



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN
EN CIENCIAS AGRÍCOLAS
INSTITUTO DE FITOSANIDAD
PROGRAMA DE ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA**

**PRUEBA RÁPIDA PARA LA DETECCIÓN DE PLANTAS DE MAÍZ
RESISTENTES AL HERBICIDA GLIFOSATO**

JAIME ALFREDO URZÚA GUTIÉRREZ

**TESIS
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

MAESTRO EN CIENCIAS


MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO


2012

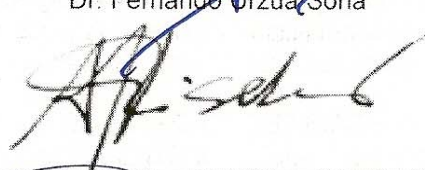
La presente tesis titulada: **Prueba rápida para la detección de plantas de maíz resistentes al herbicida glifosato**, realizada por el alumno **Jaime Alfredo Urzúa Gutiérrez**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

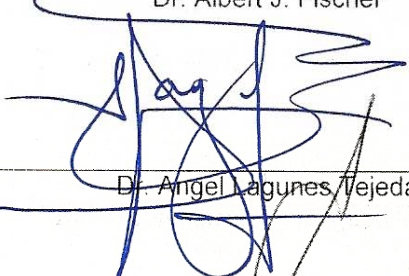
MAESTRO EN CIENCIAS
PROGRAMA DE ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

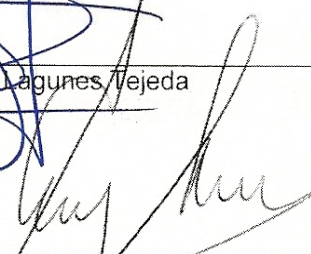
CONSEJO PARTICULAR

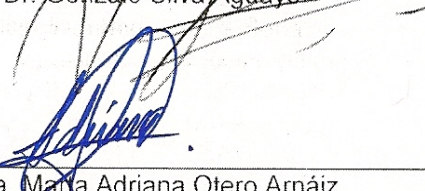
Consejero 
Dr. J. Concepción Rodríguez Maciel

Asesor 
Dr. Fernando Urzúa Soria

Asesor 
Dr. Albert J. Fischer

Asesor 
Dr. Angel Lagunes Tejeda

Asesor 
Dr. Gonzalo Silva Aguayo

Asesor 
Dra. María Adriana Otero Arnáiz

Montecillo, Texcoco, Estado de México. Mayo de 2012

AGRADECIMIENTOS

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo brindado mediante una beca para poder realiza mis estudios de maestría.

Al Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo (línea Prioritaria de Investigación 7: Inocuidad, Calidad Agroalimentaria y Bioseguridad) por el apoyo para mi trabajo.

A la Universidad Autónoma Chapingo y a la Universidad de California, Campus Davis por su cooperación para la realización de este proyecto.

Al Dr. J. Concepción Rodríguez Maciel por ser mi consejero particular, maestro, director de tesis y amigo.

Al Dr. Fernando Urzúa Soria por todo el apoyo incondicional, disposición para ayudarme, por su enseñanza y su ejemplo de vida.

Al Dr. Albert J. Fischer por la asesoría brindada a mi trabajo y por ser un excelente maestro.

Al Dr. Angel Lagunes Tejeda, Dr. Gonzalo Silva Aguayo y Dra. Marta Adriana Otero Arnaiz por sus colaboraciones y asesoría.

A mis compañeros Guadalupe, Alejandro, Daniel, Alma, y Gustavo por su amistad durante todo este tiempo.

DEDICATORIA

A mi novia Nataly Jiménez Delgado por su apoyo incondicional y su cariño.

A mi padre Fernando Urzúa Soria, por su gran calidad humana, por su gran ejemplo de éxito profesional y personal, por sus consejos y su amistad.

A mi madre Estrella Leticia Gutiérrez Salazar, por su gran y tenaz ejemplo de mejorar constantemente, por su cariño y comprensión.

A mi hermano Fernando Adolfo, por su amistad y sus ganas de superación.

A mi hermano Alvaro Daniel, por su amistad y su buena actitud ante todo.

A mi abuelita María Dolores Salazar García por su gran apoyo que siempre a mostrado hacia nosotros.

INDICE

	Página
1. Introducción	3
1.1. Revisión bibliográfica.....	6
1.1.1. El Maíz	6
1.1.1.1. Generalidades del maíz.....	6
1.1.1.2. Origen del maíz	7
1.1.1.3. Importancia económica del cultivo de maíz	8
1.1.1.4. Requerimientos del cultivo de maíz	9
1.1.1.5. Manejo del cultivo de maíz en México	9
1.1.1.6. Manejo de las malezas en el cultivo de maíz	12
1.1.2. El herbicida glifosato	12
1.1.2.1. Generalidades del glifosato	13
1.1.2.2. Toxicidad del glifosato en animales	14
1.1.2.3. Persistencia del glifosato en el ambiente	15
1.1.2.4. Toxicidad y riesgos al aplicador por exposición a glifosato ...	15
1.1.2.5. Formulaciones del glifosato	16
1.1.3. Los organismos genéticamente modificados	16
1.1.3.1. Uso de la biotecnología en la agricultura	16
1.1.3.2. Antecedentes de la formación de plantas transgénicas	17
1.1.3.3. Cultivos resistentes a glifosato	20
1.1.3.4. Riesgos con el uso de transgénicos	21

1.1.4. Los transgénicos en México	22
1.1.5. Pruebas para detectar tolerancia a glifosato	23
1.1.5.1. Bioensayos con macetas en invernadero	24
1.1.5.2. Bioensayo de laboratorio en cajas Petri	25
1.1.5.3. Bioensayos con pedazos de hojas	25
1.1.5.4. Bioensayos basados en el metabolismo	25
1.1.5.5. Acumulación de Shikimato	26
1.1.5.6. Determinación de EPSPS	27
1.1.5.7. Secuenciación de ADN	27
1.1.5.8. Prueba rápida basada en el efecto del glifosato en la fotosíntesis	27
1.2. Literatura citada	29
2. Prueba rápida para la detección de plantas de maíz resistentes al herbicida glifosato.....	33
3. Conclusiones.....	54

PRUEBA RÁPIDA PARA LA DETECCIÓN DE PLANTAS DE MAÍZ RESISTENTES AL HERBICIDA GLIFOSATO

RESUMEN

La liberación al ambiente de maíz (*Zea mays* L) genéticamente modificado resistente a glifosato, requiere de metodologías rápidas, confiables y no destructivas que permitan detectar de manera confiable siembras ilegales o presencia de plantas que expresan este gen transferido vía flujo de polen. Para tal fin, se elaboró una prueba rápida que delata la presencia de transgenes con resistencia a glifosato y su eficacia se corroboró con la prueba bioquímica de acumulación de shikimato. La metodología consiste en cortar discos de hoja de 0.5 cm de diámetro de la tercera hoja verdadera de plantas de maíz de dos semanas de edad y exponerlos a la concentración de 4.32 g i.a. L⁻¹ de glifosato más 2% v/v de sulfato de amonio, durante 12 h a 40 °C; luego a una intensidad lumínica de 200 $\mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por 36 h. Los discos de plantas susceptibles se blanquean totalmente, mientras que los provenientes de plantas resistentes a glifosato mantienen su color verde. Los resultados de la prueba propuesta concordaron con los obtenidos mediante la prueba de shikimato.

Palabras clave: Maíz transgénico, maíz biotecnológico, bioseguridad, shikimato

QUICK TEST FOR DETECTING CORN PLANTS RESISTANT TO THE HERBICIDE GLYPHOSATE

SUMMARY

The environmental release of genetically modified corn (*Zea mays* L.) resistant to glyphosate, requires fast, reliable and nondestructive methodologies to detect reliably the presence of illegal crops or plants expressing the transgene via pollen flow. For this purpose, we developed a quick test that reveals the presence of glyphosate-resistant transgenes and their effectiveness was confirmed with biochemical evidence of accumulation of shikimate. The methodology consists in cutting leaf discs of 0.5 cm of diameter of the third true corn leaf of two weeks of age and exposure it to concentrations of 4.32 g ai L⁻¹ of glyphosate plus 2% v / v ammonium sulfate during 12 h at 40 ° C, then to a light intensity of 200 $\mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ for 36 h. The discs of susceptible plants are bleached completely, while those from glyphosate-resistant plants maintain their green color. The proposed test results agreed with those obtained by testing shikimate.

Keywords: Transgenic corn, Biotechnologic corn, biosafety, shikimate.

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de maíz (*Zea mays* L) resistente al herbicida glifosato se empezó a utilizar comercialmente en el año 1998 en los Estados Unidos de Norteamérica (Spencer *et al.*, 2000). Actualmente, los países con mayores superficies cultivadas de este grano son EE.UU, Brasil, Argentina, Sudáfrica y Canadá, con 29.9, 5.0, 2.1, 1.9 y 1.17 millones de ha, respectivamente (GMO Compass, 2011). Esta tecnología permite usar al glifosato para controlar un espectro amplio de especies de maleza, con menor riesgo ambiental que el resto de las opciones químicas disponibles para el combate de malezas en maíz (Nandula, 2010).

En México, para cultivos biotecnológicos se consideran tres etapas de liberación, en función de sus riesgos y de las medidas de bioseguridad asociadas, que son: experimental, piloto y comercial. Durante el año de 2009 la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) aprobó 32 solicitudes de liberación experimental para un total de 14.43 has de maíz genéticamente modificado para los estados de Sonora, Sinaloa, Chihuahua, Tamaulipas y Durango. En 2010, se autorizó la siembra de 59.51 ha, también en fase experimental, incluyéndose al grupo anterior el estado de Coahuila. Para septiembre de 2011, se tenían aprobadas 51 solicitudes de liberación experimental y 10 solicitudes de liberación en etapa piloto (SENASICA, 2011).

El uso de maíz biotecnológico, al igual que otras tecnologías, va acompañado de riesgos que deben estimarse y manejarse apropiadamente. Dentro de este contexto, las siembras ilegales y los riesgos derivados del flujo génico hacia maíces nativos representan una de las preocupaciones más importantes del Gobierno Federal y de la sociedad mexicana. Quist y Chapela (2001) demostraron la existencia de transgenes en maíces nativos de la sierra de Oaxaca.

Estudios posteriores no volvieron a encontrar su presencia (Ortiz *et al.*, 2005), quizás porque se encontraban en una frecuencia baja, no detectable por la metodología utilizada.

La obligación de cuidar la biodiversidad está plasmada en compromisos internacionales y nacionales. En enero de 2000, México publicó la ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados. Posteriormente, en mayo de ese mismo año, suscribió el protocolo de Cartagena y lo ratificó dos años después, entrando éste en vigor el 11 de septiembre de 2003. Su objetivo es contribuir a garantizar un nivel adecuado de protección de la biodiversidad cuando se utilizan cultivos genéticamente modificados, sentando las bases generales para la actuación de los países que lo ratificaron (López, 2008).

En México, el maíz biotecnológico ha sido controversial, ya que unos grupos demandan al Gobierno Federal acelerar los procesos para su liberación comercial; mientras que otros sostienen que esta tecnología no contribuye a incrementar los rendimientos, y si representa riesgos no manejables a la biodiversidad. Ambos grupos coinciden en la importancia de desarrollar metodologías que permitan localizar oportunamente los transgenes en campo.

El glifosato [N-(fosfometil) glicina] se introdujo al mercado en 1974 y actualmente es el herbicida más usado en el mundo por ser altamente eficaz para controlar en post emergencia a un amplio espectro de especies de maleza anuales y perennes, no tener actividad herbicida residual en el suelo, y ser toxicológica y ecológicamente de bajo perfil (Duke y Powless, 2008). Este compuesto inhibe la acción de la enzima 5-enolpiruvyl-shikimato-3-fosfato sintetasa (ESPS) en la ruta del ácido shikímico, al suplantarlo al fosfoenolpiruvato, uno de los sustratos para la ESPS (Koger y Reddy, 2005). La insuficiencia de ESPS conlleva a la acumulación de shikimato-3-fosfato y a la escasa producción de aminoácidos aromáticos (triptófano, fenilalanina y tirosina)

necesarios para la síntesis de proteínas que intervienen en la formación de carotenoides, produciendo como síntomas iniciales de daño, clorosis y blanqueado (Duke y Powless, 2008).

Actualmente, la metodología más confiable para detectar resistencia a glifosato consiste en determinar, mediante pruebas bioquímicas, la acumulación de shikimato (Shaner *et al.*, 2005). Sin embargo, es costosa, requiere personal especializado y no maneja tamaños de muestra grandes; por tanto, es útil para confirmar la presencia de plantas resistentes a glifosato, pero ineficiente para detectarla a nivel poblacional, sobre todo cuando las frecuencias alélicas son bajas. Otras metodologías se basan en la aplicación directa del herbicida a las plantas, o en la inmersión de partes de éstas (Yuan, 2001; Koger *et al.* 2009), pero sus resultados no se consideran satisfactorios por ser lentos, subjetivos y no poder procesar tamaños de muestras grandes (Shaner *et al.*, 2005).

El objetivo del presente estudio fue desarrollar una metodología no destructiva, eficaz y barata para detectar la presencia de plantas de maíz resistentes al herbicida glifosato.

1.1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1.1. EL MAIZ

1.1.1.1. Generalidades del maíz

El maíz junto con el trigo y el arroz, constituyen los pilares de la alimentación humana (Reyes, 1990). No se sabe con certeza la época y lugar donde apareció por primera vez el maíz, pero se le considera a México como uno de los primeros centros de domesticación de esta gramínea (Wellhausen, 1981). La información recopilada a la fecha, indica que la domesticación del maíz se inició hace más de 10,000 años en la región de El Bajío y Occidente de México; posteriormente el maíz domesticado se difundió por otras zonas de Centroamérica, Sudamérica y el Caribe (Miranda, 1998).

El maíz fue el alimento básico de culturas y civilizaciones avanzadas como la Inca en Sudamérica; y la Maya y Azteca en Mesoamérica (Mera, 2010). Evolucionó paralelamente con otros cultivos de importancia económica mundial como el frijol (*Phaseolus* spp.), chile (*Capsicum* spp.), calabaza (*Cucurbita* spp.), tomate (*Physalis* spp.), jitomate (*Solanum* spp.), algodón (*Gossypium* spp.) y cacao (*Theobroma cacao*) (Mera, 2010).

La palabra “maíz” se acuñó por los españoles y proviene del vocablo “mahíz”, un dialecto aborigen de la isla de Haití que se utilizó para denominar a la planta, cultivo y grano que conocemos, con gran diversidad de usos y difundida por todo el mundo. En la América precolombina se le conocía con diferentes nombres: en Náhuatl como Tlayolli, Centli, Cinte o Cintle; en maya, Ixi; en huasteco, Iziz; en otomí, Detha; en quechua, Pirissincu; en guaraní, Abatí (Reyes, 1990).

1.1.1.2. Origen del maíz

El origen botánico del maíz no se ha esclarecido con precisión y se siguen planteando varias teorías: la más aceptada sostiene que el maíz actual procede de un maíz tunicado descendiente del Teocintle, que ha ido evolucionado por mutación, selección e hibridación. También se propone que el maíz es un híbrido trigenérico natural entre el Teocintle (*Zea* spp.), *Tripsacum dactyloides* y una gramínea ya extinta emparentada a estos dos materiales (Miranda, 1998).

Tanto el maíz como el teocintle son únicos entre las gramíneas porque tienen las flores masculinas y femeninas en lugares separados. La inflorescencia masculina se desarrolla en posición terminal en forma de panoja, y la inflorescencia femenina en una mazorca (maíz) o espiga (teocintle), que ocupan una posición lateral en la planta. Tal arquitectura morfológica favorece la contaminación por polinización anemófila (Garrison, 1995). No obstante, no es fácil detectar híbridos de maíz-teocintle en los lugares que comúnmente conviven ambas especies (Kermicle, 1995).

En México existe gran diversidad de razas de maíz dispersas en todo el país, que han sido clasificadas de la siguiente manera: a) Indígenas antiguas (Palomero toluqueño, Arrocillo amarillo, Chapalote y Nal-Tel); b) Exóticas precolombinas (Cacahuacintle, Harinoso de ocho, Olotón y Maíz dulce); c) Mestizas prehistóricas (Cónico, Reventador, Tabloncillo, Tehua, Tepecintle, Comiteco, Jala, Zapalote chico, Zapalote grande, Pepitilla, Olotillo, Tuxpeño y Vandeño); d) Modernas incipientes (Chalqueño, Celaya, Cónico norteño y Bolita); e) Serranas occidentales (Tablilla de 8, Bofo, Gordo, Azul y Apachito) (Wellhausen, 1981); colectas de ellas se encuentran depositadas en los Bancos de Germoplasma y constituyen una fuente muy amplia e invaluable para el mejoramiento genético de esta especie (Reyes, 2010).

1.1.1.3. Importancia económica del cultivo de maíz

El maíz es el recurso natural renovable más importante del mundo. Después del petróleo, que es no renovable, es el producto que más usos tiene. La producción de este grano tuvo un crecimiento de 75% entre 1980 y 2006, pasando de 400 a 700 millones de toneladas (Mt) (Salazar, 2010). De acuerdo con la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO), en 2005 se produjeron 711.8 Mt de maíz en una superficie cosechada de 147.6 millones de hectáreas (Mha). Seis países concentraron el 80% de la producción mundial: EE.UU (43%), China (18%), Unión Europea (7.5%), Brasil (6%), México (3%) y Argentina (2.5%). EE.UU. y China consumen más de la mitad del maíz que se produce en el mundo; el primero con fines pecuarios y el segundo para la alimentación humana (SIAP/SAGARPA, 2007).

En México la superficie sembrada de maíz ha variado a través de los años, en el periodo de 1940 a 1944 se sembraron en promedio 3.4 Mha, de 1965 a 1969 se establecieron 7.7 Mha, en 1999 fueron 8.2 Mha, y en 2010 la superficie ascendió a 8.4 Mha; de las cuales en el último año el 81% fue de temporal y el 19% restante bajo condiciones de riego. El rendimiento promedio nacional también se incrementó de 941 kg/ha que se registró en el año de 1940, a 1,830 kg/ha en 1980, a 1,990 kg/ha en 1990, a 2460 kg/ha en 2000, y a 3260 kg/ha en 2010 (García, 1999 y SIAP/SAGARPA, 2011).

En 2010 se cosecharon 7,148,046 ha de maíz para grano con una producción total de 23.3 millones de toneladas (SIAP, SAGARPA, 2011); esta producción representa el 12% del PIB del sector agrícola del país e involucra a 3 millones de productores, que junto con sus familias conforman el 55% de la población rural y casi el 13% de la población de México. Para 2012 se estima un consumo total de maíz de 38.9 Mt, mientras que la producción nacional llegará a

solamente a 24,6 Mt; es decir, habrá un déficit de 14,3 Mt, los cuales necesariamente deberán importarse (CCEESP, 2010).

1.1.1.4. Requerimientos del cultivo de maíz

El maíz se cultiva bajo condiciones edáficas muy diversas de textura, pendiente, fertilidad, pH, etc. No obstante, los mayores rendimientos se obtienen en los suelos profundos, con buen drenaje, fértiles, de fácil manejo, pH entre 6 y 7, y bien aireados. No son convenientes para la siembra de maíz los suelos muy arcillosos o demasiado arenosos, con pendientes mayores a 3%, humíferos, salinos, inundables o contaminados con residuos industriales (Castañeda, 1990).

La naturaleza alogámica del maíz ha originado gran variación genética de la especie, existiendo variedades adaptadas a infinidad de condiciones. Se cultiva desde los 58° de latitud norte en Canadá y Rusia, hasta 40° latitud sur en Brasil y Argentina; y a altitudes que van desde el nivel del mar, hasta los 3,200 msnm en la región andina de Perú. Por ser una planta C4, para su óptimo desarrollo requiere de tiempo caluroso durante el día y fresco en la noche, fotoperiodos largos y humedad adecuada. La planta reduce su crecimiento cuando la temperatura promedio es inferior a 18.9 C° durante el día y 12.8 C° durante la noche, el fotoperiodo es corto, o se tienen deficiencias de humedad. En México se presentan diversos factores del clima que recurrentemente afectan la producción de maíz, tales como heladas tempranas o tardías, neblina, sequías, inundaciones, granizadas, tormentas, huracanes, vientos fuertes, etc. (Castañeda, 1990).

1.1.1.5. Manejo del cultivo de maíz en México

Existe gran cantidad de variantes en el manejo del cultivo de maíz, desde sistemas en los que no se hace uso de insumos externos y todo se basa en energía humana como la roza, tumba y

quema, la cual se efectúa en varias regiones tropicales del país y que consiste en tirar los árboles, rozar los arbustos, amontonar y quemar, para posteriormente sembrar con coa, espeque o estaca, y posteriormente efectuar deshierbes con machete; hasta situaciones en que se hace uso extensivo e intensivo de maquinaria, semilla mejorada, riego, fertilizantes, plaguicidas y asistencia técnica. Bajo la primer situación las densidades de siembra varían de 20 a 50 mil plantas por hectárea, con rendimientos de 500 a 2500 kg ha⁻¹; en tanto, en los sistemas tecnificados las densidades varían de 50 a 125,000 kg ha⁻¹ y los rendimientos llegan a sobrepasar las 15,000 kg ha⁻¹ (Arvizu y Salazar, 2010).

En los años setentas se promovía el uso de diferentes paquetes tecnológicos para el manejo del cultivo de maíz, los cuales de manera general comprendían las siguientes actividades: desvare, paso de arado de subsuelo, paso de arado de discos o de vertedera, rastreo y nivelación; en la actualidad por razones económicas y conservacionistas se busca sólo efectuar lo necesario (Castañeda, 1990). La remoción del suelo se efectúa con el objetivo de preparar una cama de siembra, incorporar al suelo los residuos de la cosecha y maleza del ciclo anterior, controlar la maleza, facilitar la nivelación, el riego y drenaje, mejorar la aireación del suelo, controlar insectos y patógenos del suelo, favorecer la germinación y emergencia de las plántulas, entre otras (Gaytán, 2010).

En diversos lugares de los valles del centro, occidente y sur del país que registran precipitaciones pluviales menores a 700 mm, se efectúa la siembra en cajetes que consiste en preparar el terreno inmediatamente después de la cosecha para captar las lluvias de diciembre y enero, luego se dan pasos de rastra para arropar la humedad; se hace un surcado poco antes de la siembra, se siembra con espeque o pala a una profundidad de 10 a 20 cm, hasta encontrar la humedad, colocando las semillas en arreglo de “tresbolillo” a una distancia de alrededor de un

metro una de otra. Se utiliza semilla criollas de ciclo largo. Cuando se tiene buen inicio de lluvias se fertiliza y emplean otros agroquímicos. En este sistema se combina el empleo de tractor, yunta y mano de obra (Rivas *et al.* 2005).

La tendencia mundial es reducir al mínimo las prácticas de labranza que se realizan a los cultivos con el fin de disminuir los costos de producción y hacer sustentable la actividad agrícola (Powers & McSorley, 2011), la cual para lograr dicha calificación requiere: a) el suelo no debe de ser degradado por erosión, contaminación o pérdida de estructura (compactación); b) el manejo del recurso agua debe de asegurar el suministro que las plantas requieren y la eliminación por drenaje de los excesos; c) la biología y ecología del sistema deben de ser preservados a través del manejo de los recursos genéticos de plantas y animales; d) las expectativas sociales, las normas culturales y las necesidades de fibras y alimentos de la población deben ser satisfechas; y e) los sistemas deben poseer viabilidad económica y generar al productor una renta aceptable (Lybecker *et al.*, 1991).

El descuido de los principios básicos de la conservación de suelos agrícolas, conlleva a una degradación paulatina, que dependiente del clima, tipo de suelo, pendiente y forma de manejo, provocará tarde o temprano serias deficiencias de orden físico, químico y biológico. Se han desarrollado diferentes técnicas e implementos agrícolas, que permiten ahorrar tiempo y energía a los productores, así como reducir la erosión del suelo y conservar los recursos cada vez más escasos. Sistemas alternativos de manejo del cultivo son: La labranza mínima de conservación y la labranza cero de conservación; con estos sistemas se mejora la fertilidad de los suelos, se conserva el suelo y la humedad, se reducen los costos de producción y se hace más rentable el cultivo (Crovetto, 1996).

1.1.1.6. Manejo de las malezas en el cultivo de maíz

Las malezas siempre aparecen en los cultivos agrícolas, su presencia reduce la cantidad del producto cosechado de un 25 a 35% al competir por agua, luz, nutrientes y espacio. Las malezas también ocasionan otros tipos de daños como alelopatía desfavorable hacia el cultivo, hospedar plagas y enfermedades y dificultar la cosecha; por lo cual se hace necesario disponer de alternativas de control que sean efectivas, seguras y rentables (Bridges, 1994). El control químico de la maleza se ha generalizando entre los productores de maíz, quienes emplean productos pre emergentes y post emergentes, selectivos y no selectivos, usándose en México al menos 30 ingredientes químicos diferentes (Urzúa, 2009).

A nivel mundial el herbicida más usado es el glifosato; se estima que éste ocupa el 25% del consumo total de herbicidas. Solamente en los Estados Unidos de América, en el año de 2008 se asperjaron 85,000 ton de este producto (Anonimo, 2008); y se espera que para el año de 2017 el consumo mundial de este herbicida llegue a 1.35 millones de toneladas (PRWeb, 2011). Entre los principales usos del glifosato se encuentran: la preparación del terreno mediante barbecho químico para siembras sin remoción del suelo; el control de malezas en frutales y áreas no agrícolas; la eliminación de malezas en cuerpos de agua; y su uso cada vez más intensivo es en los cultivos genéticamente modificados, también denominados transgénicos (Urzúa, 2009).

1.1.2. EL HERBICIDA GLIFOSATO

1.1.2.1. Generalidades del glifosato

El glifosato se descubrió en 1950 por el químico suizo Henri Martin, quien trabajaba para la compañía farmacéutica Cilag (Franz *et al.*, 1997). La molécula se vendió en varias ocasiones pues no se le conocía ningún uso. En los años 60's, Phil Hamm le encontró actividad herbicida

sobre algunas malezas perenes; sin embargo, su acción era muy lenta para considerarla comercialmente viable (Halter, 2007). En Mayo de 1970 la molécula de glifosato la sintetizó por Monsanto y se evaluó al año siguiente en ensayos de efectividad biológica (Baird, 1971).

La molécula N-(fosfonometyl) glicina (glifosato) se introdujo al mercado en 1974 y actualmente es el herbicida que más se usa en el mundo, por ser altamente eficaz para controlar en post emergencia un amplio espectro de malezas anuales y perennes, no tener actividad herbicida residual en el suelo, y ser toxicológica y ecológicamente muy seguro. Es la única molécula herbicida que inhibe la acción de la enzima 5-enolpiruvyl-shiquimato-3-fosfato sintetasa (ESPS) en la ruta del ácido shikimico, al suplantarlo al fosfoenolpiruvato, uno de los sustratos para la ESPS (Koger and Reddy, 2005). La insuficiencia de ESPS conlleva a la acumulación de shiquimato-3-fosfato y escasa producción de aminoácidos aromáticos (triptófano, fenilalanina y tirosina) necesarios para la síntesis de proteínas que intervienen en la formación de carotenoides, produciendo como síntomas iniciales de daño, clorosis y blanqueado (Duke y Powless, 2008); además, dichos aminoácidos también son precursores de hormonas y diversos metabolitos de importancia crítica (CaJacob *et al.*, 2003). La enzima ESPS se encuentra presente en plantas, hongos, y bacterias, pero no en animales, por lo que existe poco riesgo que afecte a estos organismos (Kishore y Shah, 1988).

El glifosato un herbicida sistémico que sólo se absorbe por las hojas y tallos verdes, es muy móvil en toda la planta por vía del simplasma. La penetración y translocación puede ser mejorada agregando sulfato de amonio o urea en proporción de 1 a 2 % m/v. Es más efectivo cuando se aplica con volúmenes bajos de mezcla de aspersión y se le adiciona un penetrante (Ramsdale *et al.*, 2003). Produce una clorosis inicial y a los 8 - 20 días la planta muere (síntomas lentos). Se degrada rápidamente en el suelo por los microorganismos; también se

adsorbe en el suelo por lo que no es lixiviado. Su persistencia es muy breve, y no presenta fitotoxicidad en cultivos que se siembren inmediatamente después de su aplicación (Ross y Lembi, 1999).

Diversas formulaciones de glifosato se encuentran autorizadas y registradas para el control de más de 100 especies de malezas, en más de 100 cultivos y en más de 130 países (Nandula, 2010). Antes del surgimiento de malezas resistentes al glifosato, se decía que todas las plantas podrían ser controladas si se les aplicaba a éstas la dosis apropiada (Mithila *et al.*, 2008).

En 2007 el volumen de uso global del glifosato se estimó en 600,000 toneladas, siendo China el principal productor de ingrediente activo con más del 40% del total (Research y Markets, 2008).

1.1.2.2. Toxicidad del glifosato en animales

Se considera al glifosato como moderadamente tóxico a organismos superiores como mamíferos, pájaros, peces e invertebrados acuáticos y terrestres (lombrices de tierra y abejas melíferas). La enzima EPSPS (que inhibe el glifosato en las plantas), sólo se encuentra presente en bacterias, plantas y hongos. Este modo de acción específico contribuye a la baja toxicidad observada para diversos grupos taxonómicos (Cerdeira y Duke, 2006). Dada la importancia creciente del glifosato, la división de ecotoxicología de la EPA mantiene su base de datos sobre estudios ecotoxicológicos de este herbicida (<http://cfpub.epa.gov/ecotox/>); en tanto Green Peace argumenta que el mundo deberá prepararse para abandonar al glifosato (Greenpeace, 2011).

1.1.2.3. Persistencia del glifosato en el ambiente

Bajo condiciones de luz natural, soluciones de glifosato con agua destilada no presentan fotodegradación significativa; y bajo luz artificial, las soluciones que contienen iones de calcio registran una fotodegradación lenta de las moléculas (Franz *et al*, 1997). En contraste, el glifosato se degrada muy rápidamente por los microorganismos del suelo tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas; o en soluciones de agua no esterilizada con sedimentos. Bajo condiciones ambientales normales, el glifosato tiene una vida media en el suelo menor a 38 días; además se ha demostrado que del 76 al 86% del herbicida se biodegrada a dióxido de carbón en un periodo menor a 6 meses (Franz *et al*, 1997; Giesy *et al.*, 2000).

1.1.2.4. Toxicidad y riesgos al aplicador por exposición a glifosato

Según Williams *et al.* (2000), las características toxicológicas del glifosato son evaluadas y revisadas frecuentemente por diferentes instancias regulatorias alrededor del mundo, tales como la Agencia Canadiense de Regulación y Manejo de Plaguicidas (PMRA, 1991), la Agencia de Protección Ambiental de los EE.UU (USEPA, 1993), La Organización Mundial de la Salud (WHO, 1994), la Agencia Europea del Medio Ambiente (2000) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2000); así como diversas dependencias gubernamentales de los países donde este herbicida está registrado. En general se concluye que el glifosato presenta una toxicidad muy baja para animales, tanto oral como dermal e inhalatoria; además no se han encontrado evidencias de que provoque o induzca carcinogenesis, mutagénesis, teratogénesis, neurotoxicidad o efectos en la reproducción; tampoco se ha demostrado que existan riesgos significativos por la exposición a glifosato en las personas que regularmente trabajan en su fabricación, formulación o aplicación (Acquavella *et al.*, 2004).

1.1.2.5. Formulaciones de Glifosato

Varias formulaciones que contienen glifosato se han vendido en Los Estados Unidos de América bajo el nombre de Round Up[®] de la compañía Monsanto por más de 30 años. No obstante, una vez que las patentes originales del uso de glifosato como herbicida y sales de glifosato expiraron, otras marcas como Touchdown[®] (de Syngenta), GlyphoMax[®] (Dow Agrosiences), GlyStar[®] (Albaugh), por mencionar algunas de las más de 50 marcas registradas, se han colocado en el mercado de EE.UU. En México se usan más de 30 formulaciones de herbicidas que contienen glifosato (PLM, 2011). La compañía Monsanto también comercializa en diferentes partes del mundo mezclas de glifosato con alaclor (Bronco[®]), con 2,4-D (Landmaster[®]), con dicamba (Fallowmaster[®]), y con atrazina más acetoclor (Fieldmaster[®]), las cuales tienen alguno de los siguientes propósitos: generar un efecto más agresivo sobre las malezas tolerantes o que se encuentran fases avanzadas, aumentar el espectro de acción de las aplicaciones, o lograr un efecto residual de los tratamientos (Nandula, 2010).

1.1.3. LOS ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS

1.1.3.1. Uso de la biotecnología en la agricultura

Estimaciones de la FAO (2004), indican que para el año 2030 la población mundial con problemas para cubrir sus necesidades de alimentación, se incrementará en dos mil millones de habitantes; esta cantidad se sumará a la población que en la actualidad no satisface tales requerimientos. En consecuencia se espera un incremento considerable en la sobreexplotación de los recursos naturales, los cuales desde ahora ya se encuentran en niveles alarmantes. Una alternativa que se señala reiteradamente para incrementar la producción agrícola, es la aplicación

de la Biotecnología en la agricultura, mediante el incremento en el uso de organismos genéticamente modificados o transgénicos (García - Olmedo, 2004).

Los transgénicos que se usan en la agricultura, medicina e industria, son organismos a los que se les alteró su conformación genética, para conferirles características deseables que difícilmente hubieran podido adquirir en condiciones naturales o mediante el proceso de mejoramiento convencional. Algunas de las ventajas que se le atribuyen a esta biotecnología son: que se manipula y transfiere de un organismo a otro a un gen específico, en vez de todo el genoma; que una vez identificado el gen de interés, existe la posibilidad de transferirlo indistintamente, sin importar si es de la misma o de otra especie; y que se reducen significativamente los tiempos para la obtención de nueva variedades o razas. El desarrollo de esta nueva revolución científica, ha sido posible por los avances logrados en ingeniería genética, biología molecular y agronomía entre otras, que están haciendo posible aumentar los rendimientos (Villalobos, 2008).

1.1.3.2. Antecedentes de la formación de plantas transgénicas

En 1970 se planteó y demostró la hipótesis de que la agalla del cuello producida *Agrobacterium tumefaciens*, se debía a la transferencia de material genético de la bacteria hacia las células de las plantas infectadas, y no por el efecto de la secreción de toxinas. En el proceso de infección, la bacteria es capaz de insertar un plásmido con fragmentos de su ADN (ADN-T) a la planta infectada, y su expresión es el causante de la formación de tumores en la planta receptora, los cuales continúan manifestándose en las nuevas células, aún cuando la bacteria ya no esté presente. También se encontró que es posible sustituir el fragmento del ADN-T en el

plásmido por genes de interés, sin que éste pierda su capacidad de transferencia a otras células vegetales (Villalobos, 2008).

Un paso muy importante en el desarrollo de la ingeniería genética fue el descubrimiento de las enzimas de restricción, las cuales son capaces de reconocer y cortar secuencias de 4, 6 o más bases en diferentes moléculas de ADN. Una vez aisladas las secuencias pueden insertarse a otras moléculas de ADN, mediante la enzima ADN ligasa y generar una molécula de ADN nueva denominada “recombinante”. Se conoce una gran cantidad de enzimas de restricción presentes también en las bacterias, las cuales son una herramienta fundamental para el desarrollo de la ingeniería genética. El siguiente paso ha sido crear cepas recombinantes (plásmido- ADN-T), siendo la más utilizada hasta la fecha *A. tumefaciens* (Sánchez, 2008).

Schnepf y Whiteley (1981) aislaron el “gen Cry” del genoma de *Bacillus thuringiensis*, dicha secuencia génica codifica una proteína con propiedades insecticidas. Chilton en 1983 obtuvo las primeras plantas transgénicas de tabaco utilizando plásmidos de *Agrobacterium tumefaciens* y el gen Cry. Tales investigaciones culminaron en 1996 con la comercialización de plantas transgénicas de algodón, papa y maíz resistentes a ciertas especies de insectos. A las plantas transformadas se les denominó “Plantas Bt” (*Bacillus thuringiensis*). Esta metodología de transferencia de genes se resume de la siguiente manera: 1. Se identifica un carácter deseable en un organismo; 2. Se aísla el gen responsable del carácter deseado (gen de interés); 3. Se combinar dicho gen con el vector (plásmido) que sea funcional en el organismo receptor; 4. Se transfiere el gen de interés mediante el vector; y 5. Se hace crecer y reproduce el organismo receptor ahora modificado genéticamente (Sánchez, 2008).

La bacteria *Agrobacterium tumefaciens* prácticamente no infecta a las gramíneas, por lo que se dificulta usarla como vector de genes en este grupo plantas; para ellas se desarrolló la

técnica conocida como electroporación, que consiste en eliminar la pared celular digiriéndola con un enzima; posteriormente se somete a pulsación eléctrica los protoplastos resultantes, para crearles diminutos poros en la membrana celular y núcleo, para que penetren los genes de interés (el ADN recombinante). La principal dificultad de este método estriba en desarrollar las plántulas a partir de los protoplastos. En 1988 se obtuvieron los primeros cereales (maíz y arroz) transgénicos con esta metodología (Herrera-Estrella, 2003).

Sanford y Wolf en 1984 bombardearon células vegetales usando como proyectiles a micro partículas metálicas enganchadas con ADN del virus del mosaico del tabaco; las partículas se impulsaron con chorros de aire comprimido usando cámaras de vacío (acelerador de partículas), primero se usaron partículas ó tungsteno y posteriormente de oro. Dentro del tejido vegetal, el ADN se desprendió de las partículas y replicó al virus dentro de las células, demostrando que era posible la transferencia de genes mediante la técnica que se le llamo Biobalística. Esta técnica al no afectar la estructura de las células, facilita la regeneración de las plantas a partir del cultivo de tejidos; con ella se han transferido genes a los cultivos de arroz, maíz y soya (Sánchez, 2008).

La técnica conocida como microinyección, consiste en inyectar soluciones que contienen ADN-T a los núcleos de las células vegetales. En general aunque se han obtenido plantas transgénicas de arroz y nabo por esta vía, es una técnica poco eficiente (Sánchez, 2008).

También se ha intentado la transferencia directa de ADN a través del tubo polínico, al depositar los genes sobre el polen de las plantas, que luego es puesto directamente sobre los estigmas. Aunque se ha logrado la transferencia de genes, con esta técnica, no se ha conseguido la expresión de estos en la descendencia (Sánchez, 2008).

El cultivo de tejidos ha sido fundamental para el desarrollo de los organismos genéticamente modificados. Con frecuencia las técnicas de transferencia génica emplean

embriones inmaduros como blanco potencial para la introducción del ADN recombinante. Posterior al procesos de transferencia, las células o tejidos deben colocarse en medios de cultivo o condiciones que las discriminen; las que sobrevivan o manifiesten ciertas características serán manejadas apropiadamente en laboratorio, invernadero y campo hasta la obtención de las plantas que se desea (Hoisington, 1995).

A la fecha se han documentado transferencias génicas exitosas en al menos 40 especies de interés agronómico; sin embargo, son cuatro las más cultivadas en el mundo: soya (*Glycine max* L.), maíz (*Zea mays* L.), colza (*Brassica campestris* L.) y algodónero (*Gossypium hirsutum*). En 1995, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos aprobó la primera siembra comercial de papa productora de la toxina Bt; posteriormente en 1996, salieron al mercado semillas transgénicas de maíz Bt y algodónero Bt. Desde entonces se ha incrementado el financiamiento a la investigación para la obtención de plantas transgénicas, principalmente por las empresas transnacionales Monsanto, Novartis, Zeneca, Bayer y Dupont (Villalobos, 2008).

En la actualidad la empresas Arcadia Biosciences señala que puede transferir genes a casi cualquier planta de interés, para volverla más eficiente en el uso del nitrógeno y del agua, tolerante a la salinidad, aumentarle la vida de anaquel o hacerla más productiva de aceites y proteínas (Arcadia Biosciences, 2011).

1.1.3.3. Cultivos resistentes a glifosato

El herbicida glifosato al ser aplicado a las plantas, inhibe la acción de la enzima 3-enolpiruvil-shiquimato-5-fosfato sintasa (EPSPS), que es fundamental para la producción de los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano, que a su vez son esenciales para la síntesis de diversas proteínas necesarias en el crecimiento y funciones vitales. Esta enzima sólo

está presente en plantas y microorganismos como bacterias y hongos, y está ausente en animales. Los cultivos transgénicos resistentes a glifosato contienen el gen “epsps” de la cepa cp4 de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, cuya enzima EPSPS no es afectada por el glifosato. La proteína CP4 EPSPS presentes en las plantas genéticamente modificadas (GM), es funcionalmente equivalente a la enzima EPSPS de las plantas convencionales, a excepción de su poca afinidad con la molécula de glifosato (Nandula, 2010).

El nombre comercial más conocido del glifosato es “Roundup”; por ello, a las plantas transgénicas resistentes a glifosato se les denomina “Roundup Ready”, o “RR”. Entre las plantas cultivadas RR que se comercializan se encuentran: *Beta vulgaris* L. (remolacha azucarera), *Brassica napus* L. y *Brassica rapa* L. (colza o canola y nabo), *Glycine max* L. (soja), *Gossypium hirsutum* L. (algodonero), *Medicago sativa* L. (alfalfa) y *Zea mays* L. (maíz) (Nandula, 2010).

1.1.3.4. Riesgos con el uso de transgénicos

Los marcos regulatorios de los diferentes países donde se ha permitido la producción y consumo de plantas GM, establecen en todos ellos que el empleo de esta tecnología debe suspenderse inmediatamente, cuando a juicio de las autoridades competentes exista riesgo de daño (López, 2008).

Las principales preocupaciones de la producción y consumo de plantas GM, se relacionan con la posibilidad de aumento de alergénicos, toxinas u otros compuestos nocivos en los productos que se ingieren; así como en la transferencia horizontal de genes relacionados con la resistencia a antibióticos (FAO, 2000). Desde 1996 se han estado consumiendo alimentos provenientes de plantas GM y aún no se ha documentado ningún caso de daño a la salud humana o animal (Villalobos, 2008).

1.1.4. Los transgénicos en México

En 1988 se presentó ante la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) y fue aprobada la primera solicitud para importar y liberar en campo, específicamente en el área de Culiacán, Sinaloa, tomate GM tolerante a insectos. Desde entonces la SAGARPA ha consolidado un grupo de expertos quienes han elaborado normas y contribuido a la toma de decisiones relacionadas con el tratamiento de las solicitudes de liberación en campo de las plantas transgénicas (SENASICA, 2010).

La producción y consumo de plantas GM reviste mayor importancia para los países considerados como centros de origen de los cultivos modificados. Es el caso del arroz y la soya en China, la papa en Perú y el maíz en México; en ellos se debate el riesgo de la pérdida de germoplasma de los cultivos involucrados, particularmente de las variedades criollas. El flujo génico entre las variedades híbridas y las razas nativas de maíz, es muy común y difícil de evitarlo; no obstante, a la fecha no se tiene claridad sobre la magnitud y consecuencias de dicha erosión genética (Villalobos, 2008).

La discusión sobre la liberación de maíz GM en México ha sido muy intensa, pues se tiene la percepción de la existencia de alto riesgo, aunque prevalece la falta de información sobre las posibles repercusiones. A finales del año 2001 la revista Nature, publicó un artículo que demostraba la presencia de maíz transgénico en parcelas de productores de subsistencia de la sierra de Oaxaca, México (Quist y Chapela, 2001); por lo cual la SAGARPA condujo estudios en diversas zonas maiceras del país, detectando la presencia de transgenes sólo en maíces criollos cultivados en el estado de Oaxaca (Villalobos, 2008). Estudios posteriores realizados en ese mismo estado no encontraron de nuevo su presencia (Ortiz *et al.*, 2005), quizás porque se encontraban en una frecuencia baja, no detectable por la metodología utilizada.

En el año 2004, México manifestó en la primera conferencia de las partes del protocolo de Bioseguridad de Cartagena, celebrada en Kuala Lumpur, Malasia, que prohibiría la experimentación y liberación de maíz transgénico; sin embargo al pasar el tiempo la postura de nuestro país poco a poco se ha flexibilizado (Villalobos, 2008).

En el año 2009 en que se creó la Dirección de Bioseguridad para Organismos Genéticamente Modificados, se aprobaron 32 solicitudes de liberación experimental de maíz genéticamente modificado (MGM), en 14.43 hectáreas de los estados de Sonora, Sinaloa, Chihuahua, Tamaulipas y Durango. Para el año de 2010, se aprobó la siembra de MGM en 9.51 hectáreas de parcelas experimentales, agregándose el estado de Coahuila a la lista del año anterior. Para octubre del año 2011, La Dirección de Bioseguridad había aprobado 61 solicitudes de siembra de MGM en parcelas experimentales y piloto (SENASICA, 2011)

Para evitar flujo génico hacia los maíces criollos con genes provenientes de MGM, se han creado protocolos de bioseguridad, en los que se enlistan las acciones que deben llevarse a cabo al realizar siembras en parcelas experimentales o piloto con MGM. Una de las actividades primordiales consiste en el monitoreo para la detección de transgenes en maíces criollos (SENASICA, 2011). A continuación se describe brevemente algunos de los procedimientos que se emplean en la detección oportuna de tales materiales.

1.1.5. PRUEBAS PARA DETECTAR TOLERANCIA A GLIFOSATO

El proceso para determinar si una población de maleza es resistente o no a glifosato, es muy sencillo y a la vez de suma importancia para el manejo de las poblaciones con este herbicida (Shaner, 2010). En general el nivel de resistencia a glifosato en la mayoría de los casos es

relativamente bajo y la diferencia entre las poblaciones resistentes y las susceptibles es de 3 a 15 veces (Heap, 2008). Los métodos de prueba más usados son los siguientes:

1.1.5.1. Bioensayos con macetas en invernadero

Cuando se sospecha que una población es resistente a glifosato, se somete en invernadero a aplicaciones parecidas a las que estaría sujeta en campo. Para ello, debe elaborarse y efectuarse un protocolo de aplicación que determine el efecto dosis/respuesta de la población susceptible en diferentes estados de desarrollo. La sintomatología de daño por glifosato es relativamente lenta y generalmente la muerte de las plantas ocurre entre 14 y 28 días después de la aplicación. A la población a evaluar se le aplica una sola dosis discriminante, con la cual se pueda separar visualmente los biotipos resistentes de los biotipos susceptibles; esta dosis debe ser suficientemente alta para matar a la población susceptible, y a la vez suficientemente baja que permita a los biotipos resistentes sobrevivir (Shaner, 2010).

Comúnmente se colectan semillas de las poblaciones que se sospecha que son resistentes al herbicida, se hacen germinar y cuando se encuentran en crecimiento activo y con un estado de desarrollo de 5 a 8 hojas se hace la aplicación de glifosato. Para ahorrar tiempo pueden trasplantarse las plantas directamente de campo a macetas, y efectuar la aplicación. Si se efectúa la aplicación bajo condiciones no adecuadas el diagnóstico puede ser incorrecto (Shaner, 2010). La prueba es lenta, requiere de infraestructura, puede resultar costosa y difícilmente puede evaluar poblaciones grandes (Boutsalis, 2001).

1.1.5.2. Bioensayos de laboratorio en cajas Petri

Este tipo de ensayos se utilizan para procesar grandes cantidades de semillas que se sospecha son resistentes a glifosato. En la mayoría de los casos las semillas a prueba se germinan en papel filtro que humedecido con diferentes concentraciones de glifosato. Para evaluar la susceptibilidad o resistencia de las plántulas, después de la germinación se mide la longitud del coleoptilo y de las raíces. Los ensayos en cajas Petri son de 2 a 10 veces más rápidos que los efectuados en invernadero y además más baratos. Con este tipo de ensayos con frecuencia se tiene problema para hacer germinar las semillas por el letargo inherente que presentan las diferentes especies (Escorial, 2001).

1.1.5.3. Biosayos con partes de hojas

Este bioensayo es de los más usados para comparar la tolerancia de diferentes especies a glifosato. Consiste en sumergir en soluciones del herbicida, hojas o pedazos de éstas de las plantas a evaluar y, esperar la respuesta en aproximadamente tres días (Yuan, 2002). Generalmente las concentraciones de prueba del herbicida varían de 300 a 1200 mg L⁻¹ de i.a. (Koger, 2005). Se considera que es una prueba rápida, no destructiva, relativamente barata, que debe adecuarse para poder implementar en cada tipo de situación (Shaner, 2010).

1.1.5.4. Bioensayos basados en el metabolismo

El nivel de tolerancia a glifosato de las plantas puede evaluarse midiendo la disminución de la transpiración, la inhibición de la fotosíntesis y, la reducción en la biosíntesis de clorofila pocas horas después de la aplicación de los tratamientos; esto último puede estimarse cualitativamente mediante el blanqueamiento y clorosis de los tejidos que se ponen en contacto

con el glifosato (Franz *et al.* 1997). Donahue *et al.* (1994) monitorearon la tolerancia a glifosato de varias especies del género *Populus* sumergiendo discos de hojas en diferentes concentraciones de glifosato y observaron que los más tolerantes manifestaron menor clorosis.

1.1.5.5. Acumulación de Shikimato

El glifosato mata a las plantas al inhibir la acción de la enzima 5-enolpiruvyl-shiquimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS) y favorecer la acumulación de shikimato -3- fosfato (S3P). El nivel endógeno en la mayoría de las plantas es muy bajo, varía de 0.04 a 0.06 mg g⁻¹ (Yhosida *et al.* 1975). En las plantas susceptibles, el shikimato se acumula en los sitios de crecimiento activo, como son las zonas meristemáticas, hojas jóvenes en expansión, tejido reproductivo y raíces. Esta prueba se usa para determinar la tolerancia de diferentes especies al glifosato; o bien para estimar los daños provocados por el herbicida a cultivos no tratados, cuando se sospecha la ocurrencia de deriva durante las aplicaciones aéreas convencionales (Marchiosi *et al.*, 2008; Harring *et al.* 1998; Cromartie y Polge, 2000).

La tolerancia que presentan algunas especies hacia el glifosato, se da por la ocurrencia de menor penetración, menor translocación o mayor degradación dentro de las planta; en cambio, los cultivos genéticamente modificados contienen la enzima EPSPS CP4 que es poco afectada por el glifosato cuando éste se aplica a dosis normales de campo, por lo que existe escasa acumulación de shikimato. Esta característica es utilizada para poder diferenciar los cultivos modificados de los cultivos convencionales (Pline *et al.* 2002; Mueller, 2003).

Una adecuación de esta técnica la implementó Shaner *et al.* (2005) para determinar la resistencia de especies de maleza hacia el glifosato; consiste en cortar discos de hojas jóvenes, sumergirlos en soluciones de glifosato, incubarlos durante 18 h bajo luz continua de lámpara

incandescente, extraerles la clorofila y medir el contenido de shikimato mediante un espectrofotómetro. Estos autores encontraron que la acumulación de shikimato en los discos de hojas, es afectada por la exposición a la luz, la exposición a una fuente externa de carbón como la sucrosa, la concentración del glifosato, la edad del tejido y la especie a evaluar.

1.1.5.6. Determinación de EPSPS

La enzima EPSPS que se encuentra localizada principalmente en los cloroplastos, se extrae por diferentes métodos y se mide con un cromatógrafo. Esta prueba es muy precisa, pero requiere de equipo sofisticado y personal altamente calificado, es costosa y no es posible trabajar con un número grande de muestras a la vez (Weaver y Herrmann, 1997).

1.1.5.7. Secuenciación de ADN

Se dispone de diversos métodos para extraer y analizar secuencialmente el ADN y ARN de las plantas. Los más usados para determinar la resistencia de las plantas hacia el glifosato, son las pruebas cuantitativas en tiempo real de la Reacción de la Cadena de Polimerasa (PCR) y el análisis del Polimorfismo de Nucleótidos (SNP). Se conoce las secuencias de EPSPS de más de 70 especies (Sammons *et al.* 2007); pero al igual que la prueba anterior, requiere infraestructura sofisticada y no sería práctica para programas de monitoreo.

1.1.5.8. Prueba rápida basada en el efecto del glifosato en la fotosíntesis

El glifosato inhibe la acción de la enzima 5-enolpiruvyl-shiquimato-3-fosfato sintetasa (ESPS) en la ruta del ácido shikimico, al suplantarlo al fosfoenolpiruvato, uno de los sustratos para la EPSPS (Koger and Reddy, 2005). La insuficiencia de EPSPS conlleva a la acumulación de

shiquimato-3-fosfato y escasa producción de aminoácidos aromáticos (triptófano, fenilalanina y tirosina) necesarios para la síntesis de proteínas que intervienen en la formación de carotenoides, produciendo como síntomas iniciales de daño, clorosis y blanqueado (Duke y Powless, 2008) y la posterior muerte de la planta entre los 10 y 15 días posterior a su aplicación. Esta clase de prueba, busca acelerar el efecto del glifosato al menor tiempo posible (de 1 o 2 días) para poder diagnosticar si la planta en prueba posee la facultad o no de resistir las aplicaciones de glifosato. Las características de esta prueba son: La prueba se realiza en poco tiempo, requiere de poco material y de bajo costo, no se destruyen las plantas en prueba, cualquier persona con poco entrenamiento es capaz de llevarlas a cabo, por su naturaleza facilita realizar una gran cantidad diagnósticos en poco tiempo.

Existen diversas herramientas para determinar la resistencia de las plantas al glifosato y que cada una tiene ventajas y limitantes para cada objetivo. En nuestro caso que pretendemos evaluar la resistencia a glifosato de un alto número de muestras provenientes de un programa de monitoreo, consideramos que lo más práctico es estimar cualitativamente la pérdida de clorofila y corroborar la validez de la prueba determinado la acumulación de shikimato en primera instancia, seguida por estudios de secuenciación de DNA o RNA.

1.2. LITERATURA CITADA

- Acquavella J., F. B.H. Alexander, J.S. Mandel, C. Gustin, B.Baker. P.Chapman and M. Bleeke. 2004. Glyphosate biomonitoring for farmer-applicators and their families: results from the Farm Family Exposure Study. *Environmental Health Perspectives* 112:321-326.
- Anónimo, 2011. Diccionario de especialidades Agroquímicas. Fertilizantes y agroquímicos Vol I.México.
- Anónimo. 2008. National Agricultural Statistics Service. Glyphosate usage. http://www.pestmanagement.info/nass/app_usage.cfm.
- Arcadia Biosciences, 2005. <http://www.arcadiabio.com/products>. consultada el día 24-10-2011.
- Arvizu F., J.L. y G. Salazar. 2010. Biocombustibles derivados del maíz. En: De León y Rodríguez (compiladores) *El cultivo del maíz – Temas Selectos II*. Mundi Prensa. pp 49-59.
- Baird, D.D., R.P. Upchurch, W.B. Homesley, and J.E. Franz. 1971. Introduction of a new broad spectrum post emergence herbicide class with utility for herbaceous perennial weed control. *Proceedings of the North Central Weed Science Society* 26:64-68.
- Boutsalis, P2001. Syngenta quick test: A rapid whole-plant test for herbicide resistance. *Weed Technology* 15:257-263.
- Bridges, D.C. 1994. Impact of weed on human endeavors. *Weed Technol.* 8:392-395
- CaJacob, C.A., P.C. C. Feng, G.R. Heck, F.A. Murtaza, R.D. Sammons, and S.R. Padgett. 2003. Engineering resistance to herbicides. In P. Christou and H. Klee, eds. *Handbook of Biotechnology*, vol 1. Chichester: John Wiley & Sons, pp. 353-372.
- Castañeda R., P. 1990. *El maíz y su cultivo*. AGT Editor, S.A. México. 458p.
- CEESP. 2010. El consumo de maíz y su efecto en precios ante el reto de elevar la producción. <http://www.ccpm.org.mx/avisos/cceespjulioaizyefecto.pdf>
- Cerdeira, A.L. and S.O. Duke. 2006. The current status and environmental impacts of glyphosate-resistant crops: a review. *Journal of Environmental Quality* 35(5): 1633-1658.
- Cromartie, T.H., and N.D. Polge.2000. An improvised assay for shikimic acid and its use as a monitor for the activity of sulfosate. *Abstracts of the Weed Science Society of America* 40:291.
- Crop Data Management System. (CDMS). 2007. Agrochemical Database. <http://www.cdms.net/LDat/ld5UJ047.pdf> (12 Nov. 2011)
- Crovetto, C. 1996. La cero labranza conservación, los rastrojos y la fertilidad de los suelos. En: *Memorias del 4º Foro internacional Labranza de Conservación*. Guadalajara Jalisco. Pp 1-10.
- Duke S. O. and Powless S. B. 2008. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science.* 64: 319-325.
- Escorial, M. C., H. Sixto, J. M. Garcia-Baudin, and M.C. Chueca. 2001. A rapid method to determine cereal plant response to glyphosate. *Weed technology* 15:697-702.
- FAO (Food and Agricultural Organization). 2000. *El estado mundial de la agricultura y la alimentación. Comercio Agrícola y pobreza*. FAO, Roma, Italia. 214p.
- Franz, J.E., M.K. Mao, and Sikorski. 1997. *Glyphosate: A Unique Global Herbicide*. ACS Monograph No. 189. Washington, DC: American Chemical Society, p.653.
- García B.E. 1999. El 85% del cultivo del maíz es de temporal *Agrosíntesis* no.31:20-22

- García-Olmedo, F. 2004. Organismos modificados Genéticamente: La Tercera Revolución Verde. En: Agricultura, Medio Ambiente y Sociedad. Ed. Jesús Marrón Gaité y Gerardo García Fernández. Ministerio de Agricultura, pesca y Alimentación. España. Pp: 59-73.
- Garrison W. 1995. El teocintle en México: Panorama retrospectivo y análisis personal. En: Serratos J.A. Willcox M.C. 1995. Memorias del foro; Flujo genético entre maíz criollo, maíz mejorado y teocintle: implicaciones para el maíz transgénico. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. Pp11-19.
- Gaytan R., J.G. 2010. Mecanización del cultivo del maíz. En: El cultivo de maíz. Temas selectos II. Mundiprensa. 191-222.
- Giesy J.P., S. Dobson, and K.R. Solomon. 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 167: 35-120.
- GMO Compass. 2011. Genetically modified plants: Global cultivation area Maize. http://www.gmo-compass.org/eng/agri_biotechnology/gmo_planting/341.genetically_modified_maize_global_area_under_cultivation.html (23 Nov 2011)
- Greenpeace International. 2011. "Herbicide tolerance and GM crops. Why the world should be Ready to Round Up glyphosate". <http://www.greenpeace.org/argentina/es/informes/Herbicide-tolerance-and-GM-crops>.
- Halter, S. 2007. A brief history of Roundup. Proceedings of the First international Symposium on Glyphosate. A Agronomical Science College of the University of the State of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil, October 15-19.
- Harring T., J.C. Streibig, and S.Husted. 1998. Accumulation of shikimic acid: a technique for screening glyphosate efficacy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46:4406-4412.
- Heap, I. 2008. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. <http://weedsociety.com> (accessed December 15, 2008).
- Herrera-Estrella, L., y M. Martínez. 2003. Aplicaciones y controversias de las plantas transgénicas. En: Fronteras de la biotecnología en los inicios del siglo XXI. El colegio nacional, México. Pp.73-99.
- Hoisington D. 1995. "Conocimientos actuales en relación con la transformación del maíz. En: Memoria del foro: Flujo genético entre maíz criollo, maíz mejorado y teocintle: implicaciones para el maíz transgénico". Centro internacional de mejoramiento de maíz y de trigo. (CIMMYT). Pp 2.
- Kermicle J. 1995. Compatibilidad de cruzamiento dentro del género *Zea*.
- Kishore, G.M. and D. M. Shah. 1988. Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. *Annual Review of Biochemistry*. 57:627-663.
- Koger, C.H., D.L. Shaner, W.B. Henry, T.Nadler-Hassar, W.E. Thomas, and J.W. Wilcut. 2005. Assessment of two Non destructive assays for detecting glyphosate resistance in horseweed. (*Coniza canadensis*). *Weed Science* 53:559-566.
- López H. A. 2008. Contexto y perspectivas del proyecto bioseguridad en México. En: CIBIOGEM. Bioseguridad en la aplicación y el uso de los organismos genéticamente modificados. Pp 17-22.
- Lybecker, D.; Schweizer, E. and King, R. 1991. Weed management decisions in corn based on bioeconomic modeling. *Weed Sci.* 39: 124-129.

- Mera O. L.M., and Caballero N. J. 2010. La importancia del maíz en Mesoamérica a partir de las representaciones prehispánicas. En: De León C. and Rodríguez M. R. 2010. El Cultivo del Maíz. Temas selectos. Mundi prensa. México. Pp3-13.
- Miranda C.S. 1998. El mejoramiento genético del maíz en la época prehispánica. En: Cuevas S.J.A, E. Cedillo P, A. Muñoz O., P. Vera C. (Eds). Lecturas de Etnobotánica. PNE. Universidad Autónoma Chapingo. México. Pp 267-282.
- Mithila, J., C.J. Swanton, R.E. Blackshaw, R.J. Cathcart, and J.C. Hall. 2008. Physiological basis for reduced glyphosate efficacy on weeds grown under low soil nitrogen. *Weed Science* 56:12-17.
- Mueller, T.C., J.H. Massey, R.M. Hayes, C.L. Main, and C.N. Stewart, Jr., 2003. Shikimate accumulates in both glyphosate sensitive and glyphosate resistant horseweed (*Coniza Canadensis* L. Cronq.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:680-684.
- Nandula, V. K. 2010. Glyphosate resistance in crops and weeds. History, development and Management. John Wiley & Sons, Inc., Publication. Mississippi State University. U.S.A. pp: 25-30.
- Ortiz-García, S., E. Ezcurra, B. Schoel, F. Acevedo, J. Soberon, and A. Snow. 2005. Absence of detectable transgenes in local landraces of maize in Oaxaca, Mexico. www.pnas.com/cgi/doi/10.1073/pnas. (12 dic. 2011).
- Pline, W., K. Hatzios and S. Hagood. 2000. Weed and Herbicide-Resistant Soybean (*Glycine max*) Response to Glufosinate and Glyphosate Plus Ammonium Sulfate and Pelargonic Acid. *Weed Technology* 14(4):667-674.
- Powers, L.E. & McSorley, R. 2001. Principios ecológicos en la agricultura. Ed. Paraninfo. Madrid, España. 429p.
- PRWeb. 2011. Global Glyphosate Market to Reach 1.35 Million Metric Tons by 2017, According to a New Report by Global Industry Analysts, Inc. <http://news.yahoo.com/global-glyphosate-market-reach-1-35-million-metric-130342666.html>.
- Quist, D. and D.H. Chapela. 2001. Transgenic DNA introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca, Mexico. *Nature* 414: 541-543.
- Ramsdale, B.K., C.G. Messersmith, and J.D. Nalewaja. 2003. Spray volume, formulation, ammonium sulfate and nozzle effects on glyphosate efficacy. *Weed Technology* 17:589-598.
- Research and Markets. 2008. Glyphosate competitiveness Analysis in China. CCM International Limited. http://www.researchandmarkets.com/reportinfo.asp?cat_id=0&report_id=649031&q=glyphosate&p=1 (accesed April 5, 2010).
- Reyes C.P. 1990. El maíz y su cultivo. Ed. AGT Editor, S.A. México.
- Rivas, M., Palerm J., Muñoz A., Cuevas j., y Martínez T. 2005. Aprovechamiento de agua de lluvia en Jollas para producción de maíces de cajete en la Mixteca Alta. http://jacintapalerm.hostei.com/jollas_2005.pdf
- Sammons, R.D., D.C. Herring, N. Dinicola, h. Glick, and G.A. Elmore. 2007. Sustainability and stewardship of glyphosate and glyphosate-resistant crops. *Weed Technology* 21:347-354.
- Sánchez T., M. 2008. Plantas transgénicas: Biotecnología y alimentación. <http://www.uned.es/experto-biotecnologia-alimentos/TrabajosSelecc/TrinidadSanchez.pdf>.

- SENASICA. Dirección de bioseguridad para los organismos genéticamente modificados. Historia para la bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados. (<http://www.senasica.gob.mx/?id=2403>) 2010.
- SENASICA. Dirección de bioseguridad para los organismos genéticamente modificados. Estatus de solicitudes de permiso de liberación al ambiente de maíz genéticamente modificado ingresadas en 2011. (<http://www.senasica.gob.mx/?id=2220>) 2011.
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y alimentación. SENASICA-SAGARPA, 2011. Estatus de solicitudes de permisos de liberación al ambiente de maíz genéticamente modificado ingresadas en 2011: <http://www.senasica.gob.mx/?id=2220> (14 Dic 2011).
- Shaner D, L. T. Nadler-Hassar, W. B. Henry, and C. H. Koger. 2005. A rapid in vivo shikimate accumulation assay with excised leaf discs. *Weed Science*, 53:764-774.
- Shaner, D.L. 2010. Testing methods for Glyphosate resistance. In: Nandula, V.K. 2010. Glyphosate resistance in crops and weeds. History, Development and Management. Mississippi State University. Pp 93-117.
- Shaner, D.L., T. Nadler-Hassar, W.B. Henry, and C.H. Koger. 2005. A rapid in vivo shikimate accumulation assay with excised leaf discs. *Weed Science* 53: 769-774.
- SIAP, SAGARPA. 2007. Situación actual y perspectivas del maíz en México. 1996-2012. http://www.campomexicano.gob.mx/portal_siap/Integracion/Estadistic
- SIAP, SAGARPA. 2011. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. http://www.siap.gob.mx/aagricola_siap/icultivo/index.jsp.
- Spencer, M., R. Mumm, J. Gwyn, inventors; DEKALB Genetic Corporation, assignee. Glyphosate resistant maize lines. U.S. Patent 6040497, filed March. 2000.
- Villalobos A., V.M. 2008. Los transgénicos. Oportunidades y amenazas. Ediciones Mundi prensa. México. 103 p.
- Weaver L.M., and K.M. Herrmann. 1997. Dynamics of the pathway in plants. *Trends in Plant Sciences* 2:346-351.
- Wellhausen E.J. 1981. Razas y variedades mexicanas de maíz y su importancia en el mejoramiento genético. En memorias del simposio Nacional. El maíz en México, su presente, pasado y futuro. Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos. México. Pp. 75-86.
- Williams G.M., R. Kroes, and I.C. Munro. 2000. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roudup® and its active ingredient, Glyphosate, for humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 31:117-165.
- Yoshida, S., K. Tazaki, and T. Minamikawa. 1975. Occurrence of shikimic and quinic acids in angiosperms. *Phytochemistry* 14:195-197.
- Yuan, C.I., M.Y. Chaing, and Y.M. Chen. 2002. Triple mechanisms of glyphosate resistance in a naturally occurring glyphosate resistant plant *Dicellaetha chinensis*. *Plant Science* 163:543-554.

2. PRUEBA RÁPIDA PARA LA DETECCIÓN DE PLANTAS DE MAÍZ RESISTENTES AL HERBICIDA GLIFOSATO

Jaime Alfredo Urzúa Gutiérrez^{1*}, J. Concepción Rodríguez Maciel¹, Albert J. Fischer², Fernando Urzúa Soria³, Ángel Lagunes Tejeda¹, Gonzalo Silva Aguayo⁴, Marta Adriana Otero Arnaiz⁵

RESUMEN

El cultivo del maíz (*Zea mays* L) genéticamente modificado resistente a glifosato, requiere de metodologías sencillas, rápidas y confiables que permitan detectar la presencia de plantas que expresan este gene tanto en cultivos convencionales como ilícitos. Para tal fin, se desarrolló una prueba sencilla que detecta la presencia de transgenes con resistencia a glifosato, la cual se validó con la prueba bioquímica de acumulación de shikimato. La metodología consiste en cortar discos de 0.5 cm de diámetro de la tercera hoja verdadera de plantas de maíz de dos semanas de edad y exponerlos a la concentración de 4.32 g i. a. L⁻¹ de glifosato más 2% (p/v) de sulfato de amonio, durante 12 h a 40 °C y luego a una intensidad lumínica de 200 µm m⁻² s⁻¹ por 36 h. Los discos de plantas susceptibles se blanquean totalmente, mientras que los provenientes de plantas resistentes a glifosato mantienen su color verde. Los resultados de esta prueba concordaron con los obtenidos mediante la prueba de shikimato, por lo que se concluye que el método identifica de manera rápida y veraz la presencia del transgene resistente a glifosato.

¹Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Carretera México-Texcoco km 36.5, Montecillo Texcoco, Estado de México. C.P. 56230. ²Universidad de California, Campus Davis. OneShields Ave., Davis, CA 95616, USA. ³Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México-Texcoco km. 38.5 Chapingo, México. C.P. 56230. ⁴Facultad de Agronomía, Universidad de Concepción. Avenida Vicente Méndez 595, Chillán, Chile. ⁵ Especialista en Agricultura, *USDA Foreign Agricultural Service*, Embajada de los Estados Unidos en México, México, D. (concho@colpos.mx).

Palabras clave: Maíz transgénico, maíz biotecnológico, shikimato, bioseguridad.

INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L) biotecnológico resistente al herbicida glifosato se empezó a cultivar comercialmente en 1998 en los Estados Unidos de Norteamérica (Spencer *et al.*, 2000). Actualmente, los países con mayores superficies cultivadas de este grano son EE.UU, Brasil, Argentina, Sudáfrica y Canadá, con 29.9, 5.0, 2.1, 1.9 y 1.17 millones de ha, respectivamente (GMO Compass, 2011). Esta tecnología permite usar al glifosato para controlar un espectro amplio de especies de malezas y con menor riesgo ambiental que el resto de las opciones químicas disponibles para el combate de malezas en maíz (Nandula, 2010).

Los cultivos biotecnológicos, en México, para ser liberados deben pasar por tres etapas que en función de sus riesgos y medidas de bioseguridad asociadas se dividen en: experimental, piloto y comercial. Durante el año 2009 la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) aprobó 32 solicitudes de liberación experimental para un total de 14.43 ha de maíz genéticamente modificado para los estados de Sonora, Sinaloa, Chihuahua, Tamaulipas y Durango. En 2010, se autorizó la siembra de 59.51 ha, también en fase experimental, agregándose al grupo anterior el estado de Coahuila. Para septiembre de 2011 se tenían 51 solicitudes de liberación experimental y 10 en etapa piloto aprobadas (SENASICA, 2011).

El uso de maíz biotecnológico, al igual que otras tecnologías, va acompañado de riesgos que deben dimensionarse y manejarse apropiadamente. Dentro de este contexto, las siembras ilícitas y la presencia de plantas que expresan este transgene en cultivos convencionales representan una de las preocupaciones más importantes del Gobierno Federal y la sociedad mexicana. Quist y Chapela (2001) demostraron la presencia de transgenes en maíces nativos de la sierra de Oaxaca. Aunque, estudios posteriores no los volvieron a detectar (Ortiz *et al.*, 2005),

seguramente debido a que se encontraban en una frecuencia baja, no detectable por falta de sensibilidad de la metodología utilizada.

La obligación de cuidar la biodiversidad está plasmada en compromisos internacionales y nacionales. En enero de 2000, México publicó la ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados. Posteriormente, en mayo de ese mismo año, suscribió el protocolo de Cartagena y lo ratificó dos años después, entrando éste en vigor el 11 de septiembre de 2003. Su objetivo es contribuir a garantizar un nivel adecuado de protección de la biodiversidad cuando se utilizan cultivos genéticamente modificados (López, 2008).

El glifosato [N-(fosfometil) glicina] se introdujo al mercado en 1974 y actualmente es el herbicida más usado en el mundo por ser efectivo para controlar en post emergencia a un amplio espectro de especies de maleza anuales y perennes, no tener actividad herbicida residual en el suelo, y ser toxicológica y ecológicamente de bajo perfil (Duke y Powless, 2008). Este compuesto inhibe la acción de la enzima 5-enolpiruvyl-shikimato-3-fosfato sintetasa (ESPS) en la ruta del ácido shikímico, al suplantar al fosfoenolpiruvato, uno de los sustratos para la ESPS (Koger y Reddy, 2005). La insuficiencia de ESPS conlleva a la acumulación de shikimato-3-fosfato y a la escasa producción de aminoácidos aromáticos (triptófano, fenilalanina y tirosina) necesarios para la síntesis de proteínas que intervienen en la formación de carotenoides, produciendo como síntomas iniciales de daño, clorosis y blanqueado (Duke y Powless, 2008).

Actualmente, la metodología más confiable para detectar resistencia a glifosato consiste en determinar, mediante pruebas bioquímicas, la acumulación de shikimato (Shaner *et al.*, 2005); sin embargo, es costosa y requiere personal especializado. Por tanto, es útil para confirmar la presencia de plantas resistentes a glifosato, pero ineficiente para detectarla en grandes extensiones cuando las frecuencias alélicas son bajas. Otras metodologías se basan en la

aplicación directa del herbicida a las plantas, o en la inmersión de partes de éstas (Yuan, 2001; Koger *et al.* 2009), pero sus resultados no se consideran satisfactorios por ser lentos, subjetivos y la dificultad para procesar tamaños de muestras grandes (Shaner *et al.*, 2005). El objetivo del presente estudio fue desarrollar una metodología no destructiva, efectiva, de bajo costo, sencilla y rápida para detectar la presencia de plantas de maíz resistentes al herbicida glifosato.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material evaluado. Para las evaluaciones se emplearon tres biotipos de maíz: a) Resistente a glifosato RES-GLI, portadora de transgenes de resistencia (R-) a glifosato (GT), a lepidópteros (CB) y a glufosinato (LL) (Nielsen, 2011); b) Susceptible a glifosato SUS-GLI, y; c) Promesa[®] híbrido susceptible a glifosato generado en el Colegio de Postgraduados, México. Dado los potenciales conflictos con derechos de propiedad, se omitieron los nombres comerciales de dos de las variedades de maíz utilizadas. Debido a las estrictas medidas de bioseguridad que se tienen en México para el manejo de cultivos biotecnológicos, las evaluaciones que involucraron a la variedad RES-GLI se realizaron en la Universidad de California en Davis, California, USA.

Glifosato. Se emplearon diluciones en agua destilada de las formulaciones comerciales de glifosato Roundup Weather Max[®] y Faena Fuerte[®] de Monsanto[®], que constituyen concentrados solubles con 48.8% de sal potásica de N-fosfonometil glicina, equivalente a 540 g L⁻¹ de equivalente ácido (Anonimo, 2011; CDMS, 2007).

Evaluaciones comparativas iniciales entre biotipos resistente y susceptible

Se utilizaron los biotipos RES-GLI resistente a glifosato, y SUS-GLI susceptible a glifosato, de dos semanas de edad y 15 cm de altura. De cada biotipo se cortaron discos foliares, de 0.5 cm de diámetro de la tercera hoja verdadera de los cuales se colocaron, según su biotipo, dos discos foliares por pozo en una placa de prueba de Elisa (Nunc. Multidishes Nunclon[®],

modelo 142485). Y a cada una se le agregó dos mL de la concentración de glifosato. Se evaluaron tres concentraciones de glifosato (Roundup Weather Max[®]) (0.0, 2.16 y 4.32 g L⁻¹ de equivalente ácido) con 30 repeticiones, preparadas con agua destilada más sulfato de amonio al 2% p/v. Cada pozo se trató con dos mL de la concentración respectiva de glifosato. Posteriormente, tanto los discos foliares de RES-GLI, como los discos foliares de SUS-GLI, se dividieron en tres grupos, uno a temperatura ambiente (18-26 °C), otro a 35 °C y el último a 60 °C, donde permanecieron durante 18 h. Se consideró que la exposición a temperaturas de 35 ó 60 °C, aunado a la presencia de sulfato de amonio, incrementaría la tasa de penetración del glifosato, como lo sugieren Pline *et al.* (2000). Posteriormente, los discos foliares se colocaron en una cámara bioclimática, durante 48 h, expuestos a una intensidad de luz de 200 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de densidad de flujo de fotones fotosintéticos (PPFD), 30 °C y 50% de humedad relativa. Una vez terminado este proceso, se evaluó cualitativamente el blanqueado de cada disco foliar. Para tal efecto, se utilizó una adaptación de la escala visual de Koger y Reddy (2005), asignando el valor de 0% a los discos sin daño aparente; 33.3% a los discos con daño ligero; 66.6 a los discos con daño severo; y 100% a los completamente decolorados, y cuantitativamente se determinó su valor de absorbancia mediante un medidor de clorofila (Minolta Spad 502, Spectrum Technologies, Inc. 8002488873). Los resultados de estas pruebas sirvieron de base para las evaluaciones realizadas en México con el biotipo Promesa[®] susceptible al glifosato.

Diseño Experimental y Análisis de Datos. Se utilizó un diseño experimental factorial completamente al azar con cuatro factores y cuatro repeticiones. Mediante el uso del paquete estadístico SAS (SAS Institute, 1997), los resultados se sometieron a un análisis de varianza y separación de medias con la prueba de rango múltiple de Tukey y LSD ($p \leq 0.05$). Los factores

evaluados fueron: edad de la planta, temperaturas de acondicionamiento, tiempo de acondicionamiento y dosis de glifosato con y sin sulfato de amonio.

Cuantificación del contenido foliar de ácido shikimico en biotipos resistente y susceptible

La técnica propuesta por Singh y Shaner (1998) se utilizó para constatar el carácter de resistente o susceptible de los dos biotipos de maíz (RES-GLI y SUS-GLI) empleados en las pruebas antes descritas. Se preparó una solución 5mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, a la cual se le agregó 0.1% v/v de Tween 20[®] como coadyuvante para preparar 0.0, 7.8, 15.6, 31.3, 62.5, 125 y 250 μM de equivalente ácido de glifosato. Luego, en dos placas de Elisa de 96 pozos se colocaron de manera independiente las diluciones de glifosato; una serie de diluciones se utilizó para exponer en unas el material susceptible y otras las series para el resistente. Se utilizaron setenta pozos de cada placa, diez pozos por cada dilución; a cada pozo se le agregó 100 μl de una dilución de glifosato. Posteriormente se tomó la tercera hoja completamente desarrollada de diez plantas de maíz de dos semanas de edad y 15 cm de altura, tanto del biotipo resistente RES-GLI como del biotipo susceptible SUS-GLI. De cada hoja se cortaron dos discos foliares de 0.5 cm de diámetro. En cada pozo se colocó un disco foliar para tener 20 discos del biotipo R- y 20 discos del biotipo ss. Las placas se cubrieron con plástico transparente para evitar la evaporación y se sellaron con Parafilm[®]. Los discos de hoja tratados se incubaron por 14 h bajo luz continua ($100 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a 25 °C. Posteriormente, se colocaron a -20 °C por 30 min para promover la ruptura de las membranas celulares, luego se descongelaron a temperatura ambiente. Finalizado este proceso, a cada pozo se le agregaron 25 μl de 0.25N HCl, y se volvió a incubar, a 60°C por 30 min. Posteriormente se extrajeron alícuotas de 25 μl de cada pozo y se colocaron, respetando la disposición espacial de los tratamientos, en otra placa Elisa que contenía, en cada pozo, 100 μl de

ácido periódico al 0.25% más metaperiodato de sodio al 0.25%, y se colocó la placa en una estufa a 37 °C por 30 min para permitir la oxidación del ácido shikímico. Por último, a cada pozo se le agregaron 100 µl de una solución 0.6N de NaOH y 0.22M de Na₂SO₃, e inmediatamente se midió la densidad óptica de las mezclas formadas con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 380 nm, como sugiere Pérez-Jones *et al.*, (2005). Previamente se obtuvieron los valores de densidad óptica de concentraciones conocidas de ácido shikímico oxidado (0, 2, 4, 8, 16, 32, 64 y 128 µg/ml) en el espectrofotómetro y se elaboró una curva de calibración, la cual sirvió para extrapolar la cantidad de ácido shikímico oxidado presente en las muestras de los biotipos resistente y susceptible. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar. Las curvas de acumulación de ácido shikímico se ajustaron al modelo de Hill para curvas no lineares.

Evaluaciones con el biotipo susceptible Promesa[®]

Se cortaron discos foliares de 0.5 cm de diámetro de plantas de maíz de dos semanas de edad (P-JOVEN), y discos foliares de plantas de maíz de 12 semanas de edad (P-ADULTO). Se utilizaron charolas para bioensayos BIO-BA-128W (Australian Entomological supplies[®] Coorabell, NSW, Australia) de 128 pozos cada una, con capacidad de 4.0 mL por pozo. A 180 pozos se les colocó, individualmente, un disco foliar de P-JOVEN, y a otros 180 se les colocó, también individualmente, un disco foliar de P-ADULTO. Como tratamientos químicos se utilizaron seis diluciones de glifosato conformadas por la combinación de tres dosis del herbicida (0.0, 2.16 y 4.32 gL⁻¹) con adición de 2% (p/v) de sulfato de amonio y tres dosis del herbicida sin sulfato de amonio. En cada pozo se añadieron 3 mL de la dilución respectiva. De cada tratamiento químico se tuvieron 10 discos foliares con tres repeticiones. Una vez aplicados los tratamientos químicos, los pozos se cubrieron con un plástico auto adherible (Kleen Pack,

película auto adherible. Kimberly-Clark de México, S.A.B. de C.V.) para evitar la evaporación de las diluciones.

Se establecieron 15 experimentos los cuales estuvieron en diferentes condiciones ambientales. Un experimento se colocó, durante 144 h, en una cámara bioclimática (25 °C, e irradianza de 200 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de PPF); tres experimentos se colocaron en cada una de cuatro estufas que estaban a diferente temperatura (30, 40, 50 y 60 °C), estos 12 experimentos, que se encontraban en estufas a diferentes temperaturas, tuvieron un manejo adicional. A las 6, 12 y 18 h de exposición al calor, un juego completo de tratamientos se transfirió a cámaras bioclimáticas (25 °C, e irradianza de 200 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de PPF); otro experimento se ubicó dentro de un invernadero (20 – 35 °C, fotoperiodo de 13.5 h, e irradianza de 300 a 400 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); y finalmente, otro se ubicó en el laboratorio a temperatura ambiente (17 – 22 °C, irradianza de 30 a 50 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y fotoperiodo de 13.5 h).

El daño a los discos foliares se evaluó visualmente a las 24, 36, 48 y 144 h después de que se sumergieron en las diferentes concentraciones de glifosato. Para tal efecto, se utilizó la escala visual de Koger y Reddy (2005), asignando valores de 0% a los discos sin daño; 33.3% a los discos con daño ligero; 66.6 a los discos con daño severo; y 100% a los completamente decolorados.

Diseño Experimental y Análisis de Datos. Se utilizó un diseño experimental factorial completamente al azar con 10 repeticiones. Mediante el uso del paquete estadístico SAS (SAS Institute, 1997), a los resultados se les efectuó un análisis de varianza y separación de medias con la prueba de rango múltiple de Tukey, LSD ($p \leq 0.05$). Los factores evaluados fueron: temperatura de acondicionamiento (30, 40, 50 y 60 °C), tiempo de acondicionamiento (0, 6, 12 y

18 h), tratamientos con o sin sulfato de amonio; así como edad de la planta (planta joven ó adulta).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados con plantas resistentes y plantas susceptibles a glifosato

Los discos foliares de las plantas de maíz, tanto resistente RES-GLI, como susceptible SUS-GLI, inmediatamente después de ser cortados de las hojas, registraron un contenido clorofílico SPAD de 28.1 y 30.7, respectivamente. Dichos valores se tomaron como base para determinar la reducción del contenido clorofílico de los diferentes tratamientos. Los discos foliares sin acondicionamiento de calor y sometidos a diferentes concentraciones de glifosato, después de permanecer 48 h en cámaras bioclimáticas manifestaron diferente grado de decoloración en forma de manchas concéntricas. El tratamiento sin glifosato (sólo agua con sulfato de amonio) no registró decoloración en los dos tipos de biotipos. En los tratamientos con las diluciones de 2.16 y 4.32 g L⁻¹ de glifosato, la decoloración (blanqueado del disco foliar) fue severa en los discos susceptibles (83 y 90%) y apenas apreciable (4 a 7%) en los discos resistentes. Los valores SPAD del contenido clorofílico se redujo en todos los tratamientos incluido el testigo sin glifosato, existiendo una relación directa con los valores obtenidos visualmente (Cuadro 1).

Los discos foliares inmersos en las soluciones de glifosato y acondicionados en estufas a 35 °C por 12 h y luego puestos en cámara bioclimática por 24 h, manifestaron mayor homogeneidad de tonalidades que los discos sin acondicionar y no se apreciaron manchas concéntricas. Los discos de hoja resistentes registraron altos valores SPAD (9.26 y 6.50) y el daño visual fue muy leve (7 y 9%), mientras que en los discos susceptibles los valores SPAD fueron muy bajos (0.44 y 0.26) y el daño visual fue severo (83 a 99%). Tanto la valoración visual

como la cuantitativa (SPAD) indicaron que en los discos resistentes la reducción de clorofila fue poco afectada por la acción del glifosato; en tanto que en los discos susceptibles, fue muy severa (Cuadro 1).

Todos los discos foliares acondicionados con calor de 60 °C por 12 h y luego puestos en cámara bioclimática por 24 h, registraron mayor decoloración y disminución del contenido clorofílico que los discos sin acondicionamiento y que los acondicionados a 35 °C. Los daños visuales se calificaron de medios a fuertes (43 y 61 %) en los discos resistentes, y muy severos (100%) en los discos susceptibles, en tanto que los valores SPAD en todos los casos fueron muy bajos (Cuadro 1), lo cual indica que la temperatura de 60 °C por si sola afectó el contenido clorofílico y se confundió con la acción del glifosato. No obstante lo anterior, continuaron registrándose diferencias muy marcadas entre los discos resistentes y los susceptibles. La valoración visual concordó con lo registrado por el medidor de clorofila SPAD. Abu-Irmaileh y Jordan (1978), señalan que al incrementar la temperatura, los carotenoides protectores de clorofila se oxidan y se destruyen.

Cuadro 1. Efecto de la temperatura en la acción del herbicida glifosato sobre discos de hoja de maíz tanto resistente como susceptible al glifosato.

Acondicionamiento Conc. de glifosato	Biotipo			
	Resistente		Susceptible	
	Decoloración %	SPAD	Decoloración %	SPAD
Testigo*	0 d	28.1	0 d	30.7
Temperatura ambiente (18-26 °C)				
0.00	0 d	17.2	0 d	19.3
2.16	4 d	9.1	83 ab	0.67
4.32	7 d	8.1	90 ab	0.31
Acondicionamiento a 35 °C				
0.00	0 d	12.2	0 d	14.1
2.16	7 d	9.2	83 ab	0.44
4.32	9 d	6.5	99 a	0.26
Acondicionamiento a 60 °C				

0.00	11 d	5.7	9 d	6.0
2.16	43 c	0.52	100 a	0.08
4.32	61 bc	0.41	100 a	0.07

*Discos foliares recién cortados; Decoloración = apreciación visual; SPAD = valores obtenidos con el medidor de clorofila; Valores seguidos por la misma letra no difieren estadísticamente (Tukey, $\alpha = 0.05$).

Nota: Los discos foliares sin acondicionamiento permanecieron durante 48 h en las cámaras bioclimáticas. Los acondicionados con calor permanecieron 12 h en estufa y 24 h en cámaras bioclimáticas (a 200 $\mu\text{moles m}^2 \text{s}^{-1}$ de PPF, 30 °C y 50% de humedad relativa).

Prueba de cuantificación del contenido foliar de ácido shikímico

El shikimato solamente se acumuló en los tratamientos pertenecientes al biotipo susceptible, y la cantidad acumulada de esta sustancia aumentó a medida que se incrementó la concentración de glifosato. El biotipo resistente no registró incremento en los niveles de esta sustancia (Figura 1).

La prueba propuesta y la prueba de acumulación de shikimato concordaron en todos los casos. Es decir, no hubo falsos positivos ni falsos negativos.

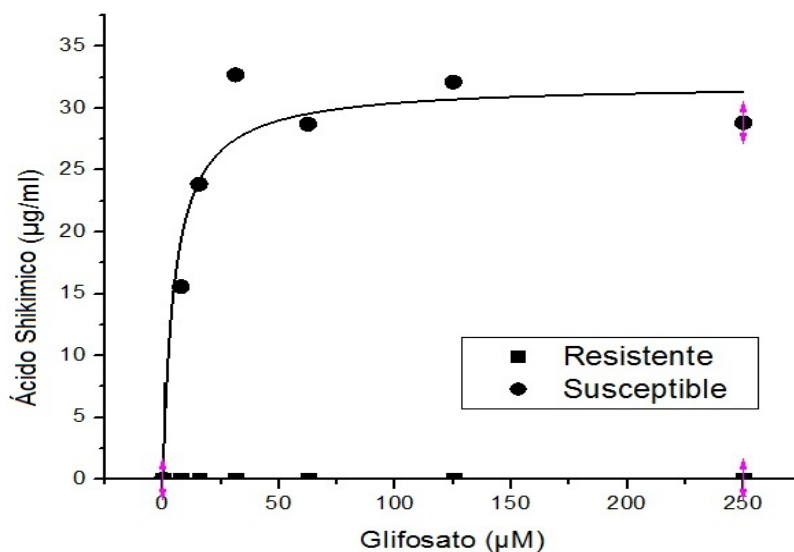


Figura 1. Acumulación de ácido shikimico ($\mu\text{g mL}^{-1}$) en discos foliares de los biotipos de maíz tanto resistente como susceptible, inmersos durante 14 h en diferentes concentraciones de glifosato (μM).

Evaluación en discos foliares de plantas susceptibles Promesa®

Los discos inmersos en agua destilada y sin sulfato de amonio (0.0 g L^{-1} de glifosato), no mostraron decoloración durante todo el tiempo que duró el estudio (144 h) (Cuadro 2). En cambio, los discos en agua destilada más sulfato de amonio, mostraron una ligera decoloración al finalizar el periodo (15%). En los discos inmersos en las diluciones de 2.16 y 4.32 g L^{-1} de glifosato sin sulfato de amonio, los síntomas aparecieron lentamente y no alcanzaron un completo blanqueado a 144 h. Sin embargo, los discos inmersos en las diluciones de glifosato (2.16 y 4.32 g L^{-1}) más sulfato de amonio, manifestaron la aparición de síntomas, y a las 48 h ya se había alcanzado un blanqueado total (100.0%); siendo sus valores en esta evaluación diferentes estadísticamente a los obtenidos con los discos sin sulfato de amonio ($p \leq 0.01$) (Cuadro, 2). El sulfato de amonio en las diluciones de glifosato aceleró la aparición de síntomas e incrementó el blanqueado de los discos foliares. Esto se atribuye a que el sulfato de amonio neutraliza cationes antagonicos del herbicida, facilita su penetración al interior de las células y coadyuva en su transporte a los tejidos fotosintéticos, aumentando así la actividad del glifosato (Donald, 1988; Salisbury *et al.*, 1991; Satchivi *et al.*, 2000; Hartzler, 2001).

Cuadro 2. Efecto de la presencia del sulfato de amonio y de diferentes concentraciones de glifosato en el grado de decoloración de discos foliares de maíz Promesa[®], susceptible a glifosato

Conc. de glifosato (g L ⁻¹)	Tiempo de evaluación (h)			
	24	36	48	144
Sin sulfato de amonio				
0.00	0.0 a*	0.0 c	0.0 c	0.0 c
2.16	0.0 a	26.6 b	33.3 b	86.5 a
4.32	9.9 a	28.3 b	48.3 b	95.0 a
Con sulfato de amonio (2% p/v)				
0.00	0.0 a	0.0 c	0.0 c	15.0 b
2.16	9.9 a	51.6 ab	96.6 a	100.0 a
4.32	13.3 a	68.3 a	100.0 a	100.0 a

* Valores seguidos por la misma letra en cada columna no difieren estadísticamente (Tukey, $\alpha = 0.05$)

Efecto de la concentración de glifosato.

Las concentraciones de glifosato con sulfato de amonio produjeron más decoloración en los discos foliares que las que carecían de sulfato de amonio. La concentración de 4.32 g L⁻¹ de glifosato, no fue diferente estadísticamente a la dosis de 2.16 g L⁻¹ ($p \leq 0.01$). En las cuatro evaluaciones, los valores de ambas concentraciones no fueron estadísticamente diferentes entre sí ($p \leq 0.01$) (Cuadro 2).

Efecto de la edad de las plantas.

Al comparar la decoloración de los discos foliares en función de la edad de las plantas, se observó que aquellos provenientes de plantas de dos semanas de edad (jóvenes), fueron los primeros en mostrar decoloración, y el daño fue más intenso, que el observado en plantas de 12 semanas de edad (adultas). En las evaluaciones realizadas a las 24, 36, 48 y 144 h, los discos de

las plantas jóvenes superaron en 2.2, 7.8, 8.5 y 6.1 % en decoloración a los discos de las plantas adultas, y siempre se detectaron diferencias estadísticas entre ellos ($p \leq 0.01$) (Cuadro 3). Los discos de plantas jóvenes son más sensibles al efecto del glifosato, debido a que en los tejidos jóvenes los procesos se realizan a mayor velocidad que en los de más edad; además, demandan, mayor cantidad de energía y fotosintatos (Bidwell, 1990).

Cuadro 3. Efecto de la edad de los discos foliares de maíz Promesa[®] en el porcentaje de decoloración debido a la actividad del glifosato.

Edad de las plantas	Tiempo de evaluación (h)			
	24	36	48	144
2 semanas (P-JOVEN)	8.99 a	45.1 a	67.4 a	99.2 a
12 semanas (P-ADULTO)	6.77 b	37.3 b	58.9 b	93.1 b

** Valores seguidos por la misma letra dentro de cada columna no difieren estadísticamente (Tukey, $\alpha = 0.05$).

Nota: las evaluaciones se hicieron en todos los discos inmersos en soluciones de glifosato más sulfato de amonio.

Sin acondicionamiento con calor.

Los discos foliares de plantas de maíz, susceptible a glifosato Promesa[®], sin acondicionamiento de calor y puestos sobre mesas de laboratorio a temperatura ambiente (17 – 22 °C), irradianza de 30 a 50 mmol m⁻² s⁻¹ y fotoperiodo de 13.5 h, no mostraron decoloración en ninguna de las combinaciones (edad de plantas por concentración de glifosato) durante las cuatro evaluaciones realizadas (24, 36, 48 y 144 h), por lo cual no se hizo análisis estadístico de los resultados.

Los discos de plantas sin acondicionamiento con calor y puestos en invernadero a 20 – 35 °C de temperatura, con fotoperiodos de 13.5 h, e irradianza de 300 a 400 mmol m⁻² s⁻¹, respondieron de la siguiente manera: en los discos inmersos en agua destilada (0.0 g L⁻¹ de glifosato) sólo

aparecieron síntomas muy ligeros, producto probablemente de la acción del sulfato de amonio. Los discos inmersos en glifosato registraron un daño de 14% durante la primera evaluación (24 h), el cual fue superior a la mayoría de los tratamientos puestos en las cámaras climáticas, a excepción de los discos acondicionados a 60 °C de temperatura por un período de 18 h, cuyo daño antes de sacarlos de la estufa ya era de 30%. En las evaluaciones realizadas a las 36, 48 y 144 h, los discos de hoja que estaban en el invernadero incrementaron paulatinamente su decoloración y al final tuvieron 93% de daño. En todos los casos, dichos valores fueron iguales o menores que los obtenidos con los discos de hoja acondicionados primero con calor y luego puestos en cámaras climáticas. Por tanto, se considera que las condiciones de invernadero, aunque pueden servir para efectuar las pruebas de detección de maíz resistente a glifosato, no son las más adecuadas (Cuadro 4).

Los discos sin acondicionamiento de calor y puestos directamente en las cámaras bioclimáticas a 25 °C y 200 m² s⁻¹ de irradianza, durante la primera evaluación no mostraron síntomas de daño. Posteriormente, en las siguientes evaluaciones (36, 48 y 144 h), el daño de éstos fue mayor que el de los discos de hoja ubicados en invernadero y no difirieron estadísticamente de la mayoría de tratamientos previamente acondicionados con calor ($p \leq 0.01$), sólo fue superado en las tres primeras evaluaciones por los tratamientos de 40 y 50 °C acondicionados durante 12 h y luego puestos en cámaras bioclimáticas. Al final del estudio (144 h) se alcanzó el 100% de daño.

Con acondicionamiento de calor.

Los tratamientos donde los discos foliares tuvieron un periodo de acondicionamiento con calor y luego fueron puestos en cámaras climáticas, registraron el siguiente comportamiento: en la primera evaluación (24 h), los valores más altos de decoloración de los discos se registraron

con el tratamiento de 60 °C por 18 h, el cual alcanzó un daño de 30%, siendo diferente estadísticamente al resto de los tratamientos ($p \leq 0.01$). Los tratamientos con acondicionamiento de calor, desde que se sacaron los discos de las estufas ya registraban ligera decoloración (alrededor de 3 puntos SPAD menos con respecto a su valor original).

Para la segunda y tercera evaluación (36 y 48 h), los valores más altos de decoloración (72.5 y 95.8%) se obtuvieron con la combinación 40 °C por 12 h, seguida por 50 °C por 12 h (64.1 y 87.4%) y la combinación de 40 °C por 6 h (56.6 y 78.3%), sin diferencia estadística entre ellos ($p \leq 0.01$). A las 144 h, todas las combinaciones de acondicionamiento de discos inmersos en soluciones de glifosato más sulfato de amonio, registraron el 100% de daño (decoloración total). Esto se debe a que el glifosato se degrada poco por fotólisis, hidrólisis y temperatura (Rueppel *et al.*, 1977), y existe una relación directa entre la temperatura y la penetración de la cutícula por los herbicidas (Baury y Schonher, 1995); además, al incrementar la temperatura, los procesos enzimáticos aumentan su velocidad de reacción (Bidwell, 1990). Por esta razón, McWhorter (1980) indica que la actividad herbicida del glifosato aumenta, cuando las aplicaciones se efectúan con alta humedad relativa y temperaturas elevadas.

Cuadro 4. Efecto del acondicionamiento con calor de los discos de hoja de maíz susceptible en la decoloración debido la actividad del glifosato.

Tratamientos	Tiempo de evaluación (h)			
	24	36	48	144
Sin acondicionar y en invernadero**				
Sin herbicida	1.7 de	3.3 fg	5.0 g	11.6 c
Con herbicida	14.1 bc	20.8 ef	37.4 f	93.3 b
Sin acondicionar y en cámara bioclimática				
Sin herbicida	0.0 e	0.0 g	0.0 g	11.6 c
Con herbicida	0.0 e	29.9 de	70.7 bcd	100.0 a
Con acondicionamiento de 6 h				
30 °C	0.0 e	39.9 cde	73.3 bcd	100.0a
40 °C	2.5de	56.6 abc	78.3 abc	100.0a
50 °C	1.7de	42.4 cd	67.4 cde	100.0a
60 °C	8.3 cde	39.1 cde	64.9 cde	100.0a
Con acondicionamiento de 12 horas				
30 °C	5.8 cde	43.2 cd	71.6 bcd	100.0 a
40 °C	19.1 b	72.4 a	95.8 a	100.0 a
50 °C	10.0 bcd	64.1 ab	87.4 ab	100.0 a
60 °C	14.9 bc	44.1 bcd	49.9 ef	100.0 a
Con acondicionamiento de 18 h				
30 °C	9.2 cde	36.6 cde	68.3 cd	100.0 a
40 °C	0.0 e	30.8 de	58.2 de	100.0 a
50 °C	1.7 de	49.1 bcd	59.9 de	100.0 a
60 °C	29.9 a	46.6 bcd	61.6 cde	100.0 a

* Valores seguidos por la misma letra dentro de cada columna no difieren estadísticamente (Tukey, $\alpha = 0.05$)

Nota: Las evaluaciones se hicieron sobre los discos de hoja sumergidos en diluciones de glifosato con sulfato de amonio.

Los resultados obtenidos indican que el método puede constituirse en una alternativa de diagnóstico rápido para la detección de plantas de maíz genéticamente modificadas para resistir la acción del glifosato. Además, es posible que la prueba propuesta, también pueda servir con algunas modificaciones, para detectar otros cultivos biotecnológicos que expresan transgenes de resistencia a glifosato como soya (*Glycine max* L) y el algodónero (*Gossypium hirsutum*) o incluso, luego de su correspondiente validación, detectar y evaluar la evolución de la resistencia de las especies de maleza al glifosato.

CONCLUSIONES

La prueba descrita para discriminar biotipos de plantas de maíz resistentes y susceptibles a glifosato fue eficiente y rápida, además es confiable pues sus resultados concordaron con los obtenidos mediante la prueba bioquímica de shikimato.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo (línea Prioritaria de Investigación 7: Inocuidad, Calidad Agroalimentaria y Bioseguridad), a la Universidad de California, Campus Davis, a la Universidad Autónoma Chapingo y al CONACYT, por su apoyo para la realización de este trabajo.

LITERATURA CITADA

- Abu-Irmaileh B. E., and L. S. Jordan. 1978. Some Aspects of Glyphosate Action in Purple Nutsedge (*Cyperus rotundus*). *Weed Science*. 26: 700-703.
- Anónimo. 2011. PLM. Diccionario de Especialidades Agroquímicas. Fertilizantes y Agroquímicos. Edición 21. Royce editores. 580 p.
- Baury, P., and J. Schonher. 1995. Temperature dependence of the diffusion of organic compounds across plant cuticles. *Chemosphere* 30: 1331-1340.

- Bidwell, R. G. S. 1990. Fisiología Vegetal. Cuarta edición. A. G. T. Editor. México. 350 p.
- CDMS (Crop Data Management System). 2007. Agrochemical Database. <http://www.cdms.net/LDat/ld5UJ047.pdf> (Consulta, 12 de noviembre de 2011)
- Donald, W. W. 1988. Established foxtail barley, *Hordeum jubatum*, control with glyphosate plus ammonium sulfate. Weed Technol. 2: 364–368.
- Duke S. O., and Powless S. B. 2008. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. Pest Management Science. 64: 319-325.
- GMO Compass. 2011. Genetically modified plants: global cultivation area Maize. http://www.gmo-compass.org/eng/agri_biotechnology/gmo_planting/341.genetically_modified_maize_global_area_under_cultivation.html (Consulta, 23 de noviembre de 2011)
- Hartzler B. 2001. Role of spray adjuvants with postemergence herbicides. <http://www.weeds.iastate.edu/mgmt/2001/additives.htm> (Consulta, 21 de octubre de 2011).
- Koger, C. H., D. L. Shaner, W. B. Henry, T. Nadler-Hassar, W. E. Thomas, and J. W. Wilcut. 2009. Assessment of two nondestructive assays for detecting glyphosate resistance in horseweed (*Conyza canadensis*). Weed Science 53: 438-445
- Koger C. H., and Reddy, K. N. 2005. Role of absorption and translocation in the mechanism of glyphosate resistance in Horseweed (*Conyza canadensis*). U. S. Department of Agriculture - Agricultural Research Service, Southern Weed Science Research. 53: 84-89.
- López H. A. 2008. Contexto y perspectivas del proyecto bioseguridad en México. In: (eds.). Bioseguridad en la Aplicación y el Uso de los Organismos Genéticamente Modificados. CIBIOGEM. Pp: 17-22.

- McWhorter C. G. 1980. Translocation of ^{14}C -glyphosate in soybean (*Glycine max*) and Johnson grass (*Sorghum halepense*). Weed Science 28: 113-118.
- Nandula, V. K. 2010. Glyphosate resistance in crops and weeds: history, development and management. Mississippi State University. U.S.A. 30 p.
- Nielsen, R. L. 2011. A Compendium of Biotech Traits. <http://www.agry.purdue.edu/ext/corn/news/timeless/BiotechTraits.html> (Consulta, 13 de septiembre de 2011).
- Ortiz-García, S., E. Ezcurra, B. Schoel, F. Acevedo J. Soberon, and A. Snow. 2005. Absence of detectable transgenes in local landraces of maize in Oaxaca, Mexico. PNAS Early Edition I-6. www.pnas.com/cgi/doi/10.1073/pnas.0503356102. (Consulta, 12 de diciembre de 2011).
- Perez-Jones A., K. W. Park, J. Colquhoun, C. Mallory-Smith, and D. L. Shaner. 2005. Identification of glyphosate resistant Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) in Oregon. Weed Science 53: 775–779.
- Pline, W., K. Hatzios, and S. Hagood. 2000. Weed and herbicide-resistant soybean (*Glycine max*) response to glufosinate and glyphosate plus ammonium sulfate and pelargonic acid. Weed Technology 14: 667-674.
- Quist, D., and D.H. Chapela. 2001. Transgenic DNA introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca, Mexico. Nature 414: 541-543.
- Rueppel, M. L., B. B. Brightwell, J. Schaefer, and J. T. Marvel. 1977. Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water. J. of Agric. and Food Chemistry 25: 517-528.

- Salisbury, C. D., J. M. Chandler, and M. G. Merkle. 1991. Ammonium sulfate enhancement of glyphosate and SC-0224 control of Johnson grass (*Sorghum halepense*). *Weed Technol.* 5: 18–21.
- SAS Institute. 1997. SAS/STAT User's Guide. SAS Institute, Cary, NC. USA. 1028 p.
- Satchivi N. M., L. M. Wax, E. W., Stoller, and D. P. Briskin. 2000. Absorption and translocation of glyphosate isopropylamine and trimethylsulfonium salts in *Abutilon theophrasti*. *Weed Science* 48: 675-679.
- SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). 2011. Estatus de solicitudes de permisos de liberación al ambiente de maíz genéticamente modificado ingresadas en 2011: <http://www.senasica.gob.mx/?id=2220> (Consulta, 14 de diciembre de 2011).
- Shaner D, L. T. Nadler-Hassar, W. B. Henry, and C. H. Koger. 2005. A rapid *in vivo* shikimate accumulation assay with excised leaf discs. *Weed Science*, 53: 764-774.
- Singh B, K., and D. L. Shaner. 1998. Rapid determination of glyphosate injury to plants and identification of glyphosate-resistant plants. *Weed Technol.* 12: 527-530.
- Spencer, M., R., and M. J. Gwyn. 2000. DEKALB, Genetic Corporation, assignee. Glyphosate resistant maize lines. U.S. Patent 6040497, filed March. 2000.
- Yuan C. I., M. Y. Chaing, and Y. M. Chen. 2001. Triple mechanisms of glyphosate resistance in a naturally occurring glyphosate resistant plant *Diclectachinensis*. *Plant Science* 163: 543-554.

3. CONCLUSIONES

Discriminar la presencia de organismos resistentes a glifosato dentro de una población, no es tarea sencilla cuando la característica distintiva no es fácilmente detectable. La decoloración que experimenta el tejido de maíz susceptible a glifosato inmerso en soluciones de este herbicida, puede ser utilizada para detectar la presencia de biotipos resistentes dentro de poblaciones susceptibles. Pequeños discos foliares de maíz inmersos en soluciones de glifosato, son suficiente para diferenciar cualitativa y cuantitativamente las plantas resistentes de las susceptibles al herbicida. La adición de sulfato de amonio a las soluciones de glifosato acelera la aparición de síntomas en los discos foliares, haciendo más rápida la prueba. El acondicionamiento con calor de los discos foliares inmersos en soluciones de glifosato, permite obtener una mayor uniformidad en el blanqueado de los discos. Los discos foliares provenientes de plantas jóvenes manifiestan más rápidamente los síntomas de blanqueado que los provenientes de plantas adultas. La prueba rápida que aporta este estudio para discriminar los biotipos de maíz resistente de los susceptibles a glifosato, consiste: en cortar discos foliares de plantas jóvenes, introducirlos en soluciones de 4.32 g/L de glifosato más 2% m/v de sulfato de amonio, acondicionarlos con calor en estufas a 40 °C por un periodo de 12 horas, transferirlos a cámaras climáticas a 25 °C y 200 m⁻² s⁻¹ de irradianza por un periodo de 48 horas y finalmente realizar la valoración. La prueba propuesta es rápida, no requiere equipo sofisticado, ni personal especializado y su costo es muy bajo. Esta prueba es potencialmente útil para el manejo de malezas propensas a generar resistencia al herbicida glifosato.

En México, existe un potencial estimado para la siembra de maíz resistente a glifosato de cerca de dos millones de hectáreas. Es probable que las siembras comerciales de este cultivo empiecen en el 2013, en zonas de riego donde se cultive maíz amarillo y se practique la agricultura de contrato. Dichas siembras comerciales requerirán de permisos especiales que se otorguen dentro del marco de la Ley que rige este tipo de cultivos. Sin embargo, es probable que existan siembras ilícitas, es decir que carezcan de los permisos pertinentes. Además, el flujo génico de maíces genéticamente modificados al resto de cultivares de maíces también es posible. En ambas situaciones, existe interés oficial y de personas físicas o morales de la sociedad de detectar este tipo de plantas. Considerando lo extenso de las superficies de maíz que hay en México, la búsqueda de plantas que expresen transgenes se torna difícil debido a la carencia de pruebas rápidas y confiables que permitan evaluar, sin destruir, una gran cantidad de individuos.

La prueba que se desarrolló en la presente investigación, es sencilla y no se requiere de personal altamente especializado para llevarla a cabo. Una sola persona podría procesar más de 12,000 muestras por semana, y considerando que los resultados que obtenga son tan confiables como la prueba de acumulación de shikimato, entonces la capacidad de detección de plantas de maíz resistentes a glifosato se incrementa significativamente. No se pretende que esta prueba se utilice con fines legales, pues se considera presuntiva debido a que detecta la expresión de genes a través de características fenotípicas. Sin embargo, permite inspeccionar eficientemente amplias zonas de cultivo y donde se detecten individuos positivos, se

podrán utilizar las pruebas bioquímicas y moleculares que, de manera indiscutible, tienen la capacidad para constatar la presencia de este tipo de maíz GM.

Dicha prueba también podría tener otros usos. Por ejemplo, en campos de cultivo de maíces criollos que tengan la presencia de plantas con transgenes de resistencia a glifosato, se podría utilizar este desarrollo para seleccionar una gran cantidad de plantas de maíz carentes de este gene y utilizarlas como padres de la siguiente generación como una forma eficaz de erradicar la presencia de plantas manipuladas genéticamente para sobrevivir a una aplicación de glifosato. De esta manera, la agricultura orgánica de maíz también podría contar con una herramienta que le permita mantener su cultivo libre de este tipo de transgenes.

En la sociedad ha existido la preocupación que el flujo de polen hacia maíces criollos pueda conllevar a un incremento de transgenes en la población receptora. Esta prueba rápida permite determinar la frecuencia de plantas con resistencia a glifosato y conocer su fluctuación a través del tiempo. Por tanto, permitirá conocer el destino de este tipo de transgenes a través de generaciones.

Los principios de la prueba rápida también se pueden emplear para determinar la frecuencia de resistencia a glifosato en las diferentes especies de maleza objeto de control por parte de dicho herbicida, fortaleciendo así las estrategias para su manejo.