

**Instituto Tecnológico de Costa Rica
Universidad Nacional
Universidad Estatal a Distancia**

**Doctorado en Ciencias Naturales para el Desarrollo
Énfasis en Sistemas de Producción Agrícola**



**MECANISMO DE RESISTENCIA DE *PASPALUM PANICULATUM* L.
(POACEAE) AL HERBICIDA GLIFOSATO**

Doctorante:

Fernando Ramírez Muñoz

Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago

Diciembre 2017

**Instituto Tecnológico de Costa Rica
Universidad Nacional
Universidad Estatal a Distancia**



**Doctorado en Ciencias Naturales para el Desarrollo
Énfasis en Sistemas de Producción Agrícola**



**MECANISMO DE RESISTENCIA DE *PASPALUM PANICULATUM* L.
(POACEAE) AL HERBICIDA GLIFOSATO**

**Tesis sometida a consideración del tribunal evaluador como requisito
para optar al grado de Doctor en Ciencias Naturales para el Desarrollo,
con énfasis en Sistemas de Producción Agrícola**

**Sustentante:
Fernando Ramírez Muñoz**

**Tutor:
Dr. Bernal E. Valverde, Ph. D.**

**Asesores:
Dra. Martha Orozco A., Ph.D.
Dr. Franklin Herrera M., Ph. D.**

**Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago
Diciembre 2017**

Instituto Tecnológico de Costa Rica
Universidad Nacional
Universidad Estatal a Distancia



Tesis sometida a consideración del tribunal evaluador como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias Naturales para el Desarrollo, con énfasis en Sistemas de Producción Agrícola



Fernando Ramírez Muñoz
Sustentante

Tribunal examinador:

Bernal E. Valverde, Ph. D.
Director de Tesis

Martha Orozco Aceves, Ph. D.
Asesora de Tesis

MARILLA

Franklin Herrera Murillo, Ph. D.
Asesor de Tesis

Carmen Madriz Quirós, Ph. D.
Posgrados TEC

Freddy Araya Rodríguez, Ph. D.
Coordinador DOCINADE

Diciembre 2017

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi familia, a toda mi gran familia, que siempre me apoyó y me alentó a seguir adelante. Especialmente a mi esposa Ivannia y mis hijas María Fernanda y Daniela, que tuvieron que sacrificar las muchas horas, fines de semanas y periodos de vacaciones que su papá le dedicó al doctorado.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional, y especialmente al Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas, por el gran apoyo que me dio en tiempo, recursos y valores humanos, para poder realizar mis estudios de pos grado.

Agradezco a mi mentor, amigo y director de tesis, Dr. Bernal Valverde, por su dedicación, valiosísima contribución científica, su tiempo y recursos aportados por su empresa IdeaTropical, desde que se gestó el tema de esta investigación.

A la Dra. Nilda R. Burgos y a su equipo de investigación del “Department of Soil, Crops & Environmental Sciences” de la Universidad de Arkansas en Fayetteville y del Laboratorio de Fisiología de Malezas: Dra. Reio Salas, Dr. Leopoldo Estorninos, Dr. Paul Tseng, Dr. Vijay Sing, Dra. Gulab Rangani, M. Sc. Shilpa Sing, M. Sc. Sirichai Sathuwijarn, M. Sc. Hussain Tahir, Dr. Muhammad Nadeen, M. Sc. Seth Bernard, por su gran amistad, grandes enseñanzas no solo en el medio científico, sino en el trabajo en grupo, solidaridad y convivencia desinteresada. Al Dr. Srinivas Jayanthi y Dr. Thallapuram Krishnaswamy Suresh Kumar, del Departamento de Química y Bioquímica de la Universidad de Arkansas, por sus grandes aportes en algunos pasos de esta investigación.

A los señores Dra. Ana María Botero Coy, Dr. Félix Hernández y Dr. Neus Fabregat Cabello, del Instituto Universitario de Plaguicidas y Aguas (IUPA) de la Universidad Jaime I, Castellón, España, por sus aportes en la metodología y análisis de metabolitos de glifosato.

A la Dra. Sayra Munguía por sus consejos, amistad y ayuda ineludible en todo este proceso, le estaré eternamente agradecido.

Para el Ing. Alejandro Vargas por su gran ayuda y apoyo en algunos análisis de esta investigación.

A mis asesores, Dra. Martha Orozco, compañera invaluable de muchas horas en la academia; al Dr. Franklin Herrera, una gran persona y profesional, un agradecimiento muy especial por su dedicación desinteresada.

A todas las personas, estudiantes, productores, colegas, amigos, familiares y compañeros que de alguna u otra forma, me ayudaron en toda esta gran aventura que fue el doctorado. Mi gratitud eterna.

Indice General

Índice de cuadros	v
Índice de figuras	vi
Índice de anexos.....	vii
Lista de abreviaturas y siglas	viii
Resumen.....	1
<i>Abstract</i>	3
1. Introducción.....	5
2. Objetivos.....	7
2.1 Objetivo general.....	7
2.2 Objetivos específicos	7
3. Marco teórico	7
3.1 La maleza <i>Paspalum paniculatum</i> L.....	7
3.2 El herbicida glifosato	10
3.3 Modo de acción del glifosato.....	15
3.3.1 Absorción	15
3.3.2 Transporte	16
3.3.3 Metabolismo	18
3.3.4 Exudación	19
3.3.5 Mecanismo de acción	20
3.4 Resistencia a herbicidas.....	22
3.5 Evolución de resistencia a herbicidas	24
3.6 Resistencia de malezas al glifosato.....	26
3.7 Mecanismos de resistencia al glifosato.....	32
3.7.1 Dependientes del sitio de acción	32
3.7.2 Independientes del sitio de acción.....	39
4. Materiales y Métodos	42
4.1 Diagnóstico del uso de glifosato.....	42
4.2 Respuesta de biotipos de <i>P. paniculatum</i> al glifosato	43
4.2.1 Origen de la semilla.....	43
4.2.2 Respuesta a dosis crecientes de glifosato	45
4.3 Determinación de resistencia fuera de sitio activo	47

4.3.1 Distribución del glifosato radio marcado en la planta	47
4.3.2 Metabolismo de glifosato.....	52
4.4 Determinación de la posible resistencia en sitio activo	55
4.4.1 Medición in vivo de la acumulación de shikimato.....	55
4.4.2 Determinación de la concentración y actividad de la EPSPS	57
4.4.3 Determinación de mutaciones en la EPSPS.....	59
5. Resultados y Discusión.....	63
5.1 Diagnóstico del uso de glifosato.....	63
5.1.1 Uso de glifosato en el cultivo de pejibaye.....	63
5.1.2 Uso de glifosato en el cultivo de cítricos.....	65
5.1.3 Uso de glifosato en el cultivo de palma africana	66
5.2 Respuesta de <i>P. paniculatum</i> al glifosato.....	69
5.3 Distribución del glifosato radio marcado en <i>P. paniculatum</i>	77
5.3.1 Absorción	77
5.3.2 Transporte de glifosato	79
5.3.3 Exudación	84
5.4 Metabolización	86
5.5 Concentración de ácido shikímico	88
5.5.1 Concentración de shikimato en discos provenientes de plantas sin aplicar	88
5.5.2 Concentración de shikimato en discos provenientes de plantas aplicadas	91
5.6 Número de copias del gen de la EPSPS	93
5.7 Actividad de la EPSPS.....	96
5.8 Mutaciones.....	96
6. Conclusiones	101
7. Recomendaciones	103
8. Literatura citada.....	105
9. Anexos.....	129

Índice de cuadros

Número	Página
1 Especies de malezas resistentes a glifosato a diciembre 2017.....	27
2 Dosis de glifosato para determinar la respuesta en biotipos selectos de <i>P. paniculatum</i>	46
3 Herbicidas usados en el cultivo de pejobaye para palmito. 2011-12	64
4 Herbicidas usados en el cultivo de cítricos. 2011-12	65
5 Herbicidas usados en el cultivo de palma africana. 2011-12	67
6 Caracterización del manejo de malezas en fincas con cultivos perennes.....	68
7 Parámetros que describen la respuesta al glifosato de biotipos R y S de <i>P. paniculatum</i> . Edad I. 21 dda	70
8 Parámetros que describen la respuesta al glifosato de biotipos R y S de <i>P. paniculatum</i> . Edad II. 21 dda	71
9 Índice de Resistencia (IR) al glifosato de biotipos de <i>P. paniculatum</i> provenientes de varias localidades de Costa Rica. 2012-2014	75
10 Glifosato radio marcado absorbido en diferentes tiempos por biotipos R y S. Edad I.....	78
11 Absorción en diferentes tiempos de glifosato radio marcado por biotipo R y S. Edad II	78
12 Porcentaje del glifosato radio marcado absorbido presente en plantas de biotipos R y S.....	79
13 Porcentaje de glifosato radio marcado exudado por las raíces en biotipos R y S en varios tiempos de medición. Edad I	85
14 Porcentaje de glifosato radio marcado exudado por las raíces en biotipos R y S en varios tiempos de medición. Edad II	86
15 Concentración de glifosato y AMPA en biotipos R aplicados y sin aplicar con glifosato y porcentajes de recuperación de las sustancias medidas.....	87
16 Valores de shikimato ($\mu\text{g mL}^{-1}$) en tejido foliar de plantas R y S aplicadas con concentraciones crecientes de glifosato	89
17 Cantidad de proteína extraída de 20 g de tejido de <i>P. paniculatum</i> ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de biotipos R y S al glifosato.....	94

Índice de figuras

Número	Página
1 Planta (A), lígula (B), panícula (C) y espiguillas (D) de <i>P. paniculatum</i>	8
2 Estructura química de las sales del ácido glifosato	13
3 Estructura química del glifosato (C ₃ H ₈ NO ₅ P).....	18
4 Sitio de inhibición del glifosato en la ruta metabólica del shikimato	21
5 Origen geográfico de biotipos de <i>P. paniculatum</i>	44
6 Plantas de <i>P. paniculatum</i> de edad I (A) y edad II (B) usadas en las pruebas con glifosato radiomarcado.....	48
7 Aplicación de glifosato radiomarcado a plantas de <i>P. paniculatum</i>	49
8 Partes de la planta usadas para determinar transporte de glifosato	51
9 Procedimiento para la extracción de glifosato y AMPA.....	53
10 Respuesta a dosis crecientes de glifosato de biotipos R y S para la edad I.....	72
11 Respuesta a dosis crecientes de glifosato de biotipos R y S para la edad II.....	72
12 Respuesta de <i>P. paniculatum</i> a dosis crecientes de glifosato (kg e.a. ha ⁻¹).....	73
13 Porcentaje de daño visual de biotipos R (D, L, B) y S (H, T, C) 15 dda con dosis crecientes de glifosato. Edad I.....	74
14 Plantas de <i>P. paniculatum</i> aplicadas con glifosato radio marcado antes (A) y después de revelarlas (B) como fosforimágen. Edad I	83
15 Plantas de <i>P. paniculatum</i> aplicadas con glifosato radio marcado antes (A) y después de revelarlas (B) como fosforimágen. Edad II	84
16 Valores de absorbancia a determinadas concentraciones de shikimato	88
17 Concentración de shikimato en biotipos R (A) y en biotipos S (B) en varios tiempos de medición	91
18 Imágenes de la electroforesis enzimática de la EPSPS de <i>P. paniculatum</i> en gel de sulfato poliacrilamida dodecil sodio.....	95
19 Secuencia de los aminoácidos en la 5´EPS 3´PS y alineamiento entre biotipos de <i>P. paniculatum</i> Resistentes y Susceptibles al glifosato.....	97
20 Modelos 3D de aminoácidos que se enlazan directamente con S3P.	99

Índice de anexos	Pág.
Anexo I: Guía de entrevista. Diagnóstico de uso de plaguicidas en cultivos perennes	129
Anexo II. Gradiente y condiciones para la extracción de metabolitos	132
Cuadro A1. Gradiente utilizada para la cromatografía de metabolitos	132
Cuadro A2. Condiciones MS/MS para los analitos.....	132
Anexo III. Condiciones del experimento para la extracción de EPSPS	132
Anexo IV. Valores de las DE ₅₀ de biotipos de <i>P. paniculatum</i>	134
Cuadro A3. Resumen DE ₅₀ (referida a daño medio) de glifosato en biotipos R y S de <i>P. paniculatum</i> de dos edades (+/- 95%) a los 21 dda	134
Anexo V: Transporte de glifosato en la planta.....	135
Cuadro A4. Cantidad porcentual de glifosato marcado presente en la parte apical de la hoja tratada (parte 1) de la planta a las 24, 48, 72 y 96 hda. Edad I	135
Cuadro A5. Cantidad porcentual de glifosato marcado presente en la parte apical de la hoja tratada (parte 1) de la planta a las 24, 48 y 72 hda. Edad II	135
Cuadro A6. Cantidad porcentual de glifosato marcado presente en la parte inferior de la hoja tratada (parte 2) en diferentes tiempos de medición. Edad I.....	135
Cuadro A7. Cantidad porcentual de glifosato marcado presente en la parte inferior de la hoja tratada (parte 2) en diferentes tiempos de medición. Edad II.....	136
Cuadro A8. Cantidad porcentual de glifosato marcado presente en la parte superior de la planta (parte 3) a las 24, 48, 72 y 96 hda. Edad I	136
Cuadro A9. Cantidad porcentual de glifosato marcado presente en la parte superior de la planta (parte 3) a las 24, 48 y 72 hda. Edad II	136
Cuadro A10. Cantidad porcentual de glifosato marcado presente en el culmo de la planta (parte 4) a las 24, 48, 72 y 96 hda. Edad I	137
Cuadro A11. Cantidad porcentual de glifosato marcado presente en el culmo de la planta (parte 4) a las 24, 48 y 72 hda. Edad II	137
Cuadro A12. Cantidad porcentual de glifosato marcado presente en la raíz de la planta (parte 5) a las 24, 48, 72 y 96 hda. Edad I.....	137
Cuadro A13. Cantidad porcentual de glifosato marcado presente en la raíz de la planta (parte 5) a las 24, 48 y 72 hda. Edad II.....	138
Anexo VI. Cromatogramas de extracción de metabolitos	139
Figura A1. Cromatogramas seleccionados de los biotipos B, D y L aplicados.....	139
Figura A2. Cromatogramas para los biotipos B, D y L no aplicados	140

Lista de abreviaturas y siglas

AMPA	ácido aminometilfosfónico
dda	días después de aplicado
ddt	días después del tratamiento
DE₅₀ = (ED₅₀)	dosis efectiva media
DL₅₀	dosis letal media
e.a.	equivalente ácido
EPSPS	5´enolpiruvil shikimato 3´fosfato sintetasa
Glifosato C¹⁴	glifosato radiomarcado
hda	horas después de aplicado
i.a.	ingrediente activo
IC₅₀	concentración inhibitoria media
IR	índice de resistencia
Kg i.a. ha⁻¹	kilogramos de ingrediente activo por hectárea
LC-MS/MS	Cromatografía Líquida con Detector Masas/Masas
LSS	<i>Liquid Scintillation Spectrometer</i> (Espectrómetro de Centelleo Líquido)
p.c.	producto comercial
PEP	fosfoenol piruvato
ppEPSPS	EPSPS de <i>Paspalum paniculatum</i>
ppm	partes por millón
QC	<i>Quality Control</i> (Prueba de Control de Calidad)
R	resistente
S	susceptible
S3P	shikimato-3-fosfato
TIPS	doble mutación T ₁₀₂ I + P ₁₀₆ S
WSSA	<i>Weed Science Society of America</i>

Resumen

Paspalum paniculatum es un pasto perenne originario de América del Sur. Como maleza, es de importancia económica sobre todo en cultivos perennes donde se utiliza glifosato para su control. El glifosato es un herbicida sistémico, de amplio espectro y su actividad se debe a la inhibición de la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS), responsable de la síntesis de aminoácidos aromáticos y otras sustancias importantes en plantas. A raíz de algunos reportes de dificultades en el control de malezas con glifosato en el cultivo de pejibaye, se determinó que había resistencia al herbicida pero sin conocer el mecanismo de resistencia. Por lo tanto, el objetivo principal de este estudio fue caracterizar los mecanismos de resistencia al glifosato en biotipos de *P. paniculatum*. Se realizó un diagnóstico de uso de herbicidas en cultivos perennes, y mostró que el glifosato es el plaguicida más utilizado en pejibaye para palmito (93% del total de herbicidas y 91% del total de plaguicidas, con 2,74 kg i.a. ha⁻¹), en cítricos (51% y 78% respectivamente con 2,68 kg i.a. ha⁻¹) y en palma aceitera (64% y 66% respectivamente con 4,24 kg i.a. ha⁻¹). En algunos campos de cultivo de pejibaye para palmito y banano de la región caribeña de Costa Rica, donde se aplicó glifosato varias veces al año a su dosis recomendada (910 g e.a. ha⁻¹) y por más de una década, se observó un control deficiente de esta maleza. Entre los años 2012 y 2014 se realizaron bioensayos en invernadero de dosis respuesta que confirmaron la resistencia al glifosato. Plantas de biotipos R de 5 hojas sin hijos (edad I) eran de tres a ocho veces menos sensibles al glifosato que plantas de biotipos susceptibles (S); plantas con uno a tres hijos (edad II) eran dos a cinco veces menos sensibles que los biotipos S. La absorción, transporte (a diferentes partes de la planta) y exudación, medida con glifosato C¹⁴ (radio marcado) y por medio de fosforimágenes, fueron similares, para ambas edades, tanto en biotipos resistentes (R) como S. El glifosato y el AMPA, su metabolito principal, se determinaron por LC-MS/MS en plantas R aplicadas con 1,0 kg e.a. ha⁻¹ y en

plantas sin tratar. No se detectó AMPA en ninguna muestra de tejidos de plantas tratadas, pero sí se encontró glifosato en niveles altos (25 a 33 ppm), lo que indica que el metabolismo diferencial del herbicida no confiere resistencia en estos biotipos de *P. paniculatum*. Plantas de biotipos S y R se trataron con glifosato (0,72 kg e.a. ha⁻¹) y se midió acumulación de ácido shikímico a las 6, 24, 48, 72, 96 y 144 horas después de la aplicación (hda). Los biotipos S acumularon entre cinco y ocho veces más ácido shikímico que los biotipos R a las 6 y 144 hda; también se trataron discos con diferentes concentraciones de glifosato, se midieron a las 24 hda y resultó que los biotipos S acumularon más shikimato que los biotipos R a dosis bajas de 15,6 µM (7 veces), 31 µM (10 veces), 63 µM (5 veces), 125 µM (3 veces), que a dosis altas 250 y 500 µM (2 veces), lo que sugiere que el mecanismo de resistencia se debe a una alteración en el sitio enzimático. Tanto los biotipos R como S tenían valores bajos y similares de EPSPS, por lo que se concluye que la amplificación genética no es el mecanismo de resistencia en esta especie. Para determinar si además existía una sobreproducción (número de copias del gen) o una sobreactividad de la enzima, se midió la concentración de EPSPS y su actividad enzimática. Las cantidades de proteína extraídas no fueron suficientes para completar los experimentos de actividad de EPSPS. Por medio de la secuenciación del gen de la EPSPS se encontró una sustitución de aminoácidos en dos posiciones. La sustitución P₁₀₆L dio lugar a cambios en la distancia entre aminoácidos y provocó que la enzima adoptara una conformación condensada que le imposibilita la unión con el glifosato y el PEP; la otra sustitución (V₃₃₂A) restaura parcialmente la conformación del sitio de unión del shikimato-3-fosfato, afectada por la mutación P₁₀₆L, lo que sugiere que la doble mutación en el gen EPSPS es la responsable de la resistencia a glifosato en *P. paniculatum*. Se concluye que la resistencia a glifosato en biotipos de *P. paniculatum* de Costa Rica se debe a una doble mutación en el sitio activo.

Abstract

Paspalum paniculatum is a perennial herbaceous grass species originating from South America. It is of economic importance as a weed in plantation crops where glyphosate is widely used in its control. Glyphosate is a broad spectrum herbicide and its activity is due to the inhibition of the enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) responsible for aromatic amino acids and other important substances synthesis in plants. A diagnosis of herbicides used in perennial crops showed glyphosate is the most used pesticide in palm heart (91% of total of pesticides and 93% of total herbicides with 2.74 kg a.i. ha⁻¹), in citrus (51% and 78% respectively with 2.68 kg a.i. ha⁻¹) and in oil palm (64% and 66% respectively 4.24 kg a.i. ha⁻¹). Reduced control by glyphosate at its recommended field rate (910 g a.e. ha⁻¹) has been observed in palm (for hearts) and banana crops in the Caribbean region of Costa Rica in fields exposed for more than a decade to multiple applications per year. The main objective of the study was to characterize glyphosate resistance mechanisms in resistant (R) biotypes. Greenhouse dose-response bioassays carried out in 2012-2014 confirmed that putative R plants with 5 leaves and no tillers (stage I) were indeed three to eight fold less sensitive to glyphosate, and plants with one to three tillers (stage II) were two to five fold less sensitive than known susceptible (S) biotypes. Glyphosate absorption, translocation (to different parts of the plant) and exudation measured with radio labeled C¹⁴ glyphosate and phosphor imaging were similar in both R and S biotypes for both grown stage. Glyphosate and AMPA, its main metabolite, were determined by LC-MS/MS in R plants sprayed with 1.0 kg a.e. ha⁻¹ and in untreated controls. AMPA were found in any sample, but glyphosate residues were found at high levels (25 to 33 ppm) in tissues of treated plants, indicating that differential metabolism of the herbicide does not confer resistance. Plants from representative individual S and R biotypes were treated with glyphosate (0.72 kg a.e. ha⁻¹) and shikimic acid was extracted 6, 24, 48, 72, 96 and 144 h after

treatment (hat), The S biotypes accumulated between five and eight times more shikimic acid than did the R biotypes at 6 and 144 hat; also discs plants were treated with different glyphosate concentrations and measured 24 hat, S biotypes accumulate more shikimate than R at low doses 15,6 μM (7 fold), 31 μM (10 fold), 63 μM (5 fold), 125 μM (3 fold) than at high doses 250 and 500 μM (2 fold), suggesting that the resistance mechanism is an active site type. EPSPS was extracted in order to measuring protein concentration (gene copy number) and enzymatic activity. Both resistant and susceptible biotypes had low and similar EPSPS copy, thus gene amplification is not the resistance mechanism. The protein extraction quantities were not enough to complete the EPSPS activity experiments. Sequencing of the EPSPS gene found a double single amino acid substitution at position P₁₀₆L that made the enzyme insensitive to glyphosate by assumed a condensed conformation results in changes in the distance between amino acids, and the substitution V₃₃₂A that partially restores the conformation of the binding site for Shikimate-3-phosphate that was affected by the P₁₀₆L mutation, suggesting that mutation on EPSPS gene is the responsible for *P. paniculatum* resistance to glyphosate. The conclusion is: resistance in *P. paniculatum* biotypes of Costa Rica is due a target site double mutation.

1. Introducción

La agricultura convencional intensiva depende de una gran variedad de plaguicidas químicos sintéticos para controlar las plagas que afectan los cultivos. Uno de los grupos de plaguicidas de mayor uso en estos sistemas de producción lo constituyen los herbicidas, y dentro de este grupo, el glifosato representa el de mayor uso, tanto en el mercado mundial como en el nacional. Su relativo bajo precio, alta eficacia y disponibilidad en el mercado, amplio espectro de control de malezas anuales, perennes, herbáceas y leñosas, tanto de hoja angosta como de hoja ancha, inciden en el amplio uso de glifosato en una gran variedad de cultivos, sistemas de mínima labranza y zonas no agrícolas. En años recientes, el aumento en áreas de cultivos transgénicos con resistencia al glifosato, ha hecho que globalmente su empleo se expanda aún más.

Estas ventajas comparativas del glifosato han estimulado su uso frecuente, lo que provoca una exposición repetida de las poblaciones de malezas, generando una presión de selección que conduce al aumento de la frecuencia de individuos resistentes. Es así como poblaciones que usualmente se controlaban con la dosis recomendada de glifosato, sobreviven y se reproducen aún siendo expuestas a esa dosis letal, evolucionando en resistentes. A nivel mundial se han reportado 40 especies de malezas con resistencia comprobada al glifosato, desde que se informó el primer caso en Australia en 1996 (Heap 2017). Esta rápida evolución de resistencia al glifosato, es una prueba más de que todo herbicida es vulnerable a enfrentarla (Shaner et al. 2012).

El glifosato controla las plantas susceptibles penetrando vía foliar y transportándose hasta los cloroplastos, donde se encuentra su sitio de acción; es el único herbicida comercial que inhibe una enzima específica dentro de la ruta metabólica del shikimato, responsable de la síntesis de aminoácidos aromáticos y la producción de otros importantes metabolitos (Jaworski 1982). Los mecanismos

responsables de la resistencia al glifosato en varias especies son diversos y pueden estar o no relacionadas con su sitio de acción.

En Costa Rica, el glifosato se utiliza en muchos cultivos, incluidos café, banano y plátano, cítricos, palma aceitera, palmito y en zonas no agrícolas. Es un herbicida de toxicidad aguda baja para los humanos, sin restricciones de venta, y representa una importante herramienta en el manejo de malezas en el país. Sin embargo, a partir de observaciones y comunicaciones personales sobre problemas de control de malezas con aplicaciones comerciales de glifosato en fincas productoras de pejibaye para palmito, Valverde (2010), determinó que dos especies de poáceas, *Eleusine indica* y *Paspalum paniculatum*, evolucionaron resistencia a este herbicida.

En dichas fincas, los productores se han visto obligados a elevar las dosis de glifosato o a utilizar otros herbicidas de mayor costo o de mayor impacto ambiental y a la salud, lo cual conlleva un aumento en los costos de mantenimiento del cultivo sin que se logre un control exitoso de ambas especies.

El conocer los mecanismos de resistencia a herbicidas es importante para desarrollar estrategias de manejo de malezas en sistemas agrícolas, buscando su sostenibilidad, tanto para reducir la evolución de resistencia como para manejar las poblaciones resistentes ya existentes. El mecanismo específico de resistencia al glifosato de los biotipos resistentes de *E. indica* y *P. paniculatum* encontrados en Costa Rica no se ha dilucidado.

Este trabajo pretendió determinar el o los mecanismos de resistencia a glifosato en biotipos de *P. paniculatum*, especie nativa de Suramérica, cuyas poblaciones hasta la fecha solo han evolucionado resistencia en Costa Rica. Para lograr los objetivos, primeramente se diagnosticó el manejo de malezas en cultivos perennes para determinar los factores que propiciaron esa evolución de resistencia al glifosato; se condujo experimentos con glifosato radio marcado para detectar el destino de la molécula del herbicida en la planta después de ser tratada y para

determinar si la reducción en la absorción, exudación o transporte del herbicida contribuyen a la resistencia. Además, se determinó la concentración de metabolitos del glifosato, que permite inferir si la resistencia se debe a una metabolización acelerada; y se hicieron evaluaciones moleculares para establecer si existen diferencias genéticas entre los biotipos resistentes y susceptibles, que involucren mutaciones, duplicaciones o mayor actividad de la enzima blanco, como causales de la resistencia.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Determinar el mecanismo de resistencia de *P. paniculatum* L. al herbicida glifosato.

2.2 Objetivos específicos

Establecer si la resistencia de *P. paniculatum* al glifosato se debe a una alteración en el sitio de acción del herbicida.

Evaluar si la resistencia de *P. paniculatum* al glifosato se debe a una modificación en el transporte o metabolización del herbicida.

Identificar el tipo de manejo agronómico que favorece la evolución de resistencia de *P. paniculatum* al herbicida glifosato en los sistemas agrícolas de Costa Rica.

3. Marco teórico

3.1 La maleza *Paspalum paniculatum* L.

Paspalum paniculatum tiene varios sinónimos botánicos como *Panicum paniculatum*, *Paspalum affine*, *P. compressicaule*, *P. cordovense*, *P. galmarra*, *P. guineense*, *P. fluitans*, *P. hemisphericum*, *P. multispica*, *P. polystachium*, *P. strictum*, *P. supinum* y *P. umbrosum* (USDA 2016; TaiBIF 2016; ITIS 2016).

Es una monocotiledónea perenne, herbácea, cespitosa, erecta o decumbente, de base densamente hirsuta, que en Costa Rica alcanza alturas de 0,75 a 1,5 m (Pohl 1980), con tallos reproductivos que llegan a los 100 cm (Barea et al. 2006) (Figura 1A).

Posee una raíz fibrosa con presencia de rizomas cortos (Barreto 1974), un tallo o culmo erecto que se ramifica en los nudos basales y medios, con nudos prominentes pardos y pubescentes y entrenudos glabros. Sus hojas son simples, alternas, con envés glabro, haz pubescente y blanquecino, de 8 a 15 cm de largo, 1 a 2 cm de ancho y con el ápice acuminado. Las vainas se traslapan, son ciliadas en la base con pelos irritantes; posee una lígula membranácea con anillo de cilios de 0,5 a 1 mm (Figura 1B).

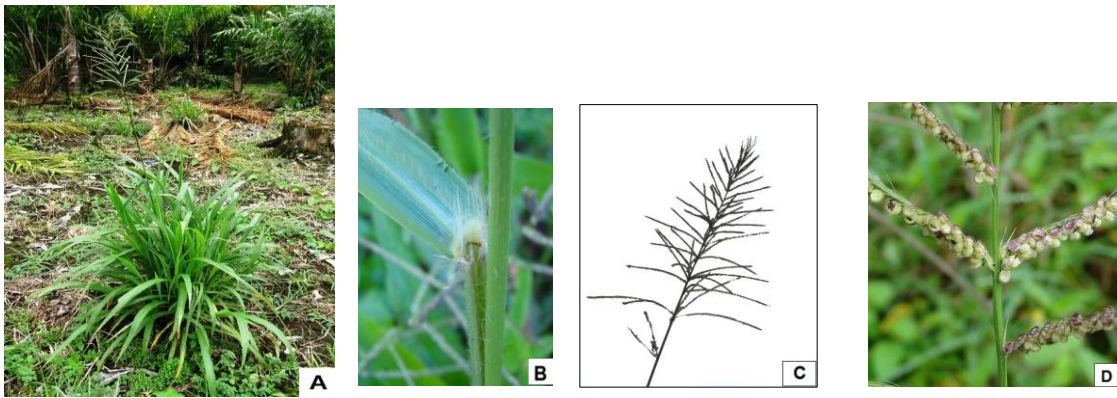


Figura 1. Planta (A), lígula (B), panícula (C) y espiguillas (D) de *P. paniculatum*. (Fotos por F. Ramírez).

Su inflorescencia consiste de una panícula terminal solitaria, de 5 a 30 cm de largo, compuesta por 8 a 21 racimos de 3 a 4 cm de largo que son ciliados en el punto de unión con el raquis (Hammel et al. 2003) (Figura 1C). Las espiguillas son pareadas, dispuestas en 4 filas de un lado de la espiga (Figura 1D), de 1,2 a 1,5 mm (PIER 2014). Sus flores son púrpura a café, de 1 mm largo y planas de un lado. El fruto es un cariósipide oscuro, café a púrpura, circular, cerca de 0,8 mm de

largo y posee una semilla por fruto. Aunque en la especie existe una alta frecuencia de poliploidía, Pozzobon et al. (sf), Fernandes et al. (1974) y Honfi et al. (1990), encontraron biotipos brasileños y argentinos diploides ($2n=2x=20$), aunque estos dos últimos autores también encontraron un biotipo tetraploide argentino. Los biotipos de Costa Rica y Venezuela poseen un número cromosómico de $n=10$ (Pohl 1980) y los costarricenses son diploides (Pohl y Davidse 1971). Burson (1979 y 1987) la describe como una planta autopolinizable, con muy baja capacidad de cruzamiento, perteneciente a un género que usualmente contiene especies autógamas o apomícticas, lo que impide su hibridación con otras especies de *Paspalum*. Se reproduce principalmente por semillas, aunque también lo hace vegetativamente por cepas o rizomas basales. Florece la mayor parte del año, principalmente de enero a abril, de junio a agosto y de octubre a diciembre (Hammel et al. 2003).

En Costa Rica se conoce popularmente como Zacate Cabezón. En estados juveniles se le considera forraje, pero es tóxico para bovinos por acumular nitratos y nitritos durante la transición de la época seca a la lluviosa. Es un pasto originario de Suramérica y actualmente se encuentra distribuido desde el sur de Estados Unidos (Mississippi) (USDA 2016) hasta Argentina, incluyendo las islas del Caribe, y ha sido introducido en todos los trópicos mundiales (PIER 2014). Crece en suelos arcillosos de buena fertilidad y especialmente en áreas perturbadas y bajo sol o sombra parcial, cultivos perennes, potreros, jardines, terrenos baldíos, bordes de caminos y zonas urbanas, en elevaciones que van de 0 a 1 500 metros sobre el nivel del mar.

Es una planta muy rústica y agresiva, llega a dominar por completo la vegetación por lo que es una de las especies de poacea más comunes en Costa Rica. Se le encuentra en las zonas de vida de Bosque Seco, Bosque Húmedo, Bosque Muy Húmedo y Bosque Pluvial, en las vertientes del Caribe y Pacífica, Valle Central, norte del Valle del General y Golfo Dulce (Hammel et al. 2003; Pohl 1980). Es frecuente en cultivos perennes como café, palmito, cítricos, banano, coco,

guanábana, papaya, palma africana, piña, y también se le encuentra en cultivos anuales como yuca y tiquizque, bordes de caminos, pastizales y orillas de canales (Ramírez 2016; Brenes y Agüero 2007).

3.2 El herbicida glifosato

El glifosato, (N-(fosfometil) glicina), es un herbicida de aplicación foliar pos emergente, sistémico, no selectivo, ampliamente usado para el control de plantas herbáceas y leñosas, tanto anuales como perennes, de hoja angosta y ancha. Es el herbicida de mayor uso en el mundo, tanto en términos de volumen como de valor (Research and Markets 2016), y de igual forma en Costa Rica; actualmente es el segundo plaguicida de mayor importación en el país, representando del año 2006 al 2010 el 10,5% del total de plaguicidas y el 33,6% del total de herbicidas (Ramírez et al. 2013; Wakelin et al. 2004).

La molécula del glifosato fue inicialmente sintetizada en 1950 por el químico suizo Dr. Henri Martin, quien trabajó para la pequeña compañía farmacéutica Cilag; el producto no tuvo aplicaciones farmacéuticas y nunca fue reportado en la literatura (Franz et al. 1997). En 1959, Cilag fue comprada por Johnson y Johnson, que vendió sus muestras experimentales, incluyendo al glifosato, a la compañía Aldrich Chemical, la cual vendió pequeñas cantidades del compuesto a muchas compañías al año siguiente, para fines no revelados, pero nunca se le reportó actividad biológica. Una de las compañías, Monsanto, en su división de Inorgánicos, estuvo desarrollando compuestos acondicionadores de aguas y sintetizó más de cien sustancias análogas del ácido aminometilfosfónico (AMPA), un metabolito del glifosato; cuando esos compuestos fueron evaluados como herbicidas por el Dr. Phil Hamm, dos de ellos mostraron cierta actividad sobre malezas perennes, pero muy baja para considerarla como un herbicida comercial (Dill et al. 2010).

Posteriormente, el Dr. John Franz continuó los trabajos con metabolitos; en mayo de 1970, el glifosato fue sintetizado por Monsanto (Saint Louis, Missouri), probado en invernadero en julio, avanzó en el proceso de pruebas de eficacia biológica en campo, para finalmente ser presentado ese mismo año como el herbicida comercial de marca Roundup (Baird et al. 1971).

La producción de glifosato en 2014 se estimó en 710 000 T, con un valor de 5,5 millardos de US dólares, y se proyecta que exceda 1,1 millones T en 2022, para alcanzar valores de 9,5 millardos de US dólares (Research and Markets 2016; Global Market Insights 2016). Algunos de los principales productores de glifosato son las industrias BASF SE (Alemania), Bayer CropScience (Alemania), Monsanto Company (EE.UU.), Nufarm Ltd. (Australia), Syngenta AG (Suiza), Dow AgroSciences LLC (EE.UU.), DuPont (EE.UU.), Sino Harvest (China), Zhejiang Xinan Chemical Industrial Group Company, Ltd. (China), Jiangsu Good Harvest-Weien Agrochemical Co. Ltd, (China) y Nantong Jiangshan Agrochemical & Chemicals Co. Ltd. (China) (Markets and Markets 2016); de estas, las industrias localizadas en China sintetizan cerca del 80% de la producción mundial, en aproximadamente 200 fábricas con capacidad para producir 720 000 T (Business Wire 2016). Los principales consumidores de glifosato son Norteamérica, América Latina y la región Asia-Pacífico (Global Market Insights 2016).

Debido a sus propiedades herbicidas no selectivas, inicialmente el glifosato fue usado solamente para el control de malezas en zonas no agrícolas, industriales, campos en barbecho y bordes de canales y carreteras. Su uso en campos agrícolas fue limitado hasta el desarrollo de la práctica de mínima labranza, donde se aplica glifosato antes de la siembra (Dill et al. 2010); pero su uso aumentó considerablemente con la introducción de los cultivos transgénicos resistentes a glifosato a mediados de los 90, ya que el daño al cultivo por el herbicida no era relevante (Nandula 2010).

Se utiliza en aplicaciones en pre siembra, dirigidas, en zonas urbanas, no agrícolas y en cultivos transgénicos resistentes; también se usa como madurador en caña de azúcar. Se empezó a comercializar en 1974 con la marca Roundup (Woodburn 2000). En Costa Rica se tienen registros de importaciones desde el año 1982 con cerca de 50 T de ingrediente activo (i.a.) con un aumento en sus importaciones, especialmente alto a partir de los 90, para llegar a 1 482 T i.a. en 2008 (Ramírez et al. 2009). Algunas formulaciones comercializadas en Costa Rica que contienen glifosato son Roundup, Atila, Balazo, Batalla, Biokil, Estelar, Evigras, Lince, Rambo, Rimaxato, Rival, Rodeo, Rondopaz y Skoba.

Estas formulaciones contienen el glifosato en forma de sal en solución acuosa. Una de las primeras en comercializarse fue la sal de isopropilamina, la más utilizada actualmente en Costa Rica (Figura 2). Otras son sales de sodio, tetrametilsulfonio (glifosato trimesium), potasio, amonio, monoetanolamina y dimetilamina (Dill et al. 2010). En Costa Rica están registradas, además de la sal isopropilamina, formulaciones de glifosato en forma de sal potásica (Touchdown Forte 50 SL) y sal de amonio (Roundup Max 68 WG). En el 2013 fue cancelado el registro de una formulación de sal tetrametilsulfónica (Touchdown 33 SL), debido a que el registrante no presentó la documentación relacionada a la reválida (SFE 2015).

Actualmente, debido a la expiración de la exclusividad de la patente de Monsanto en el año 2000 (Duke y Powles 2008), se encuentran registradas para su comercialización en el mercado nacional, 74 formulaciones que contienen glifosato: 71 con un ingrediente único y 3 en mezcla con otros herbicidas (dos con terbutilazina y una con metsulfuron metilo). Estas formulaciones comerciales contienen glifosato en concentraciones que van desde 20,4% hasta 76% de i.a., principalmente al 35,6 y 68% y formulado en líquidos solubles (SL) y gránulos dispersables (WG), respectivamente (SFE 2015). La mayoría de las formulaciones comerciales poseen algún tipo de coadyuvante, ya que debido a su baja

liposolubilidad, el glifosato necesita de estas sustancias para mejorar su penetración en las plantas.

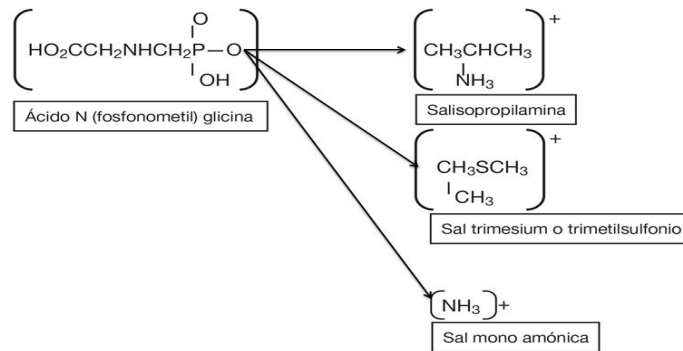


Figura 2. Estructura química de las sales del ácido glifosato.
Fuente: Kogan y Pérez (2001).

En Costa Rica las formulaciones de glifosato están autorizadas en 32 cultivos agrícolas, además en pastos, plantaciones forestales y áreas no agrícolas (SFE 2015). Cultivos perennes como café, palma africana, banano, plátano, caña de azúcar, cacao, cítricos, papaya, mango, macadamia, guanábana, piña, coco y otros frutales, tienen registros para uso de glifosato; también cultivos anuales como arroz, papa, melón, maní, frijol, algodón, soya y sorgo. Al contrario, existe una variedad de cultivos donde no se encuentran registradas para su uso formulaciones que contienen glifosato. Estos cultivos son hortalizas como apio, berenjena, cebolla, chile, coliflor, culantro, espinaca, pepino, remolacha, repollo, tomate y vainica; raíces y tubérculos como camote, jengibre, malanga, ñame, ñampí, tiquizque y yuca; frutales como guayaba, granadilla, maracuyá, mora, fresa, palmito, pejibaye y pimienta.

El glifosato posee muchos atributos positivos como herbicida, incluyendo su efectividad en un amplio número de especies, baja toxicidad aguda para mamíferos y ausencia de actividad herbicida en el suelo, lo que ha contribuido a

considerarlo clave en el manejo de malezas en la agricultura moderna (Jasieniuk et al. 2008).

Es muy tóxico para organismos acuáticos como peces y algas; medianamente tóxico para anfibios, crustáceos y lombrices de tierra (Folmar et al. 1979; Giesy et al. 2000). Además, los coadyuvantes que se utilizan en sus formulaciones pueden aumentar sus propiedades toxicológicas; un estudio hecho con la formulación original de Roundup, mostró que el surfactante podría ser el agente tóxico primario en el herbicida, especialmente para peces e invertebrados acuáticos (Folmar et al. 1979).

El glifosato es un herbicida altamente hidrosoluble, con la capacidad de contaminar rápidamente aguas de escorrentía y superficiales como ríos y lagunas; se adsorbe a las partículas del suelo (Tuffi Santos et al. 2008) y puede de esta forma estar biodisponible para organismos que se alimentan por filtración de sedimentos. Esta adsorción a partículas, ayuda en la mayoría de suelos, a que el glifosato no alcance a contaminar las aguas subterráneas; aunque Piccolo et al. (1996), determinaron que este herbicida puede ser transportado a través del perfil por sustancias húmicas. Esta situación es atenuada por su valor bajo de vida media en suelos, reportado de menos de una semana y hasta uno a dos meses (Giesy et al. 2000; Roy et al. 1989).

A pesar de su inactivación en el suelo como herbicida, varios estudios demuestran el impacto que tiene el glifosato en bacterias que participan en el ciclo del nitrógeno, al interferir en los procesos de descomposición de la materia orgánica. De hecho, inicialmente fue patentado como un agente antimicrobial (US Patent number 7 771 736 B2. 2010) (Dill et al. 2010). El glifosato puede ser exudado por raíces y retornar en forma disponible a la solución del suelo (Massenssini et al. 2008); y si permanece disponible por un tiempo suficientemente largo, de uno a cinco días, puede causar cierto daño a las plantas que lo absorben (Salazar y Appleby 1982). También puede disminuir drásticamente las poblaciones de

lombrices de tierra (*Eisenia foetida*) (Santadino et al. 2014) y aumentar el número de actinomicetes y otros hongos (Araujo et al. 2003; Florida et al. 2012).

Otro efecto que puede causar el glifosato sobre las plantas, aún en condiciones de deriva, es la disminución de las concentraciones de calcio, manganeso, magnesio y hierro, tanto en hojas como en semillas, al inmovilizar fisiológicamente estos nutrientes, especialmente en los tejidos meristemáticos, debido a que este herbicida es un poderoso agente quelatante para cationes bivalentes (Cakmak et al. 2009).

3.3 Modo de acción del glifosato

Las moléculas de glifosato, que poseen carga negativa (Franz 1985), se absorben desde la superficie de las hojas, donde la primera barrera es la cutícula foliar, compuesta de una capa de cera lipofílica (Kirkwood 1991), hasta las células de la planta, desde donde son rápidamente transportadas por el sistema floemático hacia los tejidos meristemáticos (Laerke 1995; Franz et al. 1997), para alcanzar el sitio de acción en dosis letales. Así, cambios en la absorción del herbicida, metabolismo y transporte pueden afectar la sensibilidad de la planta, al necesitar alcanzar el sitio de acción en una concentración apropiada (Reddy et al. 2008). La buena absorción y transporte hacia los puntos de crecimiento, la nula o limitada degradación y un lento modo de acción, son las razones primarias que le dan una excelente eficacia al glifosato (Duke y Powles 2008).

3.3.1 Absorción

Las sales de glifosato son moléculas altamente polares, solubles en agua con muy baja liposolubilidad, que penetran la cutícula lipofílica de las hojas probablemente por difusión, hacia la cutina hidratada y las bandas de pectina o vía hidrofílica, en el apoplasto (Caseley y Coupland 1985; Franz et al. 1997; Hess 1985).

Es un proceso bifásico que comprende una penetración inicial rápida a través de la cutícula, en unas 4 horas, seguido de una absorción lenta por el simplasto o las células del mesófilo (Caseley y Coupland 1985; Brecke y Duke 1980). La duración de este proceso depende de varios factores como la especie, edad de la planta y concentración del herbicida (Monquero et al. 2004), y condiciones ambientales, incluidas las que alteran el potencial hídrico de la planta o que influyen sobre la tasa de transpiración (humedad relativa, humedad del suelo, temperatura, absorción mineral) (Sharma y Singh 2001); o la mayor producción de cera en la cutícula, como sucede a bajas intensidades de luz (Franz et al. 1997).

3.3.2 Transporte

La eficacia del glifosato depende estrictamente de la dosis del herbicida que es transportada hacia el simplasto o a las porciones vivas de la planta (Nandula 2010). Después de penetrar por las hojas, el glifosato debe ser transportado hacia los tejidos vasculares para alcanzar los sitios metabólicos activos, como los meristemos radicales y apicales (Satchivi et al. 2000); esta habilidad de transportarse en la planta hacia los meristemos y órganos subterráneos, le provee una alta efectividad como herbicida (Shaner 2009).

Aunque no se sabe exactamente cómo ingresa el glifosato al floema, el herbicida debe de entrar en el lumen floemático, presumiblemente a través de la membrana plasmática, ya sea por difusión de masas seguido de ingreso al floema a través de los plasmodesmos, o ser tomado activamente dentro del mesófilo o células acompañantes por medio de transportadores de fosfatos dentro de la membrana celular (Burton y Balke 2012; Franz et al. 1997; Sterling 1994; Caseley y Coupland 1985). Una vez que el glifosato entra a los elementos cribosos es atrapado y transportado hacia los sumideros (Shaner 2009). Por este motivo, los órganos que poseen altas tasas de metabolismo y crecimiento, representan importantes destinos del glifosato (Cakmak et al. 2009).

La mayoría del herbicida se transporta siguiendo la ruta de los foto asimilados hacia los meristemas (Shaner 2009; Preston y Wakelin 2008; Monquero et al. 2004); esto explica por qué la mayor acumulación del herbicida después de una aplicación se da en los puntos de crecimiento, ubicados en los brotes y los ápices de las raíces (Reddy et al. 2008). Pero los herbicidas que se mueven en este patrón simplástico, cuando son aplicados a las hojas y tallos, inicialmente tienen que ingresar y moverse a través del apoplasto vía acrópeta (Jachetta et al. 1986; Dewey y Appleby 1983). Esto puede conducir a que el glifosato viaje con la corriente de transpiración y quede atrapado en los ápices de las hojas, como sucede en plantas resistentes de *Lolium* sp (Perez-Jones et al. 2007; Lorraine-Colwill et al. 2003; Wakelin et al. 2004).

En plantas de *Conyza bonariensis*, Dinelli et al. (2008) comprobaron movimiento del herbicida tanto por vía del floema como del xilema; en el transporte de glifosato del tallo hacia las hojas se involucró tanto la parte simplástica como apoplástica, pero el movimiento de tallo hacia raíz se dio exclusivamente por vía simplástica. Este movimiento apoplástico del glifosato, es suficiente para considerarlo como un compuesto ambimóvil (Franz et al. 1997).

En la mayoría de plantas, el transporte xilemático es relativamente expedito (Pérez-Jones y Mallory-Smith 2010), hasta 20 a 50 veces más rápido que el floemático (Kleier y Hsu 1996); y dentro de los herbicidas conocidos que poseen movimiento simplástico, el glifosato es el que se transporta más eficientemente (Bromilow et al. 1990). Esta eficiencia es afectada por factores como una alta temperatura e intensidad lumínica, que aceleran el transporte del glifosato (Franz et al. 1997; Sharma y Singh 2001).

El transporte floemático de compuestos iónicos, como el glifosato, se da por el efecto trampa iónica, causado por la diferencia de pH entre el apoplasto (normalmente ácido o subácido) y el simplasto (usualmente neutro o subalcalino) (Raven 1975; Brigs et al. 1987). La funcionalidad ionizable del glifosato, el cual

contiene tres grupos ácidos y una fuerte base amina, es la que le confiere una movilidad simplástica alta (Figura 3); la pérdida de uno o más de esos grupos ácidos puede afectar sus propiedades zwitteriónicas y reducir su movimiento en el floema (Bromilow y Chamberlain 2000).

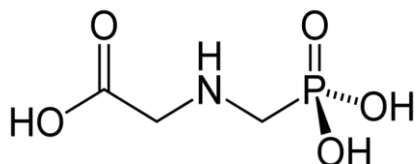


Figura 3. Estructura química del glifosato ($C_3H_8NO_5P$).
Fuente: Dill et al. (2010).

3.3.3 Metabolismo

Una característica asociada a la alta actividad del glifosato es que la mayoría de plantas son incapaces de degradarlo metabólicamente (Franz et al. 1997). La enzima glifosato oxireductasa (GOX), que permite a algunos microorganismos del suelo metabolizar el glifosato en ácido aminometilfosfónico o aminometilfosfonato (AMPA) y glioxilato, no ha sido encontrada en plantas (Duke et al. 2003).

Algunas especies como *Equisetum arvense* y cultivos como maíz, canola, trigo, arveja, centeno, lino y soya resistentes a glifosato, degradan lentamente el herbicida produciendo AMPA y dióxido de carbono (Bozzo 2010; Coupland 1985; Franz et al. 1997; Reddy et al. 2004; Marshall et al. 1987). Esto sugiere que una GOX, u otro tipo de enzima similar, cataliza esa conversión (Reddy et al. 2008).

La degradación del glifosato sigue una vía similar a la propuesta para bacterias del suelo, por medio de una escisión oxidativa del enlace carbono nitrógeno, produciendo además otros metabolitos como glioxilato y sarcosina (Schuette 1998). Algunos cultivos puros de bacterias como *Flavobacterium* sp.,

Pseudomonas sp. y *Arthrobacter atrocyneus* son capaces de degradar el glifosato en AMPA (Balthazor y Hallas 1986; Pipke y Amrhein 1988), en el proceso de la extracción del fósforo presente en la molécula del herbicida (Hove-Jensen et al. 2014).

El AMPA es mucho menos fitotóxico para la mayoría de plantas (Franz 1985), pues es considerado menos activo que el glifosato. El modo de acción del AMPA es aparentemente diferente al del glifosato, ya que tanto la soya convencional como la transgénica resistente a glifosato, son igualmente sensibles al AMPA (Bozzo 2010).

3.3.4 Exudación

La movilidad del glifosato en el floema, puede favorecer su exudación por el sistema radical de las plantas tratadas (Coupland y Caseley 1979; Rodrigues et al. 1982). El glifosato en contacto con el suelo es adsorbido por sus coloides, principalmente por óxidos de hierro, calcio y por la materia orgánica, fijándose a la solución del suelo y quedando no disponible para las plantas, especialmente en suelos arcillosos (Tuffi Santos et al. 2008). A pesar de lo anterior, algunos autores como Rodrigues et al. (1982), reportan en plantas de trigo tratadas, exudación de glifosato hacia el suelo con la subsecuente absorción del herbicida por plantas adyacentes de maíz. Tuffi Santos et al. (2008), también encontraron glifosato radio marcado exudado de plantas tratadas del pasto *Brachiaria decumbens*, que posteriormente fue absorbido vía raíz por plantas vecinas de eucalipto, en concentraciones inferiores a las necesarias para causar daño visible al cultivo (entre 0,5% y 0,9% del glifosato aplicado).

3.3.5 Mecanismo de acción

El glifosato tiene un mecanismo de acción exclusivo, la inhibición de la ruta metabólica del shikimato, localizada en los cloroplastos, que no fue descubierta sino hasta 8 años después de iniciada su comercialización (Steinrucken y Amrhein 1980). Es el único herbicida en el mercado derivado del aminoácido glicina, que inhibe, de forma competitiva, la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3 fosfato sintetasa (EPSPS), sexta enzima en la vía de síntesis proteica del shikimato, en donde el fosfoenolpiruvato (PEP) y la eritrosa-4-fosfato son convertidos a corismato, precursor de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano) y muchos metabolitos aromáticos secundarios como auxinas, fitoalexinas, antocianinas y lignina (Jaworski 1982; Herrmann y Weaver 1999). Además, provoca un agotamiento de los intermediarios en la fijación de CO₂ como bifosfato de ribulosa, una reducción en la fotosíntesis y en la síntesis de almidones (Steinrucken y Amrhein 1980). La ruta metabólica del shikimato consume cerca del 20% del total de carbono fijado por las plantas durante la fotosíntesis (Herrmann y Weaver 1999), y solo existe en plantas, bacterias y hongos (Kishore y Shah 1988).

La enzima EPSPS cataliza la transferencia de una parte del enolpiruvil del PEP a shikimato-3-fosfato (S3P) para producir 5-enolpiruvil shikimato-3-fosfato (EPSP) y fosfato inorgánico (Geiger y Fuchs 2002). El glifosato actúa como un inhibidor competitivo con el PEP (Schonbrunn et al. 2001), ocupa el lugar de unión del PEP (Funke et al. 2006), e inhibe la EPSPS al formar el complejo ternario EPSPS-S3P-Glifosato, uniéndose a la enzima solo después de la formación del complejo binario EPSPS-S3P (Alibhai y Stalling 2001); siendo este mecanismo de inhibición único (Franz et al. 1997).

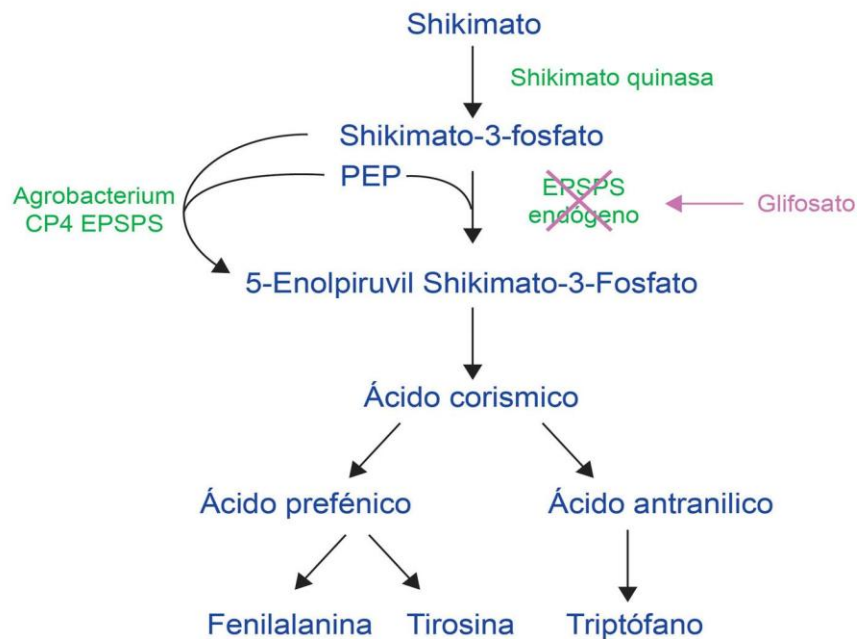


Figura 4. Sitio de inhibición del glifosato en la ruta metabólica del shikimato. Fuente: Dill (2005).

Como ya se mencionó, la inhibición de la EPSPS por parte del glifosato, evita la síntesis de aminoácidos aromáticos; sin embargo, un mayor y rápido efecto es la inhibición de la retroalimentación del flujo de carbono a través de la vía del shikimato, que resulta en un rápido aumento en la acumulación de ácido shikímico y, en menor medida, de ácidos benzoicos derivados del shikimato (Duke et al. 2003).

También se ha propuesto que la interferencia del glifosato con la EPSPS conduce a la reducción de niveles de arogenato, que incrementa el flujo de carbono en la vía del shikimato al reactivar la actividad de la enzima 3-deoxi-D-arabino-heptuloso-7-fosfato sintetasa (DAHPS), que provoca una acumulación no regulada de shikimato (Siehl 1997). Precisamente, el descubrimiento del modo de acción del glifosato, se debió en gran medida a la alta y rápida acumulación de shikimato, observada en plantas susceptibles después de una aplicación del

herbicida (Amrhein et al. 1980), lo que en la actualidad se utiliza rutinariamente como una forma de medir toxicidad de glifosato (Singh y Shaner 1998).

Esta toxicidad se detecta inicialmente en los tejidos nuevos, ya que los genes que codifican la EPSPS muestran su máxima expresión primeramente en los meristemos, luego en flores y brotes; y son menos expresados en cotiledones y hojas maduras (Weaver y Herrmann 1997). Por esta razón, una dosis de 0,2 mg kg⁻¹ (peso: peso tejido) de glifosato en la planta *Abutilon theophrasti*, fue suficiente para matar las regiones meristemáticas de raíces y brotes, mientras que para tallos se necesitó 8,4 mg kg⁻¹ (Feng et al. 2003).

Todas estas etapas del modo de acción provocan los síntomas de fitotoxicidad del glifosato: blanqueamiento y clorosis en los tejidos sumideros metabólicamente activos (Franz et al. 1997); pigmentación, retraso en el crecimiento y reducción en la dominancia apical (Ng et al. 2003), que avanzan a una necrosis de los tejidos sobre la superficie del suelo y a un deterioro de las partes subterráneas de la planta. Los efectos visibles iniciales de toxicidad por glifosato en la mayoría de malezas anuales, se pueden presentar desde los 2 a 4 días, y en malezas perennes hasta en 7 días; condiciones de bajas temperaturas o días nublados después del tratamiento, atrasan el desarrollo de los síntomas visuales (Schuette 1998).

3.4 Resistencia a herbicidas

Determinadas especies de plantas, tanto cultivadas como malezas, son capaces de vivir y crecer aun después de ser tratadas con un herbicida a su dosis recomendada, aunque puedan ser controladas cuando la dosis se eleva sustancialmente. Este tipo de respuesta se conoce como tolerancia natural y se define como “la capacidad heredable de una especie vegetal para sobrevivir y reproducirse después del tratamiento con un herbicida”, pudiendo considerarse

una característica propia de la especie (WSSA 1998). Este término se usa al referirse a las bases fisiológicas y bioquímicas de la selectividad de herbicidas, dada por reacciones primarias de detoxificación, que le dan a la planta la habilidad de soportar ciertos tratamientos herbicidas (Devine et al. 1993).

Debido a la variabilidad genética de las malezas y como consecuencia de la presión selectiva impuesta por la aplicación continua de herbicidas, que caracteriza a los sistemas modernos de producción agrícola, es posible la evolución de biotipos de malezas que dejan de ser controladas por un determinado herbicida al que originalmente eran susceptibles. Tal respuesta se conoce como resistencia, siendo una característica seleccionada en una población específica (biotipo). El Comité de Acción en Resistencia a Herbicidas (HRAC, por sus siglas en inglés) define resistencia como la capacidad evolucionada heredable de una población o biotipo de maleza para sobrevivir y reproducirse después de la aplicación de una dosis de herbicida que era letal para la población original.

Por décadas, las malezas resistentes a herbicidas han sido un problema para los productores (Heap 1997). Los primeros casos de malezas resistente a herbicidas fueron los de *Commelina diffusa* en cañales de Hawái, Estados Unidos y de *Daucus carota* (zanahoria silvestre) en bordes de carreteras en Ontario, Canadá, ambos para el 2,4-D y documentados en 1957 (Heap 2017). Durante la década de 1970, más de 30 especies de malezas fueron reportadas como resistentes a herbicidas del grupo de las triazinas (Bandeem et al. 1982).

La mayoría de herbicidas inhiben enzimas específicas que son esenciales para el metabolismo de las plantas (Powles y Yu 2010); lo que se conoce como efecto sobre el sitio activo (Busi et al. 2013). Así, los herbicidas se clasifican de acuerdo con las enzimas o procesos que inhiben (Heap 2017).

La resistencia a herbicidas puede ser conferida por cambios en el sitio activo o por mecanismos fuera del sitio activo. La resistencia de sitio activo existe cuando el herbicida alcanza el sitio de acción en dosis letales pero hay cambios en su sitio

de acople o en su cantidad, que limitan el impacto del herbicida; y la resistencia fuera del sitio activo involucra mecanismos que minimizan o impiden al herbicida alcanzar el sitio activo (Powles y Yu 2010).

Estos dos tipos de resistencia no son excluyentes el uno del otro, incluso en biotipos de malezas resistentes se presentan acúmulos en el efecto de varios genes, que producen cambios fenotípicos significativos debido a selección recurrente, aún en pocas generaciones y en pequeñas poblaciones, lo que Ffrench-Constant et al. (2004) definieron como resistencia poligénica, y que algunos autores como Gressel (2009), llaman resistencia progresiva (*creeping resistance*).

También es común que en una maleza se exprese un mecanismo de resistencia que le confiere la habilidad de soportar herbicidas de la misma o diferente familia química con un modo de acción similar, lo que se conoce como resistencia cruzada; y casos en los que la expresión de más de un mecanismo de resistencia proporciona la habilidad de resistir herbicidas de diferentes modos de acción, lo que se define como resistencia múltiple (Hall et al. 1994).

3.5 Evolución de resistencia a herbicidas

La resistencia es esencialmente un fenómeno natural, un ejemplo de evolución adaptativa de las malezas, que ocurre de forma espontánea en poblaciones; no es inducida por la acción del herbicida, pero solo es notada cuando se ejerce presión de selección sobre las malezas a través de la aplicación repetida de un herbicida (Fisher 2012). Así, se hace una selección de mutaciones naturales o de individuos resistentes preexistentes (Duke et al. 1991).

En virtud de su eficacia biológica, el herbicida ejerce presión de selección sobre las poblaciones de malezas, de modo que los individuos que naturalmente poseen un mecanismo que les permite soportar el efecto del producto, sobreviven y se

reproducen (Valverde y Heap 2009). A medida que se suceden las generaciones expuestas al herbicida, se incrementa así el número de individuos resistentes que no se controlan, hasta constituirse en la mayor proporción de la población, haciéndose evidente la ineficacia del herbicida.

Diferentes factores, tanto propios de las malezas como de los herbicidas, determinan la evolución de resistencia. La variabilidad genética de las malezas es uno de los atributos más importantes que influyen en la evolución de resistencia (Baucom y Mauricio 2004), la cual incluye la frecuencia de mutaciones. Cada especie tiene una constitución genética particular y se considera que los genes de resistencia están presentes en las poblaciones silvestres, aunque en una proporción muy baja (Bradshaw et al. 1997); así, las mutaciones responsables de la resistencia a herbicidas no son inducidas por el herbicida, sino que ocurren de forma espontánea (Jasieniuk et al. 1996); aunque podrían provocarse de forma indirecta, como lo ejemplifica Gressel (2011), al citar que después de una aplicación de glifosato, aún a dosis bajas, habrían muchas más mutaciones inducidas por rayos UV, al detenerse la síntesis de flavonoides (Keen et al. 1982; Sharon et al. 1992), que son elementos protectores contra este tipo de radiación.

Estimaciones sobre genes de resistencia a glifosato en *L. rigidum*, hechas por varios investigadores (Neve et al. 2003; Neve 2008; Werth et al. 2008), sugieren que sus frecuencias iniciales están entre 1×10^{-8} y 1×10^{-6} ; además, el costo de adaptación (*fitness*) contribuye a que la relativa baja frecuencia de genes de resistencia al glifosato sea aún menor (Christoffers y Varanasi 2010). El tiempo que pasó entre la introducción del glifosato en el mercado y la detección de malezas resistentes, sugiere que la frecuencia de alelos resistentes funcionales en poblaciones de malezas, debe ser extremadamente baja (Gressel 2011). La frecuencia inicial de estas mutaciones determina el número de generaciones requeridas para que la resistencia sea evidente y depende del número de genes (monogénico, poligénico y nivel de ploidía), mecanismo de herencia, tipo de gen y naturaleza de la modificación del gen (Warwick 1991).

De esta forma, la dinámica de la evolución de resistencia de poblaciones de malezas a herbicidas depende de varios factores relacionados a: las características de los genes de resistencia (frecuencia, cantidad, dominancia y costo de adaptación); la biología de las especies de malezas (auto o polinización cruzada, capacidad de producción de semillas, latencia y longevidad del banco de semillas, capacidad de dispersión del polen y semillas); el herbicida (estructura química, sitio activo, actividad y residualidad); y a los factores operativos que ejercen presión de selección (dosis del herbicida, habilidad del aplicador en manejo de maquinaria, tiempo y ambiente, factores del agro ecosistema como rotación de cultivos, manejo preventivo y no químico de las malezas, entre otros) (Powles y Yu 2010).

3.6 Resistencia de malezas al glifosato

Inicialmente se pensaba que la evolución de malezas resistentes a glifosato sería muy lenta y que los niveles de resistencia serían muy bajos (Bradshaw et al. 1997); además, se consideraba al herbicida como de bajo riesgo para la selección de resistencia (Beckie 2006). Esta suposición se basaba en la gran cantidad de glifosato aplicado por muchos años, tomando en cuenta el volumen de uso, las aplicaciones repetidas hechas en cultivos perennes, el alto nivel de actividad herbicida que demostró tener, la excluyente actividad metabólica en plantas, la ausencia de residualidad en el suelo, la escasa variabilidad (Bradshaw et al. 1997) y la alta estabilidad de la EPSPS (CaJacob et al. 2003), particularmente en los sitios que son críticos para la catálisis (Shaner 2010).

A pesar del dominio global del herbicida Roundup y de otras formulaciones de glifosato, el primer caso de resistencia no fue documentado sino más de veinte años después del inicio de su comercialización. Pratley et al. (1996), reportaron una población de *L. rigidum* (*ryegrass*) en Australia resistente a glifosato, la cual luego fue evaluada y confirmada por Powles et al. (1998). Actualmente en promedio, un tercio del área cultivada con maíz, soya y algodón en Estados

Unidos, Brasil y Argentina, está infestada con malezas resistentes a glifosato (Peters y Strek 2016).

El número de casos y especies resistentes ha aumentado hasta conformar un amplio grupo de 293 biotipos pertenecientes a 40 especies de malezas, en 29 países: Estados Unidos, Canadá, Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Colombia, Venezuela, Paraguay, México, Australia, Nueva Zelanda, Francia, España, Hungría, Italia, Suiza, Portugal, Grecia, República Checa, Polonia, Israel, China, Japón, Korea del Sur, Malasia, Indonesia, Sudáfrica y Costa Rica (Heap 2017).

Cuadro 1: Especies de malezas resistentes a glifosato a diciembre 2017.

Familia	Especie
Asteraceae	<i>Ambrosia artemisifolia</i> , <i>A. trifida</i> , <i>Bidens pilosa</i> , <i>Conyza canadensis</i> , <i>C. bonariensis</i> , <i>C. sumatrensis</i> , <i>Lactuca saligna</i> , <i>L. serriola</i> , <i>Parthenium hysterophorus</i> , <i>Sonchus oleraceus</i> y <i>Tridax procumbens</i> .
Poaceae	<i>Brachiaria eruciformis</i> , <i>Bromus diandrus</i> , <i>B. rubens</i> , <i>Chloris elata</i> , <i>C. truncata</i> , <i>C. virgata</i> , <i>Cynodon hirsutus</i> , <i>Digitaria insularis</i> , <i>Echinochloa colona</i> , <i>Eleusine indica</i> , <i>Hordeum murinum</i> , <i>Leptochloa virgata</i> , <i>Lolium multiflorum</i> , <i>L. rigidum</i> , <i>L. perenne</i> , <i>Urochloa panicoides</i> , <i>Paspalum paniculatum</i> , <i>Poa annua</i> y <i>Sorghum halepense</i>
Amaranthaceae	<i>Amaranthus hybridus</i> , <i>A. palmeri</i> , <i>A. tuberculatus</i> , <i>A. spinosus</i> y <i>Kochia scoparia</i>
Plantaginaceae	<i>Plantago lanceolata</i>
Brassicaceae	<i>Raphanus raphanistrum</i>
Chenopodiaceae	<i>Salsola tragus</i>
Rubiaceae	<i>Hedyotis verticillata</i>

Fuente: Heap 2017.

Gran parte de las malezas que han evolucionado resistencia al glifosato lo han hecho en cultivos perennes, con la similitud de recibir aplicaciones con dosis comerciales frecuentes y por varios años. Así, se han reportado varias especies

de poáceas (*L. multiflorum*, *L. rigidum*, *E. indica* y *D. insularis*) en campos de frutales y viñedos luego de 8 a 20 años de uso (Pérez-Jones y Kogan 2003; Perez-Jones et al. 2007; Powles et al. 1998; Jasieniuk et al. 2008; Perez-Jones et al. 2005; Collavo et al. 2012; Ng et al. 2004a; de Carvalho 2011); y la Asteracea *C. bonariensis* en campos de olivo después de 4 a 6 años de aplicaciones regulares con glifosato (Dinelli et al. 2008).

Otros casos de evolución rápida de resistencia a glifosato han ocurrido por utilizar el herbicida persistentemente a dosis bajas, como en el caso de Australia, donde las dosis recomendadas son aproximadamente la mitad de las utilizadas para el mismo propósito en otras partes del mundo (Pratley et al. 1996). Lo anterior fue experimentalmente repetido durante una década por Busi y Powles (2009), obteniendo resultados similares.

El mismo fenómeno se ha observado con otros herbicidas. Neve y Powles (2005), indican que una población de *L. rigidum* aplicada con bajas dosis recurrentes del herbicida diclofop-metil, evolucionó con altos niveles de resistencia debido a la selección y al enriquecimiento de varios mecanismos menores. Ashworth et al. (2016), reportan que el aplicar dosis subletales del herbicida 2,4-D, por cuatro generaciones, a plantas susceptibles de *Raphanus raphanistrus* (rábano silvestre), produjo evolución de resistencia al 2,4-D y resistencia múltiple a herbicidas inhibidores de la acetolactato sintetasa (ALS).

Esta rápida evolución de resistencia al usar dosis subletales, se atribuye a la alta tasa de sobrevivencia de las malezas (Neve y Powles 2005; Gressel y Levy 2006) y no al estrés que el herbicida pueda generar (Gressel 2011). El estrés es un factor que aumenta la tasa de mutaciones, así, los sobrevivientes podrían tener más mutaciones de lo normal que podrían incluir aquellas que lleven a resistir herbicidas (Gressel 2011).

Por el contrario, altas dosis de herbicida resultan en alta mortalidad de malezas, pero en una selección de genes peculiares, capaces de proporcionar altos niveles

de resistencia; sin embargo, la selección con dosis bajas de herbicida, donde algunas de las plantas sobreviven, permite el rápido acúmulo de muchos posibles genes de resistencia, tanto débiles como fuertes, especialmente en especies de polinización cruzada (Powles y Yu 2010); para *P. paniculatum* no se esperaría que este fenómeno ocurriera muy fácilmente, ya que para su control no se usan dosis bajas y es una especie mayormente autopolinizable (Burson 1987).

Costo de adaptación

Un principio básico en la evolución genética de los organismos es que, la adaptación a nuevos ambientes a menudo tiene efectos pleiotrópicos negativos en la capacidad adaptativa que se tenía en el ambiente original, lo que se llama penalización por costo de adaptación o “*fitness*” (Purrington 2000; Strauss et al. 2002). La presión de selección que conlleva a la evolución de resistencia se podría considerar como un nuevo ambiente. Este costo de adaptación contribuye con el mantenimiento del polimorfismo genético dentro de las poblaciones (Antonovics y Thrall 1994) y previene el establecimiento de los nuevos alelos recién adaptados (Tian et al. 2003).

Por ejemplo, una sustitución simple de un aminoácido puede causar una modificación estructural en la enzima blanco que limita el acople del herbicida, pero también puede comprometer su funcionalidad (Tranel y Wright 2002; Powles y Preston 2006; Powles y Yu 2010). Otro ejemplo de pérdida de *fitness* lo dan Kishore et al. (1992) y Funke et al. (2009), en experimentos de laboratorio con la bacteria *E. coli*, donde encontraron que la mutación T₁₀₂I por sí sola provoca altos niveles de resistencia, pero con una drástica disminución de la afinidad para el segundo sustrato (PEP).

Autores como Yu et al. (2015), indican también un “costo por resistencia” a nivel enzimático debido a la reducción en la eficiencia catalítica. Waters (1991),

Jasieniuk (1995) y Bradshaw et al. (1997), encontraron que mutaciones en el gen de la EPSPS se asociaron con un alto grado de penalización por *fitness*.

Así mismo, plantas cuyo mecanismo de resistencia es la reducción en el transporte de glifosato, han mostrado tener penalidades por adaptación. Estos costos pueden ser debidos a un cambio en la habilidad de los biotipos resistentes (R) de absorber o transportar importantes metabolitos o nutrientes, como los fosfatos (Shaner 2009). Por ejemplo, biotipos R de *L. rigidum* producían semillas más pequeñas comparadas con los biotipos susceptibles (S), lo que pudo deberse a una menor eficiencia en el transporte de foto asimilados (Pedersen et al. 2007).

Esta penalización por costo de adaptación se expresa en algunas especies únicamente en la ausencia del herbicida (sin presión de selección) (Beckie 2011), lo que es una desventaja evolutiva de las poblaciones R ante las S. Investigaciones hechas por Baucom y Mauricio (2004), demostraron que plantas de *Ipomoea purpurea* tolerantes al glifosato produjeron 35% menos semillas que plantas susceptibles de la misma población, cuando no eran aplicadas con el herbicida.

De esta forma, cuando no existe presión de selección del herbicida, los individuos con alelos resistentes a glifosato, reducen su frecuencia en la población. Preston y Wakelin (2008), observaron que individuos resistentes a glifosato del pasto *L. rigidum*, se volvían menos frecuentes, reduciéndose su frecuencia fenotípica de 45% a 11%, en el curso de tres años de haber dejado de aplicar glifosato. Estos estudios pueden sugerir que la reducción del *fitness* asociada a la resistencia a glifosato, se podría explotar en el manejo de ciertas malezas resistentes a este herbicida (Preston et al. 2009).

Investigaciones recientes de Han et al. (2017), en *E. indica* con altísimos niveles de resistencia a glifosato, producto de mutaciones en la EPSPS, encontraron que en condiciones de competencia, plantas homocigóticas con la mutación simple P₁₀₆S no presentaron costo de adaptación; pero cuando la mutación doble se

presentaba de forma homocigótica, exhibían un costo significativo por *fitness*, y sorprendentemente, no había costo cuando las plantas eran heterocigotas con doble mutación.

A pesar de lo anterior, también se ha visto que algunos alelos mutantes que confieren resistencia a herbicidas, no producen impactos observables en la capacidad adaptativa de algunas plantas resistentes (Vila-Aiub et al. 2009). Por ejemplo, individuos de *L. rigidum* cuyo mecanismo de resistencia es la reducción del transporte del herbicida, no presentaban reducción del crecimiento vegetativo bajo competencia con trigo, cuando se comparaban con individuos S, y las plantas R producían semillas más grandes, pero en menor cantidad, bajo ausencia o muy poca intensidad de competencia con el cultivo (Pedersen et al. 2007). En plantas R y S del congénera *L. multiflorum* también se observó un potencial de adaptación similar (Ruchel et al. 2016).

Muchos de los rasgos de resistencia tienen muy poco o ningún costo por adaptación; sin embargo, la resistencia dada por amplificación del gen de la EPSPS tiene un costo significativo; estudios en invernadero realizados por Wu et al. (2016) indican que la frecuencia de estos individuos en una población, se reduce de 40% a 15% después de 6 generaciones.

De forma contraria, plantas de *A. palmeri* cuyo mecanismo de resistencia al glifosato se asocia con una amplificación de la EPSPS de 76 veces, bajo condiciones de competencia, pero sin glifosato, tenían una altura similar y asignaban la misma cantidad de biomasa a órganos reproductivos y vegetativos que plantas de biotipos S sin la amplificación anterior, asegurándose de esta forma su reproducción, al no penalizarse con un costo de adaptación (Vila-Aiub et al. 2014). Así mismo, plantas R de *A. palmeri* creciendo bajo las mismas condiciones que plantas S, eran más altas, poseían mayor biomasa, más ramas y una mayor eficiencia en el uso del nitrógeno (Leon et al. 2016).

3.7 Mecanismos de resistencia al glifosato

Los mecanismos de resistencia al glifosato se han estudiado en varias especies: *L. rigidum*, *L. multiflorum*, *C. bonariensis*, *C. canadensis*, *E. indica*, *S. halepense*, *E. colona*, *A. palmeri*, *A. tuberculatus* y *D. insularis*, pero no en *Paspalum paniculatum*. Básicamente, se han encontrado dos formas generales por las cuales las plantas resisten al glifosato: las dependientes o basadas en el sitio de acción, como mutaciones en la secuencia de aminoácidos que componen la enzima blanco o una alta presencia (duplicación del gen del sitio activo o altos niveles de transcripción) o actividad de esa enzima; y los no basados o independientes del sitio de acción, como un limitado transporte o absorción, aislamiento o secuestro vacuolar y una respuesta rápida de necrosis, que provoca que el herbicida no alcance la enzima blanco.

A pesar de que, curiosamente, ahora los mecanismos de resistencia para glifosato exceden los descritos para cualquier otro herbicida, estos involucran con menos frecuencia al sitio activo y a mecanismos metabólicos, comparado con otros herbicidas como los que inhiben la acetolactato sintetasa (ALS) y la acetil coenzima A carboxilasa (ACCase) (Heap 2017).

El conocimiento de los procesos biológicos, como los mecanismos responsables de la resistencia a herbicidas en una determinada maleza, es fundamental para el diseño de estrategias de control (Fisher 2008; Powles 2009), que busquen minimizar el impacto que tienen las malezas sobre la producción agrícola.

3.7.1 Dependientes del sitio de acción

En general, las malezas susceptibles poseen una enzima específica con una función importante para la sobrevivencia de la planta, que cuando es inhibida por la molécula del herbicida, conduce a su muerte. Cuando las plantas susceptibles se tratan con glifosato, el herbicida inhibe la EPSPS por lo que el sustrato no puede continuar su vía metabólica normal y se convierte en shikimato, el sustrato

desfosforilado de la enzima, el cual se acumula en la planta al no poder ser consumido en cantidad suficiente por otras vías metabólicas (Amrhein et al. 1980)

El shikimato es un buen marcador de la actividad del glifosato en las plantas; se presenta en concentraciones suficientemente altas como para permitir su detección analítica; por ser químicamente estable permite un procesamiento fácil de las muestras, y es biológicamente relevante, dada la magnitud del flujo de carbono a través de la vía del shikimato (Mueller et al. 2008). Dosis subletales de glifosato causan un aumento transitorio de los niveles de shikimato endógeno, que son bajos en la mayoría de plantas, alcanzando un pico entre 4 a 7 días después de la aplicación (dda), para luego descender (Anderson et al. 2001; Henry et al. 2007).

El descubrimiento del mecanismo de acción del glifosato se debió, en gran medida, a que la adición de varias combinaciones de tres aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptofano), a plantas después de ser tratadas con el herbicida, revertía en parte el daño (Shaner y Lyon 1980); y a la muy rápida y alta acumulación de ácido shikímico en los tejidos de plantas después de la aplicación (Steinrucken y Amrhein 1980).

La resistencia al glifosato por una alteración en el sitio activo de la enzima blanco, usualmente confiere niveles bajos de resistencia (de 2 a 4 veces), comparado con la resistencia por transporte reducido (Dinelli et al. 2006; Kaundun et al. 2008; Sammons y Gaines 2014). Esto contrasta con lo observado con otros herbicidas (inhibidores de ALS o ACCasa), para los que las mutaciones en la enzima blanco, generalmente confieren niveles de resistencia muy altos (Cruz-Hipólito et al. 2011; Kaundun 2010; Warwick et al. 2008).

3.7.1.1 Mutaciones en la EPSPS

Las mutaciones en el gen de la enzima blanco, son uno de los principales mecanismos que permiten la evolución de resistencia a glifosato (Gressel 2002;

Powles y Yu 2010); generalmente producen un nivel bajo de resistencia, ya que en la competencia del glifosato con el sustrato PEP, se disminuye la capacidad catalítica de la EPSPS (Yu et al. 2015; Schonbrunn et al. 2001).

Las mutaciones en el gen que codifica la enzima generalmente son sustituciones de nucleótidos (Tranel y Wright 2002), aunque existe un reporte, para otro herbicida (lactofen), donde se removió todo un codón de aminoácidos (Patzoldt et al. 2006).

El primer caso de resistencia a glifosato en el sitio activo fue identificado en un biotipo de *E. indica*, y se debió a una sustitución del aminoácido serina en la posición Pro₁₀₆ (Pro₁₀₆Ser) en una región altamente conservada del gen de la EPSPS (Baerson et al. 2002a). Esta misma mutación se había identificado en estudios previos de laboratorio con *Salmonella typhimurium* y produjo altos niveles de resistencia cuando se introdujo en *E. coli* (Comai et al. 1983), y niveles moderados en *Petunia* (Padgett et al. 1991).

La mayoría de mutaciones que confieren resistencia al glifosato corresponden al sitio Pro₁₀₆, un aminoácido hidrofóbico de la EPSPS y se presentaron como un simple cambio de pares de bases en un nucleótido, sustituyendo el aminoácido prolina, por los hidrofílicos serina (Pro₁₀₆Ser), o treonina (Pro₁₀₆Thr), o por los hidrofóbicos alanina (Pro₁₀₆Ala) o leucina (Pro₁₀₆Leu) (Yu et al. 2015). El codón Pro₁₀₆ (CCx) puede mutar a la sustitución por Ser, Ala o Tre, comúnmente reportada, en la primera base del codón (TCx, GCx y ACx respectivamente); las sustituciones en la segunda base del codón pueden producir Leu (CTx, muy infrecuentemente reportada), Arg (CGx), glutamina (CAA/G) o histidina (CAC/T) (Sammons y Gaines 2014). Las mutaciones Pro₁₀₆Arg, Gln y His no han sido reportadas a la fecha.

Las poblaciones de malezas que presentan mutaciones simples son seis, más frecuentemente en el género *Lolium* sp., incluido *L. rigidum* y *L. multiflorum* (Perez-Jones et al. 2007; Kaundun et al. 2011; Bostaman et al. 2012; Collavo y

Sattin 2012), además *D. insularis* (de Carvalho et al. 2012), *E. indica* (Baerson et al. 2002a), *E. colona* (Alarcon-Reverte et al. 2013) y *A. tuberculatus* (Nandula et al. 2013; Bell et al. 2013), la primera dicotiledónea reportada con una mutación.

Los índices de resistencia (IR) de las poblaciones de malezas con mutaciones individuales (un solo codón), cuando es el único mecanismo de resistencia involucrado, son relativamente bajos. En *E. indica* son de 2 a 4 (Baerson et al. 2002a; Ng et al. 2003, 2004b; Kaundun et al. 2008), en *L. multiflorum* de 2 a 5 (Jasieniuk et al. 2008), en *L. rigidum* de 2 a 3 (Wakelin y Preston 2006), y en *E. colona* son de orden moderada, de 4 a 9 (Alarcón-Reverte et al. 2014).

Estos bajos niveles de resistencia que confieren este tipo de mutaciones, se explican debido a que el amino ácido Pro₁₀₆ no está directamente involucrado en el enlace del PEP o del glifosato en la EPSPS (Sammons et al. 2007; Arnaud et al. 1998); pero las sustituciones en este sitio, cambian la orientación de los otros dos aminoácidos, se reduce la afinidad con el glifosato, sin alterar el sitio de unión para el S3P o PEP y solo provocan un mínimo efecto en la eficiencia catalítica de la enzima (Healy-Fried et al. 2007; Schonbrunn et al. 2001; Stallings et al. 1991; Zhou et al. 2006).

Cuando estas mismas poblaciones evolucionan además con otro mecanismo de resistencia, su IR aumenta. Por ejemplo, en *L. rigidum* la mutación P₁₀₆T confiere un IR de 2 a 3, pero en los individuos que además presentan una reducción del transporte del herbicida, su IR se incrementa a valores entre 8 a 11 (Bostaman et al. 2012).

Gaines et al. (2010) encontraron biotipos de *A. palmeri* de Georgia, Estados Unidos, resistentes a glifosato con un cambio de aminoácidos en el codón 316 de la EPSPS (arginina por lisina), pero esta mutación no fue considerada como la causa de la resistencia, ya que la enzima era igualmente inhibida en plantas R y S.

Las mutaciones en la EPSPS también involucran el cambio en dos codones, lo que se conoce como doble mutación. Antes de que se presentaran de forma natural y en la búsqueda de cultivos tolerantes al glifosato, a nivel de laboratorio se habían generado varias mutaciones dobles en la EPSPS expresadas en *E. coli* y en plantas (Spencer et al. 2000; Howe et al. 2002; Lebrun et al. 2003; Kahrizi et al. 2007; Alibhai et al. 2016). Incluso, la doble mutación fue usada para producir la primera generación comercial exitosa de un maíz transgénico (GA21) resistente a glifosato (Spencer et al. 2000) y para el mismo propósito Kahrizi et al. (2007), patentaron tanto la T₁₀₂I + P₁₀₆T como la T₁₀₂L + P₁₀₆A.

También se ha identificado una doble sustitución de aminoácidos, T₁₀₂I + P₁₀₆S (conocida como TIPS), en *E. indica* de China (Chen et al. 2015; Han et al. 2017) y de Australia (Yu et al. 2015) que produjo altos niveles de resistencia al glifosato con una aceptable afinidad por PEP, o sea sin presentar penalidades por adaptación. Este tipo de mutaciones dobles tienen frecuencias más bajas que las mutaciones simples en un solo nucleótido (10^{-18} en lugar de 10^{-9}) (Gressel y Levy 2006).

Yu et al. (2015), encontraron que plantas de *E. indica* con mutación simple en el sitio P₁₀₆S, eran moderadamente resistentes a glifosato (IR de 5,6), mientras que plantas con doble mutación eran altamente resistentes (más de 180 veces). Las plantas TIPS podían resistir más de 20 veces la dosis recomendada de glifosato (1 080 g ha⁻¹), pero presentaban problemas en su crecimiento (costo por *fitness*).

Un dato curioso referente a respuesta al herbicida, lo encontraron Han et al. (2015), en plantas de *E. colona*, resistentes a glifosato por tener una o dos mutaciones en el mismo sitio Pro₁₀₆; estas eran controladas con la dosis comercial (450 g e.a. ha⁻¹) cuando se aplicaron bajo condiciones de temperatura de 20 a 25 °C; sin embargo, cuando eran tratadas en condiciones más cálidas (30 a 35°C), la mayoría (68%) pudieron sobrevivir y se encontró un incremento, tanto para biotipos R y S, en la dosis letal media (DL₅₀) de 2,5 veces.

3.7.1.2 Sobreexpresión de la EPSPS

Uno de los mecanismos de resistencia al glifosato descubierto recientemente en malezas, específicamente en *A. palmeri*, una de las principales malezas en el Sur de los Estados Unidos, es contar con numerosas copias del gen EPSPS en su genoma; además, este mecanismo dentro de esta población, se correlacionó con la transcripción, nivel proteico y actividad de la EPSPS (Gaines et al. 2010). El mismo fenómeno de amplificación fue encontrado en poblaciones de *A. tuberculatus* por Tranel et al. (2011).

La duplicación de genes se define como la replicación heredable de un segmento de ADN, lo que resulta en una o más copias de genes dentro del genoma de un organismo (Innan y Kondrashov 2010); es un evento vital para generar diversidad genética y un proceso común en la historia evolutiva de las plantas (Flagel y Wendel 2009).

Algunos biotipos de *L. multiflorum* de Arkansas, Estados Unidos, son resistentes a glifosato gracias a una mayor actividad de la EPSPS debido a este fenómeno (Salas et al. 2012). Otro resultado similar, pero en cultivos celulares, atribuía la resistencia al incremento en la actividad enzimática, particularmente debido a una amplificación de genes y no a una EPSPS menos sensible (Pline-Srnic 2006). Esto permite a esas plantas superar los efectos inhibitorios del herbicida, posiblemente al proveerles enzima en exceso para unir el sustrato fisiológico PEP, aún en presencia de glifosato (Zmienko et al. 2014)

También hace varias décadas, Nafziger et al. (1984), encontraron en una línea de zanahoria silvestre tolerante a glifosato, un incremento de 12 veces en su actividad enzimática debido a un aumento entre 4 a 25 veces del número de copias del gen de la EPSPS (Suh et al. 1993). De forma similar, petunias híbridas con 20 veces más actividad enzimática, poseían 20 veces más copias de genes de la EPSPS que el testigo (Steinrucken et al. 1986).

En plantas, el gen de la EPSPS normalmente tiene pocas copias. Monocotiledóneas como el arroz, tienen una sola copia por genoma haploide (Xu et al. 2002). Los cambios en el número de copias pueden ofrecer una vía para alterar rápidamente la dosificación efectiva de un gen, que afecta directamente y en grado variable, al fenotipo.

En el caso anterior, la distribución aleatoria de la copia de genes en el genoma de la EPSPS, sugiere la participación de elementos de trasposición en la creación de esas nuevas copias (Gaines et al. 2010). Dillon et al. (2016) sugieren que el evento inicial de duplicación de genes de la EPSPS de *A. tuberculatus* pudo haber ocurrido debido a la desigualdad de la recombinación mediada por el ADN repetitivo; posteriormente, la amplificación génica se habría dado a través de otros mecanismos, tales como reordenamientos cromosómicos, delección o inserción, dispersión mediada por transposón o posiblemente por hibridación interespecífica. La amplificación génica en *A. palmeri* es un evento muy complejo, que incluye una unidad de amplificación multigénica (EPSPS *cassette*) que entre otros elementos, contiene genes de respuesta al estrés (Molin et al. 2017).

En biotipos R de *L. rigidum* se encontró un incremento de tres veces en los niveles basales de la actividad enzimática, no debido a una amplificación del gen, sino por un aumento del RNAm de la EPSPS (Baerson et al. 2002b). También Dinelli et al. (2008) encontraron niveles altos de RNAm de la EPSPS en varios biotipos de *C. bonariensis* R, que complementaban el principal mecanismo de resistencia, que era la reducción del transporte de glifosato. Recientemente, Tani et al. (2015), encontraron que el mecanismo de resistencia al glifosato en biotipos de *C. canadensis* de Grecia, se debía a la sincronización de los genes de expresión de la EPSPS con los genes transportadores ABC; este mecanismo se basó en el tiempo de inducción y duración de la expresión génica y en la regulación por la carga inicial de glifosato.

3.7.2 Independientes del sitio de acción

3.7.2.1 Detoxificación por metabolización

Aunque algunas malezas podrían tener la habilidad de metabolizar al glifosato como su mecanismo de tolerancia (Duke 2011), a la fecha no existen reportes en la literatura de malezas que hayan evolucionado resistencia a glifosato debido a un aumento en la metabolización del herbicida (Roso y Vidal 2010). La monocotiledónea *Commelina benghalensis*, puede convertir hasta el 41% del glifosato en AMPA 72 horas después de aplicado (hda), lo que le confiere tolerancia al herbicida (Monquero et al. 2004); sin embargo, luego de evaluar metabolismo de glifosato en muchas especies, se encontró que no hay una relación entre la conversión a AMPA y el nivel de resistencia a glifosato (Reddy et al. 2004; Simarmata et al. 2003).

De Carvahlo et al. (2011), empleando electroforesis capilar de polaridad inversa, afirman que biotipos resistentes de la planta *D. insularis*, eran capaces de degradar más del 90% del glifosato aplicado en AMPA, glioxilato y sarcosina 168 hda, mientras que biotipos susceptibles lo hacían en proporciones menores (11%); otro caso similar lo presentaron González-Torralva et al. (2012) en *C. canadensis*. Conociendo el hecho de que esos compuestos, provenientes de la degradación del glifosato, son fácilmente metabolizados en las plantas, Sammos y Gaines (2014) expresan que esa detección requiere ser confirmada por otros medios; además, basándose en lo citado por Spencer et al. (2000), no es claro si el glifosato es metabolizado por la planta o por microorganismos presentes en la superficie de la hoja donde fue aplicado el herbicida.

Sabiendo que algunas leguminosas pueden oxidar el glifosato en AMPA (Reddy et al. 2008), sería estimulante investigar este mecanismo que ha sido ampliamente obviado para determinar si la degradación del herbicida podría contribuir con la resistencia (Sammons y Gaines 2014).

3.7.2.2 Absorción o transporte reducido

Para que un herbicida sea letal, debe alcanzar su sitio de acción en una concentración suficiente. Los herbicidas sistémicos aplicados al follaje tienen que moverse desde la superficie de las hojas hacia el floema, en cantidades suficientes para ser transportados hacia otras partes de la planta; los herbicidas de contacto deben al menos ingresar a las hojas (absorción) (Currier y Dybing 1959). La falta de transporte de un herbicida posibilitará reducir su concentración en el sitio de acción, lo que permitirá a la planta mantener su desarrollo (Busi et al. 2013). Estas bajas concentraciones pueden lograrse, ya sea mediante una reducción en la penetración o en el transporte, o por la secuestración en organelas celulares.

Se han propuesto varias hipótesis para explicar los mecanismos que reducen el transporte del glifosato en la planta (Shaner 2009; Roso y Vidal 2010): a- cambio en el transportador que traslada el glifosato dentro de la célula; b- incremento en la acción del transportador que traslada el glifosato a la vacuola; c- aumento de las bombas de flujo activo de glifosato; d- incremento en la acción del transportador que traslada el glifosato fuera del cloroplasto; e- reducción del movimiento del glifosato hacia el cloroplasto; f- inhabilidad del glifosato de reentrar al floema desde el cloroplasto.

Roso y Vidal (2010), proponen que las anteriores hipótesis se pueden integrar en una “Teoría de las Proteínas Transportadoras de Fosfato Modificadas”, ya que debido a las fuertes propiedades adherentes de la parte fosfonada del glifosato, es posible que cualquier transportador fosfato proteico pueda trasladar este herbicida a través de la membrana. Así, uno o más de los muchos tipos de proteínas transportadoras, pueden estar involucrados en la evolución de resistencia.

La reducción en el transporte interno del glifosato en la planta es un mecanismo común de resistencia en *C. canadensis* y en *L. rigidum*, que provoca niveles de resistencia generalmente altos (de 8 a 12 veces), comparados con otros

mecanismos como las mutaciones en la EPSPS, que ofrecen niveles bajos (2 a 3 veces) (Dinelli et al. 2006; Feng et al. 2004; Koger y Reddy 2005; Lorraine-Colwill et al. 2003; Michitte et al. 2007; Preston y Wakelin 2008; Wakelin et al. 2004).

En biotipos R de *C. bonariensis* y *C. canadensis* se da este transporte heterogéneo y reducido del herbicida hacia raíces, otras hojas y a tejidos meristemáticos, con un incremento de la acumulación en las hojas tratadas (Dinelli et al. 2008; Feng et al. 2004); de la misma forma en *L. rigidum* y *L. multiflorum*, el glifosato parece quedar atrapado en la parte apical de las hojas tratadas (Perez-Jones et al. 2007; Wakelin et al. 2004). En biotipos S de estas especies, el glifosato absorbido, primero se mueve apicalmente con la corriente de transpiración y luego es llevado al interior de las venas menores, moviéndose fuera de la hoja tratada hacia el resto de la planta; en biotipos R, el glifosato también se mueve apicalmente con la corriente de transpiración, pero no ingresa tan rápido en las venas menores, por lo que menos cantidad de herbicida es transportado fuera de la hoja tratada (Shaner 2009). Sin embargo, con el tiempo, el glifosato entra al floema y es transportado, aunque en aproximadamente la mitad de la cantidad que ingresa en los biotipos S. De esta forma, el herbicida produce serios daños y muerte en los tejidos aplicados, pero no en los meristemas, que parecieran estar protegidos de la dosis letal y rebrotan después de unas semanas (Ge et al. 2010).

Otro fenómeno que afecta el transporte de glifosato en la planta, e involucra transportadores, encontrado en estudios sobre selectividad de sustratos y competencia (Sammons y Gaines 2014), es el rápido secuestro vacuolar del herbicida; estos autores proponen que, así como los cloroplastos requieren de transportadores para obtener metabolitos importantes, de forma inversa, los transportadores asociados con las dos membranas plastídicas pueden muy exitosamente, de forma conjunta o separada, bloquear la entrega del glifosato al cloroplasto. En biotipos resistentes a glifosato de *C. canadensis*, el rápido secuestro vacuolar ha sido propuesto como la causa de la reducción del

transporte, siendo su principal mecanismo de resistencia (Ge et al. 2010; Ge et al. 2011), y en estudios de herencia genética posteriores se encontró que el secuestro vacuolar es un rasgo dominante importante (Zelaya et al. 2004).

La proporción de secuestro vacuolar del glifosato es alta en algunos biotipos R. Ge et al. (2012), citan para *L. rigidum*, que una gran fracción del glifosato es retenido en la vacuola (69% 14 hda y 90% 24 hda) y que una vez que ingresa a la célula, no sale fácilmente de ésta; lo anterior también fue observado en *C. canadensis* (Ge et al. 2010). Estudios recientes con la misma planta (Ge et al. 2014), concluyen que la entrada del glifosato a la vacuola ocurre de forma activa, por medio de transportadores de ATP (adenosin trifosfato) como sucede en las células de mamíferos. Este secuestro anormal del glifosato podría ser debido a la sobreexpresión de transportadores vacuolares, lo que apoya la hipótesis de que el herbicida penetra en la corriente de asimilados, se mueve de célula a célula pero no ingresa en el cloroplasto en cantidades suficientes o por un periodo extenso, no llegando a inhibir suficiente cantidad de EPSPS (Kleinman y Rubin 2016).

La resistencia fuera del sitio activo es heredable y puede asociarse a mutaciones en genes que no están directamente relacionados con el sitio de acción (Beckie y Tardif 2012).

4. Materiales y Métodos

4.1 Diagnóstico del uso de glifosato

Durante el 2012 se visitaron fincas de producción comercial de cultivos perennes de la zona Huetar Norte, Huetar Atlántica, Pacífico Central y Pacífico Sur, principalmente, y se entrevistó a los encargados del manejo de malezas (agrónomos, productores, aplicadores), para determinar las prácticas de manejo químico de las malezas. Se aplicó una guía de entrevista por finca (Anexo 1)

validada previamente en varios proyectos de investigación sobre uso de plaguicidas en cultivos agrícolas; se incluyeron preguntas sobre uso cronológico de plaguicidas en el último ciclo de producción (un año), datos sobre formulaciones, dosis, frecuencias, descargas y equipo de aplicación utilizado. Se preguntó sobre problemas de control de malezas, especies involucradas, presencia de *P. paniculatum* y, en caso positivo, historial de uso de métodos de control de malezas y cambio en el uso ingredientes activos de herbicidas.

Las fincas visitadas son productoras de palma africana, cítricos y pejobaye para palmito. Para el caso de palma africana, las entrevistas se realizaron en fincas ubicadas en los cantones de Laurel, Palmar Sur, Corredores, Quepos y Parrita, de la provincia de Puntarenas y una localidad de Siquirres, en la provincia de Limón, para un total de 13 fincas que sumaron 36 246 ha (60% del área nacional cultivada ese año). Las 4 fincas productoras de cítricos visitadas se ubicaron en cantones de la zona norte del país: Santa Cecilia, Los Chiles y Guatuso de Alajuela y abarcaron un área de 7 801 ha (36% del área nacional sembrada). Para el caso de palmito se evaluaron 10 fincas ubicadas en Guápiles, Siquirres, Guácimo y Cariari, cantones de la provincia de Limón, que en total sumaron 598 ha (8% del área nacional sembrada).

4.2 Respuesta de biotipos de *P. paniculatum* al glifosato

4.2.1 Origen de la semilla

Para determinar la respuesta de biotipos de *P. paniculatum* al glifosato, se realizaron bioanálisis de invernadero con plantas enteras, cultivadas a partir de semillas recolectadas en fincas comerciales dedicadas a la producción de cultivos perennes, particularmente de pejobaye para palmito (*Bactris gasipaes* Kunth) y banano (*Musa* sp.), donde han tenido problemas de control de esta maleza y se sospecha resistencia a glifosato (biotipos R). Estas fincas se ubican en la Región Huetar Atlántica de Costa Rica, en el cantón de Pococí, provincia de Limón y los

biotipos evaluados se nombraron como B, D y L. La semilla de las plantas susceptibles (biotipos S) se recolectó de lugares donde la población no ha sido expuesta al glifosato: una finca dedicada al cultivo de banano orgánico en la comunidad de Shiroles (biotipo H), cantón Talamanca, Limón, en la Reserva Indígena Bribri, que nunca ha estado expuesta al herbicida; el Campus Omar Dengo de la Universidad Nacional en Heredia (biotipo C) y un borde de camino en San Juan de Santa Cruz, Guanacaste (biotipo T). En estos últimos dos lugares el glifosato se había aplicado no más de una vez al año, en años no consecutivos y se había alternado con controles mecánicos y manuales.

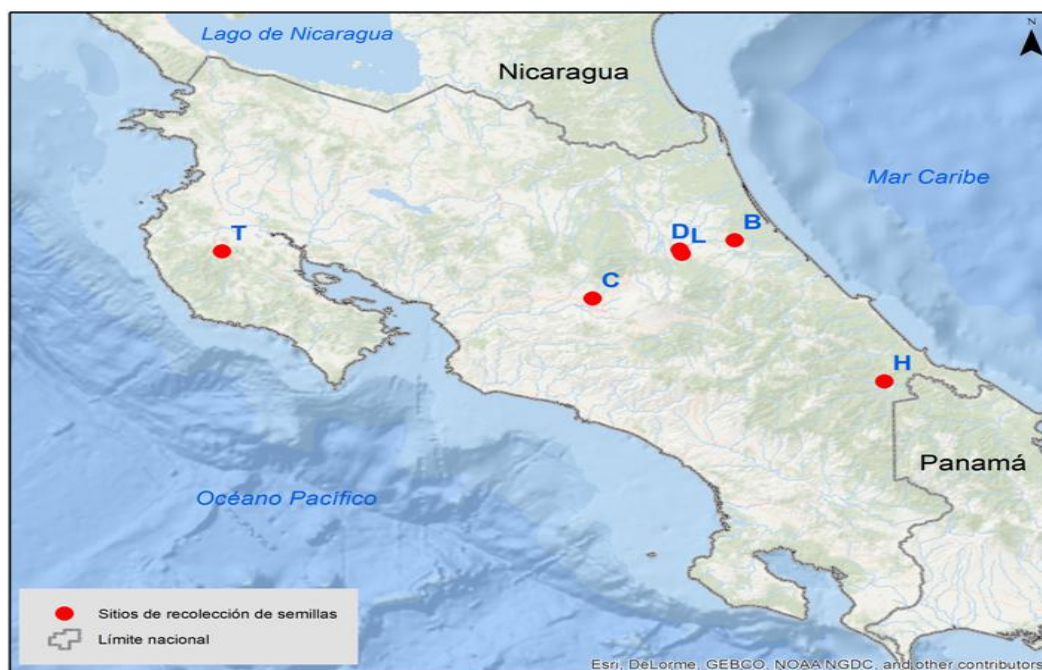


Figura 5. Origen geográfico de biotipos de *P. paniculatum*. B, D y L son biotipos resistentes a glifosato y T, C y H biotipos susceptibles.

Las semillas se recolectaron manualmente de plantas con inflorescencias maduras en proceso de desprendimiento de sus semillas, se colocaron en bolsas de papel, se identificaron y se llevaron al laboratorio para su secado, limpieza y almacenado en cámara fría a 4°C. Posteriormente, las semillas se colocaron en platos petri con

papel de filtro de grado para germinación (Advantec No. 131, Tokio Roshi Kaisha, Japón) humedecido con una solución de nitrato de potasio (0,2% p/v) en una cámara de germinación bajo luz fluorescente continua a 30°C. Cuando las plántulas alcanzaron una altura de aproximadamente 1 cm se trasplantaron a bandejas con una mezcla comercial de sustrato de crecimiento (Pindstrup, Dinamarca) y suelo (50/50) y se colocaron en el invernadero (Investigación y Desarrollo en Agricultura Tropical S.A., Tambor, Alajuela) donde se mantuvieron por tres semanas antes de su trasplante definitivo a macetas para ser tratadas de una a tres semanas después con el herbicida.

Las macetas, con un volumen de 100 dm³, se llenaron con medio de crecimiento (el mismo usado anteriormente en las bandejas) y suelo suplementado con 2 g de fertilizante químico granulado (10-30-10). En cada maceta se trasplantó una plántula de *P. paniculatum* que creció en un invernadero protegido por malla antiáfidos, con techo plástico transparente y con riego aplicado dos veces al día.

4.2.2 Respuesta a dosis crecientes de glifosato

Se determinó la respuesta de los seis biotipos a dosis crecientes de glifosato en dos estados de crecimiento: edad I (plantas de hasta 5 hojas y sin hijos) y edad II (plantas con 1 a 3 hijos) (Figura 6). Las plantas se asperjaron una sola vez con una dilución de la formulación comercial de glifosato (Roundup, Monsanto) que contiene 360 g de equivalente ácido (e.a.) de glifosato por litro, con un equipo portátil accionado por CO₂ y calibrado para descargar 200 L ha⁻¹ a través de una boquilla de abanico plano 8002 (Spraying Systems) sostenida a una altura de 50 cm. Una vez que el follaje tratado se secó, las macetas se transfirieron de nuevo al invernadero. Cada bioanálisis consistió de un biotipo asperjado con ocho dosis y dos testigos sin tratar, para un total de 10 plantas por repetición (Cuadro 2), dispuestas en un diseño experimental de bloques completos al azar con 5 repeticiones. Cada experimento se repitió al menos una vez en el tiempo.

Cuadro 2. Dosis de glifosato para determinar la respuesta en biotipos selectos de *P. paniculatum*.

Tratamiento	Biotipos S		Biotipos R	
	Dosis			
	g e.a.ha ⁻¹	L p.c.ha ⁻¹ *	g e.a.ha ⁻¹	L p.c.ha ⁻¹
Testigos	0	0	0	0
1	5,62	0,016	22,5	0,063
2	11,2	0,031	45	0,125
3	22,5	0,063	90	0,25
4	45	0,125	180	0,5
5	90	0,25	360	1
6	180	0,5	720	2
7	360	1	1.440	4
8	720	2	2.160	6

*p.c.: producto comercial; se utilizó la formulación Roundup (Monsanto) en solución acuosa que contiene 360 g e.a. L⁻¹.

La respuesta de las plantas al glifosato se evaluó mediante la estimación visual del porcentaje de daño foliar a los 21 dda. La escala porcentual de daño varió entre 0, que representa la ausencia de daño (crecimiento y condiciones de la planta idénticas a las del testigo sin tratar) y 100, que corresponde a la muerte de la planta (sin presentar tejido vivo).

Después de la evaluación visual, las plantas se cortaron a 0,5 cm del suelo y se determinó su peso fresco; el peso fresco puede ser más válido que el peso seco porque las plantas que se han necrosado o muerto recientemente, pueden tener el mismo peso seco que las plantas que se notan verdes y saludables (Santelman 1977).

Para cuantificar el efecto del glifosato en cada biotipo se determinó el valor de la DE₅₀, que corresponde a la dosis de herbicida que reduce el crecimiento (peso fresco) de la planta a la mitad del logrado por las plantas testigo. Los valores de DE₅₀ se calcularon basados en la curva de respuesta a dosis crecientes, usando el modelo logístico descrito por Seefeldt et al. (1995). Este modelo usa la siguiente

ecuación para expresar la biomasa (peso fresco) en relación al testigo y la dosis x del herbicida:

$$U_{ij} = C_i + \frac{D - C_i}{1 + \exp[b_i (\log(z_j) - \log(RC_{50}(i)))]}$$

Donde U_{ij} denota la respuesta a la dosis j del herbicida i ; D representa el límite superior del crecimiento de las plantas a la concentración cero (testigo); C_i es el límite inferior a la dosis más alta del herbicida i , y b_i es la pendiente de la curva de respuesta cerca de la $DE_{50}(i)$. Los valores están expresados en gramos de e.a. de glifosato.

El índice de resistencia (IR) se calculó como la razón de los valores de DE_{50} del biotipo R y del biotipo S. Se consideró que el biotipo evaluado era efectivamente resistente cuando su valor de IR fue superior (estadísticamente, con base en su intervalo de confianza) a 2,0 (Heap 2017).

4.3 Determinación de resistencia fuera de sitio activo

4.3.1 Distribución del glifosato radio marcado en la planta

Para evaluar la distribución del glifosato en la planta (absorción, transporte y exudación) se utilizaron los tres biotipos R y los tres S de *P. paniculatum* evaluados en los experimentos de dosis respuesta a glifosato.

Se obtuvieron plantas a partir de semilla, usando el mismo procedimiento antes mencionado, y se mantuvieron en un invernadero del Departamento de Ciencias Ambientales, Suelos y Cultivos de la Universidad de Arkansas en Fayetteville, a una temperatura promedio de $34/24 \pm 3$ °C (diurna/nocturna) y un fotoperiodo de 12 horas. Se utilizaron plantas de las mismas edades que para los experimentos de dosis respuesta: edad I (5 hojas) y edad II (1 a 3 hijos) (Figura 6).

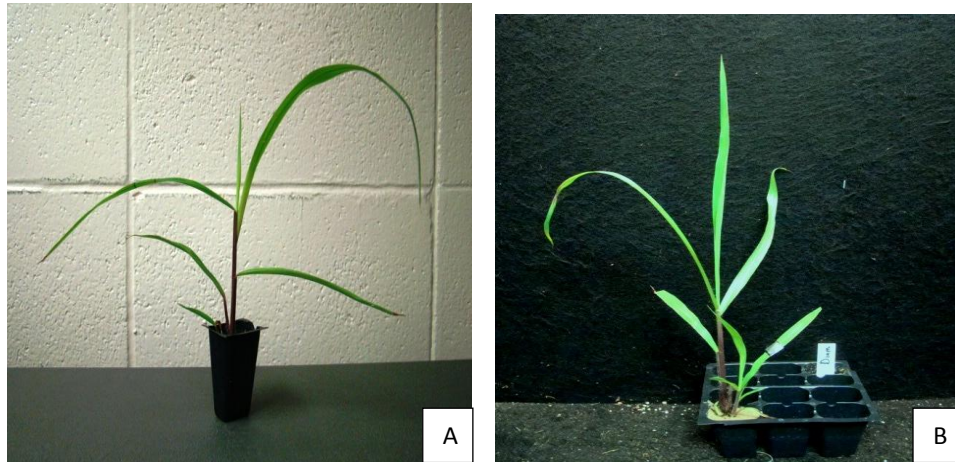


Figura 6. Plantas de *P. paniculatum* de edad I (A) y edad II (B) usadas en las pruebas con glifosato radio marcado (Fotos por F. Ramírez).

De 8 a 10 días antes de la aplicación, las plantas se trasladaron en potes individuales de 2 × 2 × 3 cm que contenían una mezcla de 80% de arena lavada y 20% de suelo cernido con un tamiz número 8 (2,36 mm apertura). Se tomó la parte media (1,5 cm) de la segunda hoja totalmente abierta para la edad I y la misma hoja del hijo principal para la edad II, se marcó con un marcador permanente y se cubrió con papel aluminio. Las plantas se asperjaron con glifosato a razón de 720 g e.a. ha⁻¹ en una cámara de aspersión utilizando un aguilón con dos boquillas de abanico plano 800067, calibradas para descargar 168 L ha⁻¹ a una presión de 2,5 kg por cm cuadrado (36 libras por pulgada cuadrada (psi)). Como fuente de glifosato se usó la formulación comercial Roundup Power Max (Monsanto Co., 660 g de glifosato como sal potásica por litro) diluida en agua deionizada.

Después que la aplicación del herbicida se secura (15 minutos), las plantas se trasladaron al Laboratorio de Carbono 14 (Universidad de Arkansas, Altheimer, Fayetteville), se removió el papel aluminio y se procedió a aplicar en la zona previamente cubierta, cuatro gotas de 1 µL de una solución marcada (Figura 7). La solución se preparó añadiendo glifosato C¹⁴ (ácido fosfometil radio marcado, American Radiolabeled Chemicals, ARC 1313, Inc. 2,0 GBq mmol⁻¹) a un volumen de la dilución asperjada suficiente para obtener una solución con una actividad específica de 0,37 kBq µl⁻¹.



Figura 7. Aplicación de glifosato radio marcado a plantas de *P. paniculatum* (Fotos por F. Ramírez).

La aplicación de la solución marcada se realizó con una micro jeringa de 50 μL (Hamilton Co.), equipada con un dispensador repetitivo. Una vez que las gotas aplicadas sobre las hojas se secaron, las plantas se retornaron al invernadero para hacer las evaluaciones a las 24, 48, 72 y 96 hda para la edad I y a las 24, 48 y 72 hda para la edad II.

Los resultados se analizaron mediante Análisis de Varianza Permutacional (Permanova) (Anderson 2001), seguido de la comparación de medias por medio de t de Student, en los casos en que el análisis principal detectó diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre tratamientos.

Para realizar el Permanova se utilizó el método de permutación de datos crudos sin restricción (*Unrestricted permutation of raw data*), se aplicó la suma de cuadrados parcial (Tipo III), y se utilizó la distancia euclidiana para construir las matrices de datos. A diferencia de los programas estadísticos tradicionales, Permanova calcula los valores de P mediante permutaciones y no mediante tablas. A pesar de que es un método multivariado, puede ser utilizado para análisis univariado y, aplicado a una variable de respuesta y usando la distancia euclidiana, produce la tradicional distribución univariada de Fisher (F de Fisher) (Anderson 2010).

El uso de Permanova resulta conveniente en el análisis univariado ya que proporciona cierta flexibilidad en cuanto a los supuestos que el *set* de datos debe cumplir, por ejemplo no es necesario que los datos se distribuyan normalmente para poder aplicarlo. El programa estadístico PRIMER v6 + PERMANOVA (PRIMER-E Ltd.) fue utilizado para realizar los análisis estadísticos.

4.3.1.1 Absorción

Para la medición de la absorción, se procedió a lavar el área aplicada con glifosato radio marcado usando 2 ml de metanol + 10 ml de líquido centellante. La solución de lavado resultante se recolectó en un vial de centelleo de 20 ml para su posterior lectura de radioactividad en un Espectrómetro de Centelleo Líquido (LSS) (Packard Tri-Carb 2100TR *Liquid Scintillation Spectrometer*, Packard Instrument Co.). El valor de esa medición se considera como la parte del glifosato que no fue absorbida por la planta para ese tiempo de evaluación. Se tuvieron dos testigos por biotipo y por experimento para determinar el valor basal de radioactividad sin aplicación de glifosato radio marcado. Cada experimento contó con 5 repeticiones por biotipo y fue repetido dos veces.

4.3.1.2 Transporte

Los patrones de transporte de glifosato C¹⁴ se determinaron siguiendo el método usado por Riar et al. (2011) y Vila-Aiub et al. (2012).

Luego de hacer el lavado para medir absorción, las plantas se dividieron cortándolas en 5 partes: la parte apical de la hoja tratada, incluyendo la zona tratada (parte 1); la base de la hoja tratada (parte 2); el follaje por encima de la hoja tratada (parte 3); el follaje por debajo de la hoja tratada o culmo (incluyendo los hijos para la edad II) (parte 4); y las raíces (parte 5) (Figura 8).

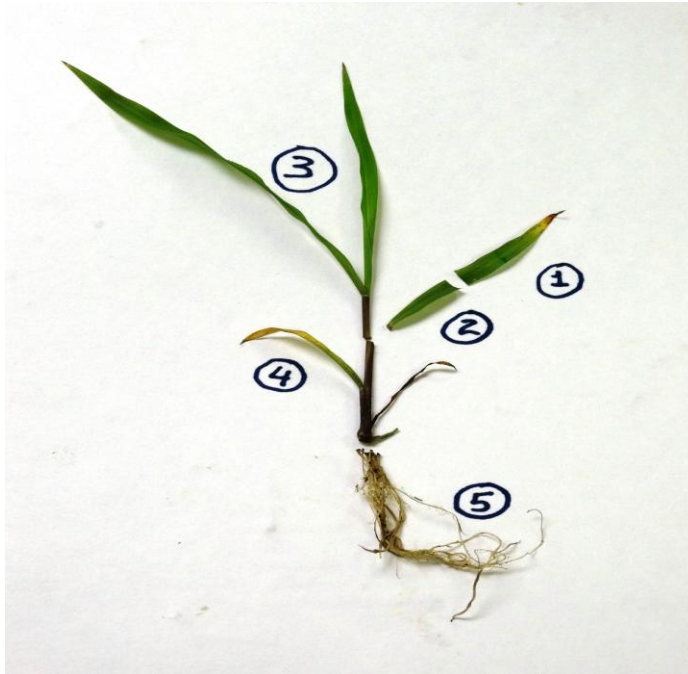


Figura 8. Partes de la planta usadas para determinar el transporte de glifosato. Edad I. 1: ápice de hoja aplicada; 2: base de la hoja aplicada; 3: follaje por encima de la hoja tratada; 4: follaje por debajo de la hoja tratada; 5: raíces.

Cada parte de la planta se cortó y se envolvió individualmente con cinta comercial adhesiva transparente (Scotch Magic tape), se colocó en un sobre identificado y se secó por 72 horas en un horno a 50°C. Posteriormente, los tejidos secos se incineraron en una oxidadora biológica (OX500, R.J. Harvey Instrument Corporation), y el CO₂ producido se atrapó en 15 ml de líquido centellante para luego medir su radioactividad por LSS. Cada tratamiento se repitió 5 veces y el experimento se repitió en el tiempo. La distribución del C¹⁴ en la planta se expresó como el porcentaje de la radioactividad absorbida.

4.3.1.3 Exudación

Para determinar si el glifosato fue exudado por la raíz, después de obtener la solución de lavado del glifosato no absorbido, se extrajo la planta del pote, se lavó la raíz y el medio con 4 mL de metanol, el líquido se decantó y colocó en un vial de

20 mL para centelleo al cual se adicionaron 10 mL de líquido centellante para su posterior lectura de radioactividad por LSS. Se designaron dos testigos (sin glifosato radio marcado) por biotipo y por experimento para determinar el valor basal de radioactividad que presentaba la arena y el sustrato de la raíz. Cada experimento contó con 5 repeticiones por biotipo y fue repetido.

4.3.2 Metabolismo de glifosato

Para determinar si la resistencia era debida a una metabolización del herbicida, no esperada en biotipos S, se tomaron únicamente plantas de los tres biotipos R y de la misma forma que para los experimentos de invernadero, se asperjaron con una solución de glifosato a una dosis de 360 g e.a. ha⁻¹. Después de la aplicación, las plantas se trasladaron al invernadero y 7 dda se cosecharon las hojas más jóvenes de 60 plantas por biotipo, 30 aplicadas y 30 sin aplicar (testigos), las cuales se lavaron con agua potable y luego con agua destilada para eliminar el glifosato superficial que no fue absorbido.

Una vez secas, cada grupo de 30 hojas se dividió en tres submuestras, se introdujeron en bolsas de papel y se congelaron a -18°C. Posteriormente se enviaron al Laboratorio de Análisis de Residuos de Plaguicidas (LARP) del Instituto Universitario de Plaguicidas y Aguas (IUPA) de la Universidad Jaime I (Castellón, España), para el análisis de residuos del herbicida glifosato y de su principal metabolito, AMPA.

Tras su recepción, las muestras foliares se homogenizaron con un triturador tipo molino (Minimoka GR 020) y se conservaron a -18°C hasta su análisis. Tras varias experiencias para ajustar la metodología analítica, sobre la base de trabajos previos sobre glifosato en suelos (Botero et al. 2013), finalmente el procedimiento aplicado fue el que se indica en la figura 9.

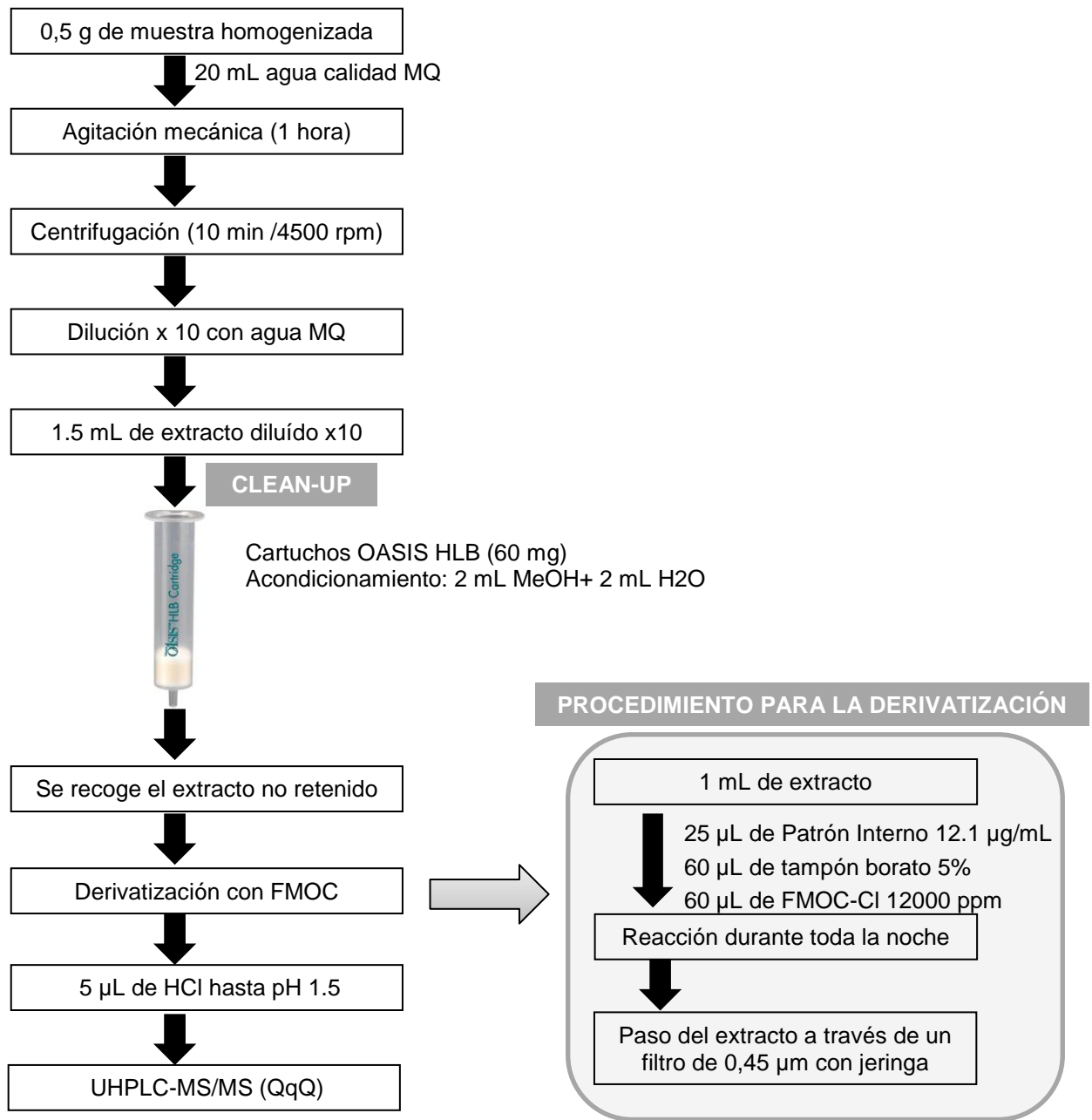


Figura 9. Procedimiento para la extracción de glifosato y AMPA.

Determinación de AMPA mediante LC-MS/MS

El análisis de las muestras se llevó a cabo mediante cromatografía líquida (LC) de fase inversa acoplada a espectrometría de masas en tándem (MS/MS) usando interfase *electrospray* (ESI) (Espectrómetro de masas TQD (cuadrupolo-hexapolo-cuadrupolo) con interfase ortogonal Z-spray-electrospray (Waters, Milford, MA, USA), previa derivación de los compuestos analizados con FMO, utilizando las siguientes condiciones cromatográficas:

- Columna: Discovery C₁₈, 5 µm, 5 × 2,1 mm (Supelco)
- Fase móvil: gradiente acetonitrilo / agua (ambos con una concentración de 0,5 mM de tampón NH₄Ac/HAc) *HAc= Ácido acético, HCH₂COOH
- Volumen de inyección: 20 µL
- Flujo: 300 µL/min
- Tiempo de análisis cromatográfico: 8 minutos

Las características de la gradiente utilizada para la cromatografía de metabolitos se encuentran en Anexo II, cuadro A1.

Condiciones para la determinación de metabolitos por espectrometría de masas

- Interfase electrospray en modo positivo (ES+)
- Voltaje capilar: +3,5 kV (ES+)
- Gas desolvatación: nitrógeno seco, aproximadamente 600 L hora⁻¹ a 350°C
- Gas colisión: argón C-45 a 3,0 × 10⁻³ mbar
- Temperatura de la fuente: 120°C

Las condiciones MS/MS utilizadas para determinar los analitos, se encuentran en Anexo II, cuadro A2.

Análisis de muestras

Después de varias pruebas para ajustar la metodología analítica aplicada, la cuantificación se llevó a cabo mediante calibrado en solvente, entre 25 y 500 ng mL⁻¹, utilizando el ¹³C₂¹⁵N-glifosato a modo de patrón interno, que se encontraba a

una concentración constante de unos 250 ng mL⁻¹. Se hicieron dos repeticiones para cada muestra y cada una de ellas se inyectó por duplicado.

Se realizó un análisis de control de calidad (QC) con muestras blanco fortificadas con glifosato y AMPA a un nivel de 100 mg kg⁻¹ en los tres biotipos no aplicados.

La adquisición de tres transiciones MS/MS, una para cuantificación (392,4>170) y las otras para confirmación, junto con el tiempo de retención, permitieron confirmar la identidad del analito en las muestras positivas o aplicadas (biotipos B, D y L). Como transición de cuantificación, se utilizó la menos interferida por otros componentes de la matriz, en vez de usar el criterio habitual basado en seleccionar la que proporciona una mayor señal.

4.4 Determinación de la posible resistencia en sitio activo

4.4.1 Medición *in vivo* de la acumulación de shikimato

La medición de la acumulación de ácido shikímico en respuesta a la inhibición de la EPSPS causada por el glifosato, es una forma rápida y precisa para cuantificar el daño causado por el herbicida en plantas sensibles (Mueller et al. 2003).

La acumulación de shikimato después de la aplicación de glifosato se midió de dos formas, en plantas de la edad II de todos los biotipos R y S de *P. paniculatum*. En la primera se tomaron discos (tejido) de las láminas de hojas en crecimiento activo de plantas sin tratar, se colocaron en tubos con varias dosis conocidas de glifosato y se midió la concentración de shikimato 24 hda. Para la segunda forma se tomaron discos de hojas en crecimiento activo de plantas que fueron previamente tratadas con glifosato a una dosis de 720 g e.a. ha⁻¹ y se midió concentración de shikimato en varios tiempos (Sección 4.4.1.2). Los resultados de ambos experimentos se analizaron mediante Análisis de Varianza Permutacional (Permanova) (Anderson 2001), seguido de la comparación de medias por medio

de t de Student, en los casos en que el análisis principal detectó diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre tratamientos.

4.4.1.1 Tejido proveniente de plantas sin aplicar

Para la determinación de la concentración de ácido shikímico, se utilizó el método sugerido por Shaner et al. (2005). A partir de plantas de biotipos R y S crecidas en el invernadero, se tomaron, por medio de un sacabocados, discos de 4 mm de diámetro de las hojas más nuevas de la planta, parcialmente extendidas; ya que la mayor concentración de shikimato después de una aplicación de glifosato se produce en las hojas más jóvenes. Experimentos como los conducidos por Cakmak et al. (2009), concluyen que al comparar la concentración de shikimato en plantas tratadas con glifosato y en plantas sin tratar, esta fue dos y 16 veces mayor en hojas viejas y jóvenes, respectivamente.

Cada disco se colocó en un tubo con capacidad para 1 mL. Los tubos del tratamiento testigo (sin glifosato) contenían 100 μ L de fosfato de amonio 10 mM (pH 4,4) más 0,1% (v/v) del surfactante Tween 80. Los tratamientos con glifosato se distribuyeron en tubos que contenían 100 μ L de fosfato de amonio 10 mM (pH 4,4), más 0,1% (v/v) del surfactante Tween 80 más las diferentes concentraciones del herbicida en un rango entre 15,63 y 1 000 μ M de glifosato.

Los tubos tapados se incubaron bajo luz fluorescente ($150 \text{ m}^2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) a 26°C por 18 a 22 horas. Después del periodo de incubación, los tubos se colocaron en un congelador a -20°C hasta que la solución contenida se congelara y luego se descongelaron en un baño maría a 60°C por 30 minutos. Seguidamente se le adicionó a cada uno 25 μ L de HCl 1,25 N, para llegar a una concentración final de 0,25 N de HCl en cada tubo. Luego se procedió a incubarlos de nuevo a 60°C por 15 minutos. Al final de esta incubación, el contenido de los tubos se tornó uniformemente de un color verde grisáceo, indicando una completa penetración del ácido en los tejidos. A partir de esta solución, se tomaron alícuotas de 25 μ L y se transfirieron a tubos nuevos añadiendo 100 μ L de una solución de ácido

peryódico 0,25% (p/v) y m-peryodato 0,25% (p/v) y se incubaron a temperatura ambiente (25°C) durante 90 minutos. Posteriormente se añadieron 100 µL de una solución de hidróxido de sodio 6 N y sulfito de sodio 0,22 M. Dentro de los 30 minutos posteriores, se midió la densidad óptica de la solución resultante de cada tubo en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 380 nm.

El valor basal de shikimato, medido en los tubos con discos sin glifosato, fue restado del obtenido en cada tratamiento en que se usó el herbicida. Previamente se desarrolló una curva estándar, añadiendo cantidades conocidas de shikimato (Ácido Shikímico, Sigma Chemical Co., P.O. Box 14508, St. Louis, MO 63178) a los tubos que contenían discos sin exponerlos al herbicida. Los niveles de shikimato se expresan como miligramos de shikimato por mililitro de la solución de HCl. El experimento completo se repitió tres veces.

4.4.1.2 Tejido proveniente de plantas aplicadas

Se realizó una variante del experimento anterior. Plantas de *P. paniculatum* crecidas en el invernadero en iguales condiciones, se asperjaron con glifosato a razón de 720 g e.a. ha⁻¹ en una cámara de aspersión utilizando un aguilón con dos boquillas de abanico plano 800067, calibradas para descargar 168 L ha⁻¹ a una presión de 2,5 kg cm² ⁻¹. Luego, se retornaron al invernadero y se obtuvieron discos de las hojas más jóvenes en tiempos de 6, 24, 48, 72, 96 y 144 hda. A los discos se les aplicó el mismo procedimiento de extracción y medición de las concentraciones de shikimato que a los obtenidos de plantas sin tratar (punto 4.4.1.1). El experimento completo se repitió tres veces.

4.4.2 Determinación de la concentración y actividad de la EPSPS

La extracción y determinación de la actividad de la EPSPS se llevó a cabo siguiendo los procedimientos dados por Sammons et al. (2014) y Salas et al. (2012). En un mortero se molieron, bajo nitrógeno líquido, 20 g (en cuatro grupos de 5 g cada uno) de tejido foliar joven de plantas de biotipos R (L y D) y S (H y C)

y se colocaron a -80°C por unos minutos (min) hasta que se congelaran. Luego cada grupo de 5 g se transfirió a tubos falcon que contenían 25 ml de buffer de extracción en frío (100 mM MOPS, 5 mM EDTA, 10% glicerol, 50 mM KCl y 0,5 mM benzamidina) más 1% de polivinilpolipirrolidona (PVPP) y 70 μL de β -mercaptoetanol preparado fresco. Las muestras se homogenizaron bajo agitación continua por 5 minutos para evitar espuma y luego se centrifugaron por 40 min a 18 000 gravedades (g) a 4°C . En un *beaker* frío se decantó el sobrenadante y se le añadió lentamente sulfato de amonio en polvo para obtener una concentración de 45% p/v, agitando continuamente por 30 min y luego se centrifugaron a 30 000 g por 30 min a 4°C . Los extractos proteicos se precipitaron de la solución al agregar gradualmente sulfato de amonio 80% p/v con una agitación constante; luego se centrifugaron a 30 000 g por 30 min y a 4°C . Los perdigones obtenidos se disolvieron en menos de 3 mL de buffer de extracción y se sometieron a diálisis durante toda la noche en 2 L de buffer de diálisis (10 mM MOPS, 0,5 mM EDTA, pH 7,0, 10% glicerol, 5 mM β -mercaptoetanol) por medio de un tubo de diálisis 10 000 MWC de 30 mm a 4°C . Las concentraciones proteicas se determinaron usando el kit de análisis Bradford (Bio-Rad protein assay system; Life Science Research, Hercules, CA) y la calidad enzimática se evaluó usando SDS-PAGE.

Los niveles de actividad de los extractos de EPSPS se determinaron usando el ensayo radiométrico basado en HPLC como lo describe Padgett et al. (1987, 1988). Los ensayos se realizaron utilizando 10 μL de extracto incubado a 25°C durante 5 a 15 minutos (50 μL de reacciones incluyeron 50 mM de HEPES, 5 mM de fluoruro de potasio, 1 mM de shikimato-3-fosfato, 0,5 mM de $[1-^{14}\text{C}]$ PEP y $1,073 \text{ GBq mmol}^{-1}$ de sal de ciclohexilamonio (CFQ10004, Amersham Life Science, Inc., Arlington Heights, IL) y 0,1 mM de molibdato de amonio, pH 7,0). Las reacciones se detuvieron luego mediante la adición de 50 μL de una mezcla de etanol:ácido acético 0,1 N, pH 4,5 (9:1, v/v) antes de la carga. Se inyectaron 30 μL de las reacciones apagadas en una columna de intercambio aniónico Synchropak AX100 (No. 942804, PJ Cobert Associates, Inc., St. Louis)

equilibrada con tampón de fosfato de potasio 0,235 M, pH 6,5, y se eluyó isocráticamente con el mismo tampón. Se usó un detector de flujo radiactivo modelo D525 (Packard Instrument Co., Downer Grove, IL) para monitorear la producción de [¹⁴C] EPSP en las reacciones.

Para las determinaciones de IC₅₀ (concentración de glifosato que inhibe un 50% la actividad de la EPSPS), los ensayos se realizaron en presencia de glifosato a concentraciones que oscilaron entre 0,1 y 100 µM, a continuación se generaron valores de curvas de inhibición y valores de IC₅₀ (punto de inflexión) a partir de los datos, mediante análisis de regresión no lineal, utilizando el paquete de software GraFit (Leatherbarrow 1998).

4.4.3 Determinación de mutaciones en la EPSPS

4.4.3.1 Extracción de ARN mensajero y síntesis de ADN complementario

Para la extracción de ARN mensajero (ARNm) y síntesis de ADN complementario (ADNc) se tomaron hojas nuevas de 20 plantas de dos biotipos R (L y D) y dos biotipos S (H y C) de *P. paniculatum* y se almacenaron inmediatamente a -80°C para su posterior análisis. Para la extracción de ARNm se tomó una muestra de este tejido, se maceró en nitrógeno líquido usando un mortero y se aplicó el Mini Kit RAN Pure Link (Ambion) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la síntesis del primer filamento de ADNc se utilizó el Oligo (dT) 20 suministrado en el *kit* de síntesis Improm-II Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI, USA). Las cadenas iniciales de oligos (dT) de ADNc fueron producidas a partir de ARN tratado con 500 ng de DNAsa, utilizando transcriptasa inversa SuperScript III e imprimadores (*primers*) aleatorios (Invitrogen) como es indicado por el fabricante.

Los *primers* para la secuenciación de EPSPS1 fueron desarrollados mediante alineación de las secuencias de codificación para EPSPS1 de *S. halepense*, *Zea*

mays, *Triticum aestivum*, *L. rigidum*, *L. multiflorum* y *A. palmeri*, disponibles en GenBank. Se seleccionaron las regiones altamente conservadas de las diferentes especies y se procesaron mediante la herramienta en línea “Primer 3”, utilizada para el diseño de *primers*. El conjunto de *primers* diseñados fue utilizado para generar fragmentos superpuestos abarcando las regiones central, 5' y 3' del gen EPSPS1. Los siguientes *primers* se utilizaron para amplificar y secuenciar el gen EPSPS1 de genotipos resistentes y susceptibles a glifosato: 1FPp- 5' TGAACAGTGAGGATGTCCACT 3' y 1RPp- 5' CTCATTCTTGGTACTCCATCA 3'; 2FPp- 5' GGAGTACCAAGAATGAGGGA 3' y 2RPp- 5' AGCACCAGCCAAGAAATAGC 3'; 3FPp- 5' TGCCTATGTTGAAGGTGATG 3' y 3RPp- 5' CGCCGTCACGTTTCAGCTTCT 3'; 4FPp- 5' AGTTTGCAGGGTGTGTGA 3' y 4RPp- 5' GAAGTAGTCGGGAAGGTC 3'.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue hecha en una mezcla reactiva de 25 µL que contenía 1 µL de ADNc, 0,4 µM de ambos *primers* (0,2 mM de cada uno de los dos primers directos e inversos), 0,2 mM de cada uno de los siguientes nucleótidos: dATP, dCTP, dGTP, y dTTP; 1,5 mM de MgCl₂, 1,25 U de DNA polimerasa GoTaq con flexi buffer Go Taq 1X (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA) y agua libre de nucleasa, en un volumen final de 50 µL. La amplificación fue desarrollada bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C por 4 minutos, 39 ciclos de 94°C por 30 segundos; calentamiento a 57,5°C por 30 segundos, elongación a 72°C por 90 segundos y una extensión final a 72°C por 10 minutos.

Los fragmentos amplificados fueron secuenciados en gel purificado utilizando *primers* directos e inversos en ambas direcciones. Los restos de los extremos 5' y 3' de la región de codificación EPSPS fueron generados mediante el kit SMARter RACE (Clontech Laboratories, Inc.). Se utilizaron los *primers* específicos de los genes 1RPp y 3FPp para 5'RACE y 3'RACE respectivamente, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los productos RACE resultantes fueron purificados antes de la secuenciación usando el gel Wizard SV y el PCR Clean-Up System

(Promega, Madison, WI, USA). Las secuencias de nucleótidos generados por PCR, 5' y 3'RACE fueron ensambladas en una secuencia continua (1314pb) que contenía un marco de lectura abierta para la proteína EPSPS1, usando el programa informático ClustalX (Larkin et al. 2007). Las secuencias de los genes EPSPS1 de genotipos R fueron alineadas y comparadas con genotipos S para determinar mutaciones subyacentes.

4.4.3.2 Construcción de modelos por homología

Para construir el modelo por homología, se utilizaron las plantillas 3D apropiadas que estaban disponibles. Para esto, se utilizó la secuencia de aminoácidos de la EPSPS de un biotipo S como interrogante y un BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul et al. 1997) para realizar la búsqueda en el Banco de Datos de Proteína (Protein Data Bank; PDB). Con base en los resultados obtenidos del BLAST se seleccionó la EPSPS de *E. coli* (PDB: 1G6S). Los criterios de selección fueron la secuencia de identidad más alta y la máxima longitud de cobertura de secuencia. Como esta estructura se co cristaliza con el sustrato y con el inhibidor de glifosato, se consideró como una opción apta para el proceso de modelado por homología. La plantilla para conseguir la secuencia para estructurar la alineación fue realizada mediante el programa Clustal X (Larkin et al. 2007).

Se encontró que la EPSPS de *P. paniculatum* (ppEPSPS) presenta una identidad de secuencia de 54% con una cobertura de interrogante de 98% para una secuencia de aminoácidos 1G6S. Mediante el programa de modelado por homología MODELLER v. 9.14, se construyeron varios modelos estructurales 3D, tanto para la ppEPSPS de biotipos S como de R. Para los análisis posteriores se seleccionó la estructura con la función de densidad molecular menos probable (mol pdf). La estructura homóloga modelada fue sometida a cuatro pasos de minimización de etapas en la SYBYL-X suite (Tripos International, MO, USA) para generar la energía mínima de conformación. Estos pasos son los siguientes (i) los hidrógenos fueron adicionados y la(s) posición(es) fueron refinadas utilizando un proceso de 1000 pasos, (ii) 1000 pasos para las cadenas de átomos laterales, (iii)

minimización de la proteína total menos átomos de C α , (iv) optimización geométrica de la proteína en su totalidad sin confinamiento de ninguna porción de la molécula.

Validación y refinamiento del modelo

La estructura de la ppEPSPS, modelada por homología y minimizada energéticamente, fue sometida al programa PSVS v 1.5. Este programa analiza la calidad estereoquímica de estructuras 3D utilizando el servidor PROCHECK (Laskowski et al., 1993), el cual se basa en los gráficos estadísticos de Ramachandran (Ramachandran y Sasisekharan 1968) para verificar la distribución de los ángulos phi y psi de los aminoácidos. El programa también verifica parámetros físicos como la longitud y ángulo de los enlaces, la planaridad de los enlaces y la geometría de los átomos de hidrógeno y de los aminoácidos de las cadenas de átomos laterales. Usando el programa de visualización PyMol (Schrödinger 2010), se superpuso la plantilla para construir estructuras 3D y así identificar las diferencias mediante el cálculo de la raíz cuadrada de los valores medios de la desviación (RMSD). En caso de observarse alguna discrepancia, el proceso de minimización de etapas fue repetido con un mayor número de interacciones para corregir los contactos erróneos en la estructura del modelo de homología 3D. Para el análisis de acoplamiento molecular se utilizó el modelo por homología refinado y optimizado de ppEPSPS de biotipos S y R.

Acoplamiento de sustrato e inhibidor

Los ligandos para el acoplamiento fueron preparados utilizando herramientas MGL (Scipps, LaJolla, CA). Para ambos, el receptor (ppEPSPS) y ligandos (Shikimato-3-fosfato, fosfoenolpiruvato y glifosato), se adicionaron hidrógenos polares y se combinaron los hidrógenos no polares. Todos los enlaces en las fracciones del ligando fueron establecidos como rotativos para un acoplamiento de proteína de

ligando flexible y de ligando rígido. Se estableció un tamaño de malla para ppEPSPS de 73,5 Å * 13,7 Å * 15,3 Å en las coordenadas X, Y y Z, respectivamente, para propiciar una rotación libre del ligando y realizar de esta manera un acoplamiento global. Mediante el uso del algoritmo genético Lamarckiano, el programa Autodock Vina buscó la mejor orientación posible del ligando en el sitio activo del receptor. Las 20 conformaciones obtenidas se examinaron con base en la energía de afinidad de enlace. Diversas poses ligando-receptor fueron analizadas utilizando el software PyMol.

5. Resultados y Discusión

5.1 Diagnóstico del uso de glifosato

Se diagnosticó el uso de glifosato en tres cultivos perennes, pejibaye para palmito, cítricos y palma africana, caracterizados por ser explotaciones extensivas de monocultivos y manejados de forma intensiva con el uso de herbicidas como su principal forma de controlar malezas. Se encontró que en general, el glifosato es el herbicida más utilizado en los tres cultivos y su uso depende de su estado fenológico; en plantaciones jóvenes se usa menos que en plantaciones ya establecidas. *P. paniculatum* era conocida solamente en fincas con problemas de resistencia.

5.1.1 Uso de glifosato en el cultivo de pejibaye

En general, se usa una menor variedad de herbicidas para el control de malezas en pejibaye para palmito que en otros cultivos. Se diagnosticaron y visitaron 10 fincas productoras de palmito, abarcando 600 ha que representan cerca de un 10% del área cultivada en el 2012. Para la zona de Cariari y Pococí, se tiene un promedio de uso ponderado de 3,0 kg i.a. ha⁻¹ año⁻¹, siendo para el glifosato 2,7 (93% del total de plaguicidas). Otros herbicidas que se utilizan son paraquat, 2,4-

D, metsulfuron y haloxifop (Cuadro 3). El itinerario común de control de malezas en palmito se basa en la utilización de un herbicida sistémico (glifosato) y de un herbicida que controle hojas anchas (2,4-D o metsulfuron), con aplicaciones regulares que van de 3 a 8 veces por año, tanto en plantaciones jóvenes como adultas, ya que la aplicación se realiza solamente en la entrecalle.

La arquitectura de la planta de palmito no permite el uso intensivo de métodos de control mecánico de malezas, como en el caso de palma y cítricos. El uso exclusivo del control químico, particularmente del glifosato en forma intensiva, poca labranza del suelo, carencia de rotación de cultivos y la ausencia de otros métodos de manejo, ha resultado en problemas para controlar algunas malezas, como es el caso de *P. paniculatum*. Las fincas donde se encontró el problema de resistencia tienen en común un historial de 5 a 8 aplicaciones anuales de glifosato por más de 15 años (Cuadro 6). Desde el año 2011 y 2012, a raíz de los problemas observados, se inició con la aplicación de otros herbicidas (haloxifop y fluazifop) y de otras formas de control de malezas (chapias).

Cuadro 3. Herbicidas usados en el cultivo de pejibaye para palmito. 2011-12

Ingrediente activo	Kg i.a. ha ⁻¹ año ⁻¹			Porcentaje de usuarios
	Promedio	Mínimo	Máximo	
Glifosato	2,74	0,36	3,03	100
2,4-D	0,07	0,201	2,016	70
Metsulfuron	0,026	0,006	0,03	20
Haloxifop	0,1	0,12	0,12	10
Paraquat	0,026	1,1	1,1	10
Total herbicidas	2,96	1,79	6,30	100
TOTAL Plaguicidas	3,01	0,57	3,81	100

5.1.2 Uso de glifosato en el cultivo de cítricos

En el cultivo comercial de cítricos, principalmente naranja para jugo, el control de malezas se realiza básicamente de dos formas: aplicaciones de herbicidas en la zona radical de los árboles (ronda o calle) y de forma mecánica en la entrecalle. Se diagnosticaron 7 801 ha de 4 fincas que representan un 35% del total del área nacional de cítricos. Se visitaron varios lotes en cada finca para comprobar la presencia de *P. paniculatum*, ya que los entrevistados dijeron no conocerla o no saber de la presencia de la maleza en el cultivo; en ninguno de ellos se encontró.

En plantaciones jóvenes (menores de 5 años de sembradas), con árboles de menor porte, se prefiere el control mecánico al uso de herbicidas, por el riesgo de fitotoxicidad asociado con dichos productos químicos. La aplicación de glifosato en plantaciones adultas se realiza, dependiendo de la finca, de 2 a 4 veces por año, a razón de 913 g e.a. ha⁻¹ por aplicación. Otros herbicidas utilizados son paraquat, diuron, oxifluorfen, diquat, 2,4-D y picloram (Cuadro 4).

Cuadro 4. Herbicidas usados en el cultivo de cítricos. 2011-12

Ingrediente activo	Kg i.a. ha ⁻¹ año ⁻¹			Porcentaje de usuarios
	Promedio	Mínimo	Máximo	
Glifosato	2,68	1,31	4,40	100
Diuron	0,34	0,14	2,14	75
Oxifluorfen	0,26	0,10	0,96	75
2,4-D	0,12	0,002	1,20	75
Paraquat	0,055	0,53	0,53	25
Diquat	0,0001	0,01	0,01	50
Picloram	0,000002	0,0006	0,0006	50
Total herbicidas	3,46	2,09	9,24	100
TOTAL Plaguicidas	5,24	4,07	10,91	100

En plantaciones adultas, la aplicación de glifosato se alterna con herbicidas de diferentes modos de acción y con control mecánico de malezas, lo que reduce la presión de selección de resistencia al glifosato.

Como promedio ponderado de uso de glifosato en cítricos, se tiene un valor de 2,68 kg i.a. ha⁻¹ año⁻¹, y el glifosato representa cerca del 78% del uso total de herbicidas, tanto en plantaciones jóvenes, donde su uso es cercano al 72%, como en plantaciones adultas (84%).

Los herbicidas constituyen el 66% del total de plaguicidas usados en cítricos (3,46 kg i.a. ha⁻¹ año⁻¹) y el glifosato representa el 77,5% de los herbicidas usados. Las otras acciones biocidas tienen porcentajes de uso del 26,9% para los fungicidas y 7,2% para los insecticidas. De los plaguicidas usados, los insecticidas están representados por 8 ingredientes activos, los herbicidas por 7 y los fungicidas por 5. En la totalidad de las fincas se utiliza glifosato; otros herbicidas como 2,4-D, oxifluorfen y diuron se usan en el 75%, picloram y diquat en el 50% y paraquat en el 25% de las fincas (Cuadro 4). Hay variedad en el uso de herbicidas (pre emergentes y pos emergentes, de contacto y sistémicos) con diferentes mecanismos de acción.

5.1.3 Uso de glifosato en el cultivo de palma africana

El manejo de malezas en plantaciones de palma africana, se puede dividir en dos fases; plantaciones jóvenes (menores de 5 años) y plantaciones adultas (mayores de 5 años). Se diagnosticó el uso de plaguicidas en 3 500 ha de palma joven y en 29 000 ha de palma adulta, cercano a un 60% del área nacional para el 2011. En ambos casos se utiliza glifosato, pero en plantaciones jóvenes su uso es muy inferior, con 0,58 kg i.a. ha⁻¹ año⁻¹, representando el 19% del total de herbicidas, y en plantaciones adultas su uso es de 4,67 kg i.a. ha⁻¹ año⁻¹, con un 72% del uso total de herbicidas. Otros herbicidas utilizados en palma africana son paraquat

(mayormente en plantaciones jóvenes), haloxifop, diuron, glufosinato de amonio, oxifluorfen, fluazifop, triclopir, metsulfuron metilo y 2,4-D.

El control de malezas se realiza usualmente cada 2 a 3 meses, alternando herbicidas y control mecánico o chapias manuales, lo que aunado al uso de coberturas vivas, disminuye la presión de selección de resistencia de malezas a herbicidas. El uso ponderado total de glifosato en plantaciones de palma africana (jóvenes y adultas) es de 4,24 kg ha⁻¹ año⁻¹, representa el 66% del total de herbicidas y el 64% de los plaguicidas usados. La diversidad en los métodos de manejo de malezas es la causante de que, a pesar del alto uso de glifosato en palma africana, especialmente en plantaciones adultas, no se hayan presentado casos de poblaciones resistentes a este herbicida.

Cuadro 5. Herbicidas usados en el cultivo de palma africana. 2011-12

Ingrediente activo	Kg i.a. ha ⁻¹ año ⁻¹			Porcentaje de usuarios
	Promedio	Mínimo	Máximo	
Glifosato	4,240	0,18	5,65	85
Paraquat	1,040	0,43	5,3	92
2,4-D	0,400	0,01	0,8	50
Triclopir	0,390	0,72	0,72	23
Diuron	0,114	0,22	0,8	44
Haloxifop	0,090	0,08	0,18	54
Fluazifop	0,063	0,13	0,18	22
Oxifluorfen	0,016	0,72	0,72	11
MSMA	0,010	0,0004	0,02	50
Glufosinato de amonio	0,006	0,1	0,1	11
Metsulfuron metilo	0,003	0,01	0,01	25
Total herbicidas	6,41	1,50	7,78	100
TOTAL Plaguicidas	6,67	1,58	7,86	100

Además del diagnóstico de uso de plaguicidas en los tres cultivos anteriores, se diagnosticó en el 2013, el uso de herbicidas en una finca bananera con problemas de control de *E. indica* y *P. paniculatum*. En esta finca, el control de malezas se

realiza de forma muy similar al de fincas de palmito donde se confirmó la resistencia a glifosato. Para controlar malezas se usa únicamente el herbicida glifosato, en dosis comerciales (900 a 1 080 g e.a. ha⁻¹) y con 7 a 8 ciclos de aplicación anual. Este itinerario se repitió en los últimos 12 años antes de detectarse los problemas de control de malezas; además, la finca tiene un historial de uso de glifosato de más de 20 años. De forma similar a las fincas de palmito, se ha implementado el control manual de malezas sobrevivientes, después de las aplicaciones de glifosato.

Como se observa en el cuadro 6, en las fincas donde se corroboró la resistencia de *P. paniculatum*, las aplicaciones de herbicidas y de glifosato fueron más frecuentes (5 a 8) que en fincas sin ese problema (3 a 5). Así mismo, en las primeras, el glifosato representa el 80% de la cantidad de herbicidas usados, mientras que en las fincas problema es del 93%. Además, en las fincas sin problema se utilizan otros métodos de control de malezas (mecánico o físico), y en las fincas con problemas solamente se utiliza el método de control químico.

Cuadro 6. Caracterización del manejo de malezas en fincas con cultivos perennes.

	Cítricos	Palma Africana	Pejibaye para palmito	
			Fincas sin problemas de resistencia	Fincas con <i>P. paniculatum</i> resistente
Ciclos herbicida por año	2 a 4	2 a 4	3 a 5	5 a 8
% uso de glifosato	72 y 84%*	19 y 72%*	80%	93%
Otro tipo de control de malezas	Mecánico	Coberturas	Manual	Ninguno
Otros herbicidas usados para control de poáceas	Paraquat, diuron, oxifluorfen, diquat	Paraquat, glufosinato, oxifluorfen, fluazifop y haloxifop	Paraquat	Ninguno
Presencia de <i>P. paniculatum</i>	No	No	No	Sí

*Valores para plantaciones jóvenes y adultas, respectivamente.

Este tipo de manejo, que aumenta la selección de resistencia, concuerda con lo expuesto por Beckie (2011) y Mortensen et al. (2000), quienes indican que en los sistemas agrícolas donde las malezas han evolucionado resistencia, el común denominador es un uso recurrente del herbicida, con poca o nula diversidad en las prácticas de manejo de malezas. La combinación de un uso intensivo de herbicidas con el mismo modo de acción y un limitado uso de tácticas culturales y ausencia de diversidad en las prácticas de manejo de malezas, resultan en una intensa presión para seleccionar malezas resistentes (Dinelli et al. 2008; Gressel y Segel 1978). No es sorprendente que la mayoría de casos de biotipos de malezas resistentes a glifosato hayan ocurrido en cultivos resistentes a glifosato o en cultivos perennes (Heap 2017).

5.2 Respuesta de *P. paniculatum* al glifosato

La respuesta biológica de biotipos R y S de *P. paniculatum* se expresa mediante los valores de DE_{50} para ambas edades. Para los biotipos R y S la DE_{50} promedio de plantas de hasta 4 hojas sin hijos (edad I) es de 257,59 g e.a. ha^{-1} y 56,15 g e.a. ha^{-1} , respectivamente. Lo anterior significa que es necesario 4,6 veces más herbicida en los biotipos R que en los S para causar una reducción del 50% en el peso fresco. Para plantas de 1 a 3 hijos (edad II), la DE_{50} promedio para biotipos R es 332,66 g e.a. ha^{-1} y 93,01 g e.a. ha^{-1} para los biotipos S.

A continuación se presentan los parámetros de respuesta a dosis crecientes de glifosato de biotipos R y S de *P. paniculatum*, incluyendo los valores de DE_{50} , para la edad I (Cuadro 7) y para la edad II (Cuadro 8).

Cuadro 7. Parámetros que describen la respuesta al glifosato de biotipos R y S de *P. paniculatum*. Edad I. 21 dda.

Biotipo	R o S	Corrida	D	C	b	DE ₅₀ (g e.a. ha ⁻¹)
B	R	1	24,74 ± 1,05	0,70 ± 1,73	1,62 ± 0,46	251,77 ± 40,15
		2	13,81 ± 0,71	1,30 ± 1,02	2,29 ± 0,97	250,67 ± 44,64
		3	15,83 ± 0,70	0,96 ± 1,03	2,13 ± 0,60	235,11 ± 39,77
		1+2+3	18,09 ± 2,06	0,86 ± 3,28	1,90 ± 1,57	251,04 ± 105,30
D	R	1	6,38 ± 1,00	1,00 ± 0,39	3,87 ± 1,66	266,19 ± 40,13
		2	47,58 ± 3,37	2,47 ± 6,18	1,61 ± 0,67	224,49 ± 80,95
		3	10,67 ± 1,08	0,52 ± 1,51	2,50 ± 1,90	298,23 ± 118,36
		1+2+3	33,48 ± 1,71	1,40 ± 2,90	1,60 ± 0,44	210,23 ± 53,55
L	R	1	5,91 ± 0,50	0,78 ± 0,57	4,44 ± 4,69	288,84 ± 65,18
		2	31,44 ± 1,35	0,25 ± 1,67	3,32 ± 1,01	355,76 ± 34,75
		3	51,79 ± 2,38	4,39 ± 4,38	3,55 ± 2,08	342,76 ± 55,60
		4	43,74 ± 2,14	1,59 ± 2,75	5,21 ± 3,50	308,16 ± 40,78
		1+2+3+4	35,35 ± 1,42	1,42 ± 1,98	3,18 ± 1,18	309,91 ± 33,39
H	S	1	37,69 ± 1,60	3,08 ± 1,60	5,66 ± 1,80	31,46 ± 3,76
		2	30,38 ± 1,04	0,01 ± 1,25	5,44 ± 3,66	46,34 ± 2,90
		1+2	34,01 ± 1,92	0,69 ± 2,00	4,65 ± 2,65	38,88 ± 4,90
C	S	1	30,98 ± 0,89	2,01 ± 1,18	4,86 ± 1,21	63,44 ± 5,40
		2	47,66 ± 1,87	1,85 ± 3,39	1,69 ± 0,44	74,72 ± 12,51
		1+2	39,46 ± 1,90	3,08 ± 2,89	2,55 ± 1,15	68,17 ± 10,89
T	S	1	14,52 ± 1,28	0,34 ± 1,69	5,92 ± 1,69	64,18 ± 18,09
		2	18,06 ± 1,01	0,04 ± 1,33	5,92 ± 3,34	58,14 ± 10,50
		1+2	16,05 ± 1,83	0,10 ± 2,43	6,04 ± 6,11	62,03 ± 24,21

Los datos están descritos de acuerdo a la ecuación $y = C + \frac{D-C}{1 + \exp [b(\log x - \log DE_{50})]}$, donde y corresponde a la respuesta en crecimiento a la dosis x de glifosato, C es el límite inferior del peso fresco a la dosis más alta, D es el límite superior del peso fresco a la dosis cero (testigo) y b es la pendiente de la curva cerca del valor de ED_{50} . Cada valor está seguido de su respectivo intervalo de confianza.

Cuadro 8. Parámetros que describen la respuesta al glifosato de biotipos R y S de *P. paniculatum*. Edad II. 21 dda.

Biotipo	R o S	Corrida	D	C	b	DE ₅₀ (g e.a. ha ⁻¹)
B	R	1	23,89 ± 1,02	1,36 ± 1,80	1,53 ± 0,37	219,11 ± 46,45
		2	17,17 ± 0,68	1,64 ± 1,22	2,05 ± 0,54	314,51 ± 56,36
		1+2	20,61 ± 2,40	1,39 ± 3,63	1,66 ± 1,02	258,99 ± 121,95
D	R	1	41,17 ± 1,45	1,65 ± 2,19	3,70 ± 1,46	360,12 ± 33,75
		2	40,77 ± 1,35	1,39 ± 2,01	3,35 ± 1,06	347,26 ± 32,77
		1+2	41,36 ± 1,65	1,46 ± 2,19	3,38 ± 1,19	350,81 ± 35,43
L	R	1	72,70 ± 3,51	11,53 ± 9,26	1,83 ± 0,89	373,04 ± 107,64
		2	75,97 ± 3,44	10,81 ± 8,32	1,89 ± 0,81	394,84 ± 93,40
		3	41,54 ± 2,03	2,38 ± 3,75	2,88 ± 1,42	384,28 ± 64,70
		1+2+3	62,27 ± 1,79	8,96 ± 3,41	2,20 ± 0,54	387,68 ± 46,47
H	S	1	74,79 ± 3,51	-3,76 ± 0,03	0,90 ± 0,23	55,45 ± 18,77
		2	63,14 ± 2,58	4,46 ± 4,72	1,86 ± 0,52	71,38 ± 13,59
		3	35,55 ± 2,41	5,43 ± 4,60	2,96 ± 2,78	92,57 ± 23,72
		4	44,54 ± 1,02	2,31 ± 1,35	4,06 ± 0,73	62,98 ± 4,17
		1+2+3+4	53,11 ± 2,26	5,21 ± 3,76	1,71 ± 0,52	76,46 ± 12,43
C	S	1	52,91 ± 3,59	12,51 ± 9,76	2,24 ± 1,69	109,74 ± 55,11
		2	33,18 ± 1,35	5,57 ± 2,56	3,88 ± 1,58	143,21 ± 21,81
		3	34,02 ± 0,82	2,84 ± 1,49	18,15 ± 19,85	144,30 ± 40,71
		1+2+3	38,99 ± 1,42	7,33 ± 2,41	4,27 ± 1,45	131,71 ± 17,04
T	S	1	51,00 ± 1,95	3,20 ± 2,97	2,89 ± 0,75	73,25 ± 9,91
		2	20,49 ± 1,02	2,61 ± 1,95	1,84 ± 0,56	80,97 ± 21,8
		1+2	51,39 ± 1,65	3,18 ± 2,22	2,86 ± 0,56	72,76 ± 7,38

Los datos están descritos de acuerdo a la ecuación $y = C + D - C / (1 + \exp [b(\log x - \log DE_{50})])$, donde y corresponde a la respuesta en crecimiento a la dosis x de glifosato, C es el límite inferior del peso fresco a la dosis más alta, D es el límite superior del peso fresco a la dosis cero (testigo) y b es la pendiente de la curva cerca del valor de ED_{50} . Cada valor está seguido de su respectivo intervalo de confianza.

En las figuras 10 y 11 se muestran las curvas de respuesta (DE_{50}) a los 21 dda con los valores promedio de peso fresco por biotipo de varios experimentos.

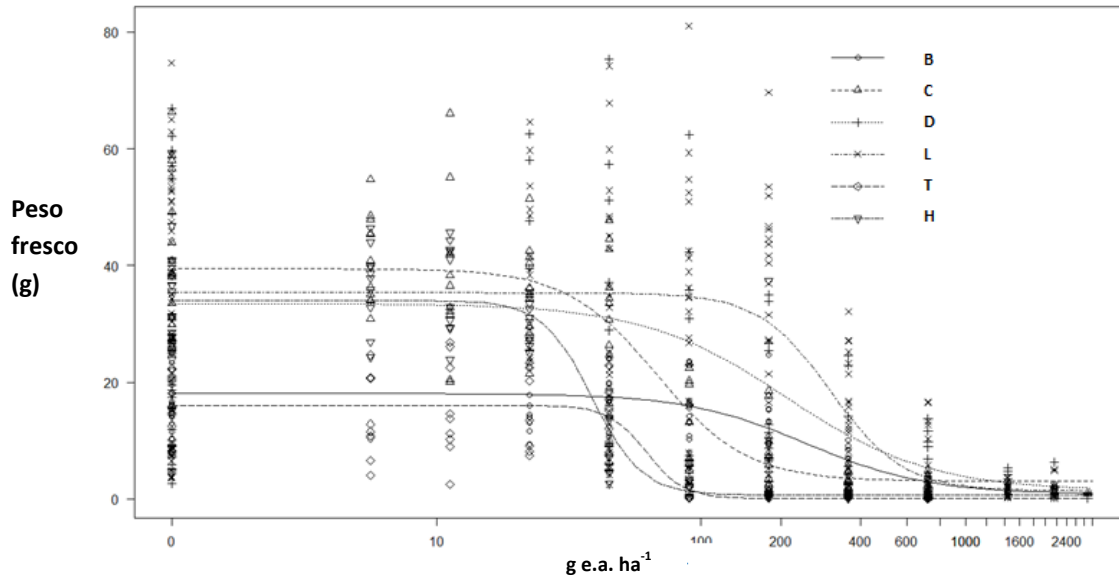


Figura 10. Respuesta a dosis crecientes de glifosato de biotipos R y S para la edad I.

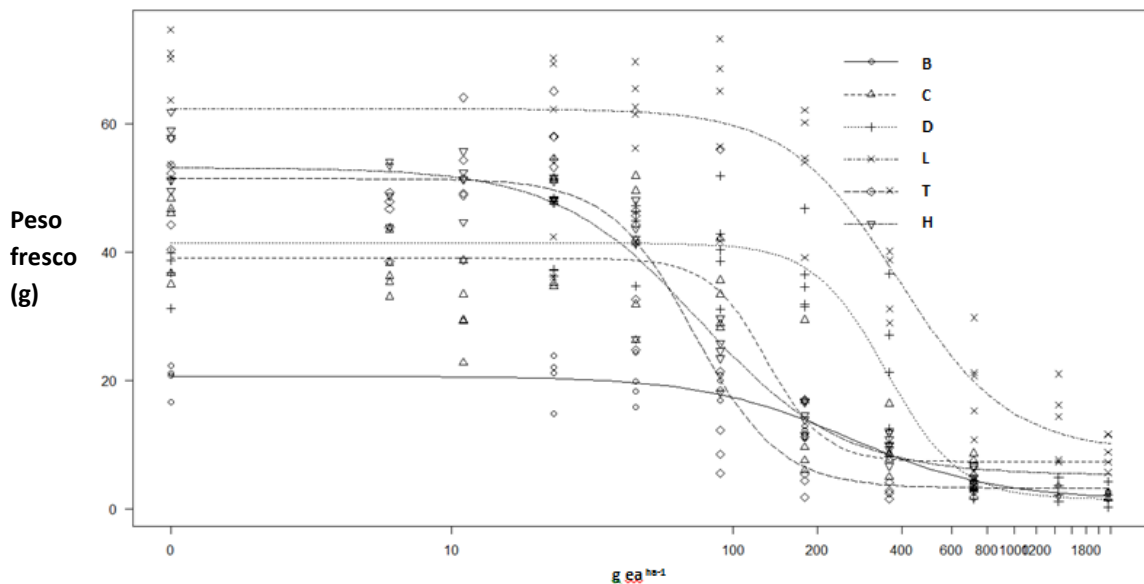


Figura 11. Respuesta a dosis crecientes de glifosato de biotipos R y S para la edad II.

Las plantas del biotipo H, el más susceptible de los evaluados, provienen de una plantación de banano orgánico de más de 12 años de establecida, donde nunca se ha aplicado glifosato; los biotipos C y T, de bordes de caminos donde la presión de selección ha sido muy baja, lo cual se manifiesta en sus menores DE_{50} .

En la figura 12 se nota la respuesta a dosis crecientes de glifosato en plantas de biotipos R (L) y S (H). A los 21 dda, 0,09 kg e.a. ha^{-1} provoca la muerte de plantas del biotipo S, mientras en el biotipo R se requieren 2,19 kg e.a. ha^{-1} para lograr el mismo efecto. La dosis comercial de aplicación de glifosato en las fincas con problemas es cercana a 0,91 kg e.a. ha^{-1} , insuficiente para controlar las plantas R, las cuales mantienen un crecimiento aceptable y la capacidad para desarrollarse y producir semilla viable. La DE_{50} del biotipo R es de 0,31 kg e.a. ha^{-1} , mientras que para el biotipo S de 0,04 kg e.a. ha^{-1} , indicando que en plantas de *P. paniculatum* de 0 a 3 hijos, se requiere cerca de 8 veces más herbicida en el biotipo R que en el S para causar una reducción en el crecimiento del 50%.

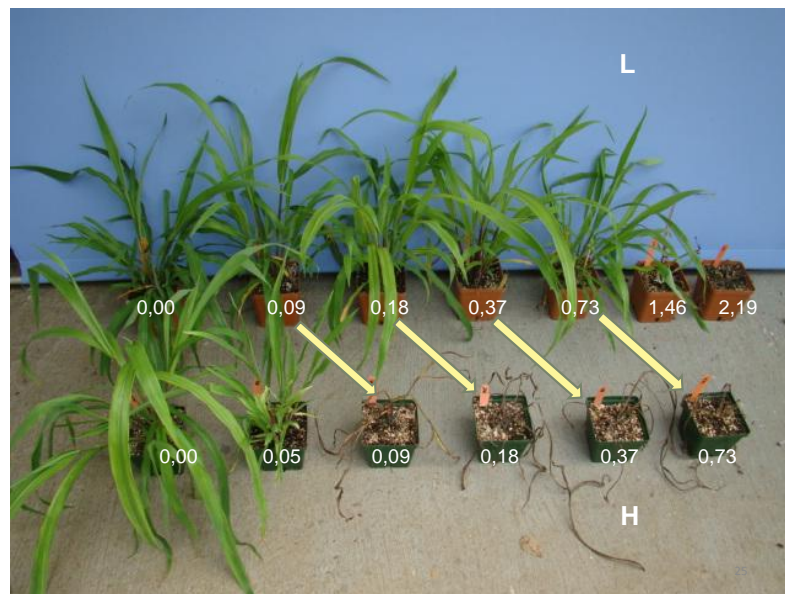


Figura 12: Respuesta de *P. paniculatum* a dosis crecientes de glifosato (kg e.a. ha^{-1}). Biotipo Resistente L (arriba) y biotipo Susceptible H (abajo). 21 dda. Edad I. 2012.

Plantas de los biotipos S de edad I evaluadas 15 dda necesitan cerca de 100 g e.a. ha⁻¹ para alcanzar un 50% de daño visual con respecto al testigo, mientras que plantas del biotipo R, en la misma fecha de evaluación, requieren entre 200 y 600 g e.a. ha⁻¹ para alcanzar el mismo nivel de daño (Figura 13).

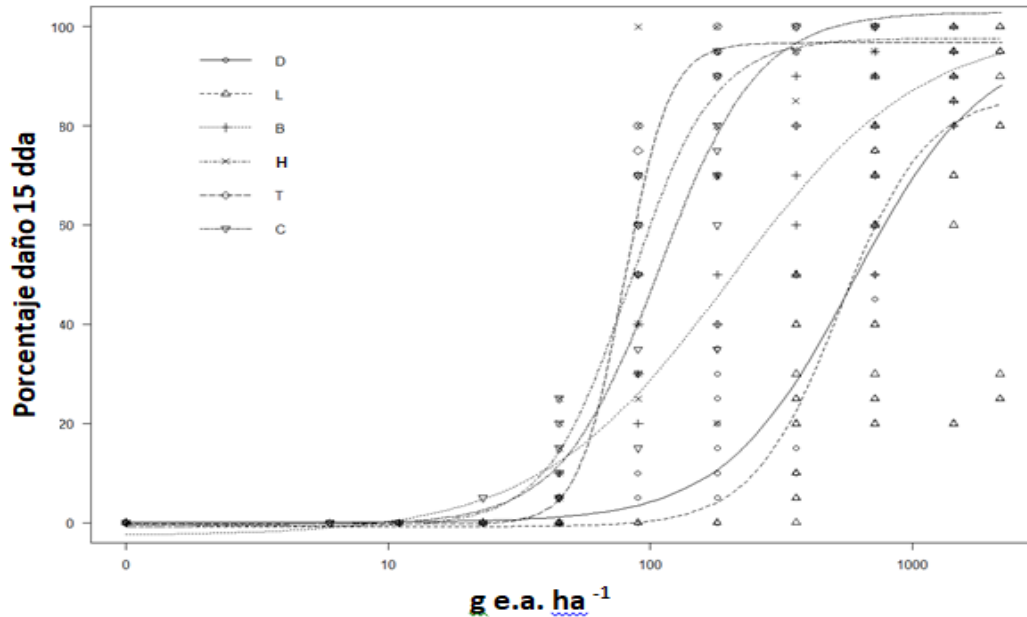


Figura 13. Porcentaje de daño visual de biotipos R (D, L, B) y S (H, T, C) 15 dda con dosis crecientes de glifosato. Edad I.

Los datos, promedio de bioanálisis, están descritos de acuerdo a la ecuación $y = C + \frac{D-C}{1 + \exp[-b(\log x - \log ED_{50})]}$, donde y corresponde al daño visual a la dosis x de glifosato, C es el límite inferior del daño visual a la dosis más alta, D es el límite superior del daño visual a la dosis cero (testigo) y b es la pendiente de la curva cerca del valor de ED_{50} .

Plantas de *P. paniculatum* sobrevivientes a la dosis de 2,19 kg e.a. ha⁻¹, al ser cosechada al ras del suelo 21 dda, presentaron un promedio de 0,46 rebrotes por planta, los cuales emergieron con una coloración albina, pero paulatinamente recuperaron sus capacidades fotosintéticas hasta producir plantas totalmente normales con capacidad de producir semilla viable. Plantas de biotipos S

cosechadas en las mismas condiciones, no fueron capaces de producir rebrotes después de ser tratadas con dosis de 0,36 kg e.a. ha⁻¹ o superiores.

Resultados similares de recuperación de plantas fueron encontrados con biotipos R de *C. canadensis* después de una aplicación de glifosato (3,8 kg e.a. ha⁻¹), letal para plantas S, donde además de la reducción en el crecimiento, se dio un amarillamiento transitorio en los meristemas apicales del tallo (Mueller et al. 2003).

En el cuadro 9 se observan los IR entre biotipos R y S. Para la edad I los IR se mantuvieron entre valores de 3 a 8 y para la edad II entre 2 a 5. Las DE₅₀ son menores en plantas de edad I que en plantas de mayor edad, lo que indica que en estas últimas se necesita mayor cantidad de glifosato para lograr un daño similar que en plantas más jóvenes. De acuerdo con los parámetros planteados por Heap (2016), sobre poblaciones resistentes, los biotipos L, D y B, tanto para la edad I como para la edad II, presentan un IR <10, lo que indica que poseen una resistencia al glifosato de orden moderada, con IRs que van desde 2 a 8.

Cuadro 9. Índice de Resistencia (IR)* al glifosato de biotipos de *P. paniculatum* provenientes de varias localidades de Costa Rica. 2012-2014

		Biotipos Susceptibles			Edad
		H	T	C	
Biotipos Resistentes	L	7,97	5,00	4,55	I
	D	5,41	3,39	3,08	I
	B	6,46	4,05	3,68	I
	L	5,07	5,33	2,94	II
	D	4,59	4,82	2,66	II
	B	3,39	3,56	1,97	II

*IR: (DE₅₀ R/DE₅₀ S)

A pesar de que los niveles de resistencia son moderados, son suficientes para que las plantas sobrevivan a las dosis de aplicación de campo, y por lo tanto, propensos a la presión de selección por el uso repetido de glifosato. Los valores de DE_{50} obtenidos de los bioanálisis entre plantas de edad I y II, sugieren que en *P. paniculatum* el nivel de resistencia podría depender de su estado de crecimiento. A mayor edad de las plantas, se requiere de mayor cantidad de herbicida para controlarlas.

Para otro tipo de malezas se han reportado IR moderados. Plantas de *R. raphanistrum* que sobrevivieron a $1\ 080\ g\ ha^{-1}$ (IR de 2,3 y 3,2) se cruzaron y se obtuvieron individuos con un IR de 3,5 y 4,5 respectivamente (Ashworth et al. 2014), comparable con los niveles reportados para *A. tuberculatus* (Zelaya y Owen 2005); *A. palmeri* (Culpepper et al., 2006); *Ambrosia trifida* (Norsworthy et al. 2010); *C. bonariensis* (Van Gessel 2001); *Parthenium hysterophorus* (Socorro y Fuentes 2005); *L. rigidum* (Powles et al. 1998); *L. multiflorum* (Perez y Kogan 2003); *S. halepense* (Vila-Aiub et al. 2007) y *E. colona* (Gaines et al. 2012).

Los biotipos resistentes a glifosato de *P. paniculatum* identificados en Costa Rica se encontraron en la región del Caribe, donde la época de crecimiento, debido a una menor estacionalidad de las lluvias, se da durante casi todo el año, haciendo necesario el control frecuente de malezas. Esta alta frecuencia de aplicación de un mismo herbicida sobre la población de malezas provocó la selección de individuos de *P. paniculatum* que resisten hasta 8 veces la dosis con la cual se controlan individuos susceptibles de la misma especie, los cuales han ido dominando la flora de malezas en cultivos como pejibaye y banano.

Los bioanálisis de dosis respuesta al herbicida, confirmaron los niveles de resistencia de los tres biotipos analizados y fueron congruentes con la información aportada en las encuestas y en la presencia y sintomatología observada en el campo. De la misma forma, las evaluaciones visuales a los 21 dda, muestran resultados muy parecidos a los valores de ED_{50} , también medidos a los 21 dda; los

biotipos R necesitan entre 4 y 6,5 veces más dosis que los biotipos S para tener el 50% del daño con respecto al testigo.

5.3 Distribución del glifosato radio marcado en *P. paniculatum*

El porcentaje de recuperación del glifosato radio marcado fue del 80,1%, tanto para los biotipos R como los S y para ambas edades. Riar et al. (2011) reportan un porcentaje de recuperación en experimentos similares con *S. halepense* del 90% tanto para biotipos R como S, y Singh et al. (2011) del 94%.

5.3.1 Absorción de glifosato

Tanto los biotipos R como S, independientemente de la edad de la planta evaluada, absorbieron el glifosato de manera similar. Al completarse el periodo de evaluación, las plantas más jóvenes (edad I) de ambos biotipos (R y S) absorbieron en promedio un 85,5% del glifosato aplicado, mientras que las S y R de mayor edad (edad II) absorbieron 86,4% y 83,0% del herbicida aplicado, sin que la diferencia fuera significativa ($p < 0,05$).

Estos valores de absorción son similares a los hallados en otras especies de malezas. Singh et al. (2011) reportan que el porcentaje de absorción del glifosato 72 hda en *I. hederacea* fue 79% del aplicado, en *Desmodium tortuosum* 88%, en *Bidens bipinnata* y en *S. halepense* 83%; valores muy cercanos a los obtenidos para *P. paniculatum* al mismo tiempo de medición: 82 a 92% para la edad I y de 77 a 87% para la edad II (Cuadros 10 y 11). Para la poacea *L. multiflorum*, Salas et al. (2012) y Nandula et al. (2008), reportan porcentajes menores de absorción de glifosato radio marcado a las 48 hda: 43 a 63% y 43 a 56%, respectivamente.

Cuadro 10. Glifosato radio marcado absorbido en diferentes tiempos por biotipos R y S. Edad I.

Biotipo – condición	Tiempo (hda)			
	24	48	72	96
	Glifosato absorbido como porcentaje del aplicado			
B – R	88,02 ±2,78	-	81,91 ±1,39	-
D – R	78,16 ±2,38	91,28 ±1,81	85,74 ±1,91	85,23 ±2,58
L – R	82,81 ±3,52	85,14 ±1,61	86,44 ±3,47	90,88 ±2,10
Promedio R	81,99 ±4,69	88,36 ±1,41	85,23 ±1,66	88,31 ±1,61
C – S	81,45 ±0,99	84,73 ±3,13	81,52 ±2,20	83,59 ±1,54
H – S	85,30 ±1,69	88,61 ±1,66	87,10 ±1,11	88,25 ±1,81
T – S	81,78 ±4,27	86,58 ±1,40	92,03 ±1,49	88,11 ±2,24
Promedio S	82,94 ±0,99	86,71 ±1,24	86,88 ±1,31	86,60 ±1,13

La absorción de glifosato en plantas de edad I aumentó levemente conforme transcurrió el tiempo desde el momento de la aplicación. Brecke y Duke (1980) demostraron que el glifosato ya en 4 horas ha penetrado la cutícula de las plantas, pero es lentamente absorbido por las células del mesófilo.

Cuadro 11. Absorción en diferentes tiempos de glifosato radio marcado* por biotipos R y S. Edad II.

Biotipo – condición	Tiempo (hda)		
	24	48	72
D – R	86,02±7,26	85,21±7,41	82,09±1,51
L – R	84,27±3,04	83,57±2,39	76,80±3,02
Promedio R	85,14±3,72	84,39±3,68	79,45±1,82
C – S	87,18±1,60	83,78±3,73	83,35 ±2,55
H – S	81,42±2,31	90,15±0,79	83,07±2,03
T – S	93,16±0,44	87,87±2,46	87,35±2,57
Promedio S	87,25±1,55	87,27 ±1,57	84,59±1,38

*Porcentaje del glifosato aplicado.

La absorción de glifosato radio marcado en las plantas de mayor edad siempre fue mayor en los biotipos S que en los R, pero la diferencia solo fue significativa ($p < 0,05$) a las 72 hda. Las magnitudes de esta diferencia en absorción (5%), no explican ni contribuyen con el mecanismo de resistencia de *P. paniculatum* al herbicida.

5.3.2 Transporte de glifosato

Si se toma en cuenta la presencia de glifosato radio marcado como un indicador de transporte del herbicida en la planta, se nota que la mayoría del glifosato absorbido se mantiene en la hoja aplicada y se moviliza sobre todo hacia su ápice, tanto en biotipos R como S. De esta forma, la mayoría del glifosato absorbido (56,1% a 61,0%) se mantuvo en la parte apical de la hoja aplicada de manera similar ($p < 0,5$) en todos los biotipos, sin importar su edad al momento de la aplicación (Cuadro 12). La mayor presencia en la parte apical de la hoja aplicada se dio a las 24 hda (71,3% a 75,5% en edad I y 62,9% a 74,9% en edad II, en biotipos R y S, respectivamente) y el porcentaje fue disminuyendo con el tiempo hasta llegar a representar cerca del 50% del glifosato absorbido a las 72 o 96 hda (Cuadros A3 y A8 en anexos).

Cuadro 12. Porcentaje del glifosato radio marcado absorbido presente en partes de plantas de biotipos R y S. *

Partes de la planta	Edad I		Edad II	
	R	S	R	S
1- Ápice hoja aplicada	58,69	58,57	61,04	56,13
2- Base hoja aplicada	6,41	6,45	23,95	29,31
3- Follaje sobre hoja aplicada	2,75	4,05**	2,88	2,94
4- Culmo	20,62	20,25	4,83	4,68
5- Raíces	11,30	10,29	7,19	6,76

*Promedios de las mediciones de 24 a 96 hda (edad I) y de 24 a 72 hda (edad II).

**Diferencias significativas ($p < 0,05$) entre valores de la misma edad.

Biotipos de *C. canadensis* y *C. bonariensis* resistentes a glifosato acumulan el herbicida en la hoja tratada, lo que sugiere que el glifosato es retenido ahí o no se transporta, por lo que no puede alcanzar su sitio de acción (Feng et al. 2004; Koger y Reddy 2005; Dinelli et al. 2008; Ferreira et al. 2008). El mecanismo de resistencia a glifosato en la poacea *C. elata* se asocia con la absorción limitada del herbicida (51% en biotipos R y 74% en S) y su posterior retención diferencial (51% en biotipos R y 40% en S) en la hoja tratada (Brunharo et al. 2016).

Las plantas jóvenes en promedio transportaron menos glifosato hacia la base de la hoja tratada (6,4%, tanto los biotipos S como los R) que las más desarrolladas (23,9% las R y 29,3% las S, $p > 0,05$), lo que se podría explicar por la teoría fuente sumidero. El transporte de glifosato hacia diferentes tejidos, así como los foto asimilados, cambia durante el ciclo de vida de la planta (Monquero et al. 2004).

El total de glifosato que se mantuvo en la hoja aplicada, en todos los biotipos, fue 65% y 85% para la edad I y II, respectivamente. Para ambas edades la presencia del herbicida en el ápice de la hoja tratada fue de 59%, sin existir diferencias entre biotipos R y S. Esto indica que en plantas de *P. paniculatum*, independientemente de la condición de resistencia, hay un gran transporte de glifosato vía corriente de transpiración, pero sin aportar al mecanismo de resistencia a la acción del herbicida.

Los valores anteriores son similares a los encontrados en otras especies cuyo mecanismo de resistencia estuvo relacionado con transporte disfuncional y mayores niveles de EPSPS. En *C. bonariensis* el 63% y 84% del glifosato permaneció en la hoja tratada de los biotipos S y R, respectivamente (Dinelli et al. 2008). En *C. canadensis*, el porcentaje del herbicida encontrado 48 hda en biotipos S y R fue 70% y 80%, respectivamente (Koger y Reddy 2005) y en *L. multiflorum* a las 72 hda, 54% en biotipos S y 72% en biotipos R (Perez-Jones et al. 2007).

Un caso muy similar al encontrado en *P. paniculatum*, lo reportan Han et al. (2015) en *E. colona*; a pesar de que el glifosato absorbido se mantuvo entre 60% a 70% en la hoja aplicada para biotipos R y S, respectivamente, el mecanismo de resistencia en esa especie se debió a una mutación en la EPSPS.

En biotipos R y S de *S. halepense* más del 50% del glifosato radio marcado absorbido se mantuvo en la hoja tratada en todos los tiempos de evaluación (2, 8, 24 y 72 hda); los biotipos R retuvieron 27% y 28% más glifosato a las 24 y 72 hda, respectivamente, que los biotipos S (Riar et al. 2011). Esto hizo pensar inicialmente que el mecanismo de resistencia podría deberse a una acumulación de glifosato en el ápice de las hojas, vía xilema o corriente de transpiración, como lo reportaron varios autores en *Lolium sp* (Lorraine-Colwill et al. 2003; Perez-Jones et al. 2007; Wakelin et al. 2004); pero al conocer que los biotipos R transportaban de forma diferente menos glifosato hacia el culmo y hacia la raíz que los biotipos S, se concluyó que el mecanismo de resistencia se debía a una reducción en el transporte hacia meristemas; situación similar fue observada por Dinelli et al. (2006) en poblaciones resistentes de *Conyza spp*.

La presencia de glifosato en el follaje por encima de la hoja tratada (parte 3) fue similar para ambas edades y se mantuvo entre el 3% y 4% del glifosato absorbido como promedio durante todo el experimento (Cuadro 12). La tendencia fue de aumentar conforme pasaba el tiempo y fue menor a las 24 hda que al último tiempo de medición (Cuadros A7 y A8 en anexos). Para la edad I el transporte de glifosato hacia esta zona fue mayor en biotipos S que en biotipos R, tanto a las 72 hda (5,4% y 2,9% respectivamente) como a las 96 hda (6,2% y 3,9% respectivamente). Para la edad II no se observaron diferencias entre biotipos (Cuadro A10 en anexos).

La cantidad de glifosato transportado hacia el culmo (parte 4) tiende a aumentar con el tiempo. En plántulas jóvenes (edad I) el herbicida encontrado a las 96 hda fue el doble que a las 24 hda. La proporción de glifosato encontrado fue similar (p

< 0,5) entre biotipos R y S, sin importar su edad al momento de la aplicación, sin embargo, la cantidad de glifosato en el culmo fue mayor para la edad I (25% de promedio durante todo el experimento) que para la edad II (5%).

El transporte hacia este segmento es muy importante, ya que es en el culmo donde se encuentra el punto de crecimiento (meristemo) de las poaceas. En *E. colona* este porcentaje fue mucho mayor, estuvo entre 30% y 37% de 24 a 72 hda (Han et al. 2015), lo que indica que mucho más glifosato fue transportado hacia los tejidos meristemáticos.

Los valores encontrados de glifosato radio marcado en raíces de *P. paniculatum*, fueron, para la edad I 11,3% y 10,3% en biotipos S y R respectivamente, y para la edad II 7,2% en biotipos S y 6,7% para biotipos R, sin existir diferencias significativas entre ellos. Valores similares en raíces fueron encontrados en *L. multiflorum* cuyo mecanismo de resistencia a glifosato se debe a un transporte diferencial y a una mutación en la EPSPS: 12% y 9% en biotipos S y R, respectivamente (Perez-Jones et al. 2007). Asimismo, en biotipos R y S de *C. bonariensis* un 17% y 7% respectivamente, se encontró en la raíz (Dinelli et al. 2008); y en *C. canadensis* el glifosato transportado hacia ese órgano fue de 13% en biotipos R y 20% en biotipos S (Koger y Reddy 2005).

El porcentaje de glifosato radio marcado encontrado en las raíces no fue diferente entre biotipos R o S, pero sí entre tiempos después de la aplicación: 6,8% a las 24 hda, 11,35% a las 48 y 96 hda y 14,2% a las 72 hda. Esto indica que en *P. paniculatum*, el glifosato sigue transportándose hacia los tejidos sumideros con el tiempo; a las 72 hda es el doble de la cantidad encontrada a la 24 hda, pero a las 96 hda ya la cantidad empieza a disminuir. Relativamente estos valores de transporte hacia raíces son bajos; por ejemplo, en *E. colona* el porcentaje de glifosato radio marcado encontrado en las raíces oscilaba entre 30 a 40% de 24 a 72 hda, tanto para biotipos R como S (Han et al. 2015), indicando que mucho más glifosato fue transportado hacia los tejidos meristemáticos de las raíces.

Al visualizar fosforimágenes de las plantas utilizadas en los experimentos con glifosato radio marcado, se confirma que el herbicida se transporta de forma similar tanto en biotipos R como S de ambas edades. Se nota que el glifosato radio marcado se transporta de forma similar hacia órganos sumideros como culmo y raíces, y la mayoría permanece en la hoja tratada (Figura 14 y 15), por lo tanto, se concluye que el transporte diferencial no es el mecanismo que confiere resistencia en los biotipos de *P. paniculatum* estudiados.

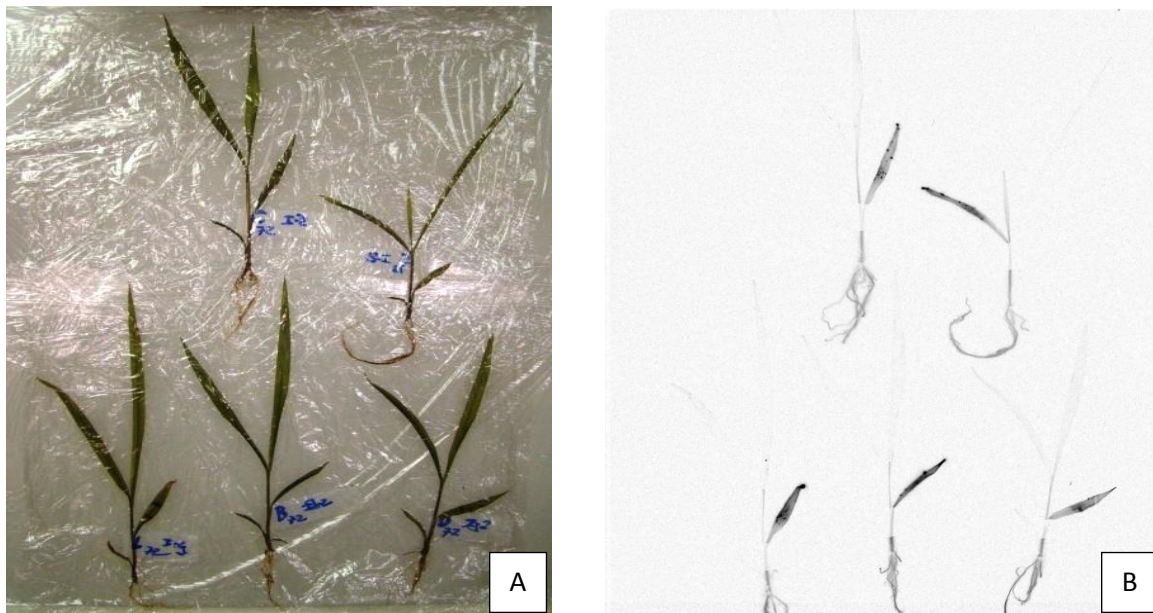


Figura 14: Plantas de *P. paniculatum* aplicadas con glifosato radio marcado antes (A) y después de revelarlas (B) como fosforimágen. Biotipos Susceptibles arriba (C y H), biotipos Resistentes abajo (L, B y D). 72 hda. Edad I (Fotos por F. Ramírez).

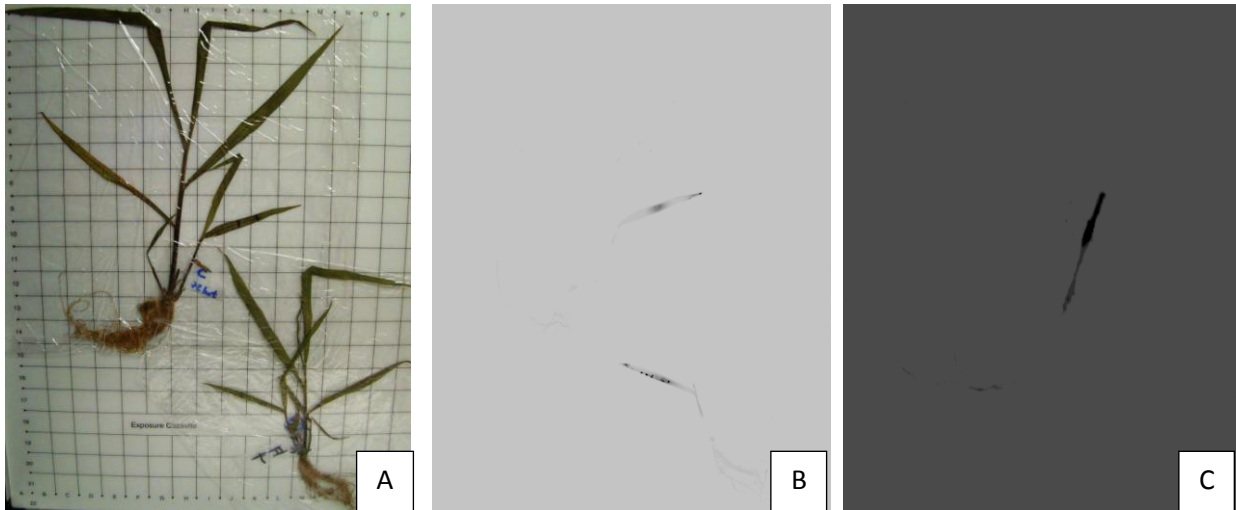


Figura15: Plantas S de *P. paniculatum* S aplicadas con glifosato radio marcado antes (A) y después de revelarlas (B) como fosforimágen. C: Biotipo R (L) 96 hda. Edad II (Fotos por F. Ramírez).

Estos valores de transporte de glifosato hacia tejidos de órganos sumideros como raíz y culmo, parecieran ser relativamente bajos en comparación con lo acumulado en la hoja tratada, pero son suficientes para causar fitotoxicidad en la planta. En una aplicación comercial, la distribución de glifosato es a nivel micro molar, con una fracción absorbida y una pequeña parte de esa cantidad transportada hacia los cloroplastos de los tejidos sumideros (Powles et al. 1998); y aun así, estas concentraciones de glifosato a niveles sub micro molares, son suficientemente efectivas para inhibir las funciones de la EPSPS (Funke et al. 2006; Healy-Fried et al. 2007).

5.3.3 Exudación de glifosato

La cantidad de glifosato radio marcado que fue exudado a través de raíces fue muy baja, menor al 0,3% del total de glifosato absorbido por la planta, independientemente del biotipo tratado, y la misma no se diferencia del valor basal encontrado en el sustrato usado para crecer las plantas. Dinelli et al. (2007)

consideraron como despreciable la exudación de 2% de diclofop-metil y 4% de triasulfuron, ya que no observaron efectos negativos en la planta debido al herbicida reabsorbido.

Durante el desarrollo del experimento (0 a 96 hda) para la edad I, los biotipos R exudaron cantidades significativamente mayores ($p=0,003$) que los biotipos S (0,28 % y 0,20% respectivamente), mientras que para la edad II (0 a 72 hda) las cantidades exudadas por raíces fueron similares, 0,12% en biotipos R y 0,17% en biotipos S (Cuadros 13 y 14).

A pesar de esta diferencia entre biotipos R y S, la baja proporción de glifosato exudado por las raíces sugiere que la exudación no tiene un aporte en el mecanismo de resistencia.

Cuadro 13. Porcentaje* de glifosato radio marcado exudado por las raíces en biotipos R y S en varios tiempos de medición. Edad I.

Biotipo – condición	Tiempo (hda)			
	24	48	72	96
B – R	0,31 ±0,15	-	0,24 ±0,05	-
D – R	0,07 ±0,02	0,29 ±0,05	0,23 ±0,05	0,40 ±0,07
L – R	0,12 ±0,02	0,35 ±0,08	0,40 ±0,07	0,40 ±0,14
Promedio R	0,14 ±0,17	0,32 ±0,04	0,31 ±0,04	0,40 ±0,08
C – S	0,08 ±0,01	0,20 ±0,03	0,13 ±0,02	0,27 ±0,04
H – S	0,09 ±0,02	0,15 ±0,03	0,27 ±0,05	0,20 ±0,03
T – S	0,07 ±0,01	0,13 ±0,03	0,58 ±0,08	0,23 ±0,06
Promedio S	0,08 ±0,02	0,16 ±0,02	0,33 ±0,05	0,23 ±0,02

* relativo al glifosato absorbido.

+/-: error estándar.

Cuadro 14. Porcentaje* de glifosato radio marcado exudado por las raíces en biotipos R y S en varios tiempos de medición. Edad II.

Biotipo – condición	Tiempo (hda)		
	24	48	72
D – R	0,04±0,004	0,12 ±0,03	0,20±0,04
L – R	0,05±0,01	0,12±0,02	0,18 ±0,03
Promedio R	0,04 ±0,005	0,12±0,02	0,19±0,02
C – S	0,07±0,02	0,14±0,02	0,73±0,34
H – S	0,04 ±0,01	0,09±0,01	0,16±0,03
T – S	0,06 ±0,004	0,12±0,03	0,14±0,04
Promedio S	0,06±0,01	0,12 ±0,01	0,34±0,13

* relativo al glifosato absorbido.

+/-: error estándar.

5.4 Metabolización

En ninguna de las muestras de tejido foliar analizadas se detectó el principal metabolito del glifosato, AMPA. Sin embargo, las tres muestras correspondientes a los biotipos aplicados fueron positivas para glifosato, el cual se detectó en concentraciones muy elevadas, entre 25 y 33 ppm (Cuadro 15). En cuanto a las QC analizadas, se puede observar que las recuperaciones fueron satisfactorias, con valores entre 92 y 112% para glifosato, y entre 86 y 125% para AMPA, los cuales resultan aceptables para el análisis de residuos de plaguicidas de acuerdo con la guía SANCO/12571/2013 (EC 2013). En Anexos (Figura A1 y A2), se encuentran los cromatogramas seleccionados de las distintas muestras analizadas.

Cuadro 15. Concentración de glifosato y AMPA en biotipos R aplicados y sin aplicar con glifosato y porcentajes de recuperación de las sustancias analizadas.

	Concentración en muestra (mg kg ⁻¹)						Recuperación QC* (%)		
	Biotipos sin aplicar			Biotipos aplicados			Biotipos sin aplicar		
	B	D	L	B	D	L	B	D	L
Glifosato	n.d.	n.d.	n.d.	25 ± 4	33 ± 4	26 ± 3	104 ± 18	92 ± 10	112 ± 12
AMPA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	107 ± 13	86 ± 10	125 ± 12

*muestras de control de calidad

n.d = no detectado; la incertidumbre se expresa como la desviación estándar.

Estos resultados evidencian que no hubo degradación metabólica del glifosato aplicado y por lo tanto no se produjo el metabolito AMPA.

La ausencia de metabolización del glifosato en los biotipos R de *P. paniculatum* estudiados no es sorprendente puesto que está claramente establecido que el metabolismo del herbicida no contribuye con la resistencia a glifosato en otras poáceas como *L. rigidum* (Lorraine-Colwill et al. 2003), *E. indica* (Tran et al. 1999) y en especies de *Conyza* (Feng et al. 2004; Dinelli et al. 2008). Sin embargo, de Carvalho et al. (2011) y Gonzalez-Torralva et al. (2012a), sugieren que existe metabolismo de glifosato en especies R de *D. insularis* y *C. canadensis*, respectivamente, aunque no queda claro, como lo cita Spencer et al. (2000), si el glifosato fue metabolizado dentro de la planta o por microorganismos de la superficie de la hoja aplicada.

Para el presente estudio, se concluye que la metabolización del glifosato no es el mecanismo de resistencia en *P. paniculatum*; esto es congruente con investigaciones recientes hechas por Sammons y Gaines (2014) quienes expresan que la metabolización no se considera hasta ahora un mecanismo que contribuya a la resistencia a glifosato.

5.5 Concentración de ácido shikímico

Curva de calibración de shikimato:

Se construyó una curva de calibración de concentraciones conocidas de shikimato versus los valores de absorbancia medidos en un espectrómetro. La curva muestra un R^2 alto (95,2 %), lo que indica una relación directamente proporcional entre concentración y absorbancia (Figura 16).

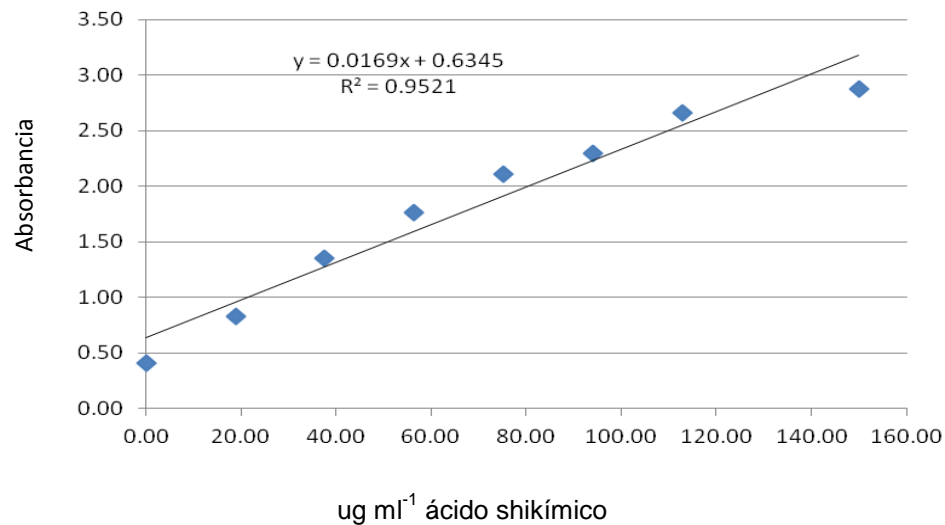


Figura 16. Valores de absorbancia a determinadas concentraciones de shikimato.

5.5.1 Concentración de shikimato en discos provenientes de plantas sin aplicar

En el cuadro 16 se presentan los resultados de la medición de la concentración de shikimato de discos tomados de hojas de plantas sin aplicarse con el herbicida, expuestos posteriormente a diferentes concentraciones de glifosato y medida 24 hda.

Cuadro 16. Valores de shikimato ($\mu\text{g mL}^{-1}$) en tejido foliar de plantas R y S aplicadas con concentraciones crecientes de glifosato.

Biotipo - condición	Concentración de glifosato aplicado (μM)							
	0	15,6	31,3	62,5	125	250	500	1000
B - R	4,68 $\pm 1,55$	13,50 $\pm 4,90$	6,04 $\pm 1,19$	14,34 $\pm 3,71$	24,12 $\pm 3,60$	28,83 $\pm 3,63$	42,99 $\pm 4,51$	41,03 $\pm 3,87$
D - R	2,24 $\pm 1,48$	2,32 $\pm 1,18$	6,33 $\pm 3,41$	7,36 $\pm 2,90$	11,88 $\pm 4,13$	23,53 $\pm 6,17$	31,93 $\pm 5,58$	33,84 $\pm 4,66$
L - R	0,33 $\pm 0,33$	0,45 $\pm 0,45$	2,56 $\pm 1,34$	8,77 $\pm 3,72$	18,40 $\pm 8,33$	20,54 $\pm 6,12$	26,48 $\pm 4,51$	30,42 $\pm 4,49$
Promedio R	2,41 $\pm 0,76$	5,42 $\pm 2,01$	4,97 $\pm 1,28$	10,16 $\pm 2,01$	18,13 $\pm 3,34$	24,30 $\pm 3,10$	33,80 $\pm 2,98$	35,09 $\pm 2,55$
C - S	7,68 $\pm 1,12$	62,00 $\pm 3,50$	69,22 $\pm 4,35$	70,82 $\pm 4,25$	71,59 $\pm 4,74$	72,37 $\pm 5,87$	69,85 $\pm 3,07$	58,00 $\pm 6,52$
H - S	0,04 $\pm 0,04$	22,96 $\pm 4,86$	40,49 $\pm 7,97$	40,13 $\pm 5,35$	44,32 $\pm 5,26$	47,55 $\pm 4,92$	57,21 $\pm 4,49$	33,59 $\pm 6,29$
T - S	0,11 $\pm 0,11$	28,07 $\pm 3,18$	35,40 $\pm 3,90$	42,22 $\pm 5,25$	47,89 $\pm 7,43$	42,17 $\pm 5,09$	41,61 $\pm 5,89$	30,27 $\pm 2,97$
Promedio S	2,61 $\pm 0,71$	37,68 $\pm 3,66$	48,37 $\pm 4,07$	51,06 $\pm 3,66$	54,60 $\pm 3,90$	54,03 $\pm 3,72$	56,22 $\pm 3,25$	40,62 $\pm 4,71$

Los valores de shikimato en plantas sin exposición a glifosato son variables entre los biotipos, van desde $0,04 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $4,68 \mu\text{g mL}^{-1}$, con promedios similares, $2,41 \mu\text{g mL}^{-1}$ en biotipos R y $2,61 \mu\text{g mL}^{-1}$ en biotipos S. Esta disparidad en los valores de shikimato, aún tomando en cuenta múltiples variables en su medición, ha sido reportada por muchos investigadores que lo han medido en varias especies (Henry et al. 2007). Así mismo, el espectrómetro hace una medición relativa entre tejido tratado y no tratado; para medir valores absolutos de shikimato es preferible usar el método de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (Shaner 2010).

Plantas de biotipos S de *P. paniculatum* expuestas a dosis entre 15,6 y 500 μM de glifosato acumularon mayor cantidad de shikimato 24 hda que plantas de biotipos R, sobre todo cuando se expusieron a dosis bajas. Cuando los discos se expusieron a dosis de 15,6 y 31,3 μM de glifosato, plantas de biotipos S

acumularon 7 y 10 veces más shikimato que biotipos R, respectivamente (Cuadro 16); sin embargo, cuando las dosis crecieron, este índice fue disminuyendo hasta casi igualarse a la dosis de 1 000 μM de glifosato. A estas altas dosis las plantas S podrían perder la capacidad funcional, incluida la síntesis de ácido shikímico en etapas previas a la ruta metabólica del shikimato, por lo que la acumulación va en descenso.

Para la dosis de 7,82 μM , evaluada solamente en biotipos S, estos acumularon 24,63 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de shikimato, valor similar al de los biotipos R cuando eran expuestos a 250 μM de glifosato (una dosis 5 veces mayor). Estos resultados indican que la acumulación de shikimato en plantas de *P. paniculatum*, expuestas a dosis bajas de glifosato, solo se da en biotipos S y no en R.

Los resultados anteriores concuerdan con los encontrados por Shaner (2009), en *C. canadensis* y *L. rigidum*; tanto en biotipos R como S de estas especies, expuestos a altas dosis de glifosato, se produjo acumulación de shikimato, pero a bajas dosis la acumulación ocurrió solamente en biotipos S. De la misma forma, Hanson et al. (2009), encontraron en discos de hojas de *C. canadensis*, que los biotipos S acumularon la cantidad máxima de shikimato a concentraciones de 16 μM glifosato, mientras que las plantas R alcanzaron ese nivel con concentraciones de 125 μM de glifosato.

Después de una aplicación de glifosato, tanto biotipos R como S acumulan shikimato, solo que en tiempo y cantidad diferente, dependiendo de la concentración a que estuvieron expuestos y al grado de sensibilidad de la EPSPS. Si hubiera una insensibilidad total de la enzima, no habría acumulación de shikimato en plantas R. Esta acumulación de shikimato claramente indica que el mecanismo de resistencia al glifosato en *P. paniculatum* se debe a una alteración en el sitio activo.

5.5.2 Concentración de shikimato en discos provenientes de plantas aplicadas

Cuando se midió la concentración de shikimato en discos obtenidos de plantas previamente aplicadas con 720 g e.a. ha⁻¹ de glifosato en diferentes tiempos de evaluación, se obtuvieron resultados similares a los del experimento con discos tratados directamente. La acumulación de shikimato se dio en mayor proporción en los biotipos S que en los R desde las 6 hda hasta las 144 hda (Figura 17). Algunas pequeñas variaciones en la concentración de shikimato se pueden presentar dependiendo de factores como luminosidad, la fuente externa de carbono, la edad del tejido muestreado y la especie (Shaner et al. 2005); esto podría explicar lo observado en la figura 17A: después de la aplicación del glifosato, la acumulación de shikimato en plantas de biotipos R se dio principalmente en las primeras 72 hda, sin sobrepasar los 55 µg mL⁻¹, luego tiende a reducirse y mantenerse constante.

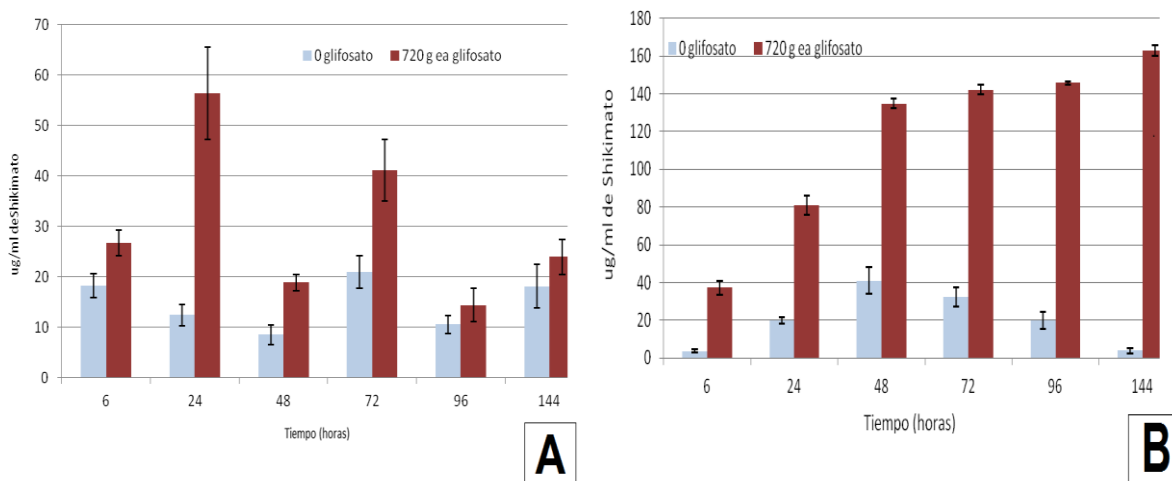


Figura 17. Concentración de shikimato en biotipos R (A) y en biotipos S (B) en varios tiempos de medición.

Contrariamente, en plantas de biotipos S, la acumulación aumenta conforme pasan las horas de evaluación, llegando a ser a las 72 hda de 140 µg mL⁻¹ y más

de $160 \mu\text{g mL}^{-1}$ a las 144 hda (Figura 17B). Resultados similares los encontraron Reinhardt et al. (2016) en biotipos de *C. bonariensis*, que incrementaron los niveles de shikimato 2 a 6 dda en todas las poblaciones, pero a los 8 dda, continuaron aumentando en biotipos S y se redujeron en biotipos R. Esto también concuerda con estudios hechos por Baerson et al. (2002) y Perez-Jones et al. (2007), en plantas cuyo mecanismo de resistencia se debía a una alteración en la EPSPS, que al aplicarlas con glifosato resultaba en un incremento en la concentración de shikimato en biotipos R, pero a niveles mucho menores que los medidos en biotipos S.

La acumulación de shikimato en plantas de maíz y soya tratadas con glifosato llega a su pico usualmente entre 4 a 7 dda y luego declina (Henry et al. 2005). En poblaciones R de *C. canadensis*, la concentración de shikimato se redujo cerca del 40% de 2 a 4 dda, mientras que en biotipos S se incrementó cerca del 35% en el mismo periodo de medición (Mueller et al. 2003). Plantas R de *Ambrosia trifida* con un IR de 5,3, acumularon entre 3,3 a 9,8 veces menos shikimato que las S de 1 a 7 dda (Norsworthy et al. 2010).

El nivel de shikimato endógeno en la mayoría de las plantas es muy bajo, aunque existe variabilidad en las mediciones entre especies (Henry et al. 2007). Yoshida et al. (1975), reportan valores entre 40 a $60 \mu\text{g g}^{-1}$ de peso fresco; Mueller et al. (2008) menores de $100 \mu\text{g g}^{-1}$, con especies (*Urochloa platyphylla*, Poaceae) que incluso alcanzan $600 \mu\text{g g}^{-1}$ en plantas sin tratar.

En especies de *Lolium*, Michitte et al. (2007) y Wakelin y Preston (2006) reportan que de 2 a 4 dda, tanto biotipos S como R, acumulan shikimato en niveles similares, pero luego el incremento continúa solamente en biotipos S. Aún en los casos en que el mecanismo es debido a una alteración de la EPSPS, como en *P. paniculatum*, después de la aplicación de glifosato los niveles de shikimato se incrementan en biotipos R, pero a niveles mucho más bajos que en biotipos S (Baerson et al. 2002b; Perez-Jones et al. 2007).

Plantas R de *C. canadensis*, cuyo mecanismo de resistencia es una mutación en la EPSPS, deben de mantener algunas isoformas susceptibles de la enzima blanco que son responsables por variar los niveles de inhibición del herbicida (Mueller et al. 2003). Lo anterior podría explicar parcialmente que plantas de *P. paniculatum* resistentes a glifosato, aplicadas con dosis altas, sufren síntomas propios del herbicida, pero se recuperan al pasar el tiempo. Aunque también el herbicida podría ser luego trasladado a la vacuola o la planta tener otro tipo de mecanismo de resistencia no dilucidado en esta investigación.

5.6 Número de copias del gen de la EPSPS

Para determinar si la resistencia al glifosato en *P. paniculatum* se debía a una sobreproducción de la EPSPS, se debe hacer una extracción de proteína, polimerizarla para luego hacer las comparaciones respectivas entre biotipos R y S. Siguiendo la metodología, los resultados obtenidos con el procedimiento utilizado no fueron los esperados en cuanto a cantidad de proteína extraída. Por lo tanto, se procedió a variar el método, utilizando tejido fresco, tejido congelado, aumentando la cantidad de tejido inicial, utilizando sustancias que previenen la degradación proteica, entre otras, pero siempre resultó en cantidades muy bajas de proteína extraída.

Así mismo, se modificó el procedimiento utilizando actina como referencia de gen de mantenimiento; también se probó con el gen ALS de *Paspalum* y un gen de sorgo, el cual se suponía presentaba un número bajo de copias, y en todos los casos los *primers* no funcionaron. Se procedió con RT-qPCR utilizando actina como gen de referencia, pero los resultados siempre fueron los mismos, cantidades insuficientes de proteína para continuar con el proceso.

El procedimiento debe ser repetido utilizando un segundo gen de referencia que sea único o que presente un número bajo de copias ya que las cantidades de

proteína extraída de plantas de *P. paniculatum*, tanto de muestras en estado fresco como congeladas, fueron muy bajas en todos los biotipos, tanto R como S (Cuadro 17).

Cuadro 17. Cantidad de proteína extraída de 20 g de tejido de *P. paniculatum* ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de biotipos R y S al glifosato.

Biotipo	Condición	Proteína ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
D	R	713,00
L	R	766,25
H	S	688,52
C	S	504,63

El procedimiento de extracción (Salas et al. 2012), exige que la concentración de proteína debe de medirse en un espectrofotómetro a 360 nm durante 10 minutos, para determinar el cambio en la absorbancia en ese periodo. Por esta razón se midió la concentración de proteína después de la homogenización y de la purificación, resultando en cantidades insuficientes, muy bajas o degradadas, incluso utilizando previamente inhibidores de proteasa y carbón activado para deshacerse de sustancias degradadoras de proteínas.

Después del proceso de diálisis, se cuantificaron las concentraciones de proteína, y se encontraron valores de solamente $\sim 500\text{-}700 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($0,5$ a $0,7 \text{ mg mL}^{-1}$) de proteína cruda (Figura 18). En trabajos similares con *L. perenne*, en este paso se extraían 15 mg mL^{-1} de proteína cruda y el mínimo para poder proseguir con el análisis debe de ser $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ (Salas et al. 2012).

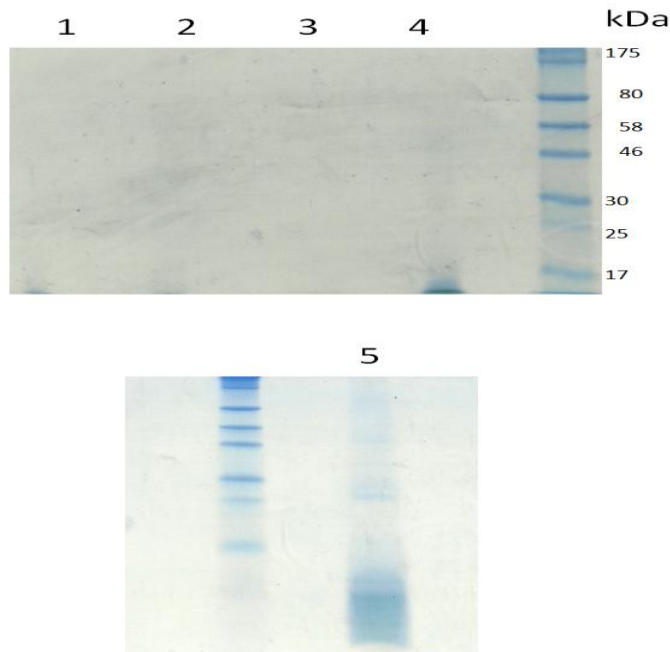


Figura 18. Imágenes de la electroforesis enzimática de la EPSPS de *P. paniculatum* en gel de sulfato poliacrilamida dodecil sodio (SDS-PAGE).

- 1: Pellets después de la homogenización.
- 2: Pellets después 40% fraccionamiento.
- 3: Sobrenadante después del 40% fraccionamiento (2 ml TCA prep.)
- 4: *P. paniculatum* después diálisis (2 ml TCA prep.)
- 5: *P. paniculatum* después de diálisis (6 ml TCA prep.)

El tamaño proteico de la enzima EPSPS es 47,6 kDa. Las 4 muestras aquí ejemplificadas proporcionan un tamaño de banda apenas apreciable, lo que indica que la concentración de la proteína es sumamente baja.

Se podría hipotetizar que *P. paniculatum* contiene una gran cantidad de fenoles o de otras sustancias degradadoras de proteína que hace muy difícil la extracción enzimática, que son necesarios más de 20 gramos de tejido para lograr una buena extracción o que se deben de modificar los procedimientos para la extracción y purificación de la proteína.

Tomando en cuenta el hecho de que se logró extraer una cantidad muy baja y similar de proteína (EPSPS) tanto de plantas R como S de *P. paniculatum* (Cuadro 17), y al ser esta una especie diploide, existen menos posibilidades de que biotipos R presenten copias extras del gen de la EPSPS, por lo tanto la amplificación de genes no se considera que pueda contribuir con el mecanismo de resistencia.

5.7 Actividad de la EPSPS

Las cantidades extraídas de enzima no fueron suficientes para proseguir con el análisis de la actividad de la EPSPS (Cuadro 17).

5.8 Mutaciones

En el presente estudio se identificó, en los individuos de *P. paniculatum* resistentes a glifosato, una doble sustitución de aminoácidos en los sitios Pro₁₀₆Leu y Val₃₃₂Ala de la EPSPS, correspondientes a P₉₉L y V₃₂₅A en *Agrobacterium* sp. CP4. Esta doble sustitución de aminoácidos es el mecanismo molecular que determina la resistencia al glifosato en *P. paniculatum* (Figura 19).

La mutación Pro₁₀₆Leu, la cual está fuera del sitio de unión, alteró la orientación espacial de varios aminoácidos: K₁₇, R₂₂, y K₃₅, lo cual fue revelado por las distancias estimadas desde el sustrato S3P. Por otro lado, la mutación Val₃₃₂Ala, y específicamente el residuo D₃₂₄, no mostró ningún cambio en términos de la distancia de enlace con respecto al sustrato S3P.

Estudios efectuados por Funke et al. (2006), revelaron que en el sitio 106, la simple sustitución de glicina por alanina, hizo que la enzima asumiera una conformación diferente (más condensada), al reducir el espacio entre el oxígeno

fosfonado del glifosato, que fue suficiente para evitar su acople, causando la insensibilidad de la EPSPS.

```

Resistente:
LQPIREISGTVKLPGSKSLSNRILLLLAALSEGTTVDNLLNSEDVHYMLGALKTLGLSVE
Susceptible:
LQPIREISGTVKLPGSKSLSNRILLLLAALSEGTTVDNLLNSEDVHYMLGALKTLGLSVE
*****

Resistente:
ADKAAKRAVVVCGGGKFPEKDDKEEVQLFLGNAGTAMRLLTAAVTAAGGNTTYVLDGVPR
Susceptible:
ADKAAKRAVVVCGGGKFPEKDDKEEVQLFLGNAGTAMRPLTAAVTAAGGNTTYVLDGVPR
*****

Resistente:
MRERPIGDLVVGLKQLGADVDCFLGTDCPPVRVKIGIGLPGGKVKLSGSISSQYLSALLM
Susceptible:
MRERPIGDLVVGLKQLGADVDCFLGTDCPPVRVKIGIGLPGGKVKLSGSISSQYLSALLM
*****

Resistente:
AAPLALGDVEIEIIDKLISIPYVEMTLRLMERFGVKAHSDSWDRFYIKGGQKYKSPQNA
Susceptible:
AAPLALGDVEIEIIDKLISIPYVEMTLRLMERFGVKAHSDSWDRFYIKGGQKYKSPQNA
*****

Resistente:
YVEGDASSASYFLAGAAITGGTVTVEGCGTTSLQGDVKFAEVLEMMGAKVTWTETSVTVT
Susceptible:
YVEGDASSASYFLAGAAITGGTVTVEGCGTTSLQGDVKFAEVLEMMGAKVTWTETSVTVT
*****

Resistente:
GPPREPFGRKHLKAIDVNMNKMPDAAMTLAVVALFADGPTAIRDVASWRVKETERMVAIR
Susceptible:
GPPREPFGRKHLKAIDVNMNKMPDVAMTLAVVALFADGPTAIRDVASWRVKETERMVAIR
*****

Resistente:
TELTKLGASVEEGPDYCIITPPEKLNVT AIDTYDDHRMAMAFSLAACAEVPVTIRDPGCT
Susceptible:
TELTKLGASVEEGPDYCIITPPEKLNVT AIDTYDDHRMAMAFSLAACAEVPVTIRDPGCT
*****

Resistente:  RKTFPDYFDVLSFVKNSTOP
Susceptible: RKTFPDYFDVLSFVKNSTOP
*****

```

Figura 19. Secuencia de los aminoácidos en la 5'EPS 3'PS y alineamiento entre biotipos de *P. paniculatum* Resistentes y Susceptibles al glifosato.

La comparación de las distancias de enlace entre aminoácidos y el inhibidor de glifosato reveló aspectos interesantes. Ninguno de los residuos en la vecindad de Val₃₃₂Ala mostró cambios en términos de formación de enlaces con los átomos de glifosato similar al sustrato S3P. Pero Pro₁₀₆Leu modificó el sitio de unión significativamente, donde la incorporación de un residuo de leucina produjo una distorsión en la orientación de las cadenas laterales de los aminoácidos vecinos R₂₂, R₉₈ y Q₁₇₃, los cuales al ser críticos para enlazar el inhibidor, pudieron haber producido un debilitamiento de la interacción con glifosato.

El otro cambio, una mutación en la posición Val₃₃₂Ala, pareció no producir ningún efecto importante en la unión de EPSPS al sustrato S3P o al glifosato. Sin embargo, la presencia de esta segunda mutación, aparentemente devuelve de forma parcial, al restablecer las distancias normales con el PEP, la conformación del sitio de acople del S3P, que fue afectado por la mutación Pro₁₀₆Leu, ya que al compararlo con la enzima sensible, se nota que algunos desplazamientos espaciales se mantienen (Figura 20). Sin embargo, la mutación V₃₃₂A + P₁₀₆L muestra un desplazamiento espacial diferente en este sitio (Figura 20C y 20D), en relación con la EPSPS no mutante de *E. coli*.

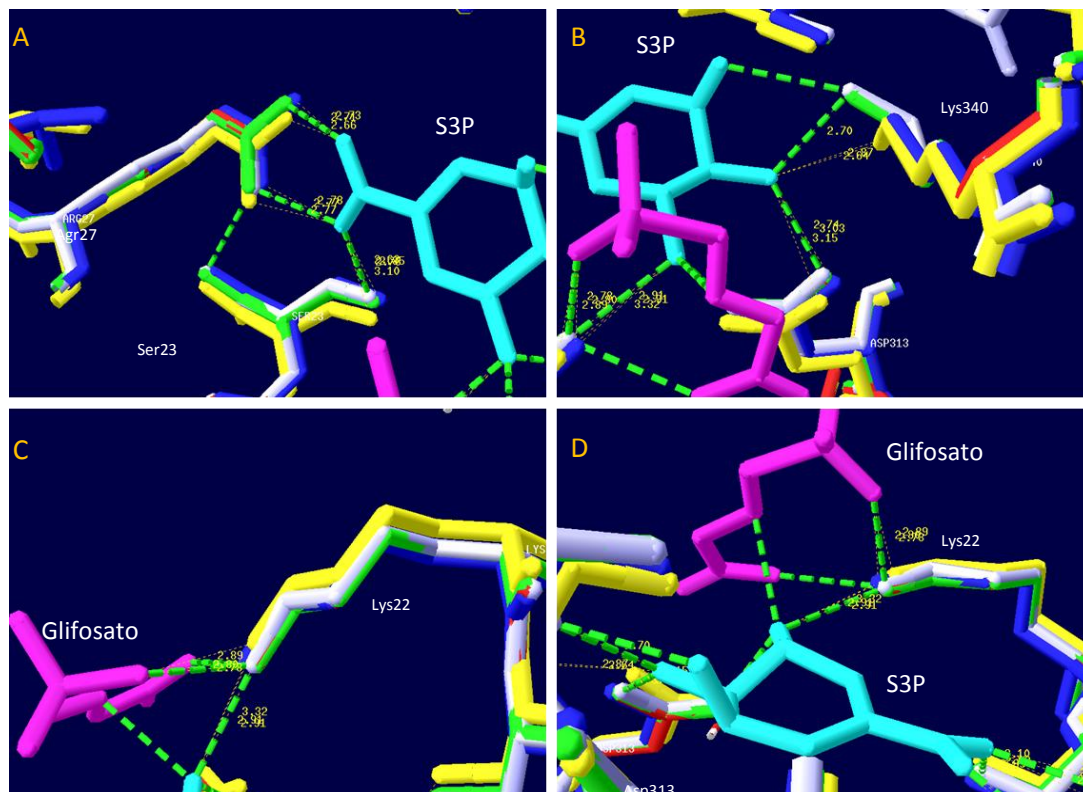


Figura 20. Modelos 3D de aminoácidos que se enlazan directamente con S3P. **A:** Ser₂₃ y Arg₂₇; **B:** Lys₃₄₀ y Asp₃₁₃; **C:** Lys₂₂ y Asp₃₁₃; **D:** Lys₂₂ y Asp₃₁₃. Código de colores: verde: V₃₃₂A; amarillo: P₁₀₆L; azul: V₃₃₂ + P₁₀₆L; rosa: glifosato.

De las dos mutaciones, la Pro₁₀₆Leu parece jugar un papel más importante en comparación con Val₃₃₂Ala. El sitio Pro₁₀₆ no está directamente involucrado en las interacciones moleculares ni con glifosato ni con el sustrato PEP, pero la sustitución de Pro₁₀₆ por otro aminoácido, produce cambios estructurales en el sitio activo y desplaza a otros aminoácidos hacia el inhibidor, reduciendo el espacio disponible (Healy-Fried et al. 2007). Esto concuerda con resultados de investigaciones especializadas en la estructura cristalina EPSPS-S3P-glifosato y en las sustituciones Pro₁₀₆ en la EPSPS, las cuales revelaron que las mutaciones en ese sitio causan un ligero estrechamiento del espacio de acople de glifosato-PEP, que provoca resistencia al glifosato, pero preserva la funcionalidad de la enzima (Healy-Fried et al. 2007).

Así mismo, como lo reporta Padgett et al. (1991), el sitio activo de la EPSPS es altamente conservado; por consiguiente, solo cambios menores en la estructura de la cavidad del sitio de unión glifosato-PEP, como en Pro₁₀₆, podrían producir resistencia a glifosato sin una pérdida significativa de la funcionalidad enzimática (Funke et al. 2009; Powles y Yu 2010).

La resistencia por mutaciones en Pro₁₀₆ se relaciona con el nivel de ploidía o número de copias del gen de la enzima que posee la especie, lo que aumenta tanto el número de unidades enzimáticas mutantes como el de sensibles. Por ejemplo, en la especie diploide *E. indica*, la mutación homocigótica Pro₁₀₆Ser le confiere solamente un moderado nivel de resistencia (2,8 veces), aun así es suficiente para soportar las aplicaciones a dosis comerciales de glifosato (Kaundun et al. 2008); pero en especies poliploides, como la hexaploide *E. colona*, la misma mutación no es suficiente para permitir sobrevivir a las plantas. En el caso de *P. paniculatum*, al ser una especie diploide y presentar doble mutación, el índice de resistencia es consecuente con su número de copias del gen, de bajo a moderado.

Otros casos de dos sustituciones separadas de aminoácidos en la EPSPS, se obtuvieron de forma artificial en el primer maíz transgénico resistente a glifosato (Thr₁₀₂Ile y Pro₁₀₆Ser) (Lebrun et al. 2003) y en *E. coli* y canola transgénica (Gly₉₆Ala y Ala₁₈₃Thr) (Kahrizi et al. 2007), pero la doble mutación encontrada en *P. paniculatum* no ha sido observada en ninguna otra especie.

En *E. indica*, Yu et al. (2015) demostraron que la doble mutación (T₁₀₂I + P₁₀₆S) se presentó de forma natural, y parece ser un evento secuencial donde primeramente se enriqueció la población de plantas con la mutación P₁₀₆S y luego con la mutación T₁₀₂I, seleccionando individuos con una EPSPS doble mutante de alta resistencia al glifosato; individuos con solo la mutación P₁₀₆S tenían un IR mayor a 32 (comparado con los susceptibles), mientras que individuos con la doble mutación poseían un IR mayor a 180. Para estos autores, el alto índice de

resistencia que aporta la evolución secuencial de la doble mutación, es un importante mecanismo por el cual las plantas se adaptan a una intensa selección del herbicida y es un ejemplo tangible de la evolución en acción.

Un caso similar al de *P. paniculatum* fue reportado por Alarcón-Reverte et al. (2013) en la poacea *E. colona*, la cual poseía un IR de 4 a 9; los individuos S acumularon más shikimato que los R; no habían diferencias de absorción o transporte entre biotipos S y R, sin embargo, plantas R poseían una mutación en el sitio Pro₁₀₆ y además poseían una actividad enzimática mayor.

6. Conclusiones

La aplicación de glifosato en altas frecuencias y dosis, su uso repetido como único método de control de malezas por varios ciclos de producción, la ausencia de rotación de cultivos, los sistemas de mínima o cero labranza, contribuyen a explicar el aumento en la presión de selección para que plantas de *P. paniculatum* evolucionaran resistencia al herbicida. En muchos sistemas agrícolas, especialmente en cultivos perennes, la evolución de casos de resistencia a glifosato es una indicación de un exceso de dependencia de este herbicida para el manejo de malezas.

Debido a que la absorción, transporte y exudación de glifosato entre biotipos R y S no fue diferente, se considera que ninguna de las características relacionadas con el movimiento del herbicida dentro de la planta contribuyen al mecanismo de resistencia al glifosato en las poblaciones evaluadas de *P. paniculatum*, aunque este sea un mecanismo común de resistencia en otras especies de malezas.

Así mismo, como sucede en muchos otros tipos de malezas y cultivos, los biotipos de *P. paniculatum* estudiados hasta el momento, tanto R como S, son incapaces de metabolizar el glifosato; por consiguiente se descarta que este proceso sea parte del mecanismo de resistencia al herbicida.

El hecho de que haya un aumento en la acumulación de shikimato solamente en biotipos S de *P. paniculatum* y no en los biotipos R, sugiere que el mecanismo de resistencia al glifosato en esta maleza, es propio del sitio activo y se debe a una alteración de la funcionalidad o cantidad de la enzima EPSPS.

La caracterización molecular de la ppEPSPS demostró que hay diferencias en la composición de aminoácidos entre las enzimas de biotipos S y R, más precisamente una doble mutación, que resulta en una baja afinidad de la EPSPS de biotipos R con el glifosato, pero que mantienen la funcionalidad de la enzima.

La doble mutación encontrada en el gen de ppEPSPS, a pesar de no situarse en el espacio de unión del glifosato o del S3P, provoca que se dé una conformación espacial proteica diferente, al reducir el espacio en el punto de acople del herbicida, evitando que el glifosato pueda unirse a la enzima, pero permitiendo cierto ligamiento del PEP, con lo cual la planta puede continuar con su proceso de síntesis a través de la ruta del shikimato y continuar con su desarrollo.

El glifosato alcanza el sitio activo en cantidades suficientes para causar daño, pero la mutación limita el impacto del herbicida. Este parece ser el mecanismo por el cual esta maleza soporta las aplicaciones de glifosato en dosis comerciales.

Tomando en cuenta que los biotipos R estudiados de *P. paniculatum* presentaron la misma mutación, y que es una especie mayoritariamente autopolinizable, se podría concluir que pertenecen a una misma población inicial, y que se han ido desplazando en territorio a través de la diseminación de sus semillas por diversos medios, incluido la actividad agrícola, de transporte y clima.

Para malezas que evolucionaron resistencia al glifosato en Costa Rica, este es el primer caso documentado de la determinación de su mecanismo de resistencia.

7. Recomendaciones

Tanto los resultados de la presente investigación como los citados en la literatura reciente, indican que los sistemas de producción agrícola donde malezas han evolucionado resistencia, se caracterizan por aplicar prácticas de control muy poco diversas. Para prevenir o retrasar esta evolución, que se manifiesta en pobres controles, es necesario que los entes involucrados en la actividad agrícola (agricultores, cámaras de productores, industria agroquímica, sector académico y gubernamental, entre otros) promuevan la aplicación de prácticas y estrategias diversas, técnica y económicamente sustentables, basadas en la integración de múltiples mejoras en el manejo de malezas y del cultivo en general.

Algunas de estas prácticas y estrategias que busquen aumentar la diversidad en el manejo y control de malezas y disminuir la presión de selección son: utilizar prácticas preventivas y culturales de manejo de malezas; alternar métodos físicos, mecánicos y biológicos de control de malezas con el control químico con herbicidas; utilizar rotaciones y mezclas de herbicidas de diferentes familias químicas o con diferentes mecanismos de acción.

Una tarea a corto plazo, debe ser el registro y disseminación de información sobre eventos de fallos en el control de malezas, que se pueda cotejar con registros de uso de herbicidas, de prácticas agrícolas y de manejo de cultivos en general. En muchos casos, los productores confunden los casos de resistencia con tolerancia, con una mala aplicación o mala calidad del herbicida, y las casas comerciales son muy cautas en aceptar que existe resistencia de malezas a sus propios herbicidas. Se debe de crear una red para disseminar información sobre sospechas de resistencia, especialmente en cultivos de alto uso de herbicidas, y para el caso de glifosato, en cultivos perennes.

Se debe de incluir en futuras investigaciones de resistencia con esta maleza, estudios sobre el costo de adaptación que genera las mutaciones encontradas en *P. paniculatum* y que le confieren niveles moderados de resistencia. Es necesario

estudiar la adaptabilidad fenotípica de esta maleza cuando crece en competencia directa con cultivos, con otras malezas o con coberturas nativas, para tomar en cuenta en programas de manejo con coberturas vivas o con diferentes densidades del cultivo u otras situaciones que le generen competencia.

Dentro de las prácticas para reducir la presión de selección se encuentra la rotación de herbicidas con diferentes mecanismos de acción. Para el caso de *P. paniculatum*, no se conoce si existe resistencia múltiple en los biotipos que evolucionaron resistencia a glifosato, y a pesar de que Ramírez y Valverde (2017), sostienen que este fenómeno no se presenta con los graminicidas fluazifop-p butilo y haloxifop metilo en esta misma especie, se hace necesario conocer la respuesta de esta maleza a otros herbicidas utilizados o a utilizar en su control, en los cultivos donde aparecieron los casos de resistencia.

Ya que la diseminación de individuos de *P. paniculatum* resistentes se podría dar por dispersión de semillas a través de transporte de materiales como suelo, almácigos y sustratos de lugares con presencia maleza R hacia otras zonas, se deben de tomar medidas más estrictas para evitar una dispersión mayor.

Debido a las dificultades en los procedimientos de extracción y purificación de proteína en *P. paniculatum*, los cuales fueron efectivos en otras especies de malezas, especialmente por la posible presencia de sustancias degradadoras de proteínas, en próximas investigaciones sobre concentración y actividad enzimática en esta especie, es necesario modificar el método de extracción para obtener cantidades adecuadas de proteína para continuar con los análisis.

En futuras investigaciones moleculares con *P. paniculatum*, se podría determinar si debido a una extrema presión de selección, la mutación V₃₃₂A se presentó de forma posterior en individuos que ya se habían seleccionado al poseer la mutación P₁₀₆L. Es probable que a nivel de campo, los productores hayan percibido el problema de resistencia únicamente hasta que se presentaran plantas con la doble mutación.

8. Literatura citada

- Alarcón-Reverte, R., García, A., Urzúa, J. & Fischer, A. J. (2013). Resistance to glyphosate in jungle rice (*Echinochloa colona*) from California. *Weed Science*, 61(1), 48-54.
- Alibhai, M. F., CaJacob, C., Feng, P. C. C., Heck, G. R., Qi, Y., Flasiniski, S. & Stalling, W. C. (12 de enero de 2016). Glyphosate resistant Class I 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS). *Monsanto Technology LLC: US Patent 7,723,575 B2. 1-49*. Recuperado de <https://www.google.si/patents/US7723575?hl=sl>
- Alibhai, M. F. & Stalling, W. C. (2001). Closing down on glyphosate inhibition-with a new structure of a drug discovery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(6), 2944-2946. doi:10.1073/pnas.061025898
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25(17), 3389–3402.
- Amrhein, N., Deus, B., Gerhke, P. & Steinrucken, H. C. (1980). The site of the inhibition of the shikimate pathway by glyphosate. II. Interference of glyphosate with chorismate formation in vivo and in vitro. *Plant Physiology*, 66(5), 830-834.
- Anderson, M. J. (2010). *Detecting multivariate changes in biological assemblages: experimental design and data analysis*. Multivariate analysis of complex experimental designs using PERMANOVA+ for PRIMER. Institute of Information and Mathematical Sciences (IIMS) Massey University, Auckland, Australia.
- Anderson, M. J. (2001). A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology*, 26, 32–46. doi: 10.1111/j.1442-9993.2001.01070.pp.x
- Anderson, K. A., Cobb, W. T. & Loper, B. R. (2001). Analytical method for determination of shikimic acid: shikimic acid proportional o glyphosate application rates. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 32(17-18), 2831-2840.
- Antonovics, J. & Thrall, P. H. (1994). The cost of resistance and the maintenance of genetic polymorphism in host-pathogen systems. *Proceedings: Biological Sciences*, 257(1349), 105-110.
- Araujo, A., Monteiro, R. & Abarkeli, R. (2003). Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. *Chemosphere*, 52(5), 799-804. Recuperado de [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00266-2](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00266-2)

- Arnaud, L., Sailland, A., Lebrun, M., Pallett, K., Ravanel, P., Nurit, F. & Tissut, M. (1998). Physiological behavior of two tobacco lines expressing EPSP synthase resistant to glyphosate. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 62(1), 27–39. Recuperado de <https://doi.org/10.1006/pest.1998.2363>
- Ashworth, M. B., Walsh, M. J., Flower, K. C., & Powles, S. B. (2016). Recurrent selection with reduced 2,4-D amine doses results in the rapid evolution of 2,4-D herbicide resistance in wild radish (*Raphanus raphanistrum* L.). *Pest Manag Sci*, 72(11), 2091-2098. doi: 10.1002/ps.4364
- Ashworth, M. B., Walsh, M. J., Flower, K. C., & Powles, S. B. (2014). Identification of the first glyphosate-resistant wild radish (*Raphanus raphanistrum* L.) populations. *Pest Manag Sci*, 70(11), 1432–1436. doi: 10.1002/ps.3815
- Baerson, S. R., Rodríguez, D. J., Tran, M., Feng, Y. M., Biest, N. A., & Dill, G. M. (2002a). Glyphosate-Resistant Goosegrass. Identification of a mutation in the target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *Plant Physiology*, 129(3), 1265–1275. doi: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.001560>
- Baerson, S. R., Rodríguez, D. J., Biest, N. A., Tran, M., You, J., Kreuger, R. W.,...Gruys, K. J. (2002b). Investigating the mechanism of glyphosate resistance in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*). *Weed Sci*, 50(6), 721–730. doi: [http://dx.doi.org/10.1614/0043-1745\(2002\)050\[0721:ITMOGR\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1614/0043-1745(2002)050[0721:ITMOGR]2.0.CO;2)
- Baird, D. D., Upchurch, R. P., Homesley, W. B. & Franz, J. E. (1971). Introduction of a new broad spectrum post emergence herbicide class with utility for herbaceous perennial weed control. *Proceedings of the North Central Weed Science Society*, 26, 64-68.
- Balthazor, T. M. & Hallas, L. E. (1986). Glyphosate-degrading microorganisms from industrial activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol*, 51(2), 432-434.
- Bandeen, J. D., Stephenson, G. R. & Cowett, E. R. (1982). Discovery and distribution of herbicide resistant weeds in North America. In Lebaron HM y Gressel J (Eds.). *Herbicide Resistance in Plants*. (pp. 9-30). John Wiley and Sons, Inc. New York
- Barea, K., Scheffer-Basso, A. M., & Favero, D. (2006). Desenvolvimento morfológico de *Paspalum paniculatum* L. (Poaceae). *Biotemas*, 19(4), 33-39.
- Barreto, I. (1974). *O genero Paspalum (Gramineae) no Rio Grande do Sul*. (Tese de Livre Docencia) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil (pp. 258).

- Baucom, R. S. & Mauricio, R. (2004). Fitness costs and benefits of novel herbicide tolerance in a noxious weed. *PNAS*, 101(36), 13386–13390. doi: 10.1073/pnas.0404306101
- Beckie, H. J. & Tardif, F. J. (2012). Herbicide cross resistance in weeds. *Crop Protection*, 35, 15-28. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.12.018>
- Beckie, H. J. (2011). Herbicide-resistant weed management: focus on glyphosate. *Pest Management Science*, 67(9), 1037-1048. doi: 10.1002/ps.2195
- Beckie, H. J. (2006). Herbicide-resistant weeds: management tactics and practices. *Weed Technology*, 20, 793–814.
- Bell, M. S., Hager, A. G. & Tranel, P. J. (2013). Multiple resistance to herbicides from four site-of-action groups in waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*). *Weed Science*, 61(3), 460-468. doi: <http://dx.doi.org/10.1614/WS-D-12-00166.1>
- Bostamam, Y., Malone, J. M., Dolman, F. C., Boutsalis, P. & Preston, C. (2012). Rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) populations containing a target site mutation in EPSPS and reduced glyphosate translocation are more resistant to glyphosate. *Weed Science*, 60(3), 474-479.
- Botero-Coy, A. M., Ibáñez, M., Sancho, J. V. & Hernández, F. (2013). Improvements in the analytical methodology for the residue determination of the herbicide glyphosate in soils by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1292, 132-141. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.12.007>
- Bozzo de Brum, M. A. (2010). *Persistencia del glifosato y efecto de sucesivas aplicaciones en el cultivo de soja en agricultura continua en siembra directa sobre parámetros biológicos del suelo* (tesis de magister). Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. Recuperado de http://ambiente.fcien.edu.uy/tesis/Tesis_Alexandra_Bozzo.pdf
- Bradshaw, L. D., Padgett, S. R., Kimball, S. L. & Wells, B. H. (1997). Perspectives on glyphosate resistance. *Weed Technology*, 11(1), 189-198.
- Brecke, B. J. & Duke, W. B. (1980). Effect of glyphosate on intact bean plants. *Plant Physiology*, 66(6), 656-659. doi: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.66.4.656>
- Brenes-Prendas, S. & Agüero-Alvarado, R. (2007). Reconocimiento taxonómico de arvenses y descripción de su manejo, en cuatro fincas productoras de piña (*Ananas comosus* L.) en Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*, 18(2), 239-246.

- Brigs, G. G., Rigitano, R. L. O. & Bromilow, R. H. (1987). Physio-chemical factors affecting uptake by roots and translocation to shoots of weak acid in barley. *Pest. Sci*, 19(2), 101-112. doi: 10.1002/ps.2780190203
- Bromilow, R. H. & Chamberlain, K. (2000). The herbicide glyphosate and related molecules: physiochemical and structural factors determining their mobility in the phloem. *Pest Management Science*, 56(4), 368-373. doi: 10.1002/(SICI)1526-4998(200004)56:4<368::AID-PS153>3.0.CO;2-V
- Bromilow, R. H., Chamberlain, K., & Patil, S. G. (1990). A rapid method using *Ricinus communis* for the estimation of phloem traslocation of xenobiotics. *Pest. Sci*, 30(1),1-12. doi: 10.1002/ps.2780300102
- Brunharo, C. A. C. G., Patterson, E. L., Carrijo, D. R., de Melo, M. S. C., Nicolai, M., Gaines, T. A., Nissen, S. J. & Christoffoleti, P. J. (19-25, junio, 2016). Confirmation and mechanism of glyphosate resistance in tall windmill grass (*Chloris elata*) from Brazil. In Proceedings 7th International Weed Science Congress. Prague, Czech Republic. p 286
- Burton, J. D. & Balke, N. E. (2012). Glyphosate uptake by suspension-cultured potato (*Solanum tuberosum* and *S. brevidens*) cells. *Weed Science*, 36(2), 146–153.
- Burson, B. L. (1987). Pollen germination, pollen tube growth and fertilization following self and interespecific pollination of *Paspalum* species. *Euphytyca*, 36(2), 641-650. doi: 10.1007/BF00041514
- Burson, B.L. (1979). Cytogenetics of *P. urivelli* X *P. intermedium* and *P. dilatatum* X *P. paniculatum* Hybrids. *Crop Science*, 19, 534-538
- Busi, R., Vila-Aiub, M. M., Beckie, H. J., Gaines, T. A., Goggin, D. E., Kaundun, S. S.,... Powles, S. B. (2013). Herbicide-resistant weeds: from research and knowledge to future needs. *Evolutionary Applications*, 6(8), 1218–1221. doi: 10.1111/eva.12098
- Busi, R. & Powles, S. B. (2009). Evolution of glyphosate resistance in a *Lolium rigidum* population by glyphosate selection at sub-lethal doses. *Heredity*, 103, 318–325. doi: 10.1038/hdy.2009.64
- Business Wire. (2016). *Glyphosate Market 2015-2022 - Global Strategic Business Report 2016 - Research and Markets*. Recuperado de <http://www.businesswire.com/news/home/20160728005938/en/Glyphosate-Market-2015-2022---Global-Strategic-Business>
- Cakmak, I., Yazici, A., Tutus, Y. & Ozturk, L. (2009). Glyphosate reduced seed and leaf concentrations of calcium, manganese, magnesium, and iron in non-glyphosate resistant soybean. *European Journal of Agronomy*, 31, 114-119.

- CaJacob, C. A., Feng, P. C. C., Heck, G. R., Murtaza, F. A., Sammons, R. D. & Padgett, S. R. (2003). Engineering resistance to herbicides. In P. Christou y H. Klee (Eds). *Handbook of Biotechnology*, V1 (pp. 353-372). Chichester: John Wiley and Sons, Ltd.
- Calabrese, E. J. (2008). Hormesis: why it is important to toxicology and toxicologists. *Environ Toxicol Chem*, 27(7), 145-1474. doi: 10.1897/07-541
- Caseley, J. C. & Coupland, D. (1985). Environmental and plant factors affecting glyphosate uptake, movement and activity. In E. Grossbard y D. Atkinson (Eds). *The Herbicide Glyphosate* (pp. 92-123). London: Butterworths y Co.
- Chen, J., Huang, H., Zhang, C., Wei, S., Huang, Z., Chen, J. & Wang, X. (2015). Mutations and amplification of EPSPS gene confer resistance to glyphosate in goosegrass (*Eleusine indica*). *Planta*, 242: 859–868. doi: 10.1007/s00425-015-2324-2
- Christoffers, M. J. & Varanasi, A. V. (2010). Glyphosate resistance: genetic basis in weeds. In Nandula VK (Ed). *Glyphosate resistance in crops and weeds: History, development and management* (pp 119-140). Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons, Inc.
- Collavo, A. & Sattin, M. (2012). Resistance to glyphosate in *Lolium rigidum* selected in Italian perennial crops: bioevaluation, management and molecular bases of target-site resistance. *Weed Research*, 52(1), 16–24. doi: 10.1111/j.1365-3180.2011.00883.x
- Comai, L., Sen, L. C. & Stalker, D. M. (1983). An Altered *aroA* Gene Product Confers Resistance to the Herbicide Glyphosate. *Science*, 221(4608), 370-371. doi: 10.1126/science.221.4608.370
- Coupland, D. (1985). Metabolism of glyphosate in plants. In Grossbard, E. y Atkinson, D (Eds). *The Herbicide Glyphosate*. (pp 25-34). London: Butterworths
- Coupland, D. & Caseley, J. C. (1979). Presence of ¹⁴C activity in root exudates and guttation fluid from *Agropyron repens* treated with ¹⁴C-labelled glyphosate. *New Phytol*, 38(1), 17-22.
- Cruz-Hipólito, H., Osuna, M. D., Dominguez-Valenzuela, J. A., Espinoza, N. & De Prado, R. (2011). Mechanism of resistance to ACCase-inhibiting herbicides in wild oat (*Avena fatua*) from Latin America. *J Agric Food Chem*, 59(13), 7261-7267. doi: 10.1021/jf201074k
- Culpepper, A. S., Grey, T. L., Vencill, W. K., Kichler, J. M., Webster, T. M., Brown, S. M.,... Hanna, W. W. (2006). Glyphosate-resistant Palmer amaranth (*Amaranthus*

palmeri) confirmed in Georgia. *Weed Sci*, 54(4), 620–626. doi: <http://dx.doi.org/10.1614/WS-06-001R.1>

Currier, H.B., & Dybing, C.D. 1959. Foliar penetration of herbicides – Review and present status. *Weeds*, 7(2), 195-213. doi:10.2307/4040221

De Carvalho, L. B., Cruz-Hipolito, H., Gonzalez-Torralva, F., da Costa Aguiar Alves, P. L., Christoffoleti, P. J. & De Prado, R. (2011). Detection of Sourgrass (*Digitaria insularis*) Biotypes Resistant to Glyphosate in Brazil. *Weed Science*, 59(2), 171-176. doi: <http://dx.doi.org/10.1614/WS-D-10-00113.1>

Devine, M. D., Duke, S. O. & Fedtke, C. (1993). Physiology of herbicide action. Englewood Cliffs, NJ:PTR Prentice-Hall, p96.

Dewey, S. A. & Appleby, A. P. (1983). A comparison between glyphosate and assimilate translocation patterns in Tall Morningglory (*Ipomoea purpurea*). *Weed Science*, 31(3), 308-314.

Dill, G., Sammons, D., Feng, P., Kohn, F., Kretzmer, K., Mehrsheikh, A.,... Haupfear, E. (2010). Glyphosate: Discovery, development, applications, and properties. In Nandula, VK (Ed). *Glyphosate Resistance in Crops and Weeds, History, Development and Management*. (pp 1-34) Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons, Inc.

Dill, G. M. (2005). Glyphosate resistant crops: history, status and future. *Pest Management Science*, 61(3), 219-224. doi: 10.1002/ps.1008

Dillon, A., Varanasi, V. K., Danilova, T. V., Koo, D.H., Nakka, S., Peterson, D. A., Tranel, P. J.... Jugulam, M. (2016). Physical Mapping of Amplified Copies of the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase Gene in Glyphosate-Resistant *Amaranthus tuberculatus*. *Plant Physiology* (Preview).DOI:10.1104/pp.16.01427 <http://www.plantphysiol.org/content/plantphysiol/early/2016/12/12/pp.16.01427.full.pdf>

Dinelli, G., Marotti, I., Bonetti, A., Catizone, P., Urbano, J. M. & Barnes, J. (2008). Physiological and molecular bases of glyphosate resistance in *Conyza bonariensis* biotypes from Spain. *Weed Research*, 48(3), 257-265. doi: 10.1111/j.1365-3180.2008.00623.x

Dinelli, G., Bonetti, A., Marotti, I., Minelli, S., Busi, S. & Catizone, P. (2007). Root exudation of diclofop-methyl and triasulfuron from foliar-treated durum wheat and ryegrass. *Weed Research*, 47, 25–33

Dinelli, G., Marotti, I., Bonetti, A., Minelli, M., Catizone, P. & Barnes, J. (2006). Physiological and molecular insight on the mechanism of resistance to glyphosate

in *Conyza canadensis* (L.) Cronq. biotypes. *Pest. Bioch. Physiol.*, 86(1), 30-41. doi: 10.1016/j.pestbp.2006.01.004

Duke, S. O., Baerson, S. R. & Rimando, A. M. (2003). Glyphosate. En D. W. Gammon & N. R. Ragsdale (Eds.), *Encyclopedia of Agrochemicals On line*. John Wiley e hijos. Recuperado de <http://www.interscience.wiley.com/emrw/9780471263630/home/>

Duke, S. O., Silva, F. M. L., Dayan, F. E. & Velini, E. D. (19-25, junio, 2016). Low doses of glyphosate change the responses of soybean to subsequent glyphosate treatments. In Proceedings 7th International Weed Science Congress. Prague, Czech Republic. p 26.

Duke, S. O. (2011). Glyphosate degradation in glyphosate-resistant and susceptible crops and weeds. *J. Agric. Food. Chem.*, 59(11), 5835-5841. doi: 10.1021/jf102704x

Duke, S. O. & Powles, S. B. (2008). Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science*, 64(4), 319-325. doi: 10.1002/ps.1518

Duke, S. O., Christy, A. L., Hess, F. D., Holt, Z. S. & Ames, I. A. (1991). Herbicide-resistant crops: Comments from CAST 1991-1. *Council of Agric. Sci. and Technol.*

EC (European Commission). (2013). SANCO/12571/2013. *Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed*. Recuperado de http://www.eurl-pesticides.eu/library/docs/allcrl/AqcGuidance_Sanco_2013_12571.pdf

Feng, P. C. C., Tran, M., Chiu, T., Sammons, R. D., Heck, G. R. & Cajacob, C. A. (2004). Investigations into glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*): retention, uptake, translocation, and metabolism. *Weed Science*, 52(4), 498-505. doi: <https://doi.org/10.1614/WS-03-137R>

Feng, P. C. C., Chiu, T. & Sammons, R. D. (2003). Glyphosate efficacy is contributed by its tissue concentration and sensitivity in velvetleaf (*Abutilon theophrasti*). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 77(3), 83-91. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2003.08.005>

Fernandes, M. I. B. M., Barreto, I. L., Salzano, F. M., & Sacchet, A. M. O. F. (1974). Cytological and evolutionary relationships in Brazilian forms of *Paspalum* (Gramineae). *Caryologia*, 27, 455-465.

Ferreira, E. A., Galon, L., Aspiazú, I., Silva, A. A., Concenço, G., Silva, A. F., Oliveira, J. A., & Vargas, L. (2008). Glyphosate translocation in hairy fleabane (*Conyza bonariensis*) biotypes. *Planta Daninha*, 26(3), 637-643. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582008000300020>

- Ffrench-Constant, R. H., Daborn, P. J., & Le Goff, G. (2004). The genetics and genomics of insecticide resistance. *Trends in Genetics*, 20(3), 163–170. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tig.2004.01.003>
- Flagel, L. E., & Wendel, J. F. (2009). Gene duplication and evolutionary novelty in plants. *New Phytologist*, 183(3), 557–564. doi:10.1111/j.1469-8137.2009.02923.x
- Florida, N., Lopez, C., & Pocomucha, V. (2012). Efecto del herbicida paraquat y glifosato en propiedades del suelo que condicionan el desarrollo de bacterias y fungi. *Investigación y Amazonía*, 2(1-2), 35-43.
- Fisher, A. (2012). Resistencia a herbicidas: mecanismos y mitigación. *Revista Especial Maleza. Aapresid*, 13-19. Recuperado de: http://www.aapresid.org.ar/articulos/revistas/REMSD12_002.pdf
- Fisher, A. J. (2008). Mecanismos de Resistencia: las bases para definir estrategias. Seminario Internacional “Viabilidad del Glifosato en Sistemas Productivos Sustentables”. INIA. Colonia, Uruguay, 27-44.
- Folmar, L. C., Sanders, H. O., & Julin, A. M. (1979). Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. *Arch. Environm. Contam. Toxicol.*, 8(3), 269-278. doi: 10.1007/BF01056243
- Franz, J. E., Mao, M. K. & Sikorski, J. A. (1997). *Glyphosate: a unique global herbicide*. ACS Monograph 189 (1a ed.). Washington, DC: American Chemical Society
- Franz, J. E. (1985). Chemistry of glyphosate. In E. Grossbard, y D. Atkinson (Eds.), *The Herbicide Glyphosate*(pp.3-17). Butterworths, London.
- Funke, T., Yang, Y., Han, H., Healy-Fried, M., Olesen, S., Becker, A. & Schönbrunn, E. (2009). Structural basis of glyphosate resistance resulting from the double mutation Thr97-Ile and Pro101-Ser in 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem*, 284(15), 9854–9860. doi: 10.1074/jbc.M809771200
- Funke, T., Han, H., Healy-Fried, M. L., Fisher, M. & Schönbrunn, E. (2006). Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 103(35), 13010–13015. doi: 10.1073/pnas.0603638103
- Gaines, T. A., Cripps, A. & Powles, S. B. (2012). Evolved resistance to glyphosate in junglerice (*Echinochloa colona*) from the tropical Ord River region in Australia. *Weed Technol*, 26(3), 480–484. doi: <http://dx.doi.org/10.1614/WT-D-12-00029.1>
- Gaines, T. A., Zhang, W., Wang, D., Bukum, B., Chisholm S. T., Shaner, D. L.,... Westra, P. (2010). Gene amplification confers glyphosate resistance in

Amaranthus palmeri. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 107(3), 1029-1034. doi: 10.1073/pnas.0906649107

- Ge, X., d'Avignon, D. A., Ackerman, J. J. & Sammons, R. D. (2014). In Vivo 31P-Nuclear Magnetic Resonance Studies of Glyphosate Uptake, Vacuolar Sequestration, and Tonoplast Pump Activity in Glyphosate Resistant Horseweed. *Plant Physiology*, 166(3), 1255–1268. doi: 10.1104/pp.114.247197
- Ge, X., d'Avignon, D. A., Ackerman, J. J., Collavo, A., Sattin, M., Ostrander, EL., Hall, E.L., Sammons, R.D. & Preston, C. (2012). Vacuolar glyphosate-sequestration correlates with glyphosate resistance in ryegrass (*Lolium* spp.) from Australia, South America, and Europe: a 31P NMR investigation. *J. Agric. Food Chem*, 60(5), 1243–1250. doi: 10.1021/jf203472s
- Ge, X., d'Avignon, D. A., Ackerman, J. J. H., Duncan, B., Spaur, M. B. & Sammons, R. D. (2011). Glyphosate-resistant horseweed made sensitive to glyphosate: low-temperature suppression of glyphosate vacuolar sequestration revealed by 31P NMR. *Pest Manag Sci*, 67(10), 1215–1221. doi: 10.1002/ps.2169
- Ge, X., d' Avignon, D. A., Ackerman, J. J. H. & Sammons, R. D. (2010). Rapid vacuolar sequestration: the horseweed glyphosate resistant mechanism. *Pest. Manag. Sci.*, 66(4), 345-348. doi: 10.1002/ps.1911
- Geiger, D. R. & Fuchs, M. A. (2002). Inhibitors of aromatic amino acid biosynthesis (glyphosate). In P. Böger, K. Wakabayashi & K. Hirai (Eds.), *Herbicide classes in development* (pp. 59–85). Springer, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-642-59416-8_3
- Giesy, J. P., Dobson, S. & Solomon, K. R. (2000). Ecotoxicological risk assessment for Roundup® Herbicide. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 167, 35-120.
- Global Market Insights. (2016). *Glyphosate Market Size, Industry Analysis Report, Regional Outlook, Application Potential, Price Trends, Competitive Market Share & Forecast, 2016 – 2023*. Recuperado de <https://www.gminsights.com/industry-analysis/glyphosate-market->
- González-Torralva, F., Rojano-Delgado, A. M., Luque de Castro, M. D., Muelleder, N., & De Prado, R. (2012). Two non-target mechanisms are involved in glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis* L. Cronq.) biotypes. *J. Plant. Phys*, 169, 1673–1679.
- Gressel, J. (2011). Low pesticide rates may hasten the evolution of resistance by increasing mutation frequencies. *Pest. Manag. Sci.*, 67(3), 253-257. doi: 10.1002/ps.2071

- Gressel, J. (2009). Evolving understanding of the evolution of herbicide resistance. *Pest. Manag. Sci.*, 65(11), 1164-1173. doi: 10.1002/ps.1842
- Gressel, J. & Levy, A. A. (2006). Agriculture: The selector of improbable mutations. *PNAS*, 103(33), 12215–12216. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1832258/pdf/zpq12215.pdf>
- Gressel, J. (Ed). (2002). *Evolution of resistance to herbicides*. In *Molecular Biology of Weed Control* (pp. 78–121). Taylor y Francis, London, UK.
- Gressel, J. & Segel, L. A. (1978). The paucity of plants evolving genetic resistance to herbicides: possible reasons and implications. *Journal of Theoretical Biology*, 75, 349-371.
- Hall, L. M., Holtum, J. A. M. & Powles, S. B. (1994). Mechanisms responsible for cross resistance and multiple resistance. In J. A. M, Holtum & Powles, S. B (Eds.). *Herbicide Resistance in Plants: Biology and Biochemistry*, (pp. 243-261). Boca Raton, FL: Lewis Publishers.
- Hammel, B. E., Grayum, M. H., Herrera, C. & Zamora, N. (2003). *Manual de Plantas de Costa Rica. Volumen III Monocotiledóneas (Orchidaceae-Zingiberaceae)* (pp. 884). Missouri Botanical Garden, Instituto Nacional de Biodiversidad, Museo Nacional de Costa Rica. Missouri, EE.UU.
- Han, H., Vila-Aiub, M., Jalaludin, A., Yu, Q., & Powles, S. (2017). A double EPSPS gene mutation endowing glyphosate resistance shows a remarkably high resistance cost. *Plant Cell Environ.*, 1-12. doi: 10.1111/pce.13067
- Han, H., Yu, Q., Widderick, M. J. & Powles, S. B. (2015). Target-site EPSPS Pro-106 mutations: sufficient to endow glyphosate resistance in polyploidy *Echinochloa colona*?. *Pest Manag Sci*, 72(2), 264-271. doi: 10.1002/ps.4038
- Hanson, B. D., Shrestha, A. & Shaner, D. L. (2009). Distribution of Glyphosate-Resistant Horseweed (*Conyza canadensis*) and Relationship to Cropping Systems in the Central Valley of California. *Weed Science*, 57(1), 48-53. doi: <https://doi.org/10.1614/WS-08-103.1>
- Healy-Fried, M. L., Funke, T., Priestman, M. A., Han, H. & Schönbrunn, E. (2007). Structural basis of glyphosate tolerance resulting from mutations of Pro101 in *Escherichia coli* 5-enolpiruvilshikimate-3-phosphate synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 32949-32955. doi: 10.1074/jbc.M705624200
- Heap, I. (02, diciembre, 2017). *International Survey of Herbicides Resistant Weeds*. Recuperado de www.weedscience.org

- Heap, I. M. (1997). The Occurrence of Herbicide-Resistant Weeds Worldwide. *Pesticide Management Science*, 51(3), 235-243. doi: 10.1002/(SICI)1096-9063(199711)51:3<235::AID-PS649>3.0.CO;2-N
- Henry, W. B., Shaner, D. L. & West, M. W. (2007). Shikimate accumulation in sunflower, wheat and proso millet after glyphosate application. *Weed Science*, 55(1), 1-5.
- Henry, W. B., Koger, C. H., & Shaner, D. L. (2005). Accumulation of shikimate in corn and soybean exposed to various rates of glyphosate. Recuperado de <http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/30100000/2005Documents/2005/429%202005%20Henry%20Crop%20Manage.pdf>
- Herrmann, K. M. & Weaver, L. M. (1999). The shikimate pathway. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 50(1), 473-503. doi: [10.1146/annurev.arplant.50.1.473](https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.473)
- Hess, F. D. (1985). Herbicide absorption and translocation and their relationship to plant tolerance and susceptibility. In S. Duke (Ed.). *Weed Physiology. Vol II. Herbicide Physiology*, (pp. 191-214). Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Honfi, A. I., Quarín, C. L. & Valls, J. F. M. (1990). Estudios cariológicos en gramíneas sudamericanas. *Darwiniana*, 30, 87-94.
- Hove-Jensen, B., Zeche, D. & Jochimsem, B. (2014). Utilization of Glyphosate as Phosphate Source: Biochemistry and Genetics of Bacterial Carbon-Phosphorus Lyase. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 78(1), 176-197.
- Howe, A. R., Gasser, C. S., Brown, S. M., Padgett, S. R., Hart, J., Parker, G. B.,... Armstrong, C. L. (2002). Glyphosate as a selective agent for the production of fertile transgenic maize (*Zea mays* L.) plants. *Mol. Breed.*, 10, 153–164.
- Innan, H. & Kondrashov, F. (2010). The evolution of gene duplications: classifying and distinguishing between models. *Nat Rev Genet.*, 11(2), 97–108. doi: 10.1038/nrg2689
- ITIS (Integrated Taxonomic Information System). (2016). *Paspalum paniculatum* L. (en línea). Recuperado de http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=41052.
- Jachetta, J. J., Appleby, A. P., & Boersma, L., (1986). Apoplastic and Symplastic Pathways of Atrazine and Glyphosate Transport in Shoots of Seedlings Sunflower. *Plant Physiol.* 82, 1000-1007
- Jasieniuk, M., Ahmad, R., Sherwood, A., Firestone, J., Perez-Jones, A., Lanini, T.,...Stednick, Z. (2008). Glyphosate-Resistant Italian Ryegrass (*Lolium*

multiflorum) in California: Distribution, Response to Glyphosate, and Molecular Evidence for an Altered Target Enzyme. *Weed Science*, 56(4), 496-502. doi: <https://doi.org/10.1614/WS-08-020.1>

- Jasieniuk, M., Brulebabel, A. L., & Morrison, I. N. (1996). The Evolution and Genetics of Herbicide Resistance in Weeds. *Weed Science*, 44, 176-193.
- Jasieniuk, M. (1995). Constraints on the evolution of glyphosate resistance in weeds. *Resistant Pest Manag. Newsletter*, 7(2), 31-32.
- Jaworski, E. G. (1982). Mode of action of N-phosphonomethyl glycine: inhibition of aromatic amino acid biosynthesis. *J. Agric. Food Chem.*, 20, 176-193.
- Kahrizi, D., Salmanian, A. H., Afshari, A., Moieni, A. & Mousavi, A. (2007). Simultaneous substitution of Gly96 to Ala and Ala183 to Thr in 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene of *E. coli* (k12) and transformation of rapeseed (*Brassica napus* L.) in order to make tolerance to glyphosate. *Plant Cell. Rep.*, 26, 95–104.
- Kaundun, S. S., Dale, R. P., Zelaya, I. A., Dinelli, G., Marotti, I., McIndoe, E. & Cairns, A. (2011). A novel P106L mutation in EPSPS and an unknown mechanism(s) act additively to confer resistance to glyphosate in a South African *Lolium rigidum* population. *J Agric Food Chem.*, 59, 3227–3233.
- Kaundun, S. S. (2010). An aspartate to glycine change in the carboxyl transferase domain of acetyl CoA carboxylase and non-target-site mechanism(s) confer resistance to ACCase inhibitor herbicides in a *Lolium multiflorum* population. *Pest Manag. Sci.*, 66, 1249–1256.
- Kaundun, S. S., Zelaya, I. A., Dale, R. P., Lycett, A. J., Carter, P., Sharpies, K. R., & McIndoe, E. (2008). Importance of the P106S target-site mutation in conferring resistance to glyphosate in a goosegrass (*Eleusine indica*) population from the Philippines. *Weed Science*, 56, 637-646.
- Keen, N. T., Holliday, M. J., & Yoshikawa, M. (1982). Effects of glyphosate on glyceollin production and expression of resistance in *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* in soybeans. *Phytopathology*, 72, 1467–1469.
- Kirkwood, R. C. (1991). Pathways and mechanisms of absorption of foliage applied herbicides with particular reference to the role of surfactants. In R. C. Kirkwood (Ed.). *Target sites for herbicide action* (pp. 219-243). Plenum Press, London.
- Kishore, G. M., Padgette, S. R., & Fraley, R. T. (1992). History of herbicide-tolerant crops, methods of development and current state of the art – emphasis on glyphosate tolerance. *Weed Technology*, 6, 626–634.

- Kishore, G. M., & Shah, D. M. (1988). Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. *Annual Review of Biochemistry*, 57, 627-663.
- Kleier, D. A., & Hsu, F. C. (1996). Phloem mobility of xenobiotics. VII The design of phloem systemic pesticides. *Weed Science*, 44, 749-756.
- Kleinman, Z., & Rubin, B. (19-25, junio, 2016). Expression profile of selected genes in GR *Conyza bonariensis* following glyphosate application. In Proceedings 7th International Weed Science Congress, (pp. 476). Prague, Czech Republic.
- Kogan, M., & Pérez, A. 2001. Herbicidas; fundamentos fisiológicos y bioquímicos del modo de acción. Chile, Universidad Católica de Chile, Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal. 307 p.
- Koger, C. H. & Reddy, K. N. (2005). Role of absorption and traslocation in the mechanism of glyphosate resistance in horseweed (*Conyza canadensis*). *Weed Science*, 53, 84-89.
- Laerke, P. E. (1995). Foliar absorption of some glyphosate formulation and their efficacy on plants. *Pesticide Science*, 44, 107-116.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H.,... Higgins, D. G. (2007). [Clustal W and Clustal X version 2.0.](#) *Bioinformatics*, 23, 2947-2948.
- Laskowski, R. A., Mac Arthur, M. W., Moss, D. S. & Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.*, 26, 283-291.
- Leatherbarrow, R. J. (1988). GraFit Version 4.0. Staines, UK: Erithacus Software Ltd.
- Lebrun, M., Sailland, A., Freyssinet, G. & Degryse, E. (2003). Mutated 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, gene coding for said protein and transformed plants containing said gene. *Bayer Crop Science S.A. US Patent 6,566,587* (pp. 1-17). Recuperado de <http://www.google.com/patents/US6566587>
- Leon, R. G., Bravo-Hoyos, W., Mulvaney, M. J. & Ferrell, J. A. (19-25, junio, 2016). Beyond glyphosate resistance: adaptation of *Amaranthus palmeri* populations to cropping systems. In Proceedings 7th International Weed Science Congress. Prague, Czech Republic.
- Lorraine-Colwill, D. F., Powles, S. B., Hawkes, R. M., Hollinshead, P. H., Warner, S. A. J. & Preston, C. (2003). Investigations into the mechanism of glyphosate resistance in *Lolium rigidum*. *Pest. Biochem. Physiol.*, 74(1), 62-72.

- Markets and Markets. (2016). Herbicides Market by Type (Glyphosate, Atrazine, Acetochlor, 2,4-D), by Crop Type (Cereals & Grains, Oilseeds & Pulses, Fruits & Vegetables), by Mode of Action (Selective & Non-Selective) & Geography - Trends and Forecasts to 2019. Recuperado de:
<http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/herbicides-357.html>
- Marshall, G., Kirkwood, R. C., & Martin, D. J. (1987). Studies on the mode of action of asulam, aminotriazole and glyphosate in *Equisetum arvense* L. (field horsetail). II. The metabolism of carbon-14 asulam, carbon-14 aminotriazole and carbon-14 glyphosate. *Pestic. Sci.*, 18, 65–78.
- Massenssini, A.M., Costa, M. D., Reis, M. R. & Silva, A. A. (2008). Activity of phosphate solubilising bacterial isolates in the presence of commercial glyphosate formulations. *Planta Daninha*, 26(4), 815-823.
- Michite, P., De Prado, R., Espinoza, N., Ruiz-Santanella, J. P. & Gauvrit, C. (2007). Mechanisms of resistance to glyphosate in a ryegrass (*Lolium multiflorum*) biotype from Chile. *Weed Science*, 55, 435-440.
- Molin, W. T., Wright, A. A., Lawton-Rauh, A., Saski, C. A. (2017). The Unique Genomic Landscape Surrounding the EPSPS Gene in Glyphosate Resistant *Amaranthus Palmeri*: A Repetitive Path to Resistance. *BMC Genomics*, 18 (1), 91. DOI: 10.1186/s12864-016-3336-4
- Monquero, P. A., Christoffoleti, P. J., Osuna, M. D. & De Prado, R. A. (2004). Absorção, translocação e metabolismo do glyphosate por plantas tolerantes e suscetíveis a este herbicida. *Planta Daninha*, 22, 445–451.
- Mortensen, D. A., Bastiaans, L. & Sattin, M. (2000). The role of ecology in the development of weed management systems: an outlook. *Weed Research*, 40, 49–62.
- Mueller, T., Ellis, A., Beeler, J., Sharma, S. & Singh, M. (2008). Shikimate accumulation in nine weedy species following glyphosate application. *Weed Research*, 48, 455-460.
- Mueller, T. C., Massey, J. H., Hayes, R. M., Main, C. L. & Stewart, N. J. (2003). Shikimate Accumulates in Both Glyphosate-Sensitive and Glyphosate-Resistant Horseweed (*Conyza canadensis* L. Cronq.). *J. Agric. Food Chem.*, 51, 680–684.
- Nafziger, E. D., Widholm, J. M., Steinrucken, H. C. & Killmer, J. L. (1984). Selection and characterization of a carrot cell line tolerant to glyphosate. *Plant Physiol.*, 76, 571–574.

- Nandula, V. K. (2010). Herbicide Resistance: Definitions and Concepts. In V. K. Nandula (Eds). *Glyphosate Resistance in Crops and Weeds, History, Development and Management* (pp. 35-43). Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons, Inc.
- Nandula, V. K., Ray, J. D., Ribeiro, D. N., Pan, Z. & Reddy, K. N. (2013). Glyphosate resistance in tall waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) from Mississippi is due to both altered target-site and nontarget-site mechanisms. *Weed Sci.*, 61, 374–383.
- Nandula, V. K., Reddy, K. N., Poston, D. H., Rimando, AM., & Duke, S. O. (2008). Glyphosate tolerance mechanism in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) from Mississippi. *Weed Sci*, 56, 344–349.
- Neve, P. (2008). Simulation modeling to understand the evolution and management of glyphosate resistant in weeds. *Pest Management Science*, 64, 392-401.
- Neve, P. & Powles, S. B. (2005). Recurrent selection with suboptimal rates of the herbicide diclofop-methyl result in a rapid increase in population level resistance in *Lolium rigidum*. *Theor. Appl. Genet.*, 110, 1154–1166.
- Neve, P., Diggle, A. J., Smith, F. P. & Powles, S. B. (2003). Simulating evolution of glyphosate resistance in *Lolium rigidum*. I: population biology of a rare resistance trait. *Weed Research*, 43, 404-417.
- Ng, C. H., Wickneswary, R., Salmijah, S., Teng, Y. T. & Ismail, B. S. (2004a). Glyphosate resistance in *Eleusine indica* (L.) Gaertn. from different origins and polymerase chain reaction amplification of specific alleles. *Aust J Agric Res*, 55, 407–414.
- Ng, C. H., Ratnam, W., Surif, S. & Ismail, B. S. (2004b). Inheritance of glyphosate resistance in goosegrass (*Eleusine indica*). *Weed Science*, 52, 564-570.
- Ng, C. H., Wickneswari, R., Salmijah, S., Teng, Y. T. & Ismail, B. S. (2003). Gene polymorphisms in glyphosate-resistant and -susceptible biotypes of *Eleusine indica* from Malaysia. *Weed Research*, 43, 108–115.
- Norsworthy, J. K., Jha, P., Steckel, L. E. & Scott, R. C. (2010). Confirmation and control of glyphosate-resistant giant ragweed (*Ambrosia trifida*) in Tennessee. *Weed Technol*, 24(1), 64–70.
- Padgett, S. R., Re, D. B., Gasser, C. S., Eichholtz, D. A., Frazier, R. B., Hironaka, C. M.,... Kishore, G. M. (1991). Site-directed mutagenesis of a conserved region of the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase active site. *J. Biol. Chem.*, 266, 22364–22369.

- Padgette, S.R., Huynh, Q.K., Aykent, S., Sammons, R.D., Sikorski, J.A. & Kishore, G.M. (1988). Identification of the reactive cysteines of *Escherichia coli* 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase and their nonessentiality for enzymatic catalysis. *J Biol Chem*, 263, 1798–1802.
- Padgette, S.R., Huynh, Q.K., Borgmeyer, J., Shah, D.M., Brand, L.A., Re, D.B., Bishop, B.F.,... Kishore, G.M. (1987). Bacterial expression and isolation of *Petunia hybrida* 5-enol-pyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *Arch Biochem Biophys*. 258, 564–573.
- Patzoldt, W. L., Hager, A. G., McCormick, J. S. & Tranel, P. J. (2006). A codon deletion confers resistance to herbicides inhibiting protoporphyrinogen oxidase. *PNAS*, 103(33), 12329-12334. Recuperado de <http://www.pnas.org/content/103/33/12329.full.pdf>
- Pedersen, B. P., Neve, P., Andreasen, C., & Powles, S. B. (2007). Ecological fitness of a glyphosate resistant *Lolium rigidum* population: growth and seed production along a competition gradient. *Basic. Appl. Ecol.*, 8, 258–268.
- Perez-Jones, A. & Mallory-Smith, C. (2010). Biochemical mechanisms and molecular basis of evolved glyphosate resistance in weed species. In V. K. Nandula (Ed.), 2010. *Glyphosate Resistance in Crops and Weeds: History, Development and Management* (pp. 119-148). Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons, Inc.
- Perez-Jones, A., Park, K. W., Polge, N., Colquhoun, J. & Mallory-Smith, C. (2007). Investigating the Mechanisms of Glyphosate Resistance in *Lolium multiflorum*. *Planta*, 226, 395-404.
- Perez-Jones, A., Park, K. W., Colquhoun, J., Mallory-Smith, C. & Shaner, D. (2005). Identification of glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) in Oregon. *Weed Science*, 53, 775-779.
- Perez-Jones, A. & Kogan, M. (2003). Glyphosate-resistant *Lolium multiflorum* in Chilean orchards. *Weed Res*, 43(1), 12–19.
- Peters, B. & Streck, H. J. (19-25, junio, 2016). The global status of weed resistance and consequences for agricultural practices. In Proceedings 7th International Weed Science Congress. Prague, Czech Republic.
- Piccolo, A., Celano, G. & Conte, D. (1996). Adsorption of Glyphosate by Humic Substances. *Agric. Food Chem.*, 44, 2442–2446.
- PIER (Pacific Island Ecosystems at Risk). (02, mayo, 2014). *Paspalum paniculatum* (en línea). Recuperado de: http://www.hear.org/pier/species/paspalum_paniculatum.htm

- Pipke, R. & Amrhein, N. (1988). Degradation of the phosphonate herbicide glyphosate by *Arthrobacter atrocyaneus* ATCC 13752. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 1293-1296.
- Pline-Srnic, W. (2006). Physiological mechanisms of glyphosate-resistance. *Weed Technol.*, 20, 290–300.
- Pohl, R. (1980). Flora Costaricensis. Family 15 Gramineae. FIELDIANA. New Series N° 4. Field Museum of Natural History (pp. 608). Iowa, USA.
- Pohl, R.W. & Davidse, G. (1971). Chromosome numbers of Costa Rican grasses. *Brittonia*, 23(3) 293-324
- Powles, S. B. (september, 2009). Evolution in action: plant resistant to herbicides: AFPP-XIIIth International Conference on Weed Biology. Dijon, France.
- Powles, S. B. & Preston, C. (2006). Evolved glyphosate resistance in plants: biochemical and genetic basis of resistance. *Weed Technology*, 20, 282-289.
- Powles, S. B., Lorraine-Colwill, D. F., Dellow, J. J. & Preston, C. (1998). Evolved resistance to glyphosate in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) in Australia. *Weed Science*, 46, 604-607.
- Powles, S. B. & Yu, Q. (2010). Evolution in Action: Plants Resistant to Herbicides. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 61, 317-347.
- Pozzobon, M. T., Valls, J. F. M., Peñaloza, A. P. S. & Santos, S. (s. f.). Further Meiotic Studies in Brazilian and Paraguayan Germplasm Accessions of *Paspalum* L. (Gramineae). 27-37. In Avances de Investigación en Recursos Genéticos en el Cono Sur. Recuperado de <http://repiica.iica.int/docs/B0515e/B0515e.pdf>
- Pratley, J., Baines, P., Eberbach, R., Incerti, M., & Broster, J. (1996). Glyphosate resistance in annual ryegrass. In Proc. 11th Annual Conf. Grasslands Soc. of New South Wales (pp. 126). Wagga Wagga, Australia.
- Preston, C., Wakelin, A. M., Dolman, F. C., Bostaman, Y. & Boutsalis, P. (2009). A decade of glyphosate-resistant *Lolium* around the world: Mechanisms, genes, fitness and agronomic management. *Weed Science*, 57, 435-441.
- Preston, C. & Wakelin, A. M. (2008). Resistance to glyphosate from altered herbicide translocation patterns. *Pest. Manag. Sci.*, 64, 372-376.
- Purrington, C. B. (2000). Costs of Resistance. Current Opinion. *Plant Biology*, 3, 305-308.

- Ramachandran, G. N. & Sasisekharan, V. (1968). Conformation of Polypeptides and Proteins. *Adv. Protein Chem.*, 23, 283–438.
- Ramírez, F. & Valverde, B.E. (26-30, junio, 2017). Respuesta de biotipos resistentes a glifosato de *Paspalum paniculatum* a los graminicidas fluazifop-p-butilo y haloxifop metilo. In Memorias XIV Congreso Internacional sobre Azúcar y Derivados, XXIII Congreso Latinoamericano de Malezas, III Congreso Iberoamericano de Malezas. (pp 315-317). La Habana, Cuba.
- Ramírez, Fernando. (2016). Resistencia al glifosato en biotipos de zacate cabezón (*Paspalum paniculatum* L.) de la Región del Caribe de Costa Rica. *Uniciencia*. 30(2):75-85
- Ramírez, F., Berrocal, S. & Bravo, V. (2013). Importación de plaguicidas en Costa Rica: Periodo 2007-2009. En V. Bravo., E. de la Cruz., A. M. Mora. & L. E. Castillo (Eds.). 15 Años de Academia. (pp. 25). Heredia, Costa Rica: Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas, Universidad Nacional. Serie de Informes Técnicos IRET N° 9.
- Ramírez, F., Chaverri, F., de la Cruz, E., Wesseling, C., Castillo, L. & Bravo, V. (2009). Importación de Plaguicidas en Costa Rica Periodo 1977 – 2006 (pp. 58). In Serie Informes Técnicos. Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas, Universidad Nacional de Costa Rica. N°6.
- Raven, J. A. (1975). Transport of indolacetic acid (IAA) in plant cells in relation to pH and electrical potential gradient, and its significance for polar IAA transport. *New Phytol.*, 74, 163-172.
- Reddy, K., Rimando, A., Duke, S. & Nandula, V. (2008). Aminomethylphosphonic Acid Accumulation in Plant Species Treated with Glyphosate. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 2125-2130.
- Reddy, K. N., Rimando, A. M. & Duke, S. O. (2004). Aminomethylphosphonic acid, a metabolite of glyphosate, causes injury in glyphosate-treated, glyphosate-resistant soybean. *J Agric Food Chem.*, 52, 5139–5143.
- Research and Markets. (2016). Glyphosate-Global Strategic Business Report 2016. Recuperado de <http://www.researchandmarkets.com/publication/m42zb7t/1946781>
- Reinhardt, C. F., Vorster, J. J. & Okumu, N. M. (19-25, junio, 2016). Resistance of *Conyza bonariensis* to glyphosate: Situation in South Africa. In Proceedings 7th International Weed Science Congress (pp. 80). Prague, Czech Republic.

- Riar, D., Norsworthy, J., Johnson, D., Scott, R. & Bagavathiannan, M. (2011). Glyphosate resistance in a Johnsongrass (*Sorghum halepense*) biotype from Arkansas. *Weed Science*, 59, 299-304.
- Rodrigues, B. N., Worsham, A. D. & Corbin, F. T. (1982). Exudation of glyphosate from wheat (*Triticum aestivum*) plants and its effects on interplanted corn (*Zea mays*) and soybeans (*Glycine max*). *Weed Sci.*, 3, 316-320.
- Roso, A. C. & Vidal, R. A. (2010). A modified phosphate-carrier protein theory is proposed as a non-target site mechanism for glyphosate resistance in weeds. *Planta Daninha*, 28, 1175-1185.
- Roy, D., Koner, S., Banerjee, S., Charles, D., Thompson, D. & Prasad, R. (1989). Persistence, movement and degradation of glyphosate in selected Canadian boreal forest soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37, 551-559.
- Ruchel, Q., Vargas, L., Agostinetto, D. & Silva, B. M. (19-25, junio, 2016). Adaptive value biotypes of *Lolium multiflorum* L. susceptible and resistant to herbicide glyphosate. In Proceedings 7th International Weed Science Congress (pp. 598). Prague, Czech Republic.
- Salas, R. A., Dayan, F. E., Pan, Z., Watson, S. B., Dickson, J. W., Scott, R. C. & Burgos, N. R. (2012). EPSPS gene amplification in glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium perenne* spp. *multiflorum*) from Arkansas. *Pest. Manag. Sci.*, 68, 1223–1230.
- Salazar, L. & Appleby, Z. (1982). Herbicidal activity of glyphosate in soil. *Weed Science*, 30, 463-466.
- Santadino, M., Coviella, C. & Momo, F. (2014). Glyphosate sublethal effects on the population dynamics of the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny, 1826). *Water, Air & Soil Pollution*, December 225:2207. doi: 10.1007/s11270-014-2207-3
- Santelmann, P. W. (1977). Herbicide Bioassay. In N. D. Truelove (Ed.). *Research Methods in Weed Science* (pp. 79-87). Auburn: Southern Weed Science Society.
- Sammons, R. D. & Gaines, T. (2014). Glyphosate resistance: state of knowledge. *Pest. Manag. Sci.*, 70(9), 1367–1377.
- Sammons, R. D., Meyer, J., Hall, E., Ostrander, E. & Schrader, S. (2014). A Simple Continuous Assay for EPSP Synthase from Plant Tissue. Recuperado de <http://www.cottoninc.com/fiber/AgriculturalDisciplines/Weed-Management/Managing-glyphosate-Resistant-Palmer-Amaranth/Research-Programs/Monsanto/11a-Industry-Sammons-NCWSS07-poster.pdf>

- Sammons, R., Heering, D. C., Dinicola, N., Glick, H. & Elmore, G. A. (2007). Sustainability and stewardship of glyphosate and glyphosate-resistant crops. *Weed Technology*, 21, 347-354.
- Satchivi, N. M., Wax, L. M., Stoller, E. W. & Briskin, D. P. (2000). Absorption and translocation of glyphosate isopropylamine and trimethylsulfonium salts in *Abutilon theophrasti* and *Setaria faberi*. *Weed Science*, 48(6), 675-679.
- Schonbrunn, E., Eschenburg, S., Shuttleworth, W. A., Schloss, J. V., Amrhein, N., Evans, J. N. S. & Kabsch, W. (2001). Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvyl-shikimate 3-phosphate synthase en atomic detail. *PNAS*, 98, 1376-1380.
- Schrödinger, L. L. C. (2010). The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8
- Schuette, J. (1998). Environmental Fate of Glyphosate. Environmental Monitoring & Pest Management, Department of Pesticide Regulation. Sacramento, California. pp 13.
- Seefeldt, S. S., Jensen, J. E. & Fuerst, E. P. (1995). Log-Logistic analysis of herbicide dose response relationships. *Weed Technology*, 9 (2), 218-227.
- SFE (Servicio Fitosanitario del Estado, CR). (04, mayo, 2015). Centro de Consulta de Insumos. Recuperado de <https://www.sfe.go.cr/insumosys/Principal.htm>
- Shaner, D. L., Lindenmeyer, R. B. & Ostlie, M. H. (2012). What have the mechanisms of resistance to glyphosate taught us? *Pest. Manag. Sci.*, 68, 3–9.
- Shaner, D. L. (2010). Testing methods for glyphosate resistance. In V. K. Nandula (Ed.). 2010. *Glyphosate Resistance in Crops and Weeds: History, Development, and Management*, (pp. 93-118). Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons, Inc.
- Shaner, D. L. (2009). Role of translocation as a mechanism of resistance to glyphosate. *Weed Sci.*, 57(1), 118-123.
- Shaner, D. L., Nadler-Hassar, T., Henry, W. B. & Koger, C. H. (2005). A rapid in vivo shikimate accumulation assay with excised leaf discs. *Weed Science*, 53, 769-774.
- Shaner, D. L. & Lyon, J. (1980). Interaction of Glyphosate with Aromatic Amino Acids on Transpiration in *Phaseolus vulgaris*. *Weed Science*, 28(1), 31-35.
- Sharma, S. D. & Singh, M. (2001). Environmental factors affecting absorption and bio-efficacy of glyphosate in Florida beggarweed (*Desmodium tortuosum*). *Crop Protection*, 20, 511-516.

- Sharon, A., Amsellem, Z. & Gressel, J. (1992). Glyphosate suppression of an elicited defense response. *Plant Physiol*, 98, 654–659.
- Siehl, D. L. (1997). Inhibitors of EPSP synthase, glutamine synthetase and histidine synthesis, in *Herbicide Activity: Toxicology, Biochemistry and Molecular Biology*. In R. M. Roe., J. D. Burton. & R. J. Kuhr (Eds.). IOS Press, Amsterdam, The Netherlands, pp. 37-67.
- Simarmata, M., Kaufmann, J. E. & Penner, D. (2003). Potential basis of glyphosate resistance in California rigid ryegrass (*Lolium rigidum*). *Weed Sci.*, 51, 678–682.
- Singh, B. K. & Shaner, D. L. (1998). Rapid determination of glyphosate injury to plants and identification to glyphosate-resistant plants. *Weed Technology*, 12, 527-530.
- Singh, M., Sharma, S. D., Ramirez, A. H. M. & Jhala, A. (2011). Glyphosate efficacy, absorption, and translocation in selected four weed species common to Florida citrus. Citrus Research and Education Center, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. p. 7.
- Smith, L., Wasshan, D. C. & Klein, R. B. (1982). Gramineas. In R. Reitz (Ed.). *Flora Illustrada de Santa Catarina, Parte I, Fascículo As Plantas Gramineas* (pp. 1060-1064). Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí, Brasil.
- Socorro, J. & Fuentes, C. (2005). Resistencia de *Parthenium hysterophorus* L. al herbicida glifosato: un nuevo caso de resistencia a herbicidas en Colombia. In 2do Congreso Bianual SODIAF (Sociedad Dominicana de Investigadores Agropecuarios y Forestales), Santo Domingo, República Dominicana, p.9.
- Spencer M., Mumm, R. & Gwyn, J. (2000). Glyphosate resistant maize lines. Dekalb Genetics Corporation: US Patent 6,040,497 (pp. 1-59). Recuperado de <http://www.google.com/patents/US6040497>
- Stallings, W. C., Abdel-Meguid, S. S., Lim, L. W., Shieh, H. S., Dayringer, H. E., Leimgruber, N. K.,... Kishore, G. M. (1991). Structure and topological symmetry of the glyphosate target 5-enol-pyruvylshikimate-3-phosphate synthase: a distinctive protein fold. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 5046-5050.
- Steinrucken, H. C. & Amrhein, N. (1980). The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpiruvil-shikimic-acid 3-phosphate synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 94, 1207-1212.
- Steinrucken, H. C., Schultz, A., Amrhein N., Porter, C. A. & Fraley, R. T. (1986). Overproduction of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in glyphosate-tolerant *Petunia hybrida* cell line. *Arch. Biochem. Biophys.*, 244, 169–178.

- Sterling, T. M. (1994). Mechanisms of herbicide absorption across plant membranes and accumulation in plant cells. *Weed Sci.*, 42, 263-276.
- Strauss, S. Y., Rudgers, J. A., Lau, J. A. & Irwin, R. E. (2002). Direct and ecological costs of resistance to herbivory. *Trends in Ecology and Evolution*, 17, 278-285.
- Suh, H., Hepburn, A. G., Kriz, A. L. & Widholm, J. M. (1983). Structure of the amplified 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene in glyphosate-resistant carrot cells. *Plant Mol. Biol.*, 22, 195-205.
- TaiBIF (Taiwan Biodiversity Information Facility). (11, enero, 2016). *Paspalum paniculatum*. Recuperado de <http://taibif.tw/zh/namecode/201623>
- Tani, E., Chachalis, D. & Travlos, I. S. (2015). A glyphosate resistance mechanism in *Conyza canadensis* involves synchronization of EPSPS and ABC-transporters genes. *Plant Mol. Biol.*, 33(6), 1721-1730.
- Tian, D., Traw, M. B., Chen, J. Q., Kreitman, M. & Bergelson, J. (2003). Fitness costs of R-gene-mediated resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 423, 74-77.
- Tran, M., Baerson, S., Brinker, R., Casagrande, L., Faletti, M., Feng, Y., Nemeth, M....., Schafer, D. (1999). Characterization of glyphosate resistant *Eleusine indica* biotypes from Malaysia. *Proceedings of the 17th Asian-Pacific Weed Science Society Conference I (B)*, pp: 527-536.
- Tranel, P. J., Riggins, C. W., Bell, M. S. & Hager, A. G. (2011). Herbicide resistances in *Amaranthus tuberculatus*: a call for new options. *J. Agric. Food. Chem.*, 59, 5808-5812.
- Tranel, P. J. & Wright, T. R. (2002). Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned? *Weed Science*, 50, 700-712.
- Tuffi Santos, L. D., Santos, J. B., Ferreira, F. A., Oliveira, J. A., Bentivenha, S. & Machado, A. F. L. (abril/junio, 2008). Exsudacao radicular de glyphosate por *Brachiaria decumbens* e seus efeitos em plantas de eucalipto. *Planta Daninha*, 26(2). Recuperado de http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-83582008000200013
- USDA (United States Department of Agriculture). (11, enero, 2016). Natural Resources Conservation Services. Plants Data Base. *Paspalum paniculatum* L (en línea). United States. Recuperado de <http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=PAPA11>
- Valverde, B. E. (2010). Status and management of glyphosate-resistant weeds in Latin America. In V. K. Nandula (Ed.). 2010. *Glyphosate Resistance in Crops and*

Weeds: History, Development, and Management (pp. 249-280). Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons, Inc.

- Valverde, B. & Heap, I.M. (2009). El estado actual de la resistencia a herbicidas en el mundo. Recuperado de <http://www2.inia.cl/medios/biblioteca/serieactas/NR36351.pdf>
- VanGessel, M. J. (2001). Glyphosate-resistant horseweed from Delaware. *Weed Science*, 49, 703-705.
- Vila-Aiub, M. M., Goh, S. S., Gaines, T. A., Han, H., Busi, R., Yu, Q. & Powles, S. B. (2014). No fitness cost of glyphosate resistance endowed by massive EPSPS gene amplification in *Amaranthus palmeri*. *Planta*, 239(4), 793-801.
- Vila-Aiub, M. M., Balbi, M. C., Distéfano, A. J., Fernandez, L., Hopp, E., Yu, Q. & Powles, S. B. (2012). Glyphosate resistance in perennial *Sorghum halepense* (Johnsongrass) endowed by reduced glyphosate translocation and leaf uptake. *Pest. Manag. Sci.*, 68, 430–436.
- Vila-Aiub, M. M., Neve, P. & Powles, S. (2009). Fitness costs associated with evolved herbicide resistance alleles in plants. *New Phytologist*, 184, 751-767.
- Vila-Aiub, M. M., Balbi, M. C., Gundel, P. E., Ghersa, C. M. & Powles, SB. (2007). Evolution of glyphosate-resistant Johnson grass (*Sorghum halepense*) in glyphosate-resistant soybean. *Weed Science*, 55, 566–571.
- Wakelin, A. M. & Preston, C. (2006). A target-site mutation is present in a glyphosate *Lolium rigidum* population. *Weed Research*, 46, 432-440.
- Wakelin, A. M., Lorraine-Colwill, D. F. & Preston, C. (2004). Glyphosate resistance in four different populations of *Lolium rigidum* is associated with reduced translocation of glyphosate to meristematic zones. *Weed Research*, 44, 453-45.
- Warwick, S. I., Xu, R., Sauder, C. & Beckie, H. J. (2008). Acetolactate synthase target-site mutations and single nucleotide polymorphism genotyping in ALS-resistant Kochia (*Kochia scoparia*). *Weed Science*, 56, 797-806.
- Warwick, S. I. (1991). Herbicide Resistance in Weedy Plants – Physiology and Population Biology. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 22, 95-114.
- Waters, S. (1991). Glyphosate tolerant crops for the future: development, risks, and benefits. In Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference: Weeds. Farnham, UK, British Crop Protection Council. pp. 165-170.

- Weaver, L. M. & Herrmann, K. (1997). Dynamics of the shikimate pathway in plants. *Trends Plant Sci.*, 2, 346–351.
- Wearth, J. A., Preston, C., Taylor, I. N., Charles, G. W., Roberts, G. N. & Baker, J. (2008). Managing the risk of glyphosate resistance in Australian glyphosate-resistance cotton production systems. *Pest Management Science*, 64, 417-421.
- Woodburn, A. (2000). Glyphosate production, pricing and use worldwide. *Pest Manag. Sci.*, 56, 309-312.
- Wu, C., Tranel, P. J. & Davis, A. S. (19-25, junio, 2016). Evolution of herbicide resistance: Is there a fitness cost? In Proceedings 7th International Weed Science Congress. Prague, Czech Republic. p. 52.
- Xu, J. W., Wei, X. L., Li, X. G., Chen, L., Feng, D. J. & Zhu, Z. (2002). Isolation of rice EPSP synthase cDNA and its sequence analysis and copy number determination. *Acta Bot. Sinica*, 44 (2), 188–192.
- Yoshida, S., Tazaki, K. & Minamikawa, T. (1975). Occurrence of shikimic and quinic acids in angiosperms. *Phytochemistry* 14, 195-197
- Yu, Q., Janaludin, A., Han, H., Chen, M., Sammons, D. & Powles, S. B. (2015). Evolution of a double amino acid substitution in the EPSP synthase in *Eleusine indica* conferring high level glyphosate resistance. *Plant Physiology*, 167, 1440–1447.
- Zelaya, I. A. & Owen, M. D. K. (2005). Differential response of *Amaranthus tuberculatus* to glyphosate. *Pest. Manag. Sci.*, 61(10), 936–950.
- Zelaya, I. A., Owen, M. D. & VanGessel, M. J. (2004). Inheritance of evolved glyphosate resistance in *Conyza canadensis* (L.) Cronq. *Theor. Appl. Genet.*, 110, 58-70.
- Zhou, M., Xu, H., Wei, X., Ye, Z., Wei, L., Gong, W., Wang, Y. & Zhu, Z. (2006). Identification of a glyphosate-resistant mutant of rice 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase using a directed evolution strategy. *Plant Physiology*, 140, 184-195.
- Zmienko, A., Samelak, A., Kozłowski, P. & Figlerowicz, M. (2014). Copy number polymorphism in plant genomes. *Theor. Appl. Genet.*, 127(1), 1-18.

9. Anexos

Anexo I: GUIA DE ENTREVISTA. DIAGNÓSTICO DE USO DE PLAGUICIDAS EN CULTIVOS PERENNES

Cultivo: _____

Código de encuesta _____ Punto de ubicación de la finca (GPS) _____

Fecha _____ Hora inicio _____ Hora final _____

Nombre del encuestador _____

I. Información general

Nombre de encuestado: _____ Número de teléfono: _____

2. Puesto:

A. Propietario B. Gerente/ Administrador C. Capataz D. Agrónomo

E. Aplicador F. Otro _____ G. Alquila _____

3. Provincia: _____ 4. Cantón: _____ 5. Distrito: _____

Nombre de la finca: _____ Otras señas: _____

6. Área total de la finca: _____ (has)

II. Características del cultivo Cultivo: _____ Época: _____

7. Variedad _____ Área: _____

8. Densidad de siembra: _____ (árboles/ha)

9. Duración de ciclo de producción: _____ (meses)

10. Área en producción 1ª cosecha (invierno): _____ (has) Fechas ciclo: _____

11. Área en producción 2ª cosecha (verano): _____ (has) Fechas ciclo: _____

12. Área en descanso: _____ (ha)

13. Producción 1ª cosecha: _____ (kg/ha/año)

14. Producción 2ª cosecha: _____ (kg/ha/año)

15. Cultivo anterior _____; cultivo futuro _____. Mezcla cultivos: _____.

III. Uso de Plaguicidas y Prácticas de Manejo

Nombre del cultivo _____ Área del cultivo _____

Uso cronológico en un ciclo de cultivo:

Vivero	Nombre plaguicida y formulación	Dosis/ha o dosis/bomba	Litros/ha o bombas/ha	Veces/ciclo	Equipo aplicación
Preparación Terreno					
Aradas, chapeas, etc					
Siembra					
Mantenimiento del Cultivo					
Cosecha					
Post-cosecha(antes de empacar)					
Fumiga las cajas en almacenaje?					
Transporte:Fumiga los camiones o contenedores?					

16. Tiempo entre la última aplicación y cosecha: _____

17. Uso en bordes, rodenticidas, molusquicidas, herbicidas, otros?

18. Compra de plaguicidas: Cuánto compró en el último año o ciclo, de los plaguicidas que usó: (si no respondió bien la parte de uso cronológico)

Plaguicida	Kg. o litros	Valor	Donde lo compra, otro. Observaciones.

19. Utiliza alternativas no químicas para control de plagas?

20. Manejo de Malezas:

A. Coberturas vivas ()

B. Coberturas muertas ()

C. Control mecánico ()

D. Control biológico ()

E. Control manual ()

F. Otros () Explique:

21. Ha tenido en este año problemas de control de malezas?

Si es afirmativo, con cuál especie:

Cómo la ha manejado?:

22. Ha variado el manejo de malezas en los últimos años? Explique:

23. Manejo de otras plagas:

Trampas ()

Plantas nectaríferas ()

Feromonas ()

Otros: Explique:

24. Otros:

Observaciones _____

Anexo II. Gradiente y condiciones para la extracción de metabolitos

Cuadro A1. Gradiente utilizada para la cromatografía de metabolitos.

tiempo (min)	% agua	% acetonitrilo
0	90	10
2,5	90	10
2,6	50	50
4,6	50	50
4,7	0	100
5,7	0	100
8	90	10

Cuadro A2. Condiciones MS/MS para los analitos

Nombre del compuesto	ion precursor (m/z)	dwell time (s)	cono (V)	energía colisión (eV)	ion producto (m/z)	
Glifosato	392.4	0.08	20	15	170.0	Q
	392.4	0.08	20	15	88	q ₁
	392.4	0.08	20	45	60	q ₃
AMPA	334.1	0.08	20	15	112.1	Q
	334.1	0.08	20	10	156	q ₁
¹³ C ₂ ¹⁵ N-glifosato	395.4	0.08	20	15	91	Patrón Interno

Q: transición cuantificación

q: transición confirmación

Anexo III. Condiciones del experimento para la extracción de EPSPS.

Inicialmente se preparan los *buffers* necesarios para el ensayo de la EPSPS:

Buffer para extracción:	<u>1 litro</u>
100 mM MOPS	20,92 gramos MOPS
5 mM EDTA	10 ml 0,5M EDTA
10% glicerol	100 ml glicerol
50 mM KCl	3,73 gramos KCl
0,5 mM Benzamidina	78 mg Benzamidina

Llevar la solución a un pH de 7,0 a 4°C. Solamente antes de usarse, adicione 1 g de PVPP y 70ul de β-mercaptoethanol (10 mM) a 100 ml de buffer.

Buffer para diálisis:	<u>1 litro de 10X</u>
100 mM MOPS	20,92 gramos MOPS
5 mM EDTA	10 ml de 0,5 mM EDTA

Llevar la solución a un pH de 7,0 @ 4°C. Diluir 200 ml de 10X, 200 ml de glicerol (10%), y 699 µl de β-mercaptoethanol (5 mM) para completar 2 litros para la diálisis.

Buffer para el ensayo:	<u>100 ml de 2X</u>
100 mM MOPS	2 gramos MOPS
1mM MgCl ₂	33 µl 3M MgCl ₂
10% glicerol	10 ml glicerol
2 mM molibdato de sodio	48 mg Na ₂ MoO ₄
200 mM NaF	840 mg NaF

Llevar la solución a un pH de 7,0 @ 25°C, almacenar @ 4°C.

Extracción de la EPSPS:

Se adicionaron los siguientes reactivos en una cubeta de 1,5 ml:

- 600 µl 2X Assay Buffer
- 300 µl agua ultrapura (libre de fosfatos)
- 200 µl 1 mM MESG**
- 10 µl 100 unidades/ml PNP**
- 25 µl PEP 50 mM
- 25 µl extract de EPSPS
- +/- 10 ul glifosato

** Incluidos en el *EnzChek Phosphate Assay kit* (Invitrogen E6646).

Preparación 50 mM PEP (Fosfoenilpiruvato): 10 mg/ml (disuelto en buffer del ensayo); es necesario prepararlo fresco cada día.

Preparación del 10 mM S3P (Shikimato-3-fosfato): 2,54 mg/ml; vial de 1 mg=394ul (disueltos en el buffer del ensayo).

Una vez adicionados los reactivos en ese orden, la cubeta se invierte en su posición para permitir una mezcla de los mismos. Se deja reposar la cubeta por 20 minutos para permitir la reacción y evitar la contaminación por fosfatos. Luego se lee la absorbancia a 360nm para tener un valor basal antes de iniciar la reacción de la EPSPS.

En este momento se adicionan 50 µL de S3P 10mM, nuevamente se invierte la cubeta para mezclar y se lee la absorbancia a 360nm por 10 minutos.

Anexo IV. Valores de las DE₅₀ de biotipos de *P. paniculatum*.

Cuadro A3. Resumen DE₅₀ (referida a daño medio) de glifosato en biotipos R y S de *P. paniculatum* de dos edades (+/- 95%) a los 15 dda.

Biotipo	R o S	Edad	D	C	b	DE₅₀ (g e.a. ha⁻¹)
B	R	I	18,09 ± 2,06	0,86 ± 3,28	1,90 ± 1,57	251,04 ± 105,30
		II	20,61 ± 2,40	1,39 ± 3,63	1,66 ± 1,02	258,99 ± 121,95
D	R	I	33,48 ± 1,71	1,40 ± 2,90	1,60 ± 0,44	210,23 ± 53,55
		II	41,36 ± 1,65	1,46 ± 2,19	3,38 ± 1,19	350,81 ± 35,43
L	R	I	35,35 ± 1,42	1,42 ± 1,98	3,18 ± 1,18	309,91 ± 33,39
		II	62,27 ± 1,79	8,96 ± 3,41	2,20 ± 0,54	387,68 ± 46,47
H	S	I	34,01 ± 1,92	0,69 ± 2,00	4,65 ± 2,65	38,88 ± 4,90
		II	53,11 ± 2,26	5,21 ± 3,76	1,71 ± 0,52	76,46 ± 12,43
C	S	I	39,46 ± 1,90	3,08 ± 2,89	2,55 ± 1,15	68,17 ± 10,89
		II	38,99 ± 1,42	7,33 ± 2,41	4,27 ± 1,45	131,71 ± 17,04
T	S	I	16,05 ± 1,83	0,10 ± 2,43	6,04 ± 6,11	62,03 ± 24,21
		II	51,39 ± 1,65	3,18 ± 2,22	2,86 ± 0,56	72,76 ± 7,38

Los datos, promedio de bioanálisis, están descritos de acuerdo a la ecuación $y = C + D - C / 1 + \exp[b(\log x - \log DE_{50})]$, donde y corresponde al daño visual a la dosis x de glifosato, C es el límite inferior del daño visual a la dosis más alta, D es el límite superior del daño visual a la dosis cero (testigo) y b es la pendiente de la curva cerca del valor de DE_{50} .

Anexo V: Transporte de glifosato en la planta.

Cuadro A4. Cantidad porcentual de glifosato marcado presente en la parte apical de la hoja tratada (parte 1) de la planta a las 24, 48, 72 y 96 hda. Edad I.

Biotipos	Tiempo (hdt)			
	24	48	72	96
B - R	79,24 ±4,73	-	49,91 ±2,45	-
D - R	73,31 ±3,25	54,96 ±4,26	71,34 ±3,82	52,85 ±4,56
L - R	65,35 ±4,16	60,04 ±2,60	40,10 ±4,79	48,90 ±4,49
Promedio R	71,31 ±2,47	57,50 ±2,5	53,86 ±3,80	50,69 ±3,01
C - S	82,81 ±1,47	49,10 ±6,34	59,62 ±3,56	57,41 ±3,09
H - S	75,53 ±2,55	58,26 ±2,39	44,19 ±5,76	42,51 ±4,24
T - S	69,68 ±3,19	63,58 ±3,94	40,22 ±8,17	59,35 ±3,32
Promedio S	75,52 ±3,32	57,25 ±2,68	48,72 ±3,71	52,88 ±2,46

± error estándar

Cuadro A5. Cantidad porcentual de glifosato marcado presente en la parte apical de la hoja tratada (parte 1) de la planta a las 24, 48 y 72 hda. Edad II.

Biotipos	Tiempo (hdt)		
	24	48	72
D - R	77,10 ±3,57	55,57 ±7,72	50,33 ±5,71
L - R	72,63 ±1,70	64,80 ±5,15	45,81 ±4,42
Promedio R	74,86 ±2,01	60,18 ±4,63	48,07 ±3,49
C - S	65,24 ±3,02	45,16 ±5,65	43,72 ±9,29
H - S	77,71 ±3,13	57,51 ±2,23	41,84 ±2,92
T - S	71,22 ±2,43	46,05 ±2,58	56,71 ±9,03
Promedio S	62,93 ±2,05	49,57 ±3,90	47,42 ±4,46

± error estándar

Cuadro A6. Cantidad porcentual de glifosato marcado presente en la parte inferior de la hoja tratada (parte 2) en diferentes tiempos de medición. Edad I.

Biotipos	Tiempo (hdt)			
	24	48	72	96
B - R	8,11 ±3,24	-	3,69 ±1,21	-
D - R	8,20 ±3,10	7,97 ±1,28	6,22 ±3,25	5,45 ±1,70
L - R	4,94 ±1,31	6,46 ±1,32	9,52 ±2,89	3,52 ±0,81
Promedio R	6,88 ±1,47	7,22 ±0,91	7,07 ±1,74	4,48 ±3,94
C - S	3,86 ±0,44	10,65 ±3,20	3,96 ±0,80	3,55 ±0,79
H - S	4,95 ±1,37	2,65 ±0,28	11,43 ±4,69	11,83 ±2,41
T - S	5,29 ±1,24	8,86 ±2,15	6,33 ±1,55	5,09 ±0,71
Promedio S	4,76 ±0,66	7,27 ±1,40	7,08 ±1,65	6,88 ±1,11

± error estándar

Cuadro A7. Cantidad porcentual de glifosato marcado presente en la parte inferior de la hoja tratada (parte 2) en diferentes tiempos de medición. Edad II.

Biotipos	Tiempo (hdt)		
	24	48	72
D - R	15,20 ±2,87	29,47 ±5,35	28,86 ±5,54
L - R	16,71 ±1,86	17,68 ±2,98	35,76 ±3,39
Promedio R	15,95 ±1,63	23,57 ±3,49*	32,31 ±3,27
C - S	27,95 ±2,92	30,45 ±1,72	39,15 ±7,78
H- S	17,22 ±3,20	33,12 ±1,85	39,09 ±1,58
T - S	21,36 ±2,75	31,97 ±2,03	23,48 ±5,32
Promedio S	22,18 ±1,98	31,85 ±1,04	33,91 ±3,55

*diferencias significativas entre medias R y S (p<5%).

Cuadro A8. Cantidad porcentual de glifosato marcado presente en la parte superior de la planta (parte 3) a las 24, 48, 72 y 96 hda. Edad I.

Biotipos	Tiempo (hdt)			
	24	48	72	96
B - R	0,84 ±0,37	-	5,62 ±0,80	-
D - R	0,93 ±0,18	2,59 ±0,44	1,17 ±0,27	3,38 ±0,64
L - R	2,31 ±0,43	3,24 ±0,63	3,07 ±0,33	4,36 ±0,92
Promedio R	1,47 ±0,24	2,91 ±0,38	2,89 ±0,41*	3,92 ±0,54*
C - S	0,69 ±0,18	5,28 ±1,82	3,17 ±0,65	3,38 ±0,45
H - S	2,49 ±1,59	2,74 ±0,29	7,72 ±2,09	9,20 ±1,68
T - S	1,19 ±0,16	1,56 ±0,30	5,55 ±1,62	5,99 ±0,48
Promedio S	1,51 ±0,57	3,12 ±0,63	5,39 ±0,92	6,20 ±0,79

*diferencias significativas entre medias R y S (p<5%).

Cuadro A9. Cantidad porcentual de glifosato marcado presente en la parte superior de la planta (parte 3) a las 24, 48 y 72 hda. Edad II.

Biotipos	Tiempo (hdt)		
	24	48	72
D - R	1,36 ±0,19	2,44 ±0,38	4,99 ±1,06
L - R	2,54 ±1,33	2,33 ±0,72	3,58 ±0,49
Promedio R	1,95 ±0,66	2,39 ±0,39	4,28 ±0,60
C - S	1,13 ±0,14	2,85 ±0,21	3,89 ±1,93
H- S	1,06 ±0,14	2,04 ±0,26	5,89 ±1,10
T - S	0,80 ±0,16	3,40 ±0,33	5,41 ±0,95
Promedio S	1,61 ±0,09	2,77 ±0,21	5,06 ±0,78

Cuadro A10. Cantidad porcentual de glifosato marcado presente en el culmo de la planta (parte 4) a las 24, 48, 72 y 96 hda. Edad I.

Biotipos	Tiempo (hdt)			
	24	48	72	96
B - R	7,31 ±2,14		30,68 ±2,05	
D - R	10,98 ±2,29	21,87 ±2,85	10,13 ±0,93	22,98 ±2,64
L - R	20,22 ±2,57	19,77 ±2,05	28,70 ±4,06	29,21 ±3,74
Promedio R	13,94 ±1,76	20,82 ±1,72	22,15 ±2,60	26,88 ±2,41
C - S	8,05 ±0,86	21,30 ±2,06	22,18 ±1,83	25,40 ±1,55
H - S	10,12 ±1,45	24,10 ±1,22	23,15 ±2,79	25,91 ±2,30
T - S	14,75 ±2,46	17,33 ±2,18	29,40 ±4,57	20,70 ±3,21
Promedio S	11,18 ±1,15	20,90 ±1,16	24,98 ±1,98	24,12 ±1,40

Cuadro A11. Cantidad porcentual de glifosato marcado presente en el culmo de la planta (parte 4) a las 24, 48, y 72 hda. Edad II.

Biotipos	Tiempo (hdt)		
	24	48	72
D - R	2,92 ±0,06	3,05 ±1,65	6,19 ±2,07
L - R	4,31 ±0,69	7,33 ±1,93	5,19 ±0,35
Promedio R	3,62 ±0,40	5,19 ±1,39	5,69 ±1,00
C - S	1,70 ±0,27	9,38 ±3,89	5,11 ±1,76
H - S	1,07 ±0,21	1,99 ±0,26	5,22 ±0,77
T - S	3,80 ±0,76	8,41 ±2,50	5,49 ±1,43
Promedio S	2,19 ±0,40	6,59 ±1,68	5,27 ±0,74

Cuadro A12. Cantidad porcentual de glifosato marcado presente en la raíz de la planta (parte 5) a las 24, 48, 72 y 96 hda. Edad I.

Biotipos	Tiempo (hdt)			
	24	48	72	96
B - R	4,19 ±0,37	-	9,86 ±1,30	-
D - R	6,53 ±1,10	12,35 ±2,03	11,00 ±0,78	15,20 ±2,06
L - R	7,09 ±1,53	10,14 ±0,99	18,31 ±1,70	13,61 ±1,01
Promedio R	6,28 ±0,76	11,25 ±1,13	13,81 ±1,12	14,33 ±1,07
C - S	4,53 ±0,64	13,48 ±2,09	10,94 ±1,53	9,99 ±1,05
H - S	6,83 ±1,45	12,10 ±1,22	13,10 ±2,79	8,91 ±2,30
T - S	9,02 ±0,80	8,55 ±1,16	17,81 ±1,96	8,63 ±1,46
Promedio S	6,95 ±0,59	11,30 ±0,88	13,98 ±1,13	9,20 ±0,61*

*diferencias significativas entre medias R y S (p<5%).

Cuadro A13. Cantidad porcentual de glifosato marcado presente en la raíz de la planta (parte 5) a las 24, 48 y 72 hda. Edad II.

Biotipos	Tiempo (hdt)		
	24	48	72
D - R	3,38 ±0,71	9,35 ±1,52	9,43 ±3,19
L -R	3,76 ±0,48	7,74 ±0,96	9,49 ±1,55
Promedio R	3,57 ±0,41	8,54 ±0,89	9,46 ±1,67
C - S	3,91 ±0,17	12,02 ±1,47	7,41 ±1,20
H - S	2,90 ±0,31	5,25 ±0,40	7,81 ±1,78
T - S	2,77 ±0,26	10,04 ±1,27	8,78 ±2,08
Promedio S	3,19 ±0,19	9,11 ±0,97	8,00 ±0,94

Anexo VI. Cromatogramas de extracción de metabolitos

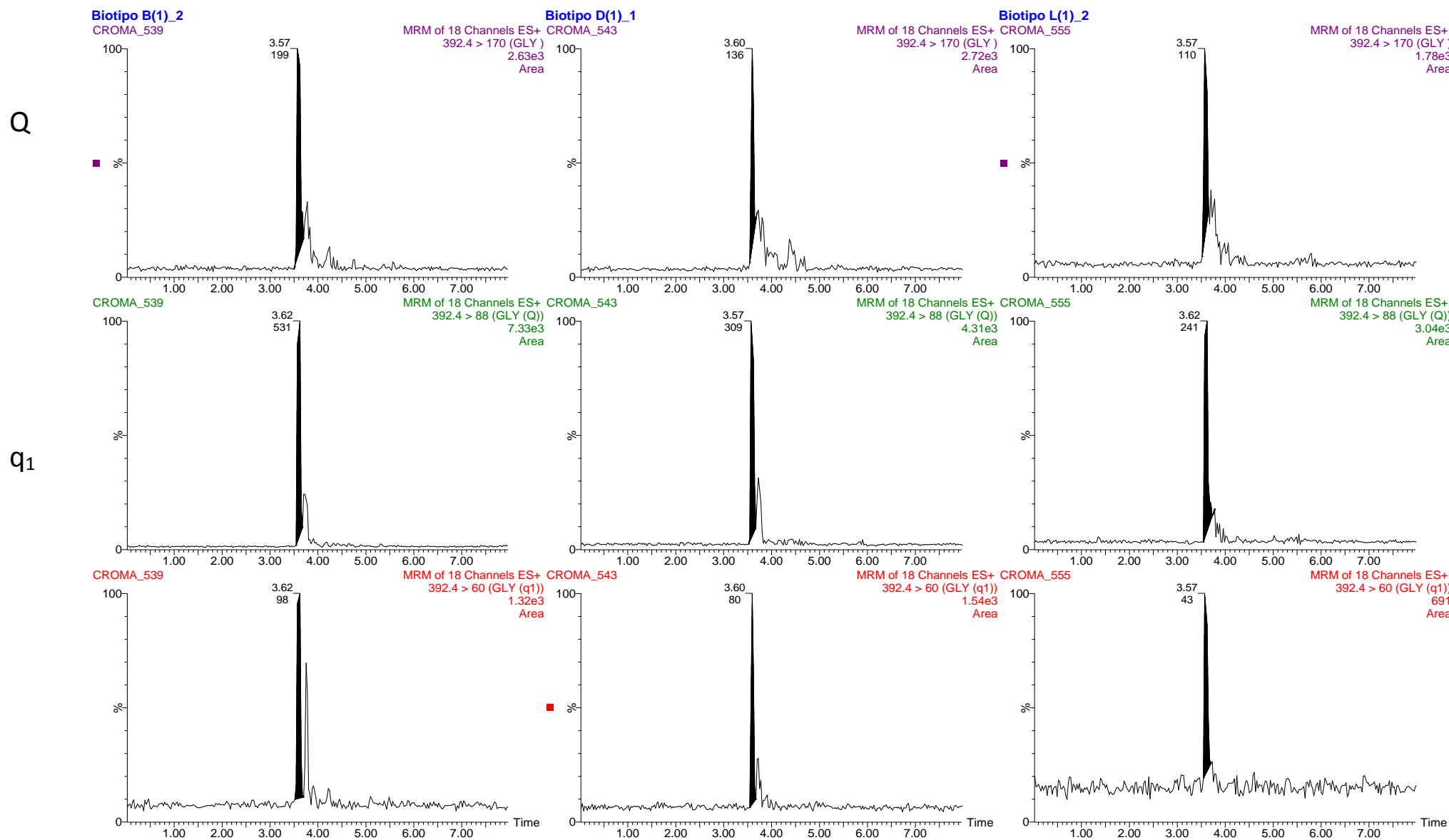


Figura A1. Cromatogramas seleccionados de los biotipos B (1), D (1) y L (1) aplicados.

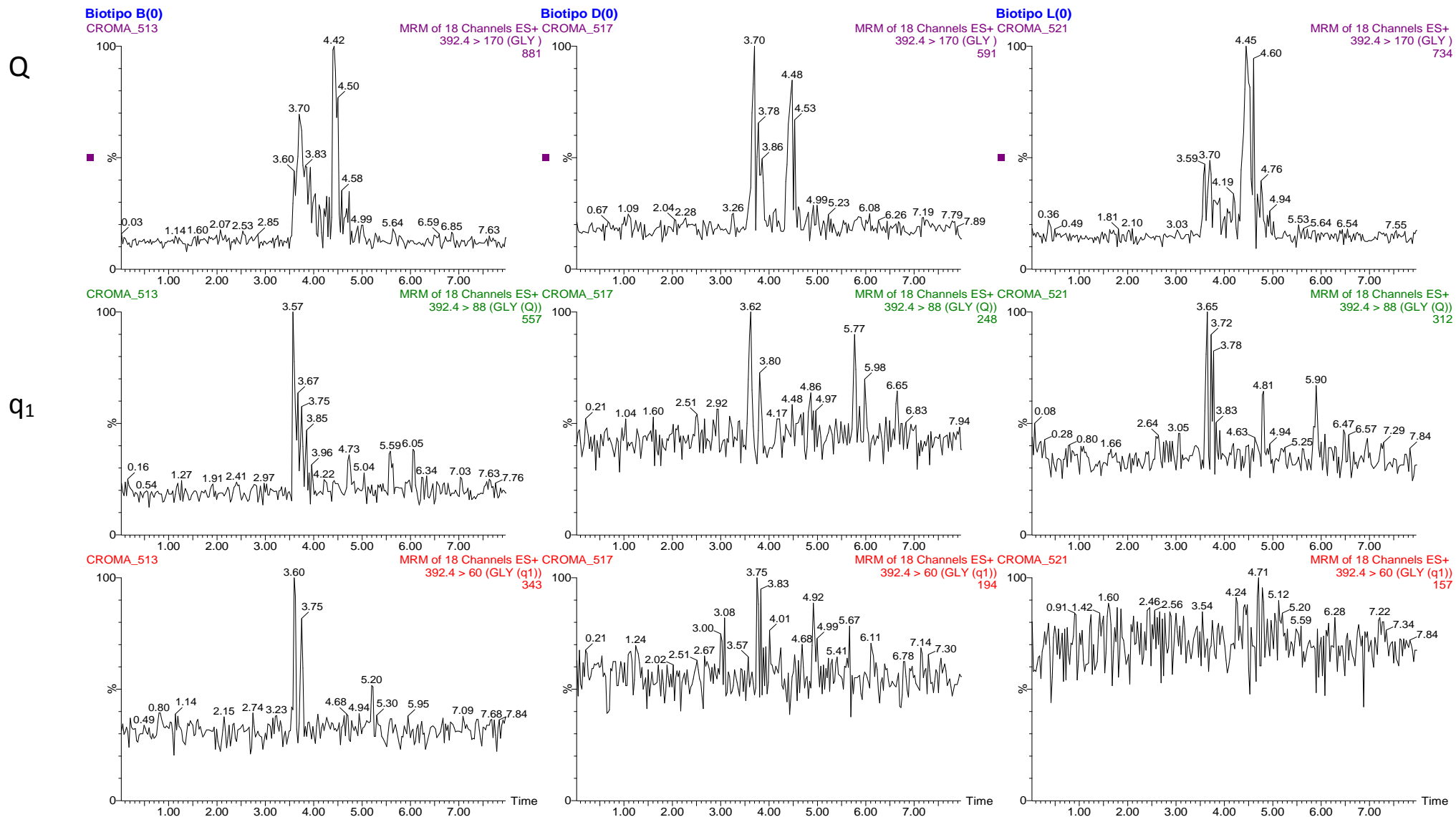


Figura A2. Cromatogramas para los biotipos B (0), D (0) y L (0) no aplicados.