



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE BOTÁNICA

DIFERENCIAS EN LA APTITUD ENTRE COLECTAS DE "ALPISTILLO" (*Phalaris minor* Retz.) RESISTENTES Y SUSCEPTIBLE A INHIBIDORES DE LA ACCasa

JESÚS RUBÉN TORRES GARCÍA

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE :

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2012

La presente tesis, titulada: **Diferencias en la aptitud entre colectas de "alpistillo" (*Phalaris minor* Retz.) resistentes y susceptible a inhibidores de la ACCasa**, realizada por el alumno **Jesús Rubén Torres García**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS
BOTÁNICA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



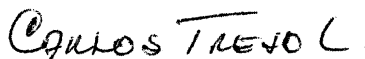
Dr. Ebandro Uscanga Mortera

ASESOR



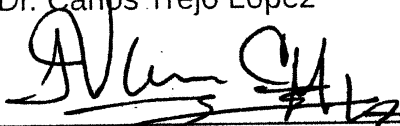
Dr. Josue Kohashi Shibata

ASESOR



Dr. Carlos Trejo López

ASESOR



Dr. F. Victor Conde Martínez

ASESOR



Dr. Juan S. Núñez Farfán

ASESOR



Dr. David Martínez Moreno

Montecillo, Texcoco, Estado de México noviembre de 2012

DIFERENCIAS EN LA APTITUD ENTRE COLECTAS DE "ALPISTILLO" (*Phalaris minor* Retz.) RESISTENTES Y SUSCEPTIBLE A INHIBIDORES DE LA ACCasa

Jesús Rubén Torres García, Dr.
Colegio de Postgraduados, 2012

Las malezas compiten intensamente con los cultivos, por lo cual, los agricultores emplean prácticas de control (manual, mecánico y químico) para eliminarlas. Los herbicidas ejercen una presión de selección extrema (99.99%) sobre las poblaciones. Como consecuencia, en unas pocas generaciones se observan individuos resistentes (R) en las poblaciones de maleza. La resistencia a herbicidas es un proceso evolutivo causado por cambios metabólicos o genéticos. En algunas especies la resistencia va acompañada de una disminución en la aptitud competitiva (*fitness*). Esto puede ocasionar que las plantas resistentes sean desplazadas cuando el factor de selección se retire de las poblaciones. *Phalaris minor* (Poaceae) es una maleza que evolucionó hacia la adquisición de resistencia a herbicidas inhibidores de la síntesis de lípidos en el Bajío Mexicano. Aún se desconoce si esta especie presenta diferencias en la aptitud entre individuos susceptibles (S) y R. El objetivo del presente estudio fue determinar las diferencias en la aptitud entre individuos S y R de *P. minor* provenientes de la región del Bajío. Se analizó la genética de las poblaciones (secuenciación de genes: código de barras y ACCasa). Se realizaron experimentos en semillas (tamaño del embrión, latencia, germinación, vigor), ciclo biológico (fenología, acumulación de biomasa y fecundidad), competencia por luz (dinámica de la cobertura del dosel bajo emergencia natural y simultánea, productividad relativa, agresividad e intensidad de competencia). El análisis de secuencias mostró que las colectas no presentan mutaciones en la región del código de barras, pero sí en el gen de la ACCasa. Las mutaciones que causan la resistencia se presentaron en diferentes posiciones dentro del gen estudiado, por lo que se establece que las poblaciones evolucionaron independientemente hacia la resistencia. En las semillas el tamaño del embrión tuvo una reducción hasta del 50% en individuos R, esto ocasionó que requirieran un mayor número de días para superar la latencia primaria, y tuvieran un porcentaje y velocidad de germinación menor. En el ciclo biológico se encontraron diferencias en la fenología, acumulación de biomasa y producción de semillas. Las colectas Col 4 y Gto fueron precoces, con poca acumulación de biomasa; mientras que Col 7 y Jal fueron de lento crecimiento, pero de mayor acumulación de biomasa, en todas se observó una fecundidad menor en comparación con el S. En la competencia por la luz, el retraso en la emergencia de las colectas R, ocasionó que tuvieran una menor proyección de la cobertura del dosel con respecto al S. Cuando la emergencia fue simultánea, no se observaron diferencias en la cobertura del dosel lo que incrementó la intensidad de competencia. La reducción en la aptitud encontrada en las colectas R podría ser una explicación razonable del bajo éxito de los individuos resistentes bajo condiciones no selectivas, lo que podría causar el retorno a las poblaciones susceptibles cuando se retire el factor de selección.

Palabras clave: *Fitness, costo de la resistencia, evolución, ecología evolutiva*

FITNESS DIFFERENCES BETWEEN COLLECTIONS OF "ALPISTILLO" (*Phalaris minor* Retz.) RESISTANT AND SUSCEPTIBLE TO INHIBITORS OF ACCase

Jesús Rubén Torres García, Dr.
Colegio de Postgraduados, 2012

Weeds are plants that compete intensively with crops, reducing the yield, therefore, farmers use practices (manual, mechanical and chemical) to eliminate them. However, herbicides exert extreme selection pressure (99.99%) on weed populations. Like a consequence of the selection pressure, in a few generations are observed individuals resistant (R) in weed populations. Herbicide resistance is an evolutionary process caused by metabolic or genetic changes. However, in some species the evolution of resistance is accompanied by a decrease in the competitive fitness of individuals (*fitness*). This penalty can cause that resistant plants are displaced when the selection factor is retired on populations. *Phalaris minor* (Poaceae) is a weed that evolved into the acquisition of resistance to inhibitors lipid synthesis herbicides in the Bajío Mexican. It remains unclear whether this species differs in fitness during the stages of their life cycle between susceptible individuals (S) and resistant. Therefore, the objective of this study was to determine the differences in fitness between individuals S and R of *P. minor* from the Bajío region. We analyzed the population genetics (sequencing chloroplast genes: barcode and resistance to inhibitor lipid synthesis herbicides). Experiments were conducted on seeds (embryo size, dormancy, germination, vigor), life cycle (phenology, biomass accumulation and fecundity), competition for light (dynamic of canopy cover under simultaneous and natural emergence, relative productivity, aggressivity and intensity of competition). The nucleotide sequence analysis showed that no mutations are presents in the studied collects in the region of the barcode, but them are presents in the reported gene for resistance to inhibitors of lipid. Mutations causing the resistance presented at various positions within the studied gene, therefore establishing that populations toward resistance evolved independently. In seed embryo size was reduced to 50% resistant individuals, this caused requiring a greater number of days to overcome the latency primary and had a lower germination percentage and speed. In the biological cycle differences in phenology, biomass accumulation and seed production. The collections Gto and Col 4 were early, with little accumulation of biomass, while Col 7 and Jal were of slow growth, but higher biomass accumulation, all collections R had lower fertility compared to S. In the study of the collections under competition for light, the delay in the emergence of R collections, resulted in a lower projection of the canopy cover with respect to S. When the emergence was simultaneous, no differences in canopy cover, which increased the intensity of competition. The reduction in fitness found in the collections R could be a reasonable explanation for the low success of resistant individuals under nonselective conditions, which could cause a return to susceptible populations when removing the selection factor.

Key words: *Fitness, Cost of resistance, evolution, evolutionary ecology*

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados, por permitirme realizar mis estudios de maestría y doctorado. Es un orgullo ser egresado de una institución con el prestigio y el nivel académico del Colegio.

Al CONACYT por la beca otorgada para mis estudios de maestría y doctorado que ahora culminan. Sin este apoyo, me hubiera sido imposible obtener el grado.

Mi más sincero agradecimiento a mi consejero, Dr. Ebandro Uscanga Mortera por su paciencia y confianza. Estoy convencido de que no podría haber encontrado a un asesor mejor.

A los integrantes del Consejo Particular: Dr. Josué Kohashi, Dr. Carlos Trejo, Dr. Víctor Conde, Dr. Juan Núñez y Dr. David Martínez. Gracias a sus comentarios y opiniones, este trabajo tomó forma y pudo culminarse satisfactoriamente.

Un agradecimiento muy especial a la Dra Obdulia Segura, por su asesoría e interés en este trabajo. Aprendí mucho de Usted.

Al grupo de trabajo del laboratorio de fisiología vegetal. En especial a los M. C. Petra Yañez y Antonio García. Por toda su ayuda y su apoyo durante mi estancia en el Colegio.

Al Laboratorio de biología molecular de uso común de Fitosanidad, por prestar sus instalaciones en donde se realizó la parte de biología molecular de esta tesis.

DEDICATORIAS

A mi esposa Sabina, gracias por ayudarme a cumplir esta meta. Espero que éste solo sea uno de muchos logros que juntos alcanzaremos.

A mis padres Ángeles y David; a mi hermano David y mi abuelita Celia. Por estar siempre conmigo.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	1
LITERATURA CITADA.....	4
Capítulo 1. REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
Las malezas en la agricultura.....	7
Evolución de la resistencia a herbicidas en malezas.....	8
Resistencia a herbicidas inhibidores de la ACCasa.....	13
Costo de la resistencia en la aptitud competitiva.....	16
Genética de las poblaciones.....	23
<i>Phalaris minor</i>	24
Resistencia a herbicidas.....	26
LITERATURA CITADA.....	27
Capítulo 2. DIVERSIDAD GENÉTICA Y EVOLUCIÓN DE LAS POBLACIONES DE ALPISTILLO (<i>Phalaris minor</i> Retz.) RESISTENTES A INHIBIDORES DE LA ACCasa EN EL BAJIO MEXICANO.....	32
RESUMEN.....	33
INTRODUCCIÓN.....	34
MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
Colecta del material biológico.....	36
Extracción de ADN por método de CTAB.....	37
Amplificación de los genes por PCR.....	37
Análisis de las secuencias.....	39
Diversidad genética intra e interpoblacional.....	40
Estimación de la divergencia evolutiva entre las poblaciones.....	40
Red de flujo genético entre poblaciones.....	40
Construcción de árbol filogenético.....	40
RESULTADOS.....	41
Diversidad genética intra e interpoblacional.....	41
Estimación de la divergencia evolutiva entre las poblaciones.....	44
Red de flujo genético entre poblaciones.....	45
Reconstrucción del árbol filogenético.....	46
DISCUSIÓN.....	49

LITERATURA CITADA.....	53
Capítulo 3. FISIOLÓGÍA DE SEMILLAS DE “ALPISTILLO” (<i>Phalaris minor</i>) SUSCEPTIBLE Y RESISTENTES A HERBICIDAS INHIBIDORES DE LA ACCasa.....	59
RESUMEN.....	60
INTRODUCCIÓN.....	61
MATERIALES Y MÉTODOS.....	63
Asignación de biomasa a las diferentes estructuras de la semilla.....	63
Tratamiento para la ruptura de la latencia.....	64
Longevidad medida por envejecimiento acelerado.....	65
Análisis estadístico.....	65
RESULTADOS.....	66
Asignación de biomasa a las diferentes estructuras de la semilla.....	66
Tratamiento para la ruptura de la latencia.....	67
Longevidad medida por envejecimiento acelerado.....	69
Correlación entre el tamaño del embrión y la germinación.....	70
DISCUSIÓN.....	72
LITERATURA CITADA.....	76
Capítulo 4. DIFERENCIAS EN BIOMASA Y FECUNDIDAD ENTRE COLECTAS DE ALPISTILLO (<i>Phalaris minor</i> Retz.) SUSCEPTIBLES Y RESISTENTES A HERBICIDAS INHIBIDORES DE LA ACCasa.....	81
RESUMEN.....	82
INTRODUCCIÓN.....	83
MATERIALES Y MÉTODOS.....	84
Condiciones de Crecimiento.....	85
Fenología y acumulación de grados días desarrollo.....	85
Producción y distribución de biomasa.....	86
Análisis de crecimiento.....	86
Costo de la resistencia en la biomasa y fecundidad.....	86
Análisis estadístico.....	87
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	87
Fenología y acumulación de grados días desarrollo.....	87
Producción y distribución de biomasa.....	89

Análisis de crecimiento.....	92
Costo de la resistencia en la biomasa y la fecundidad.....	93
LITERATURA CITADA.....	96
Capítulo 5. COMPETENCIA POR LUZ EN BIOTIPOS DE ALPISTILLO (<i>Phalaris minor</i> Retz.) SUSCEPTIBLES Y RESISTENTES A INHIBIDORES DE la ACCasa.....	100
RESUMEN.....	101
INTRODUCCIÓN.....	102
MATERIALES Y MÉTODOS.....	104
Tiempo requerido para la germinación.....	104
Competencia por luz.....	105
Índices para evaluar la competencia.....	107
Productividad relativa de las colectas en competencia.....	108
Análisis estadístico.....	108
RESULTADOS.....	109
Tiempo requerido para la germinación.....	109
Competencia por luz.....	111
Índices para evaluar la competencia.....	115
Intensidad de competencia.....	116
Productividad relativa de las colectas bajo competencia.....	116
DISCUSIÓN.....	120
Germinación en condiciones de laboratorio.....	120
Competencia por luz.....	121
Índices para evaluar la competencia.....	123
Productividad relativa de las colectas bajo competencia.....	124
LITERATURA CITADA.....	126
DISCUSIÓN GENERAL.....	131
CONCLUSIONES GENERALES.....	135
LITERATURA CITADA.....	136

ÍNDICE DE CUADROS

Capítulo 1

Cuadro 1. Valores de dosis letal media (DL_{50}) para el biotipo de <i>Lolium rigidum</i> VLR1 y líneas seleccionada con bajas dosis de diclonafop (Tomado de Neve y Powles; 2005).....	13
Cuadro 2. Costo de la resistencia a herbicidas, patógenos y herbivoría en la biomasa y fecundidad de las plantas (malezas y cultivos) (Tomado de Bergelson y Purrington, 1996).....	20

Capítulo 2

Cuadro 1. Polimorfismo del gen ACCasa de colectas de <i>Phalaris minor</i> , con diferentes índices de resistencia a herbicidas que inhiben la ACCasa en el Bajío, México.....	42
Cuadro 2. Prueba de neutralidad de Tajima, de colectas de <i>P. minor</i> con diferentes índices de susceptibilidad y resistencia a herbicidas que inhiben la ACCasa en el Bajío, Mex.....	43
Cuadro 3. Estimación de la divergencia evolutiva entre secuencias de nucleótidos de las poblaciones de <i>Phalaris minor</i> susceptible y resistentes a herbicidas que inhiben la síntesis de la ACCasa en el Bajío, México. En base a que esta estimación es en el número de diferencias, no se utilizó algún modelo de substitución.....	44
Cuadro 4. Estimación de la divergencia evolutiva entre secuencias de aminoácidos de las poblaciones de <i>Phalaris minor</i> susceptible y resistentes a herbicidas que inhiben la síntesis de la ACCasa en el Bajío, México.....	45

Capítulo 3

Cuadro 1. Peso de materia seca y porcentaje de asignación a las diferentes estructuras de semillas susceptibles (S) y resistentes (Col 4, Col 7, Gto y Jal) a herbicidas inhibidores de la ACCasa de alpistillo (<i>Phalaris minor</i>).....	66
Cuadro 2. Número de días a germinación (NDG) e índice de velocidad de germinación (IVG) después del tiempo de estratificación (0, 10, 20, 30 d a 5 °C) de semillas susceptibles (S) y resistentes (Col 4, Col 7, Gto y Jal) a herbicidas inhibidores de la ACCasa de alpistillo (<i>Phalaris minor</i>).....	69
Cuadro 3. Longevidad medida por la conductividad eléctrica ($dS\ m^{-1}$) después de 0, 24, 48, 72 y 96 h de envejecimiento acelerado (45 °C y 100% de HR) de semillas susceptibles (S) y resistentes (Col 4, Col 7, Gto y Jal) a herbicidas inhibidores de la ACCasa de alpistillo (<i>Phalaris minor</i>).....	70

Capítulo 4

Cuadro 1. Días después de la germinación y Grados días desarrollo (GDD) acumulados en los muestreos de biomasa de los biotipos susceptibles y resistentes (Col 4, Col 7, Gto y Jal) a herbicidas que inhiben la síntesis de la ACCasa de <i>Phalaris minor</i>	88
Cuadro 2. Peso de materia seca de raíz, tallo, hojas y biomasa total (g planta ⁻¹); de los biotipos susceptibles y resistentes (Col 4, Col 7, Gto y Jal) a herbicidas que inhiben la síntesis de ACCasa de <i>Phalaris minor</i> . Letras diferentes indican diferencia estadística significativa (Tukey $p < 0.05$).....	91
Cuadro 3. Análisis de crecimiento (Tasa de crecimiento absoluto TCA, tasa de crecimiento relativo TCR, tasa de asimilación neta TAN y duración del área foliar DAF) de las colectas susceptibles y resistentes (Col 4, Col 7, Gto y Jal) a herbicidas que inhiben la síntesis de ACCasa de <i>Phalaris minor</i> . Letras diferentes indican diferencia estadística significativa (Tukey $p < 0.05$).....	93
Cuadro 4. Biomasa y fecundidad relativa (<i>relative fitness</i>) de acuerdo a la fórmula de Bergelson y Purrington (1996) de los biotipos susceptibles y resistentes (Col 4, Col 7, Gto y Jal) a herbicidas que inhiben la síntesis de la ACCasa de <i>Phalaris minor</i> . Letras diferentes indican diferencia estadística significativa (Tukey $p < 0.05$). 94	94

Capítulo 5

Cuadro 1. Índices de competencia evaluados en las series de reemplazo de De Witt entre poblaciones de <i>Phalaris minor</i> susceptible y resistentes a herbicidas inhibidores de la ACCasa.....	108
Cuadro 2. Probabilidad estadística de las pruebas de Logrank y Wilcoxon para el análisis de tiempo de falla en la germinación de colectas R respecto a la colecta S de <i>Phalaris minor</i>	111
Cuadro 3. Estimadores del modelo logístico por la cobertura del dosel de colectas susceptibles y resistentes (Col 4, Col 7, Go y Jal) a inhibidores de la ACCasa de “alpistillo” (<i>Phalaris minor</i>) sembradas en series de reemplazo (De Witt, 1969). a=tiempo (d) a la máxima cobertura; X0=tiempo en que se alcanza el 50% de cobertura; b=pendiente alrededor del 50% de cobertura	113
Cuadro 4. Estimadores del modelo lineal de la cobertura del dosel de colectas susceptibles y resistentes (Col 4, Col 7, Go y Jal) a inhibidores de la ACCasa de “alpistillo” (<i>Phalaris minor</i>) sembradas en series de reemplazo (De Witt, 1969).....	115
Cuadro 5. Índice de Agresividad e intensidad de competencia entre colectas susceptibles y resistentes (Col 4, Col 7, Go y Jal) a inhibidores de la ACCasa de “alpistillo” (<i>Phalaris minor</i>) sembradas en series de reemplazo (De Witt, 1969).....	116

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1. Esquema de la selección ejercida por los herbicidas y el cambio en la proporción de individuos susceptibles y resistentes en las poblaciones de maleza (Tomado de Tharayil-Santhakumar, 2003).....	11
Figura 2. Efecto del porcentaje de efectividad del herbicida en la probabilidad de selección de individuos resistentes (Tomado de Maxwell <i>et al.</i> , 1990).....	12
Figura 3. Modo de acción de los herbicidas inhibidores de la Acetil Coenzima-A carboxilasa.....	14
Figura 4. Distribución de las especies resistentes a herbicidas inhibidores de la Acetil Coenzima-A carboxilasa.....	15
Figura 5. Comparación en la diferentes etapas del ciclo biológico para determinar las diferencias en la aptitud entre individuos susceptibles y resistentes (Tomado de Maxwell <i>et al.</i> , 1990).....	18
Figura 6. Dinámica de las poblaciones susceptibles y resistentes en presencia y ausencia de herbicidas (Tomado de Maxwell <i>et al.</i> , 1990).....	19
Figura 7. Distribución mundial de <i>Phalaris minor</i>	25
Figura 8. Distribución de <i>Phalaris minor</i> en México. Tomado de CONABIO.....	26

Capítulo 2.

Figura 1. Estimación de la red de flujo genético de las poblaciones de <i>Phalaris minor</i> susceptibles y resistentes a herbicidas inhibidores de la ACCasa en el Bajío, México.....	47
Figura 2. Árbol filogenético de las poblaciones de <i>Phalaris minor</i> susceptibles y resistentes a herbicidas inhibidores de la ACCasa, estimado por el método de máxima parsimonia. El análisis estuvo basado en la secuencia de aminoácidos (250 sitios) y con 1000 repeticiones de bootstrap. Se seleccionó el árbol consenso al 50%.....	48

Capítulo 3

Figura 1. Dinámica de la germinación de semillas (%) después del tratamiento para la ruptura de la latencia en las colectas susceptible (A) y resistentes a herbicidas: Col 4 (B), Col 7 (C), Gto (D) y Jal (E) de <i>Phalaris minor</i> . Tratamientos para la ruptura de la latencia (0, 10, 20 y 30 d a 5 °C). Datos promedio \pm el error estándar.....	68
Figura 2. Correlación entre el porcentaje ocupado por el embrión en la semilla y el	

número de días a germinación.....	71
Figura 3. Correlación entre el porcentaje ocupado por el embrión en la semilla y el índice de velocidad de germinación.....	71

Capítulo 4

Figura 1. Dinámica de la acumulación de biomasa (g planta ⁻¹) en biotipos de <i>Phalaris minor</i> Susceptibles y resistentes (Col 4, Col 7, Gto y Jal) a herbicidas inhibidores de la ACCasa.....	90
--	----

Capítulo 5

Figura 1. Dinámica de la germinación de semillas de <i>Phalaris minor</i> Susceptibles y resistentes (col 4, Col 7, Gto y Jal) a herbicidas inhibidores de la ACCasa.....	110
Figura 2. Dinámica de la cobertura del dosel (%) en germinación natural de colectas susceptibles y resistentes (Col 4, Col 7, Go y Jal) a inhibidores de la ACCasa de “alpisto” (<i>Phalaris minor</i>) en siembra mono específica y en mezcla S:R (50:50) de acuerdo al diagrama de De Witt (1969).....	112
Figura 3. Dinámica de la cobertura del dosel (%) en germinación sincronizada de colectas susceptibles y resistentes (Col 4, Col 7, Go y Jal) a inhibidores de la ACCasa de “alpisto” (<i>Phalaris minor</i>) en siembra mono específica y en mezcla S:R (50:50) de acuerdo al diagrama de De Witt (1969).....	114
Figura 4. Productividad de la materia seca relativa en germinación natural de colectas susceptibles y resistentes (Col 4, Col 7, Go y Jal) a inhibidores de la ACCasa de “alpisto” (<i>Phalaris minor</i>) sembradas en series de reemplazo (De Witt, 1969).....	118
Figura 5. Productividad de la materia seca relativa en germinación sincronizada de colectas susceptibles y resistentes (Col 4, Col 7, Go y Jal) a inhibidores de la ACCasa de “alpisto” (<i>Phalaris minor</i>) sembradas en series de reemplazo (De Witt, 1969)	119

DIFERENCIAS EN LA APTITUD ENTRE COLECTAS DE “ALPISTILLO” (*Phalaris minor* Retz.) RESISTENTES Y SUSCEPTIBLE A INHIBIDORES DE LA ACCasa

INTRODUCCIÓN

En la agricultura de subsistencia, el control de la maleza se realiza de forma manual. Sin embargo, en la agricultura tecnificada se requieren de métodos más eficaces para su control, por ejemplo, el empleo de herbicidas. Los herbicidas son sustancias químicas que están diseñadas para interrumpir una parte del metabolismo y causar la muerte de la planta (Tharayil-Santhakumar, 2003). Éstos ejercen una presión de selección extrema (99.9%) sobre las poblaciones de malezas.

Después de un uso reiterado de herbicidas con el mismo modo de acción, se observan individuos que resisten las mismas dosis a las que anteriormente les causaban la muerte. La resistencia a herbicidas es un proceso evolutivo causado por el hombre (Palumbi, 2001). La resistencia es definida como la aptitud heredada de una especie para sobrevivir a la exposición de una dosis de herbicida la cual es normalmente letal en los tipos silvestres (Thomas *et al.*, 2002; Tharayil-Santhakumar, 2003; Menalled y Dyer, 2006).

La resistencia puede estar basada en diferentes mecanismos como: cambios metabólicos (exclusión, conjugación de compuestos, sobreexpresión de compuestos, entre otros) o cambios en el sitio de acción (cambio por mutación en las secuencias de ADN) (Thomas *et al.*, 2002). La resistencia basada en cambios en el sitio de acción se origina por mutaciones no sinónimas en los genes responsables de la síntesis de la enzima blanco (Tharayil-Santhakumar, 2003). Éste cambio causa una modificación en

la estructura de la enzima, impidiendo al herbicida unirse a ésta y bloquear la ruta metabólica. Se han reportado casos en los que un mismo biotipo a desarrollado resistencia múltiple a tres diferentes tipos de herbicidas por procesos de selección (glifosato, paraquat y ACCasa) (Yu *et al.*, 2007).

La efectividad tan alta que tienen los herbicidas (99.9%) se ha relacionado con la elevada probabilidad de seleccionar hacia la resistencia. Sin embargo, reportes de Australia indican que aun con dosis bajas (10% de la dosis letal media), se obtienen niveles de resistencia de hasta 55 veces en un lapso de tres ciclos de selección (Neve y Powles; 2005a, 2005b).

La resistencia a xenobioticos (medicamentos, insecticidas, herbicidas) tiene un costo sobre las aptitudes competitivas de los organismos (*fitness*) (Bergelson y Purrington 1996; Cousteau, 2002). Esta reducción en la aptitud puede estar determinada por costos fisiológicos, efectos pleiotrópicos, intercambios (*trade-offs*), entre otros. Dichos costos ocasionan en los organismos reducciones en la biomasa, fecundidad, y en la aptitud para competir por los recursos.

Phalaris minor es una planta anual perteneciente a la familia Poaceae, es originaria del Mediterráneo y Asia occidental, pero ha sido dispersada a través de las regiones templadas de Asia, África, Oceanía y América. En México, también es conocido por su nombre común como alpiste silvestre, pasto romano, alfarín o alpestillo (Little Seed Canary Grass, en inglés). Esta especie es considerada como una maleza muy agresiva en los campos de trigo del norte del país y la región del Bajío. Aunque también se reporta en cultivos de ajonjolí, alfalfa, algodón, avena, cártamo, espárrago, frijol, garbanzo, maíz, sorgo, soya, tomate, uva y vainilla (Villaseñor y Espinosa, 1998).

Esta especie ha evolucionado hacia la resistencia a herbicidas inhibidores de la síntesis de aminoácidos ramificados (ALS) y a los inhibidores de la Acetil coenzima A carboxilasa (ACCase). En México se ha consignado la aparición de biotipos resistentes a inhibidores de la ACCase en campos de trigo en el Bajío mexicano desde 1996 (Heap, 2012). A pesar de su impacto negativo en la región del Bajío, se han realizado pocos estudios sobre la biología de *Phalaris minor*. Aún se desconocen los mecanismos de resistencia, las implicaciones genéticas y si existe una diferencia en la aptitud competitiva (*fitness*) entre colectas susceptibles y resistentes. Conocer aspectos como el costo de la resistencia sobre las aptitudes competitivas de las poblaciones resistentes puede ayudar al manejo de la resistencia y el retorno de la susceptibilidad de las poblaciones.

La presente tesis se elaboró con el objetivo de determinar si la resistencia a herbicidas tiene un costo en la aptitud competitiva de *Phalaris minor*. La tesis consta de cuatro estudios: 1) Diversidad genética y evolución de poblaciones de “alpistillo” (*Phalaris minor* Retz.) resistentes a herbicidas inhibidores de la ACCase; 2) Diferencias en biomasa y fecundidad entre colectas de “alpistillo” (*Phalaris minor* Retz.) susceptibles y resistentes a herbicidas inhibidores de la ACCase; 3) Fisiología de semillas de “alpistillo” (*Phalaris minor* Retz.) susceptible y resistentes a herbicidas inhibidores de la ACCase y .4) Competencia por la luz en colectas de “alpistillo” (*Phalaris minor* Retz.) susceptibles y resistentes a inhibidores de la ACCase.

En el primero se evaluó la genética de las poblaciones estudiadas, por medio de la secuenciación de tres fragmentos del cloroplasto. El primer fragmento corresponde a

la región utilizada para la identificación de especies, llamado “código de barras de identificación molecular”. Los fragmentos restantes corresponden al gen que codifica para la síntesis de la enzima ACCasa. Se analiza si la evolución de la resistencia tuvo un origen común en las poblaciones o se trata de una metapoblación. El segundo capítulo evaluó la diferencia en la calidad fisiológica de las semillas susceptibles y resistentes. Se comparó la latencia, velocidad y porcentaje de germinación, longevidad y vigor entre las diferentes colectas. El tercer capítulo hace una revisión del ciclo biológico completo, comparando la fenología, acumulación y distribución de biomasa, fecundidad y aptitud relativa entre las colectas. Finalmente, en el cuarto capítulo se realizaron experimentos de competencia en series de reemplazo para definir si las diferencias encontradas en la aptitud son determinantes en la sobrevivencia de los individuos resistentes.

LITERATURA CITADA

Bergelson, J. and Purrington, C. B. 1996. Surveying patterns in the cost of resistance in plants. *The American Naturalist* 148: 536-558.

Coustau, C.; Chevillon, C. and Ffrench-Constant, R. 2000. Resistance to xenobiotics and parasites: can we count the cost? *Trends in Ecology and Evolution* 15, 378-383.

Heap I. M. 2012. International survey of herbicide-resistant weeds. <http://www.weedscience.org.>, Accessed 10 february 2012.

Menalled, F. D. and Dyer, W. E. 2006. Herbicide-Resistant Weeds. Chapter in Weed Management Handbook 2006-07. Montana, Utah Wyoming. Editors: Dewey, S., Enole,

S., Menalled, F., Miller, S., Whitsides, R and Johnson, L.

Neve, P. and Powles, S. 2005a. High survival frequencies at low herbicide use rates in populations of *Lolium rigidum* result in rapid evolution of herbicide resistance. ***Heredity*** 95, 485-492.

Neve, P. and Powles, S. 2005b. Recurrent selection with reduced herbicide rates result in the rapid evolution of herbicide resistance in *Lolium rigidum*. ***Theoretical and Applied Genetics*** 110, 1154-11.

Palumbi, S. R. 2001. Humans as the World's Greatest Evolutionary Force. ***Science*** 293:1786-1790.

Tharayil-Santhakumar, N. 2003. Mechanism of herbicide resistance in weeds. University of Massachusetts, Amherst, MA 39 p.

Thomas, J. M.; Stephen, W. and Floyd, M. A. 2002. Weed Science - Principles and Practices, 4th Edition. John Wiley & Sons 672 pp.

Villaseñor R., J. L. y Espinosa G., F. J. 1998. Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México, Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario y Fondo de Cultura Económica, México, D.F.

Yu, Q.; Cairns, A. and Powles, S. B. 2007. Glyphosate, paraquat and ACCase multiple herbicide resistance in a *Lolium rigidum* biotype. ***Planta***, 225, 499-513.

CAPÍTULO 1
REVISIÓN DE LITERATURA

Las malezas en la agricultura

Las malezas son plantas que tienen una gran adaptabilidad a los ambientes en los que prosperan. Aunque no es posible ubicarlas dentro de una categoría taxonómica o delimitarlas dentro de una familia botánica, prácticamente cualquier planta puede convertirse en una maleza en las condiciones adecuadas para su crecimiento y reproducción (Baker, 1974, 1991).

Existen diferentes definiciones de acuerdo al sitio donde se desarrollan. Se han definido como malezas a aquellas que crecen en sitios perturbados, vías de comunicación, construcciones y campos de cultivo (Vibrans, 2011). Sin embargo, para las formas de vida descritas anteriormente se han propuesto los términos más adecuados como viarias, ruderales y arvenses (Font Quer, 2001).

Bajo un punto de vista agrícola una maleza es definida como “aquella planta que crece en un sitio en donde no es deseada” (Thomas *et al.*, 2002), aunque para esto debe de cumplir con ciertas características como: facilidad para germinar en diferentes ambientes, germinación discontinua en el tiempo, elevada longevidad de la semilla, rápido crecimiento durante la etapa vegetativa, autocompatible pero no completamente apomíctica, alta fecundidad en diferentes ambientes y una alta variabilidad genética (Baker, 1974, 1991).

El problema del control de la maleza es casi tan antiguo como la agricultura. Las prácticas agronómicas o también llamadas labores culturales, que incluyen acciones como: roturación del suelo, fertilización y riego para la siembra monoespecífica de un cultivo, de igual manera favorecen el crecimiento de plantas adaptadas a la

colonización de ambientes perturbados. Así como el hombre ha domesticado los cultivos, las malezas han evolucionado para adaptarse a los campos de cultivo. Las malezas han sido seleccionadas por muchas prácticas culturales las cuales originalmente fueron diseñadas para eliminarlas (Harper, 1956; Neve, 2007). Por lo anterior, se puede considerar a la relación cultivo-maleza con un proceso de evolución en acción (Neve *et al.*, 2009, Powles y Yu, 2010).

El control de la maleza siempre ha sido considerado como un problema exclusivamente agronómico, limitando la comunicación entre agrónomos, ecólogos y biólogos evolutivos (Baucom y Holt, 2009). Por lo tanto la introducción de pensamiento evolutivo es necesaria en el manejo de las malezas, debido a que tiene dos grandes componentes: la gran variabilidad genética y la presión de selección a las que son sometidas. La aplicación de conceptos de ecología evolutiva en el manejo de las malezas es una aplicación práctica de la perspectiva evolutiva (Neve, 2007; Neve *et al.*, 2009).

Evolución de la resistencia a herbicidas en malezas

En la agricultura de subsistencia el control de la maleza se realiza de forma manual. Actualmente la agricultura tecnificada requiere de métodos eficaces para su control. Los herbicidas son sustancias químicas que están diseñadas para interrumpir una parte del metabolismo y causar la muerte de la planta (Tharayil-Santhakumar, 2003). Éstos ejercen una presión de selección extrema (99.9%) sobre las poblaciones de malezas. Los herbicidas se dividen en grupos dependiendo su modo de acción, entre los principales están los inhibidores de: la síntesis de lípidos (ACCasa), de la fotosíntesis

en el fotosistema I y II, de la formación de aminoácidos aromáticos (glifosato) y ramificados, de la mitosis y división celular, de la formación de pigmentos fotosintéticos, y de la síntesis de pared celular, entre otros (Thomas *et al.*, 2002).

No obstante, después de un uso repetido de herbicidas con el mismo modo de acción, se observan individuos que resisten las mismas dosis que anteriormente causaban la muerte. Esto puede ser el resultado de dos procesos: la tolerancia y la resistencia.

La tolerancia es la capacidad innata de una especie de sobrevivir a una dosis de herbicida, la cual no se considera como resultado de un proceso de selección y por lo tanto no es del tipo evolutivo. En el caso de la resistencia, es definida como la aptitud heredada de una especie para sobrevivir a la exposición de una dosis de herbicida, la cual es normalmente letal en los tipos silvestres. La resistencia puede presentarse por diferentes mecanismos como la exclusión (basadas principalmente en el metabolismo) o cambios en el sitio de acción (cambio por mutación en las secuencias de ADN) (Yu *et al.*, 2007).

En la exclusión pueden presentarse características como problemas en la penetración diferencial del herbicida por la sobreproducción de ceras, tricomas, reducción del área foliar, etc. Asimismo, la absorción diferencial del herbicida, en la cual el ingrediente activo no es traslocado a todo el organismo, limitando las partes afectadas y la compartimentación en la que el herbicida es secuestrado en las vacuolas o metabolizado para formar parte de cuerpos lipídicos. Finalmente la detoxificación metabólica en la cual la planta oxida, reduce, hidroliza o conjuga el herbicida haciendo biológicamente inactivo (Tharayil-Santhakumar, 2003).

La resistencia basada en cambios en el sitio de acción se presenta por mutaciones no

sinónimas en los genes responsables de la síntesis de la enzima blanco. Este cambio causa una modificación en la estructura terciaria o cuaternaria de la enzima y el herbicida ya no puede unirse al sustrato (Powles y Yu, 2010). Se han reportado casos en los que un mismo biotipo de *Lolium rigidum* ha desarrollado resistencia múltiple a tres diferentes tipos de herbicidas por procesos de selección (glifosato, paraquat y ACCasa) (Yu *et al.*, 2007).

Este cambio ocasiona que los individuos que presentan la mutación sobrevivan a la aplicación del herbicida, seleccionando positivamente a los individuos resistentes (R) sobre los individuos susceptibles (S) cambiando la frecuencia en la población de ser un 99.9% susceptible a 99.9% resistente en el curso de unos cuantos ciclos agrícolas (Figura 1).

Aplicación del mismo herbicida durante varios años

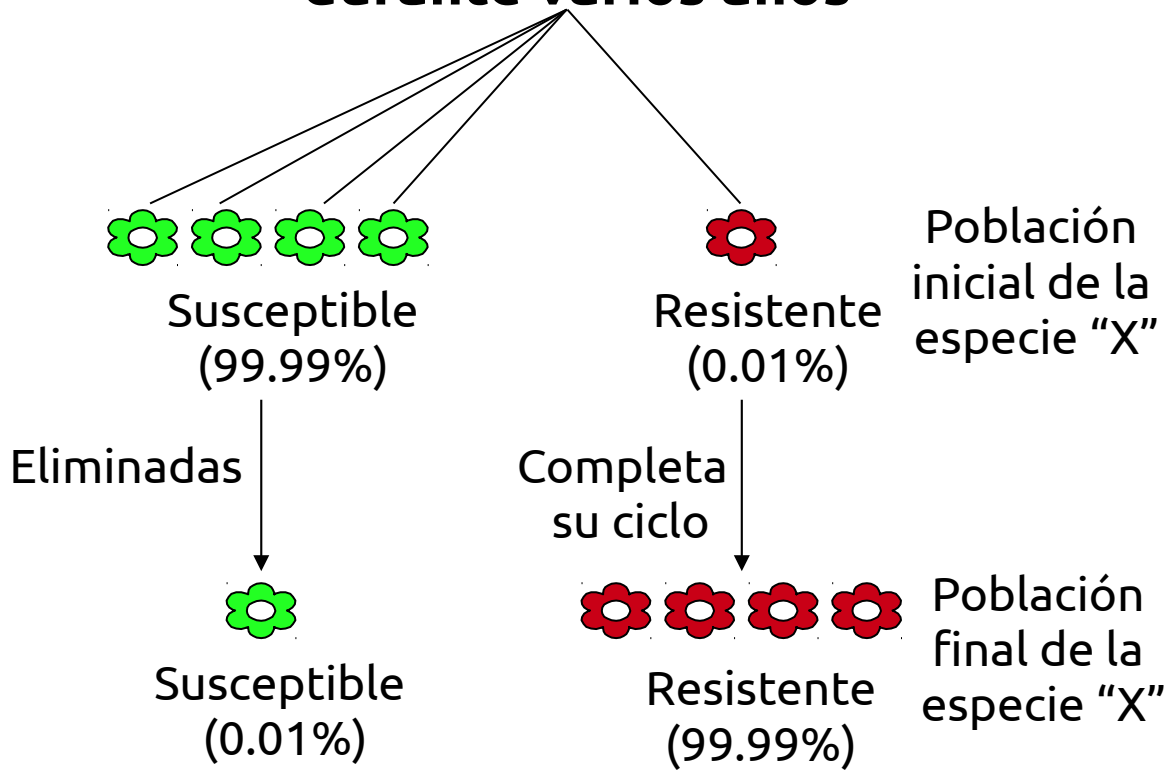


Figura 1. Esquema de la selección ejercida por los herbicidas y el cambio en la proporción de individuos susceptibles y resistentes en las poblaciones de maleza (Tomado de Tharayil-Santhakumar, 2003).

Aunque la efectividad tan alta de los herbicidas (99.9%) se ha relacionado con la elevada probabilidad de seleccionar hacia la resistencia (Figura 2), reportes de Australia indican que aun con dosis bajas (10% de la dosis letal media), se obtienen niveles de resistencia de hasta 55 veces en un lapso de tres ciclos (Neve y Powles; 2005a, 2005b). Sin embargo, aun no se han podido determinar las bases genéticas de lo que se ha llamado “evolución reptante” (Cuadro 1).

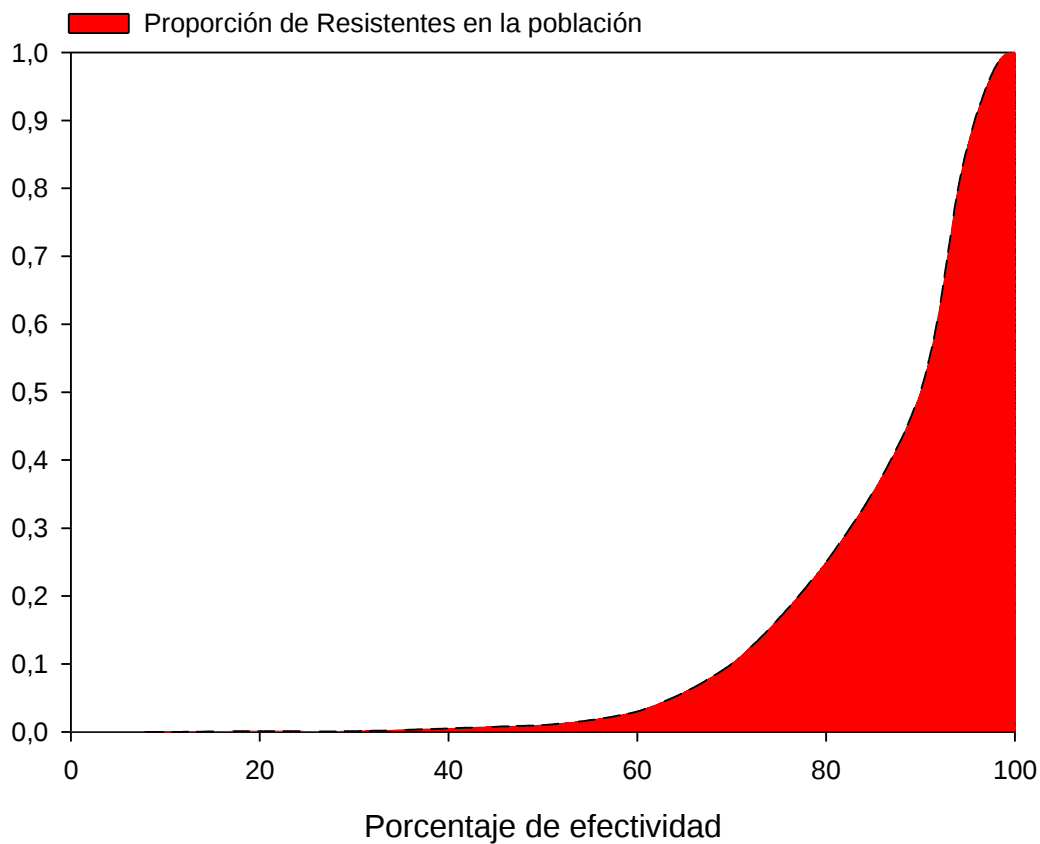


Figura 2. Efecto del porcentaje de efectividad del herbicida en la probabilidad de selección de individuos resistentes (Tomado de Maxwell *et al.*, 1990).

Cuadro 1. Valores de dosis letal media (DL₅₀) para el biotipo de *Lolium rigidum* VLR1 y líneas seleccionada con bajas dosis de diclonafof (Tomado de Neve y Powles; 2005a).

Línea	DL ₅₀	IR (R:S)
VLR1	1.79	
VLR1 (0.1, 0.2)	2.66	7.4
VLR1 (0.1, 0.2, 0.5)	2.86	11.8
VLR1 (0.1, 0.2, 1.0)	3.54	55.8
VLR1 (0.1, 0.5)	2.83	10.9
VLR1 (0.1, 0.5, 2.0)	3.39	40.1

Resistencia a herbicidas inhibidores de la ACCasa

Los lípidos son ácidos grasos esenciales para mantener la integridad de las membranas celulares y el crecimiento de las plantas. Los inhibidores de la síntesis de lípidos incluyen a las familias químicas: ariloxifenoxipropionatos y ciclohexanodiones (Devine *et al.*, 1993). El modo de acción de estos herbicidas es la inhibición de la enzima Acetil Coenzima-A carboxilasa (ACCasa) en la síntesis de lípidos (Walker *et al.*, 1989) (Figura 3). Estos herbicidas actúan sólo sobre gramíneas y sus síntomas se observan en el tejido meristemático, el cual se necrosa y desprende con facilidad en unas dos semanas después de la aplicación. Se utilizan para el control de gramíneas en cereales, al existir pequeñas diferencias en la ACCasa del trigo que le otorga selectividad a estos herbicidas (Vencill, 2002).

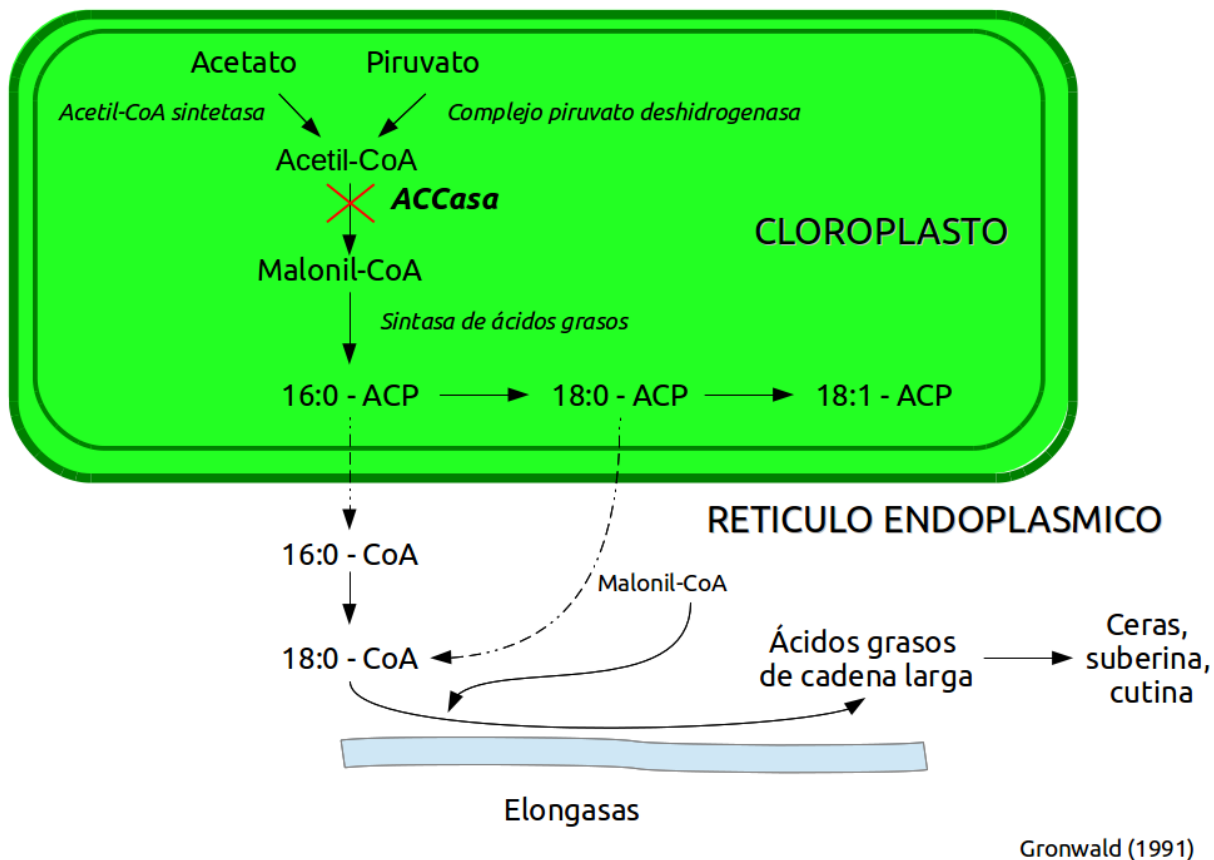


Figura 3. Modo de acción de los herbicidas inhibidores de la Acetil Coenzima-A carboxilasa.

El primer reporte de resistencia a estos herbicidas ocurrió en Australia, para la especie *Lolium rigidum* después de cuatro años consecutivos de selección. Actualmente se han reportado 42 especies que presentan resistencia a los inhibidores de la ACCasa distribuidos en todo el mundo (Heap, 2012) (Figura 4)

Distribution of ACCase Resistant Species

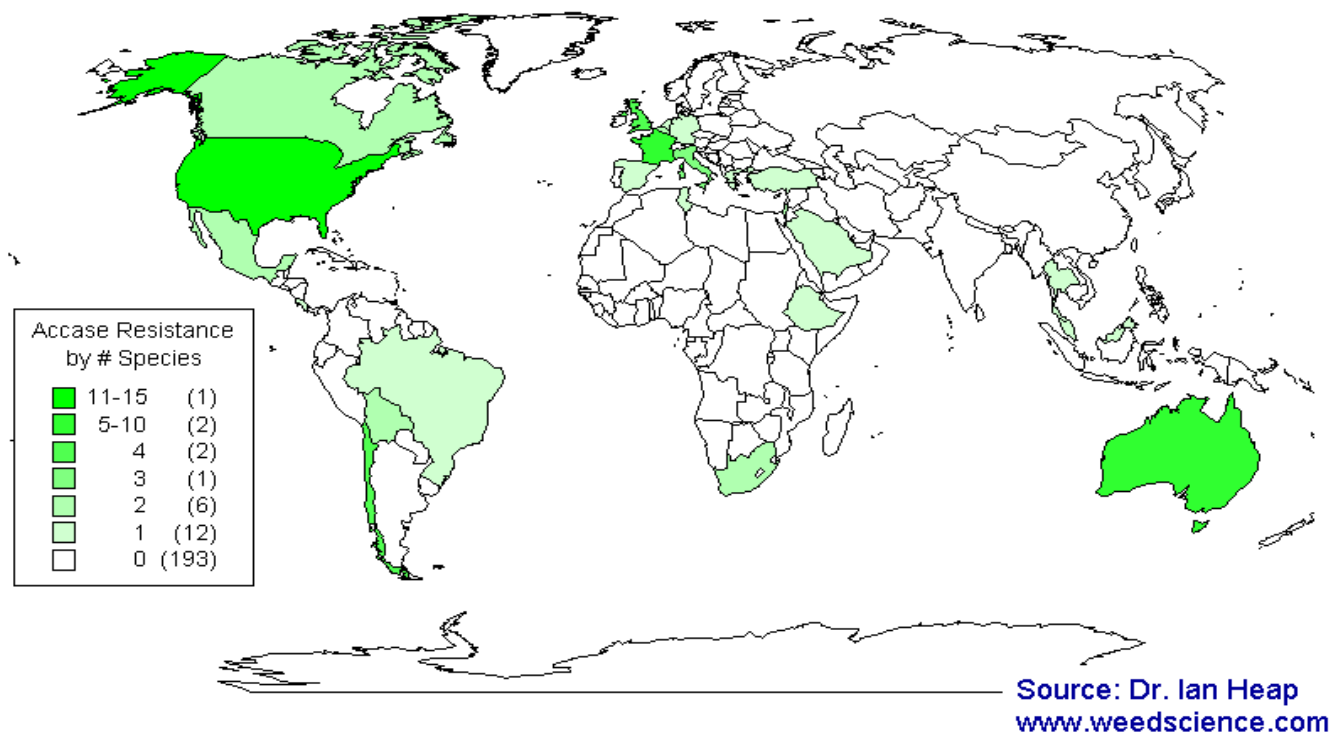


Figura 4. Distribución de las especies resistentes a herbicidas inhibidores de la Acetil Coenzima-A carboxilasa.

Costo de la resistencia en la aptitud competitiva

En 1968 se documentó la primera especie con resistencia a herbicidas, este fue el caso de *Senecio vulgaris* resistente a atrazinas (inhibidor de la fotosíntesis en el fotosistema II). Posteriormente el número de reportes se incrementó rápidamente hasta llegar actualmente a 368 biotipos resistentes, pertenecientes a 200 especies (115 dicotiledóneas y 85 monocotiledóneas) en cerca de 570 000 campos de cultivo en el mundo (Heap, 2012). Sin embargo, el número de casos de resistencia de las malezas es superado por la resistencia de insectos, ácaros, hongos y bacterias a los distintos xenobióticos (insecticidas, fungicidas y antibióticos).

La baja proporción que tienen las malezas es debida a que presentan generaciones más longevas y menor número por año (anuales en el mejor de los casos), a la incompleta presión de selección de los herbicidas (individuos que germinan después de la aplicación del herbicida) y un banco de semillas dominando principalmente por individuos S, principalmente.

La mayoría de estudios sobre la resistencia a herbicidas se ha centrado únicamente en la caracterización (curvas dosis-respuesta) y no en un entendimiento más profundo del fenómeno (Neve, 2007). En términos evolutivos, la tolerancia hacia ciertos factores como la herbivoría y los patógenos causan una reducción en las aptitudes competitivas de las plantas (*fitness*) (Bergelson y Purrington, 1996). Esto es debido a que la planta gasta una cantidad importante de asimilados en los sistemas de protección (metabolitos secundarios, área foliar, entre otros) restando materia seca al crecimiento y reproducción (Rosenthal y Dirzo, 1997).

El primer estudio publicado acerca de las diferencias en el *fitness* entre biotipos S y R,

fue realizado por Conrad y Radosevich (1979). Ellos, compararon la competencia entre biotipos de *Amaranthus retroflexus* y *Senecio vulgaris* S y R a atrazinas bajo un esquema de series de reemplazo de De Witt. Los resultados mostraron que los biotipos R acumulaban una menor cantidad de biomasa y que la asignación de materia seca se reducía hacia la formación de órganos reproductores y semillas.

El costo de la resistencia causado por las atrazinas fue ampliamente documentado en otros estudios (Warwick, 1991). Por tal motivo, el estudio de las diferencias en el *fitness* se dejó de lado por varios años, dando prioridad a nuevos estudios en los que se reportaban la aparición de nuevos biotipos resistentes a diferentes herbicidas (Neve, 2007).

En 1990, Maxwell *et al.* publican un estudio en el cual se propone un modelo para predecir la evolución y la dinámica de las poblaciones S y R, en el cual se involucran diferentes factores como las diferencias en el *fitness* en diferentes etapas del ciclo biológico como supervivencia (demografía de semillas, plántulas y plantas adultas) fecundidad (producción de polen y semillas) y competencia (Figura 5).

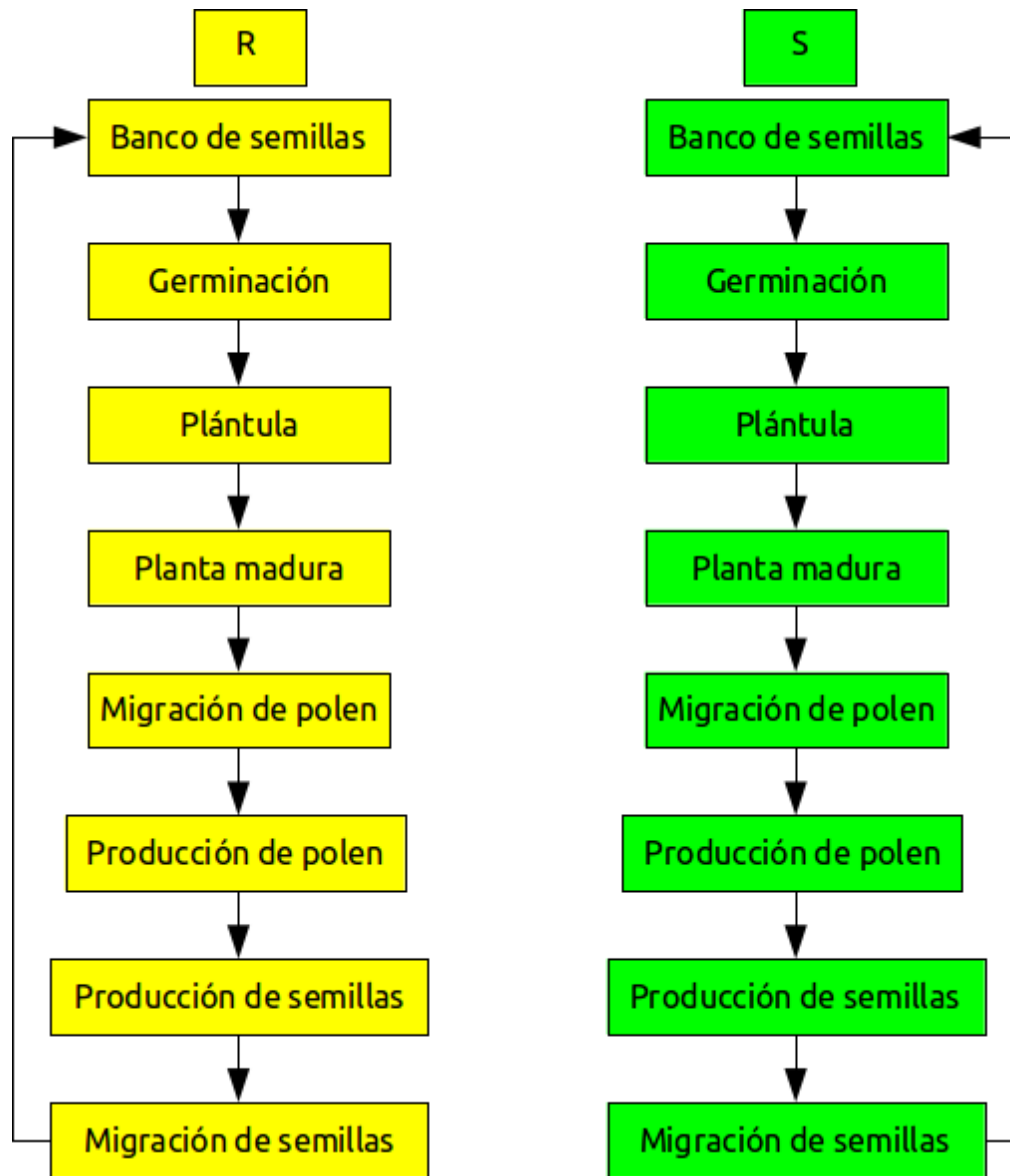


Figura 5. Comparación en la diferentes etapas del ciclo biológico para determinar las diferencias en la aptitud entre individuos susceptibles y resistentes (Tomado de Maxwell *et al.*, 1990).

El modelo predice una evolución rápida por la continua aplicación del mismo herbicida. Posterior a la suspensión del uso del herbicida, el modelo predice una declinación en la proporción de individuos R regresando a una población dominada por los S. Sin embargo, el modelo supone que existe una reducción del *fitness* de los individuos R (Figura 6).

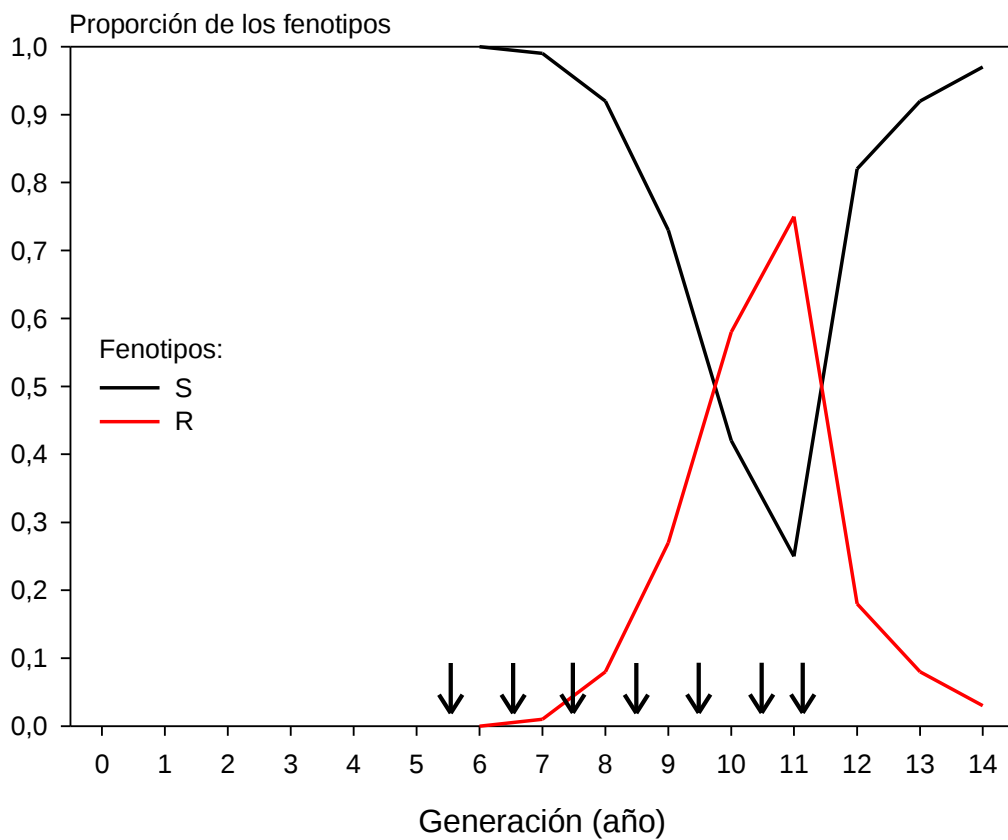


Figura 6. Dinámica de las poblaciones susceptibles y resistentes en presencia y ausencia de herbicidas (Tomado de Maxwell *et al.*, 1990).

A partir de ese estudio, nuevamente surgió el interés de caracterizar la biología de los biotipos R, para generar alguna tendencia acerca de cómo sería el futuro de las poblaciones R cuando el factor de selección (herbicida) es retirado. Bergelson y Purrington (1996) realizan probablemente la mejor recopilación acerca de los trabajos que evalúan el costo de la resistencia en plantas (patógenos, herbicidas y herbívoros). Esta recopilación estuvo basada en tres criterios: 1) los estudios deberían de tener el factor de selección ausente (patógenos, herbicidas, herbívoros), 2) el *fitness* debería de haber sido medido y 3) el control del fondo genético era indispensable para minimizar las diferencias (Cuadro 2).

Cuadro 2. Costo de la resistencia a herbicidas, patógenos y herbivoría en la biomasa y fecundidad de las plantas (malezas y cultivos) (Tomado de Bergelson y Purrington, 1996).

	<i>Fitness</i> de biotipos resistentes como un porcentaje del susceptible	
Tipo de resistencia	Biomasa	Fecundidad
<i>Herbicidas</i>	92.97	85.94
Patógenos	95.49	96.44
Herbivoría	125.9	121.83
Tipo de planta		
<i>Maleza</i>	107.61	91.89
Cultivos	95.97	93.27

Observaron que la resistencia a herbicidas tiene un costo mayor en la biomasa y fecundidad (10 y 15% respectivamente). Cabe aclarar que en la lista de trabajos seleccionados por Bergelson y Purrington, principalmente estaban incluidos compuestos por biotipos resistentes a atrazinas, de las cuales ya se conocía su costo

sobre el *fitness*.

En el estudio de las diferencias entre individuos S y R, es necesario considerar el modo de acción del herbicida al cual es resistente, ya que en algunos casos las diferencias son observadas en ciertas etapas. Por ejemplo, en biotipos de especies resistentes a los inhibidores de la síntesis de aminoácidos ramificados, se observan pocas diferencias en el ciclo biológico. En *Bromus tectorum*, no se observan diferencias estadísticas en el crecimiento (área foliar, materia seca y peso de semillas) en condiciones libres de competencia. Tampoco es posible encontrar diferencias en el área foliar, materia seca y altura cuando los biotipos se encuentran en competencia (series de reemplazo de Witt a 0:100, 25:75, 50:50, 75:25, 100:0) durante 60 d. Los únicos atributos que cambian por causa de la resistencia son: la germinación de los R es más rápida respecto a los S. Además de un costo en la fecundidad (número de semillas), el S produce hasta un 17% más que los R (Woong *et al.*, 2004)

Alcocer-Ruthling *et al.* (1992) no encontraron diferencias en la longevidad de las semillas ni diferencias en la fenología, producción de semillas (número y peso de semillas por planta) en biotipos de *Lactuca serriola*. Sin embargo, al igual que en el caso anterior la germinación de las R fue más rápida que las S. Igual comportamiento en la germinación de *Kochia scoparia* a temperatura de 8 °C encontraron Thompson *et al.* (1994).

Al igual de lo que ocurre en los inhibidores de la síntesis de aminoácidos ramificados, en los inhibidores de la fotosíntesis como las atrazinas las semillas no muestran costos. En *Solanum nigrum*, las semillas del biotipo resistente germinaron más rápido que las S. Además, presentaron un intervalo de temperaturas más amplio para la germinación

(Kremer y Lotz 1998).

En el caso de los inhibidores de la síntesis de lípidos (ACCasa), este herbicida es utilizado para controlar a las gramíneas. Para la mayoría de biotipos resistentes se han reportado controversias en cuanto a los costos. Los primeros estudios en inhibidores de la ACCasa, bajo sistemas de competencia o series de reemplazo, para las especies de *Digitaria sanguinalis* y *Setaria faberi* no mostraron costos en la producción de biomasa ni en la fecundidad (Wiederholt y Stoltenberg; 1996a, 1996b). Esta idea llevó a generalizar que para esta resistencia no existían costos asociados a la resistencia.

Años más tarde, con un enfoque más detallado en las semillas de *Lolium sp.* se observaron costos importantes en la longevidad medida a través de pruebas de envejecimiento acelerado (Gundel *et al.*, 2008) y el vigor para emerger del suelo (Vila-Aiub *et al.*, 2005a). Así mismo, en estudios que han abarcado el ciclo biológico completo, el costo en la biomasa y las tasas de crecimiento relativo y asimilación neta son evidentes (Vila-Aiub *et al.*, 2005b).

En años recientes, se han cuestionado a los estudios que cuantifican los costos en la aptitud competitiva por causa de la resistencia (Neve 2007, Neve *et al.*, 2009). Las principales críticas que se realizan a este tipo de estudios es la falta de un mismo fondo genético de las poblaciones estudiadas. Además de cuestionar que las diferencias encontradas entre poblaciones resistentes y susceptibles pueden deberse a diferentes presiones de selección como el escape a la aplicación de herbicidas (Mortimer, 1997; Owen *et al.*, 2011).

Genética de las poblaciones

Una parte importante que se debe de considerar es la genética de las poblaciones de maleza al momento de evolucionar a la resistencia. La mayoría de las especies de maleza son especies exóticas, las cuales durante la colonización inicial de un campo de cultivo tiene lugar mediante pocos individuos, resultando un efecto fundador.

La intensa presión de selección que ejerce el control químico, selecciona pocos individuos que llevan a las poblaciones a un cuello de botella que reduce la variabilidad genética de la población. Se han realizado diferentes metodologías para evaluar la genética de las poblaciones resistentes. Con la reciente generalización de estudios moleculares, estos han cobrado gran importancia en la evaluación de la diversidad genética de las poblaciones. El uso de marcadores moleculares como RAPDs, ISSRs, RFLPs, AFLPs y secuenciación se han utilizado en los últimos 10 años.

Uno de los primeros trabajos en tratar de establecer la genética de las poblaciones R fue realizado por Warwick y Black (1986) trazando el patrón electroforético de 9 isoenzimas en plantas de *Amaranthus retroflexus* resistentes a triazinas. Dicho autor encontró una reducción en la variabilidad de las poblaciones R respecto a las S.

En India las poblaciones de *Phalaris minor* fueron introducidas accidentalmente por sacos de trigo contaminados provenientes de México. McRoberts *et al.*, (2005) al realizar una comparación basada en secuencias simples repetidas (ISSRs) observaron que existen niveles de variación bajos aun entre poblaciones geográficamente distantes (500 km).

Entre las técnicas más comunes para evaluar la genética de las poblaciones es la secuenciación del gen involucrado en la resistencia. Esto es para identificar la posición

de las mutaciones (Délye *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2007). Así esta herramienta molecular ha servido como un sistema rápido de detección de resistencia, ya que por los métodos tradicionales la resistencia puede ser determinada en un lapso de 30 d (Délye, 2002).

Además de su utilidad para encontrar la posición de las mutaciones, la secuenciación ha servido como herramienta para rastrear el origen de los organismos resistentes y poder determinar si evolucionaron de manera independiente o tienen un mismo origen. Menchari *et al.*, (2006), utilizando la secuenciación del gen de la ACCasa determinaron que en Francia, la propagación de individuos resistentes de *Alopecurus myosuroides*, ocurrió en un solo sitio y que a través de las prácticas agrícolas se ha dispersado por las regiones del norte de Francia.

En general se puede observar que la resistencia a herbicidas es un proceso de evolución extremadamente rápido. Éste puede servir como modelo de estudio para probar las teorías de costo de la resistencia, ya que el factor de selección (herbicida) es de origen antropógeno y puede ser manejado (introducido o retirado) fácilmente. En un futuro, las prácticas de manejo agrícola deberán incluir conceptos de fisiología, ecología y genética de poblaciones y biología evolutiva para el control adecuado de la maleza.

Phalaris minor

Phalaris minor es una planta anual perteneciente a la familia Poaceae, es originaria del Mediterráneo y Asia occidental, pero ha sido dispersada a través de las regiones templadas de Asia, África, Oceanía y América (Figura 7).



Figura 7. Distribución mundial de *Phalaris minor*.

En México, *Phalaris minor* también es conocido por su nombre común como alpiste silvestre, pasto romano, alfarín o alpastillo (Little Seed Canary Grass, en inglés). Esta especie es considerada como una maleza muy agresiva en los campos de trigo del norte del país y en la región del Bajío. Sin embargo, también se reporta en cultivos de ajonjolí, alfalfa, algodón, avena, cártamo, espárrago, frijol, garbanzo, maíz, sorgo, soya, tomate, uva y vainilla (Villaseñor y Espinosa, 1998).

La distribución conocida en México abarca a los estados de Baja California Norte, Baja California Sur, Chihuahua, Distrito Federal, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Sinaloa, Sonora y Tlaxcala (Villaseñor y Espinosa, 1998) (Figura 8).

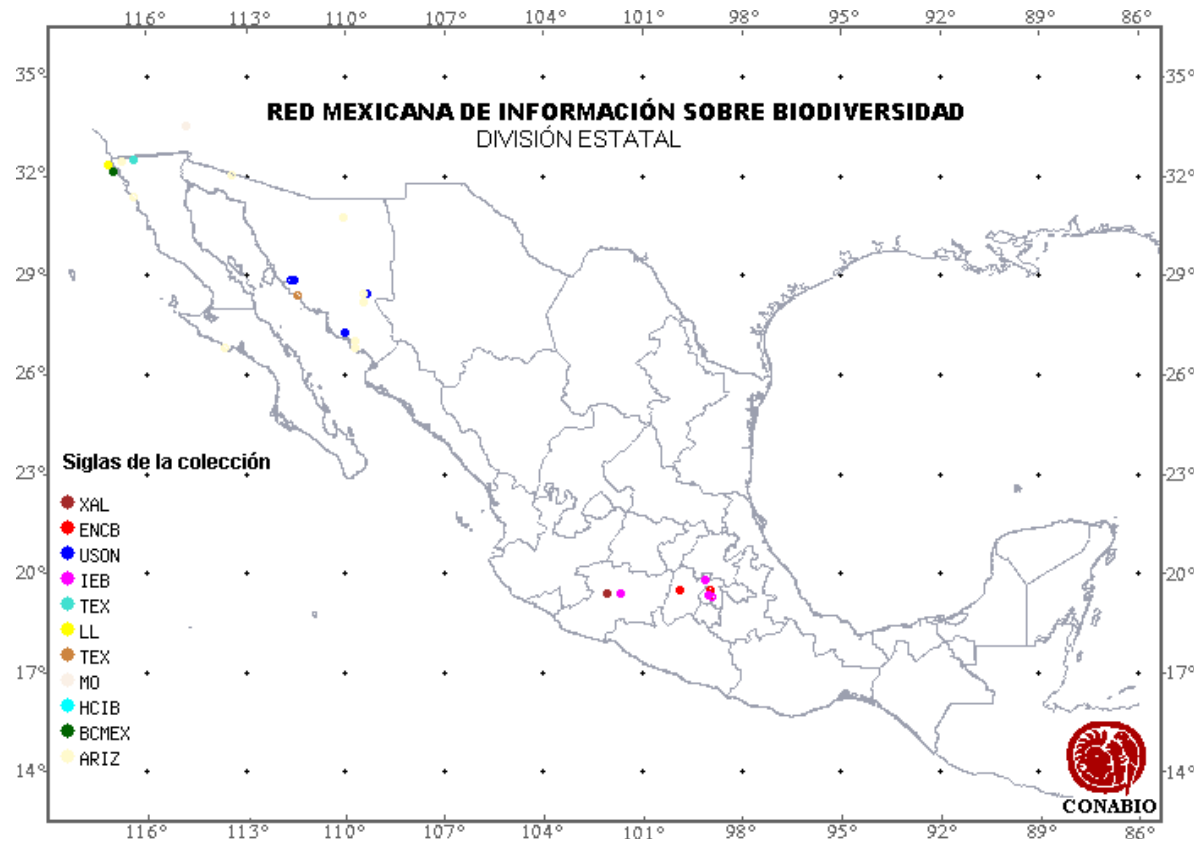


Figura 8. Distribución de *Phalaris minor* en México. Tomado de CONABIO 2012

Resistencia a Herbicidas

La sociedad de ciencia de la Maleza de América (Weed Science Society of America) en 1991 reporta el primer caso de resistencia a herbicidas en India, específicamente de ureas y amidas. Actualmente se tienen registros de biotipos resistentes en Estados Unidos, Irán, Israel, México, y Sudáfrica. En la mayoría de casos, la resistencia es a los herbicidas que inhiben la ACCasa. Para los casos de India y Sudáfrica, se ha registrado resistencia múltiple que incluye a los inhibidores de ALS.

A pesar de su amplia distribución a nivel mundial y su difícil manejo en cultivos de trigo, *Phalaris minor* no está considerada dentro de las peores malezas a nivel mundial. Aunado a esto, en México aún se desconocen los mecanismos de resistencia, las implicaciones genéticas y si existe una diferencia en el *fitness* entre los biotipos susceptibles y resistentes.

LITERATURA CITADA

Alcocer-Ruthling, M., Thill, C.D and Shafii, B. 1992 Seed biology of sulfonylurea resistant and susceptible biotypes of prickly lettuce (*Lactuca serriola*). ***Weed Technology***. 6: 858-864.

Baker, H. G. 1974. The evolution of weeds. ***Annual Review. Ecology and Systematics***. 5:1-24.

Baker, H. G. 1991. The Continuing Evolution of Weeds. ***Economic Botany***, 45(4):445-449.

Baucom, R. S. and Holt, J. S. 2009. Weeds of agricultural importance: bridging the gap between evolutionary ecology and crop and weed science. ***New Phytologist*** 184:741-743.

Bergelson, J. and Purrington, C. B. 1996. Surveying patterns in the cost of resistance in plants. ***The American Naturalist*** 148: 536-558.

Conrad, S. G. And Radosevich. 1979. Ecological Fitness of *Senecio vulgaris* and *Amaranthus retroflexus* Biotypes Susceptible or Resistant to Atrazine. ***The Journal of Applied Ecology***, 16 (1):171-177.

Délye, C.; Matějček, A. and Gasquez, J. 2002. PCR-based detection of resistance to acetyl-CoA carboxylase-inhibiting herbicides in black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds) and ryegrass (*Lolium rigidum* Gaud). ***Pest Management Science*** 58, 474–478.

Devine, M. D., S. O. Duke and C. Fedtke. 1993. Physiology of Herbicide Action. Prentice Hall. Englewood Cliffs, NJ. 441 p.

Font Quer, P. 2001. Diccionario de Botánica 2da Ed. Península, España 642 pp.

Gundel, P. E.; Martínez-Ghersa, M. A. and Ghersa, C. M. 2008. Dormancy, germination and ageing of *Lolium multiflorum* seeds following contrasting herbicide selection regimes. ***European Journal of Agronomy***. 28: 606-613.

Harper, J. L. 1956. The evolution of weeds in relation to resistance to herbicides. Proceedings of the 3rd British Weed Control Conference, Nov. 5–8, British Weed Control Council, Farnham, UK. 179–188.

Heap I. M. 2012. International survey of herbicide-resistant weeds. <http://www.weedscience.org>., Accessed 10 february 2012.

Kremer, E. and Lotz, L. 1998. Germination and emergence. characteristics of triazine-susceptible and triazine-resistant biotypes of *Solanum nigrum*. ***Journal of Applied Ecology*** 35, 302–310.

Maxwell, B. D; Roush, M. L. and Radosevich, S. R. 1990. Predicting the evolution and dynamics of herbicide resistance in weed populations. ***Weed Technology*** 4:2-13.

McRoberts, N.; Sinclair, W.; McPherson, A.; Franke, A. C.; Saharan, R. P.; Malik, R. K.; Singh, S. And Marshall, G. 2005. An assessment of genetic diversity within and between populations of *Phalaris minor* using ISSR markers. ***Weed Research***

45:431–439.

Menchari, Y.; Camilleri, C.; Michel, S.; Brunel, D.; Dessaint, F.; Le Corre, V. and Délye, C. 2006. Weed response to herbicides: regional-scale distribution of herbicide resistance alleles in the grass weed *Alopecurus myosuroides*. ***New Phytologist*** 171:861–874.

Mortimer, A. M. 1997. Phenological adaptation in weeds-an evolutionary response to the use of herbicides?. ***Pest Management Science*** 51: 299–304.

Neve, P. 2007. Challenges for herbicide resistance evolution and management: 50 years after Harper. ***Weed Research*** 47:365-369.

Neve, P. and Powles, S. 2005a. High survival frequencies at low herbicide use rates in populations of *Lolium rigidum* result in rapid evolution of herbicide resistance. ***Heredity*** 95, 485-492.

Neve, P. and Powles, S. 2005b. Recurrent selection with reduced herbicide rates result in the rapid evolution of herbicide resistance in *Lolium rigidum*. ***Theoretical and Applied Genetics*** 110, 1154-11.

Neve, P.; Vila-Aiub, M. and Roux, F. 2009. Evolutionary-thinking in agricultural weed management. ***New Phytologist*** 184:783-793.

Powles, S. B. and Yu, Q. 2010. Evolution in Action: Plants Resistant to Herbicides. ***Annual Review of Plant Biology*** 61: 317-347.

Rosenthal, J. and Dirzo, R. 1997. Effects of life history, domestication and agronomic selection on plant defence against insects: Evidence from maizes and wild relatives. ***Evolutionary Ecology*** 11 (3):337-355.

Tharayil-Santhakumar, N. 2003. Mechanism of herbicide resistance in weeds. University of Massachusetts, Amherst, MA 39 p.

Thomas, J. M.; Stephen, W. and Floyd, M. A. 2002. Weed Science - Principles and Practices, 4th Edition. John Wiley & Sons 672 pp.

Thompson, C. R.; Thill, C. D. and Shafii, B. 1994. Germination characteristics of sulfonylurea-resistant and susceptible Kochia (*Kochia scoparia*). **Weed science** 42:50-56.

Vencill, W. K. ed. 2002. Herbicide Handbook. Eight Edition. Weed Science Society of America. Lawrence, KS. 493 p.

Vibrans, H. (ED.) 2011. Malezas de México, www.conabio.gob.mx/malezasdemexico_ 14 de noviembre de 2011.

Vila-Aiub, M.; Neve, P. and Powles, S. B. 2005a. Resistance cost of a cytochrome P450 herbicide metabolism mechanism but not an ACCase target site mutation in a multiple resistant *Lolium rigidum* population. **New Phytologist**. 167: 787-796.

Vila-Aiub, M.; Neve, P.; Steadman, K. J. and Powles, S. B. 2005b. Ecological fitness of a multiple herbicide-resistant *Lolium rigidum* population: dynamics of seed germination and seedling emergence of resistant and susceptible phenotypes. **Journal of applied. Ecology**. 42: 288-298.

Villaseñor R., J. L. y Espinosa G., F. J. 1998. Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México, Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario y Fondo de Cultura Económica, México, D.F.

Walker, K. A.; Ridley, S. M.; Lewis, T. and Hardwood, J. L. 1989. Action of

aryloxy-phenoxy-carboxylic acids on lipid metabolism. *Reviews of Weed Science* 4:71-84.

Warwick, S. I. 1991. Herbicide resistance in weedy plants: physiology and population biology. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 22, 95–114.

Warwick, S. I. and Black, L. D. 1986. Electrophoretic variation in triazine-resistant and susceptible populations of *Amaranthus retroflexus* L. *New Phytologist*. 104:661-670.

Wiederholt, R. J. and Stoltenberg, D. E. 1996a. Similar Fitness between Large Crabgrass (*Digitaria sanguinalis*) Accessions Resistant or Susceptible to Acetyl-Coenzyme a Carboxylase Inhibitors. *Weed Technology* 10 (1):42-49.

Wiederholt, R. J. and Stoltenberg, D. E. 1996b. Absence of Differential Fitness between Giant Foxtail (*Setaria faberi*) Accessions Resistant and Susceptible to Acetyl-Coenzyme A Carboxylase Inhibitors. *Weed Science* 44 (1):18-24.

Woong P., K; Mallory-Smith, C. A.; Ball, D. A. and Mueller-Warrant, G. W. 2004 Ecological fitness of acetolactate synthase inhibitor-resistant and susceptible downy brome (*Bromus tectorum*) biotypes. *Weed Science* 52(5):768-773.

Yu, Q.; Cairns, A. and Powles, S. B. 2007. Glyphosate, paraquat and ACCase multiple herbicide resistance in a *Lolium rigidum* biotype. *Planta*, 225, 499-513.

Owen, M. J., Michael, P. J.; Renton, M.; Steadman, K. J. and Powles, S. B. 2011. Towards large-scale prediction of *Lolium rigidum* emergence. II. Correlation between dormancy and herbicide resistance levels suggests an impact of cropping systems. *Weed Research* 51, 133–141.

CAPÍTULO 2

DIVERSIDAD GENÉTICA Y EVOLUCIÓN DE LAS POBLACIONES DE ALPISTILLO (*Phalaris minor* Retz.) RESISTENTES A INHIBIDORES DE LA ACCasa EN EL BAJIO

MEXICANO

RESUMEN

El control químico ejerce una presión alta de selección (99.99%) sobre las poblaciones de malezas. Como consecuencia de dicha presión de selección, en pocas generaciones se observan individuos resistentes (R) en las poblaciones de maleza. La resistencia a herbicidas es un proceso evolutivo causado por cambios metabólicos o genéticos. Dentro de estos últimos se ha señalado que un cambio en la composición de nucleótidos de un gen puede causar resistencia en una especie. El manejo de malezas en la región del Bajío, es muy diversa, debido a el minifundio de una o dos hectáreas por agricultor donde emplean prácticas de manejo independientes. Por lo que es posible que aun en parcelas o localidades muy cercanas la evolución de la resistencia sea independiente. *Phalaris minor* (Poaceae) es una maleza que se ha controlado con herbicidas inhibidores de la síntesis de lípidos. Sin embargo, su efectividad se ha visto disminuida, por lo que una posible explicación es que presente cambios en la composición en el sitio de acción de éste herbicida, el cual actúa sobre el gen Acetil Coenzima A Carboxilasa (ACCase). El objetivo de este estudio fue determinar la diversidad genética y evolución del dos genes de cloroplasto, gen ACCase y el gen PsbA del código de barras para plantas de diferentes muestras de la poblaciones *Phalaris minor* Retz. de la Región del Bajío, señaladas como resistentes y susceptibles. El análisis de secuencias nucleotídicas de los dos genes presentó una respuesta diferencial, el gen PsbA de código de barras no presentó variación dentro de las poblaciones que se estudió, lo que demuestra que este gen no está relacionado con el manejo que se les da a estas plantas. Por otro lado el gen ACCase, si presentó polimorfismo dentro y entre poblaciones. Los cambios que se presentan son a nivel de

nucleótidos y de aminoácidos, permitiendo con este último agrupar las muestras por regiones de colecta. Por lo que se puede señalar que este gen es más sensible a los cambios en el manejo que se le da a esta maleza, los resultados se discuten en relación a los cambios en la composición genética, diversidad y distancia genética, flujo génico y manejo de la resistencia en la región del Bajío.

Ecología evolutiva, flujo genético, evolución molecular

INTRODUCCIÓN

Los herbicidas son compuestos químicos diseñados para inhibir procesos fundamentales en el metabolismo de las plantas (Thomas *et al.*, 2002; Vencil, 2002). Como resultado de la aplicación de estos compuestos, las plantas no pueden continuar con las rutas metabólicas y por lo tanto ocurre la muerte del individuo (Devine *et al.*, 1993). Sin embargo, la aplicación continua de herbicidas con el mismo modo de acción ha promovido la selección de plantas que presentan resistencia a estos. La resistencia a herbicidas es un proceso evolutivo que involucra una intensa presión de selección sobre las poblaciones de maleza en los cultivos (Baucom y Holt, 2009).

Las causas por las que un individuo presente resistencia pueden ser por un cambio en el sitio de acción del herbicida o por un ajuste metabólico (Tharayil-Santhakumar, 2003; Yu *et al.*, 2007; Powles y Yu, 2010) . El cambio en el sitio de acción ocurre cuando se presenta una mutación sobre la proteína blanco del herbicida. El cambio en una base en el gen es suficiente para ocasionar la resistencia. En el caso de la resistencia metabólica existe una sobreexpresión de la enzima a la cual el herbicida inhibe,

permitiéndole a la planta sobrevivir (Christoffers, 1999).

Phalaris minor es una planta anual perteneciente a la familia Poaceae, es originaria del Mediterráneo y Asia occidental, que se ha dispersado a través de las regiones templadas de Asia, África, Australia y América. Ésta especie es considerada como una maleza muy agresiva en los campos de trigo (Villaseñor y Espinosa, 1998). En México, la región del Bajío es una zona productora de trigo que ha sido afectada desde hace 15 años por la presencia de biotipos de *Phalaris minor* resistentes a inhibidores de la ACCasa (Tafoya y Morgado, 2000). Por otro lado, alrededor de 500 agricultores han reportado la presencia de resistencia dentro de sus parcelas (Heap, 2012). No obstante, aún no se ha determinado si la causa de la resistencia es debida a una mutación en el sitio de acción o a cambios metabólicos.

La presencia de biotipos de *P. minor* puede estar asociada con el manejo parcelario en esta zona de 1-2 hectáreas por productor, por lo que cada agricultor le da un manejo independiente a su parcela, como tiempo de aplicación, número de aplicaciones, producto a aplicar, además del intercambio de maquinaria y semillas, entrada de animales de pastoreo, que junto con característica de dispersión de las plantas, como la dispersión natural de las semillas y polen, hayan permitido la distribución de los biotipos resistentes (Afentouli y Eleftherohorinos, 1997). Por lo que es posible que aun en parcelas o localidades muy cercanas la evolución de la resistencia sea independiente. Lo cual ha sido señalado por en el caso de *Alopecurus myosuroides* en Europa (Délye et al., 2004; Délye et al., 2010).

La información genética del cloroplasto es heredada por vía materna y se ha mencionado que algunas regiones se han utilizado para la identificación de especies,

(Hollingsworth *et al.*, 2011) entre ellos la región de *psbA* que codifica para la proteína D1 del fotosistema II (Gielly y Taberlet, 1994). En el caso de los animales, su homólogo es el ADN mitocondrial (COI) (Herbert *et al.*, 2003). Por otro lado, el gen ACCasa se ha señalado como la principal causa de resistencia a los herbicidas inhibidores de la síntesis de lípidos, por ser altamente variable (Délye *et al.*, 2005).

El análisis de secuencias de ADN en el gen que ha sido señalado como responsable de la resistencia, podrá ayudar a determinar si estos cambios se asocian a los niveles de susceptibilidad-resistencia de las colectas, así como a la región geográfica, de donde se colectaron, además de detectar si los biotipos resistentes en el Bajío tiene un origen común o si las poblaciones evolucionaron de forma independiente hacia la resistencia. Además, el análisis del gen *psbA* que ha sido utilizado como una región del cloroplasto para la identificación molecular de especies (código de barras) puede ser de ayuda para determinar la variabilidad genética de los genes que no están bajo presión de selección. El objetivo de este estudio fue determinar la diversidad genética y evolución del dos genes de cloroplasto, gen ACCasa y el gen *psbA* del código de barras para plantas de diferentes muestras de la poblaciones *Phalaris minor* Retz. de la Región del Bajío, señaladas como resistentes y susceptibles.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta del material biológico

Las semillas de los biotipos susceptible y resistentes fueron proporcionadas por el Departamento de Parasitología de la UACH y el Centro de Sanidad Vegetal del Estado de Guanajuato (CESAVEG). Las semillas resistentes fueron colectadas en 2007 de

cuatro regiones del Bajío Mexicano, tres en Guanajuato (Col 4, Col 7, Gto) reportadas con resistencia a herbicidas que inhiben la síntesis de la ACCasa con un IR de 12 a clodinafop) (Tafoya y Morgado, 2000; Heap, 2012). Otro biotipo resistente se colectó en La Barca, Jalisco (Jal) (IR de 6.8 a clodinafop). Como susceptible se empleó una colecta proveniente del municipio de Abasolo, Gto una localidad en la que nunca se ha utilizado el control químico (comunicación personal con los productores, 2007).

Extracción de ADN por método de CTAB

Las semillas de las diferentes colectas fueron germinadas y cultivadas hasta la aparición de las hojas, posteriormente se realizó un corte de aproximadamente 100 mg. Las muestras fueron congeladas y trituradas con nitrógeno líquido. Posteriormente, se realizó la extracción de ADN por el método de CTAB (Stewart, y Via, 1993.). Al final, se cuantificó la calidad del ADN extraído en un nanodrop; solamente se utilizaron las muestras que hubieran registrado una calidad entre 1 y 2 (resultado de la lectura 260/280 nm). La amplificación de los genes y electroforesis se realizaron en el laboratorio de biología molecular de uso común de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados Montecillos Edo. Mexico.

Amplificación de los genes por PCR

Para determinar la diversidad genética de las colectas de *P. minor*, se amplificaron tres regiones del cloroplasto. Dos regiones del gen que codifica para la síntesis de la ACCasa, y otro corresponde a la región que codifica del código de barras para la identificación de especies (*psbA*). En el gen ACCasa se ha determinado que las

mutaciones que se presentan en las posiciones 5109 a 5632 y de 5950 a 6355 del gen son las que ocasionan la resistencia en gramíneas (Délye *et al.*, 2005).

Por lo que para el gen de resistencia se utilizaron dos juegos de iniciadores universales propuestos por Délye *et al.* (2005). Éstos amplifican dos regiones de 523 pb y 405 pb del gen de la ACCasa. Los iniciadores del primer fragmento fueron: sentido CAACTCTGGTGCTIGGATIGGCA; y contrasentido GAACATAICTGAGCCACCTIAATATATT. Para el segundo se utilizaron sentido CAGCITGATTCCCAIGAGCGITC, contrasentido CCATGCAITCTTIGAGITCCTCTGA. La mezcla de PCR constó de 5 µL de Buffer ; 3 µL de dNTPs; 1 µL de DNA; 3.5 µL de MgCl; 0.25 µL taq. Flexitaq Promega; 1 µL de cada primer, se aforó con agua hasta los 25 µL. Las condiciones de amplificación fueron: temperatura de desnaturalización de 95 °C por 30 s, seguido de 37 ciclos de 95 °C por 10 s, 60 o 61 °C (dependiendo el fragmento) por 15 s, 72 °C por 45 s, finalmente, una temperatura de 72 °C por 10 min.

Para el diseño de los iniciadores del gen correspondiente al código de barras, se utilizó la secuencia de *P. minor* reportada en el genbank (AY196481.1; Tal y Rubin, 2002). El diseño de los iniciadores se realizó mediante el software Primer3 (Untergasser *et al.*, 2007). Los resultantes fueron: CTACCTTATTGACTGCAACT; TTAGGTTGAAAGCCATAGT. Para la mezcla de PCR se utilizó 5 µL de Buffer; 3 µL de dNTPs; 1 µL de DNA; 3.5 µL de MgCl; 0.25 µL taq (Promega); 1 µL de cada primer, se aforó con agua hasta los 25 µL. La amplificación del gen realizó en un termociclador Biometra modelo Tpersonal con el siguiente programa de 95 °C por 120 s, seguido de 30 ciclos de 95 °C por 60 s, 52 °C por 30 s, 72 °C por 60 s, finalmente, una temperatura de 72 °C por 8 min.

El producto de PCR se corrió en un gel de agarosa al 0.8%, en buffer TBA al 1% a 76 volts por 20min, los resultados se visualizaron en un fotodocumentador. Los resultados positivos de la amplificación se secuenciaron, en la compañía Macrogen en Corea.

Análisis de las secuencias

De cada colecta se obtuvieron secuencias de 5 individuos, excepto para la colecta Jal donde el número fue de cuatro, teniendo un total de 24 secuencias para cada región estudiada. El análisis de las secuencias se realizó en el software MEGA (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) ver. 5 (Tamura *et al.*, 2011). Previo al análisis, se confirmó la calidad de las secuencias y tamaño efectivo de las secuencias que se incluyeron en el alineamiento. Las secuencias se alinearon con el programa Clustal W y se realizó la traslación a aminoácidos con el código genético de cloroplasto. Para cada región amplificada se realizó un análisis independiente. En el caso del gen de la ACCasa, los dos fragmentos fueron unidos indicando el sitio de inicio y término de cada fragmento. Los análisis se realizaron a nivel de nucleótidos y de aminoácidos.

El análisis de la variación genética se realizó dentro y entre las colectas, a nivel de nucleótidos y de aminoácidos. Se realizaron las pruebas de selección, para detectar el posible proceso de selección de las colectas de *P. minor*. basadas en las pruebas de Z (Nei y Gojobori, 1986), y en los cambios en la proporción de mutaciones sinónimas (dS) que no cambian de aminoácido y no sinónimas (dN) las que cambian de aminoácido. Las hipótesis de selección probadas fueron: selección purificadora ($dN < dS$); selección neutral ($dN = dS$); selección positiva ($dN > dS$). Para todas las hipótesis se utilizó el método de Nei-Gojobori con 1000 pseudoréplicas de bootstrap.

Diversidad genética intra e interpoblacional

Se cuantificó la diversidad genética intrapoblacional en base al número de diferencias, los análisis fueron realizados con 1000 pseudoréplicas de bootstrap. Adicionalmente, se calculó el polimorfismo en las poblaciones con la prueba de neutralidad de Tajima (1989), esta prueba mide la diversidad genética de la población (π) y calcula el valor de D . Cuando $D > 0$ sugiere que la población a tenido un cuello de botella o alguna forma de selección reciente, y $D < 0$ sugiere que la población está en expansión o en una selección normalizadora (Tajima, 1989).

Estimación de la divergencia evolutiva entre las poblaciones

Se estimó la divergencia evolutiva (distancia genética) de las poblaciones. Las divergencias se obtuvieron mediante la matriz de distancias, basadas en el número de cambios (Tajima y Nei, 1984). Se utilizaron 1000 pseudoréplicas de bootstrap.

Red de flujo genético entre poblaciones

Para determinar cómo se encuentran las relaciones filogenéticas de los haplotipos presentes en la región y saber si existe flujo genético entre las poblaciones, se construyó una red de haplotipos mediante el software TCSv1.21 (Clement *et al.*, 2000).

Construcción de árbol filogenético

Se construyó un árbol filogenético con las 24 secuencias a nivel de nucleótidos y de aminoácidos por el método de máxima parsimonia con 1000 pseudoréplicas de

bootstrap (Tamura *et al.*, 2011). Como grupos externos se incluyeron dos secuencias una de *Alopecurus myosuroides* resistente a los inhibidores de la ACCasa (AJ632096) una de *P. minor* susceptible proveniente de Israel (AY196480).

RESULTADOS

Diversidad genética intra e interpoblacional

Para el gen correspondiente al código de barras (*psbA*) se obtuvieron 24 secuencias de las cinco colectas, con 750 pb, que corresponden a 250 aminoácidos. Del gen ACCasa, se amplificaron el mismo numero de secuencias, del primer fragmento fueron 441 y el segundo de 311 pb. En el alineamiento del gen *psbA* no se encontraron cambios dentro y entre las colectas. A diferencia de gen *psbA*, el gen ACCasa si presentó polimorfismo, dentro y entre colectas por lo tanto, los resultados del análisis de las secuencias corresponden únicamente al gen ACCasa.

La colecta que presentó la mayor variación intrapoblacional fue la Col 7 con 16 sitios variables. La colecta con menor diversidad intrapoblacional fue Jal con 8 sitios. De los dos fragmentos amplificados, el segundo fue el que presentó la mayor cantidad de sitios variables para todas las colectas. Por lo que se puede señalar que la última región, tiene una tasa de mutación mas alta.

La lectura a aminoácido señala que no todos los cambios encontrados tuvieron un cambio en la estructura de la proteína, en cada colecta se presenta solo un cambio en aminoácidos con respecto al susceptible, sin embargo esta ocurre en diferentes posiciones en cada colecta (Cuadro 1). De igual manera que en el caso de los cambios en nucleótidos, los cambios se presentaron principalmente en la segunda región

amplificada.

La diversidad genética de las colectas no mostró diferencias significativas entre el susceptible y las colectas resistentes. Colectas como Jal y Col 7 presentaron una diversidad a nivel de nucleótidos inferior al susceptible, por el contrario las demás colectas resistentes tienen una mayor diversidad que el susceptible (Cuadro 2). En cuanto a la diversidad en aminoácidos, el susceptible fue el que presentó la menor diversidad. Como se mencionó anteriormente, los cambios en la composición de aminoácidos son los que realmente determinan que una población pueda cambiar de un estado susceptible a uno resistente. La diversidad a nivel de aminoácidos fue similar en todas las colectas resistentes.

Cuadro 1. Polimorfismo del gen ACCasa de colectas de *Phalaris minor*, con diferentes índices de resistencia a herbicidas que inhiben la ACCasa en el Bajío, México.

			nucleótidos	a.a.	nucleótidos	a.a.	sustituciones	%
	No. Sec	Total	R1		R2			
SUS	5	14	5	0	9	0		0
COL 4	5	16	5	0	11	1	213 Thr x Ile	80
COL 7	5	13	3	0	10	1	180 Thr x Ala	60
GTO	5	14	5	1	9	0	101 Phe x Tyr	75
JAL	5	8	3	0	5	1	163 Cys x Trp	60

En el cuadro 2 se presenta el polimorfismo de las colectas de *P. minor*. Se puede observar que en las poblaciones estudiadas, todas las secuencias constituyen haplotipos únicos, a excepción de la coleta Jal en la cual hubo dos secuencias

idénticas. También es posible observar que la colecta Jal fue la que presentó la menor cantidad de sitios variables. Los indicadores π y θ muestran la diversidad de las secuencias, en ambos casos la coleta Jal tuvo los menores valores de diversidad.

Las coletas Col 4 y Gto tienen los valores más altos de diversidad. La prueba de Tajima (D) indica la intensidad de selección a la que está sometida una población. En los casos de las coletas Susceptible, Col 7, y Jal en los que el valor de D fue superior a 0, sugiere que la población pasó por un cuello de botella recientemente, causado probablemente por la selección impuesta por el herbicida. Además de que la prueba de selección de Z resultó significativa para selección direccional en ambas coletas.

Para las coletas Col 4 y Gto en que los valores fueron negativos, la prueba considera que estas poblaciones se encuentran en expansión o están en una selección normalizadora.

Cuadro 2. Prueba de neutralidad de Tajima, de coletas de *P. minor* con diferentes índices de susceptibilidad y resistencia a herbicidas que inhiben la ACCasa en el Bajío, Mex.

	Sec	Hap.	Sitios	S. Var	π	θ	D	selección
Susceptible	5	5	752	14	0.0093	6.72	0.30	
Col 4	5	5	752	16	0.0098	7.4	-0.27	
Col 7	5	5	752	13	0.0088	6.24	0.42	direccional
Gto	4	4	752	14	0.0100	7.64	-0.18	
Jal	5	4	752	8	0.0056	3.84	0.66	direccional
Total	24	24	752	24	0.0099	0.0085	0.58	

Abreviaturas: Hap.= Haplotipos, S var.=sitios variables, π =diversidad de nucleótidos (número de sitios/sitios variables), θ =diversidad genética, D =es el estadístico de la prueba de Tajima.

Estimación de la divergencia evolutiva entre las poblaciones

La divergencia evolutiva o distancia genética a nivel de nucleótidos entre las colectas resistentes con respecto al susceptible mostró que las colectas Col 7 y Jal son las más cercanas. Las colectas más distantes genéticamente fueron Col 4 y Gto (Cuadro 3), al igual que en la prueba de Tajima estas poblaciones se están diferenciando independientemente del resto de sitios. La mayor diferencia entre las poblaciones se encontró entre las poblaciones Jal y Col 4 con 3 cambios, seguida de Gto y Col 4 con 2.9 cambios.

Cuadro 3 Estimación de la divergencia evolutiva entre secuencias de nucleótidos de las poblaciones de *Phalaris minor* susceptible y resistentes a herbicidas que inhiben la síntesis de la ACCasa en el Bajío, México. En base al número de diferencias entre secuencias.

	Susceptible	Col 7	Jal	Gto	Col4
Susceptible		0.45	0.65	0.38	1.22
Col 7 (IR12)	0.04		0.69	0.45	1.26
Jal (IR6.8)	0.28	0.60		0.74	1.11
Gto (IR12)	0.44	0.44	0.76		1.26
Col 4 (IR 12)	1.70	2.40	3.00	2.90	

La parte derecha de la matriz representa el error estándar de la estimación.

La divergencia evolutiva a nivel de aminoácidos mostró la misma relación que a nivel de nucleótidos. Las poblaciones más distantes con respecto al susceptible fueron Gto y Col 4 (Cuadro 4). A diferencia de la matriz de distancia a nivel de nucleótidos, la mayor distancia entre colectas se encontró entre Gto y Col 4 con 1.1 cambios.

Cuadro 4. Estimación de la divergencia evolutiva entre secuencias de aminoácidos de las poblaciones de *Phalaris minor* susceptible y resistentes a herbicidas que inhiben la síntesis de la ACCasa en el Bajío, México. En base al número de diferencias entre secuencias.

	Susceptible	Col7	jal	Gto	
Susceptible		0.28	0.30	0.48	0.58
Col 7	0.30		0.40	0.54	0.66
Jal	0.30	0.60		0.56	0.64
Gto	0.50	0.80	0.80		0.76
Col 4	0.60	0.90	0.90	1.10	

La parte derecha de la matriz representa el error estándar de la estimación.

Red de flujo genético entre poblaciones

La red de flujo genético agrupó a todos los individuos dentro de una población. Excepto un individuo de la colecta de Gto, lo que señala que existe una estrecha relación dentro de mayoría de las colectas, y que los ancestros y descendientes se encuentran dentro de la población. Sin embargo, la red de haplotipos basada en 95% de probabilidad en parsimonia no muestra relación con la ubicación geográfica de las colectas ni con la susceptibilidad o resistencia de los individuos. En la red se puede observar que todas las colectas se encuentran relacionadas en algún grado y que los individuos susceptibles se pueden encontrar dispersos entre los resistentes. Esto se puede deber a efectos de flujo genético entre la población, que aún y cuando en el sitio de colecta no se hallan hecho aplicaciones de herbicidas, el intercambio de maquinaria entre agricultores, así como la lluvia y el viento pueden estar involucrados en estas interacciones. El análisis de TCS señala que el posible origen de la población con el

95% de probabilidad en parsimonia es un individuo de la colecta Susceptible es el origen de la red (Figura 1). Sin embargo debido a que la mayoría de los haplotipos son únicos, sería recomendable incrementar el número de muestras de cada colecta para incrementar el nivel de confianza de esta prueba. Por otro lado, dentro de los individuos de la colecta Gto, existe uno que, no se conecta con la red de haplotipos, por que presenta un mayor numero de mutaciones, por lo que esta colecta esta teniendo presiones de selección y diferenciación diferentes a las colectadas presentes en el Bajío.

Reconstrucción de árbol filogenético

La reconstrucción del árbol filogenético de consenso con base en parsimonia, a nivel de nucleótidos, con un análisis de bootstrap de 1000, en la que se incluyó una secuencia del gen ACCasa susceptible de *Phalaris minor* proveniente de Israel, y otra de *Alopecurus myosuroides* como grupo externo. Señala que la secuencia susceptible estuvo mezclada con el resto de individuos susceptibles.

Es posible observar que se forma un grupo bien definido que separa a las colectas resistentes y el susceptible. Dentro de las colectas resistentes las colectas Gto y Col 4 son más basales y la colecta Jal es la más derivada. No es posible determinar el tiempo de divergencia por medio del reloj molecular que tienen entre las colectas porque no se conoce la tasa de mutación que tiene este gen en esta especie. No obstante, dentro de las colectas resistentes, no todos los individuos están agrupados en la parte resistente.

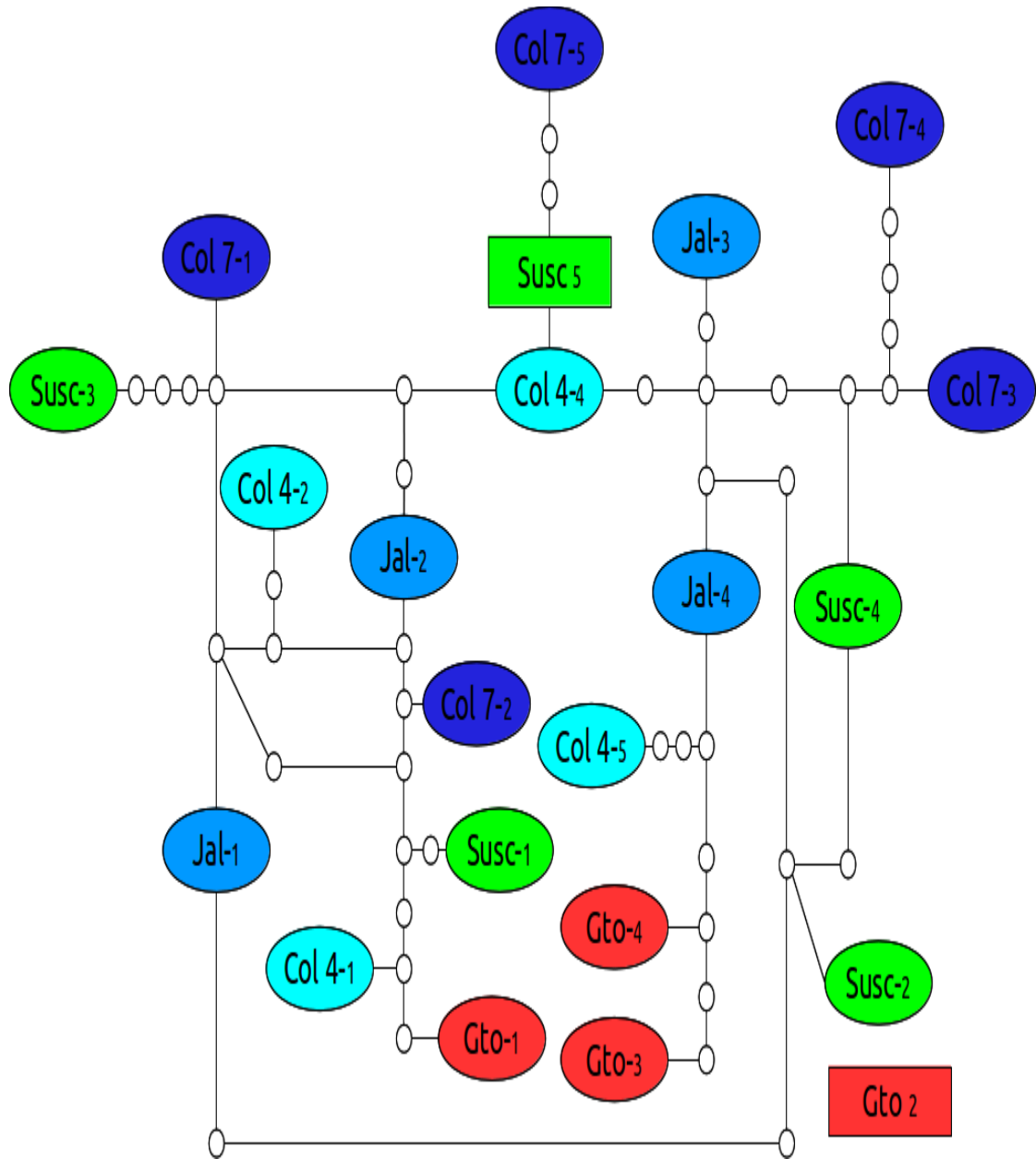


Figura 1. Estimación de la red de flujo genético de las poblaciones de *Phalaris minor* susceptibles y resistentes a herbicidas inhibidores de la ACCasa en el Bajío, México.

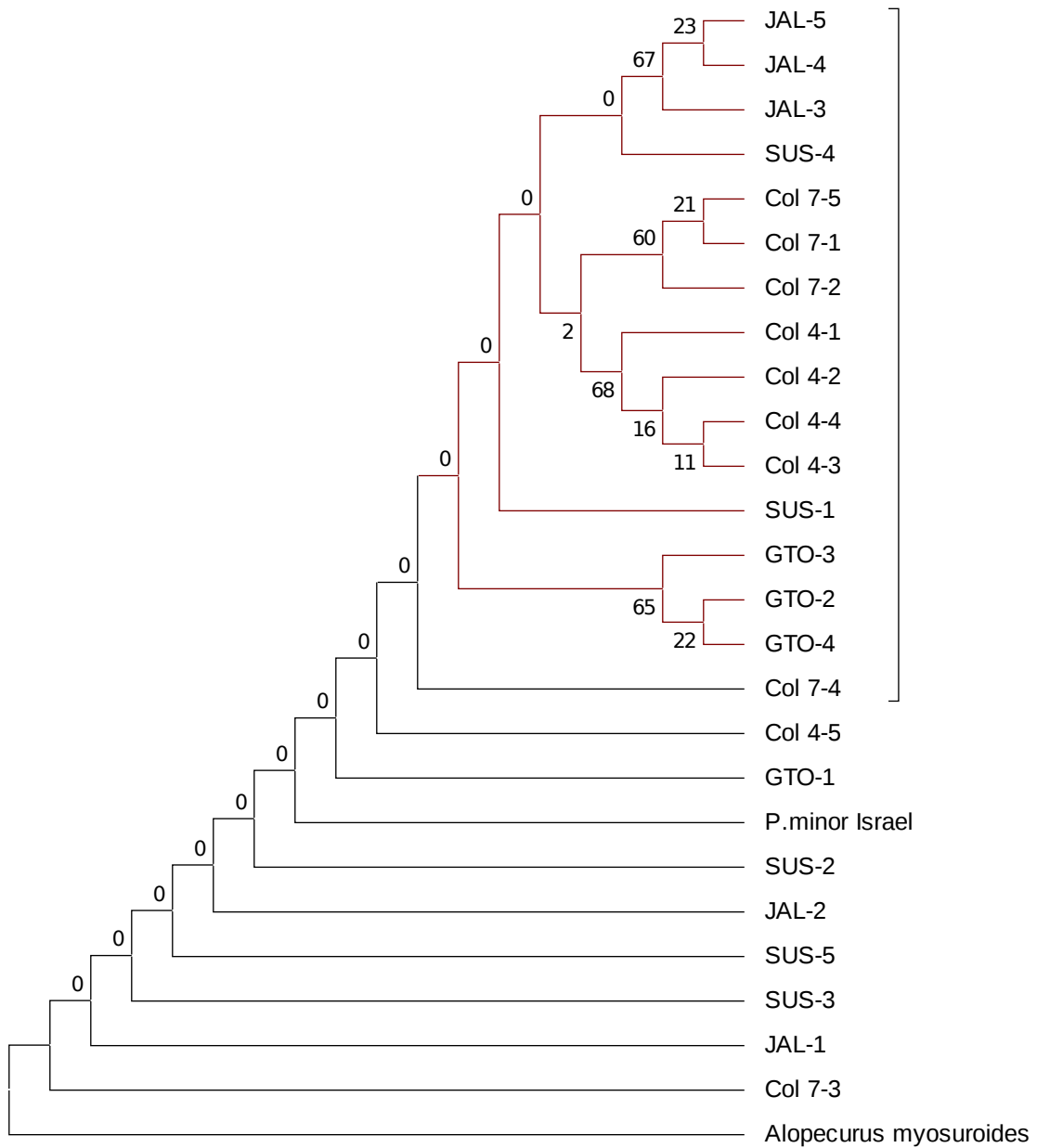


Figura 2. Árbol filogenético de las poblaciones de *Phalaris minor* susceptibles y resistentes a herbicidas inhibidores de la ACCasa, estimado por el método de máxima parsimonia. El análisis estuvo basado en la secuencia de aminoácidos (250 sitios) y con 1000 repeticiones de bootstrap. Se seleccionó el árbol consenso al 50%.

DISCUSIÓN

Se encontró diversidad genética diferencial entre los dos genes del cloroplasto secuenciados. Por una parte no se encontró variabilidad genética en la región del código de barras (PsbA) de *P. minor*, lo que sugiere que este gen no está involucrado en factores de manejo y adaptación a diferentes micro ambientes. Por otro lado, el gen que codifica para la síntesis de la ACCasa se encontraron niveles de variación elevados. De las mutaciones encontradas, ocho de ellas se presentaron en el primer fragmento y 16 en el segundo. Délye *et al.*, (2005) quienes desarrollaron los iniciadores utilizados, mencionan que el segundo fragmento utilizado es el que presenta una probabilidad mayor de encontrar mutaciones que causen la resistencia.

Estos resultados es una evidencia que estos dos genes presentes en el cloroplasto tienen diferentes tasas de mutación asociada a su función en el organismo y en este caso las regiones del gen ACCasa es un gen mucho más variable. Lo anterior puede corroborarse con el hecho de que de los 24 secuencias analizadas, 23 constituyen haplotipos únicos. Por lo que puede inferir que los cambios en este último se pueden deber a un proceso de adaptación a los diferentes sistemas de manejo de esta maleza, sobre todo por que la ubicación geográfica de las colectas, es muy cercana y se ubica en una región donde el intercambio genético entre la población se puede dar con facilidad debido que no existen barreras geográficas o montañosas que lo impidan.

P. minor es originaria de Asia, pero se ha dispersado por todo el mundo por medio de costales contaminados de semillas de trigo (Villaseñor y Espinosa, 1998; Afentouli y Eleftherohorinos, 1997). No obstante, a pesar de su amplia distribución, la secuencia de la colecta susceptible no presentó cambios a nivel de aminoácido con respecto a las

secuencias reportadas de biotipos susceptibles presentes en Israel.

Pocos estudios han encontrado una variabilidad genética tan elevada en regiones geográficas tan cercanas. McRoberts *et al.*, (2005) mencionan que las poblaciones de *P. minor* que invaden los campos de cultivo de trigo en la India tienen una diversidad genética baja (usando marcadores ISSRs). Debido principalmente al efecto fundador que ocurrió en el momento de la invasión, ya que las poblaciones de esta maleza llegaron a la India por medio de semilla contaminada proveniente de México. Por otro lado, Mortimer (1997) menciona que las poblaciones de maleza tienen diferentes factores de selección, por las prácticas agrícolas que se utilizan para eliminarlas. Sin embargo, las diferencias en la variabilidad de ambos genes indica que esta región es más susceptible a las presiones de selección entre ellas la aplicación de herbicidas.

Aunque las poblaciones resistentes mostraron un número de cambios elevado con respecto al Susceptible, solamente existió un cambio en la secuencia de aminoácidos, de estos, se observó que cada población tiene diferentes sustituciones en diferentes sitios. La baja proporción de cambios en aminoácidos demuestra que las poblaciones de *P. minor* que se encuentran en esta región se encuentran bajo evolución neutral y que en ocasiones esta puede dar cambios a que favorezcan a la adaptación a los nuevos ambientes (Linhart y Gran, 1996). Además, el hecho de encontrar cambios en aminoácidos en diferentes sitios de la proteína muestran que cada población evolucionó hacia la resistencia de manera independiente. Debido a que la aplicación de los herbicidas es decisión de cada agricultor, es posible tener en un área geográfica relativamente pequeña una gran variedad de subpoblaciones (Délye *et al.*, 2004; Délye *et al.*, 2010; Owen *et al.*, 2011).

Todas las colectas resistentes mostraron polimorfismo, pero la prueba de Tajima mostró que han habido procesos recientes que han influenciado esa variación. Las colectas Col 4 y Gto tuvieron valores negativos en el estadístico de Tajima (D), esto indica que estas poblaciones en algún momento tuvieron un cuello de botella como el que se forma por la selección realizada por el herbicida, el cual ejerce una presión extrema (99.99%). Después del proceso de selección, las poblaciones han recuperado su diversidad, lo que sugiere que nuevamente se están diversificando (Fowler y Whitlock, 1999). Para las colectas con indicador D positivo como Jal, se infiere que el cuello de botella ha sido muy reciente. Lo anterior se confirma con la baja diversidad genética que presentó, la cual fue la menor de las colectas estudiadas.

La distancia genética de las poblaciones no presentó una correspondencia con la ubicación geográfica de las colectas. La colecta Jal fue la más cercana genéticamente aunque geográficamente es la más distante del susceptible. Sin embargo, las diferencias sí tienen una correlación con el índice de resistencia. En donde el Jal tiene el IR más bajo (6.8) y el Col 4 presentó la mayor IR (12). Délye *et al.*, (2005) encontraron que el caso de los individuos R a herbicidas inhibidores de la ACCasa, mientras más mutaciones presente el sitio de acción, el índice de resistencia se incrementa considerablemente. Como se mencionó anteriormente, en un inicio esta maleza se distribuyó en un estado susceptible por toda el área del Bajío, posteriormente la selección realizada por los agricultores fragmentó esa población y ha formado diversos biotipos con características de resistencia distintas. Existen pocos estudios que hayan demostrado de manera puntual el origen genético de la resistencia en zonas de cultivos. Délye *et al.* (2004) y Délye *et al.* (2010) mencionan que las poblaciones de

Alopecurus myosuroides resistentes a herbicidas inhibidores de la ACCasa que se encuentran en la parte del norte de Francia tienen diferencias en el gen responsable, principalmente a las diferencias en selección que se ejercen en los campos de cultivo. De igual manera, encuentra que en el norte de Europa (Alemania, Bélgica, Francia, Holanda, Reino Unido y Turquía) las regiones que presentan resistencia tienen diferentes orígenes evolutivos por las dosis y programas de manejo que se emplean en cada país.

Por lo mencionado anteriormente, la red de flujo genético no fue de ayuda para determinar el flujo genético que existe entre las poblaciones, porque no tuvo una representación geográfica. Lo anterior hizo imposible establecer la filogeografía de la resistencia en el Bajío.

Finalmente, el árbol filogenético de las poblaciones de *P. minor* estudiadas mostró que existe una diferencia entre las colectas resistentes y el susceptible. Las colectas resistentes tienen un menor tiempo de evolución por el cambio de los aminoácidos. De las colectas resistentes, Gto y Col 4 son las más basales, lo que concuerda con el estimador D de Tajima y con la prueba de distancia genética. Ambas poblaciones han tenido tiempo para recuperar su diversidad después del cuello de botella que genera la selección del herbicida. De igual manera, la colecta Jal se muestra como la más derivada, lo que se comprueba con su baja diversidad genética, su indicador positivo en la prueba de Tajima (0.66) y su estrecha relación genética con el susceptible. No obstante, aun es posible observar que individuos considerados como resistentes se mezclan entre el grupo de susceptibles. Esto puede deberse a que las poblaciones presentes en el Bajío no son formadas en su totalidad por individuos resistentes y que

aún en el banco de semillas se encuentran los susceptibles (Maxwell *et al.*, 1990).

Las diferencias descritas sobre el origen y evolución de las colectas de *P. minor* presentes en el Bajío abre la posibilidad de realizar estudios acerca de la biología de éstas. Se ha documentado que la ganancia en resistencia genera costos en la aptitud competitiva (Bergelson y Purrington, 1996). No obstante, algunos autores han cuestionado la comparación de la aptitud competitiva de individuos provenientes de diferentes regiones geográficas, por las diferencias en el fondo genético (Neve 2007; Neve *et al.*, 2009). Los resultados mostraron que los herbicidas son el único factor que está seleccionando a las poblaciones de *P. minor*, por lo que se propone que si es posible realizar dichas comparaciones en aptitud para las colectas resistentes de *P. minor* en el área del Bajío.

LITERATURA CITADA

Afentouli C. G, Eleftherohorinos IG. 1997. Littleseed Canarygrass (*Phalaris minor*) and Short-spiked Canarygrass (*Phalaris brachystachys*) Interference in Wheat and Barley. *Weed Sci.* 44: 560-565.

Baucom, R. S. and Holt, J. S. 2009. Weeds of agricultural importance: bridging the gap between evolutionary ecology and crop and weed science. *New Phytologist* 184:741-743.

Bergelson, J. and Purrington, C. B. 1996. Surveying patterns in the cost of resistance in plants. *The American Naturalist* 148: 536-558.

- Christoffers, M. J. 1999.** Genetic aspects of herbicide-resistant weed management. *Weed Technology* 13:647-652
- Clement M, Posada D and Crandall K. 2000.** TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9(10): 1657-1660.
- Coustau, C.; Chevillon, C. and Ffrench-Constant, R. 2000** Resistance to xenobiotics and parasites: can we count the cost? *Trends in Ecology and Evolution* 15, 378-383.
- Délye, C. and Michel, S. 2005.** 'Universal' primers for PCR-sequencing of grass chloroplastic acetyl-CoA carboxylase domains involved in resistance to herbicides. *Weed Research* 2005 45, 323–330.
- Délye, C.; Michel, S.; Berard, A.; Chauvel, B.; Brunel, D.; Guillemin, J.; Dessaint, F. and Le Corre, V. 2010.** Geographical variation in resistance to acetyl-coenzyme A carboxylase-inhibiting herbicides across the range of the arable weed *Alopecurus myosuroides* (black-grass). *New Phytologist* 186: 1005–1017.
- Délye, C.; Straub, C.; Michel, S.; and Le Corre, V. 2004.** Nucleotide Variability at the Acetyl Coenzyme A Carboxylase Gene and the Signature of Herbicide Selection in the Grass Weed *Alopecurus myosuroides* (Huds.) *Molecular Biology and Evolution* 21(5):884–892.
- Délye, C; Zhang, X.; Michel, S.; Matějček, A. and Powles, S. B. 2005.** Molecular Bases for Sensitivity to Acetyl-Coenzyme A Carboxylase Inhibitors in Black-Grass. *Plant Physiology* 137(3):794-806.
- Devine, M. D.; Duke S. O. and Fedtke, C. 1993.** Physiology of Herbicide Action. 1993. Prentice Hall. Englewood Cliffs, NJ. 441 p.

Fowler, K. and Whitlock, M. C. 1999. The Variance in Inbreeding Depression and the Recovery of Fitness in Bottlenecked Populations. *Proceedings: Biological Sciences* 266 (1433):2061-2066 .

Gielly, L. and Taberlet, P. 1994. The Use of Chloroplast DNA to Resolve Plant Phylogenies: Noncoding versus *rbcL* Sequences. *Molecular Biology and Evolution* 11(5):769-777.

Gundel, P. E.; Martínez-Ghersa, M. A. and Ghersa, C. M. 2008. Dormancy, germination and ageing of *Lolium multiflorum* seeds following contrasting herbicide selection regimes. *European Journal of Agronomy* 28: 606-613.

Heap I. M. 2012. International survey of herbicide-resistant weeds. <http://www.weedscience.org>., Accessed 10 february 2012.

Hebert, P. D .N.; Cywinska, A.; Ball, S. L. and deWaard, J. R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings Royal Society London. Series. B:* 270: 313-321.

Hollingsworth, P.M.; Graham, S. W. and Little, D. P. 2011. Choosing and Using a Plant DNA Barcode. *PLoS ONE* 6(5):e19254.

Linhart, B. Y. and Grant, C. M. 1996. Evolutionary significance of local genetic differentiation in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 27: 237–277.

Maxwell, B. D.; Roush, M. I. and Radosevich, S. R. 1990. Predicting the evolution and dynamics of herbicide resistance in weed populations. *Weed Technology* 4: 2-13.

McRoberts, N.; Sinclair, W.; McPherson, A.; Franke, A. C.; Saharan, R. P.; Malik, R. K.; Singh, S. and Marshall, G. 2005. An assessment of genetic diversity within and

between populations of *Phalaris minor* using ISSR markers ***Weed Research*** 45: 431–439.

Mortimer, A. M. 1997. Phenological adaptation in weeds-an evolutionary response to the use of herbicides?. ***Pest Management Science*** 51:299–304.

Nei, M. and Gojobori, T. 1986. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. ***Molecular Biology and Evolution*** 3:418-426.

Neve, P. 2007. Challenges for herbicide resistance evolution and management: 50 years after Harper. ***Weed Research*** 47:365-369.

Neve, P.; Vila-Aiub, M. and Roux, F. 2009. Evolutionary-thinking in agricultural weed management. ***New Phytologist*** 184:783-793.

Owen, M. J.; Michael, P. J.; Renton, M.; Steadman, K. J. and Powles, S. B. 2011. Towards large-scale prediction of *Lolium rigidum* emergence. II. Correlation between dormancy and herbicide resistance levels suggests an impact of cropping systems. ***Weed Research*** 51, 133–141.

Palmer, J. D.; Jansen, R. K.; Michaels, H. J. Chase, M. W. and Manhart J. R. 1988. Chloroplast DNA variation and plant phylogeny. ***Annals Missouri Botanical Garden*** 75:1180-1206.

Powles, S. B. and Yu, Q. 2010. Evolution in Action: Plants Resistant to Herbicides. ***Annual Review of Plant Biology*** 61: 317-347.

Powles, S. B. and Yu, Q. 2010. Evolution in Action: Plants Resistant to Herbicides.

Annual Review of Plant Biology 61: 317-347.

Stewart, C. N. and Via, L. E. 1993. A Rapid CTAB DNA Isolation Technique Useful for RAPD Fingerprinting and Other PCR Applications. ***BioTechniques*** 14(5):748-749.

Tafoya J. A. and Morgado, J .2000. Resistencia de la maleza a la aplicación de herbicidas. ***Revista Mexicana de la Ciencia de la Maleza.*** Special number. Universidad Autónoma Chapingo, 46

Tajima F and Nei M. 1984. Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. ***Molecular Biology and Evolution*** 1:269-285.

Tajima F. 1989. Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism. ***Genetics*** 123:585-595.

Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M. and Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. ***Molecular Biology and Evolution*** (In Press).

Tharayil-Santhakumar, N. 2003. Mechanism of herbicide resistance in weeds. University of Massachusetts, Amherts, MA 39 p.

Thomas J, M.; Stephen C., W.; Floyd M. A. 2002. Weed Science - Principles and Practices, 4th Edition. John Wiley & Sons 672 pp.

Untergasser, A.; Nijveen, H.; Rao, X.; Bisseling, T.; Geurts, R. and Leunissen, J. 2007. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3 ***Nucleic Acids Research*** 35

Vencill, W. K. ed. 2002. Herbicide Handbook. Eighth Edition. Weed Science Society of America. Lawrence, KS. 493 p

Vila-Aiub, M., Neve, P.; Steadman, K. J. and Powles, B. 2005. Ecological fitness of a multiple herbicide-resistant *Lolium rigidum* population: dynamics of seed germination and seedling emergence of resistant and susceptible phenotypes. ***Journal of applied ecology*** 42:288-298.

Villaseñor R., J. L. y Espinosa G., F. J. 1998. Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México, Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario y Fondo de Cultura Económica, México, D.F.

Yu, Q.; Cairns, A. and Powles, S. B. 2007. Glyphosate, paraquat and ACCase multiple herbicide resistance in a *Lolium rigidum* biotype. ***Planta***, 225, 499-513.

CAPÍTULO 3

FISIOLOGÍA DE SEMILLAS DE “ALPISTILLO” (*Phalaris minor*) SUSCEPTIBLE Y RESISTENTES A HERBICIDAS INHIBIDORES DE LA ACCasa

RESUMEN

La resistencia a herbicidas es un proceso evolutivo que involucra cambios en la fisiología y la aptitud ecológica de las plantas. Este tipo de resistencia se presenta en *Phalaris minor*. El objetivo de este estudio fue determinar las diferencias en la aptitud por causa de la resistencia a herbicidas inhibidores de la Acetil Coenzima A Carboxilasa (ACCasa) en colectas de semillas de *P. minor*. Las características de las semillas son importantes, porque con ellas empieza la competencia entre organismos susceptibles (S) y resistentes (R) en el banco de semillas. Se llevaron a cabo experimentos para determinar si existen diferencias entre colectas S y R en el tamaño del embrión, latencia, longevidad y velocidad de germinación. Se encontraron diferencias en la fisiología de las semillas asociadas a la resistencia a herbicidas, estas diferencias tuvieron una repercusión en la aptitud de las colectas R. El tamaño del embrión mostró una reducción superior al 50% (en base a peso seco) en las colectas resistentes, lo anterior ocasionó un incremento en el número de días a germinación, así como la reducción en la velocidad de germinación. El daño a las membranas, medido como una estimación de la longevidad, fue superior en las colectas R. La reducción observada en el vigor de la semilla podría afectar el establecimiento de las plántulas y podría ser una explicación razonable para el bajo éxito de individuos R bajo condiciones no selectivas.

Palabras clave: *latencia, aptitud, germinación, longevidad, vigor*

INTRODUCCIÓN

Las malezas han sido seleccionadas intensamente por las prácticas culturales usadas para tratar de eliminarlas. Un ejemplo de esta selección es la presencia de biotipos resistentes a herbicidas (Christoffers, 1999; Baucom y Holt, 2009; Neve *et al.*, 2009). Al menos, 348 biotipos de 194 especies presentan resistencia, y se espera que ese número siga incrementándose, aún con la introducción de nuevos compuestos químicos (Coustau *et al.*, 2000; Heap, 2010). Las prácticas agrícolas que incluyan la aplicación de herbicidas inevitablemente llevarán a la evolución hacia la resistencia, incluso si éstos son usados en bajas dosis (Neve y Powles, 2005, 2005b).

La resistencia a herbicidas puede ocasionar en los individuos un costo ecológico, como la reducción en la aptitud competitiva (*fitness*); dicho costo puede ser evaluado fisiológicamente, genéticamente y evolutivamente para generar modelos que puedan ayudar al manejo de poblaciones resistentes (Coustau *et al.*, 2000; Neve *et al.*, 2009). El modelo de Maxwell *et al.* (1990) predice el retorno a la susceptibilidad de las poblaciones R cuando la aplicación del herbicida es suspendida. Sin embargo, este modelo es completamente teórico y depende de la existencia de una reducción en la aptitud competitiva de las plantas.

El “alpistillo” (*Phalaris minor* Retz.) es una maleza nativa de Asia, la cual a invadido los campos de cultivo de trigo en 60 países (Hari *et al.*, 2003). A pesar de su amplia distribución y efectos detrimentales en el rendimiento, *P. minor* no está considerada entre las diez malezas más problemáticas a nivel mundial (Heap, 2012). Esta maleza tiene la capacidad de adaptarse a los sistemas de cultivo, alcanzando densidades de hasta 300 plantas m⁻² y puede causar reducciones en el rendimiento de hasta un 95%

(Afentouli y Eleftherohorinos; Iqbal y Wright, 1997; Chhokar y Sharma, 2008). En México, 5000 ha de la zona agrícola del Bajío están infectadas por *P. minor* y entre 100 y 500 agricultores han reportado la presencia de individuos resistentes a herbicidas inhibidores de la ACCasa (Heap, 2012).

Las semillas de *P. minor* susceptibles a inhibidores de la ACCasa tienen alrededor de dos años de longevidad bajo condiciones de campo y requieren de un periodo de frío para superar la latencia. Bajo condiciones naturales, las semillas alcanzan su máximo porcentaje de germinación 70 d después de la dispersión (Om *et al.*, 2005). Sin embargo, el exceso de humedad reduce el vigor y la longevidad, dependiendo de la profundidad en la que se encuentre en el suelo (Franke *et al.*, 2007).

Las diferencias en las características de las semillas son importantes, porque de ellas depende la persistencia de los individuos resistentes en el reservorio de semillas del suelo (Ghersa y Martínez-Ghersa, 2000). El tamaño del embrión, latencia, longevidad y velocidad de germinación son medidas de vigor que pueden ser decisivas para el establecimiento de las plantas bajo condiciones no selectivas (Weaver y Thomas, 1986; Winn, 1988; Alcocer-Ruthling *et al.*, 1992; Dyer *et al.*, 1993; Thompson *et al.*, 1994). En general, los estudios acerca del costo de la resistencia a herbicidas inhibidores de la ACCasa en gramíneas han mostrado reducciones en la longevidad, porcentaje de germinación y vigor (Ghersa y Martínez-Ghersa 2000; Vila-Aiub *et al.*, 2005a, 2005b; Gundel *et al.*, 2008). Sin embargo, no existe información disponible acerca del costo de la resistencia en semillas de *P. minor*. Por éste motivo, el objetivo de la presente investigación fue determinar las diferencias en la aptitud en la fisiología de las semillas (distribución de biomasa, longevidad y germinación) en colectas susceptibles y

resistentes de *P. minor*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las colectas resistentes (Col 4, Col 7 y Gto, IR=12, clodinafop) usadas en este estudio fueron colectadas en tres campos de cultivos en la región del Bajío (20° 25' N, 101° 38' O); otra colecta (Jal) fue colectada a una distancia de 100 km, en donde se ha reportado la presencia de individuos resistentes a diclonafop (IR=6.8) (Tafoya and Morgado 2000). El susceptible (S) fue colectado en una localidad en donde no se ha utilizado el control químico en los últimos 15 años (comunicación personal con los productores).

Las semillas de las colectas originales fueron sembradas en macetas de plástico llenas de suelo. Las plantas fueron crecidas bajo condiciones de invernadero, al momento de la aparición de la espiga, éstas fueron cubiertas con bolsas de papel encerado para evitar la polinización cruzada y la pérdida de semillas, debido a que éstas se dispersan al momento de la madurez fisiológica. Las semillas obtenidas fueron mantenidas en bolsas de papel a 18 °C hasta el momento de su utilización.

Asignación de biomasa a las diferentes estructuras de la semilla

De cada una de las colectas, se seleccionaron 30 semillas mismo peso (1.8 mg). Las semillas fueron disectadas en: lema y palea, endospermo y embrión. Cada parte fue secada en una estufa de aire forzado a 80 °C por 72 h. La asignación de biomasa para cada estructura fue calculada a partir del peso de la materia seca. Los datos fueron analizados con un análisis de varianza bajo un diseño completamente al azar. Previo al

análisis estadístico, los porcentajes fueron transformados mediante la función arcoseno.

Tratamiento para la ruptura de la latencia

Las especies del género *Phalaris* requieren de periodos de bajas temperaturas para romper la latencia de las semillas (Om *et al.*, 2005). Para determinar si cada colecta requiere de diferentes periodos para la ruptura de la latencia, grupos de 100 semillas fueron estratificadas a 5 °C por 0, 10, 20 y 30 d. Posterior a la estratificación, las semillas se germinaron (20 °C; 12 h Fotoperiodo) para observar si la estratificación rompe la latencia. La germinación se cuantificó contando el número de semillas germinadas en intervalos de 5 d durante 60 d. A las semillas que no germinaron se les aplicó la prueba de cloruro de tetrazolio (0.1%) para determinar si eran viables. Se calcularon el número de días a germinación (Khan y Ungar, 1984) y el índice de velocidad de germinación (Hartmann *et al.*, 1993) de acuerdo a las siguientes fórmulas:

Número de días a germinación (NDG): $NDG = (N1 \times T1 + N2 \times T2 + \dots + Nn \times Tn)/n$

Índice de velocidad de germinación (IVG) $IVG = (N1 \times r + N2 \times r + \dots + Nn \times r)/Tn$

Donde:

N = Número de semillas germinadas dentro de los intervalos de tiempo consecutivos.

r = Número de repeticiones usadas (4)

T = Tiempo entre el inicio de la prueba y el fin del intervalo

n = Número de semillas germinadas

Los datos fueron analizados con un diseño completamente al azar con arreglo factorial, los factores principales fueron las colectas y el tiempo de estratificación. Veinticinco semillas con cuatro repeticiones fueron usadas en cada tratamiento. Diferencias significativas entre tratamientos fueron identificadas con la prueba de Tukey con $P < 0.05$.

Longevidad medida por envejecimiento acelerado

La colecta Jal no fue incluida en esta prueba debido a que no se obtuvo la cantidad suficiente de semillas. La prueba de envejecimiento acelerado (Gundel *et al.*, 2008; ISTA, 2009) fue realizada colocando 100 semillas de cada colecta en cámaras de envejecimiento a 45 °C y 100% de HR por periodos de 0, 24, 48, 72 y 96 h, resultando 20 tratamientos (4 colectas, 5 tiempos). La conductividad eléctrica (C.E. dS m⁻¹) fue medida para estimar el daño en las membranas celulares debido a la prueba de envejecimiento acelerado.

Análisis estadístico

Los datos experimentales fueron analizados usando una ANOVA con el paquete estadístico SAS versión 9.1 (SAS 2009). En todos los tratamientos se utilizaron cuatro repeticiones. Diferencias significativas entre las medias de los tratamientos fueron separadas con la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

Con la finalidad de determinar si el tamaño del embrión tiene alguna relación con la capacidad para germinar, se realizó una regresión lineal entre la proporción ocupada por el embrión y los índices de germinación evaluados.

RESULTADOS

Asignación de biomasa a las diferentes estructuras de la semilla

El endospermo fue la estructura con la mayor asignación de biomasa, seguida de las envolturas florales (lema y palea) y el embrión (Cuadro 1). Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el peso y porcentaje ocupado por el endospermo y el embrión en las semillas de las diferentes colectas. Las colectas Gto y Jal tuvieron el menor porcentaje de asignación al embrión, lo cual fue compensado con el incremento en el tamaño del endospermo. Las colectas Col 4, Col 7 y el S tuvieron una distribución similar de materia orgánica en el endospermo y el embrión (Cuadro 1)

Cuadro 1. Peso de materia seca y porcentaje de asignación a las diferentes estructuras de semillas susceptibles (S) y resistentes (Col 4, Col 7, Gto y Jal) a herbicidas inhibidores de la ACCasa de alpiñillo (*Phalaris minor*).

	Lema y palea	Endospermo	Embrión	Lema y palea	Endospermo	Embrión
	mg			%		
Susceptible	0.35 a ± 0.02	1.20 ab ± 0.02	0.25 a ± 0.02	19.5 a ± 0.93	66.6 b ± 1.2	13.9 a ± 0.9
Col 4	0.36 a ± 0.02	1.18 b ± 0.02	0.26 a ± 0.03	20.0 a ± 0.91	65.6 b ± 1.4	14.4 a ± 1.9
Col 7	0.4 a ± 0.02	1.18 b ± 0.03	0.22 ab ± 0.03	22.2 a ± 0.01	65.6 b ± 1.6	12.2 ab ± 1.6
Gto	0.38 a ± 0.02	1.28 a ± 0.02	0.14 b ± 0.02	21.6 a ± 1.0	71.1 a ± 1.1	7.3 b ± 1.2
Jal	0.39 a ± 0.02	1.28 a ± 0.02	0.13 b ± 0.02	21.7 a ± 1.0	71.1 a ± 1.1	7.2 b ± 1.2

Letras diferentes en las columnas indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey 0.05). Datos promedios ± error estándar.

Tratamiento para la ruptura de la latencia

La latencia de las semillas de *P. minor* mostraron diferencias significativas entre las colectas y el tiempo de estratificación. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en los 10, 20 y 30 d de estratificación. Posterior a la estratificación, el susceptible tuvo los porcentajes y velocidad de germinación más altos comparados con los resistentes (Figuras 1A-E). La estratificación incrementó la velocidad de germinación en el S, Col 4 y Gto comparados con los no estratificados; sin embargo, no se encontraron diferencias entre 10, 20 y 30 d de estratificación (Figuras 1B y D).

La estratificación no modificó el porcentaje ni la velocidad de germinación en Col 7 y Jal, este último tuvo el menor porcentaje de germinación (Figuras 1C y E). Sin embargo, esto fue debido a que los tratamientos no pudieron romper la latencia, porque la prueba de cloruro de tetrazolio mostró que todas las semillas eran viables al momento del experimento.

Para el número de días a germinación y el índice de velocidad de germinación, se encontraron diferencias significativas entre las colectas y entre los tiempos de estratificación (Cuadro 2). La colecta susceptible requirió el menor tiempo para germinar (16.7 d) y tuvo el índice de germinación más alto (1.96). Entre las colectas resistentes, Jal requirió más días para germinar (44.4 d) y tuvo el menor índice de velocidad de germinación (0.32).

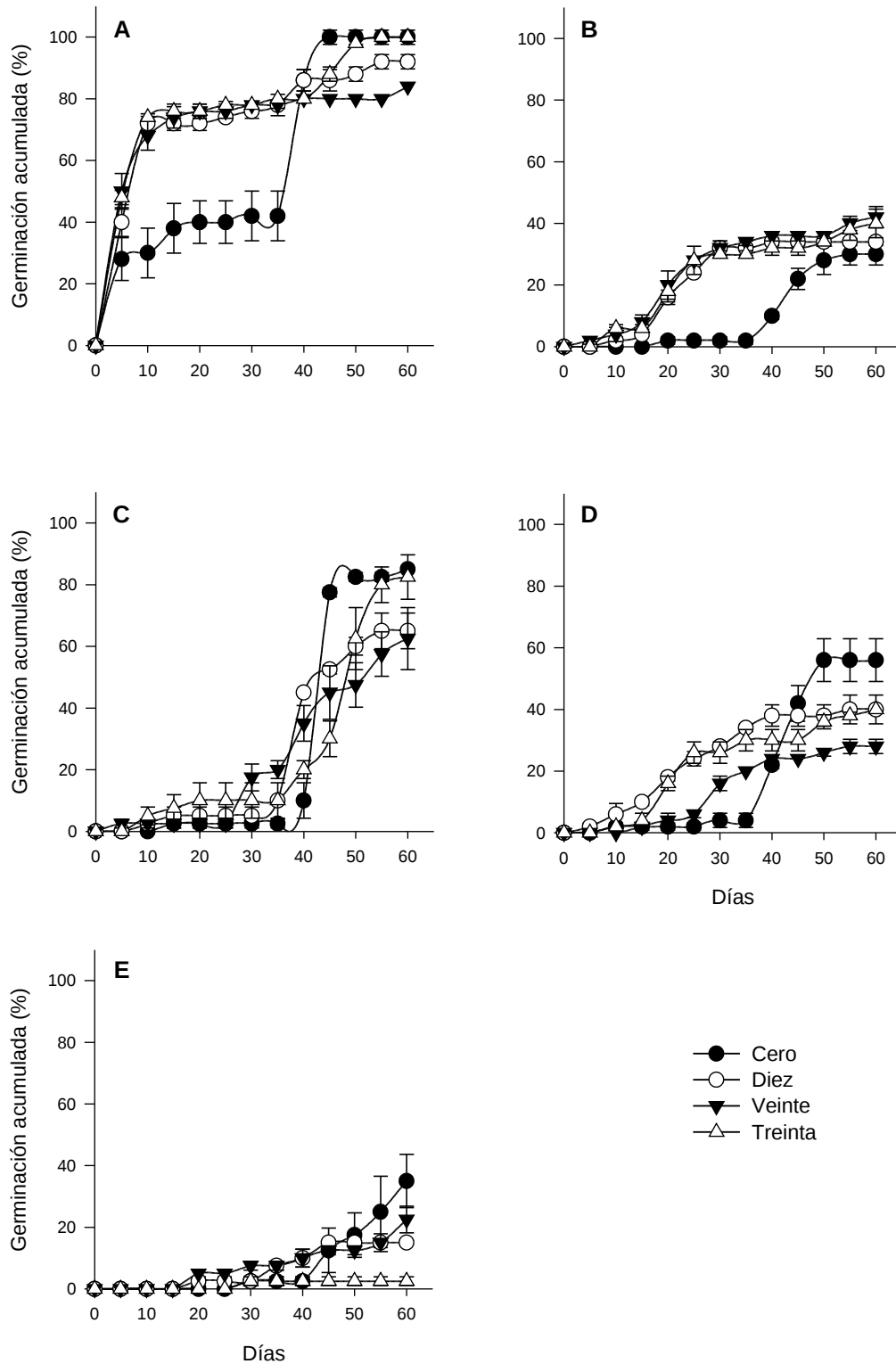


Figura 1. Dinámica de la germinación de semillas (%) después del tratamiento para la ruptura de la latencia en las colectas susceptible (A) y resistentes a herbicidas: Col 4 (B), Col 7 (C), Gto (D) y Jal (E) de *Phalaris minor*. Tratamientos para la ruptura de la latencia (0, 10, 20 y 30 d a 5 °C). Datos promedio \pm el error estándar.

Cuadro 2. Número de días a germinación (NDG) e índice de velocidad de germinación (IVG) después del tiempo de estratificación (0, 10, 20, 30 d a 5 °C) de semillas susceptibles (S) y resistentes (Col 4, Col 7, Gto y Jal) a herbicidas inhibidores de la ACCasa de alpiñillo (*Phalaris minor*).

FACTORES	Niveles	NDG	IVG
Colectas	Susceptible	16.7 c ± 1.8	1.96 a ± 0.04
	Col 4	30.5 b ± 2.1	0.76 c ± 0.04
	Col 7	42.3 a ± 0.6	1.23 b ± 0.07
	Gto	32.7 b ± 1.9	0.86 c ± 0.07
	Jal	44.4 a ± 2.5	0.32 d ± 0.06
Tiempo de estratificación	0	42.4 a ± 2.0	1.18 a ± 0.13
	10	27.8 c ± 2.3	0.96 b ± 0.13
	20	30.8 bc ± 2.8	0.93 b ± 0.11
	30	32.3 b ± 3.0	1.04 ab ± 0.15
Interacciones	Colectas	***	***
	Tiempo	***	***
	Colectas*Tiempo	*	***

*, **, *** indican 0.05, 0.01 y 0.001 de probabilidad (Tukey 0.05), respectivamente; NS diferencias no significativas. Datos promedio ± error estándar

Longevidad medida por envejecimiento acelerado

Al inicio del experimento, todas las colectas presentaron la misma C.E. (Cuadro 3). La C.E. de las semillas de todas las colectas se incrementó conforme se aumentó el tiempo de envejecimiento. En las mediciones realizadas a las 24 y 48 h, el susceptible presentó el menor daño comparado con las colectas resistentes. Sin embargo, esta tendencia cambió a las 72 y 96 h donde el susceptible tuvo los valores de C.E. más altos. El deterioro de la semilla fue generalizado en todas las colectas a las 96 h, en donde se observó la degradación total del endospermo. El incremento en la C.E. es una medida indirecta del daño de las membranas, mientras que una C.E. baja indica mayor

integridad de las membranas celulares. En condiciones naturales, esto sugeriría que las semillas con baja C.E. permanecerían viables por más tiempo en el banco de semillas comparadas con aquellas que presentan una C.E. elevada. Por lo tanto, ese puede ser un estimador de la longevidad.

Cuadro 3. Longevidad medida por la conductividad eléctrica (dS m^{-1}) después de 0, 24, 48, 72 y 96 h de envejecimiento acelerado ($45\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 100% de HR) de semillas susceptibles (S) y resistentes (Col 4, Col 7, Gto y Jal) a herbicidas inhibidores de la ACCasa de alpiñillo (*Phalaris minor*).

Horas	0	24	48	72	96
	dS m^{-1}				
Susceptible	0.51 a \pm 0.01	0.71 c \pm 0.06	1.02 d \pm 0.01	3.77 a \pm 0.2	35.90 a \pm 0.6
Col 4	0.51 a \pm 0.01	1.58 a \pm 0.03	1.22 c \pm 0.01	1.94 b \pm 0.06	29.78 ab \pm 0.6
Col 7	0.51 a \pm 0.01	1.17 b \pm 0.09	1.63 a \pm 0.06	1.63 b \pm 0.06	22.64 b \pm 4.7
Gto	0.51 a \pm 0.01	2.17 a \pm 0.03	1.48 b \pm 0.03	1.94 b \pm 0.06	20.04 b \pm 0.1

Letras diferentes en las columnas indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey 0.05). Datos promedios \pm error estándar.

Correlación entre el tamaño del embrión y la germinación

La relación entre el porcentaje ocupado por el embrión y los índices de germinación evaluados (número de días a germinación u velocidad de germinación) se muestran en las Figuras 2 y 3. En ellas se puede observar que para ambos índices, el porcentaje ocupado por el embrión está correlacionado con el incremento en la aptitud para germinar, como en el caso del susceptible que tuvo la mayor velocidad de germinación y requirió el menor número de días para germinar.

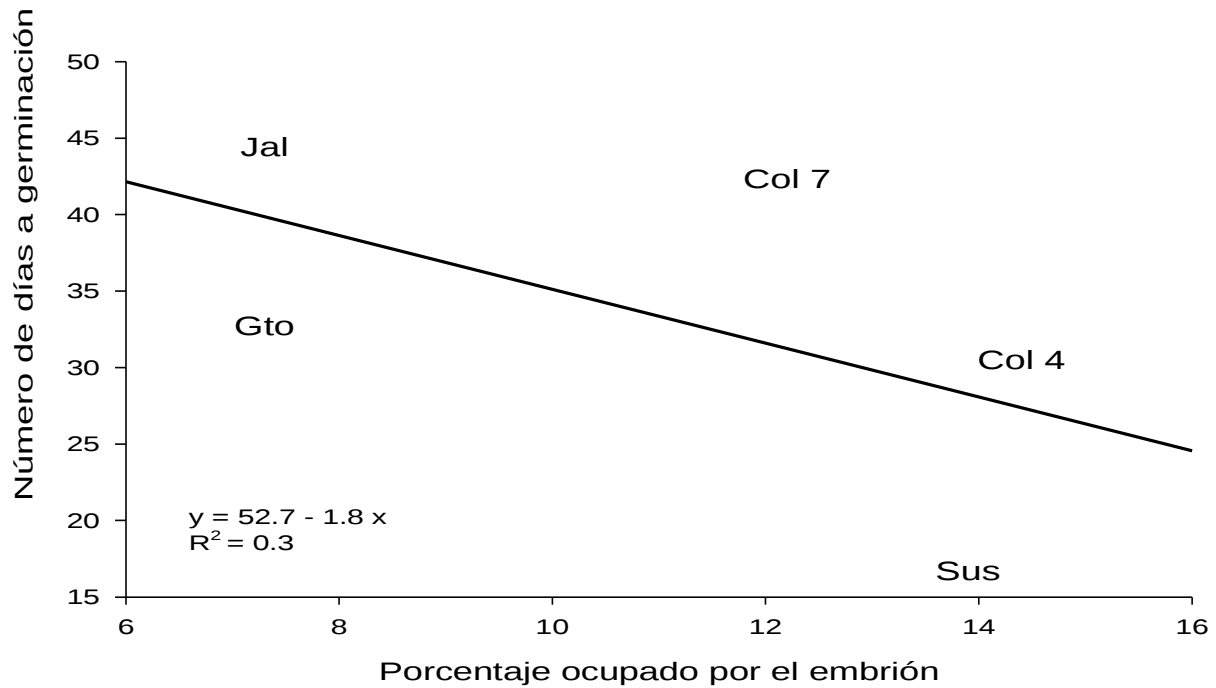


Figura 2. Correlación entre el porcentaje ocupado por el embrión en la semilla y el número de días a germinación.

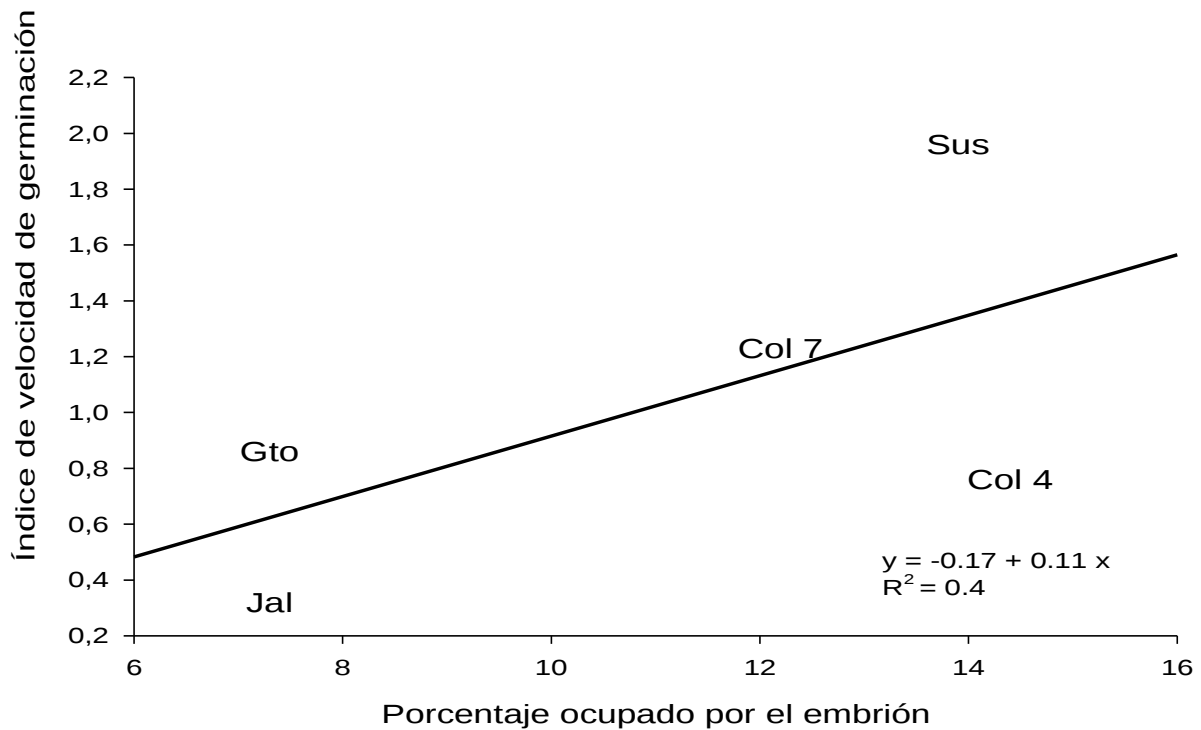


Figura 3. Correlación entre el porcentaje ocupado por el embrión en la semilla y el índice de velocidad de germinación.

DISCUSIÓN

Se encontraron diferencias asociadas a la resistencia a herbicidas inhibidores de la ACCasa en la fisiología y morfología de semillas de *P. minor*. Los aspectos evaluados, asignación de materia seca, latencia y longevidad mostraron diferencias en la aptitud en todas las colectas. Resultados similares han sido obtenidos por Gundel *et al.* (2008) y Vila-Aiub *et al.* (2005b) para semillas de biotipos de *Lolium multiflorum* y *Lolium rigidum*, respectivamente, resistentes a inhibidores de la ACCasa.

Las semillas de las colectas Gto y Jal tuvieron una reducción del 50% en el tamaño del embrión comparadas con el susceptible y tuvieron la latencia más profunda y la menor longevidad. López-Castañeda *et al.* (1996) encontraron que las diferencias en el vigor inicial en cereales como avena, sorgo, trigo y triticale esta directamente relacionada con el tamaño del embrión. No obstante, no se encontraron estudios que correlacionen el tamaño del embrión con la latencia y longevidad en colectas resistentes a herbicidas. Sin embargo, Forbis *et al.* (2002) menciona que el tamaño del embrión puede estar relacionado con la latencia primaria de las semillas. Plantas que producen semillas con embriones pequeños tienen que pasar por un periodo de maduración más largo que puede durar varios meses (latencia morfo-fisiológica). Esta situación le da una ventaja a los individuos susceptibles sobre los resistentes.

La reducción en la proporción de biomasa asignada al embrión en las semillas de poblaciones resistentes ocasionó que éstas requirieran de un número mayor de días para germinar y que tuvieran una velocidad de germinación reducida. Esto se puede observar en las Figuras 2 y 3 en las que se relaciona el porcentaje ocupado por el embrión, el número de días para la germinación y la velocidad de germinación. En el

caso de S y Col 4, los cuales tuvieron los embriones más grandes, el número de días para la germinación se redujo considerablemente. Las colectas con embriones pequeños tuvieron una velocidad de germinación baja. En ambas correlaciones, La colecta Susceptible demostró la mayor aptitud para la germinación.

Las colectas Gto y Jal tuvieron la menor aptitud para la germinación, lo que fue consistente con la baja proporción de embrión en la semilla. Algunas de las consecuencias por la intensa presión de selección que ejercida por los xenobióticos es un incremento en la endogamia como resultado del cuello de botella que ocurre en las poblaciones. El resultado de lo anterior es una disminución en el vigor de los individuos por la baja variabilidad genética. Los resultados encontrados de la diversidad genética, mostró que la colecta Jal es la que tiene la menor variabilidad genética de las poblaciones estudiadas. Además de que los resultados de la prueba de Tajima indican que recientemente han evolucionado hacia la resistencia.

Además de la proporción del embrión dentro de la semilla, existen otros factores que pueden explicar las diferencias en la latencia y la longevidad de las semillas. Las colectas resistentes (Col 4 y Col 7) con semillas en donde el tamaño del embrión fue relativamente similar al susceptible también presentaron una latencia profunda y longevidad baja. Esto puede deberse a otros tipos de costos fisiológicos; los efectos pleiotrópicos ocurren debido a que los cambios de nucleótidos pueden conferir a las proteínas diferentes formas y funciones. Al respecto, Menchari *et al.* (2008) han encontrado que mutaciones puntuales en los genes responsables a la resistencia a los inhibidores de la ACCasa pueden afectar el “*fitness*” (acumulación de biomasa y producción de semillas) en poblaciones de *Alopecurus myosuroides*.

La reducción en el tamaño del embrión observada en algunas colectas R podría ser el resultado de una correlación antagónica entre caracteres la cual compensa la supervivencia en un ambiente altamente selectivo (99.9%) con la pérdida de aptitud competitiva (*fitness*). Este tipo de “intercambios” (*tradeoffs*) han sido encontrados en la adquisición de resistencia a otros agentes de selección, tales como la resistencia a herbívoros y patógenos. El costo de la resistencia en las aptitudes competitivas en plantas es más severa en el caso de los herbicidas en relación a la resistencia a la herbivoría y patógenos, esto debido a la intensa presión de selección que éstos ejercen (Bergelson y Purrington, 1996).

El retraso en el número de días a la germinación y la velocidad de germinación de las colectas resistentes puede ser una desventaja ecológica comparada con el susceptible. En la temporada de crecimiento, cuando las condiciones son propicias para la germinación, las semillas de los individuos susceptibles estarán listas para germinar y ocupar el espacio, mientras que las resistentes que germinen después serán sombreadas y no podrán completar su ciclo biológico (Vila-Aiub *et al.*, 2005b). Mortimer (1997) menciona que una de las respuestas evolutivas para evitar la presión de selección del herbicida es la selección de individuos con latencia profunda, de tal manera que los individuos que germinen después tendrán más posibilidades de completar su ciclo biológico que aquellos que hayan recibido la aplicación del herbicida. Por esta razón, es posible que al desaparecer el factor de selección, las características de germinación retrasada represente una desventaja para el establecimiento de las plántulas, lo que podría causar una reducción en el número de individuos resistentes dentro de la población y regresar a las poblaciones a un estado susceptible (Maxwell *et*

al., 1990). En una prueba de series de reemplazo de De Witt, las colectas resistentes son desplazadas por el susceptible debido a que este germina primero y ocupa rápidamente el dosel (Capítulo 5).

La longevidad (medida a través de la prueba de envejecimiento acelerado) es un indicador del vigor, esto también fue relacionado con el tamaño del embrión. Las semillas de la colecta Susceptible, que presentaron los embriones más grandes, tendrán una mayor tolerancia al deterioro bajo condiciones naturales y permanecerán viables por un periodo mayor en el banco de semillas. Al respecto, Gundel *et al.* (2008) reportan que la longevidad de semillas de *Lolium multiflorum* se reduce por causa de la resistencia a inhibidores de la ACCasa, lo que significa una desventaja bajo condiciones no selectivas.

Las semillas de la colecta Jal no pudieron ser ocupadas para la prueba de envejecimiento debido a la baja producción de semillas. Además de la producción baja de semillas, éstas tuvieron baja calidad. La reducción de las aptitudes competitivas encontradas en este estudio podrían ser la causa del bajo éxito de los individuos resistentes bajo condiciones no selectivas, lo que podría causar el retorno de la susceptibilidad de las poblaciones (Maxwell *et al.*, 1990).

Varios autores han cuestionado la comparación de las aptitudes competitivas entre poblaciones que no comparten la misma historia de selección (Neve 2007; Vila-Aiub *et al.*, 2009). Las prácticas agrícolas que cada agricultor aplica dentro de su parcela convierten a cada colecta en una población única (Linhart y Grant, 1996). Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio acerca de las diferencias en la calidad fisiológica de las semillas mostraron que incluso poblaciones aisladas geográficamente

(Jal) mostraron tendencias similares. Es posible que la pérdida de la aptitud competitiva evaluada en este estudio sea la consecuencia de la evolución hacia la resistencia y pueda ser encontrada en todas las colectas. Esto podrá ser de ayuda para diseñar estrategias de control encaminadas a eliminar a los individuos resistentes del banco de semillas sin la necesidad del control químico.

LITERATURA CITADA

Afentouli, C. G.; Eleftherohorinos, I.G. 1997. Littleseed Canarygrass (*Phalaris minor*) and Short-spiked Canarygrass (*Phalaris brachystachys*) Interference in Wheat and Barley. *Weed Science* 44: 560-565.

Alcocer-Ruthling, M.; Thill, C. D. and Shafii, B. 1992. Seed biology of sulfonylurea resistant and susceptible biotypes of prickly lettuce (*Lactuca serriola*). *Weed Technology* 6: 858-864.

Baucom, R. S. and Holt, J. S. 2009. Weeds of agricultural importance: bridging the gap between evolutionary ecology and crop and weed science. *New Phytologist*. 184: 741-743.

Bergelson, J. and Purrington, C. B. 1996. Surveying patterns in the cost of resistance in plants. *The american Naturalist* 148: 536-558.

Chhokar, R. S. and Sharma, R. K. 2008. Multiple herbicide resistance in littleseed canarygrass (*Phalaris minor*): A threat to wheat production in India. *Weed Biology and Management* 8, 112-123.

Christoffers, M. J. 1999. Genetic aspects of herbicide-resistant weed management.

Weed Technology 13: 647-652.

Coustau, C.; Chevillon, C. and Ffrench-Constant, R. 2000. Resistance to xenobiotics and parasites: can we count the cost? ***Trends in Ecology and Evolution***. 15, 378-383.

Dyer, W. E.; Chee, P. W. and Fay, K. P. 1993. Rapid germination of sulfonylurea-resistant *Kochia scoparia* L. accessions is associated with elevated seed levels of branched chain amino acids. ***Weed science*** 41: 18-22.

Forbis, T. A.; Floyd, S. K. and De Queiroz, A. 2002. The evolution of embryo size in angiosperms and other seed plants: implications for the evolution of seed dormancy. ***Evolution*** 56, 2112-2125.

Franke, A. C.; Singh, S.; MacRoberts, N.; Nehra, A. S.; Godara, S.; Malik, R. K. and Marshall, G. 2007. *Phalaris minor* seedbank studies: longevity, seedling emergence and seed production as affected by tillage regime. ***Weed Research*** 47: 73–83.

Ghersa, C. M. and Martínez-Ghersa, M. A. 2000. Ecological correlates of weed seed size and persistence in the soil under different tilling systems: implications for weed management. ***Field crops research*** 67: 141-148.

Gundel, P. E.; Martínez-Ghersa, M. A. and Ghersa, C. M. 2008. Dormancy, germination and ageing of *Lolium multiflorum* seeds following contrasting herbicide selection regimes. ***European Journal of Agronomy*** 28: 606-613.

Hari, O. M.; Dhiman, S. D.; Hemant, K. and Sajjan, K. 2003. Biology and management of *Phalaris minor* in wheat under a rice/wheat system. ***Weed Research*** 43: 59–67.

Hartmann, H.; Kester, E. and Davies, F. 1993. Plant propagation, principles and practices. Prentice-Hall, New Delhi, India.

Heap, I. M. 2012. International survey of herbicide-resistant weeds.

<http://www.weedscience.org>., Accessed 10 february 2012.

Iqbal, J. and Wright, D. 1997. Effects of nitrogen supply on competition between wheat and three annual weed species. *Weed Research* 37: 391-400.

ISTA, rules 2009. 2009. International Seed Testing Association, Bassersdorf, Switzerland.

Khan, M. and Ungar, I. 1984. The effect of salinity and temperature on the germination of polymorphic seeds and growth of *Atriplex triangularis* Willd. *American Journal of Botany* 71: 481-489.

Linhart, B. Y. and Grant, C. M. 1996. Evolutionary significance of local genetic differentiation in plants. *Annals Review of Ecology and Systematics* 27: 237–277.

López-Castañeda, C.; Richards, R. A.; Farquhar, G. D. and Williamson, R. E. 1996. Seed and seedling characteristics contributing to variation in early vigor among temperate cereals. *Crop Science* 36: 1257–1266.

Maxwell, B. D.; Roush, M. I. and Radosevich, S. R. 1990. Predicting the evolution and dynamics of herbicide resistance in weed populations. *Weed Technology* 4: 2-13.

Menchari, Y.; Chauvel, B.; Darmency, H. and Délye, C. 2008. Fitness costs associated with three mutant acetylcoenzyme A carboxylase alleles endowing herbicide resistance in black-grass *Alopecurus myosuroides*. *Journal of Applied Ecology* 45: 939–947.

Mortimer, A. M. 1997. Phenological adaptation in weeds-an evolutionary response to the use of herbicides?. *Pest Management Science* 51: 299–304.

Neve, P. 2007. Challenges for herbicide resistance evolution and management: 50 years after Harper. *Weed Research* 47: 365-369.

Neve, P. and Powles, S. 2005. High survival frequencies at low herbicide use rates in populations of *Lolium rigidum* result in rapid evolution of herbicide resistance. ***Heredity*** 95: 485-492.

Neve, P. and Powles, S. 2005b. Recurrent selection with reduced herbicide rates result in the rapid evolution of herbicide resistance in *Lolium rigidum*. ***Theoretical and Applied Genetics*** 110: 1154-11.

Neve, P.; Vila-Aiub, M. and Roux, F. 2009. Evolutionary-thinking in agricultural weed management. ***New Phytologist*** 184, 783-793.

Om, H.; Kumar, S. and Dhiman, S. D. 2005. Dormancy and viability of *Phalaris minor* seed in a rice–wheat cropping system. ***Weed Research*** 45: 140–148.

Sas Institute. 2009. Sas/Stat user's guide. SAS Institute Inc., Cary, NC.

Tafoya, J. A. and Morgado, J. 2000. [Weed resistance to herbicide application.] ***Revista Mexicana de la Ciencia de la Maleza***. Special number. Universidad Autónoma Chapingo, 46. [In Spanish].

Thompson, C. R.; Thill, C. D. and Shafii, B. 1994. Germination characteristics of sulfonylurea resistant and susceptible *Kochia (Kochia scoparia)*. ***Weed Science*** 42: 50-56.

Vila-Aiub, M.; Neve, P. and Powles, S. B. 2005. Resistance cost of a cytochrome P450 herbicide metabolism mechanism but not an ACCase target site mutation in a multiple resistant *Lolium rigidum* population. ***New Phytologist*** 167: 787-796.

Vila-Aiub, M.; Neve, P. and Powles, S. B. 2009. Fitness costs associated with evolved herbicide resistance alleles in plants. ***New Phytologist*** 184: 751–767.

Vila-Aiub, M.; Neve, P.; Steadman, K. J. and Powles, S. B. 2005b. Ecological fitness

of a multiple herbicide-resistant *Lolium rigidum* population: dynamics of seed germination and seedling emergence of resistant and susceptible phenotypes. **Journal of Applied Ecology** 42: 288-298.

Weaver, E. S. and Thomas, G. 1986. Germination responses to temperature of atrazine resistant and susceptible biotypes of two pigweed (*Amaranthus*) species. **Weed Science** 34: 355 865-870.

Winn, A. A. 1988. Ecological and evolutionary consequences of seed size in *Prunella vulgaris*. **Ecology** 69: 1537-1544.

CAPÍTULO 4

DIFERENCIAS EN BIOMASA Y FECUNDIDAD ENTRE COLECTAS DE ALPISTILLO

(*Phalaris minor* Retz.) SUSCEPTIBLES Y RESISTENTES A HERBICIDAS

INHIBIDORES DE LA ACCasa

RESUMEN

La resistencia a herbicidas es un proceso evolutivo causado por cambios metabólicos o genéticos en las poblaciones. En algunas especies la evolución a la resistencia tiene un costo sobre la aptitud competitiva de los individuos (*fitness*). *Phalaris minor* es una maleza que evolucionó a la adquisición de resistencia a herbicidas inhibidores de la ACCasa en el Bajío Mexicano. El objetivo de este estudio fue determinar si la resistencia a herbicidas tiene un costo sobre la biomasa y fecundidad de las poblaciones de *Phalaris minor* presentes en el Bajío Mexicano. Se realizó un experimento en invernadero con colectas de una población susceptible (S) y cuatro resistentes (R) (Col 4, Col7, Gto y Jal). Se evaluó la fenología, acumulación de grados días desarrollo, producción y distribución de biomasa, tasas de crecimiento (relativo, absoluto, asimilación neta), duración del área foliar y el costo de la resistencia en la biomasa y fecundidad (número de semillas). Se encontraron diferencias en la fenología, acumulación de biomasa y producción de semillas entre los biotipos R respecto al S. Las colectas Col 4 y Gto fueron precoces, con poca acumulación de biomasa y bajo peso de semillas. Por el contrario, dos biotipos fueron de lento crecimiento, pero de mayor acumulación de biomasa respecto al S. En todas las colectas se observó una reducción en la fecundidad (número de semillas por planta) con respecto al S. Los costos encontrados podrían ocasionar el desplazamiento de los individuos R, si las condiciones selectivas son retiradas.

Palabras clave: *Crecimiento, fitness, fenología, análisis de crecimiento.*

INTRODUCCIÓN

La presencia de individuos resistentes (R) a herbicidas en cultivos donde se aplica el control químico es un proceso evolutivo (Linhart y Grant, 1996, Baucom y Holt, 2009; Powles y Yu, 2010). Dicho proceso evolutivo es causado por cambios metabólicos o genéticos que permiten a los individuos R sobrevivir a las aplicaciones de herbicidas (Christoffers, 1999; Yu *et al.*, 2007). La resistencia permite el establecimiento y la reproducción de los individuos R cambiando la frecuencia de una población completamente susceptible a R en pocas generaciones (Maxwell *et al.*, 1990).

Las condiciones en las que los individuos R se encuentran favorecidos han sido propiciadas por el hombre al aplicar una presión de selección, en este caso el herbicida (Palumbi, 2001). La modificación de las prácticas culturales (rotación de cultivos, cambio del modo de acción del herbicida, abandono del control químico, manejo integrado de la maleza, entre otros) puede ocurrir dejando a los individuos S y R compitiendo sin factores de selección presentes, con lo cual la población puede volver a su estado original.

Generalmente, la resistencia a herbicidas está asociada con costos en las aptitudes competitivas de las plantas (*fitness*) (Bergelson y Purrington, 1996). Sin embargo, Wiederholt y Stolenberg (1996, 1996b) en trabajos con *Setaria faberi* y *Digitaria sanguinalis* no encontraron diferencias en el *fitness* entre biotipos S y R a los inhibidores de la ACCasa. En estudios recientes se han encontrado costos en diferentes etapas fenológicas (desde la germinación hasta la producción de semillas y acumulación de biomasa) en *Lolium rigidum* y *L. multiflorum* (Vila-Aiub *et al.*, 2005, 2005b; Gundel *et al.*, 2008). Sin embargo, los cambios morfológicos y fisiológicos que

sean factibles de presentarse en los individuos resistentes podrían no ser caracteres adaptativos a condiciones sin presión de selección. Por lo tanto, se ha creado un modelo de simulación que plantea la posibilidad de que los individuos R sean desplazados en el momento que el factor de selección se retire del cultivo. Sin embargo, los supuestos del modelo están basados en la reducción del *fitness* de los individuos R (Maxwell *et al.* 1990).

Phalaris minor es una maleza asiática con una amplia distribución a nivel mundial, es la maleza principal de cultivos de trigo en países como Grecia, India, Israel, Sudáfrica, entre otros. En México *P. minor* se presenta en la parte central del país conocida como Bajío. En 1996 se reportó la presencia de poblaciones resistentes a herbicidas inhibidores de la ACCasa, las cuales rápidamente se dispersaron afectando a cerca de 5000 ha (Heap, 2012). Sin embargo, en la literatura no se encontró información si en las poblaciones resistentes de esta especie encontradas por Tafoya y Morgado (2000) presentan una penalización en el *fitness* por causa de la resistencia. Por tal motivo, el objetivo de este estudio fue determinar si la resistencia a dichos herbicidas tiene un costo en la biomasa y fecundidad de las poblaciones de *Phalaris minor* presentes en el Bajío Mexicano. Estos estudios generarán información útil para diseñar estrategias de manejo que ayuden al retorno de las poblaciones susceptibles.

MATERIALES Y MÉTODOS

El material biológico utilizado fue proporcionado por el Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH) y el Centro de Sanidad Vegetal del Estado de Guanajuato (CESAVEG), quienes lo colectaron en cuatro campos de cultivo,

ubicados en la región del Bajío Mexicano (Col 4, Col 7, Gto) con reporte de resistencia a herbicidas que inhiben la síntesis de la ACCasa (Tafoya y Morgado, 2000). Una colecta adicional (Jal) se realizó a 100 km de distancia en donde también se ha reportado la presencia de poblaciones resistentes. Como susceptible se empleó una colecta proveniente de una localidad en la que nunca se ha utilizado el control químico (comunicación personal con los productores).

Condiciones de Crecimiento

La investigación se realizó en condiciones de invernadero en el Colegio de Postgraduados *Campus* Montecillo, Texcoco, Edo. de México (19° 29' N y 98° 53' O y 2250 msnm). El experimento se llevó a cabo en dos estaciones otoño-invierno (octubre 2009 – marzo 2010) y primavera-verano (abril 2010 – agosto 2010). Las semillas fueron sembradas en macetas de 1.7 L de capacidad, el sustrato utilizado fue tierra de monte y arena en proporción 2:1. La humedad en el sustrato se mantuvo cerca de su capacidad de campo durante todo el experimento.

Las condiciones ambientales de temperatura mínima y máxima diaria del invernadero fueron registradas durante la duración del experimento. Se calculó el número de grados días desarrollo (GDD) con la fórmula propuesta por Forcella y Banken (1996):
$$GDD=(T_{max}-T_{min})/2.$$

Fenología y acumulación de grados días desarrollo

Durante el experimento se llevó el registro de la fenología, las etapas registradas fueron: emergencia, aparición del segundo y cuarto nófilo, aparición de la espiga y

final de la antesis. Se consideró que se había alcanzado cada etapa cuando el 50% de las plantas de cada colecta presentaba las características antes mencionadas. Se estimó el número de GDD transcurridos entre una etapa fenológica y la subsiguiente.

Producción y distribución de biomasa

En cada etapa fenológica se realizaron muestreos destructivos para obtener el peso seco. En dichos muestreos, las plantas fueron disectadas en sus diferentes estructuras (raíz, vainas, láminas foliares, tallos, inflorescencias y semillas). Los órganos fueron introducidos en bolsas de papel y colocados en una estufa de secado a 80 °C hasta llegar a peso constante. Se registró el peso (g) de cada uno de los órganos y se sumaron para obtener el peso de la biomasa por planta. Asimismo, se determinó la asignación porcentual de materia seca correspondiente a cada órgano. Por último, se contó el número de vainas, láminas foliares, macollos y espigas por planta.

Análisis de crecimiento

Se utilizó la metodología propuesta por Hunt (1978). Se evaluaron: la tasa de crecimiento absoluto (TCA), relativo (TCR), asimilación neta (TAN) y duración del área foliar (DAF). La duración del área foliar se expresa generalmente en días, sin embargo por tratarse de condiciones de invernadero el cálculo se expresó en $\text{dm}^2 \text{ día}^{-1}$.

Costo de la resistencia en la biomasa y fecundidad

Para evaluar el costo debido a la resistencia a los herbicidas inhibidores de la ACCasa en la biomasa y la fecundidad se utilizó la fórmula propuesta por Bergelson y Purrington

(1996): (resistente/susceptible x 100). Si el resultado es mayor de 100 indica que existe una ganancia por la resistencia. Por el contrario, si es menor de 100 indicará que existe un costo sobre las aptitudes de la población resistente.

Análisis estadístico

En ambas estaciones de crecimiento se utilizó un diseño experimental completamente al azar. Para eliminar el efecto de las diferentes estaciones (otoño-invierno y primavera-verano) los datos de ambos ciclos fueron analizados como una serie de experimentos en el tiempo, en donde la temporada de crecimiento esta anidada dentro de las repeticiones (Cochran and Cox, 1990).

Previo al análisis estadístico, los porcentajes fueron transformados con la función arcoseno, posterior al análisis los datos fueron retransformados. Las Diferencias significativas entre las medias de los tratamientos fueron identificadas con la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey ($P < 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fenología y acumulación de grados días desarrollo

Las colectas estudiadas mostraron diferencias en la fenología durante el desarrollo del experimento. La población susceptible (S) requirió un total de 159 d (3222 GDD) para completar su ciclo biológico, de éstos, 125 d (2523 GDD) transcurrieron desde la germinación hasta la aparición de la espiga. Esta fenología y acumulación de GDD fue similar a la de las colectas resistentes (R) Col 7 y Jal que acumularon un total de 163 d (3265 GDD) y 159 d (3222 GDD), respectivamente (Cuadro 1).

Las colectas R, Col 4 y Gto tuvieron un desarrollo precoz, en ellas las diferencias se expresaron desde el primer muestreo y conforme avanzó el desarrollo fueron más evidentes. La floración en ambas se presentó a los 90 d (1851 GDD), siendo 35 d más precoces que el S. La madurez fisiológica ocurrió 16 d antes que el S en Col 4 y 19 d en Gto.

Cuadro 1. Días después de la germinación y Grados días desarrollo (GDD) acumulados en los muestreos de biomasa de los biotipos susceptibles y resistentes (Col 4, Col 7, Gto y Jal) a herbicidas que inhiben la síntesis de la ACCasa de *Phalaris minor*.

Biotipo	2do nomófilo		4to Nomófilo		I. Floración		Madurez Fis.	
	Días	GDD	Días	GDD	Días	GDD	Días	GDD
Susceptible	15	306	37	733	125	2523	159	3222
Col 4	15	306	26	522	90	1851	140	2892
Col 7	15	312	40	588	134	2720	162	3222
Gto	12	247	26	522	90	1851	143	2926
Jal	18	372	37	733	121	2502	159	3265

La duración del ciclo biológico en el S resultó similar a lo consignado por Yadav y Malik (2005) para el ciclo de otoño en la India (156 d). Los procesos de cambios en la fenología se han observado como una respuesta evolutiva a la adaptación en los agroecosistemas, principalmente en la sincronización de los ciclos de cultivo (Duke, 1985) y como respuesta a la aplicación de los herbicidas y a las labores culturales (Mortimer, 1997). Estas características podrían ser un indicador de que las poblaciones R, Col 4 y Gto han estado expuestas a una presión de selección impuesta por las prácticas agrícolas además de la aplicación de herbicidas (Weinig, 2005). Además, los informes de resistencia realizados por Tafuya y Morgado (2000) sobre estas colectas,

muestran que el índice de resistencia para las colectas Col 4, Col 7 y Gto es de 12, mientras que la colecta Jal es de 6.8. Lo anterior indica que probablemente la evolución de la resistencia de estas poblaciones ocurrió de manera independiente por las prácticas culturales de cada productor.

Producción y distribución de biomasa

La dinámica de acumulación de biomasa para cada colecta se presenta en la Figura 1. A la madurez fisiológica, la colecta Jal presentó la mayor acumulación de biomasa, seguida de Susceptible y Col 7. Por el contrario, las colectas que tuvieron un comportamiento precoz (Col 4 y Gto) produjeron menos biomasa.

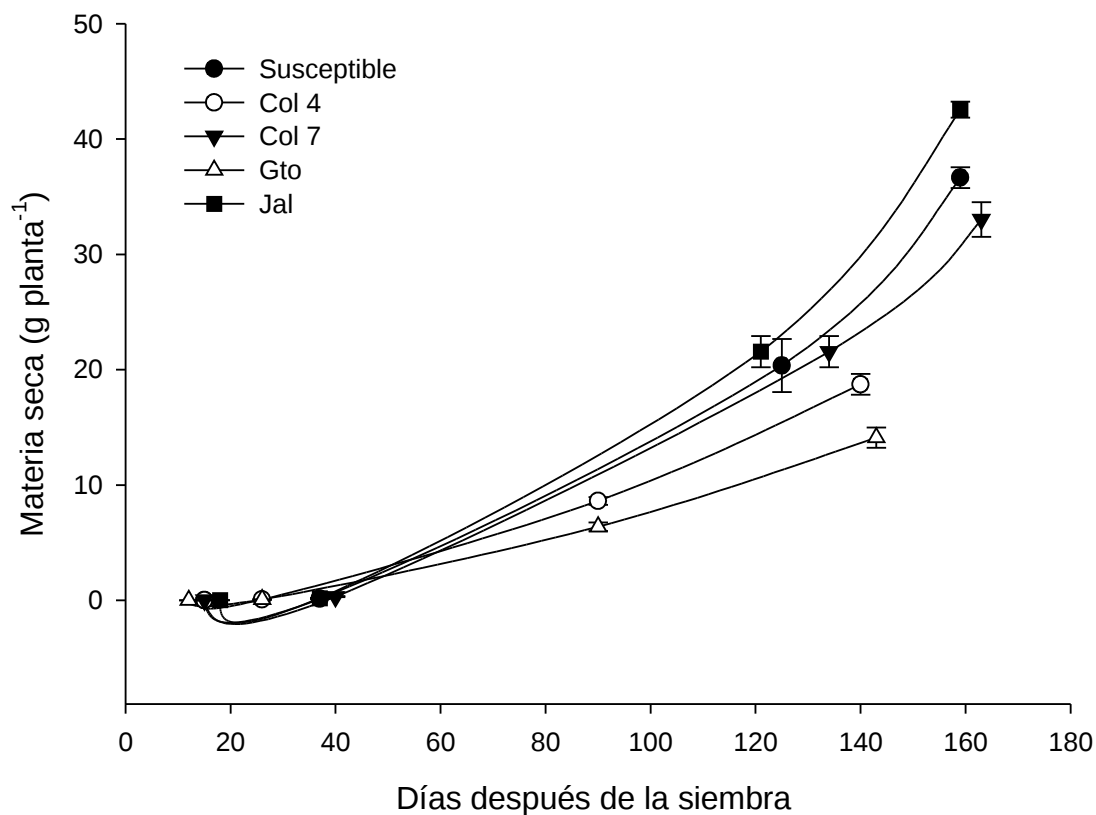


Figura 1. Dinámica de la acumulación de biomasa (g planta⁻¹) en biotipos de *Phalaris minor* Susceptibles y resistentes (Col 4, Col 7, Gto y Jal) a herbicidas inhibidores de la ACCasa.

La asignación de materia seca a los órganos de la planta mostró que la raíz tuvo el porcentaje mayor de asignación de biomasa en todas las colectas (ejemplo, 54.7% en el S), seguida de los tallos, hojas y semillas. En las colectas precoces se observó una reducción de hasta un 20% en la asignación de la raíz, con respecto al S (Cuadro 2). La reducción en el ciclo biológico y la biomasa, pueden ser adaptaciones a un ciclo biológico efímero para asegurar la producción de semillas (Baker 1991). Al respecto,

Grime (1979) menciona que las malezas han evolucionado para adaptarse a sitios con alta productividad y perturbación, tal como sucede en un campo de cultivo.

Cuadro 2. Peso de materia seca de raíz, tallo, hojas y biomasa total (g planta^{-1}); de los biotipos susceptibles y resistentes (Col 4, Col 7, Gto y Jal) a herbicidas que inhiben la síntesis de ACCasa de *Phalaris minor*. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa (Tukey $p < 0.05$).

	Raíz		Tallo		Hojas		inflo		semillas		Biom total
	g	%	g	%	g	%	g	%	G	%	g
Sus	22 a	54.7 a	8.1 ab	20.1 ab	5.9 b	14.7.b	0.5 cd	1.2 c	3.7 a	9.2 ab	36.6 b
COL 4	8.2 b	38.5 b	6.0 bc	28.2 bc	3.2 c	15.0 c	1.3 b	6.1 b	2.6 ab	12.2 a	19.5 c
COL 7	19.3 a	49.2 a	10.0 a	25.5 a	7.2 ab	18.4 a	0.2 d	0.5 d	2.5 ab	6.4 c	36.8 b
Gto	5 b	31.8 b	4.8 c	30.6 c	3.2 c	20.4 a	1.1 bc	7.0 a	1.6 b	10.2 a	14.2 d
Jal	21.2 a	46.5 a	11.0 a	24.1 a	8.0 a	17.5ab	2.4 a	5.3 b	3.0 ab	6.6 c	42.8 a
DHS	***	***	***	***	***	***	***	***	**	***	***
SIG	4.4	7.8	3.2	6.2	1.6	3.5	0.7	2.4	1.5	3.6	0.5

En lo que respecta a la parte aérea, la colecta Jal obtuvo la acumulación mayor de materia seca en conjunto (tallos, hojas e inflorescencias). Por el contrario, Gto fue la de menor acumulación en estas estructuras (Cuadro 2). Las diferencias entre colectas estuvieron relacionadas con el mayor número de tallos y hojas en los biotipos de ciclo largo, los cuales, al presentar mayor número de hojas, el área foliar también se incrementó (Cuadro 3).

Bergelson y Purrington (1996) reportan que la biomasa en algunos casos se ve favorecida por la resistencia, tal como en este caso. Sin embargo, en términos ecológicos y evolutivos la fecundidad es un atributo que es más importante para el aporte del *fitness* de la población que la producción de biomasa (Harper1977).

En la producción de semillas (g planta^{-1}) no existieron diferencias significativas entre el Susceptible y los R, Col 4, Col 7 y Jal. La colecta R, Gto tuvo la menor producción de semillas por planta. No obstante, la asignación en porcentaje tuvo una tendencia diferente; las colectas precoces tuvieron la asignación de recursos mayor a la producción de semillas mientras las colectas no precoces asignaron menor cantidad a la semilla (Cuadro 2).

El incremento en la asignación de biomasa a las semillas en las colectas precoces se debió a que su floración inició 30 d antes y por lo tanto dispusieron de mayor tiempo para la producción de espigas. Esto también puede deberse a una respuesta compensatoria por la disminución del tamaño de la planta con el incremento a la asignación de materia seca a la producción de semillas (esfuerzo reproductivo).

Las colectas resistentes con mayor producción de biomasa tuvieron una reducción en el porcentaje de asignación hacia las semillas respecto al S. Esto indica que el esfuerzo reproductivo es reducido y puede ser uno de los costos asociados con la penalización por la resistencia (Bergelson y Purrington, 1996; Vila-Aiub *et al.*, 2005).

Análisis de crecimiento

Las tasas de crecimiento determinadas tuvieron tendencias similares a la acumulación de biomasa registrada. Las tasas de crecimiento absoluto y relativo (TCA y TCR) fueron más altas en las colectas R con mayor acumulación de biomasa (Jal, Sus y Col 7) (Cuadro 3). La TCR mostró que Col 7 y Jal tienen la mayor eficiencia en la producción de biomasa a partir de la biomasa existente.

El área foliar de la colecta S fue más eficiente en la producción de biomasa, por esto su

tasa de asimilación neta (TAN) fue significativamente más alta que todos los resistentes. Estas diferencias con las otras colectas de ciclo largo puede estar relacionado con la resistencia que afecta en algunos casos la eficiencia en el metabolismo por el cambio en los sitios de acción (Vila-Aiub, 2005). Aún se desconoce si la causa de la resistencia de los biotipos de *P. minor* en México es por cambio en el sitio de acción (genética) o por un cambio en el metabolismo (metabólica).

La duración del área foliar fue mayor en S, Col 7 y Jal, esto fue el resultado de una alta acumulación de biomasa en hojas, mayor número de hojas y área foliar respecto a Col 4 y Gto.

Cuadro 3. Análisis de crecimiento (Tasa de crecimiento absoluto TCA, tasa de crecimiento relativo TCR, tasa de asimilación neta TAN y duración del área foliar DAF) de las colectas susceptibles y resistentes (Col 4, Col 7, Gto y Jal) a herbicidas que inhiben la síntesis de ACCasa de *Phalaris minor*. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa (Tukey $p < 0.05$).

Biotipo	TCA g d ⁻¹	TCR g g ⁻¹ d ⁻²	TAN g dm ⁻² d ⁻¹	DAF dm ² d ⁻¹
Susceptible	163.2 a	0.27 b	0.84 a	310 b
Col 4	91.7 b	0.26 b	0.64 b	204 b
Col 7	158.6 a	0.29 a	0.57 b	576 a
Gto	82.7 b	0.27 b	0.50 b	278 b
Jal	169.6 a	0.28 ab	0.61 b	548 a
SIG	***	***	***	***
DHS (Tukey 0.05)	12.86	0.0012	0.14	118

Costo de la resistencia en la biomasa y la fecundidad

El índice utilizado para cuantificar el *fitness* relativo en la producción de biomasa entre S y R no mostró un costo generalizado en todas las colectas (Cuadro 4). En Col 7 y Jal la resistencia a herbicidas ocasionó un incremento en su biomasa del 7.3 y 12.5%

respectivamente; mientras que Col 4 y Gto que presentaron características de precocidad tuvieron reducciones del 49.5 y 61%, respectivamente.

Cuadro 4. Biomasa y fecundidad relativa (*relative fitness*) de acuerdo a la fórmula de Bergelson y Purrington (1996) de los biotipos susceptibles y resistentes (Col 4, Col 7, Gto y Jal) a herbicidas que inhiben la síntesis de la ACCasa de *Phalaris minor*. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa (Tukey $p < 0.05$).

	Biomasa	Fecundidad
Col 4	50.5 b	73.8 b
Col 7	107.3 a	65.2 c
Gto	39.0 b	36.8 d
Jal	112.5 a	81.6 a
SIG	**	**
DHS	32.8	7.2

Por el contrario, para el caso de la fecundidad (número de semillas por planta), todas las colectas mostraron costos respecto al susceptible (Cuadro 4). Bergelson y Purrington (1996) mencionan que la resistencia a herbicidas y patógenos generalmente tiene un costo sobre la fecundidad de las especies, lo cual coincide con lo encontrado en esta investigación.

Los estudios acerca de los costos de la resistencia sobre el *fitness* han sido cuestionados por el origen de las colectas utilizadas (Vila-Aiub *et al.*, 2009). El fondo genético y la historia de selección pueden cambiar de un sitio a otro por causa de las prácticas agrícolas y los procesos de presión de selección que imponen los herbicidas en cada campo de cultivo (Kawecki, 2008). Estudios sobre la genética de las poblaciones presentes en el Bajío han mostrado que no existen mutaciones en genes del cloroplasto (investigación en proceso), lo que indica que estas poblaciones tienen una baja diversidad genética y que desde la introducción de esta maleza a México ha

experimentado pocos procesos de divergencia, por lo cual podría considerarse a toda la región del Bajío como una zona con un fondo genético uniforme.

De acuerdo a las características observadas de resistencia (R) y crecimiento, es probable que estas colectas hayan evolucionado hacia la resistencia de manera independiente. Sin embargo, la pérdida de la fecundidad fue observada de manera general en todas las colectas resistentes. Lo anterior puede dar una idea más general acerca del proceso de pérdida de aptitudes por la evolución hacia la resistencia. Recientemente Owen *et al.* (2011) han encontrado que los costos sobre la aptitud en semillas en 406 poblaciones de *Lolium rigidum* en Australia son muy similares, e indican que algunas de estas poblaciones probablemente evolucionaron de manera independiente a la resistencia.

Los costos encontrados en la fecundidad podrían ser uno de los factores que ocasionaran el desplazamiento de los R en ausencia del factor de selección (herbicida). Métodos de control como la rotación de cultivos, cambios en el ingrediente activo de los herbicidas entre otros podrían cambiar la dominancia de los individuos resistentes en las poblaciones. El estudio del ciclo biológico completo debe ser el primer paso para la cuantificación del costo por la resistencia. A partir de la información generada se podrá ir más a detalle en ciertos aspectos del ciclo biológico (germinación, establecimiento, floración, etc.) como lo proponen Maxwell *et al.* (1996) para poder conocer la dinámica de la población en ausencia del factor de selección y el retorno a la susceptibilidad.

LITERATURA CITADA

Baker, H. G. 1991. The Continuing Evolution of Weeds. *Economic Botany*, 45(4):445-449.

Baucom, R. S. and Holt, J. S. 2009. Weeds of agricultural importance: bridging the gap between evolutionary ecology and crop and weed science. *New Phytologist*. 184: 741-743.

Bergelson, J. and Purrington, C. B. 1996. Surveying patterns in the cost of resistance in plants. *The american Naturalist* 148: 536-558.

Christoffers, M. J. 1999. Genetic aspects of herbicide-resistant weed management. *Weed Technology* 13: 647-652.

Cochran, W.G. and Cox, G.M. 1990. Experimental designs. John Willey and Sons USA, 611 p.

Duke, S. O. 1985. Weed Physiology. CRC Press, USA.

Forcella, F. and Banken, K. R. 1996. Relationships among Green Foxtail (*Setaria viridis*) Seedling Development, Growing Degree Days, and Time of Nicosulfuron Application. *Weed Technology* 10(1):60-67.

Grime, J. P. 1979. Plant strategies and vegetation processes. Wiley, New York.

Gundel, P. E.; Martínez-Ghersa, M. A. and Ghersa, C. M. 2008. Dormancy, germination and ageing of *Lolium multiflorum* seeds following contrasting herbicide selection regimes. *European Journal of Agronomy* 28: 606-613.

Harper, J. L. 1977. The population biology of plants. Academic Press, London.

Heap I. M. 2012. International survey of herbicide-resistant weeds.

<http://www.weedscience.org.>, Accessed 10 february 2012.

Hunt, R. 1978. Plant growth analysis. Ed. Edward Arnold. London. 67 pp

Kawecki, T. J. 2008. Adaptation to Marginal Habitats. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 39: 321-342.

Linhart, B. Y. and Grant, C. M. 1996. Evolutionary significance of local genetic differentiation in plants. *Annunual Review of Ecology and Systematics* 27: 237–277.

Maxwell, B. D.; Roush, M. I. and Radosevich, S. R. 1990. Predicting the evolution and dynamics of herbicide resistance in weed populations. *Weed Technology* 4: 2-13.

Mortimer, A. M. 1997. Phenological adaptation in weeds-an evolutionary response to the use of herbicides?. *Pest Management Science* 51: 299–304.

Owen, M. J.; Michael, P. J.; Renton, M.; Steadman, K. J. and Powles, S. B. 2011. Towards large-scale prediction of *Lolium rigidum* emergence. II. Correlation between dormancy and herbicide resistance levels suggests an impact of cropping systems. *Weed Research* 51, 133–141.

Palumbi, S. R. 2001. Humans as the World's Greatest Evolutionary Force. *Science* 293:1786-1790.

Powles, S. B.; Yu, Q. 2010. Evolution in Action: Plants Resistant to Herbicides. *Annual Review of Plant Biology* 61:8.1–8.31.

Tafoya, J. A. and Morgado, J. 2000. [Weed resistance to herbicide application.] *Revista Mexicana de la Ciencia de la Maleza*. Special number. Universidad Autónoma Chapingo, 46. [In Spanish].

Thompson, C. R.; Thill, C. D. and Shafii, B. 1994. Germination characteristics of

sulfonylurea resistant and susceptible Kochia (*Kochia scoparia*). **Weed Science** 42: 50-56.

Vila-Aiub, M.; Neve, P. and Powles, S. B. 2005. Resistance cost of a cytochrome P450 herbicide metabolism mechanism but not an ACCase target site mutation in a multiple resistant *Lolium rigidum* population. **New Phytologist** 167: 787-796.

Vila-Aiub, M.; Neve, P. and Powles, S. B. 2009. Fitness costs associated with evolved herbicide resistance alleles in plants. **New Phytologist** 184: 751–767.

Vila-Aiub, M.; Neve, P.; Steadman, K. J. and Powles, S. B. 2005b. Ecological fitness of a multiple herbicide-resistant *Lolium rigidum* population: dynamics of seed germination and seedling emergence of resistant and susceptible phenotypes. **Journal of Applied Ecology** 42: 288-298.

Weinig, C. 2005. Rapid Evolutionary Responses to Selection in Heterogeneous Environments among Agricultural and Nonagricultural Weeds. **International Journal of Plant Sciences** 166(4):641-647.

Wiederholt, R. J. and Stoltenberg, D. E. 1996. Similar Fitness between Large Crabgrass (*Digitaria sanguinalis*) Accessions Resistant or Susceptible to Acetyl-Coenzyme a Carboxylase Inhibitors. **Weed Technology** 10 (1):42-49.

Wiederholt, R. J. and Stoltenberg, D. E. 1996b. Absence of Differential Fitness between Giant Foxtail (*Setaria faberi*) Accessions Resistant and Susceptible to Acetyl-Coenzyme A Carboxylase Inhibitors. **Weed Science** 44 (1):18-24.

Yadav, A. and Malik, R. K. 2005. Herbicide Resistant *Phalaris minor* in Wheat –A Sustainability Issue. Resource Book. Department of Agronomy and Directorate of

Extension Education, CCSHAU, Hisar, India pp. 152.

Yu, Q.; Collavo, A.; Zheng, M. Q.; Owen, M.; Sattin, M. and Powles, S. B. 2007.

Diversity of Acetyl-Coenzyme A Carboxylase Mutations in Resistant *Lolium* Populations:

Evaluation Using Clethodim. ***Plant Physiology*** 145:547–558.

CAPÍTULO 5

COMPETENCIA POR LUZ EN BIOTIPOS DE ALPISTILLO (*Phalaris minor* Retz.) SUSCEPTIBLES Y RESISTENTES A INHIBIDORES DE la ACCasa

RESUMEN

La resistencia a herbicidas tiene una penalización sobre las aptitudes competitivas de las plantas. Esta penalización puede ocasionar que las plantas resistentes sean desplazadas cuando el factor de selección se retire de las poblaciones. *P. minor* es una planta anual que presenta biotipos resistentes y susceptibles a herbicidas inhibidores de la ACCasa. Investigaciones realizadas en los biotipos presentes en el Bajío han mostrado que existen costos en diferentes características de las semillas (latencia, longevidad, germinación) y en el crecimiento de las plantas (precocidad, baja acumulación de biomasa y fecundidad). Sin embargo, aún se desconoce si esas diferencias pueden tener un costo ecológico. El objetivo del presente estudio fue comprobar si la evolución de la resistencia reduce la aptitud para competir por el establecimiento en la etapa de plántula. Se realizaron experimentos de competencia entre cuatro biotipos resistentes (R) y uno susceptible (S). Los experimentos estuvieron basados en el diagrama de competencia de De Witt en el que se emplearon tres proporciones de los biotipos R y S de 100:0 50:50 y 0:100. En un primer experimento, las semillas de cada biotipo fueron estratificadas a 5 °C por 10 d y posteriormente sembradas en macetas conteniendo suelo para que germinaran naturalmente, teniéndose una germinación diferencial entre biotipos. En el segundo experimento, las semillas fueron tratadas con GA3 para que germinaran simultáneamente en laboratorio y trasplantadas a las 48 h después de la aparición de la radícula. A partir de la siembra, cada semana se tomó una fotografía en plano perpendicular a la superficie de la maceta. Posteriormente dichas fotos fueron procesadas digitalmente en el software CobCal Versión 1.0 para calcular la proyección del área ocupada por el follaje. Los

resultados mostraron que el retraso en la germinación de los biotipos R, ocasionó que tuvieran una menor proyección de la cobertura del dosel con respecto al S. Cuando la germinación fue simultánea para todos los biotipos, no se observó diferencia en el área del dosel. Las características de germinación retrasada y por lo tanto, la diferencia en el área entre los biotipos S y R en un momento dado podría ser la causa del desplazamiento de estas últimas en ausencia del factor de selección.

Palabras Clave: *Proyección del dosel, De witt, CobCal*

INTRODUCCIÓN

La resistencia a herbicidas tiene una penalización sobre las aptitudes competitivas de las plantas (*fitness*) (Bergelson y Purrington, 1996; Baucom y Holt, 2009). Esta penalización puede ocasionar que los organismos resistentes sean desplazados por los susceptibles cuando el factor de selección se retire de las poblaciones (Maxwell *et al.*, 1990, 1996). Cuando las poblaciones convergen en espacio y tiempo se establecen relaciones de competencia entre las plantas por encima y por debajo del suelo (Begon *et al.*, 1996). En un campo de cultivo el agua y los nutrientes son suministrados por el agricultor en cantidades que no representan un desabasto y en los casos en los que exista, es casi imperceptible y no afecta la productividad de las plantas (malezas y cultivo). La competencia por luz se establece por la capacidad que tenga cada individuo de germinar, y generar su maquinaria fotosintética, es decir, sus hojas, la disposición de éstas y la altura en el dosel (Duke, 1985).

Durante mucho tiempo se pensó que la resistencia a inhibidores de la ACCasa no causaban una reducción en la aptitud de las plantas (*fitness*). Por ejemplo, estudios

realizados en *Digitaria sanguinalis* y *Setaria faberi* donde se evaluó la competencia usando series de reemplazo de De Wit en poblaciones susceptibles y resistentes a herbicidas inhibidores de la ACCasa, no mostraron costos en la producción de biomasa y semillas (Wiederholt y Stoltenberg 1996, 1996b). Sin embargo, estudios recientes han encontrado costos en las primeras etapas del ciclo biológico, como en la longevidad de la semilla, incremento de la latencia, reducción de la velocidad de germinación y velocidad de emergencia, (Vila-Aiub *et al.*, 2005; Gundel *et al.*, 2008; Owen *et al.*, 2011). Se ha propuesto que estas diferencias son una adaptación a las labores del cultivo y para escapar a las primeras aplicaciones de los herbicidas, aunque estas diferencias no están ligadas genéticamente a la resistencia (Mortimer, 1997; Owen *et al.*, 2011). En condiciones de competencia y sin el agente de selección (herbicida), es probable que la rápida germinación de los biotipos susceptibles pudiera dar ventajas en el establecimiento desplazando a los resistentes (Maxwell *et al.*, 1990; Baucom y Holt, 2009; Neve *et al.*, 2009).

Phalaris minor es una planta anual que evolucionó a la resistencia a herbicidas inhibidores de la ACCasa en el Bajío Mexicano. Investigaciones realizadas en las poblaciones resistentes presentes en el Bajío han mostrado que existen costos en diferentes características fisiológicas de las semillas, como mayor latencia, menor longevidad, y menor germinación (Capítulo 3) y en el crecimiento de las plantas tales como, precocidad, baja acumulación de biomasa y fecundidad (Capítulo 4). Sin embargo, aun se desconoce si esas diferencias pueden tener un costo ecológico que pudiera causar el desplazamiento en condiciones no selectivas. El objetivo del presente estudio fue determinar si la evolución a la resistencia reduce la aptitud para competir

por el establecimiento en la etapa de plántula en *P. minor*, para ellos se estudió el tiempo requerido para la germinación, competencia por luz y se calcularon índices para evaluar la competencia (agresividad e intensidad de competencia).

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron cuatro accesiones con reporte de resistencia a diclofop (Col 4, Col 7, Gto IR=12, clodinafop) provenientes de la región del Bajío, México (20° 25' N 101° 38' O); otra colecta (Jal) fue colectada a una distancia de 100 km, en donde se ha reportado la presencia de individuos resistentes a diclofop (IR=6.8) (Tafoya y Morgado 2000). La colecta susceptible fue colectada en una zona ubicada a 25 km en donde no se aplican herbicidas como método de control de malezas (comunicación personal con los productores). Las semillas fueron proporcionadas por el Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH) y el Centro de Sanidad Vegetal del Estado de Guanajuato (CESAVEG).

Para eliminar las diferencias en latencia y deterioro por el almacenamiento, las semillas de las accesiones originales fueron cultivadas bajo condiciones de invernadero para la obtención de semillas nuevas. En el momento de la floración, las espigas fueron cubiertas con bolsas de papel encerado para evitar la polinización cruzada y para la colecta de las semillas, ya que éstas se desprenden al alcanzar la madurez.

Tiempo requerido para la germinación

Las semillas de *P. minor* presentan latencia primaria por la falta de maduración del embrión. Por tal motivo las semillas fueron estratificadas a una temperatura de 5 °C

durante 10 d, simulando la maduración que ocurre durante su permanencia en el suelo en la temporada de invierno. Estudios previos han demostrado que en estas accesiones, el tratamiento de estratificación es suficiente para que las semillas alcancen su máxima germinación (Capítulo 2).

Posterior a la estratificación un lote de semillas se puso a germinar en condiciones de laboratorio (20 °C, 12 h luz). Durante 60 d se realizaron conteos en intervalos de 5 d. A las semillas que no germinaron se les aplicó la prueba de cloruro de tetrazolio para verificar sí, éstas eran viables.

Las curvas de germinación fueron analizadas con un análisis de tiempos de falla (Failure-time analysis) mediante PROC LIFETEST (SAS, versión 9.2). Los estimadores utilizados fueron Logrank y Wilcoxon. Se utilizaron comparaciones susceptible vs resistente para determinar si existieron diferencias en la germinación.

Competencia por luz

En este estudio se evaluó la competencia entre el susceptible y las cuatro accesiones resistentes, los experimentos estuvieron basados en series de reemplazo de De Wit (1960), las cuales consisten en establecer poblaciones en diferentes proporciones. En este estudio se usaron las proporciones 100:0 50:50 y 0:100, mezclándose la accesión susceptible con cada una de las resistentes. En macetas de 13.5 cm de diámetro (572.5 cm²) conteniendo suelo franco se colocaron las semillas a una distancia de 2.5 cm entre ellas. Esta densidad es similar a la que ocurre en condiciones de campo y puede reducir el rendimiento hasta en 90% (Afentouli y Eleftherohorinos, 1997; Park *et al.*, 2003).

El estudio fue dividido en dos experimentos: en el primero, las semillas de cada accesión fueron colocadas en sus respectivas posiciones y cubiertas con una capa de 2 mm de suelo. Lo anterior con el objetivo de que la germinación ocurriera de manera natural y se iniciara la competencia por la cobertura del dosel de la misma forma. En el segundo experimento, las semillas fueron germinadas en laboratorio y trasplantadas a las 48 h después de la aparición de la radícula, para que la competencia iniciara simultáneamente.

Debido a que los individuos de las poblaciones susceptibles y resistentes son morfológicamente similares y para que al final del experimento no hubiera confusión en la identificación de las plantas, en las combinaciones 50:50 se colocaron palillos de madera (5 cm de largo) a un lado de los individuos resistentes. A partir de la fecha de siembra, cada 7 d se tomó una fotografía en plano perpendicular a la superficie de cada maceta. Posteriormente, las fotografías fueron procesadas digitalmente en el software CobCal Versión 2.0 para calcular el área ocupada por el follaje (% de cobertura).

Los datos de la dinámica de la cobertura del dosel fueron ingresados en el software curve-expert (versión 1.5) para encontrar el modelo que mejor ajuste diera a los datos. En el caso del primer experimento, el modelo que mejor se ajustó a las coberturas del dosel fue el modelo logístico (Eq 1).

$$\%C = \frac{a}{1 + e^{\frac{(X - t_{E50})}{b}}}$$

Donde: a = cobertura máxima; X = tiempo en que se alcanza el 50% de cobertura; b =

pendiente alrededor del 50% de cobertura.

En el segundo experimento el mejor ajuste fue el modelo lineal (Eq 2).

$$Y = a + bx$$

Donde: a = punto donde la recta corta al eje "x" (ordenada al origen) y b = es la pendiente.

Posteriormente, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y cuando se encontraron diferencias significativas, se aplicó la prueba de comparación de medias de Tukey (0.05).

La duración de cada experimento estuvo en función de la cobertura por las plantas del área de la maceta, en el momento en que se alcanzó la máxima cobertura el experimento se finalizó. En ninguno de los experimentos se alcanzó una cobertura del 100%. Debido al crecimiento erecto de *P. minor* y a la filotaxia de las hojas, que ocasiona que haya sobreposición de unas con otras, lo que permite la penetración de luz a través del dosel.

Al final de los experimentos, se determinó la materia seca de la parte aérea de las plantas. Los individuos de cada tratamiento fueron colocados en bolsas de papel estraza y posteriormente se introdujeron en una estufa (80 °C) durante 72 h para obtener el peso de la materia seca.

Índices para evaluar la competencia

Con los datos de materia seca, se evaluaron los índices de agresividad e intensidad de competencia en cada uno de los experimentos. Las fórmulas y los autores se muestran en el cuadro 1.

Cuadro 1. Índices de competencia evaluados en las series de reemplazo de De Witt entre poblaciones de *Phalaris minor* susceptible y resistentes a herbicidas inhibidores de la ACCasa.

	ÍNDICE	AUTOR
Agresividad	$A = \frac{1}{2} [(A \text{ mix} + A \text{ mono}) / (B \text{ mix} + B \text{ mono})]$	McGilchrist & Trenbath (1971)
Intensidad de competencia	$CI = [(A \text{ mono} + B \text{ mono}) / (A \text{ mix} + B \text{ mix})] - 1$	Wilson (1988)

Productividad relativa de las colectas en competencia

Para evaluar la productividad relativa de las colectas R en competencia con la S se realizaron los diagramas de competencia de De Witt (1969). Se asignó el valor de uno a la productividad obtenida en siembra monoespecífica. A las mezclas 50:50 (S:R) se les asignó el valor proporcional de la productividad respecto a la siembra monoespecífica. Cuando el valor de la productividad de la colecta en mezcla 50:50 es cercana a 0.5 indica que la competencia no modificó la producción de biomasa. Se realizó la suma de las productividades relativas de las mezclas para conocer si la combinación de ambas colectas producía una biomasa mayor o menor respecto a su productividad en monocultivo.

Análisis estadístico

Para identificar diferencias entre ambos experimentos, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) a los datos bajo un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones. Cuando se encontraron diferencias significativas, se aplicó la prueba de comparación

de medias de Tukey (0.05). Las comparaciones de los índices de agresividad e intensidad de competencia fueron realizadas entre sí mismos en función del experimento.

RESULTADOS

Tiempo requerido para la germinación

La germinación de las semillas en condiciones de laboratorio presentó diferencias entre las colectas estudiadas. La colecta susceptible tuvo la mayor velocidad y porcentaje de germinación respecto a todas las resistentes (Figura 1). El susceptible a partir del día 10 tuvo un incremento significativo en el porcentaje de germinación que se mantuvo hasta el final de la prueba.

Por el contrario, en las colectas R se observó una menor velocidad y porcentaje de germinación. Entre los resistentes, la Col 7 tuvo el mayor porcentaje de germinación (60%). En el caso de la colecta Jal no se observó un incremento de la germinación, teniendo la germinación más baja de todas las colectas estudiadas (10%). Las diferencias observadas en la germinación se debieron a la latencia primaria que presentan las diferentes colectas, porque los resultados de la prueba de cloruro de tetrazolio indicaron que todas las semillas eran viables al momento de la prueba.

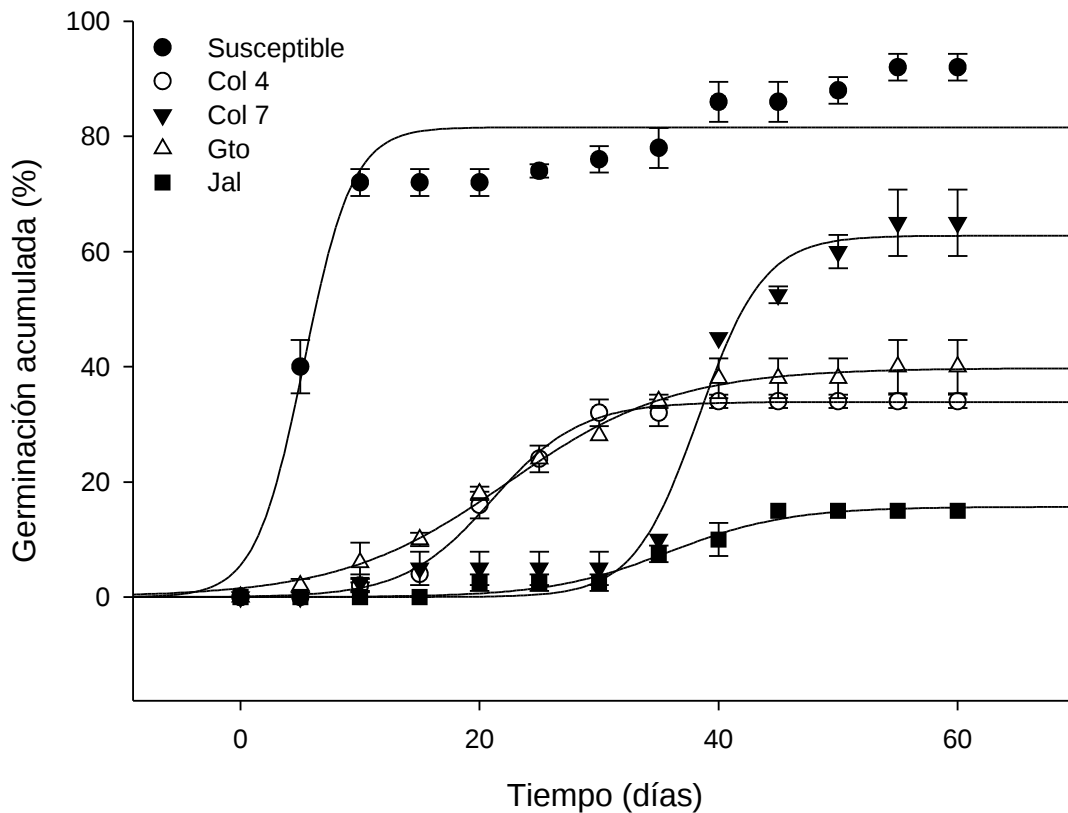


Figura 1. Dinámica de la germinación de semillas de *Phalaris minor* Susceptibles y resistentes (col 4, Col 7, Gto y Jal) a herbicidas inhibidores de la ACCasa.

El resultado del análisis de los tiempos de falla mostró que la germinación del susceptible es diferente estadísticamente ($p < 0.0001$) respecto a las colectas resistentes. Las pruebas de Logrank y Wilcoxon fueron altamente significativas en todos los casos ($p < 0.0001$) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Probabilidad estadística de las pruebas de Logrank y Wilcoxon para el análisis de tiempo de falla en la germinación de colectas R respecto a la colecta S de *Phalaris minor*.

	Col 4	Col 7	Gto	Jal
Logrank	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Wilcoxon	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001

Competencia por luz

Al igual que lo observado en la prueba de germinación; en el experimento donde, la germinación ocurrió en forma natural, en siembra monoespecífica la cobertura del susceptible fue superior estadísticamente en comparación con la cobertura de los resistentes y aun con la suma del S y el R en la siembra en mezcla. Debido a que el susceptible germinó primero, la cobertura del dosel fue dominada por éste en la siembra en mezcla. El retraso de la germinación de la Col 7 y Gto ocasionó que éstas iniciaran después la cobertura del dosel y, tuvieron aunado a la competencia, una cobertura menor del dosel- (Figura 2).

Los parámetros estimados del modelo logístico mostraron que todas las colectas tuvieron el mismo crecimiento. El Susceptible llegó a la máxima cobertura (72.6 d), sin embargo esta diferencia no fue significativa respecto a las colectas Col 4, Col 7 y Jal. El tiempo en el que se llegó a la máxima cobertura no mostró cambios entre los biotipos (Cuadro 3).

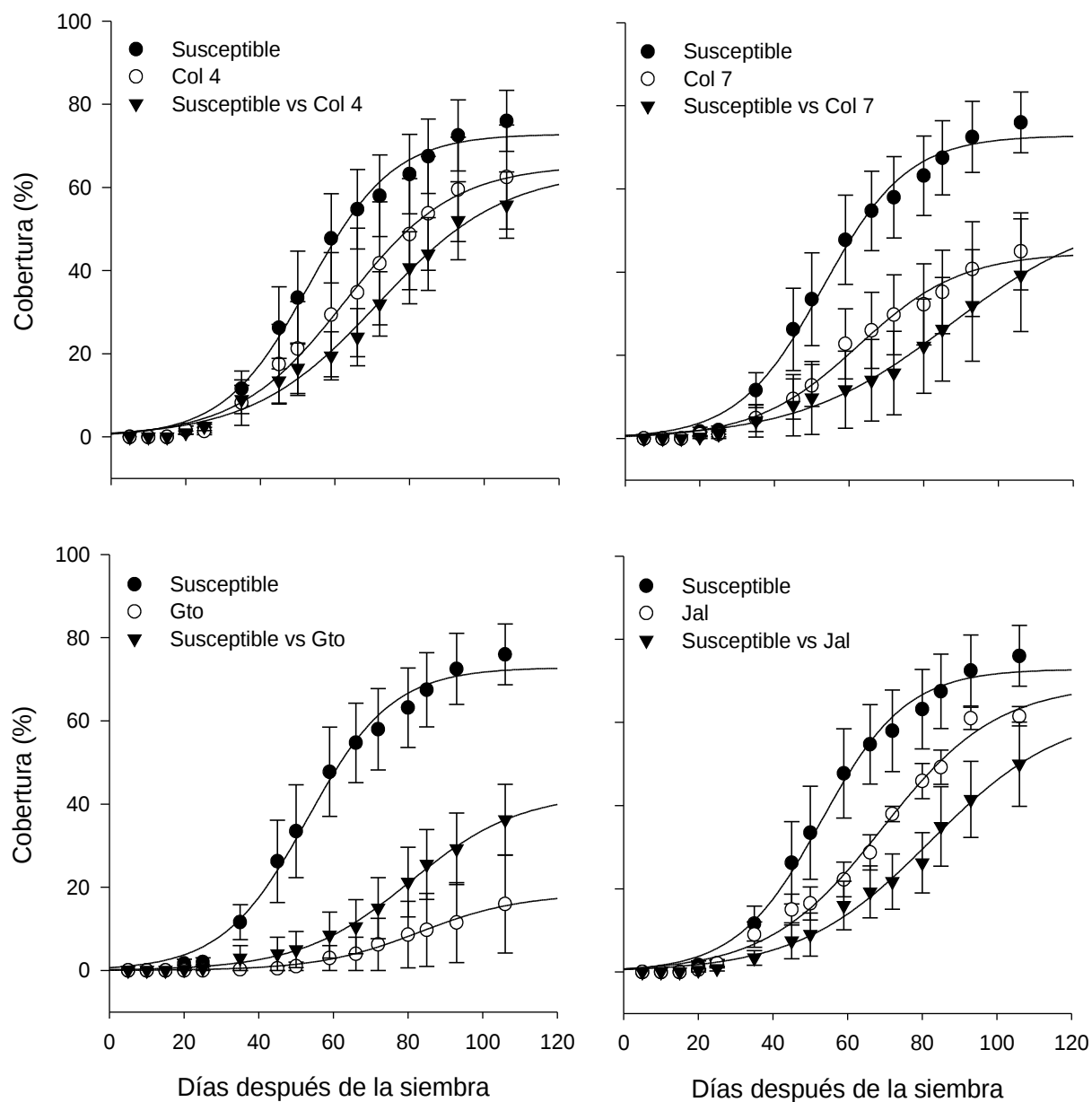


Figura 2. Dinámica de la cobertura del dosel (%) en germinación natural de colectas susceptibles y resistentes (Col 4, Col 7, Go y Jal) a inhibidores de la ACCasa de "alpastillo" (*Phalaris minor*) en siembra mono-específica y en mezcla S:R (50:50) de acuerdo al diagrama de De Witt (1969).

Cuadro 3. Estimadores del modelo logístico por la cobertura del dosel de colectas susceptibles y resistentes (Col 4, Col 7, Go y Jal) a inhibidores de la ACCasa de "alpistillo" (*Phalaris minor*) sembradas en series de reemplazo (De Witt, 1969). a=tiempo (d) a la máxima cobertura; X₀=tiempo en que se alcanza el 50% de cobertura; b=pendiente alrededor del 50% de cobertura

	Sus	Col 4	Col 7	Gto	Jal
a	72.6 a	62.46 a	51.45 ab	17.76 b	68.2 a
b	9.63 ab	9.45 ab	12.14 ab	5.32 b	14.82 a
X ₀	53.57 a	63.7 a	71.76 a	45.9 a	68.85 a

En el segundo experimento, donde la germinación fue inducida para que la competencia iniciara simultáneamente, los valores de la cobertura vegetal fue similar en el S, Col. 4 y Gto cuando crecieron en siembras monoespecificas; mientras que Col 7 y Jal fue inferior estadísticamente. En la siembra 50:50, la cobertura en el Col 4 fue inferior a la del S en monoespecifica; mientras que la cobertura del Gto y S, y Col 7 y S fue similar a la de los R en monoespecifica (Figura 3).

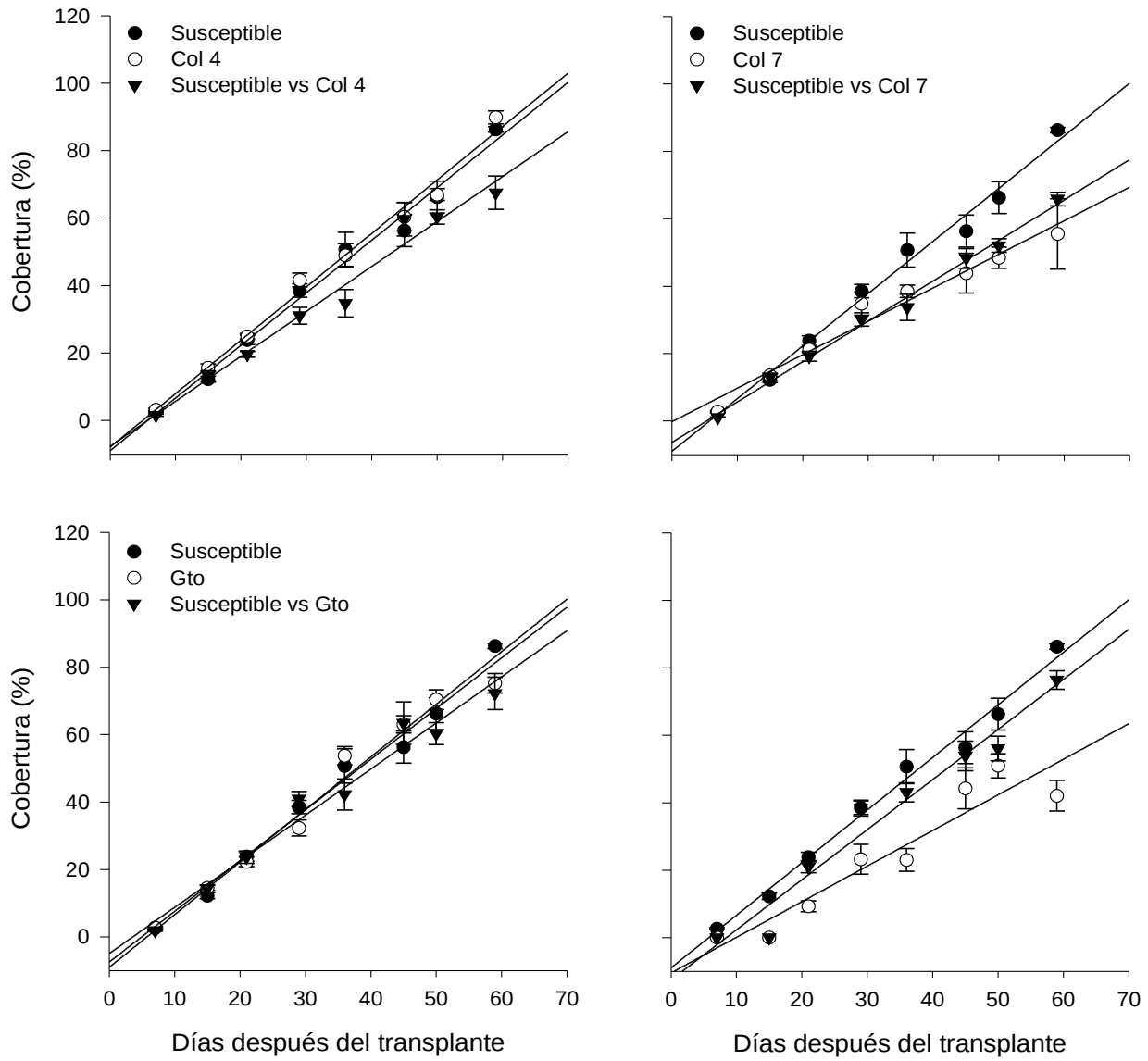


Figura 3. Dinámica de la cobertura del dosel (%) en germinación sincronizada de colectas susceptibles y resistentes (Col 4, Col 7, Go y Jal) a inhibidores de la ACCasa de “alpistillo” (*Phalaris minor*) en siembra monoespecífica y en mezcla S:R (50:50) de acuerdo al diagrama de De Witt (1969).

Comparando las Figura 2 y 3 se observa que la competencia fue más intensa entre los biotipos respecto a lo observado en condiciones de germinación natural. Lo anterior puede corroborarse con el cambio de ajuste, del modelo sigmoideal al modelo lineal. Bajo iguales la condición de germinación inducida todos los biotipos se mostraron igualmente competitivos, incluso las mezclas S:R tuvieron un comportamiento similar a las colectas en monocultivo. Las colectas Col 7 y Jal fueron las que tuvieron sus valores de pendiente más bajos respecto a los otros biotipos (Cuadro 4).

Cuadro 4. Estimadores del modelo lineal de la cobertura del dosel de colectas susceptibles y resistentes (Col 4, Col 7, Go y Jal) a inhibidores de la ACCasa de “alpisto” (*Phalaris minor*) sembradas en series de reemplazo (De Witt, 1960).

	Sus	Col 4	Col 7	Gto	Jal
a	1.56 a	1.58 a	0.99 c	1.50 ab	1.06 bc
b	-8.96 ab	-7.90 ab	-0.18 a	-7.41 ab	-10.46 b

Índices para evaluar la competencia

Agresividad. Los índices de agresividad en todos los casos fueron menores de uno, lo cual indica que la suma de los valores de la “biomasa” del S en monoespecífica y en mezcla fue superior a la suma de los valores de la “biomasa” del R en monoespecífica y en mezcla. En el primer experimento la agresividad de Col 4, 7 y Jal fueron iguales estadísticamente y mayores que Gto. En el experimento dos no se observaron diferencias estadísticas entre los R. Sin embargo, al comparar los experimentos 1 y 2 se observa que en el experimento dos hubo un incremento en la agresividad (Cuadro 5).

Cuadro 5. Índice de Agresividad e intensidad de competencia entre colectas susceptibles y resistentes (Col 4, Col 7, Go y Jal) a inhibidores de la ACCasa de “alpistillo” (*Phalaris minor*) sembradas en series de reemplazo (De Witt, 1969).

Biotipos	Agresividad		Intensidad de competencia	
	1 ^{er} exp.	2do exp.	1 ^{er} exp.	2do exp.
Col 4	0.52 a	0.53 a	1.34 a	2.18 b
Col 7	0.69 a	0.58 a	0.56 a	3.37 b
Gto	0.29 b	0.58 a	1.61 a	1.97 b
Jal	0.32 a	0.30 a	1.08 a	1.56 b

Intensidad de competencia

A diferencia de lo observado en la agresividad, la intensidad de competencia tuvo diferencias significativas entre los experimentos. La intensidad de competencia con respecto al susceptible fue menor cuando se dejó que las plantas germinaran naturalmente. Al igual que lo observado en la cobertura del dosel, las plantas que iniciaron su ciclo en el mismo momento tuvieron tasas de crecimiento similares al S y es por ello que incrementaron su competencia.

Productividad relativa de las colectas bajo competencia

La productividad relativa de materia seca correspondiente al primer experimento se muestra en la Figura 4. La productividad de las colectas R: Col 4, Col 7 y Gto bajo competencia con el S tuvieron una productividad mayor de la esperada (0.5). La colecta Jal fue la única en la que la competencia no incrementó el crecimiento, reduciendo su productividad relativa hasta 0.3. En las colectas Col 4 y Gto, la productividad total de la mezcla con el S superó a su productividad en monocultivo. Es importante mencionar

que se está tratando como productividad relativa, por lo que encontrar productividades mayores con respecto al susceptible no significa una acumulación mayor de biomasa absoluta, en términos absolutos el S fue el que presentó la acumulación mayor de materia seca.

En el segundo experimento en el que la competencia inició simultáneamente, se observó una reducción generalizada en la productividad de todas las mezclas. Todos los biotipos disminuyeron su productividad esperada por el efecto de la competencia. Sin embargo, el biotipo S tiene la mayor aptitud para la competencia que los biotipos Col 4 Col 7 y Gto porque su productividad relativa estuvo más cercana al 0.5 mientras que para los biotipos resistentes, la competencia redujo la productividad (Figura 5). En ningún caso se observó que la suma de las productividades estuviera por arriba de 1.

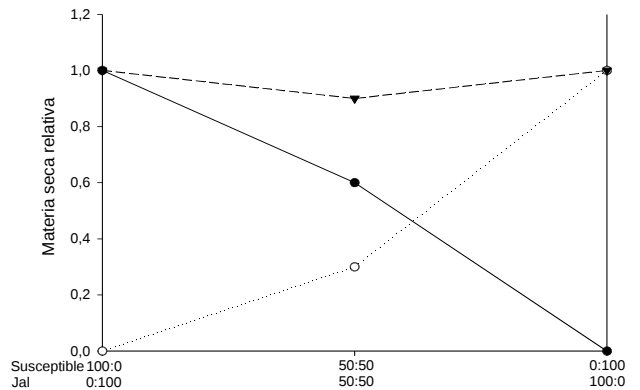
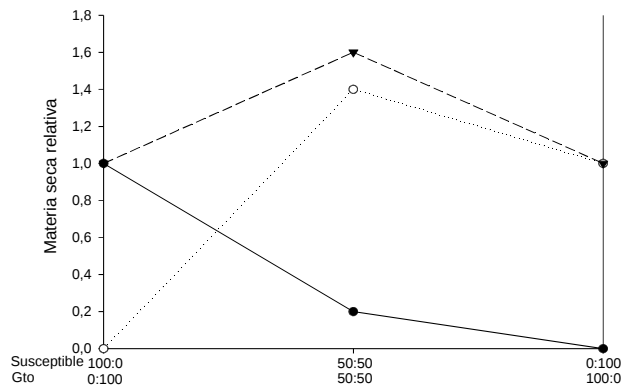
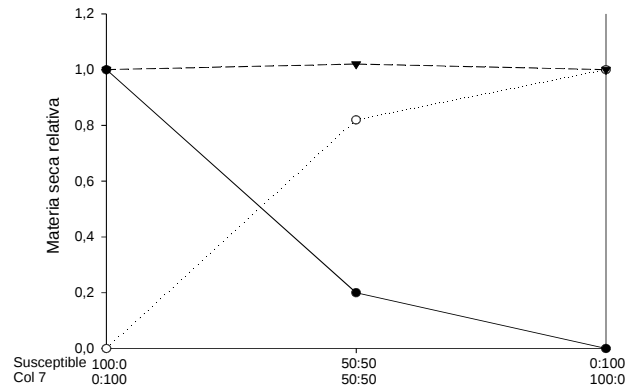
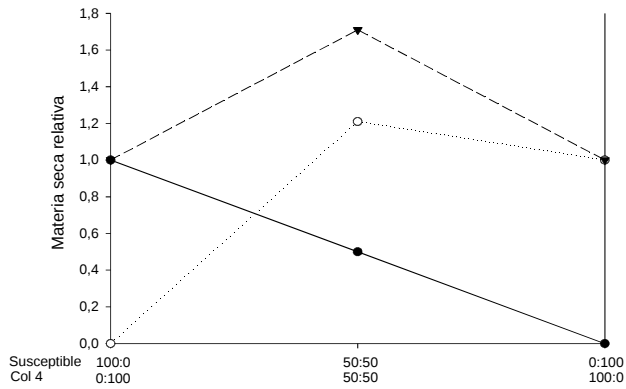


Figura 4. Productividad de la materia seca relativa en germinación natural de colectas susceptibles y resistentes (Col 4, Col 7, Go y Jal) a inhibidores de la ACCasa de "alpistillo" (*Phalaris minor*) sembradas en series de reemplazo (De Witt, 1969).

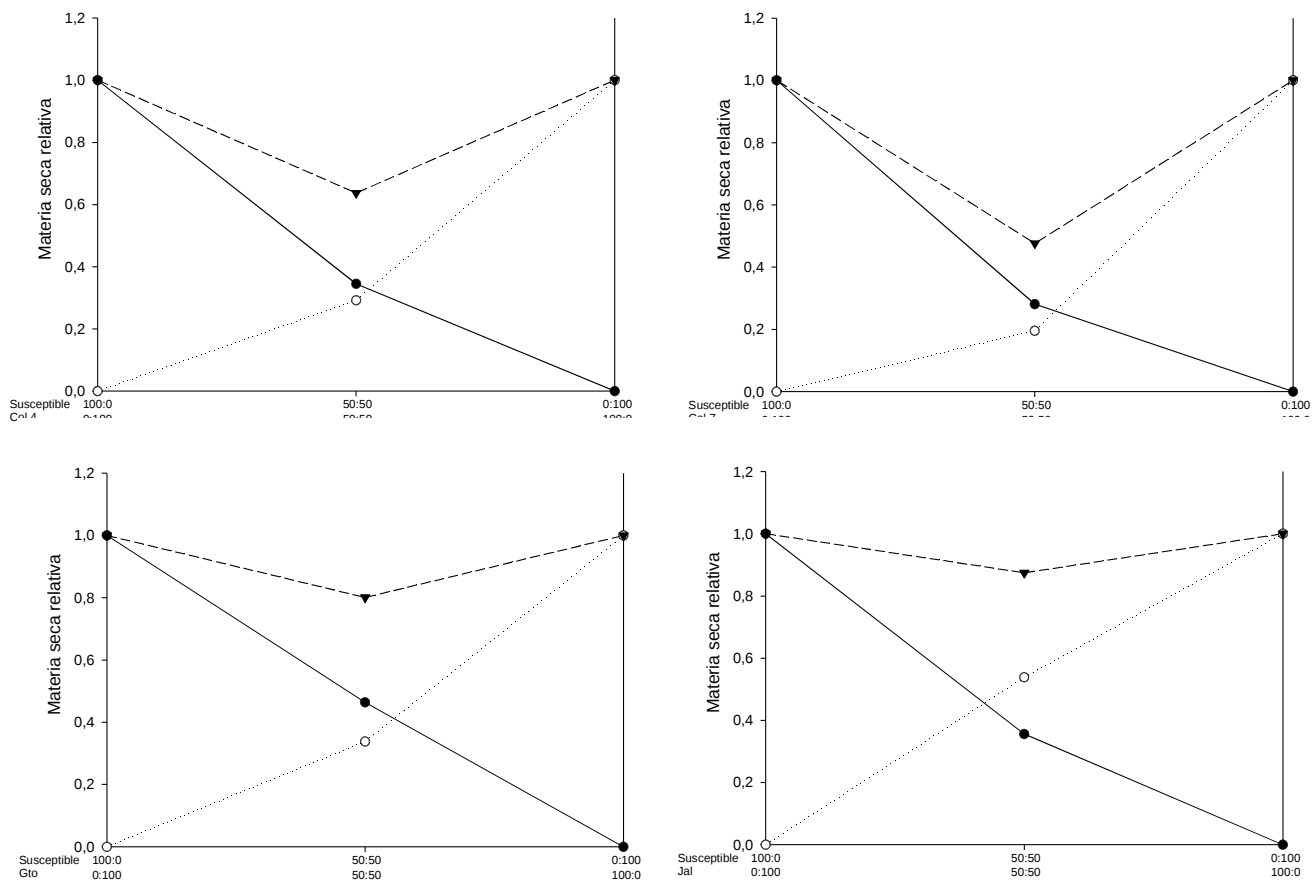


Figura 5. Productividad de la materia seca relativa en germinación sincronizada de colectas susceptibles y resistentes (Col 4, Col 7, Go y Jal) a inhibidores de la ACCasa de “alpistillo” (*Phalaris minor*) sembradas en series de reemplazo (De Witt, 1969).

DISCUSIÓN

Germinación en condiciones de laboratorio

La germinación en condiciones de laboratorio mostró que la colecta S tuvo mayor aptitud para germinar debido al porcentaje elevado de germinación además, presentó una velocidad mayor de germinación con respecto a las colectas R. Estas diferencias fueron corroboradas por las pruebas Logrank y Wilcoxon en el análisis de tiempos de falla. La latencia primaria al parecer es la única causa de la no germinación ya que la prueba de cloruro de tetrazolio realizada a las semillas no germinadas, indicó que todas eran viables al momento de la prueba. Además, las semillas fueron obtenidas en condiciones de invernadero y los efectos de latencia secundaria o deterioro fueron eliminados, ya que se seleccionaron semillas normales para dicha prueba (Arnold *et al.*, 1992; Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006; Valleriani y Tielbörger, 2006).

En algunas especies la resistencia a herbicidas está asociada con un incremento de la velocidad y porcentaje de germinación como en *Avena fatua* L. resistente a difenzoquat (ODonovan *et al.*, 1999), *A. fatua* resistente a diclofop (Scursoni *et al.*, 1999), *S. nigrum* L. resistente a triazina (Kremer y Lotz, 1998) y *Lactuca serriola* L. resistente a sulfonilurea (Alcocer-Ruthling *et al.*, 1992), entre otros. Por el contrario, el incremento de la latencia en individuos R a inhibidores de la ACCasa ha sido reportada en *Lolium rigidum* y *L. multiflorum* incluso en poblaciones que tienen diferentes mecanismos de resistencia como mutación en el sitio de acción o resistencia metabólica (Vila-Aiub *et al.*, 2005, 2005b; Gundel *et al.*, 2008). Recientemente, Owen *et al.* (2011) han encontrado que en cerca de 14 millones de hectáreas de cultivo en Australia la resistencia causó un incremento en la latencia, incluyendo algunos sitios donde las

poblaciones evolucionaron independientemente a la resistencia.

En las colectas estudiadas se han encontrado diversos costos en las semillas R como: incremento de la latencia, reducción de la longevidad, menor velocidad y porcentaje de germinación (Capítulo 3). Las diferencias en la germinación de estas colectas se han relacionado con una reducción en el tamaño del embrión que genera que las colectas R requieran de un tiempo mayor de maduración del embrión para poder romper las cubiertas seminales (latencia morfo-fisiológica). Lo anterior ocasiona que su germinación en los cultivos se retrase (Forbis *et al.*, 2002) reduciendo el vigor y la resistencia al deterioro de las semillas (López-Castañeda *et al.*, 1996).

Además de la reducción del embrión pueden existir otras causas para el incremento de la latencia en las colectas R. Rees (1994) menciona que los ambientes impredecibles favorecen el incremento de la latencia. Este argumento puede aplicarse a las condiciones que ocurren en un campo de cultivo. Mortimer (1997) y Owen *et al.* (2011), proponen que el retraso en la germinación puede estar relacionado con una forma de escape hacia las labores de cultivo (independientemente de la resistencia a herbicidas), lo cual dará una ventaja a los individuos que germinen posterior a la aplicación de escardas y herbicidas. Sin embargo, esta característica muestra un costo fisiológico, pero se desconoce si tendría un costo en la aptitud ecológica para competir por el establecimiento en una situación libre de selección. Por tal motivo fue necesario establecer el experimento de competencia para conocer si este retraso tiene un costo sobre las poblaciones R bajo condiciones no selectivas.

Competencia por luz

La competencia por la captación de luz se modificó cuando se cambiaron las condiciones iniciales de competencia. Uno de los cambios más notorios fue la duración del experimento, mientras que el primero tuvo una duración cercana a los 120 d, en el segundo su duración se redujo a 70 d en alcanzar la mayor cobertura posible. Además el cambio de ajuste de modelo en la cobertura (de sigmoïdal a lineal) sugiere que en el segundo experimento la competencia fue mucho más intensa por haberse encontrado todos los individuos compitiendo desde el inicio del experimento.

Los cambios en los modelos de crecimiento se han observado en función del inicio de la competencia (Knezevic y Horak, 1998; Uscanga-Mortera *et al.*, 2006). Wiederholt y Stoltenberg (1996, 1996b) encontraron una relación lineal en el incremento de la producción de biomasa y de área foliar en biotipos de *Digitaria sanguinalis* y *Setaria faberi* S y R a inhibidores de la ACCasa. Sin embargo, los datos en ese estudio fueron ajustados mediante la función Ln. Los datos aquí presentados son las observaciones originales sin ninguna modificación.

La dinámica de la cobertura en el primer experimento estuvo influenciada por la velocidad de la germinación que cada colecta presenta. No obstante, en las colectas estudiadas se han observado que éstas presentan diferentes tasas de crecimiento. En estudios donde se ha evaluado el crecimiento de estas colectas en condiciones de invernadero y en siembra individual, las colectas 7 y Jal expresan un vigor y producción de biomasa elevada. Por el contrario la colecta Gto, muestra un crecimiento precoz con acumulación de biomasa baja, lo que la convierte en una población poco competitiva por la cobertura del dosel para la captación de luz (Capítulo 4).

Las diferencias observadas en las tasas de crecimiento pudieran ser una adaptación

para la competencia en los campos de cultivo. En la prueba de germinación de laboratorio y en otros atributos de calidad de la semilla, la colecta Jal mostró tener severos costos por la resistencia. Para contrarrestar su deficiencia en la germinación incrementó su tasa de crecimiento y por ello su competencia por el dosel no se vio tan afectada como lo sucedido en la colecta Gto. Resultados similares han sido encontrado en *Leptochloa chinensis* donde la competencia con el arroz incrementó significativamente la altura de las plantas (Chauhan y Johnson, 2011).

El segundo experimento corroboró que bajo las mismas condiciones de competencia inicial, todos los biotipos pueden ser igualmente exitosos en la competencia por la ocupación del dosel y difícilmente podrían ser desplazados por el S. Wiederholt y Stoltenberg (1996, 1996b) en un estudio similar de competencia, no encontraron diferencias en la competencia entre *Digitaria sanguinalis* y *Setaria faberi*. Sin embargo, el inicio de los tratamientos ocurrió al mismo tiempo, y como se ha observado en este estudio y los estudios de Vila-Aiub *et al.* (2005b) y Gundel *et al.* (2008) la resistencia está asociada con el incremento de la latencia. Por lo que unos de los costos que pueden tener los individuos R es en la competencia por el establecimiento y la competencia por la luz.

Índices para evaluar la competencia

Los índices para evaluar la competencia mostraron tendencias distintas en los dos experimentos. La agresividad no fue afectada por el tiempo de la germinación. Las diferencias en la agresividad de la colecta Gto se debió a que en el primer experimento se observó un retraso notable en la germinación, lo que redujo significativamente la

competencia y por lo tanto, su agresividad contra el susceptible. La agresividad con la cual compite una especie con otra es un factor que está establecido por la fisiología de cada planta, es por ello que la relación de competencia no cambió entre las colectas resistentes. Bagavathiannan *et al.* (2011) comparando la agresividad de biotipos de *Echinochloa crus-galli* susceptibles y resistentes a propanil y clomazone, obtuvo que el índice de agresividad es similar entre los S y R.

Sin embargo, al contrario de lo que ocurrió con la agresividad, la intensidad de competencia se incrementó en todas las colectas en función de la germinación. El índice de intensidad de competencia se incrementó significativamente en cada colecta R cuando la competencia inició simultáneamente. El incremento de la latencia a causa de la resistencia pudiera ser uno de los principales factores que ocasionarían el desplazamiento de los individuos R en las poblaciones. Hasta el momento no se ha encontrado en la literatura algún trabajo que relacione la intensidad de competencia entre colectas S y R en función del inicio de la competencia.

Productividad relativa de las colectas bajo competencia

La materia seca relativa es una estimación de la productividad que puede alcanzar un organismo respecto a si mismo en condiciones de siembra monoespecífica y en mezcla. En algunos casos la productividad de los biotipos R se incrementó con respecto al susceptible, pero esto no significa que los R hayan superado en la competencia al S. En términos absolutos el S fue el de mayor acumulación de materia seca y mayor competencia por el dosel.

Los resultados mostraron que en el primer experimento las colectas R incrementaron la

productividad relativa esperada (0.5). Esto pudo ser un efecto de compensación o ahilamiento para la competencia por la cobertura del dosel, porque al momento de germinar, se encontraban en desventaja con respecto al S. En algunas malezas se ha observado que muestran una compensación en el crecimiento por efecto de la competencia. *Ludwigia hyssopifolia* tiene la capacidad de incrementar su biomasa para reducir los efectos de la competencia con el cultivo de arroz (Chauhan *et al.*, 2011).

La colecta Jal fue la única en la que la competencia no estimuló el crecimiento. Esto puede significar que ésta colecta tiene una menor plasticidad para la competencia. En *Amaranthus rudis* Sauer, se ha observado que no tiene la capacidad de responder competitivamente cuando la germinación ocurre retrasada, disminuyendo su biomasa y número de semillas en competencia con maíz y soya (Uscanga-Mortera *et al.*, 2007).

En la mayoría de estudios de competencia entre poblaciones S y R han establecido a las series de reemplazo de De Witt como método de comparación de competencia. Sin embargo, la mayoría de ocasiones no se han encontrado diferencias en su productividad y competencia. Las diferencias en la germinación pocas veces se han estudiado como etapa decisiva en la competencia. Las observaciones encontradas por Vila-Aiub *et al.* (2005), Gundel *et al.* (2008) y Owen *et al.* (2011) sobre el incremento de la latencia en gramíneas resistentes a inhibidores de la ACCasa puede causar que los biotipos R sean desplazados por los S en la competencia por la luz. Estos resultados unidos a los estudios realizados en las semillas en donde se ha encontrado que éstas llegan a tener una reducción de la longevidad, latencia mayor, porcentaje y velocidad de germinación menor (Capítulo 3) y en su crecimiento (fenología, acumulación de biomasa y fecundidad) pueden ser factores que produzcan un desplazamiento de estos

individuos R dentro de las poblaciones.

LITERATURA CITADA

Afentouli, C. G.; Eleftherohorinos, I.G. 1997. Littleseed Canarygrass (*Phalaris minor*) and Short-spiked Canarygrass (*Phalaris brachystachys*) Interference in Wheat and Barley. **Weed Science** 44: 560-565.

Alcocer-Ruthling, M.; Thill, C. D. and Shafii, B. 1992. Seed biology of sulfonylurea resistant and susceptible biotypes of prickly lettuce (*Lactuca serriola*). **Weed Technology** 6: 858-864.

Arnold, R. L. B.; Fenner, M. and Edwards, P. J. 1992. Changes in dormancy level in *Sorghum halepense* seeds induced by water stress during seed. **Functional Ecology** 6(5):596-605.

Bagavathiannan, M. V.; Norsworthy, J. K.; Jha, P. and Smith, K. 2011. Does Resistance to Propanil or Clomazone Alter the Growth and Competitive Abilities of Barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*)?. **Weed Science** 59(3):353-358.

Baucom, R. S. and Holt, J. S. 2009. Weeds of agricultural importance: bridging the gap between evolutionary ecology and crop and weed science. **New Phytologist**. 184: 741-743.

Begon, M. J. L.; Harper, J. L. and Townsend, C. R. 1996. Ecology. Blackwell Science. London. GB. 1996. 1068 p.

Bergelson, J. and Purrington, C. B. 1996. Surveying patterns in the cost of resistance

in plants. *The American Naturalist* 148: 536-558.

Chauhan, B. S. and Johnson, D. E. 2011. Phenotypic Plasticity of Chinese Sprangletop (*Leptochloa chinensis*) in Competition with Seeded Rice. *Weed Technology* 24(4):652-658.

Chauhan, B. S.; Pame, A. R. P. and Johnson D. E. 2011. Compensatory Growth of Ludwigia (*Ludwigia hyssopifolia*) in Response to Interference of Direct-Seeded Rice. *Weed Science* 59(2):177-181.

Duke, S. O. 1985. Weed Physiology. CRC Press, USA.

Forbis, T. A.; Floyd, S. K. and De Queiroz, A. 2002. The evolution of embryo size in angiosperms and other seed plants: implications for the evolution of seed dormancy. *Evolution* 56, 2112-2125.

Gundel, P. E.; Martínez-Ghersa, M. A. and Ghersa, C. M. 2008. Dormancy, germination and ageing of *Lolium multiflorum* seeds following contrasting herbicide selection regimes. *European Journal of Agronomy* 28: 606-613.

Knezevic, S. Z.; Horak, Michael J. and Richard, L. V. 1997. Relative Time of Redroot Pigweed (*Amaranthus retroflexus* L.) Emergence Is Critical in Pigweed-Sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Weed Science* 45(4):502-508.

Kremer, E. and Lotz, L. 1998. Germination and emergence characteristics of triazine-susceptible and triazine-resistant biotypes of *Solanum nigrum*. *Journal of Applied Ecology* 35, 302-310.

López-Castañeda, C.; Richards, R. A.; Farquhar, G. D. and Williamson, R. E. 1996.

Seed and seedling characteristics contributing to variation in early vigor among temperate cereals. **Crop Science** 36: 1257–1266.

Maxwell, B. D.; Roush, M. I. and Radosevich, S. R. 1990. Predicting the evolution and dynamics of herbicide resistance in weed populations. **Weed Technology** 4: 2-13.

McGilchrist, C. A. and Trenbath, B. R. 1971. A Revised Analysis of Plant Competition Experiments. **Biometrics** 27(3):659-671.

Mortimer, A. M. 1997. Phenological adaptation in weeds-an evolutionary response to the use of herbicides?. **Pest Management Science** 51: 299–304.

Neve, P.; Vila-Aiub, M. and Roux, F. 2009. Evolutionary-thinking in agricultural weed management. **New Phytologist** 184:783-793.

O'Donovan, J. T.; Newman, J. C.; Blackshaw, R. E.; Harker, K. N.; Derksen, D. A. and Thomas, A. G. 1999. Growth, competitiveness and seed germination of triallate / difenzoquat-susceptible and -resistant wild oat populations. **Canadian Journal of Plant Science** 79, 303–312.

Owen, M. J., Michael, P. J.; Renton, M.; Steadman, K. J. and Powles, S. B. 2011. Towards large-scale prediction of *Lolium rigidum* emergence. II. Correlation between dormancy and herbicide resistance levels suggests an impact of cropping systems. **Weed Research** 51, 133–141.

Park, S. E.; Laurence, R. B. and Watkinson, A. R. 2003. The Theory and Application of Plant Competition Models: an Agronomic Perspective. **Annals of Botany** 92:741-748.

Rees, M. 1994. Delayed Germination of Seeds: A Look at the Effects of Adult Longevity, the Timing of Reproduction, and Population Age/Stage Structure. **The American**

Naturalist 144(1):43-64.

Sas Institute (2009) Sas/Stat user's guide. SAS Institute Inc., Cary, NC.

Scursoni J. A.; Benech-Arnold, R. L. and Hirchoren, H. 1999. Demography of wild oat (*Avena fatua* L.) in barley crops; effect of crop, sowing rate and herbicide treatment. *Agronomy Journal* 91, 478–485.

Uscanga-Mortera, E.; Clay, S. A.; Forcella, F. and Gunsolus, J. 2007. Common Waterhemp Growth and Fecundity as Influenced by Emergence Date and Competing Crop. *Agronomy Journal* 99:1265–1270.

Valleriani, A. and Tielbörger, K. 2006. Effect of age on germination of dormant seeds. *Theoretical Population Biology* 70 (2006) 1–9.

Vila-Aiub, M.; Neve, P. and Powles, S. B. 2009. Fitness costs associated with evolved herbicide resistance alleles in plants. *New Phytologist* 184: 751–767.

Vila-Aiub, M.; Neve, P. and Powles, S. B. 2005a. Resistance cost of a cytochrome P450 herbicide metabolism mechanism but not an ACCase target site mutation in a multiple resistant *Lolium rigidum* population. *New Phytologist* 167: 787-796.

Vila-Aiub, M.; Neve, P.; Steadman, K. J. and Powles, S. B. 2005b. Ecological fitness of a multiple herbicide-resistant *Lolium rigidum* population: dynamics of seed germination and seedling emergence of resistant and susceptible phenotypes. *Journal of Applied Ecology* 42: 288-298.

Wiederholt, R. J. and Stoltenberg, D. E. 1996. Absence of Differential Fitness between Giant Foxtail (*Setaria faberi*) Accessions Resistant and Susceptible to Acetyl-Coenzyme

A Carboxylase Inhibitors. **Weed Science** 44 (1):18-24.

Wiederholt, R. J. and Stoltenberg, D. E. 1996b. Similar Fitness between Large Crabgrass (*Digitaria sanguinalis*) Accessions Resistant or Susceptible to Acetyl-Coenzyme a Carboxylase Inhibitors. **Weed Technology** 10 (1):42-49.

Finch-Savage, W. E. and Leubner-Metzger, G. 2006. Seed Dormancy and the Control of Germination. **New Phytologist** 171(3):501-523.

Wilson, J. B. 1988. Shoot Competition and Root Competition. **Journal of Applied Ecology** 25(1):279-296.

DISCUSION GENERAL

Las colectas de *Phalaris minor* resistentes a herbicidas inhibidores de la ACCasa presentaron diferencias en las etapas del ciclo biológico (germinación, fenología, acumulación de biomasa y fecundidad) con respecto al susceptible. Las diferencias encontradas fueron debidas a la evolución hacia la resistencia a herbicidas. Esta evolución fue causada por una mutación no sinónima en el sitio de acción. Sin embargo, aunque las poblaciones estudiadas se ubican en zonas cercanas, el análisis de las secuencias del gen de la ACCasa mostró que todas las colectas evolucionaron independientemente hacia la resistencia porque la mutación que ocasionó el cambio en el aminoácido se encuentra en diferente posición en cada colecta.

La intensa presión de selección que ejercen los herbicidas ocasiona que la evolución hacia la resistencia sea un proceso relativamente rápido y pueda presentarse en áreas geográficas cercanas (Linhart y Grant, 1996; Powles y Yu, 2010). Se ha documentado que las poblaciones de *Alopecurus myosuroides* resistentes a herbicidas inhibidores de la ACCasa presentes en Europa tienen orígenes evolutivos distintos, debido principalmente a las diferencias en selección que se ejercen en los campos de cultivo (Délye *et al.*, 2004, 2010).

El proceso de selección al cual han estado expuestas las poblaciones de *P. minor* ha afectado principalmente al gen que codifica para la ACCasa. Mientras que en la región del gen PsbA no se encontró variación entre las poblaciones, lo que sugiere que este gen no está involucrado en factores de manejo y adaptación a diferentes micro ambientes.

La diversidad genética de las poblaciones fue variable, mientras que las colectas Col 4

y Gto mostraron la mayor diversidad de nucleótidos, la colecta Jal presentó la menor diversidad respecto al susceptible. De acuerdo a la prueba de Tajima (1989) las colectas Col 4 y Gto tuvieron en el pasado un cuello de botella poblacional, pero éstas se han empezado a diversificar nuevamente (Fowler y Whitlock, 1999). En el caso de Jal la prueba indicó que recientemente han pasado por un proceso de selección intenso y por ello su diversidad genética es baja.

La reducción de la variabilidad genética se ha propuesto como una de las causas de la reducción de la aptitud competitiva en los individuos R (Christoffers, 1999). Además de la reducción en la variabilidad genética, es posible que el cambio en la secuencia del gen de la ACCasa produjera efectos pleiotrópicos que modificaran la función de la proteína. Dicho cambio puede alterar el metabolismo de la planta reduciendo la producción de biomasa, fecundidad y calidad fisiológica de la semilla (Gundel *et al.*, 2008; Mechari *et al.*, 2008).

En la etapa de semilla, se observó que las semillas de las colectas R tienen menor velocidad y porcentaje de germinación, además de requerir de un tiempo mayor de estratificación para superar la latencia. Lo anterior estuvo relacionado con la disminución de la proporción que tiene el embrión con la semilla. Las colectas R que requirieron de más tiempo para superar la latencia, fueron las que presentaron la menor proporción embrión:semilla (Forbis *et al.*, 2002). Esto causó que los individuos tuvieran vigor bajo y longevidad menor. Lo anterior puede considerarse como un costo por la evolución hacia la resistencia, que representaría una desventaja en la permanencia en el banco de semillas del suelo por la longevidad baja y en la germinación en la estación de crecimiento (Vila-Aiub *et al.*, 2005; Gundel *et al.*, 2008).

Durante el ciclo biológico se encontraron diferencias en la fenología, acumulación de biomasa y producción de semillas entre los biotipos R respecto al S. Las colectas Col 4 y Gto fueron precoces, con poca acumulación de biomasa y bajo peso de semillas. Por el contrario, dos biotipos fueron de lento crecimiento, pero de mayor acumulación de biomasa respecto al S. En todas las colectas se observó una reducción en la fecundidad (número de semillas por planta) con respecto al S.

Los costos fisiológicos observados en la aptitud de las colectas R, podrían ocasionar el desplazamiento bajo condiciones no selectivas. Sin embargo, fue necesario establecer estudios de competencia en series de reemplazo para determinar si las características de germinación retrasada y baja acumulación de biomasa son determinantes en la competencia.

Los resultados de los experimentos en series de reemplazo mostraron que la característica de germinación retrasada que tienen los individuos R es determinante en la competencia inicial por la luz. Cuando la germinación ocurre de manera simultánea no se observan diferencias en la competencia. Wiederholt y Stoltenberg (1996, 1996b) no encuentran diferencias en la competencia entre individuos S y R de *Digitaria sanguinalis* y *Setaria faberi*, sin embargo el estudio fue realizado bajo germinación simultánea.

Neve (2007) y Neve *et al.* (2009) han cuestionado las comparaciones realizadas entre colectas provenientes de diferentes zonas para la determinación de la aptitud. Basados principalmente en las diferencias del fondo genético y a las diferentes presiones de selección a las que han estado expuestas las poblaciones. Sin embargo, los resultados obtenidos mostraron que incluso poblaciones que evolucionaron independientemente,

solo variaron en el gen que confiere resistencia a la ACCasa, además de que la pérdida de la aptitud competitiva fue generalizada en todas las colectas R.

En base a las evidencias obtenidas desde nivel genético, fisiológico, ecológico y evolutivo es posible concluir que la resistencia a herbicidas que inhiben la síntesis de la ACCasa causa una reducción de la aptitud competitiva en los organismos y que es posible que en el momento que el factor de selección se retire de las poblaciones, se revierta la dominancia y las poblaciones regresen a un estado susceptible (Maxwell *et al*, 1990). En la Región del Bajío, en el caso de *P. minor* después de retirar el factor de selección, las poblaciones susceptibles han vuelto a dominar (Tafoya 2011, Comunicación personal).

CONCLUSIONES GENERALES

De acuerdo a los resultados obtenidos de los estudios realizados acerca de las diferencias en la aptitud de las poblaciones resistentes de *P. minor* se concluye que: las poblaciones de *Phalaris minor* resistentes a herbicidas inhibidores de la ACCasa tienen orígenes evolutivos distintos y se encuentran bajo una presión de selección sobre el gen de la ACCasa. En el ciclo biológico se encontró que las semillas de los individuos resistentes presentan menor porcentaje y velocidad de germinación, requieren de mayor tiempo de estratificación para superar la latencia y tienen menor longevidad. La resistencia a herbicidas no modifica la acumulación de biomasa en los individuos resistentes, pero si causa una reducción en la fecundidad. La característica de germinación retrasada de los individuos resistentes es determinante en la competencia por luz en la etapa de plántula. Por lo anterior, se predice que si el factor de selección (herbicida) es retirado de las parcelas, las poblaciones de *P. minor* cambiarán de un estado dominado por los resistentes a otro dominado por individuos susceptibles.

LITERATURA CITADA

Christoffers, M. J. 1999. Genetic aspects of herbicide-resistant weed management. *Weed Technology* 13: 647-652.

Delyé, C.; Michel, S.; Berard, A.; Chauvel, B.; Brunel, D.; Guillemin, J.; Dessaint, F. and Le Corre, V. 2010. Geographical variation in resistance to acetyl-coenzyme A carboxylase-inhibiting herbicides across the range of the arable weed *Alopecurus myosuroides* (black-grass). *New Phytologist* 186:1005–1017.

Delyé, C.; Straub, C.; Michel, S.; and Le Corre, V. 2004. Nucleotide Variability at the Acetyl Coenzyme A Carboxylase Gene and the Signature of Herbicide Selection in the Grass Weed *Alopecurus myosuroides* (Huds.) *Molecular Biology Evolution* 21(5):884–892.

Forbis, T. A.; Floyd, S. K. and De Queiroz, A. 2002. The evolution of embryo size in angiosperms and other seed plants: implications for the evolution of seed dormancy. *Evolution* 56, 2112-2125.

Fowler, K. and Whitlock, M. C. 1999. The Variance in Inbreeding, Depression and the Recovery of Fitness in Bottlenecked Populations. *Proceedings: Biological Sciences*, 266 (1433):2061-2066.

Gundel, P. E.; Martínez-Ghersa, M. A. and Ghersa, C. M. 2008. Dormancy, germination and ageing of *Lolium multiflorum* seeds following contrasting herbicide selection regimes. *European Journal of Agronomy* 28: 606-613.

Linhart, B. Y. and Grant, C. M. 1996. Evolutionary significance of local genetic differentiation in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 27: 237–277.

Maxwell, B. D; Roush, M. L. and Radosevich, S. R. 1990. predicting the evolution and dynamics of herbicide resistance in weed populations. *Weed Technology* 4:2-13.

Menchari, Y.; Chauvel, B.; Darmency, H. and Délye, C. 2008. Fitness costs associated with three mutant acetylcoenzyme A carboxylase alleles endowing herbicide resistance in black-grass *Alopecurus myosuroides*. *Journal of Applied Ecology* 45: 939–947.

Neve, P. 2007. Challenges for herbicide resistance evolution and management: 50 years after Harper. *Weed Research* 47: 365-369.

Neve, P.; Vila-Aiub, M. and Roux, F. 2009. Evolutionary-thinking in agricultural weed management. *New Phytologist* 184:783-793.

Powles, S. B.; Yu, Q. 2010. Evolution in Action: Plants Resistant to Herbicides. *Annual Review of Plant Biology* 61:8.1–8.31.

Tajima F. 1989. Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585-595.

Vila-Aiub, M.; Neve, P.; Steadman, K. J. and Powles, S. B. 2005. Ecological fitness of a multiple herbicide-resistant *Lolium rigidum* population: dynamics of seed germination and seedling emergence of resistant and susceptible phenotypes. *Journal of Applied Ecology* 42: 288-298.

Wiederholt, R. J. and Stoltenberg, D. E. 1996a. Similar Fitness between Large Crabgrass (*Digitaria sanguinalis*) Accessions Resistant or Susceptible to Acetyl-Coenzyme A Carboxylase Inhibitors. *Weed Technology* 10(1):42-49.

Wiederholt, R. J. and Stoltenberg, D. E. 1996b. Absence of Differential Fitness

between Giant Foxtail (*Setaria faberi*) Accessions Resistant and Susceptible to Acetyl-Coenzyme A Carboxylase Inhibitors. **Weed Science** 44 (1):18-24.