que les permitan diferenciarse visualmente (Vidal, 1997).

### **Enzima**

Proteína que acelera una reacción química en las células (Vidal, 1997).

### **Gel de Agarosa**

Soporte de polisacárido no tóxico, macroporoso e inerte para la separación electroforética de moléculas de ARN y ADN de acuerdo con su tamaño y conformación (Valadez & Kahl, 2000).

### **Mutación**

Cambio heredable en el material genético (Nandula, 2010).

### **Mutante**

Organismo con alteración heredable de una característica biológica (Vidal, 1997).

## **Nucleótido**

Molécula compuesta por una base nitrogenada, un azúcar y un grupo fosfato; se trata del elemento estructural básico de los ácidos nucleicos (Griffiths *et al.*, 2002).

## **Resistencia**

Es la capacidad natural de algunos biotipos de malezas dentro de una población para sobrevivir al tratamiento con herbicida, que bajo las condiciones adecuadas de uso controlan la población de malezas, la selección de biotipos resistentes puede eventualmente dar lugar a fallas de control de las malezas (Heap, 1997).

## **Resistencia cruzada**

Es la resistencia de un biotipo de una maleza a uno o más herbicidas, debido a la presencia de un mecanismo individual de resistencia (Valverde, Riches, & Caseley, 2000).

## **Resistencia Múltiple**

Se refiere a situaciones en las que las plantas (malezas) poseen dos o más mecanismos distintos de resistencia (Heap, 1997).

## **Reacción de polimerización en cadena (PCR)**

Procedimiento de síntesis y duplicación *in vitro* mediante el cual fragmentos de ADN mayores a 15 kilobases de longitud pueden amplificarse alrededor de  $10^8$  veces (Valadez & Kahl, 2000).

## **Tolerancia**

Es la capacidad hereditaria natural que tienen todas las poblaciones de una maleza para sobrevivir y reproducirse después del tratamiento con un herbicida. (Valverde *et al.*, 2000).

## 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El maíz es uno de los cereales más importantes utilizados por el hombre desde épocas remotas, su centro de origen es México desde donde se difundió a todo el mundo (Paliwal, 2001). Debido a sus múltiples aplicaciones tanto en la alimentación humana como animal, juega un papel socioeconómico relevante (Fancelli, 2011). El (SIAP) Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2019), menciona que la superficie de maíz sembrada (riego y temporal<sup>1</sup>) en México en 2018 fue de 7, 345,786 hectáreas, con una producción de 21,185,003 toneladas, y un rendimiento promedio de 3.9 t ha<sup>-1</sup>. Para mantener estos rendimientos es necesario realizar un control integral de enfermedades, plagas y principalmente de malezas.

Las malezas son una limitante importante en la producción agrícola, hasta el momento no hay concordancia precisa de las pérdidas económicas en los cultivos, sin embargo, para darnos una idea del problema, Soltani, Dille, Burke y Everman (2016), determinaron que la interferencia de malezas en el cultivo de maíz en los Estados Unidos y Canadá, ascendió a 52 % de pérdidas del rendimiento equivalentes a 142 millones de toneladas de maíz disminuidas anualmente.

Es por esta razón la necesidad de utilizar herbicidas sintéticos, empleados para matar las malas hierbas, estos xenobioticos actúan inhibiendo letalmente la actividad de las proteínas cruciales para los procesos fisiológicos de las malezas (Délye, Jasieniuk & Le Corre, 2013). Los herbicidas han proporcionado a los agricultores un éxito sin precedentes en el control de las malezas en los últimos 65 años, sin su utilización el mundo se enfrentaría a una gran reducción en los rendimientos de los cultivos que resultarían en altos costos y escasez de alimentos (Heap, 2014). Sin embargo, el uso frecuente de los mismos materiales activos de herbicidas, ha sido la causa de la rápida evolución de la resistencia de ciertas malezas a herbicidas (Powles & Yu, 2010). Actualmente hay 510 casos de malezas resistentes a herbicidas en todo el mundo, en 262 especies (152 dicotiledóneas y 110 monocotiledóneas). Las malezas han

desarrollado resistencia a 23 de los 26 sitios de acción de herbicidas conocidos y a 167 herbicidas diferentes. Se han reportado malezas resistentes a herbicidas en 93 cultivos y 70 países (Heap, 2019).

Tranel y Wright (2002) mencionan que los herbicidas inhibidores de la enzima Acetolactato Sintasa (ALS) están entre los más utilizados en el mundo; sin embargo, estos herbicidas son también conocidos por su capacidad para seleccionar poblaciones de malezas resistentes. Además indican, que hay más especies de malezas que son resistentes a inhibidores de ALS que a cualquier otro grupo de herbicidas. Al respecto, Heap (2019) señala que son 165 biotipos de malezas que se han reportado con resistencia a este grupo de herbicidas en diferentes países.

*Sorghum halepense* también conocido como Johnson grass o Sorgo de Alepo, es nativo del sur de Euroasia e India, esta especie está presente en la mayoría de las zonas tropicales y templadas de la tierra, además de estar catalogado como una de las peores malezas del mundo, su presencia en los cultivos es resultado de pérdidas severas en los rendimientos, ya sea por la competencia directa o por efectos alelopáticos; así mismo, es un hospedero alternativo para varias plagas en los diferentes cultivos (Warwick & Black, 1983).

En el presente documento se exhiben resultados acerca de las investigaciones realizadas durante el periodo comprendido del año (2018-2019), con biotipos de *Sorghum halepense* y *Sorghum bicolor*. Como primer estudio se presentan datos acerca de tratamientos pregerminativos para romper la dormancia de semillas de *Sorghum* spp. Continuando con el siguiente capítulo, se muestran resultados sobre ensayos preliminares de resistencia de 17 biotipos de *Sorghum* spp. a herbicidas inhibidores de 4-HPPD, EPSPS y ALS (topramezone, glifosato y nicosulfurón respectivamente). Finalmente en un tercer capítulo se exhiben resultados sobre bioensayos de dosis-respuesta, realizados con cuatro poblaciones de *Sorghum halepense* al herbicida nicosulfuron. El objetivo principal de la investigación fue determinar si las poblaciones de *S. halepense* provenientes de Veracruz y Guanajuato presentan

algún grado de resistencia al herbicida nicosulfuron, para posteriormente dilucidar su mecanismo de resistencia.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Importancia de las malezas

Las malezas han afectado las actividades humanas, incluida la agricultura desde hace siglos. Si miramos el escenario global, los principales contribuyentes de la pérdida de los cultivos son las malezas, seguido de plagas insectiles y patógenos, los herbicidas que representan el 47.6 % de la ventas mundiales de pesticidas seguido por insecticidas con un 29.4%, fungicidas (17.5%) y otros pesticidas (5.5%) (Vats, 2015).

#### 2.1.1 Ecología y periodo crítico de competencia de maíz con *Sorghum halepense*.

*Sorghum halepense* es un pariente silvestre cercano del sorgo cultivado (Sun, Skinner & Liang, 1994). Originario de la región mediterránea es una de las peores malezas del mundo (Lorenzi, 1991). Es de ciclo perenne, se reproduce por medio de rizomas y semillas llegando a producir más de 8000 semillas/m<sup>2</sup> en lugares densos (Scopel, Ballare & Ghera, 1988). Para Ghosheh, Holshouser y Chandler (1996) el periodo crítico de competencia de maíz infestado con *S. halepense* es de 3 a 6.5 semanas después de la emergencia del cultivo. Controlar esta maleza en este periodo de tiempo, evita pérdidas en la reducción del rendimiento. En la Figura 1. se muestran las principales características morfológicas para identificar a esta especie.

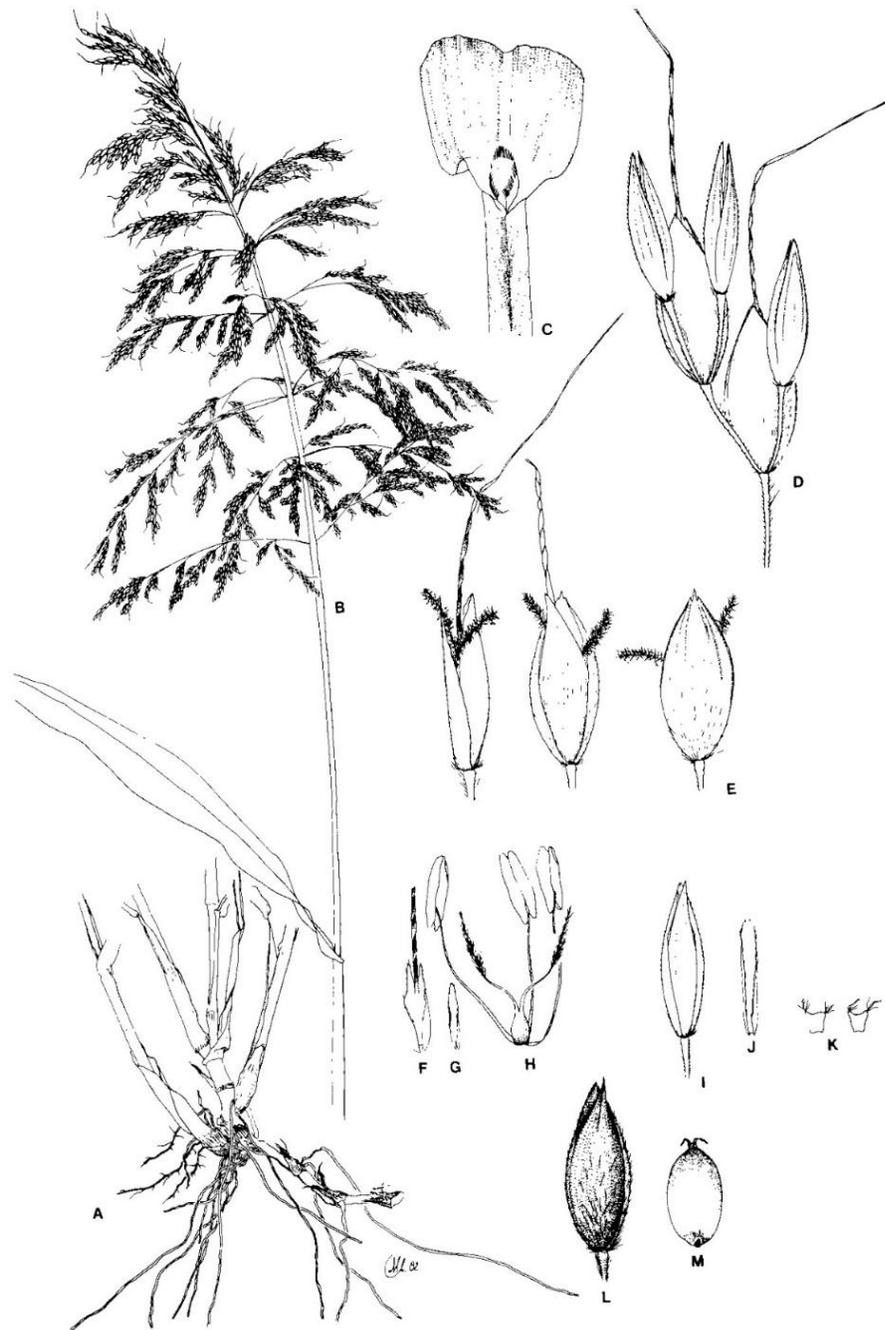


Figura 1. Características Morfológicas de *Sorghum halepense*.

A, base de la planta con rizomas; B, inflorescencia; C, lígula; D, extremo terminal de la rama que muestra dos espiguillas sésiles y tres pediceladas; E-H, espiguilla sésil; E, espiguilla entera en la antesis, vista lateral ventral y dorsal; F, lema; G, palea; H, estambres y pistilos; I, J, espiguilla pedicelada; I, espiguilla entera, vista ventral; J, lema; K, lodículas; L, espiguilla sésil en el fruto, grano encerrado por glumas; M, grano o cariopsis. Escala A-B  $\frac{1}{2}$  X; C-M 8 X. (Warwick & Black, 1983).

### 2.1.2 Distribución

De acuerdo con Holm (1977) *Sorghum halepense* se distribuye por todas las regiones agrícolas tropicales del mundo, como son Centro y Sur América, Euro Mediterránea, África, India, Australia y Lejano Oriente (Figura 2).

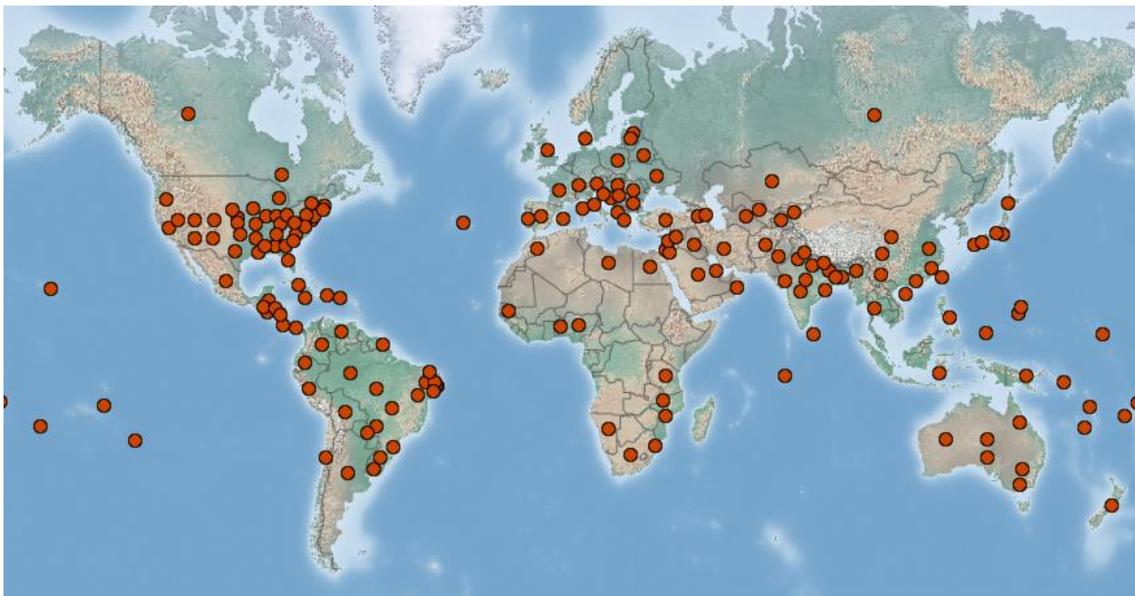


Figura 2. Distribución de *Sorghum halepense* en el mundo (CABI, 2019).

### 2.2 Herbicidas inhibidores de ALS

Los herbicidas inhibidores de la enzima acetolactato sintasa (ALS), desde su introducción a principios de los años 1980 se encuentran entre los productos químicos más utilizados para el control de malezas (Zhou, Liu, Zhang, & Liu, 2007). Acetolactato sintasa (ALS), es la enzima encargada de catalizar la biosíntesis de aminoácidos esenciales de cadena ramificada que son; valina, leucina e isoleucina (Whitcomb, 1999). La biosíntesis consiste en la condensación de dos moléculas de piruvato para formar 2-acetolactato que es precursor de la síntesis de valina y leucina, y la otra reacción es la condensación de piruvato con 2-cetobutirato para la síntesis de isoleucina (Fig. 3) (Kishore & Shah, 1988). Estos aminoácidos son sintetizados en plantas, algas, hongos, bacterias y arqueas excepto por animales (McCourt, & Duggleby, 2006). Por tanto, herbicidas pertenecientes a los grupos químicos: Sulfonilureas, Imidazolinonas, Triazolopirimidinas, Pirimidiniltio-benzoatos y

Sulfonilamino-carboniltriaolinonas, inhiben esta enzima (Zhou, Liu, Zhang, & Liu, 2007). La inhibición priva a las plantas de estos aminoácidos esenciales lo que conduce a la muerte de las mismas (Yu & Powles, 2014).

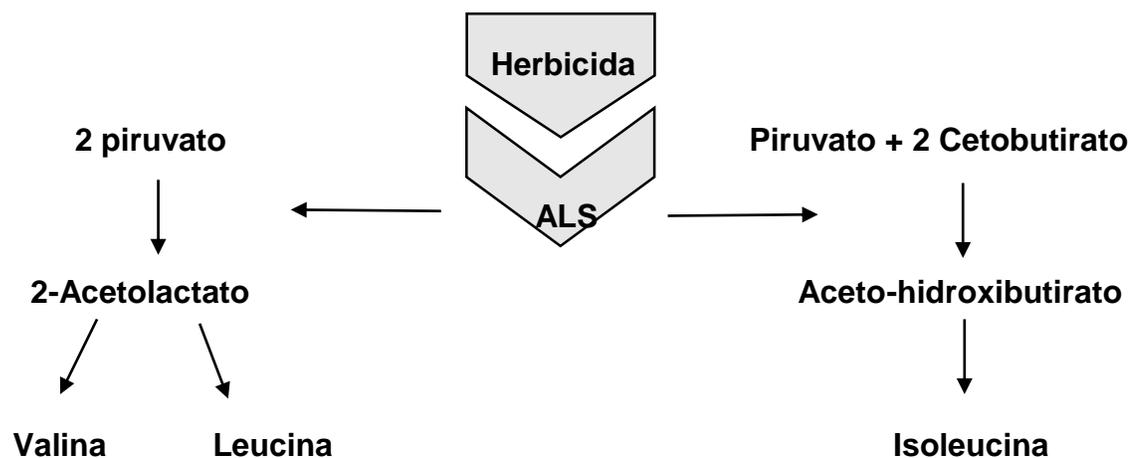


Figura 3. Biosíntesis y mecanismo de acción de los inhibidores de ALS. Elaborado en base a (Agostinetto & Vargas, 2014).

### 2.2.1 Sulfonilureas

Esta familia de herbicidas se caracteriza por su amplio espectro de control de malezas, buena selectividad en cultivos debido a una rápida inactivación metabólica del herbicida en cultivos tolerantes (1 a 5 horas), muy baja toxicidad en animales, tasas mínimas de aplicación que van desde los 2.0 g ha<sup>-1</sup>; se han comercializado para controlar malezas en cultivos como trigo, cebada, arroz, maíz, soya y muchos otros más (Brown, 1990).

### 2.2.2 Nicosulfuron

Pertenece al grupo químico de las Sulfonilureas, desarrollado por la empresa DUPONT/ISK con el código DPX-V9360/SL-950 en el año 1991, está recomendado para controlar malezas en el cultivo de maíz (Saari, Cotterman, & Thill, 2018). Algunos de los síntomas visibles en las malezas sensibles como ya es característico de los inhibidores de ALS, es la inhibición del crecimiento, clorosis en el meristemo apical, las nervaduras de las hojas desarrollan

pigmentos antocianinicos, en algunos casos se desarrolla acortamiento de los entrenudos y engrosamiento de la base del tallo (Vidal & Merotto, 2001).

### **2.3 Resistencia de malezas a herbicidas**

Shaner (2014) indica que, la selección de poblaciones de malezas resistentes a herbicidas comenzó con la introducción de herbicidas sintéticos a fines de la década de 1940. Así mismo, señala que durante los primeros 20 años después de su introducción, se informaron casos limitados de malezas resistentes a herbicidas, esto cambió en 1968 con el descubrimiento de *Senecio vulgaris* resistente a triazinas. Durante los siguientes 15 años, los casos de malezas resistentes a los herbicidas aumentaron, principalmente a los herbicidas triazínicos, sin embargo, no fue hasta finales de la década de 1980, con el descubrimiento de la resistencia a los inhibidores de la acetil Co-A carboxilasa (ACCase) y acetolactato sintasa (ALS) que la resistencia a los herbicidas atrajo mucha más atención, particularmente de la industria, por la rápida evolución de la resistencia a estas clases de herbicidas.

#### **2.3.1 Resistencia en *Sorghum halepense***

Heap (2019) menciona que *S. halepense* presenta 28 casos de resistencia a nivel mundial a herbicidas inhibidores de ACCase, Tubulina, ALS, EPSPS y ACCase + EPSPS. Además indica que, los primeros casos de resistencia se dieron en Estados Unidos de América, en los Estados de Mississippi, Kentucky, Tennessee, Virginia, Louisiana, Texas y West Virginia; posteriormente los casos de resistencia se extendieron en países como Argentina, Grecia, Italia, Israel, Chile, México, Venezuela, Serbia, España y Hungría (Figura 4). Los primeros estudios demostraron resistencia a inhibidores de ACCase como fluazifop-P, quizalofop-P, y setoxidim (Smeda, Snipes & Barrentine, 1997; Bradley & Hagood, 2001). Más tarde mediante ensayos de espectrofotometría, se demostró que la resistencia del sitio objetivo a los inhibidores de ACCase se podía expresar en el polen de *Sorghum halepense* (IR = 6.1) veces más, respecto al biotipo susceptible (Burke, Holland, Burton, York, & Wilcut, 2007).

También se ha demostrado la resistencia mediante inhibición enzimática con inhibidores de ALS, los cuales han mostrado (IR) hasta 15.9 veces más, que el biotipo susceptible (Bozic, Vrbnicanin, Barac & Stefanovic, 2007).

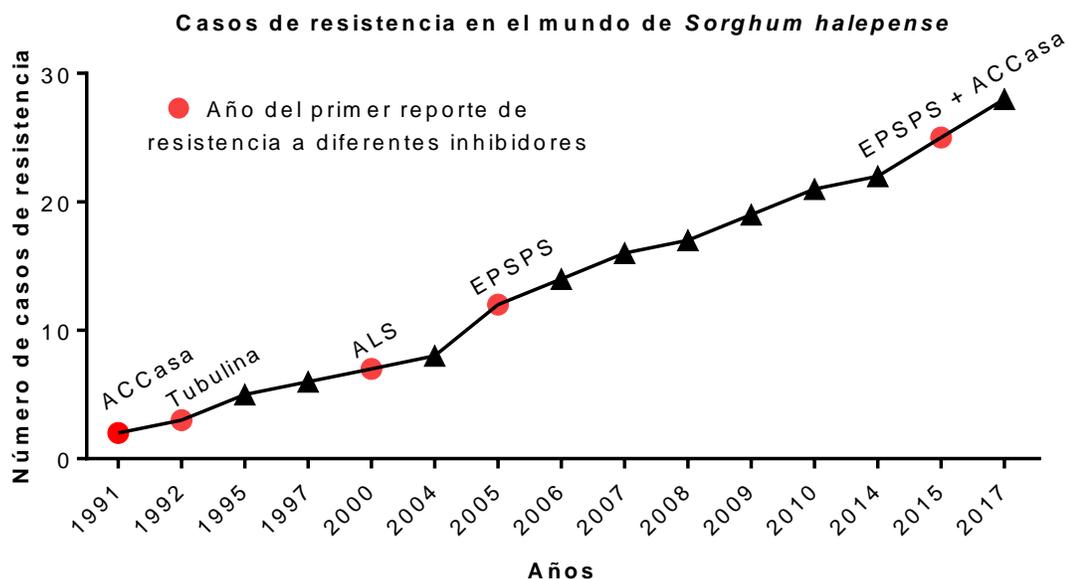


Figura 4. Resistencia de *S. halepense* a nivel mundial. Elaborado en base a información de Heap (2019).

#### 2.4 Bioensayos de dosis respuesta

Los bioensayos de dosis respuesta se basan principalmente en la respuesta de las plantas a herbicidas, se pueden utilizar varios parámetros de respuesta como; germinación, peso, tamaño de las partes de las plantas, modificaciones en las principales actividades fisiológicas como la fotosíntesis, transpiración y síntomas (Horowitz, 1976). Para analizar estas respuestas cuantitativas se utilizan de manera muy común los modelos log-logístico, los cuales han sido utilizados ampliamente y con éxito en la ciencia de las malezas, durante muchos años (Seefeldt, Jensen & Fuerst, 1995; Bellio, Jensen & Seiden, 2000). La ecuación matemática se expresa de la siguiente manera:

$$y = c + \frac{d - c}{1 + \exp(b(\log(x) - \log(RC_{50})))}$$

A partir de esta ecuación se puede generar una curva sigmoidea definiendo sus parámetros de la siguiente manera: (y) es la respuesta de la planta a la dosis del herbicida, c y d son límites inferior y superior, b es la pendiente de la curva y  $RC_{50}$ , es reducción del crecimiento, peso de biomasa de la planta en un 50 % por efecto del herbicida (Figura 5) (Seefeldt *et al.*, 1995).

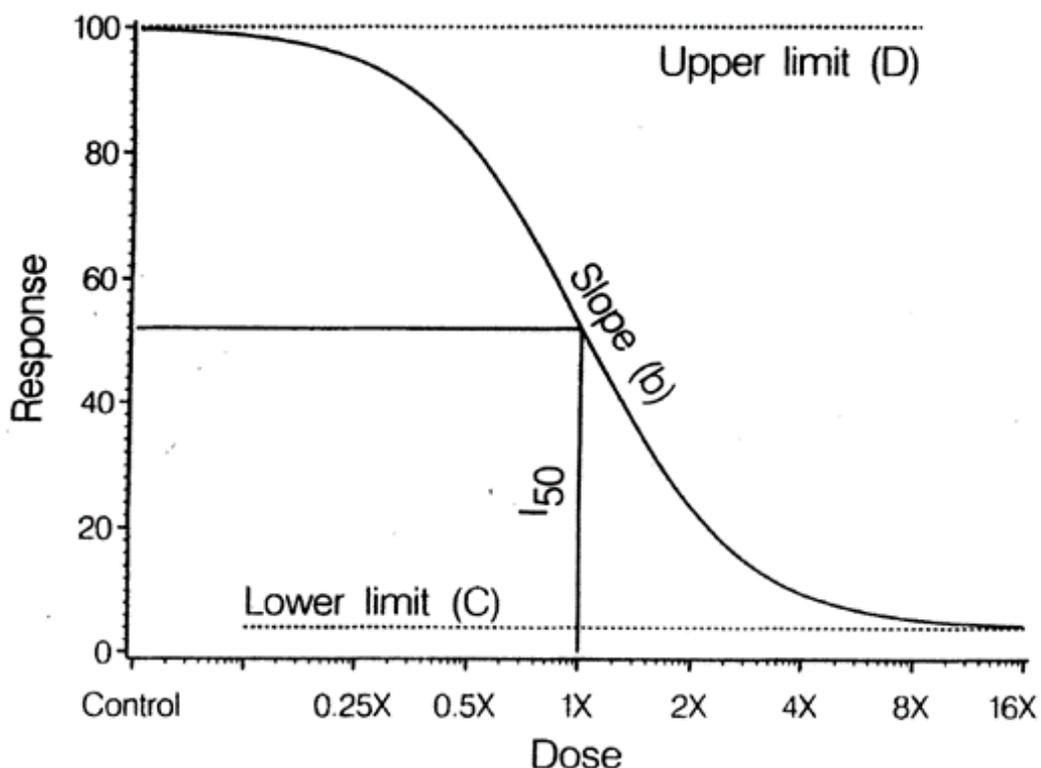


Figura 5. Curva de dosis respuesta correspondiente a la ecuación anterior adaptado de (Seefeldt *et al.*, 1995).

Una de las características a tomar en cuenta al momento de realizar los bioensayos dosis-respuesta, es elegir el ámbito de dosis correcta, es importante que las dosis sean proporcionalmente superiores e inferiores a la dosis recomendada, al tratarse de modelos logarítmicos se recomienda que exista una proporción geométrica entre la dosis comercial por ejemplo; para biotipos con sospecha de resistencia se pueden utilizar dosis comerciales (X) con múltiplos de 2 (0X, 1/8X, 1/4X, 1/2X, X, 2X, 4X y 8X) y para biotipos

susceptibles, se puede ampliar el rango de sub-dosis utilizando múltiplos de 4 a 10 (Agostinetto & Vargas, 2014).

Para el análisis de dosis-respuesta existen muchos programas estadísticos como SAS®, SigmaPlot®, Origin®, entre otros; sin embargo, el lenguaje de programación R con su librería “drc” (doses response curve) es idóneo para esta clase de bioensayos, principalmente porque nos permite ajustar múltiples curvas de dosis respuesta, además, de comparar parámetros de la curva para elegir el modelo que mejor se ajuste. Así mismo, permite calcular la  $RC_{50}$  en cualquier punto de interés a lo largo de la curva, además de realizar gráficos didácticos para publicación de artículos científicos (Knezevic, Streibig & Ritz, 2007).

## **2.5 Mecanismos de Resistencia**

La resistencia en el sitio objetivo comúnmente llamado Target-site resistance (TSR) por sus siglas en inglés, es el mecanismo más común de resistencia, resultado de una modificación en el sitio de unión del herbicida (generalmente una enzima), esta modificación impide que el herbicida pueda acoplarse al sitio de inhibición, por lo cual las malezas continúan realizando sus procesos fisiológicos normalmente (Powles, & Shaner, 2001). Otro mecanismo de resistencia puede basarse en el sitio no objetivo, tales como la alteración en el metabolismo o translocación. El metabolismo mejorado, como la translocación reducida en malezas resistentes a herbicidas evitan que los niveles fitotóxicos del xenobiótico lleguen al sitio de acción (Figura 6) (Beckie & Tardif, 2012).

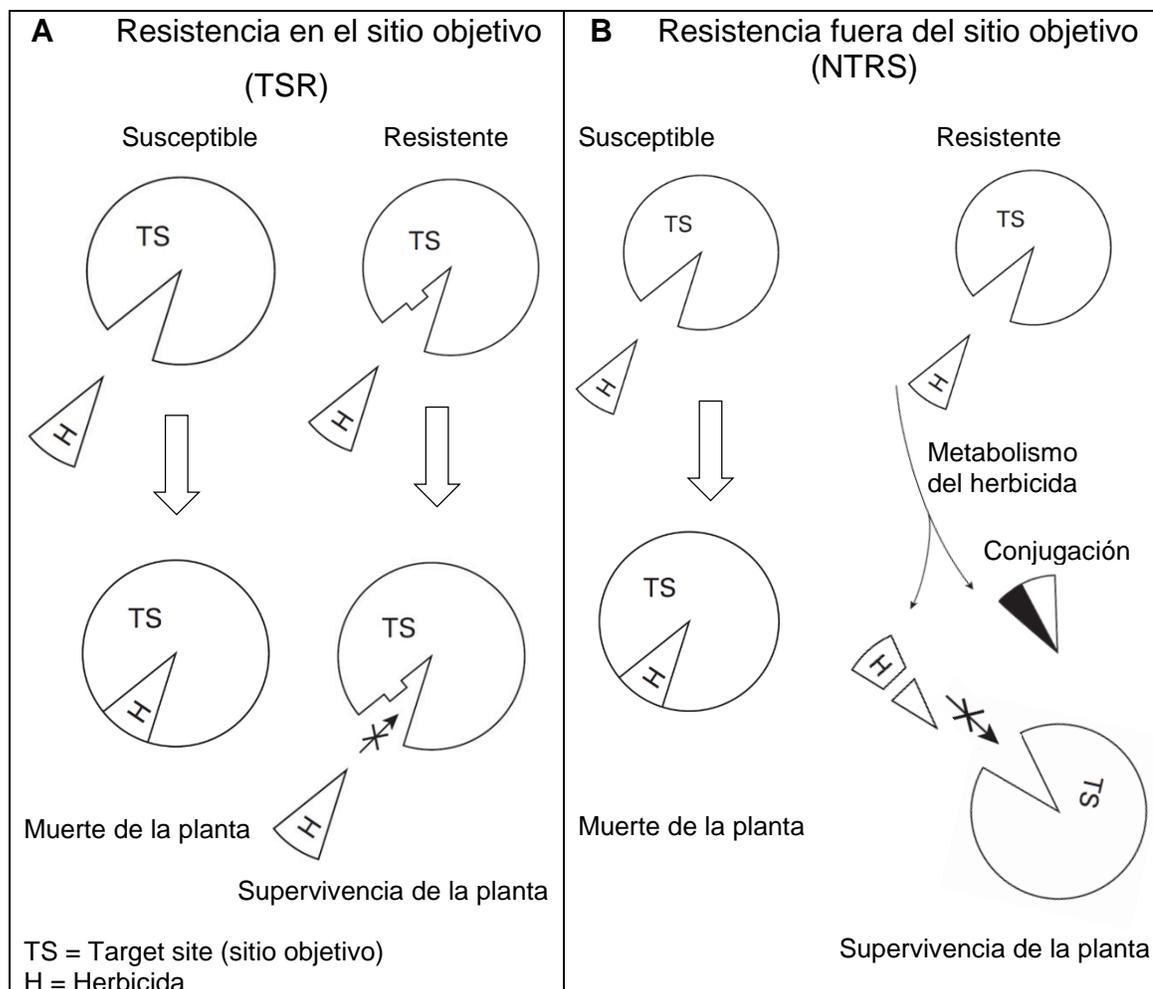


Figura 6. Representación esquemática de los principales mecanismos de resistencia A; Resistencia en el sitio objetivo. B; Resistencia fuera del sitio objetivo, Adaptado de (Cobb & Reade, 2011).

## 2.6 LITERATURA CITADA

- Agostinetto, D., Vargas, L., (2014). Resistência de Plantas Daninhas a Herbicidas no Brasil, Pelotas, Brasil: UFPel. 398 p.
- Beckie, H. J., & Tardif, F. J. (2012). Herbicide cross resistance in weeds. *Crop Protection* 35: 15-28.
- Bellio, R., Jensen, J. E., & Seiden, P. (2000). Applications of likelihood asymptotics for nonlinear regression in herbicide bioassays. *Biometrics*, 56(4): 1204-1212.
- Bozic, D., Vrbnicanin, S., Barac, M., & Stefanovic, L. (2007). Determination of Johnson grass (*Sorghum halepense* (L.) Pers.) level of sensibility to nicosulfuron. *Maydica* 52(3), 271.
- Bradley, K. W., & Hagood, E. S. (2001). Identification of a johnsongrass (*Sorghum halepense*) biotype resistant to aryloxyphenoxypropionate and cyclohexanedione herbicides in Virginia. *Weed technology* 15(4): 623-627.

- Brown, H. M. (1990). Mode of action, crop selectivity, and soil relations of the sulfonylurea herbicides. *Pesticide Science* 29(3): 263-281.
- Burke, I. C., Holland, J. B., Burton, J. D., York, A. C., & Wilcut, J. W. (2007). Johnsongrass (*Sorghum halepense*) pollen expresses ACCase target-site resistance. *Weed technology* 21(2): 384-388.
- CABI, (2019). *Invasive Species Compendium*. Wallingford, UK: CAB International. [www.cabi.org/isc](http://www.cabi.org/isc).
- Cobb, A. H., & Reade, J. P. (2011). *Herbicides and plant physiology*. John Wiley & Sons. 286 p.
- Délye, C., Jasieniuk, M., & Le Corre, V. (2013). Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. *Trends in Genetics* 29(11): 649-658.
- Fancelli, A.L. (2011). *Milho Produção e Produtividade*. Piracicaba: USP/ESALQ/LPV, SP. Antonio Luiz Fancelli. 176 p.
- Ghosheh, Hani Z., D. L. H. y J. M. C. (1996). The Critical Period of Johnsongrass (*Sorghum halepense*) Control in Field Corn (*Zea mays*). *Weed Science* 44(4): 944-947.
- Griffiths, A. J. F., Miller, J. H., Suzuki, D. T., Lewontin, R. C y Gelbart, W. M. (2002). *Genética Séptima edición*, Madrid, España: Mcgraw-Hill, Interamericana. 860 p.
- Heap, I. M. (1997). The occurrence of herbicide-resistant weeds worldwide. *Pesticide Science* 51(3); 235-243.
- Heap, I. (2014). Herbicide resistant weeds. In *Integrated pest management* (pp. 281-301). Springer, Dordrecht.
- Heap, I. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Online. Internet. Wednesday, December 18, 2019. Available [www.weedscience.org](http://www.weedscience.org).
- Holm, L. (1969). Weeds problems in developing countries. *Weed Science* 17(1): 113-118.
- Horowitz, M. (1976). Application of bioassay techniques to herbicide investigations. *Weed Research*, 16(4): 209-215.
- Kishore, G. M., & Shah, D. M. (1988). Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. *Annual review of biochemistry* 57(1): 627-663.
- Knezevic, S. Z., Streibig, J. C., & Ritz, C. (2007). Utilizing R software package for dose-response studies: the concept and data analysis. *Weed Technology* 21(3): 840-848.
- Lorenzi, H. (1992). *Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais*. 2 ed. Nova Odessa, SP: Editora Plantarum.
- McCourt, J. A., & Duggleby, R. G. (2006). Acetohydroxyacid synthase and its role in the biosynthetic pathway for branched-chain amino acids. *Amino Acids* 31(2): 173-210.
- Nandula, V. K. (2010). Herbicide resistance: Definitions and concepts. *Glyphosate Resistance in Crops and Weeds: History, Development, and Management* 35-43.
- Paliwal, R. L. (2001). El maíz en los trópicos: Mejoramiento y producción (No. 28). Food & Agriculture Org. 392 p.
- Powles, S. B., & Shaner, D. L. (2001). *Herbicide resistance and world grains*. Crc Press.

- Powles, S. B., & Yu, Q. (2010). Evolution in Action: Plants Resistant to Herbicides. *The Annual Review of Plant Biology* 61: 317–347.
- Saari, L. L., Cotterman, J. C., & Thill, D. C. (2018). Resistance to acetolactate synthase inhibiting herbicides. In *Herbicide resistance in plants*. CRC Press. pp. 83-140.
- Scopel, A., Ballare, C., & Ghera, C. (1988). Role of Seed Reproduction in the Population Ecology of *Sorghum halepense* in Maize Crops. *Journal of Applied Ecology*, 25(3): 951-962.
- Seefeldt, S. S., Jensen, J. E., & Fuerst, E. P. (1995). Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationships. *Weed Technology* 9(2): 218-227.
- Shaner, D. L. (2014). Lessons learned from the history of herbicide resistance. *Weed Science* 62(2): 427-431.
- SIAP (Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera) (2019). Avance de Siembras y Cosechas Resumen por Estado. Consultado el 4 de septiembre en [http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola\\_siap\\_gobmx/ResumenProducto.do](http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/ResumenProducto.do).
- Smeda, R. J., Snipes, C. E., & Barrentine, W. L. (1997). Identification of graminicide-resistant johnsongrass (*Sorghum halepense*). *Weed Science* 45(1): 132-137.
- Soltani, N., Dille, J. A., Burke, I. C., Everman, W. J., VanGessel, M. J., Davis, V. M., & Sikkema, P. H. (2016). Potential corn yield losses from weeds in North America. *Weed Technology* 30(4): 979-984.
- Sun, Y., Skinner, D.Z., Liang, G. H. (1994). Phylogenetic analysis of *Sorghum* and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *Theoretical and Applied Genetics* 89(1): 26–32.
- Vats, Sharad. (2015). "Herbicides: history, classification and genetic manipulation of plants for herbicide resistance." *Sustainable Agriculture Reviews*. Springer, Cham, pp. 153-192.
- Valadez, M. E., & Kahl, G. (2000). Huellas de ADN en genomas de plantas. Edit. Mundi Prensa. México, D.F. 147 p.
- Valverde, B. E., Riches, C. R., & Caseley, J. C. (2000). Prevención y manejo de malezas resistentes a herbicidas en arroz: experiencias en América Central con *Echinochloa colona* (No. 633.18958). Cámara de Insumos Agropecuarios. 156 p.
- Vidal, R. A. (1997). Herbicidas: mecanismos de ação e resistência de plantas. Porto Alegre, RS, Brasil. 165 p.
- Vidal, R. A., Merotto, A. (2001). Herbicidología. Porto Alegre, Brasil. Vidal & Moretto, 152 p.
- Warwick, S. I., & Black, L. D. (1983). The biology of Canadian weeds 61. *Sorghum halepense* (L.) PERS. *Canadian Journal of Plant Science* 63(4): 997-1014.
- Whitcomb, C. E. (1999). An introduction to ALS-inhibiting herbicides. *Toxicology and industrial health* 15(1-2): 232-240.
- Yu, Q., & Powles, S. B. (2014). Resistance to AHAS inhibitor herbicides: current understanding. *Pest Management Science* 70(9): 1340-1350.

Zhou, Q., Liu, W., Zhang, Y., & Liu, K. K. (2007). Action mechanisms of acetolactate synthase-inhibiting herbicides. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 89(2): 89-96.

### 3. ARTÍCULO CIENTÍFICO

#### <sup>3</sup>TRATAMIENTOS PRE-GERMINATIVOS PARA LA RUPTURA DE LA DORMANCIA DE SEMILLAS DE *Sorghum* spp.

ARTÍCULO PRESENTADO EN EL XXXIX CONGRESO NACIONAL DE LA CIENCIA DE LA MALEZA EN MÉXICO

#### RESUMEN

Se realizaron pruebas de germinación para romper la dormancia de cuatro biotipos de *Sorghum* spp. Las semillas fueron recolectadas en Ciudad Isla, Veracruz, México. Los tratamientos aplicados fueron: inmersión en ácido sulfúrico por 10, 20 y 30 minutos, escarificación manual (EM), (EM) + ácido giberélico (AG) a 250, 500 y 1000 ppm., (EM) + nitrato de potasio (KNO<sub>3</sub>) al 0.1, 0.2 y 0.5 % p/v y un testigo absoluto. Cajas Petri conteniendo las semillas se colocaron en una cámara de crecimiento, sometiendo los tratamientos a una temperatura constante de 30°C y 70% de humedad relativa. Se tomaron datos del porcentaje de germinación (PG), e índice de velocidad de germinación (IVG). Para el porcentaje de germinación, se realizó un análisis de varianza combinado para los cuatro biotipos, utilizando un modelo lineal correspondiente al diseño experimental de parcelas divididas, usando los biotipos como parcelas grandes y los tratamientos como las parcelas chicas. Los resultados mostraron que los tratamientos con EM y EM + KNO<sub>3</sub> al 0.2 %, potenciaron la germinación en un 65 y 61 %, respecto al testigo absoluto. El biotipo que presentó el mayor índice de velocidad de germinación fue *Sorghum bicolor* (L.) Moench con 9.25, respecto a los biotipos 2, 3 y 1 los cuales mostraron IVG de 7.8, 6.3 y 5.8, respectivamente. El biotipo que presentó el mayor porcentaje de germinación fue *S. bicolor*, con un 79.59 %, mientras que los biotipos 2, 3 y 1 de *Sorghum halepense* (L.) Pers., germinaron en promedio 56.53, 56.16 y 51.38 % respectivamente.

**Palabras clave:** semillas, dormancia, malezas, químicos.

---

<sup>3</sup> Tesis de Maestría en Ciencias, Posgrado en Protección Vegetal, Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo  
Autor: Ing. Agr. José Saavedra Ávila  
Director de tesis: Dr. Andrés Bolaños Espinoza

#### **<sup>4</sup>PRE-GERMINATIVE TREATMENTS FOR THE BREAKAGE OF DORMANCY OF SEEDS OF *Sorghum* spp.**

##### **SUMMARY**

To break the dormancy of four biotypes of *Sorghum* spp. germination tests were performed. The seeds were collected in Island City, Veracruz, Mexico. The treatments applied were: immersion in sulfuric acid for 10, 20 and 30 minutes, manual scarification (MS), (MS) + gibberellic acid (GA) at 250, 500 and 1000 ppm., (MS) + potassium nitrate (KNO<sub>3</sub>) at 0.1, 0.2 and 0.5% p/v and an absolute control treatment. Petri dishes containing the seeds were placed in a growth chamber, subjecting the treatments to a constant temperature of 30 ° C and 70% relative humidity. Data of germination percentage (GP), and germination rate index (GRI) were taken. To evaluate the percentage of germination, a combined analysis of variance was carried out for the four biotypes, using a linear model corresponding to a split-plot design, using biotypes as whole plots and treatments as sub plots. The results showed that treatments with MS and MS + KNO<sub>3</sub> at 0.2%, enhanced germination by 65 and 61% with respect to the absolute control treatment. The biotype that presented the highest germination rate was *Sorghum bicolor* (L.) Moench with 9.25 with respect to biotypes 2, 3 and 1 which showed a GRI of 7.8, 6.3 and 5.8, respectively. The biotype that presented the highest germination percentage was *S. bicolor* with 79.59%, while biotypes 2, 3 and 1 of *Sorghum halepense* (L.) Pers., germinated on average 56.53, 56.16, 51.38 %.

**Keywords:** seeds, dormancy, weeds, chemicals.

---

<sup>4</sup> Master of Science Thesis, Postgraduate in Plant Protection, Department of Agricultural Parasitology, Universidad Autónoma Chapingo  
Author: Ing. Agr. José Saavedra Ávila  
Thesis Director: Dr. Andrés Bolaños Espinoza

### 3.1 INTRODUCCIÓN

Las malezas interfieren en el crecimiento de las plantas y generalmente son persistentes, dañan los sistemas de cultivo, los sistemas naturales, las actividades humanas, y como tales, son indeseables (Roos & Lembi 2009).

*Sorghum halepense* (L.) Pers., es catalogada como una de las peores malezas del mundo, ocasionando pérdidas severas en diferentes cultivos, por competencia, efectos alelopáticos o como hospedante alternativo de varias plagas de los cultivos (Warwick & Black, 1983). En ocasiones se usa como forraje, pero si es afectada por alguna sequía o condiciones desfavorables se vuelve venenosa; los cerdos, caballos y vacas pueden intoxicarse debido al ácido cianhídrico o hidrocianina (Muñoz & Pitty, 1994). Es una planta perenne, que se reproduce por rizomas y semillas (Scopel, Ballare, & Ghera 1988). Las semillas presentan un contorno elíptico con un ápice puntiagudo, la superficie de la gluma es lisa y brillante y su cariopsis es de color marrón oscuro de aproximadamente 2 mm de largo (Davis, 1993).

Armendariz y Hernández (1992) mencionan la problemática de otra especie que es *Sorghum bicolor* L. Moench, llamada regionalmente como “sorgo forrajero” o “sorgo maleza”. Los autores comentan que a principios de la década de los 80's en el estado de Morelos (México) se observó una fuerte infestación la cual ocasionó que gran parte de la superficie cultivada por sorgo se perdiera parcial o totalmente, además evidenciaron que al quitar las glumas el porcentaje de germinación aumentó en un 11 %. Las semillas de *Sorghum bicolor*, presentan un contorno elíptico corto, con el vértice agudo, la superficie de la gluma es lisa y brillante, su cariopsis es de forma elíptica color marrón de aproximadamente 3 mm de largo (Davis, 1993).

Uno de los mecanismos de sobrevivencia más importantes para las plantas que crecen en condiciones impredecibles, es su capacidad para producir semillas con una variación considerable en su germinación (Duke, 1985). La

germinación es el período durante el cual se inician los procesos fisiológicos en la semilla que conducen a la formación de nuevas células, tejidos y órganos vegetales (Muzik, 1970). Sin embargo, no todas las semillas germinan fácilmente, algunas presentan ciertos mecanismos que les impiden hacerlo, estas semillas se conocen como durmientes o latentes, expresándose como el estado en que se encuentran las semillas viables sin que germinen, aunque dispongan de suficiente humedad para embeberse, existiendo causas físicas, químicas, mecánicas, morfológicas y combinadas, que evitan la germinación de las semillas (Camacho, 1994). Esta capacidad de dormancia es muy importante en la sobrevivencia de diferentes especies, entre ellas *Sorghum* spp., porque mantiene el banco de semillas en el suelo permitiendo su re-establecimiento después de temporadas desfavorables (Monaghan, 1979).

El objetivo de la investigación, fue evaluar el porcentaje e índice de velocidad de germinación, con diferentes métodos para romper la dormancia en semillas de biotipos de *Sorghum* spp., provenientes del municipio de Ciudad Isla, Veracruz, México.

## **3.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.2.1 Recolección de semillas**

Del 13 al 15 de abril de 2018 se recolectaron muestras de semillas de *Sorghum halepense* y *Sorghum bicolor*, dentro de cultivos de maíz bajo el sistema de agricultura de conservación, en el municipio de Ciudad Isla, Estado de Veracruz (México), con las siguientes coordenadas; biotipo 1 (18°05'40.2" N 95°31'55.5" W), biotipo 2 (18°00'41.9" N 95°00'41.9" W), biotipo 3 (17°57'07" N 95°41'17.3" W) y biotipo 4 (18°14'30.6" N 95°25'53.8" W).

### **3.2.2 Desarrollo del Experimento**

En julio de 2018 en instalaciones del laboratorio de malezas del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo, se realizaron dos pruebas preliminares de germinación con semillas de *Sorghum halepense*, para ajustar las dosis y los tratamientos a evaluar. En agosto del mismo año, se

realizó el experimento general el cual consistió en colocar 10 semillas de *Sorghum spp.* y en los casos donde el material fue menor, se usaron de 7, 8 y 9 semillas por caja Petri (60 x 15 mm) en papel filtro (Whatman Cat No. 1001 090), previamente desinfectadas y tratadas con el fungicida Captan 50 WP (3 g/L). Los tratamientos aplicados fueron: inmersión en ácido sulfúrico (98%) durante 10, 20 y 30 minutos, una vez completado los periodos de inmersión, las semillas se sacaron del recipiente que contenía el tratamiento y se lavaron con bastante agua destilada hasta que se disiparon los residuos de ácido sulfúrico, posteriormente se estableció el tratamiento de escarificación manual con papel lija (Grit/360). Enseguida se aplicaron los tratamientos de escarificación manual (EM) + ácido giberélico (AG) a las dosis de 250, 500 y 1000 ppm, finalmente se probaron los tratamientos de (EM) + nitrato de potasio ( $KNO_3$ ) al 0.1, 0.2 y 0.5 %. Cada biotipo contó con un testigo absoluto, se aplicaron 2 ml de tratamiento por cada caja Petri y se colocaron en una cámara de crecimiento (APT.line® KBWF E5.2, Binder, tuttlingen, Alemania) sometiendo los tratamientos a una temperatura constante de 30°C y 70% de humedad relativa. A las cajas Petri se les agregó 2 ml de agua destilada cada dos días.

Para el análisis estadístico se realizó primero una prueba de bondad de ajuste con las variables originales para determinar la estrategia de análisis más apropiada, posteriormente se realizó un análisis de varianza combinado para los cuatro biotipos, utilizando un modelo lineal correspondiente a un Diseño de Parcelas Divididas, usando los biotipos como parcelas grandes y los tratamientos como las parcelas chicas. La comparación múltiple de medias se hizo mediante la prueba de la diferencia significativa honesta de Tukey ( $P = 0.05$ ), utilizando el programa estadístico SAS® versión 9.4.

### **3.2.3 Porcentaje de germinación (PG)**

Se evaluó el porcentaje de germinación, considerando cada caja Petri como una unidad experimental, computando el número de semillas germinadas contra las semillas sembradas, a los 3, 7 y 10 días después de la siembra (DDS).

### **3.2.4 Índice de velocidad de germinación (IVG)**

Se realizaron conteos diarios del número de semillas germinadas de biotipos de *Sorghum* spp., considerando las que exhibieron la radícula brotada. El Índice de Velocidad de Germinación (IVG) fue determinado 7 DDS, de acuerdo a lo planteado por Maguire (1962).

## **3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **3.3.1 Porcentaje de germinación**

La evaluación a los 3 DDS mostró diferencias estadísticas significativas entre tratamientos. La (EM) y (EM) + (KNO<sub>3</sub>) al 0.2 % presentaron germinación promedio de 76.18 y 72.50 %, respecto al testigo con solo un 5.62%. La (EM) + (AG) a 250 ppm y (EM) + (KNO<sub>3</sub>) al 0.1 % manifestaron una germinación promedio de 69.23 y 68.94%, las (EM) + (AG) a 500 y 1000 ppm. obtuvieron 68.61 y 60.97 % de germinación, en cuanto a la (EM) + (KNO<sub>3</sub>) al 0.5 % se obtuvo un 53.12%, seguido de inmersión en ácido sulfúrico por 30, 20 y 10 minutos los cuales presentaron una germinación promedio de 50.41, 44,37 y 38.6 %, respectivamente (Cuadro 1).

Las evaluaciones realizadas a los 7 y 10 días después de la siembra no mostraron diferencias estadísticas significativas entre ellas en cuanto al porcentaje de germinación, sin embargo, entre tratamientos hubo diferencias significativas, el porcentaje de germinación para la (EM) fue de 78. 12, seguido de (KNO<sub>3</sub>) al 0.2 % con un 74.37 %, respecto al testigo que obtuvo un 13.39 %. El tratamiento con (KNO<sub>3</sub>) al 0.1, %, (AG) a 250, 500 y 1000 ppm, e inmersión en ácido sulfúrico por 30 minutos obtuvieron porcentajes de germinación por encima de 62.43 al 70.81 %. La inmersión en ácido sulfúrico por 10 y 20 minutos, seguido del (KNO<sub>3</sub>) al 0.5% presentaron porcentajes de germinación por debajo del 59% (Cuadro 1). En dicho Cuadro se observa que con excepción del Testigo, el cual presentó un ligero incremento en la germinación entre los 7 y 10 días, el resto de los tratamientos se mantuvieron con los mismos porcentajes de germinación.

Cuadro 1. Comparación múltiple de medias con la prueba de Tukey (P = 0.05) para los tratamientos pre-germinativos en biotipos de *Sorghum* spp. Chapingo, México. 2018.

Tratamientos	% de Germinación (días después de la siembra)		
	3	7	10
1 Testigo	5.62 f	12.14 d	13.39 d*
2 Inmersión en ácido sulfúrico por 10 minutos	38.6 e	53.24 c	53.24 c
3 Inmersión en ácido sulfúrico por 20 minutos	44.37 de	58.12 bc	58.75 bc
4 Inmersión en ácido sulfúrico por 30 minutos	50.41 cde	62.43 abc	62.43 abc
5 Escarificación manual	76.18 a	78.12 a	78.12 a
6 Escarificación manual + ácido giberélico (250 ppm)	69.23 ab	70.48 abc	70.48 abc
7 Escarificación manual + ácido giberélico (500 ppm)	68.61 abc	68.61 abc	68.61 abc
8 Escarificación manual + ácido giberélico (1000 ppm)	60.97 abcd	65.34 abc	65.34 abc
9 Escarificación manual + nitrato de potasio (0.1%)	68.94 ab	70.81 abc	70.81 abc
10 Escarificación manual + nitrato de potasio (0.2%)	72.50 a	74.37 ab	74.37 ab
11 Escarificación manual + nitrato de potasio (0.5%)	53.12 bcde	54.37 c	54.37 c

\*= Valores por columnas agrupados con la misma letra no son estadísticamente diferentes, según la prueba de Tukey (P = 0.05).

Los biotipos 1, 2 y 3 de *S. halepense* exhibieron los menores porcentajes de germinación, en tanto que, el biotipo de *S. bicolor* exhibió el mayor porcentaje de germinación a los 3, 7 y 10 DDS (Cuadro 2).

Cuadro 2. Comparación múltiple de medias con la prueba de Tukey (P = 0.05) para los tratamientos pre-germinativos en biotipos de *Sorghum* spp. Chapingo, México. 2018.

Biotipos	% de Germinación (días)		
	3	7	10
1. <i>Sorghum halepense</i>	47.82 b	51.38 b	51.38 b
2. <i>Sorghum halepense</i>	52.41 b	56.3 b	56.53 b
3. <i>Sorghum halepense</i>	49.79 b	55.93 b	56.16 b
4. <i>Sorghum bicolor</i>	71.26 a	79.31 a	79.59 a

\*= Valores por columnas agrupados con la misma letra no son estadísticamente diferentes, según la prueba de Tukey (P = 0.05).

La Figura 7 muestra diferencias estadísticas significativas entre biotipos, en donde *S. bicolor* germinó en promedio 28.21, 23.06 y 23.43% más que los biotipos 1, 2 y 3 de *S. halepense* a los 10 DDS.

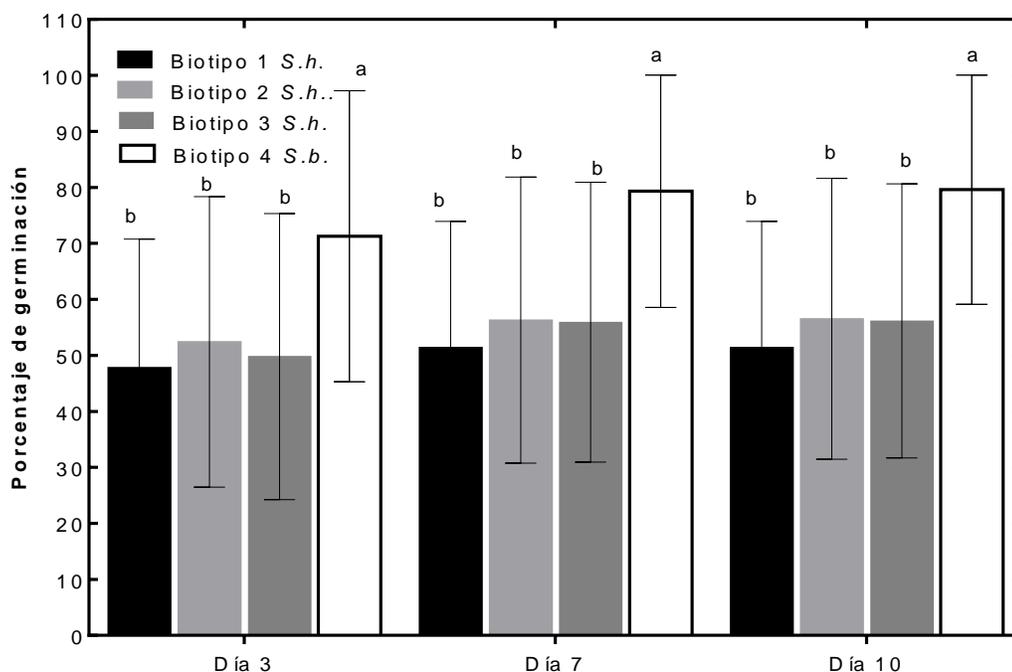


Figura 7. Porcentaje de germinación para los diferentes biotipos de *Sorghum* spp. a los 3, 7 y 10 DDS. Barras con la misma letra por días, no son estadísticamente diferentes (Tukey, P=0.05).

### 3.3.2 Índice de velocidad de germinación

Los biotipos no mantuvieron una relación directa con los tratamientos, ya que la respuesta de éstos en cuanto al índice de velocidad de germinación (IVG) fue diferente. En los biotipos 1 y 4 el mayor IVG lo exhibió el tratamiento con escarificación manual con 5.8 y 9.25 respectivamente. En los biotipo 2 y 3 los mayores IVG (7.8) y (6.3) lo presentaron los tratamientos con EM + KNO<sub>3</sub> al 0.1 y 0.2 %. En todos los biotipos el menor IVG lo manifestó el testigo absoluto (Figura 8).

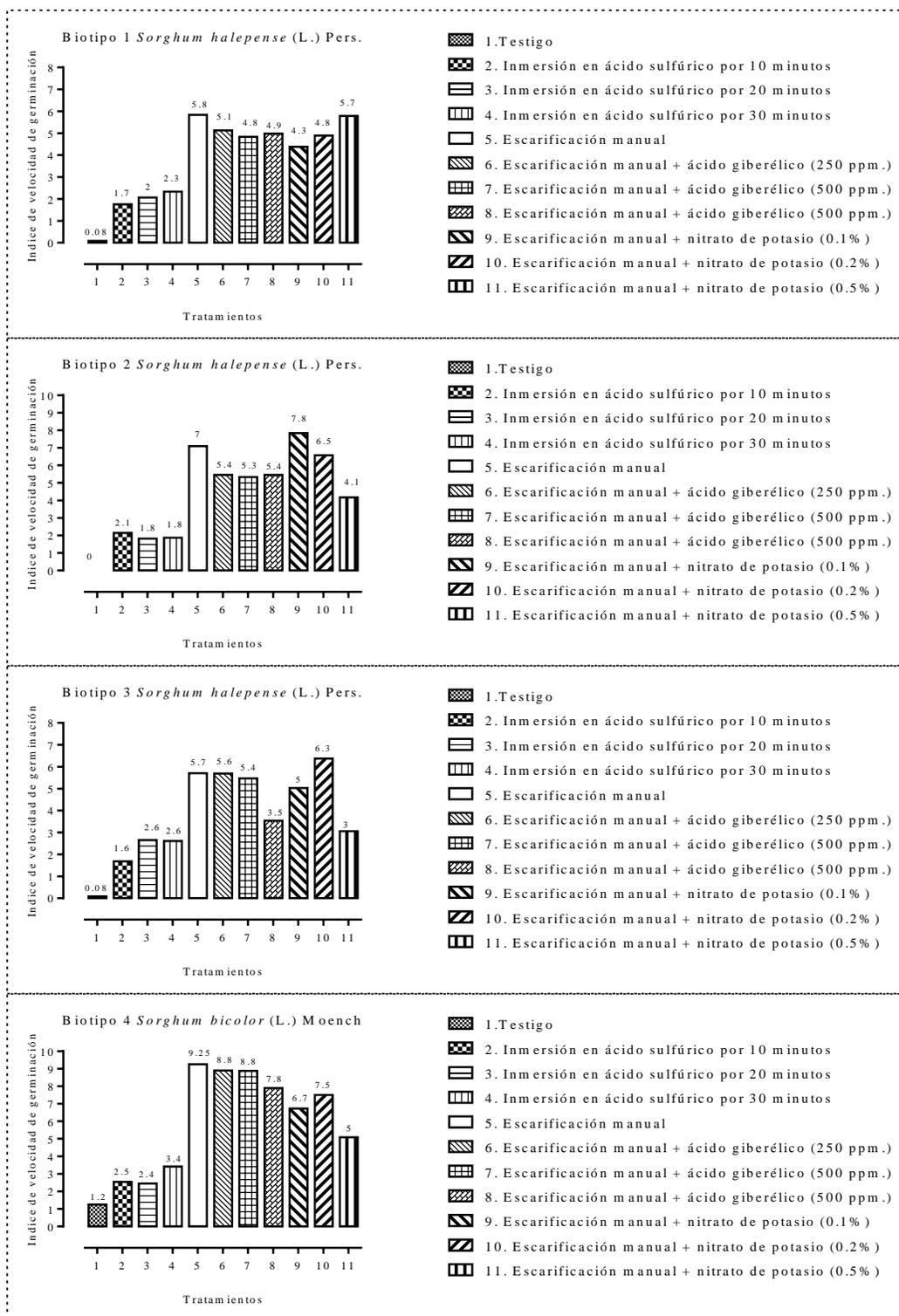


Figura 8. Tratamientos mostrando el Índice de Velocidad de Germinación (IVG) en los diferentes biotipos.

La dormancia de semillas de *S. halepense* se atribuye a la presencia de glumas que cubren la cariopsis completamente, actuando como una barrera para la difusión del oxígeno en la cariopsis (Benech, Fenner & Edwards, 1992).

El nitrato de potasio ayuda a la germinación de las semillas a bajas concentraciones, en muchas especies de plantas (Duermeyer *et al.*, 2018). Los autores indican, que en *Arabidopsis thaliana*, el nitrato actúa como una señal para estimular su germinación.

### **3.4 CONCLUSIONES**

Los mejores tratamientos para la germinación de las semillas de *Sorghum* spp. fueron EM y EM + KNO<sub>3</sub> al 0.2 % los cuales aumentaron la germinación en un 64.73 y 60.98 %, respecto al testigo absoluto.

El mayor porcentaje de germinación al finalizar el ensayo lo presentó el biotipo 4 de *S. bicolor* con un 79.59 % seguido de los biotipos 2, 3 y 1 de *Sorghum halepense* (L.) Pers., con un 56.53, 56.16 y 51.38.

El biotipo 4 de *S. bicolor* exhibió el mayor índice de velocidad de germinación (9.25) con el tratamiento de EM, seguido de los biotipos 2 y 3 de *S. halepense* con índices de 7.8 y 6.3 con el tratamiento de EM + KNO<sub>3</sub> al 0.1 y 0.2 % respectivamente, finalmente el biotipo 1 presentó la menor velocidad de germinación (5.8) con el tratamiento de EM. El menor IVG lo exhibió el tratamiento sin EM en todos los casos.

### **AGRADECIMIENTOS**

Se agradece a la Dirección General de Investigación y Posgrado, por el financiamiento de la investigación y al M.C. Antonio Segura Miranda por su colaboración en la preparación de las soluciones químicas.

### 3.5 LITERATURA CITADA

- ARMENDARIZ, M. M. E.; B. HERNÁNDEZ F. (1992). Población Estratificada y Germinación de semillas de “sorgo maleza” (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) en tres sistemas de labranza en el oriente de Morelos, México (Tesis de grado). Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Parasitología Agrícola. 91 p.
- BENECH A. R. L.; M. FENNER ; P. J. EDWARDS. (1992). Changes in Dormancy Level in *Sorghum halepense* Seeds Induced by Water Stress During Seed Development. *Functional Ecology* 6 (5): 596-605.
- CAMACHO, M. F. (1994). Dormición de semillas: Causas y tratamientos. México: Trillas. 125 p.
- DAVIS, L. W. (1993). Weed Seeds of the Great Plains a Handbook for Identification, United States of America, University Press of Kansas. 130 p.
- DUERMAYER, L.; E. KHODAPANAH; D. YAN; A. KRAPP; S. ROTHSTEIN; E. NAMBARA. (2018). Regulation of seed dormancy and germination by nitrate. *Seed Science Research* 1-8.
- DUKE, O. D. (1985). Weed Physiology: Reproduction and ecophysiology Volume I. Boca Raton, Florida, USA. CRC Press. 165 p.
- MAGUIRE, J. D. (1962). Speeds of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science* 2: 176-177.
- MONAGHAN, N. (1979). The biology of Johnson grass (*Sorghum halepense*). *Weed Research* 19: 261-267.
- MUÑOZ, R.; A. PITY. (1994). Guía Fotográfica para la Identificación de Malezas. Zamorano, Honduras: Escuela Agrícola Panamericana. 124 p.
- MUZIK, T. J. (1970). Weed Biology and Control, United States of America, McGraw-Hill. 47 p.
- ROSS, M.A. & C. A. LEMBI. (2009). Applied Weed Science. Purdue University. Prentice-Hall, Inc. 3<sup>rd</sup>ed. 561 p.
- SCOPEL, A.; C., BALLARE & C., GHERSA. (1988). Role of Seed Reproduction in the Population Ecology of *Sorghum halepense* in maize Crops. *Journal of Applied Ecology* 25(3): 951-962.
- WARWICK, S. I.; BLACK, L. D. (1983). The Biology of Canadian Weeds: *Sorghum halepense* (L.) Pers. *Canadian Journal of Plant Science* 63: 997-1014.

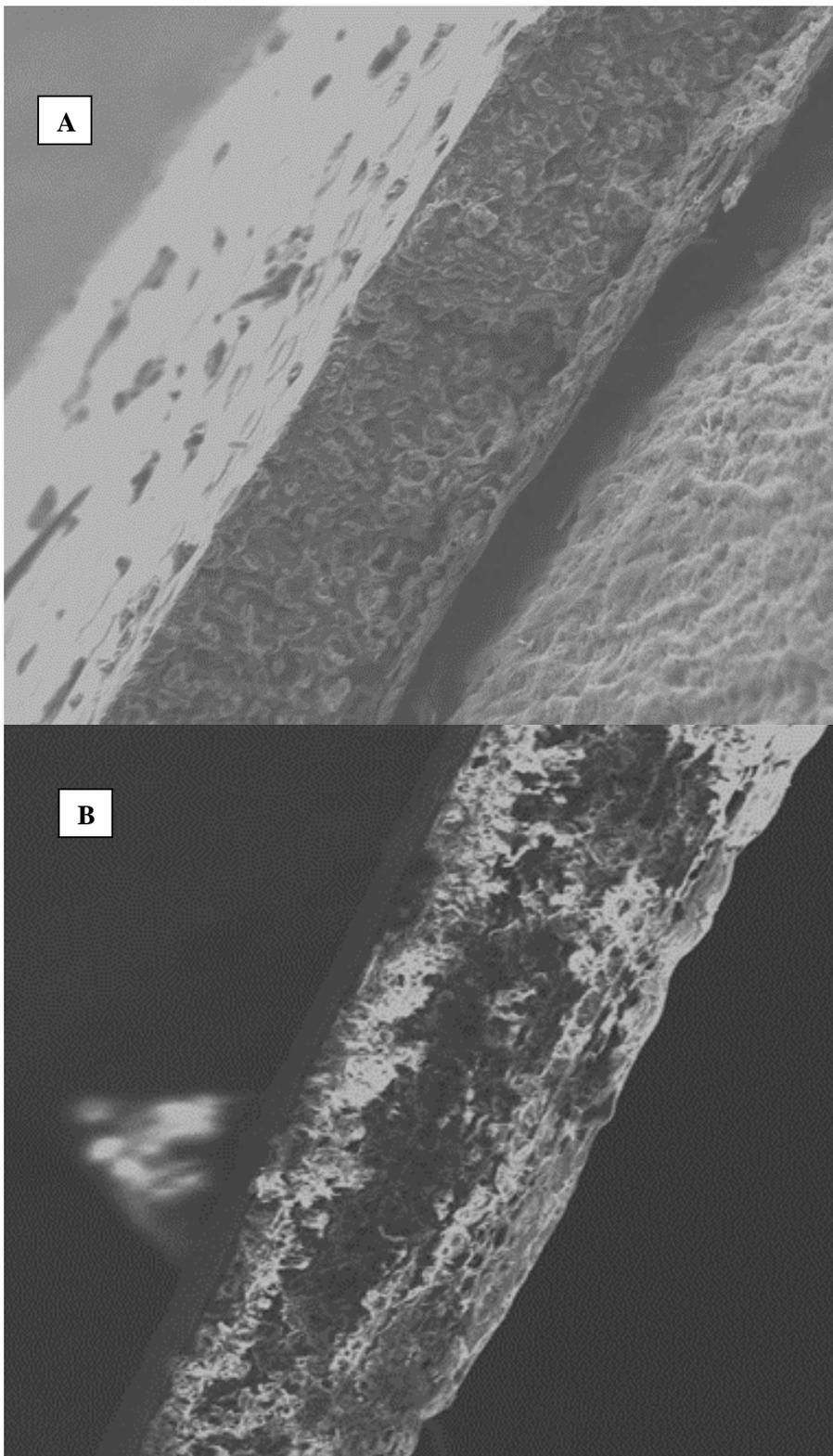
### 3.6 ANEXOS

#### Anexo 1. Germinación de semillas *Sorghum* spp.



De izquierda a derecha: Testigo absoluto sin escarificación, Inmersión en ácido sulfúrico durante 10, 20 y 30 minutos, escarificación manual, escarificación manual + ácido giberélico a 250, 500 y 1000 ppm., escarificación manual + nitrato de potasio al 0.1, 0.2 y 0.5 %, 3 días después de la siembra.

Anexo 2. Microscopia de barrido electrónico en glumas de *Sorghum* spp.



A) *Sorghum bicolor* (1053X); B) *Sorghum halepense* (919X).

#### 4. ARTÍCULO CIENTÍFICO

##### **<sup>5</sup>ENSAYOS PRELIMINARES DE RESISTENCIA EN BIOTIPOS DE *Sorghum* spp. A HERBICIDAS INHIBIDORES DE LA ALS, EPSPS Y 4-HPPD**

RESUMEN Y PONENCIA ORAL PRESENTADO EN EL XXIV CONGRESO LATINOAMERICANO DE MALEZAS EN SAN JOSÉ, COSTA RICA.

##### **RESUMEN**

Los bioensayos preliminares de resistencia son una herramienta muy valiosa en la investigación de los herbicidas, se utilizan principalmente para determinar de una forma sencilla, los biotipos con sospecha de resistencia, susceptibles o tolerantes a algún herbicida, proporcionando una idea clara de las diferentes poblaciones de malezas a investigar. El objetivo de este estudio fue determinar mediante bioensayos preliminares los efectos de herbicidas inhibidores de la ALS, EPSPS y 4-HPPD, sobre biotipos de *Sorghum* spp., para posteriormente realizar bioensayos de dosis respuesta y análisis molecular, ampliando el rango de dosis y repeticiones con menos biotipos en estudio. Los experimentos se llevaron a cabo en los laboratorios e invernaderos del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo (México), en los meses de octubre y noviembre de 2018. La colecta de semillas de *Sorghum* spp. se realizó en el mes de abril y agosto del mismo año, recolectando 16 biotipos de *Sorghum halepense* (L.) Pers. y un biotipo de *Sorghum bicolor* (L.) Moench, de los cuales 14 biotipos de *Sorghum* spp. con historial de aplicación de herbicidas en cultivos de maíz bajo el sistema de agricultura de conservación y 3 biotipos de *S. halepense* sin historial de aplicación. Las semillas se escarificaron manualmente y se colocaron en una cámara de crecimiento a una temperatura constante de 30°C y 70% de humedad relativa por 48 horas. Posteriormente en invernadero, se procedió al trasplante de las plántulas en macetas con sustrato compuesto por 80 % de suelo de campo y 20 % de "Peat Moss". Las aplicaciones de herbicidas se realizaron a los 26 días después del trasplante de la siguiente manera: glifosato en dosis de 726 y 1452 g de i.a. ha<sup>-1</sup>, nicosulfuron 60 y 100 g de i.a. ha<sup>-1</sup>, topramezone 33,6 y 67,2 g de i.a. ha<sup>-1</sup>. Se tomaron datos de materia verde a los 21 días después de la aplicación de los herbicidas para realizar un análisis de varianza para los 17 biotipos de forma individual por herbicida y dosis, usando un modelo lineal general. Los resultados obtenidos mostraron alta susceptibilidad de *Sorghum* spp. a las diferentes dosis del herbicida glifosato; contrario a ello, en algunos biotipos nicosulfuron a dosis de 100 g de i.a. ha<sup>-1</sup> no presentó reducción significativa de materia verde, respecto al testigo absoluto; finalmente todos los biotipos con aplicaciones de topramezone al doble de la dosis comercial (67,2 g ha<sup>-1</sup>) no exhibieron reducción significativa de materia verde.

**Palabras clave:** bioensayos, herbicidas, efectividad, malezas.

---

<sup>5</sup> Tesis de Maestría en Ciencias, Posgrado en Protección Vegetal, Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo

Autor: Ing. Agr. José Saavedra Ávila

Director de tesis: Dr. Andrés Bolaños Espinoza

## **6PRELIMINARY TESTS OF RESISTANCE IN BIOTYPES OF *Sorghum* spp. TO INHIBITOR HERBICIDES OF ALS, EPSPS AND 4-HPPD**

### **SUMMARY**

Preliminary resistance bioassays are a very valuable tool in herbicide research, used mainly to determine in a simple way the biotypes with suspected resistance, susceptible or tolerant to any herbicide, providing a clear idea of the different populations of weeds to be investigated. The objective of this study was to determine by means of preliminary bioassays the effects of herbicides inhibitors of ALS, EPSPS and 4-HPPD, on *Sorghum* spp. biotypes, to later carry out bioassays of dose response and molecular analysis, extending the range of doses and repetitions with less biotypes in study. The experiments were carried out in the laboratories and greenhouses of the Department of Agricultural Parasitology of the Universidad Autónoma Chapingo (Mexico), in October and November 2018. *Sorghum* spp. seeds were collected in April and August of the same year, collecting 16 biotypes of *Sorghum halepense* (L.) Pers. and one biotype of *Sorghum bicolor* (L.) Moench, of which 14 biotypes of *Sorghum* spp. with history of application of herbicides in corn crops under the conservation agriculture system and 3 biotypes of *Sorghum* spp. biotypes of *S. halepense* with no history of application. The methodology consisted of manually scarifying the seeds and placing them in a growth chamber at a constant temperature of 30°C and 70% relative humidity for 48 hours. Later in greenhouse, the seedlings were transplanted in pots with substrate composed by 80 % of vegetal soil and 20 % of Peat Moss. The applications of herbicides were made 26 days after the transplant in the following way: glyphosate in doses of 726 and 1452 g of i.a. ha<sup>-1</sup>, nicosulfuron 60 and 100 g of i.a. ha<sup>-1</sup>, topramezone 33,6 and 67,2 g of i.a. ha<sup>-1</sup>. Green matter data were taken 21 days after application of the herbicides to perform an analysis of variance for the 17 biotypes individually by herbicide and dose, using a general linear model. The results obtained showed high susceptibility of *Sorghum* spp. to the different doses of the herbicide glyphosate; contrary to this, in some nicosulfuron biotypes at a dose of 100 g of i.a. ha<sup>-1</sup> there was no significant reduction of green matter, with respect to the absolute control, Finally all the biotypes with applications of topramezone at twice the commercial dose (67.2 g ha<sup>-1</sup>) did not exhibit significant reduction of green matter.

**Keywords:** bioassays, herbicides, efficacy, weeds.

---

<sup>6</sup> Master of Science Thesis, Postgraduate in Plant Protection, Department of Agricultural Parasitology, Universidad Autónoma Chapingo  
Author: Ing. Agr. José Saavedra Ávila  
Thesis Director: Dr. Andrés Bolaños Espinoza

#### 4.1 INTRODUCCIÓN

El zacate (*Sorghum halepense* L. (Pers.) se encuentra entre las 10 peores malezas del mundo (Holm, 1968). Para su control se han empleado diversas prácticas, siendo el uso de los químicos la alternativa más empleada en los últimos años. Nicosulfuron es un herbicida postemergente de la familia de las Sulfonilureas recomendado para el control de malezas en maíz (Mekki & Leroux, 1994). Su mecanismo de acción es inhibir la enzima acetolactato sintasa (ALS) (Zhou, Liu, Zhang & Liu 2007). Respecto a topramezone, es un herbicida inhibidor de 4- hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (HPPD), que al igual que nicosulfuron inhibe la enzima ALS, tiene alta selectividad en el cultivo de maíz, para el control de malezas de hoja ancha y gramíneas (Grossmann & Ehrhardt, 2007). Glifosato es un herbicida inhibidor de enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato-sintetasa (EPSPS) (Shaner, 2014). Es el herbicida más importante en el mundo, utilizado para controlar un amplio espectro de malezas no deseadas, sin embargo, debido a su uso excesivo principalmente en cultivos transgénicos se han desarrollado malezas resistentes (Powles, 2008). Streibig (1988) menciona que una de las técnicas para evaluar la eficacia de los herbicidas es la aplicación del principio de bioensayos, definiéndose éstos como un experimento para estimar la potencia del herbicida en plantas u otros organismos vivos. Los bioensayos en plantas constituyen una herramienta muy valiosa en la investigación sobre la acción de los herbicidas. Su amplia gama de posibilidades de utilizar organismos vivos para detectar la presencia y concentración de xenobioticos en el medio ambiente o para evaluar la respuesta biológica y fisiológica de las plantas a estos productos es muy amplia y permite adaptar métodos y técnicas, según sean los objetivos perseguidos (Valverde, 2009). El objetivo del presente trabajo fue realizar un ensayo preliminar de resistencia con dos dosis (media, alta) de los herbicidas antes citados, en biotipos de *Sorghum* spp., para determinar las poblaciones a evaluar en un futuro, en estudios de dosis respuesta.

## 4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.2.1 Recolección de semillas

Se recolectaron muestras de semillas de 15 biotipos de *Sorghum halepense* en el Estado de Veracruz México, 13 de ellos en cultivos de maíz manejado bajo agricultura de conservación con un historial consecutivo de aplicaciones de herbicidas mencionados en este estudio, 2 biotipos más sin información, recolectados a orillas de las vías del camino, además de un biotipo de *Sorghum bicolor* recolectado en campos de maíz con historial de aplicación de herbicidas. Finalmente se recolectaron semillas de un biotipo de *Sorghum halepense* en el Estado de Guanajuato, México, sin historial de aplicaciones.

El biotipo 14 (B14) representa a la especie de *Sorghum bicolor*, todos los demás biotipos recolectados pertenecen a *Sorghum halepense*.

### 4.2.2 Conducción del trabajo de investigación

En Septiembre del mismo año en los laboratorios de malezas del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo, se procedió a la escarificación manual de semillas de los 17 biotipos de *Sorghum* utilizando papel lija (Grit/360). Se colocaron 100 semillas de cada biotipo previamente desinfectadas con el fungicida Captan 50 WP (3 g/L) en cajas Petri (60 x 15 mm) con papel filtro (Whatman Cat No 1001 090) previamente humedecido con agua destilada, posteriormente fueron trasladadas a una cámara de crecimiento (APT.line® KBWF E5.2, Binder, tuttligen, Alemania), a una temperatura constante de 30°C y 70% de humedad relativa por 48 horas; tres días después se procedió a trasplantarlas en macetas cuyo sustrato quedó compuesto por 80 % de suelo de campo y 20 % de Peat Moss, colocando tres plántulas por maceta. En algunos biotipos donde el material vegetal fue menor, se trasplantaron de 1 a 2 plántulas. Los riegos se realizaron cada 24 horas o cuando las plantas los requirieron.

### 4.2.3 Tratamientos y diseño experimental

Los tratamientos involucrados en el bioensayo se indican en el Cuadro 3, los cuales se aplicaron sobre 17 biotipos de *Sorghum* spp. El diseño experimental empleado fue bloques completos al azar, con tres repeticiones. La unidad experimental quedo constituida por una maceta.

Cuadro 3. Tratamientos evaluados en el bioensayo de selección de biotipos con sospechas de resistencia.

Tratamiento	Dosis P.C.* ha <sup>-1</sup>	i.a** g.ha <sup>-1</sup>
Testigo	0	0
Nicosulfurón	1.5 L ha <sup>-1</sup>	60
	2.5 L ha <sup>-1</sup>	100
Glifosato	2.0 L ha <sup>-1</sup>	726
	4.0 L ha <sup>-1</sup>	1452
Topramezone	100 cc ha <sup>-1</sup>	33.6
	200 cc ha <sup>-1</sup>	67.2

\*Producto comercial; \*\* Ingrediente activo

### 4.2.4 Aplicación de los tratamientos

Cuando las plantas exhibieron de 3 a 4 hojas verdaderas (26 días después del trasplante) se procedió a la aplicación de los tratamientos químicos, utilizando un equipo de aspersión, presurizado a base de CO<sub>2</sub>, con una punta de la serie Teejet XR-8003VS y calibrado previamente para asperjar 215 L ha<sup>-1</sup>, con una presión de 50 psi. Los tratamientos se aplicaron en dosis crecientes, lavando cuidadosamente el equipo entre la aplicación de los diferentes tratamientos (herbicidas y dosis).

### 4.2.5 Variables respuesta

Se determinó el peso de materia verde a los 21 días después de la aplicación de los tratamientos. Las plantas fueron cortadas al ras del suelo y su peso fue determinado mediante una balanza digital con capacidad de 0.01 a 200 g.

#### 4.2.6 Análisis estadístico

A los datos obtenidos del peso de materia verde se les realizó un análisis de varianza y una comparación de medias, mediante la prueba de la diferencia significativa honesta de Tukey ( $P = 0.05$ ), utilizando en ambos casos el programa estadístico SAS® versión 9.4.

### 4.3 RESULTADOS

#### 4.3.1 Aplicaciones de glifosato en biotipos de *Sorghum* spp.

##### 4.3.1.1 Peso de materia verde

Los datos obtenidos del peso de materia verde en el biotipo 16 no manifestaron diferencias estadísticas significativas para las dosis, con respecto a sus testigos. Por el contrario, todos los biotipos restantes presentaron diferencias significativas con relación a sus respectivos testigos en ambas dosis (2.0 y 4.0 L ha<sup>-1</sup>) (Figura 9). Los resultados obtenidos mostraron la alta susceptibilidad de los biotipos a glifosato, con lo cual se descartó la posible sospecha de resistencia de estos biotipos. También se corroboró que el biotipo 17 (control) fue el que exhibió el menor peso de materia verde.

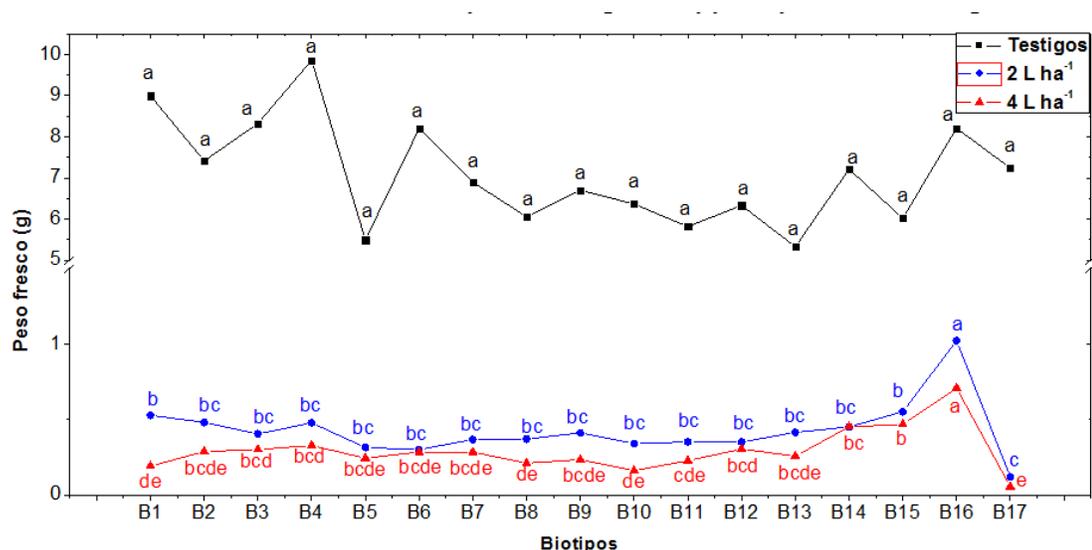
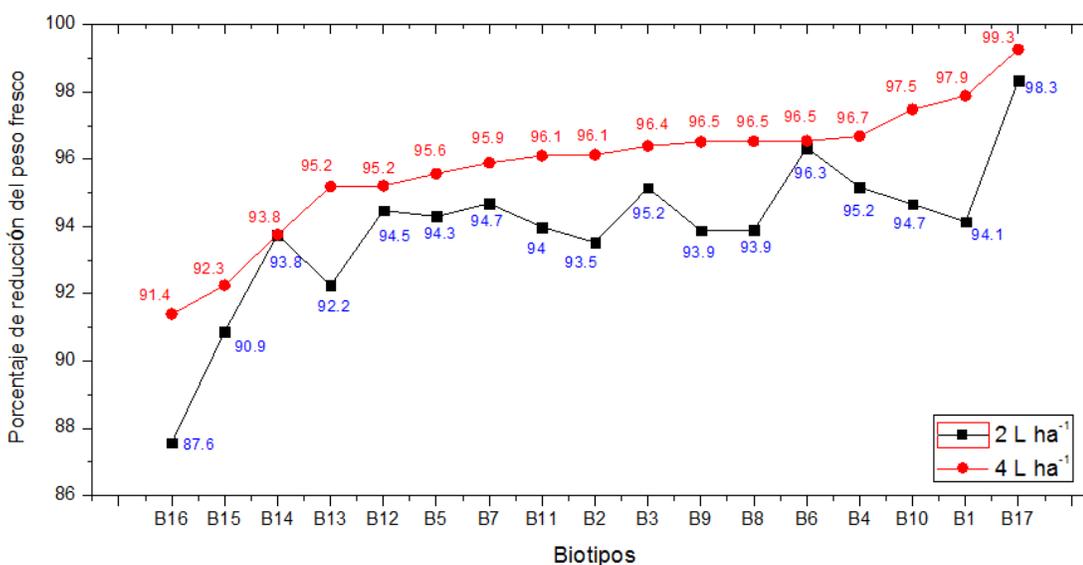


Figura 9. Peso de materia verde en biotipos de *Sorghum* spp. por aplicaciones de glifosato en dosis de 2.0 y 4.0 L ha<sup>-1</sup>.

### 4.3.1.2 Reducción del peso fresco

Los biotipos 16, 15 y 14 fueron los que presentaron la menor reducción del peso de materia verde siendo estos de 91.4, 92.3 y 93.8 %, respectivamente. En cambio, las mayores disminuciones del peso fresco lo exhibieron los biotipos 10, 1 y 17 con reducciones de 97.5, 97.9 y 99.3 %, respectivamente, con relación a sus testigos en las dosis de 4.0 L ha<sup>-1</sup>. En conclusión se observó efectivamente que la dosis fue determinante en la reducción de peso de materia verde, ya que de forma general se encontró que a mayor dosis los biotipos presentaron una mayor reducción en el porcentaje de peso de materia verde



(Fig.10).

Figura 10. Reducción del peso fresco en biotipos de *Sorghum* spp. por efecto de aplicaciones de glifosato.

### 4.3.2 Aplicaciones de Topramezone en biotipos de *Sorghum* spp.

#### 4.3.2.1 Peso de materia verde

Para las aplicaciones de topramezone, todos los biotipos de *Sorghum* spp. no presentaron reducción significativa del peso fresco respecto a sus testigos a las dosis de 200 cc ha<sup>-1</sup>, contrario a ello el biotipo 13 exhibió diferencias estadísticas significativas en cuanto al peso de materia verde, respecto a los demás tratamientos a la dosis de 100 cc ha<sup>-1</sup> (Figura 11). De forma general se

observó que la dosis más alta de topamezone exhibió los mayores efectos sobre *Sorghum* spp., al presentar los menores pesos de materia verde.

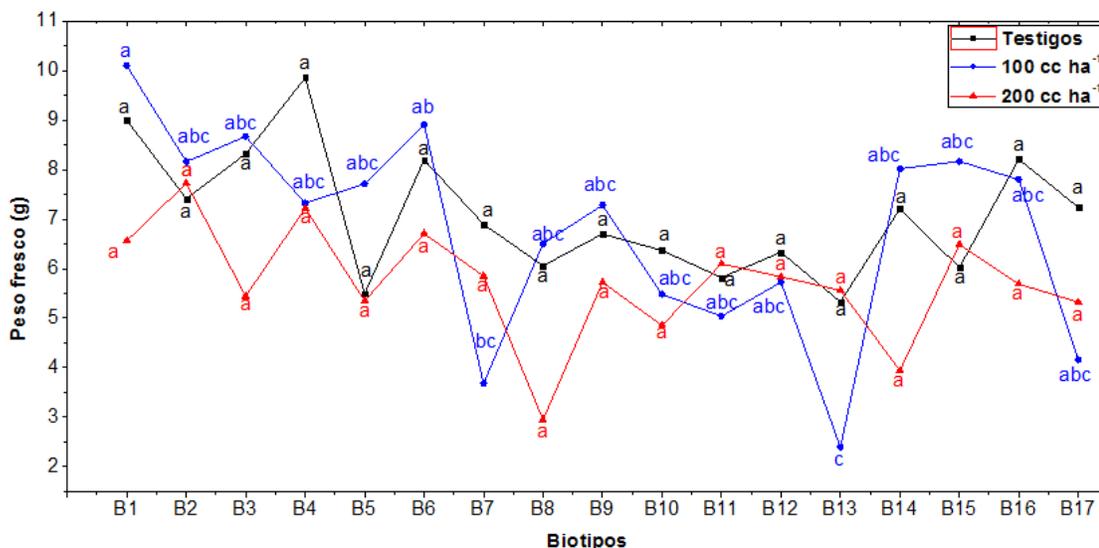
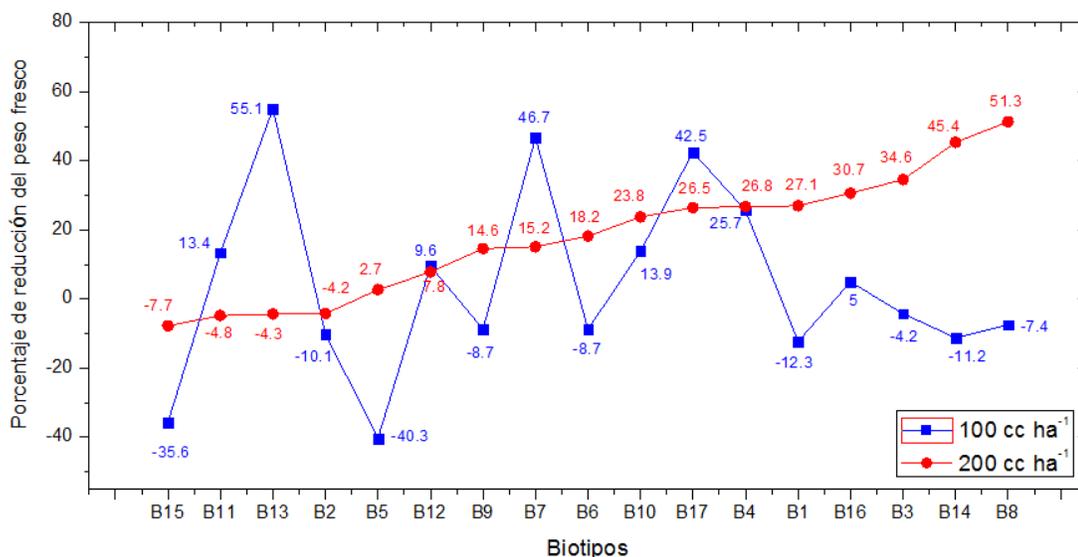


Figura 11. Peso fresco de los diferentes biotipos de *Sorghum* spp., por efectos de topamezone a los 21 DDA.

#### 4.3.2.2 Reducción del peso de materia verde

Los biotipos 15, 11 y 13 presentaron aumento en la producción de biomasa en un 7.7, 4.8 y 4.3 %, respecto a sus testigos. Sin embargo, los biotipos 3, 14 y 8 mostraron la mayor reducción del peso de materia verde con un 34.6, 45.4 y



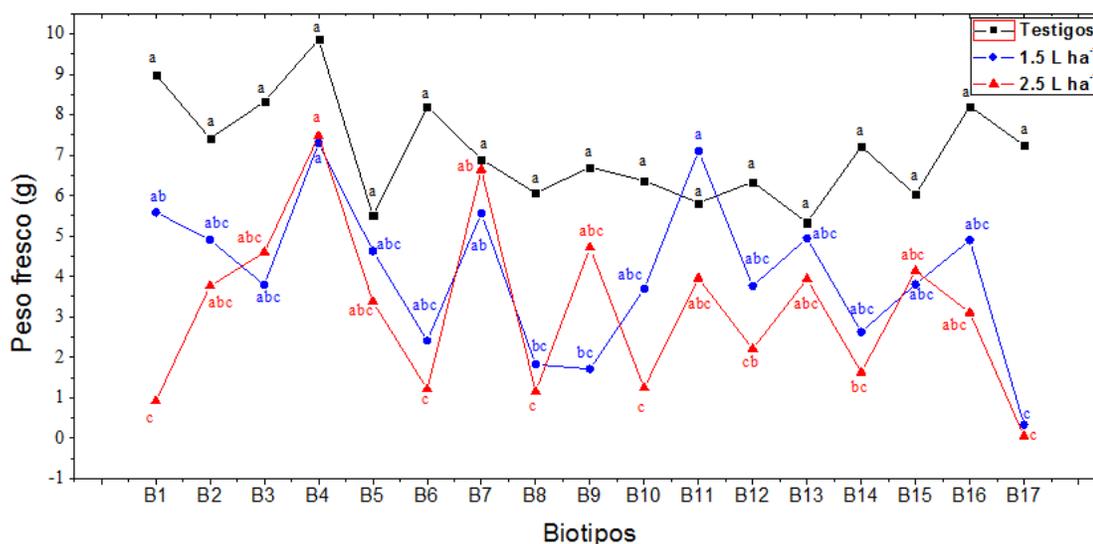
51.3 %, respecto a sus controles, en las dosis de 200 ml ha<sup>-1</sup> (Figura 12).

Figura 12. Reducción del peso de materia verde en biotipos de *Sorghum* spp. por efectos de topramezone a los 21 DDA.

#### 4.3.3 Aplicaciones de Nicosulfuron en biotipos de *Sorghum* spp.

##### 4.3.3.1 Peso de materia verde

Los biotipos 4, 7 y 9 presentaron los mayores pesos de materia verde (7.4, 6.6 y 4.7 g.), cuando se aplicó a la dosis de 2.5 L ha<sup>-1</sup> de nicosulfuron. Sin embargo, los biotipos 8, 1 y 17 mostraron menores efectos sobre *Sorghum*, al exhibir los menores pesos de materia verde (1.1, 0.9 y 0.05 g) en la misma dosis (Figura



13).

Figura 13. Peso de materia verde de los diferentes biotipos de *Sorghum* spp. por efecto del herbicida nicosulfuron 21 DDA.

##### 4.3.3.2 Reducción del peso de materia verde

Los biotipos 7, 4 y 13 presentaron la menor reducción del peso de materia verde (3.7, 24.2 y 26.2 %), respecto a sus controles. Por el contrario, los biotipos 6, 1 y 17 presentaron los mayores efectos, al manifestar el mayor porcentaje de reducción (85.3, 89.9 y 99.3 %), respecto a sus testigos, en dosis de 2.5 L ha<sup>-1</sup> (Figura 14).

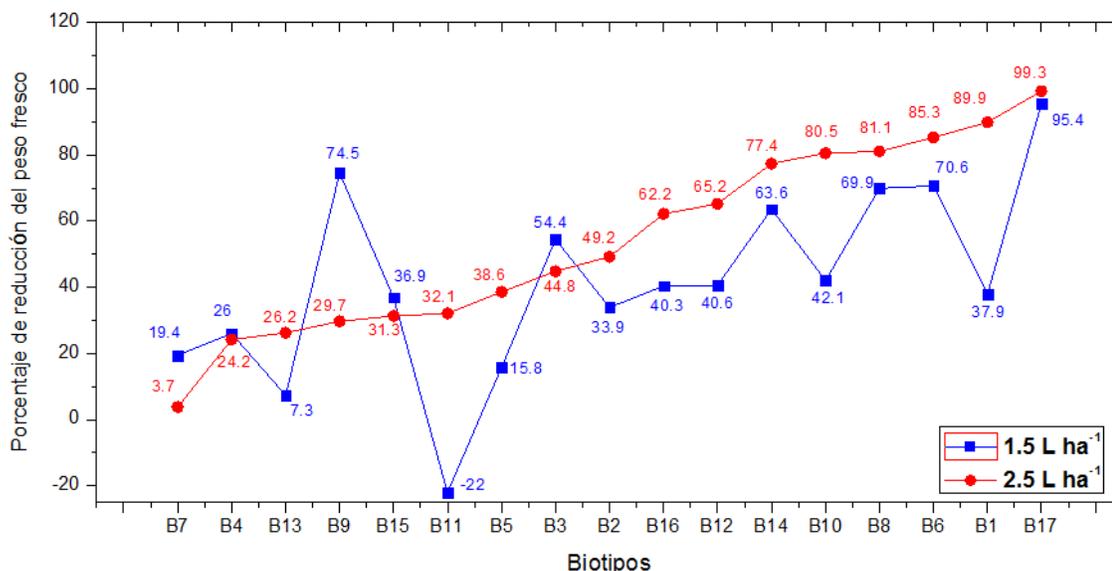


Figura 14. Reducción del peso de materia verde en biotipos de *Sorghum* spp. por efectos de nicosulfuron a los 21 DDA.

En general los mayores efectos en cuanto a la reducción del peso de materia verde se vieron reflejados al aplicar las dosis altas de los diferentes herbicidas en estudio, en todos los biotipos de *Sorghum* Spp.

#### 4.4 CONCLUSIONES

Los biotipos de *Sorghum* spp. mostraron alta susceptibilidad a las aplicaciones de glifosato en dosis de 2.0 y 4.0 L ha<sup>-1</sup>.

Todas las poblaciones de *Sorghum* exhibieron diferentes grados de tolerancia a ambas dosis (100 y 200 mL ha<sup>-1</sup>) de topamezone.

Los biotipos de *Sorghum halepense* 7, 4 y 13 presentaron las menores reducciones de peso de materia verde, con respecto a sus testigos; contrario a ello el biotipo 17 fue el que exhibió la mayor reducción del peso de materia verde, en su dosis de 2.5 L ha<sup>-1</sup> de nicosulfuron.

Con base a los resultados obtenidos se concluye realizar el experimento de dosis respuesta, con los biotipos 7, 4 y 13 con sospecha de presentar resistencia al herbicida nicosulfuron; además, se determina utilizar el biotipo 17

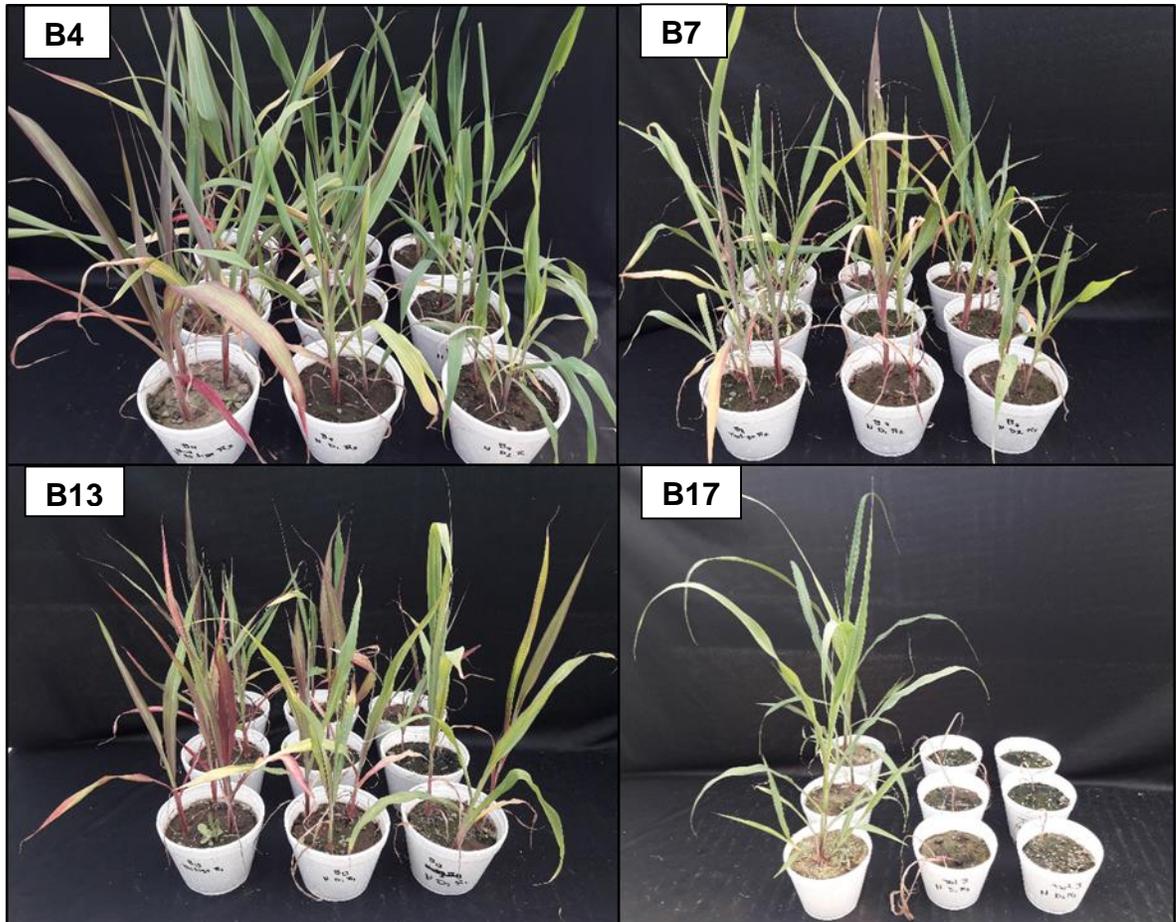
de *Sorghum halepense* como testigo (control), debido a su alta susceptibilidad al mismo herbicida.

#### 4.5 LITERATURA CITADA

- Grossmann, K., & Ehrhardt, T. (2007). On the mechanism of action and selectivity of the corn herbicide topramezone: a new inhibitor of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 63(5), 429-439.
- Holm, L. (1969). Weeds problems in developing countries. *Weed Science*, 17(1), 113-118.
- Mekki, M., y Leroux, GD (1994). Inhibición de la acetolactato sintasa vegetal por nicosulfuron, rimsulfuron y su mezcla DPX-79406. *Weed Science* 42 (3), 327-332.
- Powles, S. B. (2008). Evolved glyphosate-resistant weeds around the world: lessons to be learnt. *Pest management science*, 64(4), 360-365.
- Shaner, D. L. (2014). *Herbicide handbook*. Weed Science Society of America. t 513 p.
- Streibig, J. C. (1988). Herbicide bioassay. *Weed research*, 28(6), 479-484.
- Valverde, B. E. (2009). Bioanálisis en la ciencia de las malezas: conceptos importantes y experiencia práctica. In A. Anzalone, & A. Ortíz (Eds.), *Curso de actualización en metodologías de investigación y el desarrollo tecnológico en el manejo de malezas: edición especial* (pp. 52-76).
- Zhou, Q., Liu, W., Zhang, Y., & Liu, K. K. (2007). Action mechanisms of acetolactate synthase-inhibiting herbicides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 89 (2), 89-96.

#### 4.6 ANEXOS

Anexo 3. Biotipos de *Sorghum halepense* seleccionados para el bioensayo general de dosis respuesta con nicosulfuron.



De izquierda a derecha: Testigo, 1.5 L ha<sup>-1</sup> y 2.5 L ha<sup>-1</sup>.

## 5. ARTÍCULO CIENTÍFICO

### MECANISMO DE RESISTENCIA EN *Sorghum halepense* (L.) PERS. A NICOSULFURON EN MÉXICO

### MECHANISM OF RESISTANCE IN *Sorghum halepense* (L.) PERS. TO NICOSULFURON IN MEXICO

José Ignacio **Saavedra Ávila**<sup>1</sup> Andrés **Bolaños Espinoza**<sup>2</sup>

#### RESUMEN

Se realizaron bioensayos de dosis respuesta para determinar resistencia en cuatro biotipos de *Sorghum halepense*, tres de ellos provenientes de Veracruz-México, con historial consecutivo de aplicaciones de nicosulfuron en el cultivo de maíz, más uno originario de Guanajuato, sin historial de aplicación. Se aplicaron dosis crecientes de nicosulfuron confirmando la resistencia en los biotipos de Veracruz, así mismo, se efectuaron pruebas de inhibición del citocromo P450 con malation con un biotipo de Guanajuato susceptible (S) y uno de Veracruz resistente (R), este último presentó una disminución del índice de resistencia (IR) de 6.1 veces a causa del inhibidor. Finalmente se llevaron a cabo pruebas moleculares en las que se encontró una mutación en todas las poblaciones de Veracruz, debido a cambio de bases en los nucleótidos GAT a GAA del gen ALS, lo que se traduce en una sustitución de Asp (ácido aspártico) a Glu (ácido glutámico) en la posición 376. Hasta donde se tiene información, este es el primer caso en México, con dicha mutación en esta especie, que otorga resistencia a nicosulfuron.

**Palabras clave:** Pasto, Herbicida, Mutación.

#### ABSTRACT

Dose response bioassays were performed to determine resistance in four *Sorghum halepense* biotypes, three of them from Veracruz-Mexico, with a consecutive history of nicosulfuron applications in corn cultivation, and the other one from Guanajuato with no history of application. Increased doses of nicosulfuron were applied confirming resistance in the biotypes of Veracruz, as well as inhibition tests of cytochrome P450 with malation with a susceptible biotype from Guanajuato (S) and a resistant one from Veracruz (R), the latter showed a decrease in the resistance index (IR) of 6.1 times because of the inhibitor. Finally, molecular tests were carried out in which a mutation was found in all the populations of Veracruz, due to a change of bases in the nucleotides GAT to GAA of the ALS gene, which translates into a substitution of Asp (aspartic acid) to Glu (glutamic acid) in position 376. As far as information is available, this is the first case in Mexico with this mutation in this species that grants resistance to nicosulfuron.

**Keywords:** Grass, herbicide, mutation.

<sup>1</sup>Tesista

<sup>2</sup>Director

## 5.1 INTRODUCCIÓN

Realizar un diagnóstico de la resistencia de malezas a herbicidas es el primer paso en su manejo, monitorear su naturaleza, distribución y abundancia exige pruebas de detección eficientes y efectivas (Beckie, Heap, Smeda, & Hall, 2000).

Estudios en biotipos de malezas han demostrado que la resistencia del sitio objetivo a inhibidores de la enzima acetolactato sintasa (ALS) se basa principalmente en las sustituciones de aminoácidos individuales como ser Ala-122, Pro-197, Ala-205, Trp-574 y Ser-653 (Tranel, & Wright 2002). A su vez, Heap (2019) menciona que han surgido nuevas mutaciones en los últimos años en las posiciones Asp-376, Arg-377 y Gly-654.

Para el caso del metabolismo mejorado por parte de las plantas el citocromo P450 es una familia grande de proteínas enzimáticas la cual ayuda a la detoxificación de químicos exógenos incluidos pesticidas, básicamente insertando un átomo de oxígeno en moléculas hidrofóbicas inertes para hacerlas más reactivas e hidrosolubles (Werck-Reichhart, Hehn & Didierjean, 2000).

El objetivo del estudio fue determinar la presencia de resistencia en biotipos de *Sorghum halepense*, al herbicida nicosulfuron mediante bioensayos de dosis respuesta, con tasas de reducción del 50% ( $RC_{50}$ ) e índices de resistencia (IR), y en caso de presencia de resistencia, dilucidar su mecanismo de resistencia.

## 5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.2.1 Bioensayo de dosis respuesta

Después de realizar los ensayos preliminares de resistencia se eligieron cuatro biotipos de *Sorghum halepense*, para el ensayo general de dosis respuesta, tres de ellos: B4 (Oro verde), B7 (El Marcial) y B13 (Francisco Villa) provenientes del Estado de Veracruz, con un historial consecutivo de

aplicaciones de nicosulfuron en el cultivo de maíz bajo el sistema de agricultura de conservación, más un biotipo sin historial de aplicación B17 (Comonfort), proveniente del Estado de Guanajuato y recolectado a la orilla de un camino.

En el laboratorio de malezas del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo, se procedió a la escarificación manual con papel lija (Grit/360) colocando semillas en cajas Petri con papel filtro (Whatman Cat No 1001 090), previamente desinfectadas con el fungicida Captan 50 WP (3 g/L). Se agregó agua destilada para posteriormente colocarlas en una cámara de crecimiento (APT.line® KBWF E5.2, Binder, tuttlingen, Alemania) a 30°C y 70% de humedad relativa constante durante 48 horas. El trasplante se realizó en invernadero colocando 2 plántulas de *Sorghum halepense* en macetas de un litro conteniendo 80% de tierra de campo y 20% de Peat Moss.

Veinte días después del trasplante se realizó la aplicación de nicosulfurón (SANSON® 6 OD), con una aspersora presurizada a base de CO<sub>2</sub> y equipada con una punta Teejet XR-8003VS previamente calibrada para asperjar 200 L ha<sup>-1</sup>. La aplicación se realizó en horas de la mañana con una humedad relativa del 75%, vientos de 8 km/h, temperatura de 20°C y un pH del agua de 7.1. Los tratamientos aplicados se detallan en el Cuadro 4.

El experimento se repitió en el tiempo en invernadero utilizando el herbicida nicosulfuron (SANSON® 4 SC).

Cuadro 4. Dosis crecientes de nicosulfuron en el bioensayo de dosis-respuesta en biotipos de *Sorghum halepense*. Chapingo, México. 2019.

Tratamientos	B4* - B7* - B13*	B17**
	Dosis de nicosulfuron (g i.a. ha <sup>-1</sup> )	
1	0	0
2	0	0
3	3.75	0.93
4	7.5	1.87
5	15	3.75
6	30	7.5
7	60***	15
8	120	30
9	240	60***
10	480	120
11	960	240

\*Biotipos sospechosos de resistencia

\*\*Biotipo susceptible

\*\*\*Dosis recomendada

A los 21 días después de la aplicación de los tratamientos las plantas fueron cortadas al ras del suelo, con el fin de obtener el peso fresco de cada tratamiento.

### 5.2.2 Bioensayo de Inhibición del Citocromo P450

Se procedió a la germinación de semillas de *Sorghum halepense* de los biotipos El Marcial y Comonfort en las condiciones especificadas anteriormente. Se realizó el trasplante en macetas de 0.5 litros colocando 80% de tierra de campo y 20% de Peat Moss. Posteriormente, cuando las plantas presentaron de 3 a 4 hojas verdaderas se aplicaron los tratamientos, con un equipo presurizado a base de CO<sub>2</sub> previamente calibrado para asperjar 245 L ha<sup>-1</sup> (Cuadro 5).

Cuadro 5. Tratamientos de los bioensayos de inhibición del citocromo P450 en biotipos de *Sorghum halepense*. Chapingo, México. 2019.

<b>Comonfort</b>		<b>El Marcial</b>			
Malation + Nicosulfuron	Nicosulfuron	Malation + Nicosulfuron	Nicosulfuron		
Dosis g i. a. ha <sup>-1</sup>					
	0.00	0.00	0	0	
	0.47	0.47	3.75	3.75	
	0.94	0.94	7.5	7.5	
	1.88	1.88	15	15	
	3.75	3.75	30	30	
1000	7.50	7.50	1000	<b>60*</b>	<b>60*</b>
	15	15	120	120	
	30	30	180	180	
	<b>60*</b>	<b>60*</b>	240	240	
	120	120	360	360	
	240	240	480	480	

\*Dosis comercial en g i.a. ha<sup>-1</sup>

Se realizaron dos bioensayos para generar dos curvas de dosis-respuesta, la primera con aplicaciones de malation + nicosulfuron (SANSON 4 SC), aplicando el insecticida 8 horas antes de las aplicaciones con nicosulfuron y un segundo bioensayo, solo con aplicaciones crecientes de nicosulfuron. Contando con 3 repeticiones para el primer bioensayo y 4 repeticiones por tratamiento para el segundo bioensayo.

21 días después de la aplicación de los tratamientos, se cortaron las plantas al ras del suelo, para evaluar el peso de materia fresca con el fin de obtener los datos para generar las curvas de dosis-respuesta.

### 5.2.3 Extracción y secuenciación de ADN

#### Germinación y trasplante

Se colocaron a germinar semillas previamente escarificadas de 4 biotipos de *Sorghum halepense* de las poblaciones Oro verde, El Marcial, Francisco Villa y

Comonfort, provenientes del Estado de Veracruz y Guanajuato (México), en una cámara de crecimiento (ELETROlab® Modelo, EL202/3) durante 7 días, a una temperatura constante de 30°C con 12 horas luz y 12 horas de oscuridad, posteriormente se trasplantaron en vasos de plástico de 0.8 L colocando una planta por vaso, con tres repeticiones por biotipo.

### **Extracción de ADN**

A los 17 días después del trasplante se procedió a extraer ADN de 3 plántulas de cada biotipo de *Sorghum halepense*, siguiendo el protocolo de Doyle y Doyle (1987) con algunas modificaciones. Se pesaron 50 mg de tejido vegetal de cada biotipo, macerado con nitrógeno líquido en morteros de porcelana, el polvo fino se pasó a tubos Eppendorf de 1.5 mL, agregando 800 µL de tampón CTAB 2% mas 4 µL de β- Mercaptoetanol, seguidamente se colocaron las muestras en Baño María durante 1 hora a 60 °C, al finalizar el tiempo se agregaron 700 µL de CIA (cloroformo: alcohol isoamílico 24:1), homogeneizando las muestras en un agitador Vortex durante 5-10 segundos, se centrifugaron a 12000 gravedades (g) durante 5 minutos, se recuperó el sobrenadante y se pasaron a nuevos tubos Eppendorf agregando 700 µL de CIA y homogeneizando la muestra cómo se mencionó anteriormente, se centrifugaron a las mismas condiciones mencionadas previamente recuperando la fase acuosa a nuevos tubos Eppendorf adicionando isopropanol de la siguiente manera; 0.7 multiplicado por el volumen de la muestra. Se colocaron las muestras en un Freezer a -20 °C durante 4 horas, se centrifugaron durante 15 minutos a 12000 g, se desechó el sobrenadante para quedarse con el material genético comprimido, comúnmente llamado pastilla de ADN, se adicionó 1 mL de etanol 70%, se desprendió la pastilla del tubo para posteriormente centrifugar a 12000 g durante 3 minutos, este proceso se realizó 2 veces con el fin de lavar la pastilla, se descartó el sobrenadante y se dejaron secar los tubos toda la noche, se agregaron 50 µL de tampón TE 10:1 (Tris=10mM : EDTA=1mM), se dejaron enfriar las muestras a 4°C. Finalmente, las muestras fueron cuantificadas en un NanoDrop™ Thermo Scientific 2000.

## Amplificación y secuenciación

Para la amplificación de la reacción de la cadena de polimerasa (PCR) se sintetizó el Iniciador descrito por (Hernández *et al.*, 2015) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Secuencia de Iniciadores utilizados en la PCR, para las muestras de ADN de los biotipos de *Sorghum halepense*. Chapingo, México. 2019.

Iniciador	Secuencia de 5'- 3'	Sitios de mutaciones
AHAS-F	CTGTTCTTTATGTTGGTGGT	Asp-376, Arg-377, Trp-574,
AHAS-R	TATCTGTAGCAAAGGCACT	Ser-653, Gly-654

Se siguió la metodología de Hernández *et al.*, (2015) con algunas modificaciones; se preparó una mezcla para cada reacción de 50  $\mu$ L, adicionando 36.6  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O, 5  $\mu$ L de la mezcla Buffer + Mg Cl<sub>2</sub> (10X), 2  $\mu$ L de DNTps (10 mM), 2  $\mu$ L de Forward (AHAS-F), 2  $\mu$ L de Reverse (AHAS-R), 0.4  $\mu$ L de Taq DNA Polimerasa (5 unidades/ $\mu$ L), 2  $\mu$ L de ADN (100 ng/  $\mu$ L). Las muestras se colocaron en un termociclador (TECHNE: TC-412), las condiciones para la prueba de PCR fueron; 1 ciclo de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto. Seguido por 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 57°C por 30 segundos y 72°C por 1.2 minutos más un ciclo final de 72°C por 10 minutos.

Para la purificación de cada muestra de PCR, se etiquetaron nuevos tubos Eppendorf agregando 50  $\mu$ L de Polietilenglicol 8000 (PEG) al 20 %, seguido de 50  $\mu$ L de producto PCR mezclando homogéneamente con una micropipeta, se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos, para posteriormente centrifugar a 13000 g durante 15 minutos, el sobrenadante se descartó con una micropipeta sin tocar el fondo del tubo. Seguidamente se agregaron 125  $\mu$ L de Etanol al 80 %, para posteriormente centrifugar a 13000 g durante 2 minutos, posteriormente se descartó el sobrenadante con una micropipeta sin tocar el fondo del tubo, este proceso se realizó 2 veces. Se secaron las muestras a temperatura ambiente durante 2 horas, se adicionaron 25  $\mu$ L de agua ultrapura, y se homogeneizaron con una micropipeta. Para verificar si el proceso de PCR y purificación fue correcto, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al

0.8%, agregando 2  $\mu$ L de Buffer de carga más 2  $\mu$ L de producto de PCR purificado en cada pocillo, se agregaron 5  $\mu$ L de marcador de peso molecular con un rango de bandas de 100-3000 pb (100 pb), las condiciones de electroforesis fueron 100 voltios durante 1 hora, el gel se sumergió en una solución de bromuro de etidio (100  $\mu$ L de bromuro de etidio por cada 100 mL de agua destilada) durante 15 minutos para posteriormente observar los resultados en un fotodocumentador (UVP MultiDoc-It™).

La secuenciación se realizó por el método Sanger con un equipo Applied Biosystems™ 3500xL, en instalaciones del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad Federal de Paraná, Brasil.

#### **5.2.4 Análisis estadístico y bioinformático**

Se realizó un análisis de varianza para la variable de peso fresco, transformada a porcentaje respecto al control no tratado, tanto para el bioensayo de dosis respuesta, como para el bioensayo de inhibición con malation. Posteriormente, los datos se sometieron a un análisis de regresión no lineal con el fin de estimar la dosis del herbicida que causó el 50% de reducción del crecimiento de las plantas ( $RC_{50}$ ). Los datos se ajustaron al modelo de regresión no lineal propuesto por (Seefeldt, Jensen & Fuerst, 1995). El índice de resistencia (IR) o factor de resistencia (FR) fue calculado dividiendo la  $RC_{50}$  del biotipo con sospecha de resistencia entre la  $RC_{50}$  del biotipo susceptible. El análisis de varianza se realizó con el programa SAS® versión 9.4, en tanto que el análisis de regresión no lineal se realizó con el programa “R” 3.6.1, con la librería “drc”.

Para la limpieza de las secuencias se utilizó el programa BioEdit, y para el alineamiento y comparación de las muestras se requirió el programa Mega 7.

### **5.3 RESULTADOS**

#### **5.3.1 Bioensayo de dosis respuesta**

Los resultados obtenidos del peso de materia verde en las cuatro poblaciones de *S. halepense*, se ajustaron al modelo logístico de 3 parámetros mostrando

ser altamente significativos. Las dosis requeridas de nicosulfuron para inhibir el peso de biomasa en un 50% para los biotipos Oro Verde, El Marcial y Francisco Villa, fueron 114, 56 y 152 g i.a. ha<sup>-1</sup> respectivamente, siendo éstas 69, 34 y 92 veces más resistentes que el biotipo susceptible (Comonfort), el cual solo requirió dosis mínimas de 1.6 g i.a. ha<sup>-1</sup>, para reducir el peso de su biomasa en un 50 % (Cuadro 7 y Figura15).

Cuadro 7. Parámetros estimados del modelo logístico, y valores de RC<sub>50</sub> e IR del bioanálisis de dosis respuesta para los biotipos de *Sorghum halepense*. Chapingo, México. 2019.

Biotipos	RC <sub>50</sub> *	b**	d***	Prob. (RC <sub>50</sub> )	IR
Oro Verde (R)	<b>114.67</b> (± 28.55)	1.80 (± 0.73)	106.66 (± 7.36)	8.994e-05 ***	<b>69.92</b>
El Marcial (R)	<b>56.30</b> (± 9.51)	3.13 (± 1.48)	112.46 (± 6.82)	1.836e-08 ***	<b>34.32</b>
Francisco Villa (R)	<b>152.18</b> (± 31.50)	2.36 (± 0.93)	106.17 (± 6.28)	3.115e-06 ***	<b>92.79</b>
Comonfort (S)	<b>1.64</b> (± 0.24)	4.86 (± 5.86)	102.29 (± 9.64)	2.072e-10 ***	-----

Los valores en paréntesis corresponden a la desviación estándar de la muestra.

\* Dosis de nicosulfuron en g i.a.ha<sup>-1</sup> para inhibir el peso de materia verde de los biotipos de *Sorghum halepense* en un 50%.

\*\* Pendiente de la curva de dosis-respuesta

\*\*\* Límite superior de la curva de dosis-respuesta

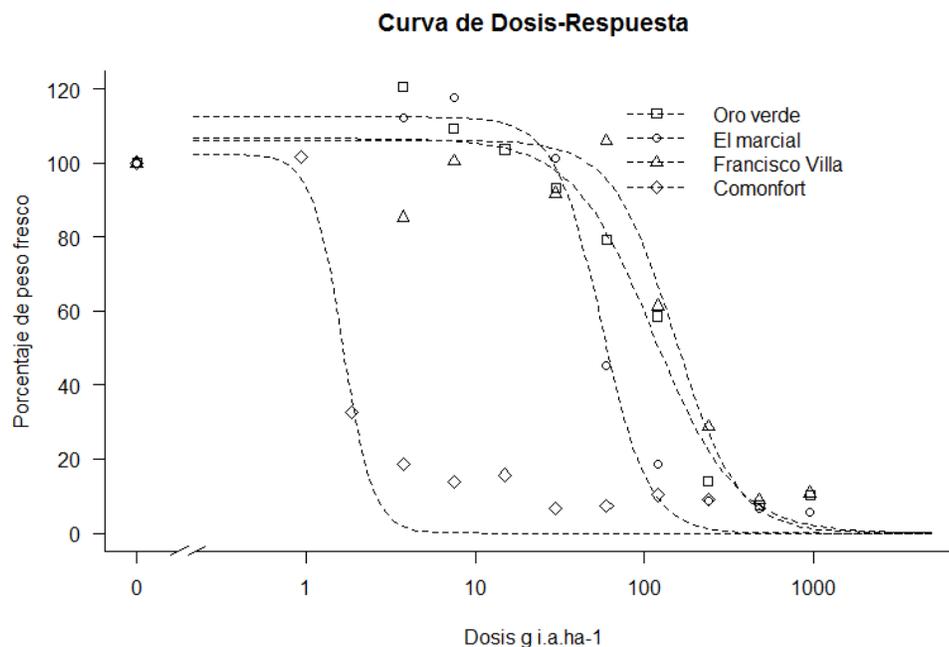


Figura 15. Curva logística del bioanálisis de dosis respuesta para los cuatro biotipos de *Sorghum halepense*. Chapingo, México. 2019.

Los resultados del análisis de varianza para los 4 biotipos de *Sorghum halepense* mostraron diferencias estadísticas significativas en cuanto al peso de materia verde, presentando una reducción significativa para el biotipo “Comonfort” a partir de la dosis de 7.5 g i.a.ha<sup>-1</sup>. Sin embargo, los biotipos “Oro verde”, “El Marcial” “Francisco Villa”, exhibieron diferencias estadísticas significativas a partir de las dosis de 120, 60 y 120 g i.a.ha<sup>-1</sup>, respecto al control no tratado (Cuadro 8).

Cuadro 8. Reducción del peso de materia verde en biotipos de *Sorghum halepense* por efecto del herbicida nicosulfuron respecto al control (testigo). Chapingo, México. 2019.

Porcentaje de peso fresco					
Dosis g i. a. ha <sup>-1</sup>	Comonfort	Dosis g i. a. ha <sup>-1</sup>	Oro Verde	El Marcial	Francisco Villa
0	100 ab*	0	100 ab	100 ab	100 abc
0	100 ab	0	100 ab	100 ab	100 abc
0.93	102 a	3.75	120 a	112 ab	85 abc
1.87	33 abc	7.5	109 ab	118 a	101 ab
3.75	19 abc	15	104 ab	130 a	152 a
7.5	14 bc	30	93 ab	101 ab	92 abc
15	16 abc	<b>60</b>	79 ab	45 bc	106 ab
30	7 c	120	59 bc	19 c	61 bcd
<b>60**</b>	7 c	240	14 c	9 c	29 cd
120	10 c	480	7 c	7 c	9 d
240	9 c	960	10 c	6 c	11 d

\* Medias con la misma letra por columnas no son estadísticamente diferentes (Tukey, p=0.05).

\*\* Dosis Comercial recomendada

### 5.3.2 Bioensayo de Inhibición del Citocromo P450

Los bioanálisis de dosis-respuesta con malation respecto a aplicaciones sin malation, mostraron una reducción en la RC<sub>50</sub>. Para el biotipo “Comonfort” redujo su dosis de 23.3 a 14.5 g i.a. ha<sup>-1</sup> para inhibir su peso de materia verde en un 50%. Aun así, está dosis está por debajo de la dosis recomendada de 60 g i.a. ha<sup>-1</sup>. Similar fue el caso del biotipo “El Marcial” el cual disminuyó su dosis de 361.9 a 137.7 g i.a. ha<sup>-1</sup> para reducir su RC<sub>50</sub>, esta dosis sigue siendo superior a la dosis comercial de 60 g i.a.ha<sup>-1</sup> para controlar esta maleza. También es importante mencionar que el IR para el biotipo “El Marcial”, se redujo de 15.5 a 9.4. (Cuadro 9 y Figura 16).

Cuadro 9. Parámetros estimados del modelo logístico, y valores de  $RC_{50}$  e IR del bioanálisis de dosis respuesta con y sin malation, para los biotipos Comonfort y El Marcial. Chapingo, México. 2019.

Biotipos	$RC_{50}^*$	$b^{**}$	$d^{***}$	IR
Comonfort + Nicosulfuron	23.3 (±8.4)	1.17 (±0.1)	103 (±7.6)	-
Comonfort + Nicosulfuron+ Malation)	14.5 (±8.4)	2.46 (±0.1)	102 (±10.5)	-
El Marcial + Nicosulfuron	361.9 (±48.3)	0.71 (±1.5)	82.2 (±5.0)	<b>15.5</b>
El Marcial + Nicosulfuron + Malation	137.7 (±27.8)	0.71 (±0.3)	110 (±6.7)	<b>9.4</b>

Los valores en paréntesis corresponden a la desviación estándar de la muestra

\* Dosis en g i.a.ha<sup>-1</sup> para inhibir el peso de materia verde de los biotipos de *Sorghum halepense* en un 50%.

\*\* Pendiente de la curva de dosis-respuesta

\*\*\* Límite superior de la curva de dosis-respuesta

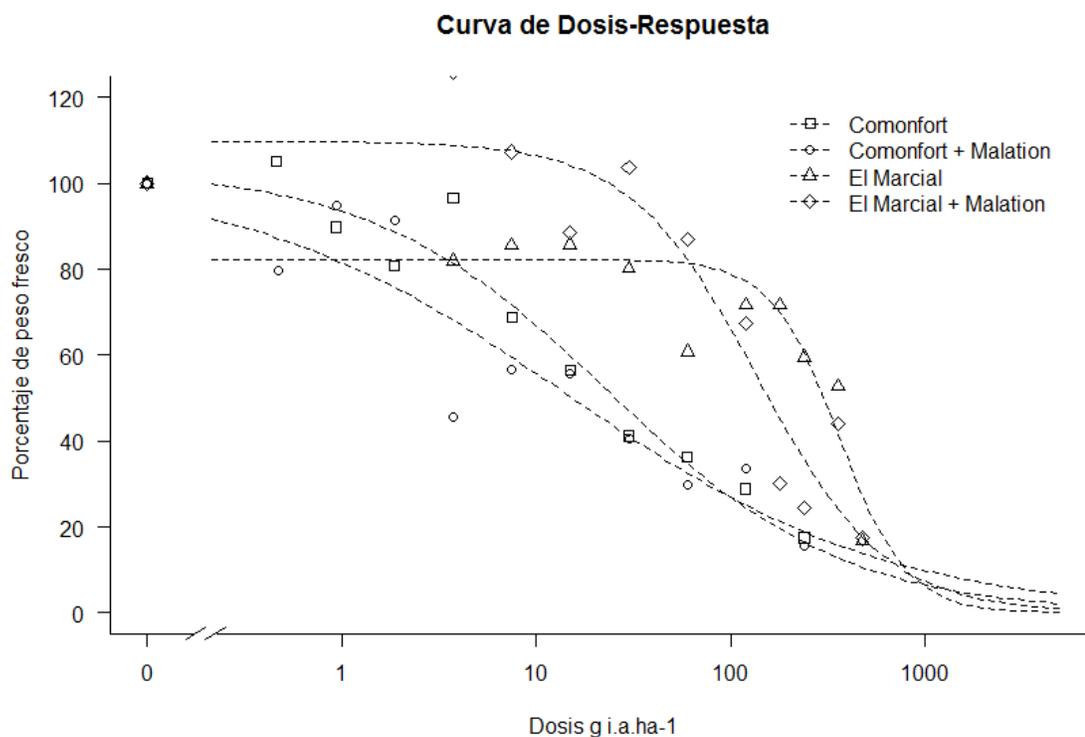


Figura 16. Curva logística del bioanálisis de dosis respuesta con y sin malation para los biotipos Comonfort y El Marcial. Chapingo, México. 2019.

### 5.3.3 Extracción, amplificación y secuenciación de ADN

Las concentraciones de las muestras de ADN en las poblaciones de *S. halepense* fluctuaron entre 275 a 1018 ng/  $\mu$ L, mientras que la pureza en relación a la absorbancia 260/280, estuvo aceptable en un rango de 1.99 a 2.12. (Cuadro 10).

Cuadro 10. Concentración y pureza de las muestras de ADN en los biotipos de *Sorghum halepense*. UFPR, Brasil. 2019.

Biotipos	Repetición	Concentración (ng/ $\mu$ L)	Pureza	
			260/280	260/230
Oro Verde	1	275.60	2.12	2.14
	2	656.50	2.01	2.11
	3	467.30	2.07	2.22
El Marcial	1	649.40	2.03	2.11
	2	624.70	2.02	2.14
	3	812.30	2.12	2.14
Francisco Villa	1	569.80	2.01	2.00
	2	674.00	1.99	2.05
	3	1018.90	2.11	2.19
Comonfort	1	510.70	2.07	2.20
	2	452.70	2.08	2.24
	3	433.00	2.09	2.16

La amplificación purificada en el gel de agarosa mostró que todos los fragmentos de ADN de *Sorghum halepense* con los iniciadores asignados, amplificaron en un rango aproximado de 1300 pares de bases (pb). Cabe mencionar que las marcas fluorescentes a la altura de 300 pb corresponden a pocillos superpuestos en el gel de agarosa (Figura 17).



Figura 17. Amplificación de los fragmentos purificados de ADN en las poblaciones de *Sorghum halepense*. UFPR, Brasil. 2019.

Los resultados del secuenciamiento se limpiaron en el programa BioEdit. Posteriormente se convirtieron en formato FASTA para someterlos a un BLAST en NCBI en el cual los biotipos Oro verde, El Marcial, Francisco Villa y Comonfort presentaron una similitud mayor al 99 % con las accesiones del gen ALS de *Sorghum halepense* MF462186.1 (susceptible) y MF462189.1 (resistente) provenientes de Italia y Hungría (Panozzo *et al.*,2017). Los alineamientos se compararon con las dos accesiones anteriores más una de *Arabidopsis thaliana* del gen ALS (NM\_114714.3) sugerida por el Doctor Patrick Tranel (comunicación personal), con el objetivo de consensuar la numeración universal de las mutaciones puntuales en el gen ALS (Ala 122, Pro 197, Ala 205, Asp 376, Arg 377, Trp 574, Ser 653 y Gly 654).

Los resultados mostraron un cambio de bases en los nucleótidos GAT a GAA lo que resultó en una sustitución del aminoácido Asp (ácido aspártico) a Glu (ácido glutámico), en la posición 376 (Figura 18).

<input checked="" type="checkbox"/> Name																			
<input checked="" type="checkbox"/> 1. GEN ALS Arabidopsis thaliana	G	G	T	T	T	G	A	T	G	A	T	C	G	T	G	T			
<input checked="" type="checkbox"/> 2. Sorghum halepense Italia (S)	G	G	T	T	T	G	A	T	G	A	T	C	G	T	G	T			
<input checked="" type="checkbox"/> 3. Sorghum halepense Hungría (R)	G	G	T	T	T	G	A	T	G	A	A	C	G	T	G	T			
<input checked="" type="checkbox"/> 4. COMONFORT (S)	G	G	T	T	T	G	A	T	G	A	T	C	G	T	G	T			
<input checked="" type="checkbox"/> 5. ORO VERDE (R)	G	G	T	T	T	G	A	T	G	A	A	C	G	T	G	T			
<input checked="" type="checkbox"/> 6. EL MARCIAL (R)	G	G	T	T	T	G	A	T	G	A	A	C	G	T	G	T			
<input checked="" type="checkbox"/> 7. FRANCISCO VILLA (R)	G	G	T	T	T	G	A	T	G	A	A	C	G	T	G	T			

Species/Abbrv	C	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
1. GEN ALS Arabidopsis thaliana	D	L	L	L	A	F	G	V	R	F	D	D	R	V	T	G	K		
2. Sorghum halepense (susceptible) Italia	D	L	L	L	A	F	G	V	R	F	D	D	R	V	T	G	K		
3. Sorghum halepense (Resistente) Hungría	D	L	L	L	A	F	G	V	R	F	D	E	R	V	T	G	K		
4. COMONFORT (S)	D	L	L	L	A	F	G	V	R	F	D	D	R	V	T	G	K		
5. ORO VERDE (R)	D	L	L	L	A	F	G	V	R	F	D	E	R	V	T	G	K		
6. FRANCISCO VILLA (R)	D	L	L	L	A	F	G	V	R	F	D	E	R	V	T	G	K		
7. EL MARCIAL (R)	D	L	L	L	A	F	G	V	R	F	D	E	R	V	T	G	K		

Figura 18. Alineamiento y comparación de secuencias. A: Secuencia de nucleótidos, cambio de GAT susceptible a GAA Resistente. B: Conversión a secuencia de Aminoácidos, cambio de D (Asp) a E (Glu) en la posición 376.

Esta mutación confiere niveles elevados de resistencia a herbicidas inhibidores de ALS. Tal es el caso de *Amaranthus hybridus* L. el cual presenta índices de resistencia de 60 a 3200 veces más que su biotipo susceptible en algunos herbicidas de las familias químicas de las Sulfonilureas (SU), Imidazolinonas (IMI), Pirimidiltiobenzoatos (PTB) y Triazolpirimidinas (TP) (Whaley, Wilson, & Westwood, 2007). Hasta el momento existen 120 especies de malezas que han presentado mutación en el gen ALS, adquiriendo resistencia a diferentes herbicidas, 13 de ellas presentan la mutación Asp376Glu, sin embargo, solo una Poacea (*Lolium perenne*), se encuentra reportada en el portal de la Weed Science (Heap, 2019).

## 5.4 CONCLUSIONES

Se confirmó la resistencia en los biotipos “Oro Verde”, “El Marcial” y “Francisco Villa” al herbicida Nicosulfuron. Contrario a ellos el biotipo Comonfort exhibió alta susceptibilidad.

Las poblaciones de “Oro Verde”, “El Marcial” y “Francisco Villa” fueron 69, 34 y 92 veces más resistentes que la población susceptible (Comonfort), la cual requirió dosis de 1.6 g i.a. ha<sup>-1</sup> para reducir el peso de su biomasa en un 50%.

El biotipo “El Marcial” presentó una disminución del Índice de resistencia (IR) en un 6.1 a causa de la inhibición del Citocromo P450.

El mecanismo involucrado de resistencia al herbicida Nicosulfuron en los biotipos Oro Verde, El Marcial y Francisco Villa, se atribuye a una mutación en el gen ALS debido a una sustitución de asp376glu.

Hasta donde se tiene información este es el segundo caso a nivel global y primer caso en México con dicha mutación en esta especie.

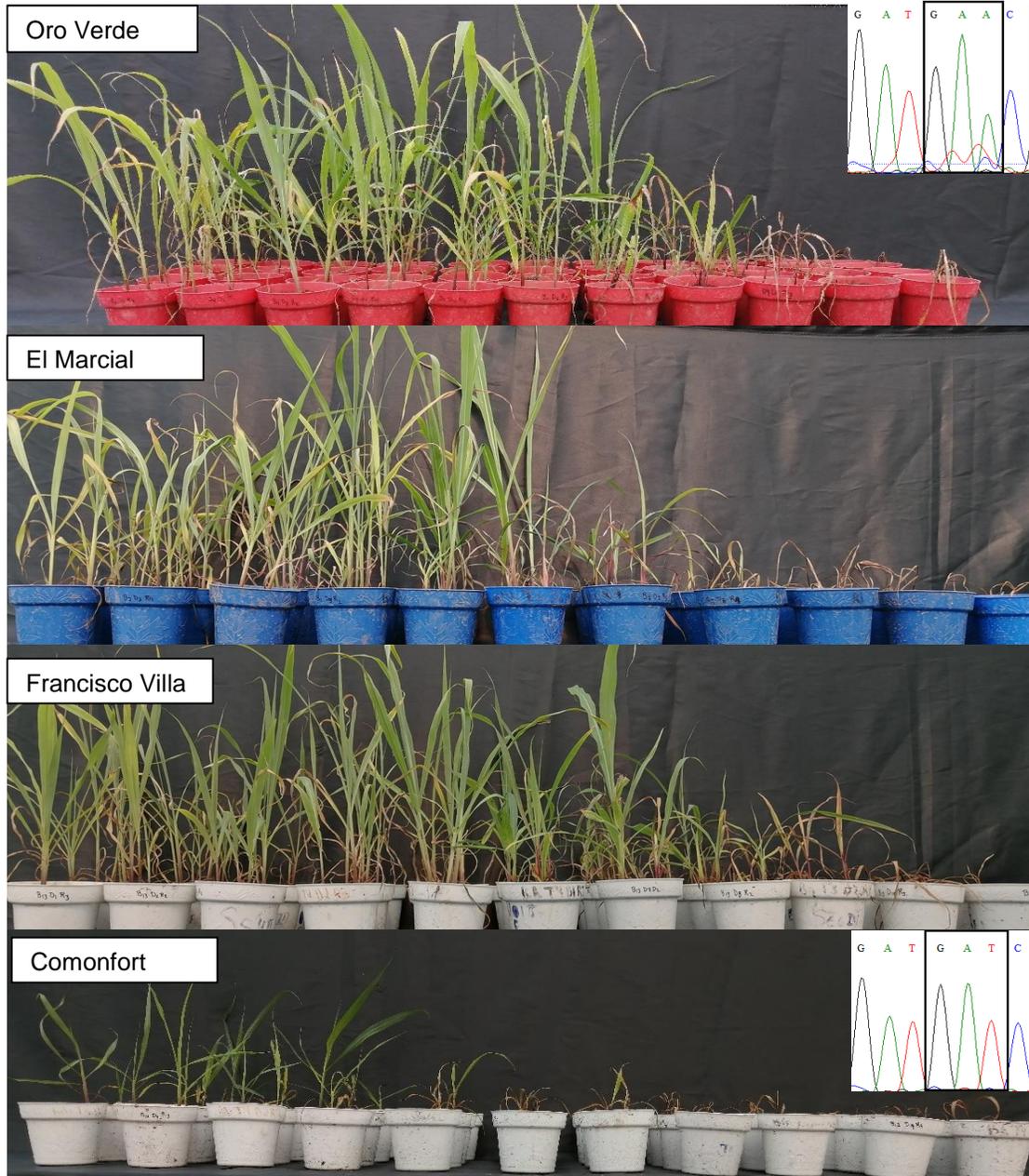
## 5.5 LITERATURA CITADA

- Beckie, H. J., Heap, I. M., Smeda, R. J., & Hall, L. M. (2000). Screening for herbicide resistance in weeds. *Weed Technology* 14(2): 428-445.
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue (No. RESEARCH).
- Heap, I. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Online. Internet. Tuesday, December 3, 2019. Available [www.weedscience.org](http://www.weedscience.org).
- Hernández, M. J., León, R., Fischer, A. J., Gebauer, M., Galdames, R., & Figueroa, R. (2015). Target-site resistance to nicosulfuron in Johnsongrass (*Sorghum halepense*) from Chilean corn fields. *Weed Science* 63(3): 631-640.
- Panozzo, S., Milani, A., Scarabel, L., Balogh, A., Dancza, I., & Sattin, M. (2017). Occurrence of Different Resistance Mechanisms to Acetolactate Synthase Inhibitors in European *Sorghum halepense*. *Journal of agricultural and Food Chemistry* 65(34): 7320-7327.

- Seefeldt, S. S., Jensen, J. E., & Fuerst, E. P. (1995). Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationships. *Weed Technology* 9(2): 218-227.
- Tranel, P. J., & Wright, T. R. (2002). Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned?. *Weed Science* 50(6): 700-712.
- Whaley, C. M., Wilson, H. P., & Westwood, J. H. (2007). A new mutation in plant ALS confers resistance to five classes of ALS-inhibiting herbicides. *Weed Science* 55(2), 83-90.
- Werck-Reichhart, D., Hehn, A., & Didierjean, L. (2000). Cytochromes P450 for engineering herbicide tolerance. *Trends in Plant Science* 5(3): 116-123.

## 5.6 ANEXOS

Anexo 4. Bioensayo general de dosis respuesta y electroferograma de un biotipo resistente (Oro Verde) y uno susceptible (Comonfort) presentando el cambio de bases GAA a GAT en el gen ALS.



Biotipos “Oro Verde”, “El Marcial” y “Francisco Villa”, de izquierda a derecha dosis crecientes de 0, 0, 3.75, 7.5, 15, 30, 60, 120, 240, 480 y 960 g i.a. ha<sup>-1</sup>. Biotipo Comonfort de izquierda a derecha dosis crecientes de 0, 0, 0.93, 1.87, 3.75, 7.5, 15, 30, 60, 120 Y 240 g i.a.ha<sup>-1</sup>.