

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Departamento de Edafología y Química Agrícola

**“Resistencia de malas hierbas a herbicidas inhibidores de la
enzima ACCasa”**

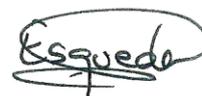
Tesis Doctoral

Gloria de los Ángeles Zita Padilla

Directores:



Dr. Rafael de Prado Amián



Dr. Valentín Alberto Esqueda Esquivel

TITULO: *Resistencia de malas hierbas a herbicidas inhibidores de la enzima ACCasa*

AUTOR: *Gloria de los Ángeles Zita Padilla*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba.
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es



TÍTULO DE LA TESIS: Resistencia de malas hierbas a herbicidas inhibidores de la enzima ACCasa

DOCTORANDO/A: Gloria de los Ángeles Zita Padilla

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

Que el presente trabajo de investigación titulado “**Resistencia de malas hierbas a herbicidas inhibidores de la enzima ACCasa**”, constituye la memoria que presenta Dña. **Gloria de los Ángeles Zita Padilla** para aspirar al grado de Doctor en “**Biociencias y Ciencias Agroalimentarias**”, habiendo sido realizada en los laboratorios del Departamento de Química Agrícola y Edafología de la Universidad de Córdoba, bajo nuestra dirección y supervisión. Consideramos que la doctoranda cumple los requisitos legales para optar al grado de Doctor en “**Biociencias y Ciencias Agroalimentarias**”.

A continuación se presenta una relación de trabajos publicados relacionados con la metodología utilizada en esta tesis:

Pérez, P., Alonso, A., **Zita, G.**, Morcuende, R. and Martínez-Carrasco, R. 2011. Down-regulation of Rubisco activity under combined increases of CO₂ and temperature minimized by changes in Rubisco kcat in wheat. *Plant Growth Regul.* 65(3):439-447.

Pérez, P., **Zita P., G.**, Morcuende, R. and Martínez-Carrasco, R. 2007. Elevated CO₂ and temperature differentially affect photosynthesis and resource allocation in flag and penultimate leaves of wheat. *Photosynthetica.* 45(1):9-17.

Aranjuelo, I., Pérez, P., Hernández, L., Irigoyen, J., **Zita G.** and Martínez-Carrasco, R. 2005. The response of nodulated alfalfa to water supply, temperature and elevated CO₂: photosynthetic downregulation. *Physiol. Plant.* 123:348-358.

Zita P., G. (ed.). 2012. Especies de la familia Asteraceae exóticas a la flora de México. Villaseñor, J. L., Ortiz, E., Hinojosa-Espinosa, O. y Segura-Hernández, G. CONACOFI-ASOMECEIMA. México. 162 p.

Sánchez-Ken, J. G., **Zita P., G.** y Mendoza, C., M. 2012. Catálogo de las gramíneas malezas nativas e introducidas de México. 1ª ed. CONACOFI-ASOMECEIMA, A. C. México. 430 p.

Bojórquez B., G., Rosales R., E., **Zita P., G.**, Vargas T., V. y Esqueda E., V. A. (coords.). 2011. Manejo de malezas en México. Vol. 1. Maleza terrestre. Universidad Autónoma de Sinaloa. UNAM. ASOMECEIMA, A. C. SENASICA. Fundación Produce Sinaloa. Junta Local de Sanidad Vegetal del Valle del Évora. Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología de Sinaloa. Culiacán, Sin., México. 327 p. ISBN obra completa: 978-607-7929-79-6. ISBN volumen: 978-607-7929-80-2. Tiraje 500 ejemplares.

Bojórquez B., G., Vargas T., V., **Zita P., G.**, Rosales R., E. y Esqueda E., V. A. (coords.). 2011. Manejo de malezas en México. Vol. 2. Maleza acuática. Universidad Autónoma de Sinaloa. UNAM. ASOMECEIMA, A. C. SENASICA. Fundación Produce Sinaloa. Junta Local de Sanidad Vegetal del Valle del Évora. Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología de Sinaloa. Culiacán, Sin., México. 181 p. ISBN obra completa: 978-607-7929-79-6. ISBN volumen: 978-607-7929-81-9. Tiraje 500 ejemplares.

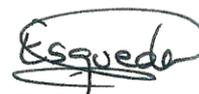
Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 30 de Julio de 2012

Firma de los directores



Fdo.: R. De Prado



Fdo.: V.A. Esqueda

Índice General

Índice general	3
Agradecimientos	7
Índice de tablas	9
Índice de figuras	11
Índice de abreviaturas	13
Resumen	15
Summary	17

Capítulo I Introducción general

1	Malas hierbas	21
1.1.	Importancia y definición	21
2	Origen de las malas hierbas	21
2.1.	Ecológico	21
2.2.	Taxonómico	22
2.3.	Geográfico	22
2.4.	Características de la maleza ideal	24
3	Métodos de control de las malas hierbas	24
4	Control químico de malezas: herbicidas	25
4.1.	Generalidades	25
4.1.1.	Nomenclatura	26
4.1.2.	Clasificación de los herbicidas	27
4.1.2.1.	Época de aplicación	27
4.1.2.2.	Selectividad	28
4.1.2.3.	Movilidad en la planta	28
4.1.2.4.	Familia química	28
4.1.2.5.	Modo de acción	29
4.1.2.6.	Mecanismo de acción	29
4.1.2.6.1.	Fotosíntesis	30
4.1.2.6.2.	Síntesis de pigmentos	32
4.1.2.6.3.	Auxínicos	34
4.1.2.6.4.	Biosíntesis de lípidos	36
4.1.2.6.5.	Inhibidores de la síntesis de aminoácidos	37
4.1.2.6.6.	División celular	39
4.1.2.6.7.	Otros	40
5	Resistencia de las malas hierbas a herbicidas	40
5.1.	Definición	40
5.2.	Tipos de resistencia	41
5.3.	Origen y evolución	41
5.4.	Mecanismos de resistencia a herbicidas	42
5.4.1.	Reducción de la concentración de herbicida en el sitio de acción	43
5.4.2.	Resistencia asociada a procesos de secuestro o	44

	compartimentación	
5.4.3.	Reparación de efectos fitotóxicos	44
5.4.4.	Pérdida de afinidad por el sitio de acción	44
5.4.5.	Metabolización a especies no tóxicas (detoxificación)	45
5.4.5.1.	Fase I o conversión	46
5.4.5.2.	Fase II o conjugación	48
5.4.5.3.	Fase III o deposición	48
5.5.	Manejo de la resistencia	49
5.5.1.	Prevención	49
5.5.2.	Detección	50
5.6.	Estado actual de la resistencia a herbicidas	51
5.6.1.	Problemática de la resistencia a nivel mundial	51
5.6.2.	Situación de la resistencia en Latinoamérica	54
5.6.3.	Malas hierbas reportadas como resistentes en México	55
6	Bibliografía	58

Capítulo II

Estudio monográfico del género *Phalaris* en México

1	Introducción	67
2	Objetivos	72
3	Materiales y métodos	73
3.1.	Definición de las especies de maleza del género <i>Phalaris</i> presentes en México	73
3.2.	Distribución geográfica actual y potencial de las especies de malezas de <i>Phalaris</i>	74
3.3.	Caracterización botánica de <i>Phalaris minor</i>	75
4	Resultados y discusión	76
4.1.	Definición de las especies de malas hierbas del género <i>Phalaris</i> presentes en México	76
4.2.	Imágenes de ejemplares de herbario de las especies de <i>Phalaris</i> más comunes	80
4.2.1.	<i>Phalaris canariensis</i> L.	80
4.2.2.	<i>Phalaris arundinacea</i> L.	81
4.2.3.	<i>Phalaris paradoxa</i> L.	83
4.2.4.	<i>Phalaris minor</i> Retz.	85
4.3.	Distribución geográfica actual y potencial de las especies de malezas de <i>Phalaris</i>	86
4.4.	Caracterización botánica de <i>Phalaris minor</i>	92
4.4.1.	Clasificación supragenérica de <i>Phalaris</i>	92
4.4.2.	Descripción del género <i>Phalaris</i>	92
4.4.3.	Sinonimia de <i>Phalaris minor</i>	93
4.4.4.	Descripción botánica de <i>Phalaris minor</i>	94
5	Conclusiones	96
6	Bibliografía	97

Capítulo III

Mecanismos de resistencia de *Phalaris minor* a herbicidas inhibidores de la ACCasa

1	Introducción	105
1.1.	Síntesis de ácidos grasos vegetales	105
1.2.	Herbicidas inhibidores de la ACCasa	107
1.3.	Modo de acción de los inhibidores de la ACCasa	110
1.4.	Bases de la selectividad	111
1.5.	Mecanismos de resistencia a herbicidas inhibidores de la ACCasa	113
1.6.	Estado actual de la resistencia a herbicidas inhibidores de la ACCasa	116
2	Objetivos	119
3	Materiales y métodos	120
3.1.	Ensayos de dosis-respuesta	120
3.1.1.	Material vegetal	120
3.1.2.	Herbicidas y reactivos	121
3.1.3.	Condiciones de crecimiento	121
3.1.4.	Tratamiento con herbicidas	121
3.2.	Mecanismos de resistencia fuera del sitio de acción	125
3.2.1.	Absorción y translocación de ¹⁴ C-diclofop-metil	125
3.2.1.1.	Material vegetal y condiciones de crecimiento	125
3.2.1.2.	Herbicidas y reactivos	125
3.2.1.3.	Metodología utilizada	125
3.2.1.4.	Autorradiografías	126
3.2.2.	Metabolismo de ¹⁴ C-diclofop-metil	126
3.2.2.1.	Material vegetal y herbicidas	126
3.2.2.2.	Metodología utilizada	127
3.2.3.	Efecto de ABT sobre el metabolismo de diclofop metil	127
3.3.	Mecanismos de resistencia dentro del sitio de acción	128
3.3.1.	Extracción y actividad acetil CoA carboxilasa (ACCasa)	128
3.3.1.1.	Material vegetal	128
3.3.1.2.	Herbicidas y reactivos empleados	128
3.3.1.2.1.	Herbicidas	128
3.3.1.2.2.	Reactivos	129
3.3.1.3.	Extracción de la enzima	131
3.3.1.4.	Ensayo de actividad de la ACCasa	131
3.3.1.5.	Análisis estadístico	132
3.3.2.	Secuenciación del dominio carboxil-transferasa (CT)	134
3.3.2.1.	Material vegetal	134
3.3.2.2.	Extracción de ADN	134
3.3.2.3.	Cuantificación del ADN	135
3.3.2.4.	Amplificación de las regiones A y B del dominio CT	135
3.3.2.5.	Diseño de los cebadores	135
3.3.2.6.	Purificación de los fragmentos obtenidos en la PCR	136

3.3.2.7.	Secuenciación del gen ACCasa	137
4	Resultados	138
4.1.	Ensayos de dosis-respuesta (cálculo del ED ₅₀)	138
4.2.	Mecanismos de resistencia fuera del sitio de acción	140
4.2.1.	Absorción y traslocación de ¹⁴ C diclofop-metil	140
4.2.1.1.	Absorción de ¹⁴ C-diclofop- metil	140
4.2.1.2.	Translocación de ¹⁴ C-diclofop-metil	140
4.2.1.3.	Visualización de ¹⁴ C-diclofop-metil	141
4.2.2.	Metabolismo de ¹⁴ C-diclofop-metil	141
4.3.	Mecanismos de resistencia dentro del sitio de acción	143
4.3.1.	Estudio de la actividad de la ACCasa	143
4.3.2.	Secuenciación del dominio carboxil-transferasa (CT)	143
5	Discusión	146
6	Conclusiones	150
7	Bibliografía	151
	Capítulo IV	
	Resumen curricular	159
	<i>Curriculum vitae</i>	161
	Capítulo V	
	Publicaciones	177

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a las dos instituciones mediante las cuales el desarrollo de este trabajo ha sido posible: La Universidad Nacional Autónoma de México a través de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico por la beca recibida con el fin de realizar los estudios de doctorado y la Universidad de Córdoba por brindarme el espacio y los recursos materiales y humanos. Así mismo agradezco a los directores de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán: Dr. Juan Antonio Montaraz Crespo y Dra. Suemi Rodríguez Romo quienes en sus respectivos periodos al mando de la facultad, me han brindado todo el apoyo que he necesitado para la consecución del objetivo final. En el mismo sentido extiendo mi agradecimiento al Dr. Arturo Aguirre Gómez, al Fís. Jesús Cruz Guzmán, al Biól. Marcos Espadas Reséndiz, a la Quím. Celia Elena Valencia Islas y a la M.C. Margarita Tadeo Robledo.

En segundo lugar pero no por ello menos importante, hago constar mi profundo agradecimiento a las dos personas que han sido decisivas en la empresa que supone esta tesis por su función como directores del presente trabajo: Dr. Rafael De Prado Amián, profesor Catedrático de la UCO, cuyas inconmensurables atenciones y dedicación han sido piedra angular y fundamento del logro que es para mí esta tesis. Al Dr. Valentín Esqueda Esquivel, quien a lo largo de nuestra amistad de 30 años ha sido al mismo tiempo mi mentor. Ambos me han compartido su experiencia y conocimientos, me han tenido paciencia pero sobre todo me han brindado su amistad. Siempre estaré enormemente agradecida con ustedes.

También quiero expresar mi sincero agradecimiento a la Dra. María Dolores Osuna Ruiz, del Centro de Investigación La Orden-Valdesequera, por sus enseñanzas en biología molecular y al Dr. Fernando Bastida Milian, profesor Titular de la Universidad de Huelva por sus consejos y opiniones. Agradezco también al Dr. Hugo Cruz Hipólito investigador de Bayer México por sus atinados comentarios y observaciones sobre esta tesis. No puedo olvidar a mis compañeros y amigos del laboratorio de Química Agrícola que tanto me han ayudado en la ejecución de este trabajo: Antonia, Fidel, Rafa e Isa. Así mismo quiero agradecer a Tomás Medina Cázares por su amabilísima aportación del material biológico y por compartir sus conocimientos. Al Dr. Rafael Martínez-Carrasco Tabuena del IRNA-CSIC Salamanca, quien me brindó innumerables herramientas metodológicas.

Por supuesto quiero extender un cariñoso agradecimiento a mi familia y especialmente a mis hijos. Ellos han sido partícipes de primera mano en el proceso de elaboración del trabajo que aquí presento. Rogerio siempre me revisa la gramática en español e inglés, Alejandro siempre me resuelve mis dudas informáticas y Diana, la bióloga, me aporta sus conocimientos en biología molecular. Esta tesis es tan mía como de ellos.

Son muchísimas más personas las que han contribuido a la finalización de este trabajo, amigos, compañeros, alumnos, secretarias. A todos ellos mi agradecimiento.

Índice de tablas

	Capítulo I	
TABLA		PÁGINA
Tabla 1.1.	Razones por las cuales llamar maleza a una planta.	23
Tabla 1.2.	Clasificación de herbicidas.	27
Tabla 1.3.	Herbicidas. Modos y mecanismos de acción más comunes.	30
Tabla 1.4.	Resumen de las tres fases de detoxificación metabólica de plaguicidas.	47
Tabla 1.5.	Grupos de herbicidas y número de biotipos resistentes reportados a nivel global.	54
Tabla 1.6.	Malezas resistentes a herbicidas en México.	57
Tabla 1.7.	Biotipos de <i>Phalaris minor</i> resistentes a herbicidas	58
	Capítulo II	
Tabla 2.1.	Guía para evaluar la confiabilidad de un registro de una plaga conforme a la NIMF-8.	71
Tabla 2.2.	Registros de especies de <i>Phalaris</i> en México según diversas fuentes.	79
Tabla 2.3.	Especies de maleza del género <i>Phalaris</i> en México.	80
	Capítulo III	
Tabla 3.1.	Herbicidas recomendados para el cultivo de trigo en el estado de Guanajuato.	109
Tabla 3.2.	Especies de poáceas que han desarrollado resistencia a inhibidores de la ACCasa y las sustituciones aminoacídicas en el dominio CT de la ACCasa.	116
Tabla 3.3.	Malas hierbas en las que se ha desarrollado resistencia a herbicidas inhibidores de la ACCasa.	119
Tabla 3.4.	Relación de herbicidas empleados en los bioensayos de postemergencia en biotipos resistentes y sensibles de <i>P. minor</i> .	124
Tabla 3.5.	Dosis de herbicidas utilizadas para el cálculo de parámetros de la curva sigmoideal de <i>Phalaris minor</i> provenientes de Guanajuato, México.	127
Tabla 3.6.	Resumen de ensayos de actividad ACCasa para diferentes concentraciones de herbicida en los ensayos <i>in vivo</i> de ACCasa.	135
Tabla 3.7.	Cebadores utilizados en la amplificación de los fragmentos	138

conteniendo las principales sustituciones aminoacídicas descritas en la región A (Up n600/Lown600) y B (Upm591/Low591) del dominio CT.

Tabla 3.8. Programas de amplificación por PCR de las regiones A y B del dominio CT del gen de la ACCasa.	138
Tabla 3.9. Resultados de los ensayos dosis-respuesta de <i>P. minor</i> .	141
Tabla 3.10. Absorción de ¹⁴ C-diclofop-metil en diferentes biotipos de <i>P. minor</i> en diferentes tiempos después del tratamiento.	142
Tabla 3.11. Traslocación de radiactividad en hojas de biotipos R y S de <i>P. minor</i> 72 h después de haber sido tratadas con ¹⁴ C-diclofop-metil.	142
Tabla 3.12. Metabolismo de ¹⁴ C-DM en biotipos de <i>P. minor</i> resistente (R) y susceptible (S) 12, 24, 48 y 72 h después del tratamiento (HDT).	144
Tabla 3.13. Efecto de ABT (70 µM) sobre el metabolismo de ¹⁴ C-DM en hojas de biotipos resistentes (R) y sensibles (S) de <i>P. minor</i> .	144
Tabla 3.14. Parámetros de la ecuación de la curva sigmoideal utilizada para calcular la dosis de herbicida necesaria para reducir un 50% la actividad enzimática (I ₅₀) de los biotipos R y S de <i>P. minor</i> proveniente de México y las relaciones obtenidas (FR factor de resistencia) de la población resistente.	145

Índice de figuras

Capítulo I

FIGURA	PÁGINA
Figura 1.1. Representación esquemática del modo de acción de un herbicida.	29
Figura 1.2. Mecanismos de resistencia de plantas a herbicidas.	44
Figura 1.3. Resistencia debida a pérdida de afinidad por el sitio de acción.	46
Figura 1.4. Incremento del número de malas hierbas resistentes a herbicidas hasta el año 2010.	52
Figura 1.5. Número de biotipos resistentes a distintas familias de herbicidas desde que se encontró el primer caso de resistencia hasta el año 2010, distribuido según modo de acción.	53
Figura 1.6. Los 10 grupos de herbicidas con mayor numero de biotipos resistentes y sus respectivos porcentajes.	55

Capítulo II

Figura 2.1. Producción anual de alpiste en Canadá de 1998 a 2007.	68
Figura 2.2. Valor y volumen de la producción de alpiste en México.	69
Figura 2.3. <i>Phalaris canariensis</i> ejemplar de herbario (MEXU).	80
Figura 2.4. <i>Phalaris arundinacea</i> . Detalle de la lámina y lígula.	82
Figura 2.5. <i>Phalaris arundinacea</i> . Detalle de inflorescencia.	82
Figura 2.6. <i>Phalaris arundinacea</i> . Ejemplar de herbario (MEXU).	83
Figura 2.7. <i>Phalaris paradoxa</i> . Ejemplar de herbario (MEXU).	84
Figura 2.8. <i>Phalaris paradoxa</i> . Detalle de la lámina.	85
Figura 2.9. <i>Phalaris paradoxa</i> . Detalle de la inflorescencia.	85
Figura 2.10. <i>Phalaris minor</i> . Ejemplar de herbario (MEXU).	86
Figura 2.11. Distribución actual y potencial de <i>Phalaris canariensis</i> en México	89
Figura 2.12. Distribución conocida de <i>Phalaris arundinacea</i> y <i>P. brachystachys</i> en México.	90
Figura 2.13. Distribución conocida y potencial de <i>Phalaris paradoxa</i> en México.	91
Figura 2.14. Distribución conocida y potencial de <i>Phalaris minor</i> en México.	92
Figura 2.15. <i>Phalaris minor</i> . Detalle de vaina y lígula.	95
Figura 2.16. Detalle de una espiga de <i>Phalaris minor</i> .	95

Capítulo III

Figura 3.1. Síntesis de ácidos grasos.	108
Figura 3.2. Representación esquemática de la reacción catalizada por la ACCasa.	108
Figura 3.3. Esqueleto básico de ariloxifenoxipropanoatos. R ₁ y R ₂ se refieren a diferentes sustituyentes.	110
Figura 3.4. Esqueleto básico de las ciclohexanodionas. R ₁ , R ₂ , R ₃ y R ₄ se refieren a posibles sustituciones.	111
Figura 3.5. Fórmula desarrollada de pinoxaden	111
Figura 3.6. Sitios de acción de herbicidas inhibidores de la síntesis de lípidos	112
Figura 3.7. Isoformas de ACCasa presentes en plantas	114
Figura 3.8. Representación esquemática de la ACCasa mostrando los dominios.	118
Figura 3.9. Mapa de localización del municipio de Cortázar en el estado de Guanajuato, México.	122
Figura 3.10. Máquina de laboratorio de aplicación de herbicidas donde se controla la presión, el volumen, la velocidad y la altura de aplicación.	126
Figura 3.11. Gel de Agarosa al 1,5%. Muestras de ADN procedentes de plantas individuales de <i>P. minor</i>	136
Figura 3.12. Efecto de fenoxaprop (g i. a./ha) aplicado en postemergencia sobre los biotipos S (izquierda) y R (Dderecha) de <i>P. minor</i> proveniente de México, evaluado 21 días después del tratamiento.	140
Figura 3.13. Autorradiografías de biotipos sensibles (izquierda) y resistentes (derecha) de <i>P. minor</i> 72 h después del tratamiento foliar con ¹⁴ C-DM.	143
Figura 3.14. Amplificación del fragmento conteniendo el dominio A (longitud 600 pb), utilizando los cebadores Up n600/Low n600	146
Figura 3.15. Amplificación del fragmento conteniendo el dominio A (591 pb), usando los cebadores Up n591/ Low n591.	146
Figura 3.16. Resultados de una parte de secuencia de la región B del dominio carboxil-transferasa del gen ACCasa y comparación con la encontrada con el biotipo S.	147
Figura 3.17. Metabolismo de diclofop-metil en plantas resistentes y sensibles.	151

Índice de abreviaturas

ACCasa	Acetil coA carboxilasa
AGs	Ácidos grasos
AGsintasa	Ácido graso sintasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AHAS	Acetohidroxiácido sintasa
AIA	Ácido indolacético
ALS	Acetolactato sintasa
APPs	Ariloxifenoxipropanoatos
ARMS	Amplification refractory mutations system
ASPCR	Allele-specific PCR
ATP	Adenosín trifosfato
CE	Concentrado emulsionable
¹⁴C-DM	Diclofop-metil
CHDs	Ciclohexanodionas
CIPF	Convención Internacional de Protección Fitosanitaria
Cit P₄₅₀	Citocromo P ₄₅₀
CT	Carboxil-transferasa
CTAB	Hexadecyltrimethylammonium bromide
DGSV	Dirección General de Sanidad Vegetal
DHP	Dihidropterato sintetasa
DM	Diclofop
DTT	Ditiotreitól
ED₅₀	Dosis de herbicida capaz de reducir en un 50% el peso fresco de las plantas frente al control
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EPSPS	Enolpiruvato-sikimato fosfato sintasa
FAD	Flavin adenin dinucleótido
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
GS	Glutamino sintetasa
HDT	Horas después del tratamiento
HET-PP	Hidroxietil-TPP
4-HPPD	4-hidroxifenil-piruvato-dioxigenasa
HRAC	Herbicide Resistance Action Committee
I₅₀	Dosis de herbicida capaz de reducir en un 50% la actividad enzimática

HRAC	Herbicide resistance action committee
ISO	Organización Internacional para la Estandarización
LD₅₀	Dosis letal media
LE	Líquido emulsionable
m.a.	Materia activa
MIP	Manejo integrado de plagas
NADP	Forma oxidada de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH	Forma reducida de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NIMF	Norma Internacional de Medidas Fitosanitarias
PCR	Polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
PDS	Fitoeno desaturasa
pH	Potencial de Hidrógeno
PM	Peso molecular
POST	Postemergentes
PPO	Protoporfirinógeno oxidasa
PRE	Preemergentes
PSI	Fotosistema I
PSII	Fotosistema II
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
PXD_s	Fenilpirazolinás
TAE 1X	40 mm Tris-acetato; 10 mm EDTA
TGs	Triglicéridos
TLC	Thin layer chromatography (cromatografía de capa fina)
TP	Triazolopirimidinas
TPP	Tiamina pirofosfato
VLCFAs	Ácidos grasos de cadena muy larga
VMP	Virus del mosaico del pepino
WSSA	Sociedad Americana de la Ciencia de la Maleza

Resumen

Las malas hierbas constituyen una de las principales limitantes bióticas para el óptimo desarrollo de los cultivos agrícolas. Aunque el uso de herbicidas ha permitido el desarrollo de la agricultura moderna, en la actualidad la resistencia a herbicidas es un desafío que debe ser enfrentado desde varios enfoques. A nivel mundial se reportan 388 biotipos correspondientes a 209 especies. Los biotipos resistentes incluyen a la mayoría de los grupos de herbicidas, siendo los más numerosos aquellos resistentes a los herbicidas inhibidores de la ALS, del fotosistema II y de la ACCasa.

En México, existen siete biotipos resistentes en cinco especies de la familia Poaceae, tres biotipos de *Avena fatua*, un biotipo de *P. paradoxa* y un biotipo de *P. minor* resistentes a los inhibidores de la ACCasa, un biotipo de *Sorghum halepense* resistente a inhibidores de la ALS y un biotipo de *Leptochloa virgata* resistente a glicinas.

Este trabajo se desarrolló con el fin de aportar conocimientos enfocados a solventar la problemática agronómica y económica generada por la resistencia a herbicidas de *Phalaris minor*.

La investigación arrojó como resultados que en México se encuentran presentes seis especies del género *Phalaris*: *P. canariensis*, *P. minor*, *P. paradoxa*, *P. caroliniana*, *P. arundinacea* y *P. brachystachys*. De las especies presentes en México, *P. canariensis*, *P. minor*, *P. paradoxa*, *P. arundinacea* y *P. brachystachys* son malezas invasoras. Se establecieron las distribuciones actuales y potenciales de *P. paradoxa* y *P. minor*. Finalmente, se elaboró una descripción botánica de *P. minor*.

Los ensayos de dosis-respuesta realizados confirmaron el carácter resistente de *P. minor* de México a los inhibidores de la ACCasa. Los factores de resistencia (FR) obtenidos mediante el cociente ED_{50R}/ED_{50S} para los herbicidas evaluados fueron: diclofop-metil (9,79), fenoxaprop-p-etil (13,96), cihalofop-butil (17,49), propaquizafop (17,55), tralkoxidim (2,07), cletodim (5,17), cicloxidim (11,87).

No se observaron diferencias significativas entre el biotipo R y S en los ensayos *in vitro* de absorción y translocación de ^{14}C -diclofop-metil.

Los metabolitos obtenidos mediante cromatografía en placa fina mostraron que la concentración de diclofop-ácido fue 3,6 veces mayor en el biotipo S (75,87) que en el biotipo R (21,32) de *P. minor* a las 72 HDT, mientras que la concentración de conjugados

no tóxicos fue de S (14,80) y R (67,46); es decir, en el biotipo R hay aproximadamente 4,6 veces más conjugados no tóxicos que en el S.

La preincubación en ABT redujo la concentración de conjugados no tóxicos en el biotipo resistente. Se obtuvieron valores de R-ABT (61,32) y R+ABT (15,68) lo que confirma que el CitP₄₅₀ está involucrado en el metabolismo de diclofop-metil.

En cuanto la actividad ACCasa, los ensayos *in vitro* mostraron diferencias marcadas entre los biotipos R y S. Los valores de FR (I_{50R}/I_{50S}) fueron: diclofop-metil (4,3) cihalofop-butil (6,2), fenoxaprop-etil (8,4), setoxidim (2,3) y tepraloxidim (8,4).

La secuencia del dominio CT del gen ACCasa de plantas de *P. minor* reveló que en el biotipo R existe un cambio de nucleótido que da lugar a una sustitución de serina por glicina en la posición 2079. Esto confirma la mutación en el sitio de acción (ACCasa) como mecanismo de resistencia a este grupo de herbicidas

Summary

Weeds constitute one of the main biotic limitations in the optimal growth of agricultural crops. Although the use of herbicides has permitted the development of modern agriculture, currently, resistance to herbicides is a challenge which has to be faced from several focuses. At a world level, 388 biotypes corresponding to 209 species have been reported. The resistant biotypes include most of the herbicide groups, the most numerous ones being those resistant to ALS-, photosystem II- and ACCase-inhibiting herbicides.

In Mexico, there are seven resistant biotypes in five species of the Poaceae family. Three biotypes of *Avena fatua*, one biotype of *P. paradoxa* and one biotype of *P. minor* are all resistant to ACCase inhibitors, one biotype of *Sorghum halepense* is resistant to ALS inhibitors, and one biotype of *Leptochloa virgata* is resistant to glycines.

This work has been carried out with the aim of supplying knowledge targeted towards solving agronomic and economic problems generated by the resistance to herbicides of *Phalaris minor*.

The research gave results showing that in Mexico six species of the genus *Phalaris*: *P. canariensis*, *P. minor*, *P. paradoxa*, *P. caroliniana*, *P. arundinacea* and *P. Brachystachys* are present. Of these species, *P. canariensis*, *P. minor*, *P. paradoxa*, *P. arundinacea* and *P. brachystachys* are invasive weeds. The current and potential distributions of *P. paradoxa* and *P. minor* were established. Finally, a botanical description of *P. minor* was made.

The dose-response assays carried out confirmed the resistant nature of *P. minor* in Mexico to ACCase inhibitors. The resistance factors (RF) obtained by the quotient ED_{50R}/ED_{50S} for the herbicides evaluated were: diclofop-methyl (9.79), fenoxaprop-p-ethyl (13.96), cihalofop-butyl (17.49), propaquizafop (17.55), tralkoxydim (2.07), clethodim (5.17), cycloxydim (11.87).

No significant differences were observed between the R and S biotypes in the *in vitro* assays of absorption and translocation of ^{14}C -diclofop-methyl.

The metabolites obtained by thin layer chromatography showed that the concentration of diclofop acid was 3.6 times higher in the S biotype (75.87) than in the R one (21.32) of *P. minor* at 72 HDT. However, the concentration of non toxic conjugates was of S (14.80) and R (67.46; i.e. in the R biotype there were approximately 4.6 times more non toxic

conjugates than in the S one.

Pre-incubation in ABT reduced the concentration of non toxic conjugates in the resistant biotype. Values of R-ABT (61.32) and R+ABT (15.68) were obtained of non toxic conjugates, which confirms that CitP₄₅₀ is implicated in the metabolism of diclofop-methyl.

With regard to the ACCase activity, the *in vitro* assays exhibited marked differences between the R and S biotypes. The values of FR (I₅₀R/I₅₀S) were: diclofop-methyl (4.3) cihalofop-butyl (6.2), fenoxaprop-ethyl (8.4), sethoxydim (2.3) and tepraloxym (8.4).

The sequence of the CT domain of the ACCase gene in *P. minor* plants revealed that, in the R biotype, there was a change of nucleotide, which gave rise to a substitution of serine for glycine at position 2079. This confirms the mutation at the action site (ACCase) as a mechanism of resistance to this group of herbicides.

Capítulo I

Introducción general

1. Malas hierbas

1.1. Importancia y definición

La Malherbología es la ciencia que estudia la biología, ecología y manejo de malas hierbas o maleza. De acuerdo a la mayor parte de la literatura, se puede definir a la maleza como “una planta que crece en un momento y en un lugar no deseado”. En el presente escrito se emplearán de manera indistinta los términos maleza y mala hierba. Mientras que el término planta arvense, se usará para referirse a aquella vegetación asociada a un agroecosistema y que no es el cultivo de interés.

Las malezas ocasionan pérdidas directas a la producción agrícola con variaciones regionales muy grandes. En México, estas pérdidas son difíciles de estimar, debido a la falta de estadísticas, sin embargo, se acepta que es uno de los principales factores que reducen el rendimiento agrícola. Ante la FAO, la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) menciona que se pueden observar pérdidas de un 50% del rendimiento en algunas zonas de México (Cotero, 1997). Los daños que causan las malezas son muy variados y pueden ser directos o indirectos. En la Tabla 1.1 se ofrece un resumen de estos tipos de daños (Liebman *et al.*, 2001).

Al observar la amplia gama de daños que pueden causar las malas hierbas, es de sorprender que menos de 250 especies vegetales sean suficientemente problemáticas para considerarlas como malezas. Esto representa aproximadamente 0.1% de la flora mundial. (Cobb, 1992)

Sin embargo, cabe señalar que la flora arvense mexicana también se utiliza como fuente medicinal y alimenticia. Por ejemplo, son arvenses cerca del 45% de las plantas medicinales que se colectan en el oriente del Estado de México, lo mismo que el 29% de las especies comestibles de los bosques tropicales deciduos de Puebla y Guerrero. Algunas de las especies actualmente consideradas como maleza tuvieron algún uso en la época prehispánica. Tal es el caso de la chaya, los quelites, el mirasol, los quintoniles, la alegría, la malva y el toloache (SEMARNAT, 2001).

2. Origen de las malas hierbas

2.1. Ecológico

Las plantas arvenses prosperan en los sistemas ecológicos antropógenos conocidos como agroecosistemas. Éstos son sistemas fotosintéticos creados por el hombre, en los

que se busca aumentar su productividad neta mediante el aumento de la tasa fotosintética de los cultivos, la disminución del nivel de pérdida por respiración y la canalización de asimilados hacia los órganos de almacenamiento de la planta que tengan importancia económica para el hombre.

2.2. Taxonómico

Prácticamente cualquier planta puede comportarse como maleza. Por ejemplo, las algas, especialmente cuando la contaminación incrementa la disponibilidad de nitrógeno y fósforo, son importantes malezas acuáticas. Los musgos y las hepáticas pueden comportarse como maleza en invernaderos. Las colas de caballo *Equisetum* spp. (Artrófito), cuya propagación vegetativa es muy exitosa, se comportan como arvenses o ruderales en canales de riego. Dentro de los helechos (Pteridofita), *Pteridium aquilinum* de distribución casi cosmopolita es una maleza alelopática sumamente agresiva. Dentro de las gimnospermas, *Pinus radiata* fue introducido desde California a Nueva Zelanda en donde se reporta como maleza. Sin embargo, dentro de las angiospermas se encuentra la inmensa mayoría de los taxa de maleza (Baker, 1974).

Un aspecto interesante es que 12 cultivos pertenecientes a cinco familias botánicas aportan el 75% del alimento mundial, y a esas mismas cinco familias pertenecen muchas de las peores malezas. Esto implica que nuestros principales cultivos y malezas comparten características taxonómicas y probablemente un origen común (Cobb, 1992).

2.3. Geográfico

Desde el descubrimiento de América se inició un movimiento de plantas americanas cultivadas hacia el Viejo Mundo, y hay evidencia de que el número de malezas trasladadas a Europa fue mayor que el de las trasladadas a América. En tiempos recientes, el flujo neto ha sido invertido tanto en regiones templadas como en los trópicos, debido al transporte de animales domésticos de pastoreo desde Europa y África a las áreas de pastoreo extensivo de América, o bien, debido a que algunas plantas cultivadas “escapan” al cultivo y se convierten en maleza (Baker, 1974).

La mayoría de la flora arvense de México es nativa del país. Noventa y tres especies (56% de las cuales son nativas) tienen importancia agronómica, destacando por su diversidad las familias botánicas Asteraceae, Poaceae, Amaranthaceae y Fabaceae (SEMARNAT, 2001). Por otro lado, la familia Poaceae es la más abundante en cuanto a número de especies exóticas en México. A esta familia pertenece el 27.7% de la flora

exótica del país, y muchas de sus especies se comportan como maleza (Villaseñor *et al.*, 2004).

Tabla 1.1. Razones por las cuales llamar maleza a una planta. Modificado a partir de Liebman *et al.* (2001).

Justificación	Mecanismos	Ejemplos
Reducen el rendimiento de los cultivos	Interfieren con la planta por la obtención de recursos como agua, luz y nutrientes.	<i>Avena fatua</i> y <i>Galium aparine</i> en cereales y <i>Poa annua</i> en pastizales.
Reducen la calidad de las cosechas	Contaminación de semillas para siembra y otros productos de cosecha.	<i>Sinapis arvensis</i> en canola, bayas de <i>Solanum nigrum</i> en chícharo.
Retrasan la cosecha	La conservación de la humedad puede retrasar la maduración e incrementar los niveles de humedad del cultivo cuando éste es cosechado.	<i>Sorghum halepense</i> en trigo.
Interfieren con la cosecha	Las plantas trepadoras, pueden dificultar las operaciones de cosecha. Las malezas tardías de crecimiento vigoroso, pueden interferir con la cosecha de papas y camote.	<i>Sycios deppei</i> en maíz. <i>Chenopodium album</i>
Interfieren con la alimentación animal	Las plantas espinosas inhiben la alimentación animal.	<i>Cirsium arvense</i>
Causan envenenamiento		<i>Senecio jacobaea</i> <i>Digitalis purpurea</i> <i>Rhododendron ponticum</i>
Contaminan los productos animales	Les confiere sabores desagradables.	<i>Allium ursinum</i> <i>Ranunculus</i> spp.
Pueden comportarse como parásitas		<i>Cuscuta</i> spp.
Reducen la sanidad de los cultivos	Funcionan como hospedantes alternos o reservorios de plagas y enfermedades de cultivo. Al aumentar la humedad relativa del microambiente pueden elevar la incidencia y severidad de algunas enfermedades.	<i>Oxalis</i> spp. es hospedante alternativo de <i>Puccinia sorghi</i> , que provoca la roya del maíz. El chayotillo es hospedante del VMP (virus del mosaico del pepino).
Reducen la salud de animales y humanos	Actúan como hospedantes intermediarios o vehículos para la ingestión de parásitos. Provocan fotosensibilidad o efectos teratogénicos.	Pastos <i>Hypericum perforatum</i> <i>Pteridium aquilinum</i>
Son una amenaza para la seguridad	Reducen la visibilidad en los caminos. Son un riesgo de incendio debajo de las líneas eléctricas.	Plantas altas. Cualquier planta, pero especialmente los arbustos.
Reducen la calidad de la lana	Semillas ganchudas reducen el valor de la lana y el vellón.	<i>Bidens</i> spp.
Impiden el adecuado flujo de agua	Masas de plantas bloquean canales y drenes.	<i>Elodea canadensis</i>
Algunas son alelopáticas	Liberan sustancias tóxicas para plantas de cultivo.	Se presentan sobre todo en zonas tropicales.
Impacto sobre el establecimiento del cultivo	La vegetación impide el establecimiento de árboles jóvenes.	

2.4. Características de la maleza ideal

Baker (1974) en su ya clásica obra dedicada a estudiar la evolución de las malezas, enlista las características que tendría una hipotética “maleza ideal”. Estas son:

- Requerimientos de germinación satisfechos en muchos ambientes.
- Germinación discontinua (controlada internamente) y una gran longevidad de la semilla.
- Rápido crecimiento desde la fase vegetativa hasta la floración.
- Producción continua de semilla en tanto que las condiciones de crecimiento lo permitan.
- Autocompatible, pero no completamente autógena o apomíctica.
- Cuando son de polinización cruzada, no requiere de polinizadores especializados, o bien son anemófilas.
- Alta producción de semilla bajo condiciones ambientales favorables.
- Producción de semilla en un amplio rango de condiciones ambientales (tolerante y plástica).
- Tiene adaptaciones para la dispersión a cortas y largas distancias.
- Si es perenne, tiene una reproducción vegetativa vigorosa o regeneración a partir de fragmentos.
- Si es perenne, es frágil, por lo que no es fácilmente arrancada del suelo.
- Tiene habilidad para competir interespecíficamente por medios especiales (crecimiento arrosado, sofocante o presenta aleloquímicos).

El estudio de la biología y ecología de malezas, así como su correcta identificación taxonómica constituyen componentes imprescindibles en cualquier estudio malherbológico. Por esta razón, la caracterización de la especie de estudio es considerada una fase fundamental en este trabajo.

3. Métodos de control de las malas hierbas

La clasificación de los métodos de control puede variar dependiendo del autor consultado. De manera sintética, se pueden dividir en dos grandes grupos: los métodos no químicos y los métodos químicos. Dentro de los primeros se pueden incluir a manera de ejemplo:

Físicos: son todos los métodos que cortan, entierran, cubren y queman la vegetación indeseada.

Culturales: selección del cultivo, densidad óptima de siembra, espaciamento entre líneas y entre plantas, sistema de riego.

Preventivos: utilización de propágulos de cultivo libres de semillas de malas hierbas, limpieza de utensilios de labranza, rotación de cultivos, etc.

Biológicos: uso de enemigos naturales que mantienen la densidad de la población de malezas por debajo del nivel de daño permitido en los cultivos. Este método de control se puede implementar mediante el uso de patógenos y depredadores que son liberados en diversas ocasiones, se establecen y se monitorean. También se puede hacer mediante el uso de micoherbicidas con conidias de hongos patógenos de maleza obtenidos mediante cultivos artificiales. Se aplican como cualquier herbicida y es necesaria la aplicación reiterada de los mismos.

Por otra parte, el control químico se basa en el uso de herbicidas. Es actualmente el más usado en agricultura intensiva. Tiene la innegable ventaja de su eficacia, rapidez, selectividad y costo. No obstante, también presenta desventajas, como el desarrollo de biotipos resistentes y el deterioro ambiental.

En el año 1959, Stern y colaboradores acuñaron el término de “control integral”, definiéndolo como la combinación e integración del control biológico y el control químico. Estos autores también introdujeron los términos de daño económico y umbral económico. Más tarde, Smith y Van den Bosch en 1967 introdujeron el término “manejo integrado de plagas” como un concepto que integra todas las estrategias de control aplicando principios ecológicos al control de plagas en sistemas de producción. Por último, la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos de América (NAS por sus siglas en inglés), enfatizó la necesidad del enfoque de análisis de sistemas y el uso de modelos matemáticos por computadora. Poco a poco el concepto se fue afinando, incluyendo conceptos de sustentabilidad. Actualmente, el manejo integrado de malezas reconoce la necesidad de un profundo conocimiento de la biología y ecología de la maleza, al tiempo que enfatiza la integración de múltiples medidas de control (Sanyal *et al.*, 2008).

4. Control químico de maleza: herbicidas

4.1. Generalidades

Un herbicida es un producto químico que inhibe o interrumpe el crecimiento y desarrollo de una planta. Los herbicidas se usan extensivamente en la agricultura, la industria y en zonas urbanas. Si son utilizados adecuadamente, proporcionan un control eficiente de maleza a un bajo costo (Kansas State University, 2012). No obstante, si no se aplican

correctamente, pueden causar daños a las plantas cultivadas, al medio ambiente e incluso a las personas que los aplican. En la agricultura, los herbicidas han sido una herramienta importante para el manejo de maleza por muchos años. Desde la década de los años cuarenta, los herbicidas han sido cada vez más sofisticados en cuanto al espectro y duración del periodo de control. Aunque los herbicidas son aplicados extensivamente, son probablemente el componente menos entendido de un sistema de manejo integrado de maleza (Baumann *et al.*, 1998).

4.1.1. Nomenclatura

En la etiqueta de un herbicida se incluyen tres nombres: el nombre químico, el nombre común y el nombre comercial. Por ejemplo, el herbicida vendido con el nombre comercial de Gesaprim tiene el nombre común de atrazina y el nombre químico 6-cloro-N-etil-N'-(1-metiletil)-1,3,5, triazina-2,4-diamina. El nombre comercial es usado por la empresa de agroquímicos para promocionar la venta de su marca específica y comúnmente es el nombre más conocido de un herbicida. El nombre común es el nombre genérico dado al ingrediente activo y está aprobado por autoridades apropiadas, como la Sociedad Americana de la Ciencia de la Maleza (WSSA) y la Organización Internacional para la Estandarización (ISO). El nombre químico describe la estructura química del compuesto herbicida (Caseley, 1996).

Las compañías de agroquímicos obtienen una patente para su herbicida antes de su introducción al mercado. La compañía que desarrolló el producto tiene el uso exclusivo del mismo durante los 17 años que siguen a la aprobación de la patente. Después de que expira esta patente, otras compañías pueden producir y comercializar el herbicida; sin embargo, deben utilizar un nombre comercial diferente. Además existen herbicidas comerciales formulados como una mezcla de dos o más ingredientes activos, por lo que es importante conocer los nombres comunes de los herbicidas (Rosales y Esqueda, 2011).

Los herbicidas se comercializan en formulaciones líquidas o sólidas, dependiendo de la solubilidad en agua del ingrediente activo y de su forma de aplicación. La formulación se indica en la etiqueta del producto y se designa por una o varias letras después del nombre comercial. En la etiqueta del herbicida también se indica la concentración de ingrediente activo en porcentaje y/o en gramos por litro o kilogramo del producto comercial.

4.1.2. Clasificación de los herbicidas

Los herbicidas pueden ser clasificados de acuerdo a varios criterios, siendo los más comúnmente usados: época de aplicación, selectividad, tipo de movilidad en la planta, familia química y modo y mecanismo de acción (Tabla 1.2.).

Tabla 1.2. Clasificación de herbicidas.

Época de aplicación	Preemergentes Postemergentes Presiembra
Selectividad	Selectivos No selectivos
Movilidad en la planta	De contacto Sistémicos
Familia química	25 familias químicas
Modo de acción	Siete modos de acción
Mecanismos de acción	24 mecanismos de acción

4.1.2.1. Época de aplicación

De acuerdo a su época de aplicación, los herbicidas pueden clasificarse en forma general como preemergentes (PRE) y postemergentes (POST). Por lo general, los herbicidas PRE se aplican después de la siembra, pero antes de que emerjan la maleza y el cultivo. Los herbicidas PRE requieren de un riego o precipitación para situarse en los primeros 5 cm de profundidad del suelo, donde germina la mayoría de las semillas de maleza. Este tipo de herbicidas elimina las malas hierbas en germinación o recién emergidas, lo que evita la competencia temprana con el cultivo. Por lo general, la semilla de los cultivos se coloca por debajo de la zona de suelo con alta concentración de herbicida, y la selectividad al cultivo puede ser tanto posicional como fisiológica. Los herbicidas PRE presentan una gran interacción con algunas características del suelo, como la textura, el pH y la materia orgánica, que pueden afectar la cantidad de herbicida disponible en el suelo para controlar la maleza. Generalmente la dosis de este tipo de herbicidas se ajusta según el tipo de suelo y materia orgánica, requiriéndose una mayor dosis en suelos arcillosos y con alto contenido de materia orgánica.

Los herbicidas POST se aplican después de la emergencia del cultivo y la maleza. En la mayoría de los casos, la aplicación de herbicidas POST debe realizarse sobre malezas en

sus primeros estados de desarrollo, cuando son más susceptibles a los herbicidas y su competencia con el cultivo es mínima. Los herbicidas POST pueden resultar más económicos para el productor al utilizarse sólo donde se presenta la maleza. La actividad de los herbicidas POST depende de factores como su grupo químico, especies de maleza presentes y condiciones de clima, como velocidad del viento, temperatura del aire, humedad relativa y presencia de lluvia (Buhler, 1998).

4.1.2.2. Selectividad

De acuerdo a su espectro de fitotoxicidad, los herbicidas pueden ser clasificados como selectivos y no selectivos. Los selectivos son herbicidas que a ciertas dosis, formas y épocas de aplicación eliminan a algunas plantas sin dañar significativamente a otras. Por ejemplo, atrazina es un herbicida selectivo en maíz y sorgo. Los herbicidas no selectivos son aquellos herbicidas que ejercen su toxicidad sobre toda clase de vegetación y deben utilizarse en terrenos sin cultivo o bien, evitando el contacto con las plantas cultivadas. El glifosato es un ejemplo de herbicida no selectivo (Caseley, 1996).

4.1.2.3. Movilidad en la planta

Por su movilidad en la planta, los herbicidas pueden ser de contacto o sistémicos. Los herbicidas de contacto son aquellos que eliminan sólo las partes de la planta con las que entran en contacto al momento de la aplicación, y tienen un transporte limitado dentro de la planta. Es por esto que se recomiendan para el control de maleza anual. Por su parte, los herbicidas sistémicos son aquellos se aplican al suelo o al follaje y son absorbidos y transportados a toda la planta incluyendo sus raíces y otros órganos subterráneos. Debido a lo anterior, los herbicidas sistémicos son utilizados para el control de maleza perenne (Ross y Lembi, 1985).

4.1.2.4. Familia química

Esta clasificación se basa en la estructura química de los diferentes compuestos usados como herbicidas. Los herbicidas dentro de una familia química tienen propiedades químicas similares, y generalmente tienen el mismo modo de acción (Retzinger y Mallory-Smith, 1997). Algunos ejemplos de las principales familias químicas de herbicidas son: las triazinas, las dinitroanilinas, los fenoxiacéticos, las cloroacetamidas, las ciclohexanodionas, las sulfonilureas y los bipiridilos (Hance y Holly, 1990). En los Estados Unidos de América, en la actualidad existen alrededor de 200 ingredientes activos que se utilizan en la fabricación de aproximadamente 800 herbicidas comerciales (Vencill, 2002). En México existen 65 ingredientes activos en alrededor de 300 herbicidas comerciales (Anónimo, 2007).

4.1.2.5. Modo de acción

La clasificación más útil de los herbicidas es por su modo de acción (Duke y Dayan, 2001; HRAC, 2012). El modo de acción es la secuencia de eventos que ocurren desde la absorción del herbicida hasta la muerte de la planta. Los herbicidas con el mismo modo de acción tienen el mismo comportamiento de absorción y transporte, y producen síntomas similares en las plantas tratadas (Gunsolus y Curran, 1996). Además, la clasificación de los herbicidas según su modo de acción permite predecir, en forma general, su espectro de control de maleza, época de aplicación, selectividad a cultivos y persistencia en el suelo. Ashton y Craft (1981) y Cobb y Reade (2010), distinguen siete grandes grupos, dentro de los cuales a su vez se incluyen uno o más mecanismos de acción (Ver Figura 1.1).

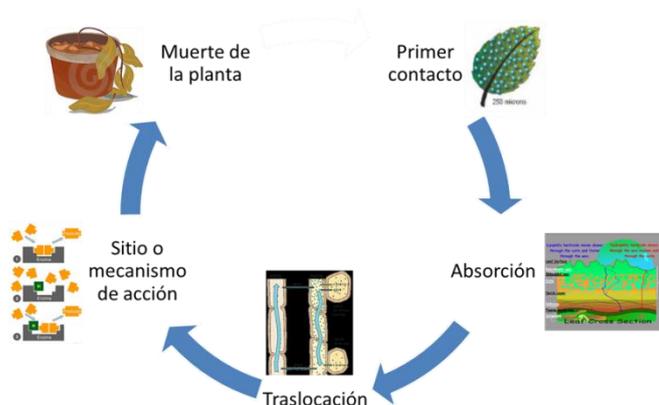


Figura 1.1. Representación esquemática del modo de acción de un herbicida.

4.1.2.6. Mecanismo de acción

El mecanismo de acción de un herbicida, se define como la principal reacción bioquímica o biofísica que es afectada por el herbicida para dañar a la planta tratada. Como se puede observar en la Figura 1.1, el modo de acción incluye al mecanismo de acción. El mecanismo de acción comúnmente incluye el bloqueo de algún proceso enzimático vital para la planta. Los herbicidas pueden funcionar de diferentes maneras en la planta, interfiriendo con algún proceso esencial para su correcto crecimiento y desarrollo de la planta. Los herbicidas pueden ser clasificados por su mecanismo de acción, con base en los síntomas provocados por éstos en las plantas tratadas.

La Sociedad Americana de la Ciencia de la Maleza (WSSA) ha desarrollado un sistema de clasificación numérico, mientras que la clasificación del Comité de Acción Contra la Resistencia a Herbicidas (HRAC) se basa en letras. Diversos autores también han

propuesto clasificaciones de herbicidas según su modo y mecanismo de acción. Sin embargo, de algunos no se tiene la suficiente información, mientras que otros tienen un mecanismo de acción que dificulta su inclusión dentro de un grupo. Cada una de estas clasificaciones es diferente, y no siempre coinciden los criterios. Con base en varios autores, se propone la clasificación que se presenta en la Tabla 1.3.

Tabla 1.3. Herbicidas. Modos y mecanismos de acción más comunes.

Modo de acción	Mecanismo o sitio de acción
Fotosíntesis	Fotosistema I
	Fotosistema II
Síntesis de pigmentos	Fitoeno desaturasa
	Deoxi-xilulosa-5-fosfato sintasa
	Hidroxifenilpiruvato dioxigenasa
	Protoporfirinógeno oxidasa
Auxínicos	Auxinas sintéticas
	Transporte de auxinas
Biosíntesis de lípidos	Síntesis de ácidos grasos a nivel de ACCasa
	Formación de ácidos grasos de cadena muy larga
Biosíntesis de aminoácidos	5-enolpiruvil shikimato 3-fosfato sintasa
	Acetato lactato sintasa
	Glutamino sintetasa
División celular	Síntesis de tubulina y de la organización de los microtúbulos
	Síntesis de celulosa
Otros	Dihidropteroato sintetasa
	Proteína fosfatasa

4.1.2.6.1. Fotosíntesis

4.1.2.6.1.1. Inhibidores del fotosistema II

En el grupo de los herbicidas inhibidores de la fotosíntesis se encuentran algunos de los herbicidas con más tiempo en el mercado. El rompimiento de la molécula de agua para producir O₂ por el fotosistema II (PSII) es el primer paso de la fotosíntesis. Este proceso genera poder reductor en forma de electrones provenientes del rompimiento de la molécula de agua. Para producir ATP y una forma reducida de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), los electrones son conducidos por la cadena de transporte de electrones, la cual está compuesta por varias proteínas a las que se asocian pequeñas moléculas redox. La proteína D1 del fotosistema II es parte de este complejo de transporte electrónico. El sitio Q_B unido a la proteína D1 normalmente se liga con la plastoquinona, la cual es reducida por un electrón proveniente del agua antes de oxidarse por movimiento de ese electrón al siguiente paso. Todos los herbicidas que

inhiben la fotosíntesis a nivel del citocromo Q_B de la proteína D1, detienen el transporte electrónico fotosintético.

La interrupción del transporte de electrones en D1 lleva a muchas disfunciones celulares, incluyendo la rápida suspensión de la fijación de CO_2 , la inhibición del movimiento de D1, la acumulación de nitritos tóxicos en el cloroplasto, la pérdida del ascorbato y los carotenoides que protegen al cloroplasto del daño oxidativo y la pérdida de clorofila. Un efecto inmediato y fácilmente medible, es un incremento en la fluorescencia de la clorofila. En un periodo de uno a dos días después del tratamiento, el cloroplasto ha perdido todos los componentes del aparato fotosintético y los lípidos de la membrana han sido peroxidados hasta un punto no reversible. En condiciones de alta iluminación, las hojas tratadas generalmente se marchitan en unas pocas horas y se secan tomando un color de marrón a marrón oscuro después de algunos pocos días. Cuando la luz no es muy intensa el proceso es más lento e involucra la falta de pigmentación de la hoja, que ocasionalmente adquiere un color blanco necrótico. (Cobb y Reade, 2010; Duke y Dayan, 2011).

Los herbicidas inhibidores del fotosistema II incluyen a las ureas, las triazinas, las amidas y los hidroxibenzonitrilos. Todos los herbicidas que inhiben el fotosistema II se usan en dosis relativamente altas, debido a las altas cantidades de D1 en los tejidos de las plantas verdes. Así mismo, todos los herbicidas inhibidores del fotosistema II son selectivos, y existen ejemplos de herbicidas tanto de aplicación al suelo como de aplicación al follaje. El mecanismo de selectividad consiste en una detoxificación metabólica.

La resistencia a inhibidores del fotosistema II es una de las más comunes; en la actualidad, se han reportado con 69 biotipos de malezas con resistencia a triazinas, 22 a ureas sustituidas y cuatro a nitrilos (WSSA, 2012). En la mayoría de los casos, la resistencia se debe a cambios en los residuos de aminoácidos de D1, lo que provoca una reducida afinidad del herbicida al sitio Q_B (Duke y Dayan, 2011).

4.1.2.6.1.2. Desviadores de electrones en el fotosistema I

El fotosistema I (PSI) de la fotosíntesis provee poder reductor para reducir NADP a NADPH, el cual se requiere para la fijación de carbono y otros procesos biosintéticos. Los herbicidas no selectivos que actúan en el PSI son los de más rápida acción en aplicaciones foliares. En sólo una hora bajo condiciones de iluminación, provocan un marchitamiento severo, seguido de necrosis. Estos efectos son tan rápidos, que el herbicida no tiene tiempo de ser trasladado a los tejidos que no fueron tocados por el

caldo de aspersión. Cuando son aplicados simultáneamente con herbicidas que inhiben el PSII, los síntomas se retrasan.

Dado que su actividad depende del O₂, tanto el paraquat como el diquat son tóxicos para mamíferos, debido a que pueden ser reducidos a radicales reactivos en células animales, donde generan especies de oxígeno reactivo en los tejidos respiratorios. Sin embargo, ambos compuestos son inactivados por el suelo y tienen una vida media muy corta en el ambiente (Duke y Dayan, 2011). El paraquat es conocido desde 1930 como metil viológeno, y usado como un indicador de reacciones redox, pero no fue utilizado como herbicida hasta mediados de la década de los cincuenta (Cobb y Reade, 2010).

Veinticinco especies de maleza han desarrollado resistencia a paraquat, incluyendo dicotiledóneas y monocotiledóneas, lo cual es sorprendente, dado que la presión de selección para resistencia es de vida corta (WSSA, 2012). Las plantas que tienen resistencia transgénica a paraquat tienen una sobreexpresión de genes que codifican para enzimas que detoxifican de especies de oxígeno reactivo, así como otros genes que facilitan el secuestro molecular. Es poco probable que cultivos con estas modificaciones lleguen a ser comercializados, dada la alta toxicidad de paraquat para organismos no objetivo.

4.1.2.6.2. Síntesis de pigmentos

4.1.2.6.2.1. Fitoeno desaturasa

La fitoeno desaturasa (PDS) es necesaria para la producción de carotenoides, los cuales se requieren para la estabilización de la membrana cloroplástica y como “quenching” de las especies de oxígeno reactivo en el cloroplasto. Las plantas sin carotenoides no acumulan clorofila en condiciones de luz, ocasionando tejidos blancos e incapacidad de realizar la fotosíntesis. Los síntomas causados por todos los inhibidores de la PDS consisten en la producción de tejidos blancos, eventualmente seguida de necrosis. Existen varios herbicidas que inhiben esta enzima, entre los que se encuentran norflurazón, fluridona, flurtamona y diflufenican. Estos productos se utilizan principalmente en preemergencia o postemergencia temprana, dado que trabajan mejor sobre las plántulas de maleza en desarrollo. Muy pocas malezas han desarrollado resistencia a inhibidores de la PDS, tal vez debido a la necesidad de dos pares de bases para generar una sustitución aminoacídica que genere resistencia. Sin embargo, *Hydrilla verticillata* requirió sólo el cambio de un par de bases para desarrollar resistencia. La escasez de malezas resistentes a este tipo de herbicidas, podría sugerir que son buenos candidatos para el desarrollo de cultivos resistentes (Duke y Dayan, 2011).

4.1.2.6.2.2. Deoxilulosa 5-fosfato sintasa

La ruta de los carotenoides a partir de terpenoides es específica del plástido, y no inicia con ácido mevalónico, como sucede en la ruta de terpenoides en el citosol. Tanto la ruta plastídica como la citosólica producen isopentenil pirofosfato (isopreno), el cual es el monómero de cinco carbonos necesario para la formación de terpenoides. Esta ruta no mevalónica o ruta del metil eritritol-fosfato, fue descubierta recientemente, por lo que el modo de acción del herbicida clomazone hubiera sido imposible de entender antes de este descubrimiento. El problema de encontrar el sitio de acción del clomazone fue particularmente difícil de resolver, por el hecho de que es un proherbicida, que requiere la conversión metabólica a 5-quetoclomazone; la forma activa contra la enzima xilulosa 5 fosfato-sintasa, específica de la ruta terpenoide no mevalónica. El clomazone es el único herbicida comercial conocido con este sitio de acción, y sus síntomas son idénticos a los inhibidores de la PDS. Generalmente se usan como herbicidas preemergentes o incorporados al suelo. En algunos casos, dada su volatilidad, algunas plantas no objetivo pueden llegar a mostrar síntomas. Se han reportado cinco especies de maleza con resistencia a este grupo (Duke y Dayan, 2011).

4.1.2.6.2.3. Hidroxifenilpiruvato dioxigenasa

Existen tres clases químicas de herbicidas inhibidores de la enzima hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (HPPD), la cual es necesaria para la síntesis de plastoquinona (PQ) y de tocoferoles en plantas. Los herbicidas con este mecanismo de acción son los más recientemente introducidos al mercado (hace aproximadamente 20 años) e incluyen las familias químicas de las triquetonas, los isoxasoles y los benzopirazolios. Los isoxasoles son proherbicidas que deben ser convertidos metabólicamente a inhibidores de la HPPD. Estos herbicidas se utilizan a dosis bajas para el control pre y postemergente de malezas tanto de hoja ancha como angosta en maíz y arroz (Cobb y Reade, 2010; Duke y Dayan, 2011). Hasta el momento, no existen reportes de malezas que hayan desarrollado resistencia a estos herbicidas (WSSA, 2012).

4.1.2.6.2.4. Protoporfirinógeno oxidasa

Varias clases químicas de herbicidas inhiben la protoporfirinógeno 9 oxidasa (PPO), la cual es una enzima necesaria para la síntesis de porfirinas, que son pigmentos necesarios para la síntesis de clorofilas. Estos herbicidas causan un rápido quemado y necrosis, y también son llamados herbicidas peroxidantes debido a que provocan la peroxidación de especies reactivas de oxígeno (Cobb y Reade, 2010).

En esta clase se incluyen los difeniléteres, los oxadiazoles, las triazolinonas, las pirimidindionas y las N-fenil-ftalamidas. Todos estos compuestos poseen al menos dos anillos que les permiten unirse a la estructura de la PPO, la cual acepta dos anillos del sustrato protoporfirinógeno IX. La mayoría de los herbicidas de esta clase se aplican al follaje y otros pocos son aplicados al suelo (sulfentrazol). Las dosis de aplicación son sumamente bajas, obteniéndose un buen control con unos cuantos gramos por hectárea. La selectividad de estos herbicidas se basa en la degradación metabólica diferencial. En presencia de herbicidas inhibidores de la PPO, la concentración de protoporfirina se incrementa y empieza a acumularse en toda la célula. Si la planta es mantenida en la oscuridad o bajo luz muy tenue, los efectos del herbicida no son observados. En cambio, cuando la planta es expuesta a la luz solar directa, la protoporfirina acumulada en la célula es excitada a un estado triplete, interactuando entonces con el oxígeno molecular (O_2) para producir oxígeno excitado simple (1O_2), que es tóxico para las células. Los principales puntos de ataque del oxígeno excitado simple, incluyen los enlaces dobles de los ácidos grasos y los aminoácidos. Las membranas celulares son particularmente vulnerables a la peroxidación (Duke y Dayan, 2011). Sólo cuatro especies de maleza han desarrollado resistencia a inhibidores de la PPO (WSSA, 2012).

4.1.2.6.3. Auxínicos

4.1.2.6.3.1. Auxinas sintéticas

Los primeros herbicidas sintéticos fueron compuestos auxínicos que imitaban los efectos de dosis altas de ácido indolacético, una hormona vegetal natural que es necesaria para la elongación celular y el crecimiento, así como para la diferenciación de los meristemos florales y la dominancia apical. Versiones comerciales de estos compuestos incluyen los ácidos fenoxicarboxílicos (2,4-D), los ácidos benzoicos (dicamba), los ácidos carboxilquinólicos (quinclorac) y los ácidos piridincarboxílicos (picloram). Estos herbicidas son selectivos (matan únicamente dicotiledóneas), a excepción de los ácidos quinolincarboxílicos. Se aplican al follaje, y de ahí son translocados a toda la planta. A pesar de ser los herbicidas sintéticos más antiguos, su sitio de acción ha sido un misterio por más de 60 años (Duke y Dayan, 2011).

Los herbicidas auxínicos inicialmente provocan un rápido crecimiento, con el concomitante metabolismo elevado, caracterizado por enrollamiento de los tallos y las hojas y un rápido crecimiento longitudinal. Los pecíolos se doblan hacia abajo (epinastia) y se incrementa la síntesis de etileno y ácido abscísico. La primera fase es seguida por una inhibición del crecimiento y del metabolismo. Los altos niveles de (ABA) provocan el cierre estomático, lo cual inhibe la asimilación de CO_2 , provocando la formación de

especies de oxígeno reactivo. La fase final es la senescencia y la muerte celular. En síntesis, los herbicidas auxínicos impiden la regulación los procesos de crecimiento. Como se mencionó antes, los ácidos quinolincarboxílicos también controlan algunas malezas gramíneas. Los síntomas en éstas consisten en la detención del crecimiento, clorosis, marchitamiento y finalmente la muerte. Esto se debe a los altos niveles de cianidina acumulados por la estimulación de la síntesis de etileno (Duke y Dayan, 2011).

Aproximadamente 30 especies de malezas han desarrollado resistencia a herbicidas auxínicos (WSSA, 2012), pero no se conoce mucho acerca de los mecanismos de resistencia de la mayoría de éstas. El hecho es, que un número significativo de biotipos de malezas resistentes tienen resistencia múltiple a herbicidas no relacionados, lo cual sugiere que la degradación metabólica es un mecanismo de resistencia común. En laboratorio se han producido mutantes resistentes a herbicidas auxínicos, pero los fenotipos resultantes sugieren que no prosperarían adecuadamente en la naturaleza (Duke y Dayan, 2011).

Los cultivos con resistencia a 2,4-D que se han producido, utilizan una bioxigenasa bacteriana dependiente de alfa-quetoglutarato que es capaz de degradar tanto al 2,4-D, como a inhibidores de ACCasa con estructuras relacionadas. Esto ha sido aparentemente muy exitoso en varios cultivos, los cuales serán comercializados en un futuro próximo (Cobb y Reade, 2010; Duke y Dayan, 2011).

4.1.2.6.3.2. Inhibidores del transporte de auxinas

Para los procesos esenciales de crecimiento y desarrollo en las plantas, las auxinas deben de ser transportadas hacia los sitios donde la planta los necesita. El diflufenzopir y el naptalam son reportados como inhibidores del transporte de auxinas. Éstos se usaron inicialmente contra malezas de hoja ancha, pero también pueden controlar algunos pastos. El diflufenzopir aparentemente incrementa la actividad de algunos herbicidas auxínicos sobre algunas especies de maleza. Se cree que éstos tienen un sitio de unión en la membrana, que está involucrado en el movimiento intercelular de las auxinas. Ninguna maleza ha desarrollado resistencia a estos herbicidas, y en el caso del diflufenzopir, el mecanismo de tolerancia de los cultivos se basa en la rápida degradación metabólica. Hasta el momento no se han desarrollado cultivos resistentes a estos herbicidas (Duke y Dayan, 2011; Kansas State University, 2012).

4.1.2.6.4. Biosíntesis de lípidos

4.1.2.6.4.1. Acetil coenzima A carboxilasa

La primera enzima involucrada en la síntesis de ácidos grasos es la Acetil coenzima A carboxilasa (ACCasa). Las ciclohexanodionas (setoxidim) y los ariloxifenoxipropanoatos (diclofop-metil) son dos de los principales grupos que inhiben a esta enzima. Estos grupos son a veces llamados dim's y fop's, respectivamente. Recientemente, también se ha iniciado la comercialización de pinoxaden, un herbicida perteneciente al grupo de las fenilpirazolininas. El modo y mecanismo de acción de estos herbicidas se tratará con detalle en el Capítulo III.

4.1.2.6.4.2. Inhibición de elongasas formadoras de ácidos grasos de cadenas muy largas

Los ácidos grasos de cadenas muy largas (VLCFAs, por sus siglas en inglés), son importantes componentes del plasmalema. Son utilizados por las plantas para la síntesis de ceras, cutinas y suberinas que son necesarias para mantener la humedad en los tejidos y células vegetales, así como para mantener algunas sustancias fuera de la planta. Estos ácidos también se encuentran presentes en bajas concentraciones en las membranas plasmáticas (Cobb y Reade, 2010; Duke y Dayan, 2011).

Una reducción en la concentración de estos compuestos en las membranas celulares puede detener la división celular y el crecimiento. Los síntomas provocados por la aplicación de herbicidas inhibidores de las elongasas de VLCFAs, incluyen disminución del crecimiento y enchinamiento y enroscamiento de las hojas. Algunos cultivos y malezas son insensibles a esta clase de herbicidas, debido a su rápida detoxificación. Hay muchas clases de químicos que inhiben estas enzimas poco estudiadas, como las cloroacetanilidas, las tetrazolinonas, los tiocarbamatos y las oxiacetamidas. Estos herbicidas se aplican en dosis altas en preemergencia, para controlar tanto malezas de hoja ancha como pastos, aunque la actividad sobre estos últimos no suele ser muy fuerte (Duke y Dayan, 2011).

Sólo cinco especies de malezas han desarrollado resistencia a esta clase de herbicidas (WSSA, 2012). Los mecanismos de resistencia permanecen sin ser completamente esclarecidos (Cobb y Reade, 2010). A la fecha no existen cultivos genéticamente modificados con resistencia a estos herbicidas.

4.1.2.6.5. Inhibidores de la síntesis de aminoácidos

4.1.2.6.5.1. 5-enolpiruvil shikimato-3-fosfato sintasa

El glifosato (N-fosfometilglicina) es el herbicida más usado en el mundo, tanto por volumen, como por extensión de área tratada (Duke y Powles, 2008). Esto se debe principalmente, a que casi el 80% de los cultivos transgénicos tienen la característica de ser resistentes a este herbicida de amplio espectro, el cual se aplica al follaje, y es absorbido y traslocado rápidamente por toda la planta. Generalmente no hay detoxificación, y en caso de haberla, es muy lenta. Actúa de manera relativamente lenta, permitiendo que el herbicida pueda llegar a casi todos los tejidos de la planta antes de que su fitotoxicidad limite su movimiento. Además, de manera casi idéntica a la sacarosa, es traslocado preferencialmente a los tejidos meristemáticos, por lo que la planta es incapaz de rebrotar (Duke y Dayan, 2011).

El glifosato es el único herbicida que inhibe la 5-enolpiruvil shikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), una enzima requerida en la ruta del ácido shikímico para la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano. Este parece ser el único sitio de acción del glifosato, dado que las plantas transformadas con EPSPS microbiano resistente, son 50% más resistentes al glifosato que las plantas no transformadas. Aunque se debería asumir que la planta muere debido a la inanición de aminoácidos aromáticos necesarios para la síntesis de proteínas, existe evidencia de que una disfunción más importante e inmediata causada por la inhibición de la EPSPS es la desregulación de la ruta del ácido shikímico, lo que conduce a altos niveles de shikimato-3-fosfato y el desvío del carbono y los fosfatos de otras rutas metabólicas, interrumpiendo no sólo la ruta del shikimato. A pesar de que está codificada nuclearmente, la EPSPS reside en el plástido. Así, la detención de las rutas de fijación de carbono mediante el secuestro de intermediarios puede causar más daño celular que una simple reducción de los niveles de aminoácidos aromáticos libres. La EPSPS se encuentra en plantas, algunos hongos y bacterias. A dosis muy bajas, el glifosato estimula el crecimiento vegetal (hormésis), especialmente en las plantas leñosas (Duke y Dayan, 2011).

Los cultivos resistentes a glifosato constituyen casi el 80% del mercado, por lo que se consideran los cultivos transgénicos más exitosos (Duke y Powles, 2008).

4.1.2.6.5.2. Acetolactato sintasa

Uno de los grupos más grandes de herbicidas comerciales inhiben la acetolactato sintasa (ALS), también llamada acetohidroxiácido sintasa (AHS), una enzima que participa en la

ruta de síntesis de los tres aminoácidos de cadena ramificada: leucina, isoleucina y valina. Las plantas tratadas con estos inhibidores detienen su crecimiento, se marchitan y adquieren un color rojo debido a la acumulación de antocianinas inducidas por el estrés. Estos herbicidas son selectivos. Algunos cultivos y malezas, son tolerantes de manera natural debido a la rápida degradación del herbicida. Existen inhibidores de la ALS comerciales de varias clases químicas, incluyendo sulfonilureas, imidazolinonas y pirimidiltiobenzoatos. La mayoría de estos herbicidas actúan a dosis bajas, obteniéndose buenos resultados con unos cuantos gramos por hectárea.

Los inhibidores de la ALS provocan acumulación de uno de sus precursores, el 2-oxibutirato y del producto de una transaminación de este precursor, el 2-amino-butirato. La acumulación de este producto fitotóxico puede ser al menos en parte la causa de la fitotoxicidad, dado que no se acumula en tejidos vegetales sanos.

En la actualidad, existen 118 especies de malezas con resistencia a estos herbicidas, constituyendo el grupo con mayor número de casos reportados (WSSA, 2012).

4.1.2.6.5.3. Glutamino sintetasa

El glufosinato (ácido 2-amino-4-hidroximetilfosfinil butanoico) es un herbicida de amplio espectro que inhibe la enzima glutamino sintetasa (GS). El producto comercial es una mezcla racémica del producto natural 1-fosfino trisina, producido por *Streptomyces* spp. Ningún otro herbicida comercial afecta este sitio de acción, aunque se conocen a la fecha un buen número de otros inhibidores naturales de la GS (Duke y Dayan, 2011).

La GS se localiza en el cloroplasto, y está involucrada en la asimilación de amonio mediante la reducción de nitritos mediada por la luz. Sin la actividad de la GS, la toxicidad del amonio acumulado causa un rápido desacoplamiento de la fotofosforilación, así como inhibición de la fijación fotosintética de carbono y disrupción de la síntesis de aminoácidos, que son procesos que dependen de la fotorrespiración. El efecto del glufosinato es mucho más rápido que el de glifosato, pero sus síntomas son más parecidos a los producidos por los inhibidores de la fotosíntesis, es decir, marchitamiento de las hojas seguido de necrosis. Los genes *pat* y *bar* obtenidos a partir de dos diferentes especies de *Streptomyces* codifican para enzimas que incorporan grupos acilo al glufosinato, y lo vuelven inactivo. El gen *bar* ha sido muy usado como marcador selectivo. Ahora se emplea para producir maíz, algodón, canola y soya resistentes a glufosinato. Debido al mayor costo del herbicida y a su menor efectividad como herbicida de amplio espectro, los cultivos resistentes a glufosinato han tenido un mercado mucho menor que aquellos resistentes a glifosato (Duke y Dayan, 2011).

Hasta el momento se reportan dos especies de maleza resistentes a este herbicida (WSSA, 2012).

4.1.2.6.6. División celular

4.1.2.6.6.1. Tubulina

La división celular en las plantas, la elongación y la formación de pared celular requiere de microtúbulos funcionales. Un microtúbulo es una estructura dinámica que se ensambla sobre el final de uno y se desensambla sobre del otro, y está compuesto por heterodímeros de subunidades de α y β tubulina. Varios herbicidas interfieren con el ensamblaje de las subunidades de tubulina dentro de los microtúbulos funcionales, ya sea mediante la unión directa a la tubulina o interfiriendo con los centros de organización de microtúbulos o sobre proteínas asociadas a los microtúbulos (PAM). Estas PAM están involucradas en el ensamblaje, desensamblaje y funcionamiento de los microtúbulos. Esta clase de herbicidas incluye a las dinitroanilinas, la piridina tiafopir y las amidas sustituidas. La mayoría de estos herbicidas son aplicados en preemergencia e incorporados al suelo (Duke y Dayan, 2011).

Las dinitroanilinas se unen directamente a la tubulina, a la subunidad β , impidiendo así el ensamblaje dentro de los microtúbulos. Un síntoma típico de estos herbicidas es la formación de protuberancias en las puntas de la raíz. La división celular es interrumpida en el estado de metafase, debido a que los microtúbulos son necesarios para mover los cromosomas condensados hacia los nuevos polos celulares. La metafase suspendida provoca una gran cantidad de células mitóticas en una configuración permanente de metafase. En algunos casos, el mecanismo de resistencia está en una subunidad alterada de tubulina y en otros, es debido a un metabolismo de degradación incrementado (Duke y Dayan, 2011). Actualmente 16 especies de malezas han desarrollado resistencia a alguno de los herbicidas que interfieren con la formación y organización de microtúbulos (WSSA, 2012).

4.1.2.6.6.2. Síntesis de la pared celular

El isoxaben y diclobenil inhiben fuertemente la incorporación de glucosa en la fracción celulosa de la pared celular de *Arabidopsis thaliana*. Todo indica que el isoxaben inhibe el primer paso de la ruta de conversión de sacarosa a UDP-Glucosa, mientras que el diclobenil inhibe el complejo enzimático celulosa sintasa, aunque esto no se ha podido reproducir *in vitro*. La inhibición de esta enzima da como resultado la inhibición de la formación *in vivo* de las microfibras de celulosa. En células jóvenes, la falta de celulosa conduce a la formación de protuberancias en las puntas de la raíz, y el cese del

crecimiento de manera análoga al efecto provocado por herbicidas que actúan a nivel del ensamblaje de la tubulina. No se han reportado casos de resistencia a esta clase de herbicidas, ni se han generado cultivos resistentes a ellos mediante ingeniería genética (Duke y Dayan, 2011; WSSA, 2012).

4.1.2.6.7. Otros

4.1.2.6.7.1. 7,8-dihidropteroato sintasa

Solamente el herbicida asulam actúa mediante la inhibición de la síntesis del ácido fólico. Es un análogo del 4-aminobenzoato uno de los sustratos de la 7,8-dihidropteroato sintasa (DHPs), una enzima de la ruta del ácido fólico. Este sitio objetivo fue comprobado tanto por inhibición *in vitro* de la enzima, como por resistencia de una planta con una forma microbiana de DHPS. El asulam es un herbicida cuya selectividad está basada en la degradación metabólica diferencial (Duke y Dayan, 2011).

4.1.2.6.7.2. Proteína fosfatasa

La proteína fosfatasa (PPs) controla un gran número de procesos de señalización en las plantas. El endotal es el único herbicida que inhibe la PPs serina/treonina. La inhibición de esta PPs interrumpe muchos procesos celulares, provocando la muerte celular. Cuando se aplican al follaje, los síntomas visuales son similares a los daños por congelación, con defoliaciones, obscurecimiento y desecamiento del tejido. Por otra parte, cuando se aplica al suelo, inhibe el crecimiento de raíces. No se ha reportado ninguna maleza que tenga resistencia desarrollada a este herbicida (Duke y Dayan, 2011).

5. Resistencia de las malas hierbas a herbicidas

5.1. Definición

La resistencia a herbicidas se define como la habilidad heredada de una maleza para sobrevivir a una dosis de herbicida, con la cual normalmente se tendría un control efectivo. En este contexto, la resistencia es un proceso evolutivo, en el que una población cambia de ser susceptible a ser resistente. Las plantas individuales no pasan de ser susceptibles a ser resistentes, sino que es la proporción de individuos originalmente resistentes dentro de la población, la que se incrementa a lo largo del tiempo.

5.2. Tipos de resistencia

El término resistencia cruzada es a menudo usado para describir casos en los cuales una población de malezas es resistente a dos o más herbicidas (de la misma o diferente clase química) debido a la presencia de un mecanismo de resistencia único. El término de resistencia múltiple se refiere a aquellas plantas resistentes a dos o más grupos diferentes de herbicidas con dos o más mecanismos de resistencia.

La resistencia cruzada negativa se refiere a aquellos casos en los que un biotipo resistente a un herbicida exhibe un aumento en la sensibilidad a otros herbicidas con distinto modo de acción o de degradación (De Prado *et al.*, 1992). Por último, los cultivos resistentes a herbicidas, son cultivos que poseen genes que les confieren resistencia a un cierto herbicida al que habían sido previamente sensibles.

El término tolerancia se usa no sólo para referirse a variaciones entre especies, sino también en relación con la variabilidad dentro de una especie (LeBaron y Gressel, 1982). En este caso, tolerancia y resistencia son expresiones que denotan diferencias en intensidad de un mismo fenómeno, considerándose la resistencia como un caso extremo y menos frecuente de tolerancia (Holt y LeBaron, 1990), o considerando la tolerancia como un mecanismo poligénico, y la resistencia como uno monogénico (Gressel, 1985).

5.3. Origen y evolución

Hay dos maneras en que la resistencia se puede manifestar dentro de una población de malezas. En primer lugar, puede estar presente un gen o un grupo de genes otorgando resistencia debido a mutaciones aleatorias, que pueden haber ocurrido antes de la introducción del herbicida. En cualquier caso, el herbicida mata a la mayoría de las plantas susceptibles, pero los individuos resistentes sobreviven y se reproducen. La proporción de individuos resistentes en la población se incrementa gradualmente, hasta el punto en el que se produce un fallo en la efectividad del herbicida: se considera tal, cuando hay entre un 10 y un 20% de plantas que no mueren por la aplicación. Es importante tener en cuenta que la proporción de genes resistentes en toda la población puede haberse incrementado durante años, antes de que se advierta un problema de control en campo. El grado de resistencia en la población depende de la proporción entre individuos resistentes y susceptibles (Moss, 2002).

En segundo lugar, la selección puede, mediante un proceso bastante menos conocido, actuar sobre la variación continua o cuantitativa, adquiriendo un incremento gradual y progresivo en la resistencia a lo largo de varias generaciones. Estas variaciones

cuantitativas pueden ser causadas por un cierto número de poligenes, cada uno de los cuales, si bien produce un efecto mínimo, tiene la posibilidad de generar un nuevo rasgo en el fenotipo. De acuerdo a este segundo método, la selección puede estar actuando sobre los genes que producen resistencia, aunque sea muy leve la ventaja que aportan a la planta. El término de variación cuantitativa implica que existe un continuo de respuestas al herbicida dentro de la población, las cuales van desde susceptible, parcialmente resistente hasta altamente resistente. Esto ocurre debido a un incremento progresivo en el nivel de resistencia en toda la población, y no a un incremento en la proporción de individuos resistentes (Moss, 2002).

La sola aplicación del herbicida selecciona cualquier rasgo que favorezca la supervivencia del individuo. Muchos de estos rasgos aportan una ventaja relativamente baja, lo que a corto plazo no supone un beneficio importante para la maleza. Otros rasgos pueden dotar al individuo de un alto grado de resistencia, y son éstos los que suponen una mayor probabilidad de afectar la actividad del herbicida en campo y de ser investigados. Sin embargo, es necesario reconocer que muchas plantas sobrevivirán debido a un amplio rango de mecanismos de resistencia, y éstos pueden diferir entre poblaciones de la misma especie y especies diferentes (Moss, 2002).

Aunque se ha demostrado que los mecanismos de resistencia antes señalados tienen un gran impacto en la actividad del herbicida, aún están por ser descritos varios mecanismos que pueden incidir en la actividad del herbicida en mayor o menor grado. Algunos de ellos pueden manifestarse lentamente, lo que puede llevar a una grave consecuencia final. Otros más, sin embargo, se mantienen como una amenaza menor (Moss, 2002).

5.4. Mecanismos de resistencia a herbicidas

El conocimiento de los procesos fisiológicos responsables de la resistencia a herbicidas en las malas hierbas, es fundamental para el diseño de una estrategia de control. Dependiendo del tipo de mecanismo de resistencia detectado, la mala hierba presentará un patrón específico en su resistencia a herbicidas, que podrá variar desde un alto grado de resistencia a determinados compuestos de una misma familia química, a una moderada resistencia a un amplio espectro de herbicidas. Asimismo, el conocimiento de estos mecanismos permite prever la posible respuesta de la población resistente al conjunto de métodos (químicos, mecánicos, culturales) seleccionados para su control, la efectividad a corto y largo plazo de los mismos y la posible aparición de nuevos problemas. Millones de toneladas de plaguicidas se aplican anualmente, sin embargo, se

ha estimado que sólo un pequeño porcentaje de estos productos alcanzan el organismo objetivo; el resto se deposita en el suelo y en organismos no objetivo, y se mueve hacia la atmósfera y al agua (Rodríguez-Castellanos y Sánchez-Hernandez, 2007).

Existen al menos cinco mecanismos generales no necesariamente excluyentes, que podrían explicar la resistencia a herbicidas (Sherman *et al.*, 1996). En la Figura 1.2 se mencionan cada uno de estos cinco mecanismos, y las tres fases del proceso de metabolización de moléculas.

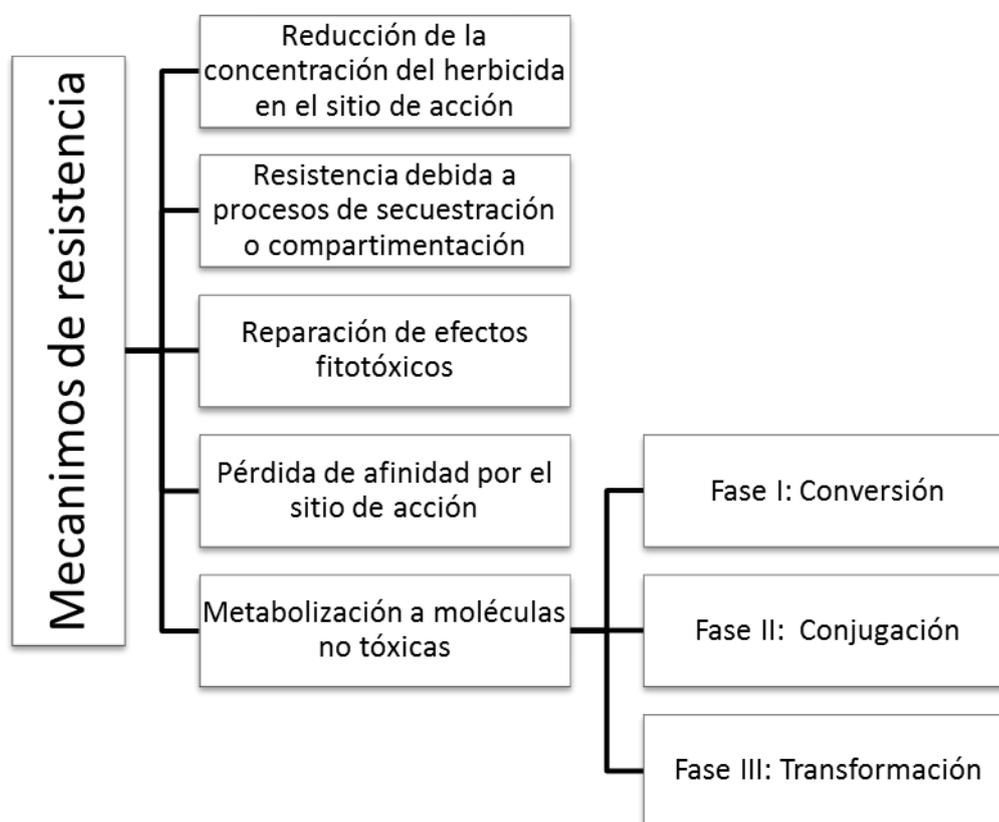


Figura 1.2. Mecanismos de resistencia de plantas a herbicidas.

5.4.1. Reducción de la concentración de herbicida en el sitio de acción

Una condición necesaria para lograr la efectividad de un herbicida, es que alcance su sitio de acción en una concentración suficiente para que su efecto sea letal. La falta de movimiento de un herbicida reduce la concentración de éste en el sitio de acción, lo que permite al último mantenerse funcional. Las bajas concentraciones pueden deberse a la reducción en la penetración, absorción o translocación, o a la existencia de fenómenos

de secuestación en orgánulos celulares más o menos traslocables. La falta de absorción, penetración o translocación de herbicidas es básicamente un mecanismo de tolerancia existente en numerosos cultivos y algunas malas hierbas (Hess, 1985; De Prado *et al.*, 2001; Michitte *et al.*, 2004; Ruiz-Santaella *et al.*, 2004; Cruz-Hipolito *et al.*, 2009). Aun cuando pueden estudiarse por separado, estos mecanismos resultan difíciles de diferenciar entre sí, dado que una absorción diferencial suele implicar una translocación diferencial, y ésta a su vez, puede derivar de la diferente degradación del herbicida en el sitio de absorción, la cual resulta en metabolitos más o menos traslocables.

5.4.2. Resistencia asociada a procesos de secuestación o compartimentación

Son mecanismos de resistencia o tolerancia poco conocidos, pues las evidencias que los apoyan son en muchos casos circunstanciales (Coupland, 1991; Owen y Pallutt, 1991). Los pocos casos encontrados en la bibliografía, relacionan este tipo de mecanismos de resistencia con herbicidas de acción hormonal e inhibidores del fotosistema I, justificando la resistencia tanto en líneas de cultivos celulares como en plantas enteras, como un incremento en la capacidad de secuestrar el herbicida o los metabolitos potencialmente fitotóxicos dentro de la vacuola celular. Los procesos subyacentes a estos mecanismos de secuestación son todavía desconocidos

5.4.3. Reparación de efectos fitotóxicos

Algunos herbicidas ariloxifenoxipropanoatos como diclofop-metil y haloxifop, despolarizan el potencial de la membrana plasmática en células parenquimáticas de *Avena sativa*, *Triticum aestivum*, *Lolium rigidum*, etc. La capacidad despolarizadora del diclofop-metil se atribuye al flujo específico de protones que este compuesto produce hacia el interior de la célula. Se han identificado biotipos de malas hierbas cuyo mecanismo de resistencia al diclofop-metil parece deberse a la capacidad de recobrar el potencial de membrana una vez que se ha retirado el herbicida causante de la despolarización (De Prado *et al.*, 1999).

5.4.4. Pérdida de afinidad por el sitio de acción

Los herbicidas resultan letales para las plantas debido a su actividad sobre un sitio de acción primario, generalmente una proteína, de especial relevancia biológica. Este sitio primario suele ser específico, y la acción del herbicida sobre éste suele conducir al desarrollo de efectos secundarios de naturaleza mucho más general, que normalmente

producen la muerte de la planta. Una o varias mutaciones en la secuencia aminoacídica del sitio primario de acción, pueden resultar en una pérdida de afinidad del herbicida por éste, imposibilitando la unión efectiva de ambos e impidiendo así la continuidad del proceso vital mediado por dicho sitio (Devine y Shimabukuro, 1994; Grownwald, 1994). Este tipo de mecanismo, es el exhibido en la mayoría de los biotipos resistentes descritos hasta el momento. Se caracteriza por conferir un alto grado de resistencia al herbicida empleado e incluso a otras moléculas pertenecientes a la misma familia química (Fig. 1.3).

5.4.5. Metabolización a especies no tóxicas (detoxificación)

Los procesos de detoxificación metabólica, se caracterizan por ser procesos biológicos en los que las moléculas tóxicas, son metabolizadas a compuestos inocuos o menos tóxicos. En los procesos de detoxificación metabólica, los biotipos resistentes son capaces de degradar el herbicida antes de que éste cause daños irreversibles. La velocidad de degradación enzimática puede variar debido a factores endógenos y exógenos como el estadio de crecimiento de la planta o las condiciones climáticas, entre otros.

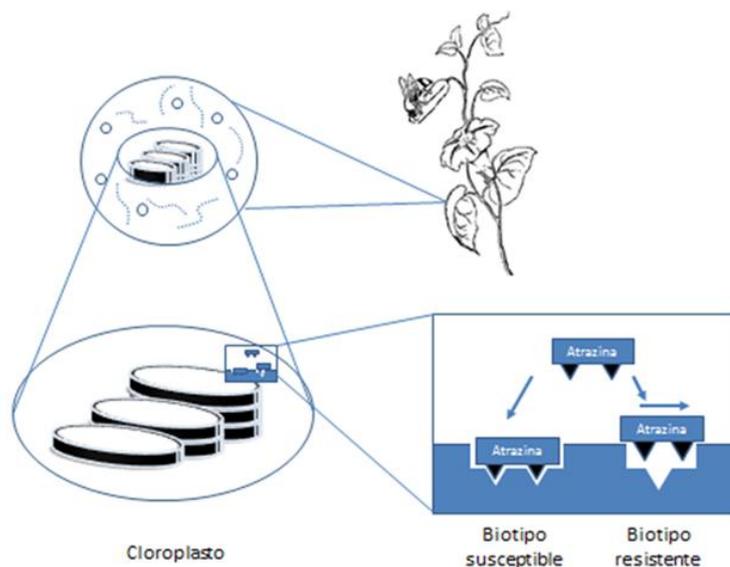


Figura 1.3. Resistencia debida a pérdida de afinidad por el sitio de acción. Representación esquemática de la inhibición de la acción herbicida de atrazina debido a un cambio conformacional en el cloroplasto. Fuente: Kansas State University (2012).

Los procesos de detoxificación metabólica de herbicidas en tejidos vegetales pueden dividirse en tres fases (Tabla 1.4) (Shimabukuro, 1985; Hatzios, 1991). En la fase I (conversión), las propiedades iniciales del herbicida de partida son transformadas a través de reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis, para producir un compuesto

más soluble en agua y menos tóxico. La segunda fase implica la conjugación del herbicida o sus metabolitos con un azúcar, aminoácido o glutatión, incrementando su solubilidad en agua y reduciendo la toxicidad del compuesto. Generalmente, los metabolitos formados en la fase II tienen poca o nula fitotoxicidad, y pueden ser almacenados en orgánulos celulares. La fase III implica la transformación de los metabolitos de la fase anterior a conjugados secundarios con nula toxicidad (Hatzios, 1991). Esta división no constituye una regla general, dado que alguna de las fases puede no estar presente en los procesos de detoxificación. La molécula herbicida puede ser un proherbicida inactivo que debe ser enzimáticamente convertido en un compuesto activo. A veces, ciertos procesos de conjugación son de carácter reversible, por lo que sólo afectan de manera parcial a la cantidad de herbicida libre intracelular.

Tabla 1.4. Resumen de las tres fases de detoxificación metabólica de plaguicidas. Adaptado de Shimabukuro (1985) y De Prado *et al.* (2004).

Fases	Reacciones	Propiedades iniciales		
		Solubilidad	Movilidad	Fitotoxicidad
Fase I	Oxidación, reducción, hidrólisis	Anfófilico	Modificada o reducida	Modificado o menos tóxico
Fase II	Conjugación	Hidrofílico	Limitada o inmóvil	Muy reducida o no tóxico
Fase III	Conjugación secundaria o incorporación a biopolímeros	Hidrofílico o insoluble	Inmóvil	No tóxico

5.4.5.1. Fase I o conversión

Algunos herbicidas pueden ser conjugados directamente; sin embargo, otros no poseen sustituyentes disponibles en sus moléculas (grupos amino, hidroxilo, sulfhidrilo, etc.) que puedan reaccionar para formar conjugados con constituyentes celulares. Dichos herbicidas deberán ser convertidos en metabolitos mediante algunas de las siguientes reacciones:

Hidrólisis: estas reacciones están catalizadas por enzimas hidrolíticas (esterasas, fosfatasas o amidasas, dependiendo del sustrato). En las transformaciones hidrolíticas se rompen los enlaces de un sustrato por adición a cada producto de H u OH

proveniente del H₂O. Hay muchas enzimas hidrolíticas capaces de metabolizar una gran variedad de sustratos, particularmente aquellos que contienen grupos funcionales amida, carbamato o éster. Estas enzimas pueden estar compartimentalizadas o ser extracelulares y las reacciones pueden ocurrir tanto en condiciones aerobias como anaerobias. La hidrólisis de enlaces éster de herbicidas han sido ampliamente estudiadas y analizadas en plantas y microorganismos (Inclendon y Hall, 1997; Hoagland y Zablutowicz, 1998). La hidrólisis del enlace éster es realizada principalmente por esterasas, y en menor medida por lipasas y proteasas. Con respecto a la hidrólisis de enlaces amida, el propanil es el herbicida más estudiado. La base de la selectividad del arroz (*Oryza sativa*) es debida a los altos niveles que posee de la enzima aril acilamidasa, la cual rompe el enlace amida formando ácido propiónico y 3,4-dicloroanilina (Frear y Still, 1968).

Reducciones: La metabolización reductora de herbicidas es un proceso que raramente se da en plantas, pudiéndose destacar únicamente la desaminación reductora de las s-triazinonas (metamitrona y metribuzina) en cultivos tolerantes y malas hierbas resistentes (Fedtke, 1983).

Oxidaciones, oxigenaciones e hidroxilaciones: todas ellas se pueden incluir dentro del grupo denominado transformaciones oxidativas. La oxigenación es el primer paso más frecuente en la biotransformación de herbicidas, siendo las hidroxilaciones las más observadas en plantas. La destoxicación por hidroxilación y la posterior formación de un conjugado glicósido, son especialmente importantes como mecanismos de selectividad y resistencia a herbicidas en monocotiledóneas. Muchas de estas reacciones están mediadas por enzimas oxidativas (p.e. citocromo P₄₅₀), que son las enzimas más importantes en la primera fase del metabolismo de un herbicida (Barrett, 2000). La regulación y expresión de P₄₅₀ no se conocen bien en plantas, principalmente porque en las células que no están expuestas a ningún tipo de estrés fisicoquímico, fisiológico o xenobiótico, las cantidades que se encuentran de esta enzima son muy pequeñas. Los agroquímicos pueden influir en los sistemas citocromo P₄₅₀ actuando como efectores, modificando o regulando así el metabolismo de los herbicidas en una planta.

Además de las enzimas citocromo P₄₅₀, las plantas producen otras enzimas oxidativas (peroxidasas, polifenoloxidasas, lacasas y tirosinasas), las cuales catalizan la polimerización de varias anilinas y fenoles (Dec y Bollag, 2001). Las peroxidasas que median el metabolismo de herbicidas que funcionan de manera similar a las P₄₅₀, intervienen en descarboxilaciones, oxidaciones sulfúricas, N-demetilaciones, hidroxilaciones del anillo y oxidaciones aromáticas del grupo metilo (Lamoureux y Frear,

1979). En plantas, a menudo las enzimas peroxidasas funcionan en la tercera fase del metabolismo, (p.e. formación de residuos ligados). *Amorocia lapathifolia* contiene en las raíces gran cantidad de peroxidasas.

5.4.5.2. Fase II o conjugación

Los conjugados suelen ser los metabolitos finales en los procesos de detoxificación de herbicidas. La naturaleza de estos conjugados suele ser muy diversa, con azúcares, aminoácidos, péptidos y lignina como grupos orgánicos y enlaces de tipo éster, éter, tioéter, amida o glicosídico.

Conjugación con glutatión: Constituye un mecanismo de detoxificación de gran importancia en muchos tejidos vegetales. Se trata de una sustitución nucleofílica en el que el anión glutatión GS⁻ sirve de nucleófilo, actuando los grupos cloro, p-nitrofenol o alquil-sulfóxido como posibles grupos a sustituir en la molécula herbicida (Lamoureux y Frear, 1979). La conjugación con el tripéptido glutatión está catalizada por una familia de enzimas denominadas glutatión-S-transferasas más o menos específicas que se encuentran de manera constitutiva o inducible en muchos tejidos vegetales (Devine *et al.*, 1993).

Conjugación con aminoácidos: de forma general, la hidrólisis de glutatión en este tipo de conjugados suele producir un conjugado de cisteína que puede ser posteriormente malonizado. Sin embargo, en el caso del herbicida clorfemprop, sólo el conjugado de cisteína y no el de glutatión se ha descrito en trigo (Pont y Collet, 1980), siendo posible que la cisteína pueda actuar como nucleófilo en una reacción de conjugación similar a la descrita en el glutatión.

Conjugación con azúcares: los conjugados glicósidos más frecuentemente hallados en plantas son los β -D-glucopiranosidos, junto con los N-glicósidos, O-glicósidos y ésteres de glucosa. Este tipo de reacciones están catalizadas por glucosil-transferasas que utilizan UDP-glucosa como donante de glucosa (Mansager *et al.*, 1983). De todas estas reacciones, la formación de O-glicósidos es la más común. Esta formación sigue normalmente a la introducción de grupos hidroxilo en la molécula herbicida por monooxigenación.

5.4.5.3. Fase III o deposición

La ruta metabólica seguida por un herbicida afecta de gran manera el uso final de los metabolitos terminales y conjugados. Los conjugados glicósidos son depositados en la vacuola donde quedan almacenados, mientras que los conjugados de origen

aminoacídico son excretados a la pared celular donde se integran en el componente de lignina de éstas, formando un residuo insoluble (Pillmoor y Caseley, 1984). Cabe mencionar, que estos procesos de deposición no son completamente irreversibles, la reentrada de los aglicones herbicidas o sus productos de conversión en el *pool* de herbicida activo intracelular es muy lenta (Devine *et al.*, 1993).

La resistencia a herbicidas por detoxificación es un proceso muy frecuente. Sin embargo, este mecanismo suele estar asociado a fenómenos de resistencia cruzada, lo que implica que un mismo individuo tiene la capacidad de metabolizar moléculas muy diferentes pertenecientes a diversas familias químicas. Esta moderada resistencia a un amplio espectro de productos, hace extremadamente difícil el control de estos biotipos de malas hierbas, solamente mediante el uso de métodos químicos.

5.5. Manejo de la resistencia

5.5.1. Prevención

El factor principal en la evolución de la resistencia es la presión de selección impuesta por el herbicida que depende por su parte, de la dosis, eficacia y frecuencia de aplicación del producto. Por lo tanto, para evitar o retrasar la evolución de la resistencia, es necesario disminuir la presión de selección (Valverde *et al.*, 2000).

Los herbicidas muy eficaces pueden imponer una presión de selección extremadamente alta, capaz de provocar la evolución de resistencia en unas cuantas generaciones. Tal es el caso de los inhibidores de la ALS y de los inhibidores de la ACCasa. En Costa Rica se presentó resistencia fenoxaprop-etil (inhibidor de la ACCasa), tras solamente cuatro años de uso reiterado (Valverde *et al.*, 2000).

Sin embargo, aunque teóricamente la reducción de las dosis provoca una disminución en la mortalidad, y por lo tanto la supervivencia de organismos susceptibles, que a su vez enriquecerían el banco de semilla con biotipos susceptibles, se ha encontrado que herbicidas aplicados a dosis bajas seleccionan la resistencia basada en mecanismos poligénicos, lo que podría provocar resistencia múltiple (Valverde *et al.*, 2000).

De manera muy sintética, el HRAC (2012) recomienda las siguientes medidas preventivas:

1. Emplear herbicidas sólo cuando sea necesario.
2. Hacer rotación de cultivos y/o herbicidas.

3. Utilizar programas de control integrado de malas hierbas, en los que se combinen el uso de herbicidas con otros métodos alternativos de control.
4. Limpiar cuidadosamente los equipos de laboreo y recolección a fin de no diseminar las semillas procedentes de individuos resistentes.
5. Utilizar material vegetal exento de semillas de individuos resistentes.
6. Vigilar cuidadosamente la eficacia obtenida con los tratamientos herbicidas, comprobando si los fallos de eficacia son debidos a errores en la aplicación o del herbicida.
7. Combinar el uso de herbicidas con distintos modos de acción.

El conocimiento de cómo se desarrolla la resistencia, es importante para implementar sistemas de producción que prevengan o disminuyan su ocurrencia. Los factores a considerar para implementar programas de manejo de resistencia, incluyen las características de la maleza, características de los herbicidas y prácticas culturales.

5.5.2. Detección

Por lo general, la sospecha inicial de resistencia está relacionada con un control deficiente o no satisfactorio de las malezas después de una aplicación de herbicidas. Antes de considerar a la resistencia como causante de la falla, deben descartarse otros factores, como dosis o época de aplicación inadecuada del herbicida, aplicación deficiente, nivel de humedad y preparación del suelo, adsorción, condiciones climáticas no favorables, tamaño de malezas, germinación posterior a la aplicación y alta infestación (Salas, 2001).

La resistencia a los herbicidas no es un problema que se presente en forma súbita en un terreno en particular, ni es la falta de control de malezas en un solo año. Puede ocurrir primero en una pequeña área o áreas, especialmente en donde se han utilizado herbicidas con el mismo modo de acción por varios años consecutivos. Se debe recordar que la resistencia a herbicidas se presenta cuando la aplicación repetida de un herbicida, selecciona a plantas individuales con tolerancia natural a dicho herbicida, y que ésta se hereda de padres a hijos (Bussan *et al.*, 2000).

Existen indicadores clave de la resistencia en el campo, los cuales son: 1. Plantas no afectadas entre grupos de plantas muertas de la misma especie, que fueron aplicadas al mismo tiempo, 2. Manchones de malezas no controladas que se están expandiendo, 3. Presencia de otras especies susceptibles de malezas que fueron controladas al mismo tiempo, 4. No hay evidencia de escapes o problemas en la aplicación, 5. Poco o ningún

daño en las malezas, 6. El mismo herbicida se utiliza año tras año, y 7. Se ha confirmado la resistencia en terrenos cercanos (Kending, 1995; Bussan *et al.*, 2000).

En el Capítulo III se tratarán con más detalle los métodos de detección de resistencia a herbicidas, así como los mecanismos de resistencia.

5.6. Estado actual de la resistencia a herbicidas

5.6.1. Problemática de la resistencia a nivel mundial

El número de casos de resistencia a insecticidas y fungicidas se incrementó rápidamente después de los años 50 y 60. En cambio, fue hasta 1968 cuando se detectó un biotipo de *Senecio vulgaris* (una planta de la familia Asteraceae) con resistencia a simazina en un vivero forestal en el que dicho herbicida se había utilizado por muchos años como el único método de control de malezas (Ryan, 1970). Desde la identificación de este primer biotipo resistente, el incremento anual es considerable en cuanto al número de malas hierbas resistentes a herbicidas en el mundo, experimentándose un crecimiento exponencial a partir de los años ochenta (Figura 1.4). Este aumento en especies y biotipos amenaza a muchas regiones agrícolas del mundo, sobre todo en aquellas en donde existen casos de malas hierbas que presentan resistencia múltiple. En la actualidad, a nivel mundial se reportan 388 biotipos correspondientes a 209 especies, de las cuales, 123 son dicotiledóneas y 86 monocotiledóneas (WSSA, 2012).

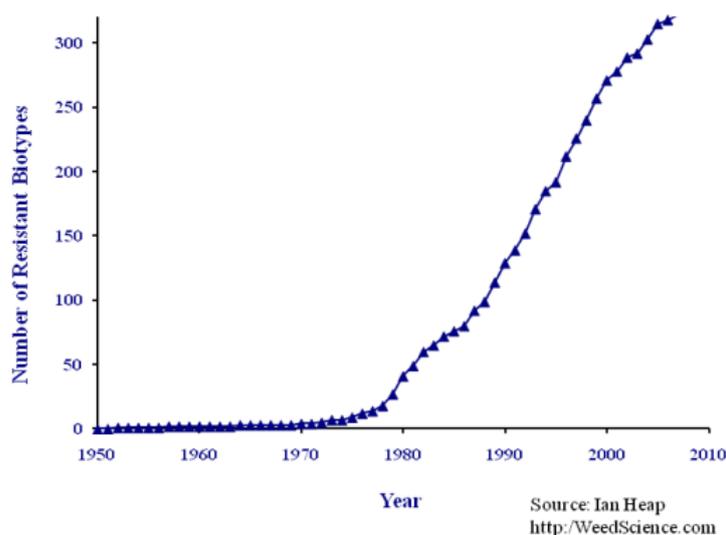


Figura 1.4. Incremento del número de malas hierbas resistentes a herbicidas hasta el año 2010 (WSSA, 2012).

Existen reportes de resistencia en 60 países a 19 grupos de herbicidas. Estos grupos han sido descritos de acuerdo al modo de acción por el HRAC. El número de especies de maleza por grupo, actualizado hasta la fecha, se presenta en la Tabla 1.5 (WSSA, 2012).

La resistencia generalmente se desarrolla en una, o a lo mucho en unas pocas especies de una comunidad de malezas, a pesar de que todas hayan estado expuestas a la misma intensidad de uso del herbicida. No hay una clara relación entre la familia o el género de la planta y su tendencia a desarrollar resistencia. Las gramíneas son muchísimo más abundantes, constituyendo el 33% de todas las especies resistentes y el 40% de todos los biotipos resistentes. No obstante, representan sólo el 25% de las peores malezas del mundo (Moss, 2002; Beckie, 2006).

Un serio problema es el rápido desarrollo de malas hierbas resistentes a herbicidas inhibidores de las enzimas ALS y ACCasa. Estos herbicidas ejercen gran presión de selección sobre las malas hierbas, al ser productos selectivos. El clorosulfurón, primer herbicida inhibidor de la ALS, se comercializó en 1982, confirmándose el primer caso de resistencia en la especie *Lactuca serriola* en el año 1987 (Mallory-Smith *et al.*, 1990). La resistencia a este grupo de herbicidas es la que aumenta más rápidamente en la actualidad, ocupando más de un 30% del total de biotipos resistentes a estos herbicidas (WSSA, 2012) (Figuras 1.5 y 1.6) (Tabla 1.5).

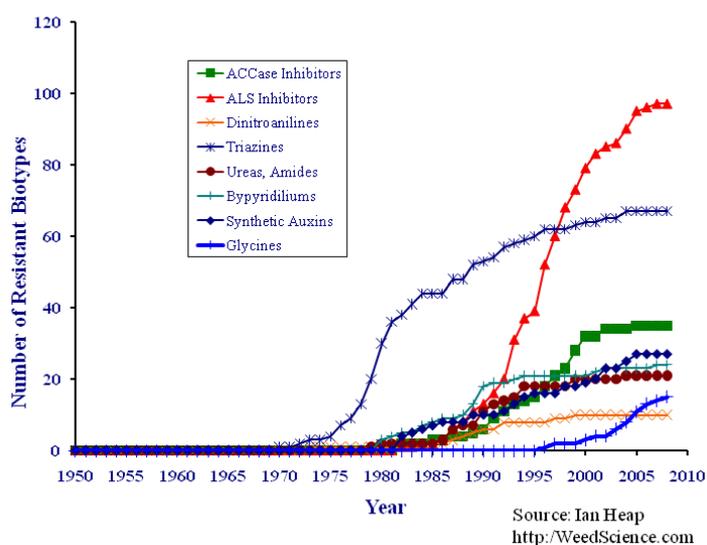


Figura 1.5. Número de biotipos resistentes a distintas familias de herbicidas desde que se encontró el primer caso de resistencia, hasta el año 2010, distribuido según modo de acción. Fuente: WSSA (2012).

Tabla 1.5. Grupos de herbicidas y número de biotipos resistentes reportados a nivel global.

Grupo herbicida	Ejemplo	Total
Inhibidores de la ALS	Clorosulfurón	123
Inhibidores del fotosistema II	Atrazina	69
Inhibidores de la ACCasa	Diclofop-metil	42
Auxinas sintéticas	2,4-D	29
Bipiridilios	Paraquat	25
Glicinas	Glifosato	23
Ureas y amidas	Clorotolurón	22
Dinitroanilinas y otros	Trifluralina	11
Tiocarbamatos y otros	Triallato	8
Triazoles, ureas, isoxazolidiones	Amitrol	5
Cloroacetamidas y otros	Butaclor	5
Nitrilos y otros	Bromoxinil	4
Inhibidores de PPO	Oxifluorfen	4
Inhibidores de la biosíntesis de carotenoides	Flurtamona	3
Inhibidores de la glutamino sintetasa	Glufosinato de amonio	2
Desconocido	Flampropmetil	2
Desconocido	Clorofuretol	2
Inhibidores de la 4-HPPD	Isoxaflutole	1
Inhibidores de la mitosis	Profam	1
Inhibidores de la celulosa	Diclobenil	1
Organoarsenicales	MSMA	1

Fuente: HRAC (2012).

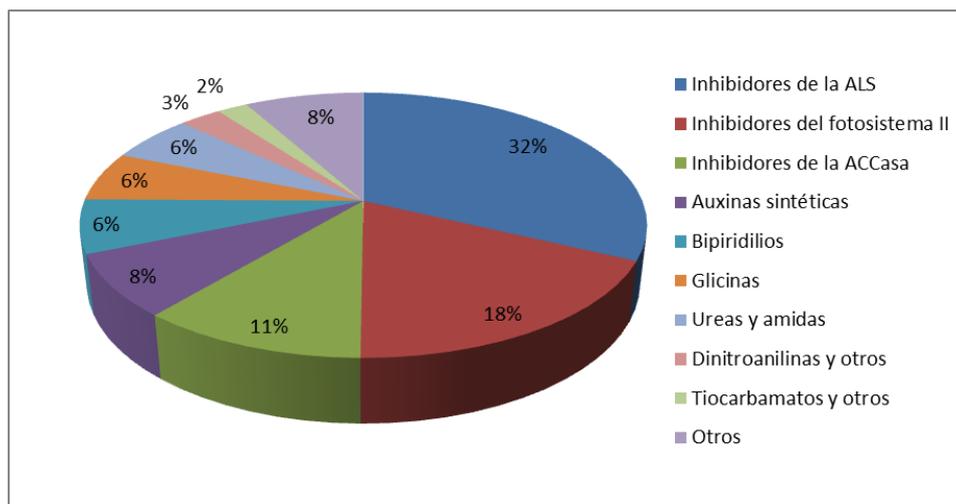


Figura 1.6. Los 10 grupos de herbicidas con mayor número de biotipos resistentes y sus respectivos porcentajes. Con datos provenientes de International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Fuente: WSSA (2012).

Para el caso específico de *P. minor* en 1991, en India se reportaron biotipos de esta especie resistentes a ureas y amidas (isoproturón) (Malik y Singh, 1995) en un área de entre 1 y 2 millones de acres. Singh *et al.* (1999) mencionan que el área de infestación se incrementa a razón de una hectárea por año en Haryana, Punjab, pudiendo llegar la densidad poblacional de estos biotipos a más de 2.000 plantas/m². Las poblaciones varían en cuanto a su nivel de resistencia, y se ha encontrado resistencia cruzada a diclofop. En cuanto a inhibidores de la ACCasa, y con base en la página la WSSA (2012), biotipos resistentes de *P. minor* se ha reportado en Irán, India, Israel, Sudáfrica, Estados Unidos de América y México. También se han reportado en India, biotipos con resistencia a ureas y amidas (Chhokar y Sharma, 2008), y biotipos resistentes a inhibidores de la ALS en India y Sudáfrica.

5.6.2. Situación de la resistencia en Latinoamérica

Hay diferencias en la distribución relativa de los casos de resistencia basados en el modo de acción de los herbicidas, entre los países desarrollados y los países en desarrollo. Los tres grupos más importantes (triazinas, ALS y ACCasa) comprenden 74 y 65% de los casos de resistencia en los países desarrollados y en los países en desarrollo, respectivamente. En ambos grupos de países, la resistencia a las triazinas continúa siendo la más frecuente de acuerdo con el número de biotipos. En los países desarrollados, la resistencia al grupo ALS tiene una frecuencia equivalente al doble de la resistencia a ACCasa. En los países en desarrollo, la frecuencia a la resistencia de ambos modos de acción es prácticamente la misma. Los herbicidas del tipo bipiridilios, auxínicos y urea y amidas, contribuyen con más casos de resistencia en los países en desarrollo que en los países industrializados. Una posible explicación pudiera

encontrarse en el uso relativamente difuso de paraquat, 2,4-D y propanil en los países en desarrollo (Valverde, 2007).

Los mayores problemas encontrados en cereales están asociados con la competencia de malas hierbas, principalmente gramíneas, que son de difícil manejo y control. Aunado a esto, se encuentra la resistencia conferida a herbicidas con distintos modos de acción; en México, destaca por su importancia la resistencia que presentan las gramíneas *Phalaris minor* y *P. paradoxa* a inhibidores de la ACCasa (Valverde, 2007).

5.6.3. Malas hierbas reportadas como resistentes en México

De acuerdo con datos publicados por “*The International Survey of Herbicide Resistant Weeds*” (WSSA, 2012), existen siete biotipos resistentes en cinco especies de la familia Poaceae. Tres biotipos de *Avena fatua*, un biotipo de *P. paradoxa* y un biotipo de *P. minor* se describen como resistentes a los inhibidores de la ACCasa. En el mismo sentido, recientemente se han reportado un biotipo de *Sorghum halepense* resistente a los inhibidores de la ALS y un biotipo de *Leptochloa virgata* resistente a glicinas. Reportes locales establecen que otros nueve biotipos han sido encontrados, dos de ellos corresponden a biotipos de *A. fatua* resistentes a inhibidores de la ACCasa, y uno más con resistencia múltiple (inhibidores de la ACCasa e inhibidores de la ALS).

Por su parte, Tamayo y Martínez (2002) reportan la presencia de *P. minor* y *P. paradoxa* resistentes a inhibidores de la ACCasa en Sonora. Mientras que Ruiz-Santaella (2006) incluye otro biotipo de *P. paradoxa*. *Echinochloa colona* se reporta como resistente a propanil (Valverde, 2007).

Finalmente, tanto el Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato (CESAVEG, 2007), como Medina (2011), reportan a *P. brachystachys* como resistente a inhibidores de la ACCasa. Hasta el momento no existe una fuente en la que se incluya a todos los biotipos resistentes de maleza en México. La información es escasa y en muchos casos, sólo se da a conocer en congresos y simposios. Una síntesis de especies con biotipos resistentes en México se presenta en la Tabla 1.6.

Es también notoria la falta de catálogos de malezas, en los que se incluyan las descripciones, área de distribución y sinonimias de estas plantas. En el Capítulo II se pretende coadyuvar al conocimiento de estos aspectos.

Para el caso específico de *P. minor*, a nivel mundial se reportan ocho biotipos con resistencia a herbicidas; uno de ellos, presente en India es resistente a ureas y amidas, mientras que los otros siete son resistentes a herbicidas inhibidores de la ACCasa. En

India y Sudáfrica se reportan dos de esos biotipos, además con resistencia múltiple; en el primer caso, incluye inhibidores de la ALS y ureas y amidas, mientras que en Sudáfrica, la resistencia múltiple involucra a inhibidores de la ALS (Tabla 1.7).

Tabla 1.6. Malezas resistentes a herbicidas en México.

Biotipo	Año	Localidad	Modo de acción	Herbicidas	Fuente
<i>Avena fatua</i>	1998	Guanajuato	Inhibidores ACCasa	Cicloxiidim, diclofop-metil y fenoxaprop-P-etil	(WSSA, 2012)
<i>Avena fatua</i>	1998	Guanajuato, Jalisco y Baja California	Inhibidores ACCasa	Clodinafop-propargil, fenoxaprop-P-etil y tralkoxidim	(WSSA, 2012)
<i>Avena fatua</i>	1999	Guanajuato	Inhibidores ACCasa	Clodinafop-propargil, fenoxaprop-P-etil, fluazifop-P-butil, setoxidim y tralkoxidim	(WSSA, 2012)
<i>Avena fatua</i>	1996	ND	ND		(Bolaños y García, 1996)
<i>Avena fatua</i>	2007	Guanajuato	Resistencia múltiple (ALS y ACCasa)	Tralkoxidim, clodinafop, pinoxaden y flucarbazone-s	(Velasco <i>et al.</i> , 2007)
<i>Avena fatua</i>	2007	Bajío	Inhibidores ACCasa	Clodinafop-propargil, tralkoxidim y fenoxaprop-P-etil	(Medina <i>et al.</i> , 2007b)
<i>Echinochloa colona</i>	2000	México	Inhibidores del PSII	Propanil	(Valverde, 2007)
<i>Leptochloa virgata</i>	2012	Veracruz	Inhibidores de la EPSP sintasa	Glifosato	(WSSA, 2012)
<i>Phalaris brachystachys</i>	2011	Bajío	Inhibidores ACCasa	ND	Medina (2011) <i>com. pers.</i> Datos no publicados (WSSA, 2012)
<i>Phalaris minor</i>	1996	México	Inhibidores ACCasa	Clodinafop-propargil, fenoxaprop-P-etil, fluazifop-P-butil, pinoxaden, setoxidim y tralkoxidim	(WSSA, 2012)
<i>Phalaris minor</i>	2002	Sonora	Inhibidores ACCasa	Fenoxaprop-P-etil y tralkoxidim	(Tamayo y Martínez, 2002)
<i>Phalaris paradoxa</i>	1996	Guanajuato, Jalisco y Michoacán	Inhibidores ACCasa	Clodinafop-propargil, fenoxaprop-P-etil, pinoxaden y tralkoxidim	(WSSA, 2012)
<i>Phalaris paradoxa</i>	2001	Sonora	Inhibidores ACCasa	Fenoxaprop-P-etil y tralkoxidim	(Tamayo y Martínez, 2002)
<i>Phalaris paradoxa</i>	2006	Bajío	Inhibidores ACCasa	Fenoxaprop, cicloxiidim, cihalofop, diclofop-metil	(Ruiz-Santaella <i>et al.</i> , 2006)
<i>Phalaris spp.</i>	1999	Bajío	Inhibidores ACCasa	Clodinafop-propargil, tralkoxidim y fenoxaprop-P-etil	(Medina <i>et al.</i> , 2007a)
<i>Sorghum halepense</i>	2009	Veracruz	Inhibidores ALS	Foramsulfuron, nicosulfuron, primisulfuron-metil y rimsulfuron	(WSSA, 2012)

Tabla 1.7. Biotipos de *Phalaris minor* resistentes a herbicidas.

No.	País	Año	Sitio de acción	Herbicidas
1	India	1991	Ureas y amidas	Isoproturon
2	India (resistencia múltiple)	2006	Inhibidor de ACCasa, inhibidor de ALS, ureas y amidas	Clodinafop-propargil, fenoxaprop-P-etil, isoproturon y sulfosulfuron.
3	Irán	2004	Inhibidor de ACCasa	Diclofop-metil y fenoxaprop-P-etil.
4	Irán	2006	Inhibidor de ACCasa	Clodinafop-propargil, diclofop-metil, fenoxaprop-P-etil, pinoxaden y tralkoxidim
5	Israel	1993	Inhibidor de ACCasa	Fenoxaprop-P-etil
6	México	2006	Inhibidor de ACCasa	Clodinafop-propargil, fenoxaprop-P-etil, fluazifop-P-butil, pinoxaden, setoxidim y tralkoxidim
7	Sudáfrica (resistencia múltiple)	1999	Inhibidor de ACCasa, Inhibidor de ALS	Clodinafop-propargil, diclofop-metil, fenoxaprop-P-etil, haloxifop-P-metil, iodosulfuron-metil-sodio, mesosulfuron-metil, propaquizafop, quizalofop-P-tefuril, y sulfosulfuron
8	Estados Unidos (California)	2001	Inhibidor de ACCasa	Clethodim, fenoxaprop-P-etil, fluazifop-P-butil y setoxidim

Fuente: WSSA (2012). Consultado el 10 de junio de 2012.

6. Bibliografía

- Anónimo. 2007. Diccionario de Especialidades Agroquímicas. 17 ed. PLM Thompson PLM, S. A. de C. V. México, D.F. Versión en CD.
- Ashton, F. M. & Craft, A. 1981. Mode of action of herbicides. Wiley Interscience. New York, NY, USA. 525 p.
- Baker, H. 1974. The evolution of weeds. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 5:1-24.
- Barrett, M. 2000. The role of cytochrome P₄₅₀ enzymes in herbicide metabolism. p. 25-37. *In: Cobbs, A. H. & Kirkwood, R. C. (eds.). Herbicides and their mechanisms of action.* Sheffield Academic. Sheffield, UK.
- Baumann, P. A., Dotray, P. A. & Prostko, E. 1998. Herbicide mode of action and injury symptomatology. SCS-1998-07. Texas A&M University Texas Agricultural Extension Service. College Station, TX, USA. 10 p.
- Beckie, H. J. 2006. Herbicide-resistant weeds: Management tactics and practices. *Weed Technol.* 20:793-814.
- Bolaños, E. A. & García, G. A. 1996. Susceptibilidad de biotipos de avena loca (*Avena fatua* L.) a herbicidas bajo condiciones de invernadero. p. 25-26. *In: Memoria de XVII Congreso Nacional de Ciencia de la Maleza.* Ixtapa Zihuatanejo, Gro., México.
- Buhler, D. D. 1998. Tillage systems and weed population dynamics and management. p. 223-246. *In: Hatfield, J. L. & Stewart, D. D. (eds.). Integrated weed and soil management.* Ann Arbor Press. Chelsea, MI, USA.
- Bussan, A. J., Boerboom, C. M. & Stoltenberg, D. E. 2000. Response of giant foxtail (*Setaria faberi*) demographic processes to herbicide rate. *Weed Sci.* 48:445-453.
- Caseley, J. C. 1996. Herbicidas. *In: Labrada, R., Caseley J. C. & Parker, C. (eds.) Manejo de malezas para países en desarrollo.* Estudio FAO. Producción y Protección Vegetal 120. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia. Dis. [consultado el 11 de noviembre de 2011]. <http://www.fao.org/docrep/T1147S/t1147s05.htm>
- CESAVEG. 2007. Campaña de manejo fitosanitario de trigo. Manejo integrado de malezas: Comité estatal de sanidad vegetal de Guanajuato. [consultado el 30 de mayo de 2012] http://www.cesaveg.org.mx/html/folleto/folleto_07/folleto_malezas_07.pdf
- Chhokar, R. S. & Sharma, R. K. 2008. Multiple herbicide resistance in littleseed canarygrass (*Phalaris minor*): A threat to wheat production in India. *Weed Biol. Manag.* 8:112-123.
- Cobb, A. 1992. Herbicides and plant physiology. Chapman & Hall. London, UK. 176 p.

- Cobb, A. & Reade, J. 2010. Herbicides and plant physiology. 2nd ed. Wiley-Blackwell. Singapore. 286 p.
- Cotero G., M. 1997. Situación de la resistencia de las malezas a los herbicidas en México. p. 11-12. *In*: FAO: Resistencia de las malezas a herbicidas. Reunión Regional de la División de Producción y Protección Vegetal. Jaboticabal, Brasil.
- Coupland, D. 1991. The role of compartmentation of herbicides and their metabolites in resistance mechanisms. p. 263-278. *In*: Caseley, J. C., Cussans, G. W. & Atkin, R. K. (eds.). Herbicide resistance in weeds and crops. Butterworth-Heinemann. Oxford, UK.
- Cruz-Hipolito, H., Osuna, M. D., Heredia, A., Ruiz-Santaella, J. P. & De Prado, R. 2009. Nontarget mechanisms involved in glyphosate tolerance found in *Canavalia ensiformis* plants. *J. Agric. Food Chem.* 57:4844-4848.
- De Prado, J. L., De Prado, R. & Shimabukuro, R. H. 1999. The effect of diclofop on membrane potential, ethylene induction and herbicide phytotoxicity in resistant and susceptible biotypes of grasses. *Pest. Biochem. Physiol.* 63:1-14.
- De Prado, R., De Prado, J. L., Osuna, M. D., Taberner, A. & Heredia, A. 2001. Is diclofop-methyl resistance in *Lolium rigidum* associated with a lack of penetration? p. 545-550. *In*: Proc. Crop Prot. Conf. Weeds. Brighton, UK.
- De Prado, R., Osuna, M. D. & Fischer, A. J. 2004. Resistance to ACCase inhibitor herbicides in green foxtail (*Setaria viridis*) biotype in Europe. *Weed Sci.* 52:506-512.
- De Prado, R., Sánchez, M., Jorrín, J. & Dominguez, C. 1992. Negative cross-resistance to bentazone and pyridate in atrazine-resistant *Amaranthus cruentus* and *Amaranthus hybridus* biotypes. *Pest. Sci.* 35:131-136.
- Dec, J. & Bollag, J. M. 2001. Use of enzymes in bioremediation. p. 182-193. *In*: American Chemical Society (ed.). Pesticide biotransformacion in plants and microorganism: Similarities and divergences. American Chemical Society. Washington, DC, USA.
- Devine, M. D., Duke, S. & Fedtke, C. 1993. Physiology of herbicide action. P T R Prentice Hall. Englewood Cliffs, NJ, USA. 441 p.
- Devine, M. D. & Shimabukuro, R. H. 1994. Resistance to acetyl coenzyme A carboxylase inhibiting herbicides. p. 141-170. *In*: Powles, S. B. & Holtum, J. (eds.). Herbicide resistance in plants: Biology and biochemistry. Lewis. Boca Raton, FL, USA.
- Duke, S. & Dayan, F. 2011. Bioactiviy of herbicides. p. 23-35. *In*: Moo-Young, M. (ed.). Comprehensive biotechnology. 2nd ed. Vol. IV. Elsevier Science. Amsterdam, The Netherlands.
- Duke, S. & Powles, S. 2008. Glifosate: A once in a century herbicide. *Pest Manag. Sci.* 64:319-365.

- Duke, S. O. & Dayan, F. E. 2001. Classification and mode of action of the herbicides. p. 31-44. *In: De Prado, R. & Jorrín, J. (eds.). Uso de herbicidas en la agricultura del siglo XXI. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. Córdoba, España.*
- Fedtke, C. 1983. Leaf peroxisomes deaminate as-triazinone herbicides. *Naturwissenschaften*. 70:199-200.
- Frear, D. S. & Still, G. G. 1968. The metabolism of 3,4-dichloropropionanilide in plants. Partial purification and properties of an aryl acylamidase from rice. *Phytochemistry*. 7:913-920.
- Gressel, J. 1985. Herbicide tolerance and resistance: Alteration of site of activity. *Weed Physiol*. 2:159-189.
- Grownwald, J. 1994. Resistance to photosystem II inhibiting herbicides. p. 27-60. *In: Powles, S. & Holtum, J. (eds.). Herbicide resistance in plants: Biology and biochemistry. Lewis, Boca Raton, FL, USA.*
- Gunsolus, J. L. & Curran, W. 1996. Herbicide mode of action and injury symptoms. North Central Regional Publication 377. University of Minnesota Extension Service. St Paul, MN, USA. 22 p.
- Hance, R. J. & Holly, K. 1990. Weed control handbook: Principles. Blackwell Scientific Publications. Oxford, UK. 582 p.
- Hatzios, K. K. 1991. Biotransformations of herbicides in higher plants. p. 141-185. *In: Grover, R. & Cessba, A. J. (eds.). Environmental chemistry of herbicides. CRC Press, London, UK.*
- Hess, F. D. 1985. Herbicide absorption and translocation and their relationship to plant tolerance and susceptibility. 192-214 *In: Duke, S.O. (ed.) Weed physiology: Herbicide physiology. CRC Press. London, UK.*
- Hoagland, R. E. & Zablutowicz, R. M. 1998. Biotransformation of fenoxaprop-ethyl by fluorescent *Pseudomonas*. *J. Agric. Food Chem*. 46:4759-4765.
- Holt, J. & LeBaron, H. 1990. Significance and distribution of herbicide resistance. *Weed Technol*. 4:141-149.
- HRAC. 2012. Classification of herbicides according to site of action. [consultado el 31 de mayo de 2012]. <http://www.hracglobal.com/Publications/ClassificationofHerbicideSiteofAction/tabid/222/Default.aspx>
- Inclendon, B. J. & Hall, J. C. 1997. Enzymatic de-esterification of xenobiotics in plants. p. 67-82. *In: Hatzios, K. K. (ed.). Regulation of enzymatic systems detoxifying xenobiotics in plants. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands.*
- Kansas State University. 2012. Herbicide mode of action. C-715. Kansas State University Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service. [consultado el 6 de abril de 2012]. <http://www.ksre.ksu.edu/library/crpsl2/c715.pdf>

- Kending, A. 1995. Herbicide resistance in weeds. Agricultural MU Guide G 4907. University of Missouri-Columbia. University Extension. Columbia, MO, USA. 8 p.
- Lamoureux, G. L. & Frear, D. S. 1979. Pesticide metabolism in higher plants: *in vitro* enzyme studies. p. 77-128. *In*: Paulson, G. D., Frear, D. S. & Marks E. P. (eds.). Xenobiotic metabolism: *in vitro* methods. American Chemical Society. Washington, DC, USA.
- LeBaron, H. & Gressel, J. 1982. Herbicide resistance in plants. J. Wiley & Sons. New York, NY, USA.
- Liebman, M., Molher, C. & Staver, C. 2001. Ecological management of agricultural weeds. Cambridge University Press. Cambridge, UK. 544 p.
- Malik, R. K. & Singh, S. 1995. Littleseed canary grass (*Phalaris minor*) resistance to isoproturon in India. Weed Technol. 9:419-425.
- Mallory-Smith, C. A., Thill, D. C. & Dial, M. J. 1990. Identification of sulfonylurea herbicide-resistant prickly lettuce (*Lactuca serriola*). Weed Technol. 4:163-168.
- Mansager, E. R., Swanson, H. R. & Tanaka, F. S. 1983. Metribuzin metabolism in tomato: Isolation and identification of N-glucoside conjugates. Pest. Biochem. Physiol. 19:270-281.
- Medina, T. 2011. com. pers.
- Medina, T., Vuelvas, M. A., Aguilar, L., Grageda, O. A., Gámez, J. & Arreola, J. M. 2007a. Resultados preliminares de los bioensayos realizados sobre alpiste silvestre (*Phalaris minor* L.) resistente a herbicidas colectado en la región del Bajío. p. 33-41. *In*: Memoria del XXVIII Congreso Mexicano de la Ciencia de la Maleza. Mazatlán, Sin., México.
- Medina, T., Vuelvas, M. A., Martínez, J., Gámez, J. & Arreola, J. M. 2007b. Resultados preliminares de los bioensayos realizados sobre avena silvestre (*Avena fatua* L.) resistente a herbicidas colectada en la región del Bajío. p. 19-28. *In*: Memoria del XXVIII Congreso Mexicano de la Ciencia de la Maleza. Mazatlán, Sin., México.
- Michitte, P., Gauvrit, C., Heredia, A. & De Prado, R. 2004. Resistance to glyphosate in *Lolium multiflorum*: Involvement of epicuticular waxes? p. 597-602. *In*: XII Colloque International sur la Biologie des Mauvaises Herbes. Dijon, France.
- Moss, S. R. 2002. Herbicide resistant weeds. p. 225-252. *In*: Naylor, R. E. (ed.). Weed management handbook. 9th ed. British Crop Protection Council. Blackwell Publishing. Wiley-Blackwell. London, UK.
- Owen, W. J. & Pallutt, B. 1991. How the crop rotation affects weeds. PSP Pflanzenschutz Praxis 3:14-16.
- Pillmoor, J. B. & Caseley, J. C. 1984. The influence of growth stage and foliage or soil application on the activity of AC 222,293 against *Alopecurus myosuroides* and *Avena fatua*. Ann. Appl. Biol. 105:517-527.

- Pont, V. & Collet, G. F. 1980. Metabolisme du chloro-2-(p-chlorophenyl)-3 propionate de méthyle et problème de sélectivité. *Phytochem.* 19:1361-1363.
- Retzinger, E. J. & Mallory-Smith, C. 1997. Classification of herbicides by site of action for weed resistance management strategies. *Weed Technol.* 11:384-393.
- Rodríguez-Castellanos, L. & Sánchez-Hernández, J. 2007. Earthworm biomarkers of pesticide contamination: Current status and perspectives. *J. Pestic. Sci.* 32:360-371.
- Rosales-Robles, E. & Esqueda-Esquivel, V. A. 2011. Modo de acción de los herbicidas. p. 193-218. *In: Bojórquez-Bojórquez, G. A., Rosales-Robles, E. Zita-Padilla, G., Vargas-Tristán, V. & Esqueda-Esquivel, V. A. (eds.). Manejo de malezas en México. Vol. I. Maleza terrestre. Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, Sin., México.*
- Ross, M. A. & Lembi, C. A. 1985. Applied weed science. Burgess Publishing Co. Prentice Hall. Minneapolis, MN, USA. 340 p.
- Ruiz-Santaella, J. P., Heredia, A., Osuna, M. D. & De Prado, R. 2004. Influence of cuticular waxes in the absorption of cyhalofop-butyl in *Oryza sativa* L. and *Echinochloa oryzoides* populations. p. 169-176. *In: Proceedings of the Conference Challenges and Opportunities for Sustainable Rice-based Production Systems. Torino, Italy.*
- Ruiz-Santaella, J., Wagner, J., Gerhards, R. & De Prado, R. 2006. Detection of a new mutation of glycine to serine in the ACCase of a resistant biotype of *Phalaris paradoxa*. *Weed Sci. Soc. Am. Abstr.* 46:93.
- Ryan, G. F. 1970. Resistance of common groundsel to simazine and atrazine. *Weed Sci.* 18:614-616.
- Salas, M. 2001. Resistencia a herbicidas. Detección en campo y laboratorio. p. 251-260. *In: De Prado, R. & Jorrín, J. V. (eds.). Uso de herbicidas en la agricultura del siglo XXI. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. Córdoba, España.*
- Sanyal, D., Bhowmik, P., Anderson, R. & Shrestha, A. 2008. Revisiting the perspective and progress of integrated weed management. *Weed Sci.* 56(1):161-167.
- SEMARNAT. 2001. Ordenamiento ecológico del territorio. Memoria Técnica. SEMARNAT. México, D.F.
- Sherman, T. D., Vaughn, K. C. & Duke, S. 1996. Mechanism of action and resistance to herbicides. p. 14-28. *In: Duke, S. O. (ed.). Herbicide resistant crops. CRC Press. Boca Raton, FL, USA.*
- Shimabukuro, R. H. 1985. Detoxification of herbicides. p. 215-240. *In: Duke, S. (ed.). Weed Physiol. Vol. 2. CRC Press. Boca Raton, FL, USA.*
- Singh, S., Kirkwood, R. C. & Marshall, G. 1999. Biology and control of *Phalaris minor* Retz. (littleseed canarygrass) in wheat. *Crop Protect.* 18:1-16.

- Tamayo E., L. M., & Martínez C., J. L. 2002. Resistance of little seed canary-grass *Phalaris minor* Retz. and hood canary-grass *Phalaris paradoxa* L. to commercial herbicides in the Yaqui Valley of Sonora, México. Resistant Pest Management Newsletter 12(1):37-38.
- Valverde, B. 2007. Status and management of grass-weed resistance in Latin America. Weed Technol. 21(2):310-323.
- Valverde, B., Riches, C. & Caseley, J. 2000. Prevención y manejo de malezas resistentes a herbicidas en arroz: experiencias en América Central con *Echinochloa colona*. Cámara de Insumos Agropecuarios de Costa Rica. San José, Costa Rica. 135 p.
- Velasco L., M. C., Bolaños E., A., Urzúa S., F., Vargas H., M. & Morales G., R. 2007. Resistencia de *Avena fatua* L. a herbicidas inhibidores de la acetil coenzima-a carboxilasa y acetolactato sintasa en biotipos provenientes del Bajío guanajuatense. p. 291-295. In: Memoria del XXVIII Congreso Mexicano de la Ciencia de la Maleza. Mazatlán, Sin., México.
- Vencill, W. 2002. Herbicide handbook. 8th ed. Weed Science Society of America. Lawrence, KS, USA. 493 p.
- Villaseñor R., J. & Espinosa-García, F. 2004. The alien flowering plants of Mexico. Diversity Distrib.10:113-123.
- WSSA. 2012. International Survey of Herbicide Resistant Weeds. [consultado el 31 de mayo de 2012]. <http://www.weedscience.org/Summary/UniqueCountry.asp?lstCountryID=29&FmCountry=Go>

Capítulo II

Estudio monográfico del género *Phalaris* en México

1. Introducción

México es uno de los países con mayor megadiversidad en el mundo. Ocupa el quinto lugar en cuanto al número de especies de plantas, el cuarto en anfibios, el segundo en mamíferos y el primero en reptiles; sin embargo, esta biodiversidad está amenazada por cinco factores: el cambio del hábitat, la sobreexplotación, la contaminación, las especies exóticas invasoras y el cambio climático (Koleff *et al.*, 2010). Aunque la afectación de todos estos factores es importante, la presencia de especies invasoras puede considerarse de muy alto impacto, no solamente en la biodiversidad, sino en el desarrollo económico y el bienestar humano (GBIF, 2011). Una especie invasora es una planta, animal o patógeno microscópico que una vez fuera de su hábitat natural, se establece, propaga y daña el medio ambiente, la economía o la salud humana en su nuevo hábitat (Arriaga *et al.*, 2004; Naranjo y Dirzo, 2009; Comisión para la Cooperación Ambiental de América del Norte, 2011).

Si bien la flora arvense en México es en su mayoría nativa (SEMARNAT, 2000), el número de especies exóticas que ingresan al país es cada vez mayor, debido a la apertura comercial. La introducción de especies exóticas inició en tiempos de la colonización española; así, en el norte de México, 80% de las introducciones de plantas son especies que provienen de África, Asia y Europa. De acuerdo con Villaseñor y Espinosa-García (2004), la familia Poaceae es la que registra mayor número de especies introducidas al país, con 74 géneros y 171 especies. Entre ellas, destacan el zacate Buffel (*Cenchrus ciliaris* L.), el zacate Llanero (*Andropogon gayanus* Kunth), el zacate Tanzania (*Megathyrsus maximus* (Jacq.) B.K. Simon & S.W.L. Jacobs) y el zacate Bermuda (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.). Estos pastos se introdujeron intencionalmente para su cultivo como forraje de ganado, y en algunos casos para prevenir la erosión; son especies con facilidad de adaptación, rápido crecimiento, resistencia a la sequía y alta productividad de biomasa. Su adaptación ha sido exitosa debido a la similitud de condiciones climáticas entre las áreas de introducción y las de su distribución original. Su dispersión en ecosistemas nativos se dio en relativamente pocos años, en los que prácticamente han remplazado la cubierta vegetal nativa y modificado los regímenes de incendios en la región (Arriaga *et al.*, 2004; Villaseñor y Magaña, 2006).

El género *Phalaris* pertenece a la familia Poaceae o Gramineae. Esta familia está presente en prácticamente cualquier bioma, por lo que se considera como uno de los grupos vegetales mejor adaptados a diferentes ambientes. Las gramíneas son un grupo vegetal de gran importancia económica. Muchas especies de esta familia presentes en México son introducidas, y algunas de ellas son cultivadas a gran escala (Dávila *et al.*, 2006). El arroz (*Oryza sativa*), maíz (*Zea mays*), trigo (*Triticum aestivum*), sorgo

(*Sorghum bicolor*) y centeno (*Secale cereale*), del grupo de los cereales, constituyen la dieta básica de gran parte de la humanidad; algunos de ellos también son importantes para la alimentación animal, por los productos que se obtienen de fermentaciones alcohólicas (cerveza, whisky y sake), y como productoras de aceite (maíz). De otras gramíneas, como la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) se obtiene el azúcar, y el bambú (*Bambusa* sp.), proporciona materiales de construcción. En contraste, otras especies de esta familia son consideradas malezas importantes de los principales cultivos del mundo.

El género *Phalaris* L. es originario de Eurasia, no obstante, cuenta con especies nativas de América. Singh *et al.* (1999) consideran un total de 22 especies, 11 de las cuales se consideran nativas de la cuenca mediterránea; sin embargo, como se verá más adelante, algunas de estas especies son en realidad nombres no válidos y corresponden a sinonimias de las especies aceptadas.

El alpiste (*Phalaris canariensis* L.) es la única especie del género *Phalaris* que se cultiva comercialmente, para alimento de pájaros. Es una planta nativa de Europa, que fue introducida en Estados Unidos de América en los años cincuenta, y posteriormente en Canadá en los setenta del siglo pasado. Actualmente, en el último país se obtiene el 75% de la producción mundial de este cereal (Lin, 2005), con un promedio anual de 192.100 t (Canadian Grain Commission, 2009) (Ver Figura 2.1).

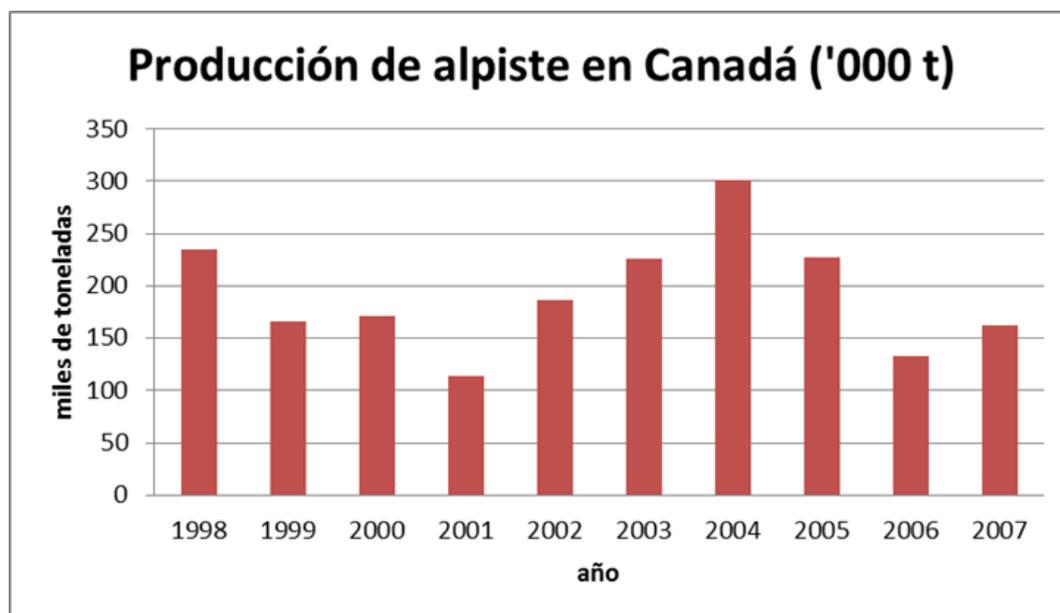


Figura 2.1. Producción anual de alpiste en Canadá de 1998 a 2007. Fuente: Canadian Grain Commission (2009).

En México, la superficie cultivada con alpiste es muy pequeña; en el ciclo agrícola 2009 solamente se sembraron 163 ha en Oaxaca y 16 ha en Coahuila (SIAP, 2011). Por otra parte, en los últimos cuatro años se importaron en promedio 37.169 t, provenientes casi en su totalidad de Canadá (SE, 2011) (Ver Figura 2.2).

En contraste, otras especies de *Phalaris*, como *P. minor* y *P. paradoxa*, entre otras, son malezas importantes del trigo, cebada, avena y centeno (Villaseñor y Espinosa-García, 2004; Vibrans, 2011). En el Bajío guanajuatense, estas malezas pueden ocasionar reducciones en el rendimiento del trigo y la cebada de 30 a 60%, y su control representa del 12 al 15% del costo total del cultivo (Medina y Arévalo, 2000; Medina *et al.*, 2009).

Las malezas de los cereales se controlan básicamente mediante la aplicación de herbicidas selectivos, destacando los inhibidores de la ACCasa, utilizados para controlar malezas gramíneas, que son las especies dominantes. La aplicación de estos herbicidas se ha utilizado como el principal método de control en las regiones productoras de cereales desde 1976 con Iloxan® (diclofop-metil), en 1989 con Puma® (fenoxaprop-P-etil), y después en 1996 con Puma S® (fenoxaprop-P-etil); en 2004 se liberó Sigma S® (mesosulfurón-metil + iodosulfurón-metil) (Santos-González, 2011).

La aplicación reiterada de los herbicidas inhibidores de la ACCasa, provocó una fuerte presión de selección, dando lugar a la detección de biotipos resistentes en las poblaciones de *P. minor* y *P. paradoxa* en siembras de trigo del Bajío en 1996, que fueron los primeros casos de resistencia a herbicidas en México, de acuerdo al informe internacional de malezas resistentes (WSSA, 2012).

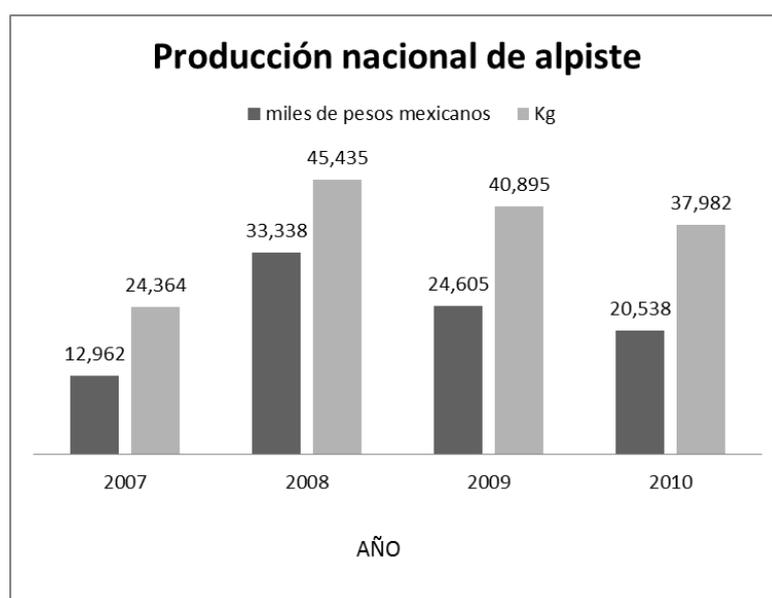


Figura 2.2. Valor y volumen de la producción de alpiste en México (SIAP, 2011).

Quiñones y Tafoya, (2008) han realizado estudios que indican que pyroxsulam controla satisfactoriamente malezas resistentes a Puma Super®, Topik® (clodinafop-propargil) y Grasp® (tralkoxidim), en el Bajío guanajuatense.

Debido a la problemática para controlar por medios químicos los biotipos de *Phalaris* resistentes a inhibidores de la ACCasa, en el Bajío guanajuatense (Delgado *et al.*, 2007; Delgado y Morales, 2008), en el Valle de Mexicali, B. C. y en San Luis Río Colorado, Son. (López *et al.*, 2007) se han desarrollado estrategias para el manejo integrado de malezas en trigo. Otros autores también llaman la atención sobre la importancia de la rotación de cultivos en el manejo integrado de estas malezas (Tafoya *et al.*, 2006).

Numerosos autores han resaltado la importancia del conocimiento preciso de la sistemática, biología y ecología de las especies de maleza como base para un mejor manejo y control de las mismas (FAO, 1997; Mortensen *et al.*, 1999; Cousens, 2001; Marshall *et al.*, 2003; Damalas, 2008; Royo y López, 2008; Neve *et al.*, 2009).

Por otro lado, México al ser signatario de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (IPPC, por sus siglas en inglés), tiene la responsabilidad de contar con registros de las plagas presentes en el país (NIMF 5), sin que hasta el momento se cuente con ellos. Los registros de plagas son componentes esenciales de la información utilizada para establecer su situación en un área o región determinada. Todos los países importadores y exportadores necesitan información relativa a la situación de plagas para los análisis del riesgo, para el establecimiento de reglamentaciones de importación y para el cumplimiento de las mismas, así como para el establecimiento y mantenimiento de áreas libres de plagas (Secretaría de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria, 2005).

La confiabilidad de los registros de plagas se basa en la consideración de los datos relativos a: el recolector/identificador, el medio de identificación técnica, la ubicación y la fecha del registro y su registro y/o publicación (Ver Tabla 2.1). La situación de una plaga se determina utilizando la información de registros individuales, registros de la plaga provenientes de encuestas, antecedentes sobre la ausencia de ella, hallazgos a través de la vigilancia general, así como publicaciones y bases de datos científicos (Secretaría de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria, 2005).

Recapitulando, *P. minor* es una especie invasora en México que ha presentado biotipos resistentes a herbicidas en los cultivos de cereales, lo cual también se reporta en otros países. El conocimiento que se tiene de la flora arvense en México no es suficiente, y no existen catálogos de plagas a pesar de que México es signatario de la IPPC. En el caso particular del género *Phalaris*, no se tienen revisiones actualizadas de su biología, ecología, ni de su distribución exacta. Debido a la problemática agronómica y económica

generada por la resistencia a herbicidas de los diferentes biotipos de *Phalaris*, es de importancia prioritaria elaborar estudios conducentes a obtener un mayor conocimiento de la situación, distribución y caracterización de las diferentes especies de este género. En el presente capítulo se determina el área de distribución actual y potencial de las especies más abundantes de maleza pertenecientes al género *Phalaris* (*P. minor* y *P. paradoxa*), al tiempo que se sintetizan sus características botánicas y diagnósticas, con el objeto de sentar las bases para estudios posteriores de análisis de riesgo y para la prevención de aparición de biotipos resistentes.

Tabla 2.1. Guía para evaluar la confiabilidad de un registro de una plaga conforme a la NIMF-8¹
(Las fuentes se clasifican de más confiable a menos confiable).

1. Colectores/ Identificadores	2. Información técnica	3. Ubicación y fecha	4. Registro/ Publicación
a. Especialista taxonómico	a. Diagnóstico discriminador bioquímica o molecular (si está disponible)	a. Encuestas de delimitación o de detección	a. Registro de la ONPF/Publicación de la ONPF ² (con aprobación editorial)
b. Especialista profesional, técnico diagnóstico	b. Espécimen o cultivo mantenido en una colección oficial; descripción taxonómica por especialista	b. Otras encuestas de campo o de producción	b. Revista científica o técnica con aprobación editorial
c. Científico	c. Espécimen en una colección general	c. Observación de campo casual o incidental, posiblemente sin ubicación/fecha definida	c. Registro oficial histórico
d. Técnico	d. Descripción y fotografía	d. Observación de productos o subproductos; intercepción	d. Documento científico técnico sin aprobación editorial
e. Aficionado experto	e. Sólo descripción visual	e. Ubicación y fecha exactas desconocidas	e. Publicación de aficionado especialista
f. No especialista	f. Método de identificación desconocido		f. Documento científico o técnico no publicado
g. Recolector/ identificador desconocido			g. Publicación no técnica; periódico/diario h. Informe personal; no publicado

¹Norma Internacional para Medidas Fitosanitarias Número 8. (Secretaría de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria, 2005).

²Organismo Nacional de Protección Fitosanitaria; en el caso de México corresponde a la Dirección General de Sanidad Vegetal.

2. Objetivos

Coadyuvar al conocimiento botánico del género *Phalaris* en México.

Establecer la presencia de las especies del género *Phalaris* en México.

Establecer el comportamiento malezoide de las especies del género *Phalaris* presentes en México.

Determinar el área de distribución actual y potencial de las especies de *Phalaris* en México.

Caracterizar botánicamente a *P. minor*.

3. Materiales y métodos

3.1. Definición de las especies de maleza del género *Phalaris* presentes en México

Se realizó una búsqueda de todos los ejemplares del género *Phalaris* en los herbarios consignados en la Red Mundial de Información sobre Biodiversidad (REMIB) mediante el portal de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO. REMIB, 2008), así como los sitios Web “PLANTS” del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América (USDA, 2011), el “Manual de Pastos de Norteamérica” de la Universidad de Utah (Utah State University, 2011), “La Flora Mundial de Pastos on-line” del Jardín Botánico de Kew (Clayton *et al.*, 2010) y el manual JEP’s de la Universidad de California (University of California Berkeley, 2011). También se hizo revisión de los ejemplares herborizados del Herbario Nacional de la Universidad Nacional Autónoma de México (MEXU) y del Herbario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB) del Instituto Politécnico Nacional, así como en bibliografía especializada. La nomenclatura fue cotejada en esos mismos sitios, en el Sistema Integrado de Información Taxonómica (ITIS, 2011) y en el Catálogo de Pastos del Nuevo Mundo de “Tropicos” (TROPICOS, 2011).

Se elaboró una base de datos con los siguientes campos: especie, autor, nombre común, estado, municipio, localidad, coordenadas, altitud, hábitat, colector, número de colecta, fecha de colecta, determinación, descripción, herbario y número de colección. Estos datos fueron compulsados con las fuentes bibliográficas que se enlistan en el apartado correspondiente. La información recabada se validó con base en lo establecido en la Norma Internacional para Medidas Fitosanitarias Número 8 (Secretaría de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria, 2005), y con la misma base se estableció el estado de cada una de las especies, es decir, se determinó si está presente, ausente o es transitoria.

Adicionalmente, con base en la información proveniente de las etiquetas de herbario, se seleccionaron aquellas cuyo sitio de colecta correspondía a ecosistemas antropogénicos, caracterizándolas así como maleza o mala hierba.

Se revisó la sinonimia del género y cada una de sus especies para obtener una lista depurada de especies válidas presentes en México. En esta lista se incluyeron las especies del género de las cuales se cuenta con algún registro bibliográfico o de herbario. La sinonimia se realizó con base en lo publicado por Dávila *et al.* (2006), compulsada con ITIS (2011) y TROPICOS (2011).

De las especies con comportamiento malezoide se tomaron fotografías de los ejemplares de MEXU que mostraban las mejores características diagnósticas, con base en la identificación por el experto agrostólogo de MEXU, Jorge Gabriel Sánchez-Ken (Sánchez-Ken *et al.*, 2012).

3.2. Distribución geográfica actual y potencial de las especies de malezas de *Phalaris*

A partir de la información de la base de datos de las especies de *Phalaris*, los registros fueron georreferenciados siguiendo las recomendaciones de GBIF (Chapman y Wieczored, 2006). Una vez obtenidas las coordenadas geográficas de las localidades, se generaron los mapas de distribución conocida en México para cada especie; adicionalmente, cuando se contó con los registros suficientes, se elaboró el modelo de distribución potencial de la especie, que se sobrepuso al mapa con los sitios de recolecta conocidos.

Para elaborar los modelos de distribución potencial, se consideraron veinte variables como predictoras potenciales de la distribución de *Phalaris* en México. De ellas, 19 variables bioclimáticas fueron obtenidas de la base de datos de WorldClim (Hijmans *et al.*, 2005), y la altitud fue obtenida de un modelo digital de elevación de la misma página de WorldClim; la resolución espacial en todas las variables es de 1 km².

Se usó el modelo de distribución de máxima entropía o Maxent, el cual ha presentado el mejor desempeño entre diferentes métodos de modelación (Elith *et al.* 2006; Ortega-Huerta y Peterson, 2008), y puede ser efectivo a pesar de contar con muestras pequeñas (Hernández *et al.*, 2006). Maxent estima la probabilidad de ocurrencia de la especie buscando la distribución de máxima entropía (lo más uniforme posible), sujeta a la condición de que el valor esperado de cada variable ambiental coincida con su media empírica (Phillips *et al.*, 2006). Para el análisis, sólo se requiere de datos de presencia de las especies (no ausencias) y capas de variables ambientales (continuas o categóricas) para el área de estudio. Se empleó la versión gratuita de Maxent versión 3.3.3a (Princeton University, 2011), que genera un estimado de la probabilidad de la presencia de las especies que varía de 0 a 1, donde 0 es la más baja probabilidad y 1 la más alta. En las especies con más de cinco registros, se seleccionó el 75% de los registros para entrenar el modelo. En todos los modelos se emplearon inicialmente las veinte variables, y posteriormente se evaluó su contribución al modelo con la prueba de Jackknife, incorporada al programa. Tras esta evaluación, se volvió a generar el modelo sólo con

aquellas variables consideradas como relevantes, seleccionadas mediante un análisis de medias.

Los modelos de salida continuos generados por Maxent registran una probabilidad logística de 0.00 a 1.00, que pueden ser transformados en mapas Booleanos de áreas de presencia-ausencia por medio de la aplicación de umbrales o cortes; esto es, todos los pixeles con valores abajo del umbral seleccionado son reclasificados como "0". Determinar el umbral óptimo es un tópico todavía no muy explorado en Maxent (Phillips *et al.*, 2006); sin embargo, aquí empleamos como umbral el valor logístico correspondiente al error de omisión del 10%, el cual mantiene una alta proporción de presencias correctamente predichas, y que de manera comparativa también se ha aplicado por Pearson *et al.* (2007), Suárez-Seoane *et al.* (2008) y Kumar y Stohlgren (2009). Tras realizar el corte en ArcGIS 10, el área de presencia de la especie fue reclasificada en tres categorías iguales de probabilidad de presencia: baja, media y alta.

Para aquellas especies que no contaban con al menos cinco registros para poder hacer la modelación, únicamente se realizaron mapas señalando mediante figuras los sitios conocidos de recolecta.

3.3. Caracterización botánica de *Phalaris minor*

Se hicieron las descripciones del género *Phalaris* y de *P. minor* en México, incluyendo en cada caso los sinónimos, una ilustración, su descripción, distribución geográfica, hábitat o cultivo asociado, información sobre reportes de resistencia, y fecha del primer y último registro.

Las descripciones del género y especie se elaboraron con base en las siguientes fuentes: Díaz (1976), Baldini (1995), Espinosa y Rodríguez (1996), Espinosa y Sarukhán (1997), Hari *et al.* (2003), Soreng *et al.* (2003), Wilson (2003), Clayton *et al.* (2010), Barkworth (2011), GBIF (2011), University of California Berkeley (2011), USDA (2011) y Vibrans (2011).

Se realizó una revisión de todos los casos conocidos de resistencia en México, con base en la página Web de la "International Survey of Herbicide Resistant Weed" (WSSA, 2012) y de trabajos en memorias de congresos nacionales e internacionales, fuentes bibliográficas y encuestas a especialistas.

4. Resultados y discusión

4.1. Definición de las especies de malas hierbas del género *Phalaris* presentes en México

El Sistema Integrado de Información Taxonómica (ITIS, 2011) incluye 170 taxones infragenéricos de *Phalaris* L., la mayoría de los cuales son sinónimos o nombres no válidos; sólo 15 están aceptados como especies, y dos como subespecies. En México, se tiene registro de 10 especies (Tabla 2.2).

De las especies presentes en México, *P. canariensis* L., *P. minor* Retz. y *P. paradoxa* L. se consideran invasoras (Villaseñor y Espinosa-García, 2004).

Todas las fuentes consultadas incluyen ejemplares de *P. canariensis*. Mientras que *P. minor* se cita en seis de las fuentes, y se cuenta con más de 100 ejemplares de herbario. Por su lado, *P. paradoxa* se cita en seis fuentes y cuenta con más de 20 ejemplares colectados. *P. caroliniana*, aunque también se cuenta con más de 20 ejemplares colectados, no la citan ni Villaseñor y Espinosa-García (2004), ni Herrera y Cortés (2010).

El resto de las especies tienen cuatro citas o menos, y un número muy escaso de colectas.

Con base a la NIMF08, *P. minor*, *P. canariensis*, *P. paradoxa* y *P. caroliniana* se consideran como presentes en México con base en su número de colectas, que estas colectas se ubican en una colección oficial, o están incluidas en un artículo arbitrado e identificadas por especialistas; cabe hacer notar, que de esta última no se encontraron referencias que indiquen un comportamiento malezoide.

P. arundinacea, aunque se presenta en un área restringida, pues sólo se reportan colectas en una pequeña porción del estado de Baja California, debe ser considerada como especie de interés agrícola, dado que se encuentra distribuida en prácticamente todo el territorio de los Estados Unidos de América, e incluso, está considerada como especie invasora y maleza nociva por el Departamento de Agricultura de dicho país (USDA, 2011).

P. angusta y *P. aquatica* se consideran ausentes, dado que sólo se cuenta con un ejemplar de herbario de cada una, los cuales carecen de datos precisos de colecta e identificador. El ejemplar de *P. lemmonii* reportado, tiene datos precisos, pero no existen más colectas, lo que hace suponer que no existe en el territorio nacional, por lo que se le considera transitoria, a reserva de efectuar trabajo de campo que dilucide su situación (Tabla 2.2).

En la etiqueta de herbario del ejemplar de *P. californica* colectado en Chapingo, se indica que es una planta cultivada, por lo que probablemente es una identificación errónea de *P. canariensis*.

Con respecto a *P. brachystachys*, sólo se encontró un ejemplar en el herbario MEXU, aunque según Medina (2011, com. pers.) se han detectado poblaciones de biotipos resistentes a herbicidas de esta especie en siembras de trigo en el estado de Guanajuato. Dado que este ejemplar cuenta con datos precisos de identificación y ubicación, está revisado por un especialista (Sánchez-Ken *et al.*, 2012), además de que existe el antecedente de citación en un boletín técnico del Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato -sin comité editorial- (CESAVEG, 2007), se deberá considerar como presente. Además, dado que es una especie reportada como resistente a inhibidores de la ACCasa en Italia y con resistencia múltiple (ACCasa y ALS) en Turquía (HRAC, 2012), se recomienda realizar el estudio de riesgo de esta especie, así como el seguimiento de la evolución de biotipos resistentes

Tabla 2.2. Registros de especies de *Phalaris* en México según diversas fuentes.

Número	Especie	REMIB ¹	Villaseñor ²	Herrera ³	TROPICOS ⁴	ENCB ⁵	Dávila ⁶	MEXU ⁷	TOTAL
1	<i>Phalaris canariensis</i> L.	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	7
2	<i>Phalaris minor</i> Retz.	sí	sí		sí	sí	sí	sí	6
3	<i>Phalaris paradoxa</i> L.	sí	sí		sí	sí	sí	sí	6
4	<i>Phalaris caroliniana</i> Walter	sí			sí	sí	sí	sí	5
5	<i>Phalaris arundinacea</i> L.				sí	sí	sí	sí	4
6	<i>Phalaris angusta</i> Nees ex Trin.	sí	sí		sí		sí		4
8	<i>Phalaris aquatica</i> L.				sí		sí		2
7	<i>Phalaris brachystachys</i> Link				sí			sí	2
9	<i>Phalaris lemmonii</i> Vasey				sí			sí	2
10	<i>Phalaris californica</i> Hook. & Arn.					sí			1
11	<i>Phalaris peruviana</i> H. Scholz & Gutte								0
12	<i>Phalaris amethystina</i> Trin.								0
13	<i>Phalaris arundinacea</i> var. <i>arundinacea</i> L.								0
14	<i>Phalaris arundinacea</i> var. <i>picta</i> L.								0
15	<i>Phalaris coerulescens</i> Desf.								0
16	<i>Phalaris lindigii</i> Baldini								0
17	<i>Phalaris platensis</i> Henrard ex Wacht.								0

1. CONABIO. REMIB (2008), 2. Villaseñor y Espinosa-García (2004), 3. Herrera y Cortés (2010), 4. TROPICOS (2011), 5. Herbario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, 6. Dávila *et al.* (2006), 7. Herbario Nacional de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Con base en los datos recolectados en ejemplares de herbario, la identificación precisa de los mismos y el análisis de etiquetas mediante la base de datos, se seleccionaron aquellas especies que manifiestan un comportamiento malezoide, es decir, fueron colectadas en ambientes antropógenos; con esta información, se elaboró la Tabla 2.3. Se incluyen fotografías de los ejemplares mejor conservados de las especies más distribuidas (Figuras 2.3 a 2.10).

Tabla 2.3. Especies de maleza del género *Phalaris* en México.

	Nombre científico	Origen	Notas
1	<i>Phalaris canariensis</i> L.	Introducida	Forraje, potencial como cereal Puede comportarse como maleza
2	<i>Phalaris arundinacea</i> L.	Introducida	Maleza nociva, control de erosión, ornamental, forraje
3	<i>Phalaris brachystachys</i> Link	Introducida	Ruderal, arvense
4	<i>Phalaris paradoxa</i> L.	Introducida	Ruderal, arvense
5	<i>Phalaris minor</i> Retz.	Introducida	Ruderal, arvense

4.2. Imágenes de ejemplares de herbario de las especies de *Phalaris* más comunes

4.2.1. *Phalaris canariensis* L.

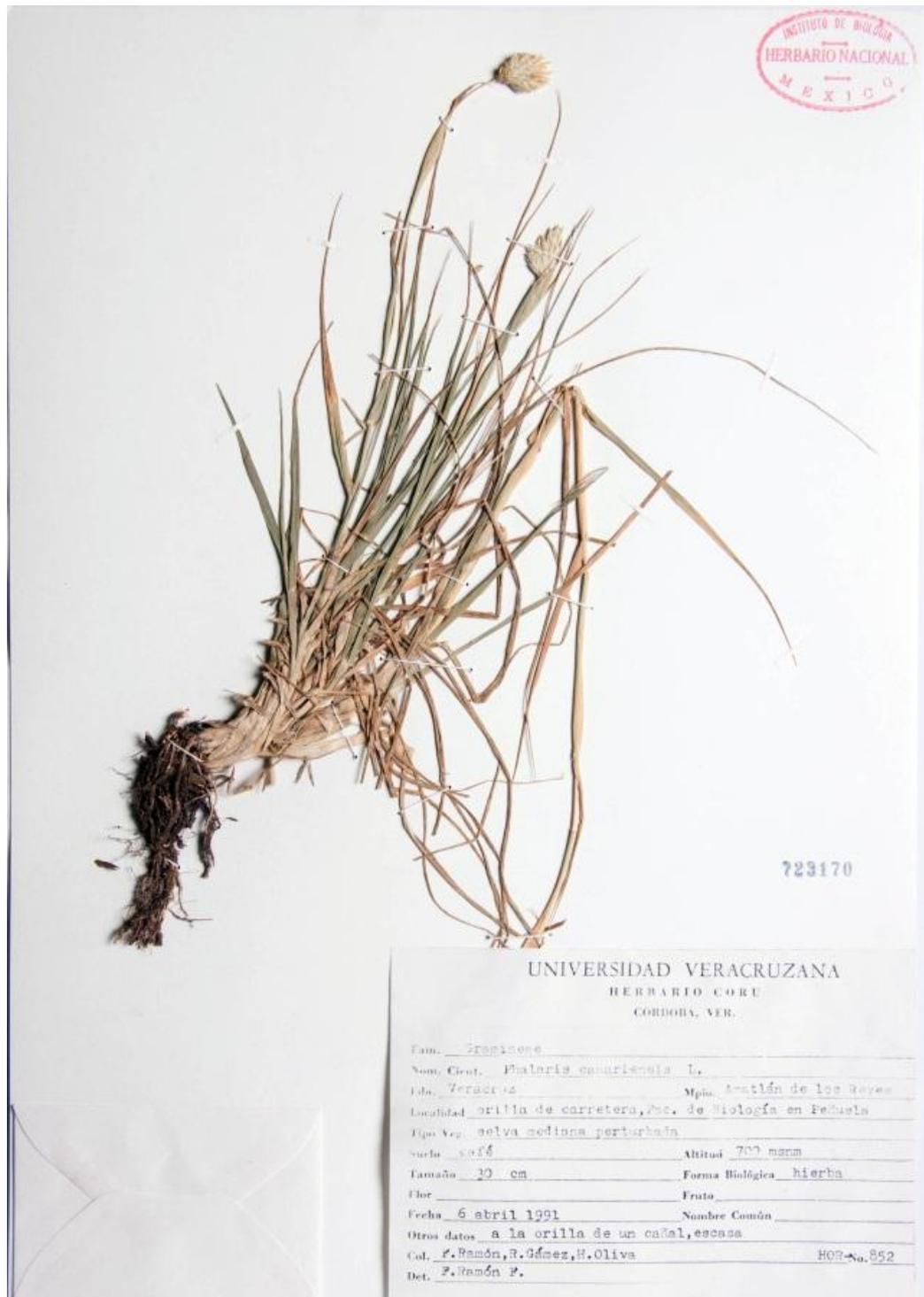


Figura 2.3. *Phalaris canariensis*. Ejemplar de herbario (MEXU).

Fuente: Sánchez-Ken *et al.* (2012).

4.2.2. *Phalaris arundinacea* L.

Figura 2.4. *Phalaris arundinacea*. Detalle de la lámina y lígula.
Fuente: Sánchez-Ken *et al.* (2012).



Figura 2.5. *Phalaris arundinacea*. Detalle de inflorescencia.
Fuente: Sánchez-Ken *et al.* (2012).



Figura 2.6. *Phalaris arundinacea*. Ejemplar de herbario (MEXU).
Fuente: Sánchez-Ken, *et al.* (2012).

4.2.3. *Phalaris paradoxa* L.



Figura 2.7. *Phalaris paradoxa*. Ejemplar de herbario (MEXU).
Fuente: Sánchez-Ken *et al.* (2012).



Figura 2.8. *Phalaris paradoxa*.
Detalle de la lámina.
Fuente: Sánchez-Ken *et al.* (2012).

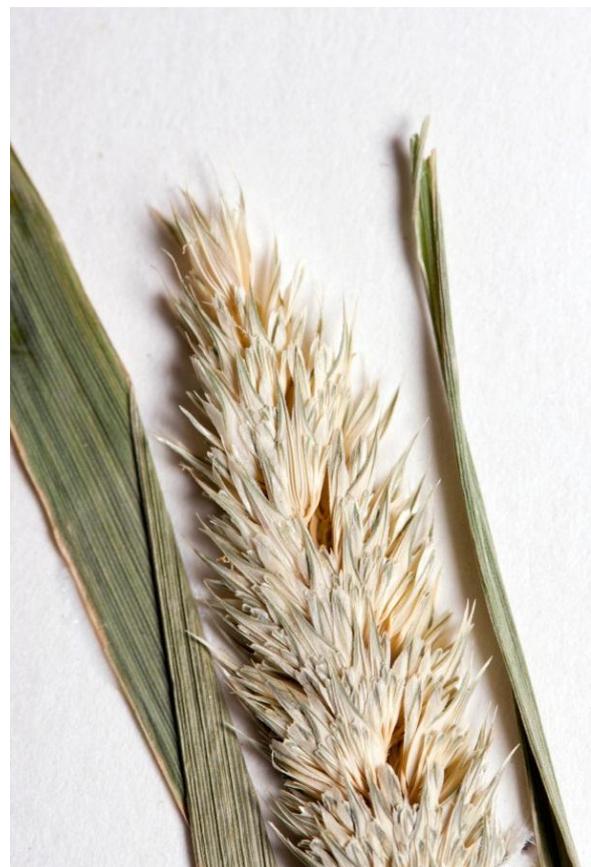


Figura 2.9. *Phalaris paradoxa*.
Detalle de la inflorescencia.
Fuente: Sánchez-Ken *et al.* (2012)

4.2.4. *Phalaris minor* Retz.



Figura 2.10. *Phalaris minor*. Ejemplar de herbario (MEXU).
Fuente: Sánchez-Ken *et al.* (2012).

4.3. Distribución geográfica actual y potencial de las especies de malezas de *Phalaris*

Como fue referido al inicio de este capítulo, *P. canariensis* fue introducido a América como un cultivo forrajero para alimentación de aves canoras. Sin embargo, en muchas de las colectas, se reporta como maleza asociada a cultivos y como maleza ruderal. También se reporta en bosques de pino, matorrales esclerófilos, bosques latifoliados y zonas urbanas.

Se distribuye en Canadá, Estados Unidos de América, Centroamérica, Sudamérica, Caribe y Viejo Mundo.

En México, se encuentra en Campeche, Chihuahua, Chiapas, Distrito Federal, Durango, Jalisco, México, Michoacán, Nuevo León, Oaxaca, Puebla y Sinaloa (Figura 2.11).

P. arundinacea se puede encontrar en Baja California y Chihuahua en la República Mexicana; no obstante, como ya se mencionó, está ampliamente distribuida en Estados Unidos de América. Se le encuentra también en Canadá y el Viejo Mundo. Las colectas datan de 1980 y 1981, y se refieren a un comportamiento arvense.

P. brachystachys, es una maleza presente en Guanajuato, México desde hace poco tiempo; la única colecta es de 1991. Se reporta presente en algunos estados fronterizos de los Estados Unidos de América (California y Texas), además en zonas restringidas de Missouri, Louisiana y Oregon (USDA, 2011).

Tanto *P. arundinacea* como *P. brachystachys* son especies poco colectadas, por lo cual no fue posible realizar la modelación de su distribución actual y potencial. En la Figura 2.12 se incluyen los puntos de colecta.

Los ejemplares de herbario de *P. paradoxa*, indican en la etiqueta reiteradamente su presencia en cultivos de trigo. Se le puede encontrar en Estados Unidos de América, Sudamérica y el Viejo Mundo. En México, los ejemplares de herbario identificados lo ubican en Chihuahua y Jalisco; sin embargo, se reporta como resistente a inhibidores de la ACCasa en Guanajuato, Jalisco, Michoacán (HRAC, 2012) y Sonora (Tamayo y Martínez, 2002). En la Figura 2.13 se puede observar que su área potencial de distribución es muy extensa, es por demás preocupante que las zonas marcadas como de alta probabilidad de presencia coincidan con las zonas trigueras del país. Esta especie también está reportada como resistente a los inhibidores de la ACCasa en

Australia, Irán, Israel e Italia, y como resistente a los inhibidores del fotosistema II en Israel (HRAC, 2012).

La maleza *P. minor*, se puede encontrar en matorrales esclerófilos, asociado a vegetación halófila, bosque de encino, en bosque tropical subdeciduo, así como en dunas costeras. Más comúnmente como ruderal, y en la mayoría de los registros como arvense de cultivos de cereales, predominantemente en trigales, aunque también se puede encontrar asociado a cultivos de maíz, alfalfa y cebada.

Estudios realizados por Alcántara *et al.* (2010), mostraron que esta especie es relativamente susceptible a la sequía, por lo que se presenta principalmente en zonas de riego.

Es de amplia distribución geográfica, estando presente en todos los continentes. Europa: suroeste, sureste y este. África: norte, Macaronesia, noreste y sur tropical, sur. Asia templada: lejano oriente y centro de Rusia, Cáucaso, Asia occidental, Arabia, China y este de Asia. Asia tropical: India y Malasia. Australia y Nueva Zelanda. Pacífico: suroeste y norte central. Norteamérica: zona subártica, Canadá, casi todo el territorio de Estados Unidos de América. Sudamérica: zona mesoamericana, oeste y sur de Sudamérica, Brasil. Antártico: islas subantárticas (Anderson, 1961).

Distribución en México: con base en los ejemplares de herbario revisados, se estableció la distribución actual de *P. minor* en los estados de Baja California, Baja California Sur, Sonora, Coahuila, Nuevo León, Sinaloa, Jalisco, Michoacán, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, Estado de México, Distrito Federal, Veracruz y Puebla. El mapa de distribución potencial indica que su área de distribución es muy extensa, no obstante, se ubica predominantemente en Baja California y el Bajío, que comprende principalmente el territorio no montañoso del estado de Guanajuato, los llanos al oeste de la ciudad de Querétaro y el valle de San Juan del Río en el estado de Querétaro, los valles del norte del estado de Michoacán y las llanuras de oriente en el estado de Jalisco incluyendo los Altos de Jalisco.

La colecta más antigua fue realizada por I. L. Wiggins en la localidad de Tijuana, Baja California en 1931. El último ejemplar fue colectado e identificado por T. R. Van Devender, Reina y Krebs en Caborca, Sonora, el 8 de marzo de 2002.

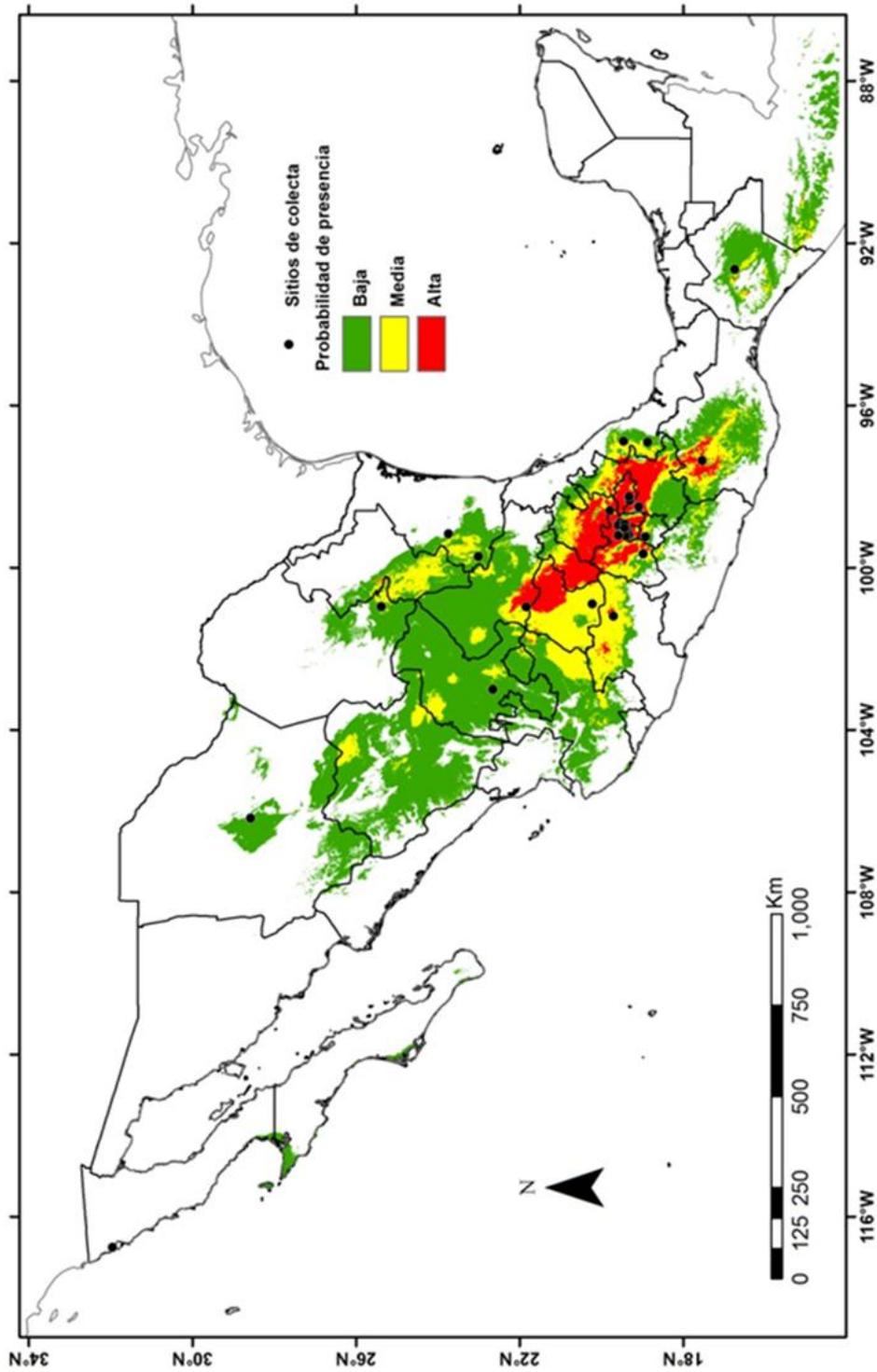


Figura 2.1.1. Distribución actual y potencial de *Phalaris canariensis* en México.

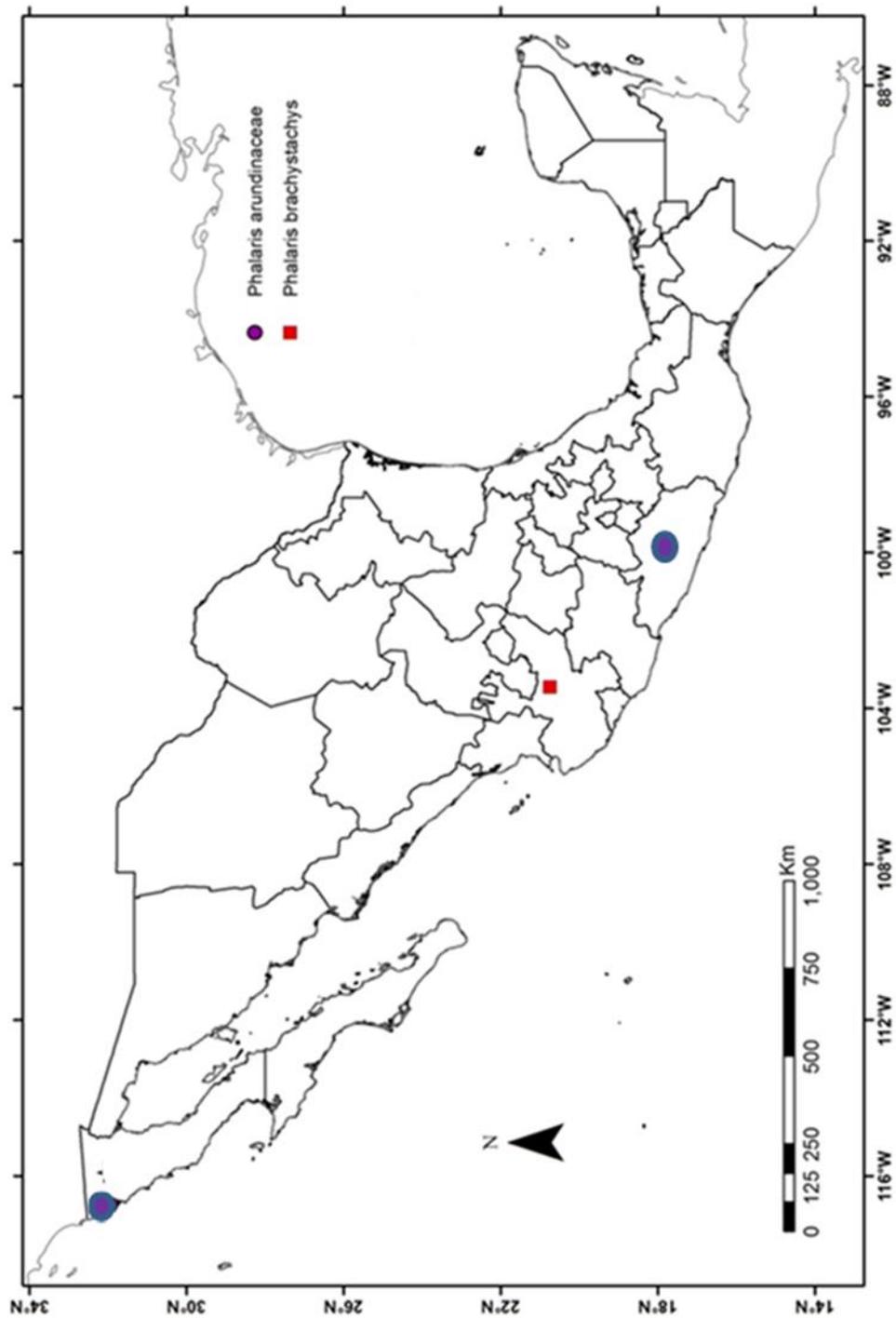


Figura 2.12. Distribución conocida de *Phalaris arundinacea* y *P. brachystachys* en México.

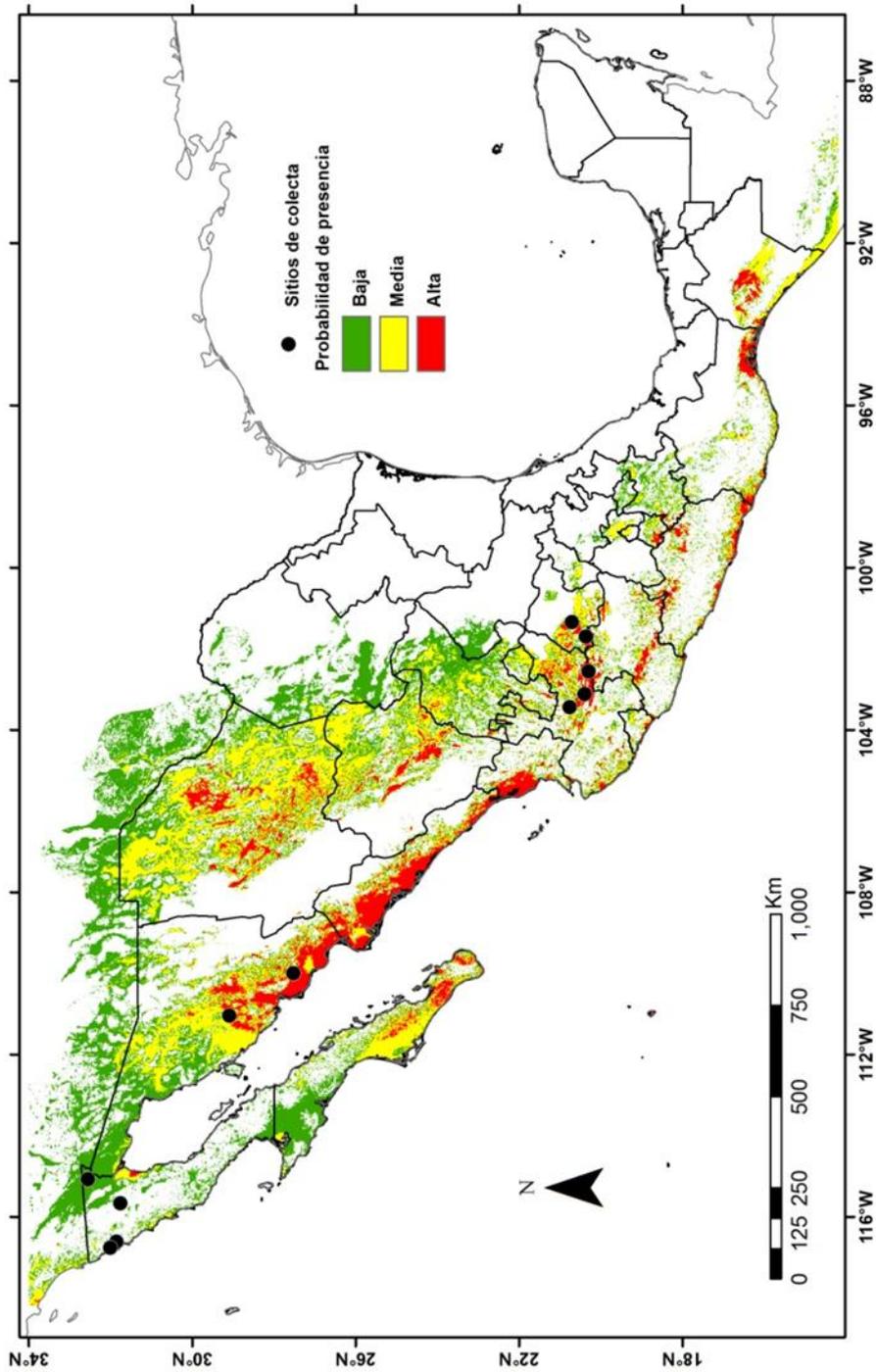


Figura 2.13. Distribución conocida y potencial de *Phalaris paradoxa* en México.

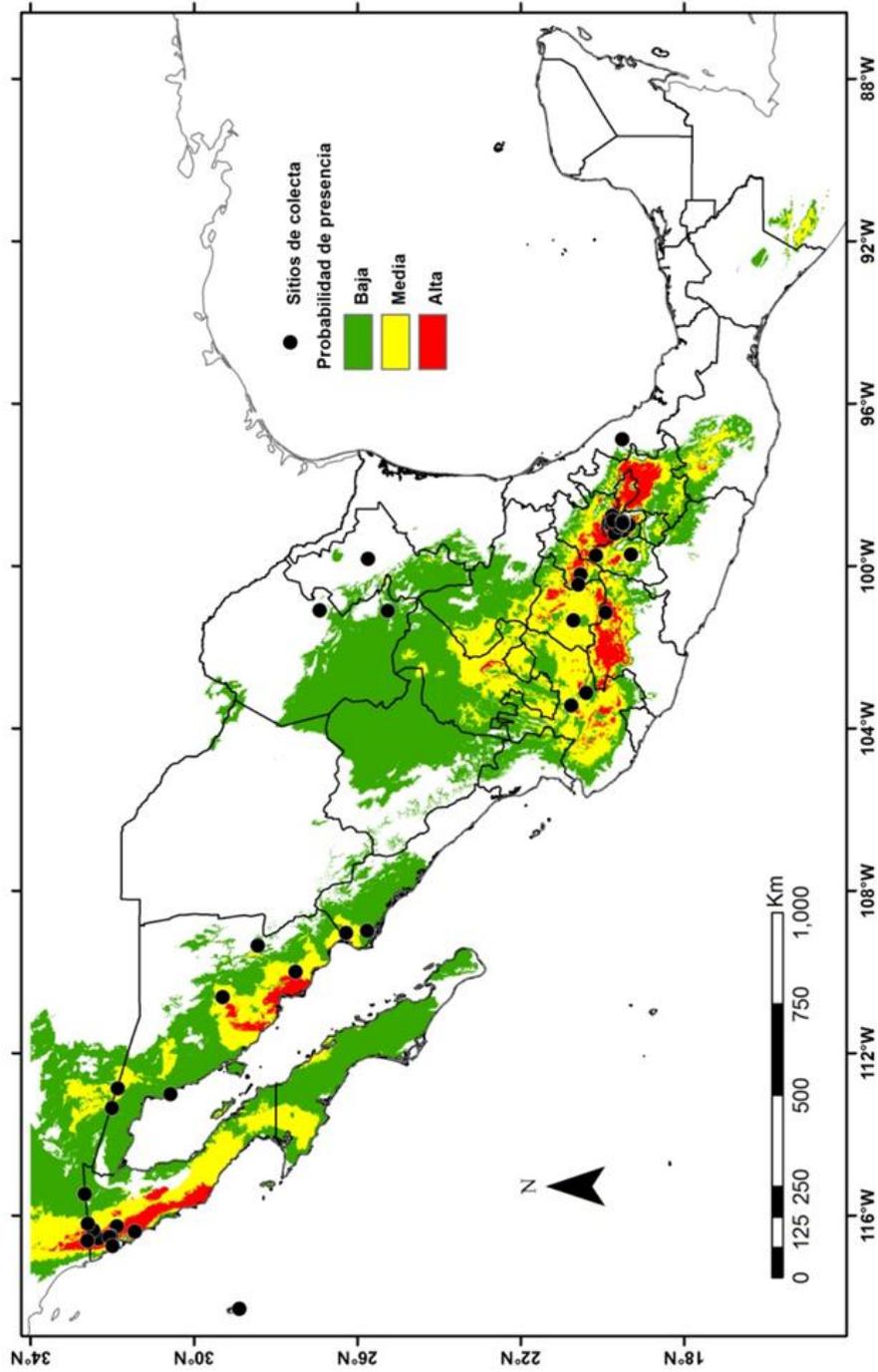


Figura 2.14. Distribución conocida y potencial de *Phalaris minor* en México.

4.4. Caracterización botánica de *Phalaris minor*

4.4.1. Clasificación supragenérica de *Phalaris*

La Familia Poaceae se divide en 13 o 14 subfamilias –según el autor consultado–, siendo la subfamilia Pooideae la más grande de éstas. La supertribu Pooideae pertenece a esta subfamilia, y cuenta con una única tribu, Poeae que agrupa alrededor de 2,260 especies. El género *Phalaris* es clasificado dentro de la subtribu Phalaridinae, perteneciente a la tribu Poeae, y de acuerdo a los estudios de DNA plastídico, se encuentra dentro del linaje de “taxa con pDNA tipo Aveneae”, dentro del cual se encuentran otros géneros como *Avena* y *Briza*. La subtribu Phalaridinae cuenta con dos géneros: *Phalaris* y *Anthoxanthum*, no obstante, no existe evidencia molecular para asegurar que estos géneros formen parte de un grupo monofilético, por lo que se ha propuesto colocarlos en subtribus independientes (Saarela *et al.*, 2010).

En la página Web Tropicos (TROPICOS, 2011) se encuentra información sobre la clasificación de pastos del Nuevo Mundo, conformada por una minuciosa revisión de la clasificación de la familia Poaceae, en donde se incluyen subfamilias, tribus, subtribus y géneros.

4.4.2. Descripción del género *Phalaris*

La palabra *Phalaris* proviene del griego, y etimológicamente significa lustroso, refiriéndose probablemente a lo brillante de la lema, aunque también podría hacer referencia a las glumas aladas.

En este género se incluyen plantas principalmente anuales, aunque existen algunas perennes, con rizomas ausentes o cortos, raras veces elongados. Los tallos son erectos o geniculados, ascendentes, y la lígula es una membrana eciliada. La inflorescencia es una panícula subtendida, cuyo eje es persistente o con espiguillas deciduas agrupadas en clúster. La panícula está contraída, capitada o más comúnmente tiene forma de espiga. Las espiguillas son elípticas, ovadas u obovadas, lateralmente comprimidas. Las glumas son persistentes en la mayoría de las especies, excediendo a los apéndices florales, y más delgadas que la lema fértil. La gluma inferior a menudo con una quilla alada, con tres venas. La gluma superior con la superficie de textura variable, con el ápice truncado, obtuso, agudo, acuminado o atenuado. Las flores tienen dos lodículas membranosas, tres anteras y ovario glabro. El fruto es una cariósida con hilum linear. Distribución: África, Asia, Europa y América.

4.4.3. Sinonimia de *Phalaris minor*

- Phalaris minor* Retz., Observ. Bot. 3: 8. 1783.*
- Phalaris ambigua* Fig. & De Not., Agrostr. Aegypt. 10, t. 6. 1851.
- Phalaris aquatica* Thunb., Prodr. Pl. Cap. 19. 1794.
- Phalaris aquatica* var. *minor* (Retz.) Mutel, Fl. Franc. 4: 15. 1837.
- Phalaris arundinacea* var. *minor* (Retz.) Paunero, Anales Jard. Bot. Madrid 8: 489. 1948.
- Phalaris brevis* Trin., Mém. Acad. Imp. Sci. Saint- Pétersbourg, Sér. 6, Sci. Math., Seconde Pt. Sci. Nat. 5,3(3): 50. 1839.
- Phalaris capensis* Thunb., Prodr. Pl. Cap. 19. 1794.
- Phalaris decumbens* Moench, Methodus 208. 1794.
- Phalaris gracilis* Parl., Pl. Nov. 36. 1842.
- Phalaris haematites* Duval- Jouve & Paris, Bull. Soc. Bot. France 14: 276. 1867.
- Phalaris haematites* var. *granulose* Sennen & Mauricio, Diagn. Nouev. 244. 1936.
- Phalaris mauritii* Sennen, Cat. Fl. Rif. Orient. 125. 1933.
- Phalaris minor* fo. *bracteata* Jansen & Wacht., Ned. Kruidk. Arch. 6: 132. 1917.
- Phalaris minor* var. *comosula* Heldr., Bull. Herb. Boissier 4: 396. 1898.
- Phalaris minor* fo. *composita* Jansen & Wacht., Ned. Kruidk. Arch. 6: 132. 1917.
- Phalaris minor* var. *genuina* Maire & Weiller, Fl. Afrique N. 2: 23. 1953.
- Phalaris minor* fo. *glomerata* Henrard ex Jansen & Watch., Ned. Kruidk. Arch. 6: 131. 1917.
- Phalaris minor* fo. *gracilis* (Parl.) Asch. & Graebn., Syn. Mitteleur. Fl. 2 (1): 21. 1898.
- Phalaris minor* subsp. *gracilis* (Parl.) Arcang., Comp. F1. Ital. 1: 70. 1882.
- Phalaris minor* var. *gracilis* (Parl.) Parl., Fl. Ital. 1: 70. 1848.
- Phalaris minor* var. *haematites* Duval- Jouve & Paris, Bull. Soc. Bot. France 14: 276. 1867.
- Phalaris minor* fo. *haematites* Duval-Jouve & Paris ex Trab., Fl. Alger 141. 1895.
- Phalaris minor* var. *integra* Trab., Bull. Soc. Bot. France 32 (7): 394. 1885.
- Phalaris minor* var. *nepalensis* (Trin.) Bor, Grass. Burma, Ceylon, India & Pakistan 616. 1960.
- Phalaris minor* var. *haeosperma* Cavara, Bull. Orto Bot. Regia Univ. Napoli 9: 42. 1927.
- Phalaris nepalensis* Trin., Sp. Gram. 1: t. 80. 1828.
- Phalaris trivialis* Trin., Mém. Acad. Impl. Sci. Saint-Péterbourg, Sér. 6, Sci. Math., Seconde Pt. Sci. Nat. 5,3(3): 55. 1839.

4.4.4. Descripción botánica de *Phalaris minor*.



Figura 2.15. *Phalaris minor*.
Detalle de vaina y lígula .
Fuente: (Sánchez-Ken, *et al.*, 2012)

Es una planta anual cespitosa, con tallo erecto o geniculado ascendente, de 20 a 100 cm de longitud. La lígula es una membrana eciliada (Figura 2.15) de 2 a 7,5 mm de longitud. El limbo de las hojas es flácido, de 5 a 10 cm de longitud por 3 a 12 mm de ancho. Los márgenes de las hojas escabrosos. La inflorescencia es una panícula en forma de espiga o capitada, oblonga u ovada, de 1 a 6 cm de largo por 1 a 2 cm de ancho (Figura 2.16). Las espiguillas son solitarias. Las espiguillas fértiles pediceladas, comprimiendo dos flósculos basales estériles, un flósculo fértil, sin extensión en la raquilla. Espiguillas elípticas, lateralmente comprimidas, fuertemente comprimidas, de 4 a 6,5 mm de largo, rompiéndose en la madurez por debajo de cada flósculo fértil. Las glumas son persistentes, similares,

excediendo el ápice de los flósculos y más delgadas que la lema fértil. La gluma inferior elíptica, de 4 a 6.5 mm de longitud, tan larga como la gluma superior, papirácea, quillada, con un ala sobre la quilla y tres venas. El ápice de la gluma inferior agudo. La gluma superior elíptica de 4 a 6.5 mm de longitud, 1.5 a 1.6 veces más larga que la lema fértil adyacente, papirácea, quillada, con un ala sobre la quilla y tres venas. El ápice de la gluma superior agudo. Flósculos basales estériles disímiles, con un flósculo inferior vestigial, unido a y deciduo con el fértil. La lema del flósculo superior estéril subulada, de 1 a 1.8 mm de largo. La lema fértil elíptica, lateralmente comprimida, de 2.7 a 4 mm de largo, papirácea, brillante, quillada y con cinco venas. La superficie de la lema, pubescente. Ápice de la lema agudo. Pálea papirácea, con dos venas, sin quilla. Superficie de la



Figura 2.16. Detalle de una espiga de *Phalaris minor* .
Fuente: (Sánchez-Ken, *et al.*, 2012)

pálea pubescente. La flor tiene tres anteras de 1 a 1.5 mm de longitud y ovario glabro. El fruto es una cariósida con pericarpio adherente, de 2.3 a 2.5 mm de largo. Hilum linear.

Con respecto a las poblaciones presentes en el estado de Guanajuato, en un estudio realizado por Delgado *et al.* (2007) se encontró que el número de espigas por planta varía entre 0,4 y 13,9, con un promedio de 3,9. La longitud de la espiga mide en promedio 5,84 cm, con una variación de 2,8 a 8 cm. El peso de la espiga fue en promedio de 0,49 g, con un mínimo de 0,1219 g y un máximo de 1,003 g. El número promedio de semillas por espiga fue de 305,57, con un mínimo de 35, y un máximo de 932. El número total promedio de semillas por planta fue de 1.374.

Por su parte, Carmona *et al.* (2008) y Carmona (2009) encontraron que el número promedio de semillas por gramo fue de 584,416, lo que dio un peso promedio por semilla de 0,00171 g. En cuanto a la viabilidad, luego de 12 años de almacenamiento en bolsa de papel, se obtuvo un 72,72% de germinación de las semillas.

El tiempo de imbibición y la temperatura influyen en el porcentaje de germinación; a temperaturas muy altas la germinación disminuye (Hari *et al.*, 2003), siendo lo óptimo 24 h de imbibición a 18°C (Carmona *et al.*, 2008; Carmona, 2009).

5. Conclusiones

En México se encuentran presentes seis especies del género *Phalaris*: *P. canariensis*, *P. minor*, *P. paradoxa*, *P. caroliniana*, *P. arundinacea* y *P. brachystachys*.

Se establecieron las distribuciones actuales y potenciales de *P. paradoxa* y *P. minor*.

Se elaboró una forma sencilla y confiable para distinguir *P. minor* y *P. paradoxa* con base en sus características morfológicas.

6. Bibliografía

- Alcántara, C., Saavedra, M. & Jiménez, H. 2010. Responses of *Phalaris minor* Retz. and *Phalaris brachystachys* Link to different levels of soil water availability. *Span. J. Agric. Res.* 8(4):1074-1083.
- Anderson, D. E. 1961. Taxonomy and distribution of the genus *Phalaris*. Iowa State College J. Sci. 36(1):1-96.
- Arriaga, L., Castellanos, A., Moreno, E. & Alarcón, J. 2004. Potential ecological distribution of alien invasive species and risk assessment: A case study for buffel grass in arid regions of Mexico. *Conserv. Biol.* 18(6):1504-1514.
- Baldini, R. M. 1995. Revision of the genus *Phalaris* L. (Gramineae). *Webbia* 49:265-329.
- Barkworth, M. E. 2011. *Phalaris*. Manual of Grasses for North America and Flora North America North of Mexico, modificado por Barkworth *et al.* [consultado el 8 de marzo de 2011]. <http://herbarium.usu.edu/webmanual>
- Canadian Grain Commission. 2009. Canadian canary seed. [consultado el 7 de abril de 2011]. <http://www.grainscanada.gc.ca/grainsc-cgrains/canaris-eng.htm>
- Carmona M., M. A. 2009. Detección de resistencia a fenoxaprop-p-etil de *Phalaris minor* mediante bioensayos con semillas y plantas enteras. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., México. 65 p.
- Carmona, M., Espadas, M., Esqueda, V., Martínez, A., Monroy, S., Sánchez, L. & Zita, G. 2008. Comparación de métodos de detección de resistencia de alpistillo (*Phalaris minor*) a fenoxaprop-p-etil. p. 158. *In: Memoria del XXIX Congreso Mexicano de la Ciencia de la Maleza*. Tapachula, Chis., México.
- CESAVEG. 2007. Campaña de manejo fitosanitario de trigo. Manejo Integrado de Malezas. Comité Estatal de Sanidad Vegetal Guanajuato. Irapuato, Gto., México. 20 p.
- Chapman, A. D. & Wieczored, J. 2006. Guide to best practices for georeferencing. Global Biodiversity Information Facility. Copenhagen, Denmark. 80 p.
- Clayton, W., Voronstova, M., Harman, K. & Williamson, H. 2010. Kew Royal Botanical Garden. GrassBase The online World Grass Flora. [consultado el 22 de noviembre de 2010]. <http://www.kew.org/data/grasses-db/>
- Comisión para la Cooperación Ambiental de América del Norte. 2011. Biodiversidad y Ecosistemas. El mosaico de América del Norte: panorama de los problemas ambientales más relevantes. Especies invasoras: [consultado el 18 de marzo de 2011]. http://www.cec.org/Storage/35/2623_SOE_InvasiveSpecies_es.

- CONABIO. REMIB. 2008. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Red Mundial de Información sobre Biodiversidad. [consultado el 18 de marzo de 2011]. http://www.conabio.gob.mx/remib_esp.html
- Cousens, R. 2001. My view. *Weed Sci.* 49: 579-580.
- Damalas, C. 2008. Distribution, biology and agricultural importance of *Galinsoga parviflora* (Asteraceae). *Weed Biol. Manag.* 8:147-153.
- Dávila, P., Mejía, S. T., Gómez, S. M., Valdés, R. J., Ortiz, J. J. & Morín, C. 2006. Catálogo de gramíneas de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D.F. 671 p.
- Delgado C., J. C. & Morales G., R. 2008. Avances en la estrategia de manejo integrado de malezas en trigo en el Bajío guanajuatense ciclo O-I. p. 468-473. *In: Memoria del XXIX Congreso Mexicano de la Ciencia de la Maleza.* Tapachula, Chis., México.
- Delgado C., J. C., Urzúa S., F., Morales G., R., Ramos A., C. A. & Oliveros E., C. 2007. Estrategia para el manejo integrado de malezas en trigo en el Bajío de Guanajuato. p. 42-46. *In: Memoria del XXVIII Congreso Mexicano de la Ciencia de la Maleza.* Mazatlán, Sin., México.
- Díaz, P. 1976. Manual de gramíneas. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. México, D. F. 238 p.
- Elith, J., Graham, C. H., Anderson, R. P., Dudi, K. M., Ferrier, S. & Guisan, A. 2006. Novel methods improve prediction of species distribution from occurrence data. *Ecography* 29:129-151.
- Espinosa, G. J. & Rodríguez, J. S. 1996. Listado florístico del estado de Michoacán. Sección IV (Angiospermae: Fagaceae, Gramineae, Krameriaceae, Leguminosae). Fascículo Complementario XII. Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Instituto de Ecología, A. C. Pátzcuaro, Mich., México. 273 p.
- Espinosa, G. F. & Sarukhán, J. 1997. Manual de malezas del Valle de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Fondo de Cultura Económica. México, D. F. 407 p.
- FAO. 1997. Consulta de expertos en ecología y manejo de malezas. 1997. División de Producción y Protección Vegetal. FAO. Roma, Italia. [consultado el 15 de marzo de 2010]. <http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Biodiversity-pollination/Weeds/Docs/ECOSP1.PDF>
- GBIF. 2011. Global Biodiversity Information Facility. [consultado el 18 de marzo de 2011]. <http://data.gbif.org/welcome.htm>
- Hari, M. O., Dhiman, D. S., Hemant, K. & Sajjan, K. 2003. Biology and management of *Phalaris minor* in wheat under a rice/wheat system. *Weed Res.* 43:59-67.

- Hernández, P. A., Graham, C. H., Master, L. L. & Albert, D. L. 2006. The effect of sample size and species characteristics on performance of different species distribution modeling methods. *Ecography* 29:773-785.
- Herrera, A. & Cortés, O. A. 2010. Listado florístico y aspectos ecológicos de la familia Poaceae para Chihuahua, Durango y Zacatecas, México. *J. Bot. Res. Inst. Tex.* 4(2):711-738.
- Hijmans, R. J., Cameron, S. E., Parra, J. L., Jonesy, P. G. & Jarvis, A. 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *Int. J. Climat.* 25:1965-1978.
- HRAC. 2012. Guideline to the Management of Herbicide Resistance. [consultado el 29 de abril de 2012]. <http://www.hracglobal.com/Home/tabid/121/Default.aspx>
- ITIS. 2011. Integrated Taxonomic Information System on-line database. [consultado el 18 de marzo de 2011]. <http://itis.gov>
- Koleff, P., González, A. I. & Born, S. G. 2010. La estrategia nacional sobre especies invasoras: un marco para las políticas de conservación y manejo sustentable en México. p. 1. *In: Memoria del XXXI Congreso Mexicano de la Ciencia de la Maleza.* Cancún, Q. Roo, México.
- Kumar, S. & Stohlgren, T. J. 2009. Maxent modeling for predicting suitable habitat for threatened and endangered tree *Canacomyrica monticola* in New Caledonia. *J. Ecol. Nat. Environ.* 1:94-98.
- Lin, E. 2005. Production and processing of small seeds for birds. FAO. Rome, Italy. 47 p.
- López L., F., Cruz V., M. & Loza V., E. 2007. Transferencia de tecnología en control integral de maleza en trigo, en el Valle de Mexicali, B.C. y San Luis Colorado, Son. p. 71-80. *In: Memoria del XXVIII Congreso Mexicano de la Ciencia de la Maleza.* Mazatlán, Sin., México.
- Marshall, E. J., Brown, V. K., Boatman, N. D., Lutman, P. J., Squire, G. R. & Ward, L. K. 2003. The role of weeds in supporting biological diversity within crop fields *Weed Res.* 43:77-89.
- Medina C., T. 2011. Comunicación personal.
- Medina C., T. & Arévalo V., A. 2000. Maleza en el cultivo de cebada maltera. Estrategias de manejo y control en el Bajío. Folleto Científico. SAGAR. INIFAP. Impulsora Agrícola S. A. de C. V. Celaya, Gto., México. 56 p.
- Medina C., T., Rosales R., E., Garcia R., J. J., Gámez V., A. J., Toledo M., J. A., Santos G., F. *et al.* 2009. Evaluación de la efectividad biológica del herbicida Puma Super sobre poblaciones de maleza en lotes con tres ciclos de aplicación de Sigma "S" en el cultivo de trigo (*Triticum aestivum* L.) en el Bajío. p. 185-192. *In: Memoria del XXX Congreso Mexicano de la Ciencia de la Maleza.* Culiacán, Sin., México.

- Mortensen, D. A., Bastiaans, L. & Sattin, M. 1999. The role of ecology in the development of weed management systems: An outlook. *Weed Res.* 40:49-62.
- Naranjo, E. J. & Dirzo, R. 2009. Impacto de los factores antropogénicos de afectación directa a las poblaciones silvestres de flora y fauna. p. 247-276. *In: Dirzo, R. Gonzales, R. & March, I. J. (eds.). Capital natural de México. Vol. II. CONABIO. México, D. F.*
- Neve, P., Vila-Aiub, M. & Roux, F. 2009. Evolutionary-thinking in agricultural weed management. *New Phytol.* 184:783-793.
- Ortega-Huerta, M. A. & Peterson, A. T. 2008. Modeling ecological niches and predicting geographic distributions: A test of six presence-only methods. *Rev. Mex. Biodivers.* 79:205-216.
- Pearson, R. G., Raxworthy, C. J., Nakamura, M. & Peterson, A. T. 2007. Predicting species distribution from small numbers of occurrence records: A test case using cryptic geckos in Madagascar. *J. Biogeogr.* 34:102-117.
- Phillips, S. J., Anderson, R. P. & Schapire, R. E. 2006. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Eco. Modelling* 190:231-259.
- Princeton University. 2011. Maxent software for species habitat modeling. [consultado el 10 de septiembre de 2011]. <http://www.cs.princeton.edu/~schapire/maxent/>
- Quiñones, S. & Tafoya R., A. 2008. Control postemergente de malezas en cultivo de trigo empleando el herbicida pyroxsulam. p. 527. *In: Memoria del XXIX Congreso Mexicano de la Ciencia de la Maleza. Tapachula, Chis., México.*
- Royo, E. A. & López F., M. L. 2008. Biología de *Oxalis latifolia*: revisión acerca de su origen, ciclo anual, características biológicas más notables y formas taxonómicas. *Agron. Mesoam.* 19(2):291-301.
- Saarela, J. M., Liu, Q., Peterson, P. M., Soreng, R. J. & Pazki, B. 2010. Phylogenetics of the grass "Aveneae-type plastid DNA clade" (Poaceae: Pooideae: Poeae) based on plastid and nuclear ribosomal DNA sequence data. p. 566-596. *In: Seberg, O., Petersen, G., Bardfod, A. S. & Davis J. I. (eds.). Diversity, phylogeny and evolution in the monocotyledons. Aarhus University Press. Aarhus, Denmark.*
- Sánchez-Ken J., Zita-Padilla, G. & Mendoza-Cruz, M. 2012. Catálogo de las gramíneas malezas nativas e introducidas de México. 1st ed. CONACOFI-ASOMECEMA, A. C. México. 430 p.(En prensa).
- Santos-González, F. 2011. Secuencia de comercialización en México de herbicidas fop's. Comunicación personal.
- SE. 2011. Secretaría de Economía. Sistema de Información Arancelaria Vía Internet SIAVI: [consultado el 7 de abril de 2011]. <http://www.economia-snci.gob.mx:8080/siaviWeb/fraccionAction.do?tigie=10083001&paper=comanu alimpo>

- Secretaría de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria. 2005. NIPF 8. Determinación de la situación de una plaga en un área. Normas Internacionales para Medidas Fitosanitarias. Roma, Italia. 93 p.
- SEMARNAT. 2000. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Estadísticas de medio ambiente. [consultado el 7 de abril de 2011]. http://app1.semarnat.gob.mx/dgeia/estadisticas_2000/naturaleza/estadistica-am/informe/acrobat/capitulo3-1-4.pdf
- SIAP. 2011. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. [consultado el 7 de abril de 2011]. http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=351.
- Soreng, R. J., Peterson, P. M., Davidse, G., Judziewicz, E. J., Zuloaga, F. O., Filgueiras, T. S. *et al.* 2003. Catalogue of new world grasses (Poaceae): IV Subfamily Pooideae. Smithsonian Institution. Contributions from the United States National Herbarium 48:1-730.
- Suárez-Seoane, S., García, E. L., Morales, M. B., Osborn, P. E. & De Juana, E. 2008. Maximum entropy niche-based modelling of seasonal changes in little bustard (*Tetrax tetrax*) distribution. *Ecol. Modelling* 219:17-29.
- Tafoya R., J. A., Ocampo R., R. A. & Carrillo M., R. M. 2006. Resistencia de *Avena fatua* L. a herbicidas en la región del Bajío guanajuatense. p. 239. *In: Memoria del XXVII Congreso Mexicano de la Ciencia de la Maleza*. Ensenada, B.C., México.
- Tamayo E., L. M. & Martínez C., J. L. 2002. Resistance of little seed canary-grass *Phalaris minor* Retz. and hood canary-grass *Phalaris paradoxa* L. to commercial herbicides in the Yaqui Valley of Sonora, México. *Resist. Pest Manag. Newsletter*. 12(1):37-38.
- TROPICOS. 2011. Catalogue of New World Grasses (Poaceae). [consultado el 15 de marzo de 2011]. <http://www.tropicos.org/Project/CNWG>
- University of California Berkeley. 2011. The Jepson Manual: Higher Plants of California. Key to *Phalaris*. [consultado el 22 de marzo de 2011]. http://ucjeps.berkeley.edu/cgi-bin/get_key.pl?Phalaris
- USDA 2011. United States Department of Agriculture. Plants Database. [consultado el 22 de marzo de 2011]. <http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=PHAR3>
- Utah State University. 2011. Manual of Grasses for North America. [consultado el 29 de abril de 2012]. <http://herbarium.usu.edu/grassmanual/>
- Vibrans, H. 2011. Malezas de México. [consultado el 18 marzo de 2011]. <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico>
- Villaseñor, J. L. & Espinosa-García, F. 2004. The alien flowering plants of Mexico. *Diversity and Distributions* 10:113-123.

- Villaseñor, J. L. & Magaña, P. 2006. Plantas introducidas en México. *Ciencias* 82:38-40.
- Wilson, E. O. 2003. The encyclopedia of life. Trends in ecology and evolution. [consultado el 27 de abril de 2012]. <http://mcz-28168.oeb.harvard.edu/caribbean/eol.pdf>
- WSSA. 2012. International Survey of Herbicide Resistant Weeds. [consultado el 31 de mayo de 2012]. <http://www.weedscience.org/Summary/UniqueCountry.asp?lstCountryID=29&FormCountry=Go>

CAPÍTULO III

Mecanismos de resistencia de *Phalaris minor* a herbicidas inhibidores de la ACCasa

1. Introducción

Los lípidos se definen como ácidos grasos y sus derivados biosintéticos o funcionales, sintetizados por la condensación de malonil CoA. La clase más común de lípidos en la naturaleza son los ésteres llamados triglicéridos, que consisten en ácidos grasos unidos a un alcohol de tres carbonos denominado glicerol.

Los lípidos en las plantas, además de ser almacén de energía y componentes de membrana, pueden ser precursores de importantes metabolitos secundarios, mientras que otros funcionan como mensajeros en la señalización celular. Dentro de la célula, pueden regular la actividad de algunas quinasas y fosfolipasas. Son los principales constituyentes de la cutícula, y algunos están involucrados en la regulación de la expresión génica.

Los lípidos complejos de membrana, así como los glicerofosfolípidos, además de servir de barrera celular y subcelular semipermeable, controlan el transporte de materiales, funcionando como mensajeros lipídicos o transductores. En los tejidos fotosintéticos, una cantidad sustancial de lípidos consiste en 1,2-diacil-sn-gliceroles, unidos a carbohidratos. Los componentes principales son los mono y diacilglicerolípidos, constituyentes de las membranas cloroplásticas y seguramente con una importante función en la fotosíntesis (Harwood, 2012).

La carboxilación de acetil CoA a malonil CoA es la etapa limitante y reguladora en la síntesis de ácidos grasos; esta reacción es catalizada por la acetil coenzima A carboxilasa (ACCasa). Esta enzima, es el sitio de acción de tres grupos de herbicidas, también llamados graminicidas: los ariloxifenoxipropanoatos (APPs), las ciclohexanodionas (CHDs) y recientemente las fenilpirazolininas (PPZ) (Duke y Dayan, 2011).

1.1. Síntesis de ácidos grasos vegetales

La clase más común de lípidos en la naturaleza son los ésteres llamados triglicéridos (TGs), que consisten en ácidos grasos (AGs) unidos a un alcohol de tres carbonos por un enlace éster; este alcohol de tres carbonos puede variar en su composición y estructura y contener una variedad de grupos funcionales. Los AGs están formados por cadenas hidrocarbonadas rectas saturadas o insaturadas, siendo los más comunes en tejidos vegetales, aquellos cuya cadena tiene una extensión de 16

(hexadecanoico o palmítico) y de 18 (octadecanoico o estereárico) carbonos (Harwood, 2012).

Los AGs de cadenas largas son sintetizadas *de novo*, a partir de pequeños precursores en procesos mediados por dos sistemas de enzimas, la carboxilasa (ACCasa) y la ácido graso sintasa (AG sintasa). Los productos finales de esta síntesis son usualmente el palmitato y el estereato. Las cadenas de estos AGs pueden ser objeto de elongación, desaturación y algunas modificaciones mediadas por enzimas (Figura 3.1) (Harwood, 2012).

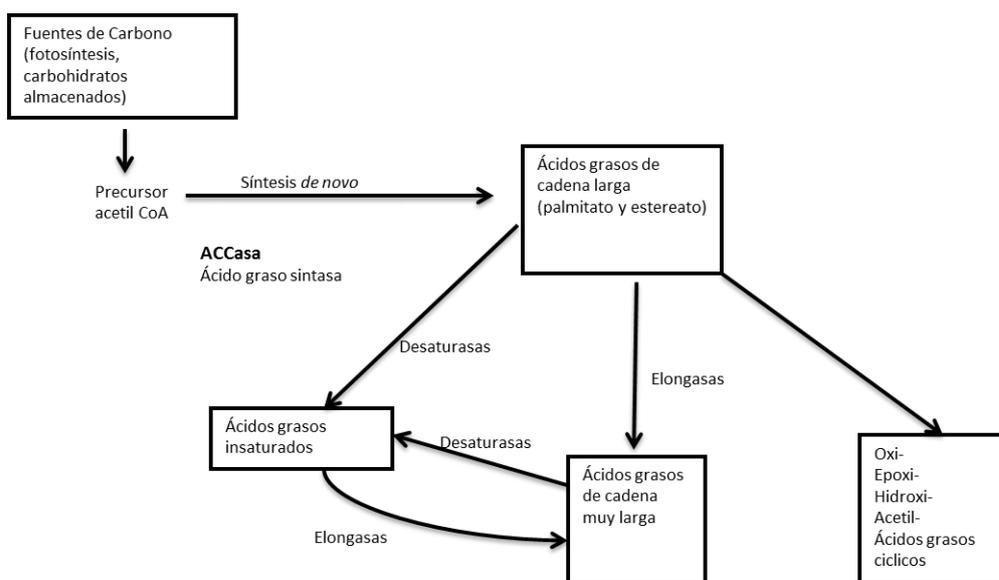


Figura 3.1. Síntesis de ácidos grasos. Modificado de Harwood (2012).

Tanto la ACCasa como la AG sintasa, son enzimas solubles, mientras que las elongasas son proteínas unidas a membrana y se encuentran situadas en el retículo endoplásmico. Las ácido graso desaturasas (AGD) están usualmente unidas a membrana y utilizan un complejo sustrato lipídico. La ACCasa (EC 6.4.1.2.) pertenece al grupo de las enzimas biotinizadas solubles de la clase 1, la cual usa ATP y bicarbonato para carboxilar un grupo prostético (Figura 3.2). El grupo carboxil es entonces transferido al aceptor de la acetil coenzima A para producir malonil coenzima A (Knowles, 1989; Harwood, 2012).



Figura 3.2. Representación esquemática de la reacción catalizada por la ACCasa. E-Biotina = enzima unida al grupo prostético biotina. El 2º paso (carboxitransferasa) está inhibido por los herbicidas APPs y CHDs. Fuente: Harwood (1988).

1.2. Herbicidas inhibidores de la ACCasa

Estos graminicidas fueron introducidos a finales de la década de los 70, y desde entonces han sido utilizados en postemergencia en cultivos de cereales y dicotiledóneas (Anónimo, 2004; Hofer *et al.*, 2006; Raffel *et al.*, 2006). Son ampliamente utilizados en todo el mundo, y en la actualidad representan un 10% de las ventas mundiales de herbicidas (Harwood, 1999).

En México, estos herbicidas se han usado con éxito en varios cultivos. Sin embargo, en 1996 se reportaron los primeros casos de resistencia de *P. minor* en el cultivo de trigo en la zona del Bajío. Actualmente, el Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Estado de Guanajuato recomienda 13 ingredientes activos y dos mezclas para el control de maleza en trigo, entre los que se encuentran tres inhibidores de la ACCasa (clodinafop-propargil, fenoxaprop-P-etil y tralkoxidim). Por su parte, la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios de México (COFEPRIS) ha autorizado recientemente el uso de pinoxaden (COFEPRIS, 2011); la lista de herbicidas usados en trigo en el estado de Guanajuato se presenta en la Tabla 3.1. En la misma, se ha agregado el grupo al que pertenece cada herbicida según su modo de acción de acuerdo a la WSSA y el HRAC.

Tabla 3.1. Herbicidas recomendados para el cultivo de trigo en el estado de Guanajuato. Fuente: CESAVEG (2007), COFEPRIS (2011) y WSSA (2012).

Mecanismo de acción		Herbicida	Dosis	Malezas
HRAC	WSSA			
A	1	Clodinafop-propargil	250 a 300 mL/ha	Hoja angosta
A	1	Fenoxaprop-etil	2,5 L/ha	Hoja angosta
A	1	Tralkoxidim	2 a 3 L/ha	Hoja angosta
A	3	Pinoxaden ^a	500 mL/ha	Hoja angosta
B	2	Amidosulfurón	60 g/ha	Hoja ancha
B	2	Flucarbazone-sodio	30 a 45 g/ha	Hoja angosta
B	2	Mesosulfurón + iodosulfurón	500 g/ha	Hoja ancha y angosta
B	2	Metsulfurón metil	60 a 70 g/ha	Hoja ancha
B	2	Thifensulfurón-metil	20 a 30 g/ha	Hoja ancha
B	2	Triasulfurón	20 g/ha	Hoja ancha
C2	7	Linurón	1 kg/ha	Hoja ancha
C3	6	Bromoxinil	1,5 a 2 L/ha	Hoja ancha
E	14	Carfentrazone etil	0,5 a 0,75 L/ha	Hoja ancha
E + O	14 + 4	Carfentrazone etil + 2,4-D	1 a 1,25 L/ha	Hoja ancha
O	4	2,4-D	1 L/ha	Hoja ancha
O	4	Dicamba	0,5 a 1 L/ha	Hoja ancha
O	4	Dicamba + 2,4-D	0,5 a 1L/ha	Hoja ancha

^a Autorizado por COFEPRIS en 2011.

Los APPs se caracterizan por tener dos grupos arilo, uno de los cuales está sustituido por un grupo isopropilo en posición 1. El segundo grupo arilo presenta una gran variabilidad química, tanto en la estructura del anillo (grupos fenoxi, benzoxazoliloxi, quinoxaliniloxi o piridiniloxi) como en los sustituyentes del mismo (cloro o trifluorometilo). Esta variabilidad en la estructura resulta en una amplia gama de herbicidas con diferente actividad biológica y selectividad (Figura 3.3).

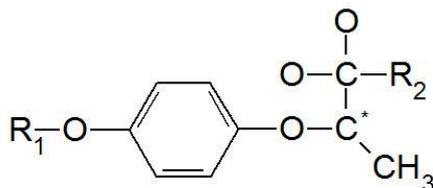


Figura 3.3. Esqueleto básico de ariloxifenoxipropanoatos. R_1 y R_2 se refieren a diferentes sustituyentes. Fuente: Cobb y Reade (2010).

Las ciclohexanodionas, cuyo esqueleto básico se presenta en la Figura 3.4., tienen su origen en el acaricida benzoximato, el cual fue desarrollado por Nippon Soda en 1971. Los científicos de esa compañía observaron que algunos benzohidroximatos mostraban una ligera actividad herbicida. Después de varios procesos experimentales, se llegó a la síntesis del ácido dehidroacético, un fungicida, que también mostró una fuerte actividad herbicida preemergente en malezas gramíneas anuales, sin afectar las plantas de hoja ancha. Investigaciones posteriores, llevaron al descubrimiento e introducción al mercado de aloxidim-sodio en 1978 (Sandin-España *et al.*, 2012).

El aloxidim-sodio mostró una potente actividad contra malezas gramíneas anuales, pero prácticamente no tenía actividad sobre malezas gramíneas perennes. Por esta razón, la síntesis química sintética se enfocó a la introducción de diferentes sustituyentes sobre el anillo ciclohexano. Se encontró que los sustituyentes que poseían cloro, oxígeno o azufre, incrementaban la actividad herbicida. Algunos derivados de la CHD que contenían azufre mostraban una alta actividad herbicida sobre malezas gramíneas anuales y perennes en tratamientos post-emergentes. De este modo, los grupos alquil, aril y tioalquil fueron introducidos en la posición R_1 , dando lugar al descubrimiento de los herbicidas CHD, como setoxidim, cletodim y cicloxidim (Sandin-España *et al.*, 2012).

Setoxidim, introducido en 1982, mostró excelente actividad herbicida contra varias especies de maleza; a su vez, cletodim, descubierto por Chevron Chemical, presentó

casi el mismo espectro herbicida de setoxidim, pero a dosis más bajas. Cicloxidim, descubierto por BASF, mostró un muy amplio espectro con dosis de aplicación similares a las de setoxidim. Por su parte, tralkoxidim tiene un espectro de acción más limitado que setoxidim y cletodim, por lo que ha sido usado solamente para el control de malezas gramíneas de invierno en campos de trigo. El último herbicida comercializado de la familia de las CHD, fue el profoxidim, desarrollado por BASF, y registrado en 1998 para el control de malezas gramíneas en arroz (Figura 3.4) (Sandin-España *et al.*, 2012).

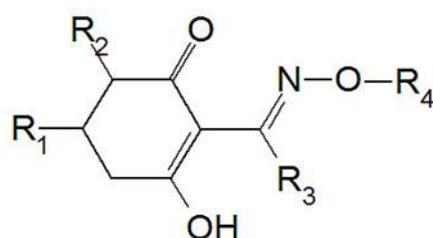


Figura 3.4. Esqueleto básico de las ciclohexanodionas. R₁, R₂, R₃ y R₄ se refieren a posibles sustituciones. Fuente: Cobb y Reade (2010).

Pinoxaden es un nuevo ingrediente activo desarrollado por Syngenta que pertenece a una nueva familia química, las fenilpirazolininas (Figura 3.5). Es un herbicida utilizado para el control selectivo de malas hierbas gramíneas en trigo y cebada. Se comercializa con el nombre de Axial®.

Axial® está formulado como una emulsión concentrada, que contiene 100 g de pinoxaden y 25 g del protector cloquintocet-mexil, por litro de formulado. Además, debe aplicarse con Adigor®, un mojante específico desarrollado por Syngenta.

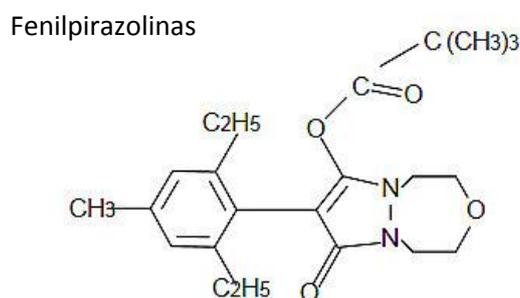


Figura 3.5. Fórmula desarrollada de pinoxaden. Fuente: Cobb y Reade (2010).

1.3. Modo de acción de los inhibidores de la ACCasa

Estos herbicidas son generalmente aplicados en postemergencia, por lo que para facilitar su absorción a través de la cutícula foliar, suelen formularse como ésteres de sus correspondientes ácidos. Los ésteres de APPs tienen poca actividad fitotóxica y son considerados como pro-herbicidas. Una vez dentro del tejido vegetal, son rápidamente activados a su forma ácida por hidrólisis mediante esterasas (Shimabukuro *et al.*, 1979). Una vez activados, los APPs son translocados a las regiones meristemáticas, donde ejercen su función herbicida (Brezeanu *et al.*, 1976; Duke & Kenyon, 1988; Walker *et al.*, 1989). Las plantas tratadas van adquiriendo un color púrpura, seguido de un marrón oscuro y finalmente mueren; las hojas viejas pueden permanecer verdes por largo tiempo. Cuando son aplicados a dosis subletales pueden causar bandas cloróticas en las hojas, daños en el tallo o muerte de las ramas principales, lo cual varía dependiendo de la dosis y estadio de crecimiento (Baumann *et al.*, 1998; Kansas State University, 2012).

El mecanismo de acción consiste en la inhibición de la ACCasa, lo cual impide la formación de malonil CoA, y por lo tanto, la síntesis de AGs (Figura 3.6).

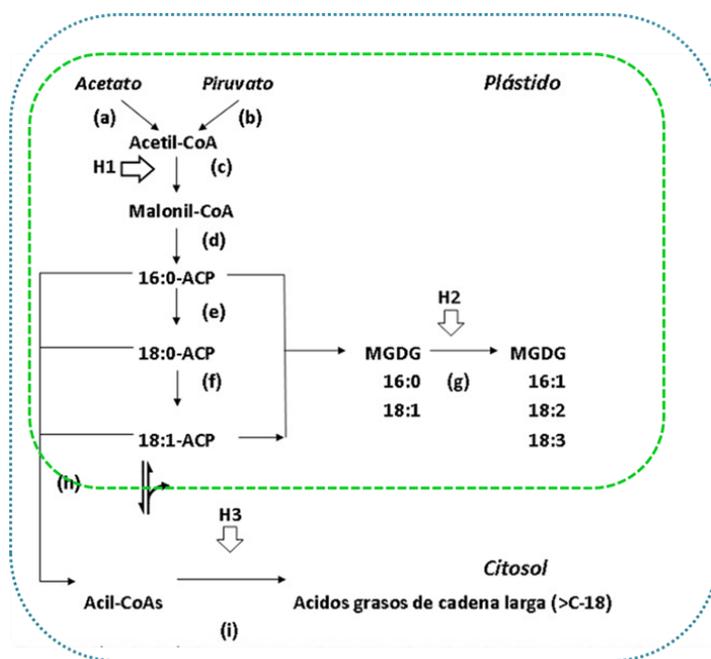


Figura 3.6. Sitios de acción de herbicidas inhibidores de la síntesis de lípidos.

H1: ácidos aril-propanoicos y estructuras similares, H2: piridazinonas, H3: tiocarbamatos.

Las enzimas son (a) acetato tiokinasa, (b) piruvato deshidrogenasa, (c) acetil-CoA carboxilasa, (d) complejo ácido graso sintetasa tipo II, (e) palmitoil-ACP elongasa, (f) y (g) diferentes saturasas, (h) un sistema de transferencia de acil-CoA (plástido → citoplasma), (i) complejo acil-CoA sintetasa tipo III y elongasas específicas. Transportadora de grupo acil: MGDG (monogalactosildiacylglicérido). Los números antes de : indican el número de carbonos en la cadena mientras que después de : número de dobles ligaduras. Fuente: Devine (1997).

No todos los tejidos de una especie de planta son igualmente sensibles a dichos herbicidas, ya que la ACCasa se encuentra presente en células en división y en cloroplastos activos. De acuerdo con esto, los síntomas provocados por la acción de estos herbicidas se observan con mayor intensidad y más rápidamente en regiones meristemáticas y en cloroplastos. Por otra parte, los efectos secundarios de la acción del herbicida a nivel molecular, incluyen clorosis (inhibición de la biosíntesis de clorofila y de carotenoides), alteración en la distribución de ácidos grasos de cadena larga en el cloroplasto (disminución de C-18 e incremento de \leq C-16) e inhibición de la síntesis de ADN y de la mitosis. El daño en el cloroplasto podría ser seguido por una perturbación en la membrana. La pérdida de la función de la membrana da lugar a una “mezcla intracelular”, donde las enzimas catabólicas y sus sustratos, que normalmente están separados en distintos compartimentos en el interior celular, entran en contacto (Cruz-Hipólito, 2010).

Por medio del uso de herbicidas de acción específica sobre gramíneas, Page *et al.* (1994) midieron el control ejercido por la enzima en la síntesis de lípidos en hojas de maíz y cebada, encontrando que la reacción de la ACCasa sola, controla cerca del 55% del flujo total, con lo que se demostró claramente su importante papel en la regulación.

1.4. Bases de la selectividad

Hay dos formas moleculares de ACCasa: un complejo multiproteínico presente en procariontes, y una proteína multifuncional, típica de eucariotes. Además, las plantas tienen isoformas en dos sitios subcelulares. Una isoforma localizada en el plástido es usada para la síntesis *de novo* de AGs, mientras que una isoforma extraplastídica (probablemente ubicada en el citoplasma) provee malonil coenzima A para la elongación de los AGs. La diferente susceptibilidad entre gramíneas y dicotiledóneas a varios herbicidas pertenecientes a los grupos químicos mencionados, llevó al descubrimiento de que mientras las gramíneas tienen dos diferentes proteínas multifuncionales de ACCasa (con masa molecular de 220-230 kDa), las dicotiledóneas tienen una proteína multifuncional en el citosol y un complejo multienzimático en el estroma (Harwood, 2012).

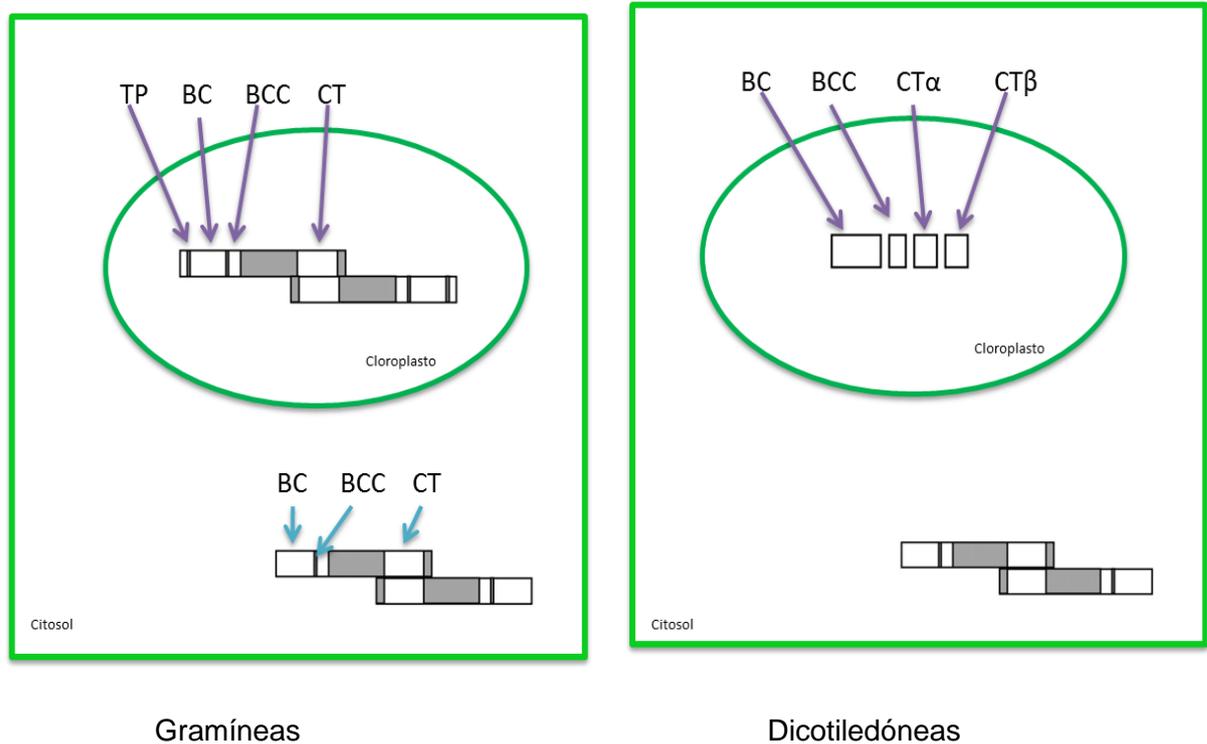


Figura 3.7. Isoformas de ACCasa presentes en plantas. TP: péptido acarreador, BCC: acarreador de la biotina carboxilasa, BC: biotina carboxilasa, CT: carboxiltransferasa. La figura izquierda esquematiza la ACCasa en gramíneas (homomérica) y la derecha, la de dicotiledóneas (heteromérica). Fuente: Délye (2005).

A dosis de campo, los APPs, CHDs y PPZ no afectan la mayoría de las especies de plantas o animales. Las bases de la selectividad hacia la vasta mayoría de las especies no gramíneas, reside en la insensibilidad de la ACCasa heteromérica que presentan estas plantas en sus plástidos. La estructura de la ACCasa heteromérica es muy diferente de la forma homomérica (Figura 3.7). Otros organismos como los animales y hongos, sólo contienen isoformas homoméricas. Se han encontrado diferencias considerables en la actividad de distintas moléculas de APPs y CHDs contra una isoforma homomérica de ACCasa dada, así como entre isoformas homoméricas a un inhibidor de ACCasa dado (Délye, 2005).

1.5. Mecanismos de resistencia a herbicidas inhibidores de la ACCasa

Para ser efectivo, un herbicida de postemergencia debe moverse desde la superficie foliar y alcanzar el sitio de acción que se encuentra dentro del citoplasma de las células vegetales. El proceso que gobierna la absorción de los herbicidas es simple difusión. Cuando la gota de aspersión toca la superficie de la hoja, una gran concentración del químico se encuentra en la superficie foliar, mientras que esta es nula dentro de la hoja. Los químicos se mueven de acuerdo a un gradiente de mayor a menor concentración, por lo que tan pronto la gota del herbicida entra en contacto con la hoja, su absorción comienza. La velocidad de penetración es directamente proporcional a la concentración externa del herbicida.

La absorción y translocación de diclofop-metil y otros APPs no parecen ser factores importantes en la acción selectiva del herbicida entre plantas sensibles y resistentes. La detoxificación de los APPs mediante aril-oxidación y posterior conjugación o por escisión de la molécula en derivados fenólicos, es un mecanismo de tolerancia común a varias especies de mono y dicotiledóneas. Sin embargo, no existen suficientes evidencias que apoyen la detoxificación metabólica como mecanismo de resistencia en biotipos de malas hierbas resistentes a APPs y CHDs (Duke y Kenyon, 1988). Sin embargo, últimamente se han detectado algunas poblaciones de *A. myosuroides* y *L. rigidum* con una alta capacidad de metabolizar DM (De Prado *et al.*, 2005; Powles y Yu, 2010).

Si bien se han detectado ligeras diferencias en la velocidad de metabolización en algunos biotipos resistentes a APPs, éstas no parecen lo suficientemente importantes como para contribuir de manera significativa a la resistencia observada a nivel de planta entera (Holtum *et al.*, 1991; Marles *et al.*, 1993; Preston *et al.*, 1996). En la mayoría de los biotipos de malas hierbas resistentes a APPs y CHDs analizados hasta el momento, el carácter resistente está conferido por una mutación en la ACCasa que reduce su sensibilidad al herbicida (Powles y Yu, 2010).

En los casos estudiados, la resistencia está controlada por un solo gen nuclear dominante o semidominante (Parker *et al.*, 1990; Betts *et al.*, 1992; Morrison *et al.*, 1992), existiendo por lo general una buena correlación entre el nivel de sensibilidad *in vitro* del sitio de acción y el grado de resistencia que el biotipo presenta *in vivo*. Aunque no siempre es válido comparar datos derivados de distintos biotipos, y en los que se han usado protocolos ligeramente diferentes, los patrones de resistencia

presentados por los distintos biotipos resistentes caracterizados, parecen indicar la existencia de diversas mutaciones en el gen de la ACCasa capaces de proporcionar distinto grado de resistencia a APPs y CHDs. De este modo, es posible identificar biotipos que presentan resistencia sólo a determinados APPs, a APPs y CHDs o sólo a CHDs (Devine, 1997). Las mutaciones que confieren resistencia a estos herbicidas están en una región de 400 aminoácidos, la cual codifica para la carboxil transferasa (Nikolskaya *et al.*, 1999; Délye *et al.*, 2002; Tal y Rubin, 2004). Con base en la secuencia de *Alopecurus myosuroides*, sustituciones Ile por Leu en la posición 1781 y Asp por Gly en la posición 2078, parecen ser críticas para la interacción con APPs y CHDs (Christoffers *et al.*, 2002; Délye *et al.*, 2002; Moss *et al.*, 2003; Tal y Rubin, 2004). Sustituciones de Trp por Cys en la posición 2027, así como de Ile por Asn o Val en la posición 2041 y Gly por Ala en la posición 2096 dan lugar a resistencia a APPs, pero no a CHDs (Délye *et al.*, 2003). Powles y Yu (2010) resumen las sustituciones conocidas hasta el momento (Tabla 3.2). En la Figura 3.8 se ubican de manera esquemática algunas de las mutaciones en el dominio carboxil transferasa de la ACCasa que dan lugar a resistencia en varias gramíneas.

Existe otro mecanismo de resistencia a inhibidores de la ACCasa que involucra alteraciones en el potencial electroquímico de membrana. Este mecanismo fue descrito por primera vez en biotipos de *Lolium rigidum* resistentes a diclofop-metil (Heap y Knight, 1990; Matthews *et al.*, 1990), y posteriormente ha sido descrito en otras especies (Devine *et al.*, 1992; Holtum y Powles, 1992; Devine y Shimabukuro, 1994; De Prado *et al.*, 1997). En estos casos, la resistencia a los herbicidas parece estar relacionada con una recuperación del potencial de membrana después del tratamiento con el herbicida (De Prado *et al.*, 1997; Shimabukuro y Hoffer, 1997).



Figura 3.8. Representación esquemática de la ACCasa mostrando los dominios (BC: biotina carboxilasa, BCC: acarreador de la biotina carboxilasa, CT: carboxil transferasa y TP: péptido de transición, este último ausente en la ACCasa citosólica). Se señalan en el dominio CT los casos reportados por Délye (2005) con sus correspondientes aminoácidos.

Tabla. 3.2. Especies de poáceas que han desarrollado resistencia a inhibidores de la ACCasa y las sustituciones aminoacídicas en el dominio CT de la ACCasa.

Aminoácido sustituido ¹	Especie	Espectro de resistencia ²		
		APP	CHD	PPZ
Ile-1781-Leu	<i>Alopecurus myosuroides</i>	R	R	R
	<i>Avena fatua</i>	R	R	r
	<i>A. sterilis</i>	R	R	ND
	<i>Lolium multiflorum</i>	ND	R	ND
	<i>L. rigidum</i>	R	R	R
	<i>Setaria viridis</i>	R	R	ND
Trp-1999-Cys	<i>A. sterilis</i>	R/S	S	ND
Trp-2027-Cys	<i>A. myosuroides</i>	R	S	R
	<i>A. sterilis</i>	R/r	r	ND
	<i>L. rigidum</i>	ND	r	ND
Ile-2041-Asn	<i>A. myosuroides</i>	R	S	r
	<i>A. sterilis</i>	R	r	ND
	<i>Phalaris paradoxa</i>	ND	ND	ND
	<i>L. rigidum</i>	R	r/S	ND
Ile-2041-Val	<i>L. rigidum</i>	S/R	S	ND
	<i>A. myosuroides</i>	R	R	R
Asp-2078-Gly	<i>A. sterilis</i>	R	R	ND
	<i>L. multiflorum</i>	R	R	R
	<i>L. rigidum</i>	R	R	R
	<i>P. paradoxa</i>	R	R	R
Cys-2088-Arg	<i>L. rigidum</i>	R	R	R
Gly-2096-Ala	<i>A. myosuroides</i>	R	r/S	S

Abreviaturas: ACCasa: Acetil-coenzima A carboxilasa; CT: carboxil transferasa.

1) La posición de los aminoácidos corresponde al plástido completo de ACCasa en *A. myosuroides*.

2) **APP**: ariloxifenoxipropanoatos; **CHD**: ciclohexanodionas; **PPZ**: fenilpirazolinás; **R**: resistente; **S**: susceptible; **r**: poco o moderadamente resistente; **ND**: no determinado. Fuente: Powles y Yu (2010).

1.6. Estado actual de la resistencia a herbicidas inhibidores de la ACCasa

Los primeros casos de resistencia a inhibidores de la ACCasa se dieron en cultivos de gran importancia económica en todo el mundo, a finales de la década de los años 80 (Devine y Shimabukuro, 1994). En la actualidad, existen 42 especies de malezas resistentes, representado un 19% del total de biotipos resistentes a herbicidas descritos en el mundo (Tabla 3.3). El amplio uso de diclofop-metil para el control de malas hierbas gramíneas en todo el mundo, ocasionó los casos de resistencia a inhibidores de la ACCasa. Por ejemplo, diversas especies de *Lolium* han desarrollado resistencia a diclofop-metil y a otros inhibidores de la ACCasa en Estados Unidos de América, Reino Unido, Francia, Chile, Italia, Australia, Arabia Saudita, España, Francia, Sudáfrica, Chile, Túnez y Grecia. También especies de *Avena* han desarrollado resistencia a inhibidores de la ACCasa en Canadá, Estados Unidos de América, Sudáfrica, Australia, México, Chile, Bélgica, Francia, Reino Unido e Italia. La resistencia encontrada en biotipos de *Phalaris* spp. de México y de *Setaria* spp. en Norte América, es de una considerable importancia económica (Tabla 3.3).

La mayoría de los biotipos resistentes de malas hierbas caracterizados hasta ahora, son resistentes a inhibidores de la ACCasa, pero no a herbicidas con otros modos de acción. Sin embargo, existen diferencias en los niveles de resistencia y en los distintos patrones de resistencia cruzada a los distintos APPs y CHDs; también se ha observado resistencia a pinoxaden en algunas partes del mundo. (Cruz-Hipólito, 2010).

En los biotipos que presentan resistencia cruzada y/o múltiple a otras clases de herbicidas, la resistencia viene dada por uno o más mecanismos. Existen varios casos de resistencia múltiple en *A. myosuroides*, *Avena fatua*, *Digitaria sanguinalis*, *Echinochloa* spp., *Eleusine indica*, y algunos biotipos de *Lolium* spp. y *Setaria viridis*. Las malas hierbas resistentes a herbicidas inhibidores de la ACCasa son uno de los casos más importantes a nivel económico, debido a la magnitud de la superficie afectada y al número limitado de herbicidas alternativos para su control (Cruz-Hipólito, 2010).

Este capítulo se centra en el estudio de la caracterización de la resistencia en un biotipo de *P. minor* proveniente del municipio de Cortázar en el estado de Guanajuato, México

Tabla 3.3. Malas hierbas en las que se ha desarrollado resistencia a herbicidas inhibidores de la ACCasa. Fuente: WSSA (2012).

Especie	País
<i>Alopecurus aequalis</i>	China
<i>A. japonicus</i>	China
<i>A. myosuroides</i>	Reino Unido, Alemania, Francia, Bélgica, Países Bajos, Dinamarca, Turquía
<i>Apera spica-venti</i>	Alemania, Polonia
<i>Avena fatua</i>	Australia, Sudáfrica, Canadá, Estados Unidos de América, Reino Unido, Bélgica, Francia, Chile, México, Irán, Argentina, Brasil
<i>A. sterilis</i>	Australia, Reino Unido, Turquía, Italia, Israel, Irán
<i>A. sterilis ludoviciana</i>	Italia, Francia, Irán
<i>Beckmannia syzigachne</i>	China
<i>Brachiaria plantaginea</i>	Brasil
<i>Bromus diandrus</i>	Australia
<i>B. rigidus</i>	Australia
<i>B. tectorum</i>	Estados Unidos de América
<i>Cynosurus echinatus</i>	Chile
<i>Digitaria ciliaris</i>	Brasil
<i>D. ischaemum</i>	Estados Unidos de América
<i>D. sanguinalis</i>	Estados Unidos de América, Australia, Italia
<i>Echinochloa colona</i>	Costa Rica, Nicaragua, Bolivia, Venezuela
<i>E. crus-galli</i>	Estados Unidos de América, Tailandia, Corea del Sur, Italia, Turquía, China
<i>E. oryzoides</i>	Turquía
<i>E. phyllopogon</i>	Estados Unidos de América, Corea del Sur
<i>Eleusine indica</i>	Malasia, Brasil, Bolivia
<i>Eriochloa punctata</i>	Bolivia
<i>Hordeum glaucum</i>	Australia
<i>H. leporinum</i>	Australia
<i>Ischaemum rugosum</i>	Colombia, Venezuela
<i>Leptochloa chinensis</i>	Tailandia
<i>L. panicoides</i>	Estados Unidos de América
<i>Lolium multiflorum</i>	Estados Unidos de América, Reino Unido, Francia, Italia, Chile, Argentina, Brasil
<i>L. perenne</i>	Chile, Alemania
<i>L. persicum</i>	Estados Unidos de América, Canadá
<i>L. rigidum</i>	Australia, Arabia Saudita, España, Francia, Sudáfrica, Túnez, Chile, Grecia, Israel, Irán
<i>Phalaris brachystachys</i>	Italia, Turquía
<i>P. minor</i>	Israel, México, Estados Unidos de América, Sudáfrica, Irán, India
<i>P. paradoxa</i>	México, Australia, Italia, Israel, Irán
<i>Rottboellia cochinchinensis</i>	Estados Unidos de América
<i>Setaria faberi</i>	Estados Unidos de América

Resistencia de malas hierbas a herbicidas inhibidores de la enzima ACCasa

<i>S. viridis</i>	Canadá
<i>S. viridis</i> var. <i>robusta-alba</i>	Estados Unidos de América
<i>S. viridis</i> var. <i>robusta-purpurea</i>	Estados Unidos de América
<i>Snowdenia polystachya</i>	Etiopía
<i>Sorghum halepense</i>	Estados Unidos de América, Grecia, Israel, Italia
<i>S. sudanense</i>	Bolivia

2. Objetivos

Confirmar el carácter resistente a herbicidas inhibidores de la acetil coenzima A carboxilasa en biotipos de *P. minor*, recolectados en México, realizando ensayos de dosis-respuesta (ED_{50}).

Estudiar las posibles diferencias *in vitro* entre los biotipos R y S (sensibilidad a las enzimas objetivo) que justifique el comportamiento resistente de *P. minor* a ariloxifenoxipropanoatos y ciclohexanodionas.

Estudiar los mecanismos de resistencia a inhibidores de la ACCasa en *P. minor*, mediante:

Ensayos de absorción y traslocación de ^{14}C -diclofop-metil.

Ensayos de metabolismo de ^{14}C -diclofop-metil.

Secuenciación y localización de posibles mutaciones.

3. Materiales y métodos

3.1. Ensayos de dosis-respuesta

El estudio de dosis-respuesta de *P. minor* se realizó con herbicidas inhibidores de la ACCasa, para la determinación de la dosis efectiva 50 (ED₅₀), la cual se define como la dosis de herbicida capaz de reducir en un 50% el peso fresco de las plantas tratadas. Es normalmente el mejor estimador posible de la sensibilidad de una planta a un herbicida, y es útil para realizar comparaciones entre diferentes experimentos de dosis respuesta (Streibig y Kudsk, 1993).

3.1.1. Material vegetal

En 2008 se colectaron semillas de *P. minor* en cultivos de trigo en el municipio de Cortázar en el estado de Guanajuato, México (Figura 3.9). Las semillas del biotipo resistente (R) fueron colectadas en campos de trigo donde por varios años se han aplicado graminicidas inhibidores de la ACCasa a las dosis recomendadas por el fabricante, y se detectaron escapes en el control de esta maleza. Las semillas del biotipo sensible se colectaron de campos aledaños, en los cuales se tiene referencia que estos productos nunca han sido aplicados. En ambos casos se seleccionaron plantas maduras, y se les extrajeron los carióspsides mediante agitación mecánica de las panículas dentro de bolsas de papel.



Figura 3.9. Mapa de localización del municipio de Cortázar en el estado de Guanajuato, México.

3.1.2. Herbicidas y reactivos

¹⁴C-DM fue proporcionado por Bayer CropScience (Alemania). Una formulación comercial de este herbicida (Iloxán; 36% w/v CE) utilizada para los ensayos de crecimiento fue suministrado por Bayer CropScience (España). Los ingredientes activos puros y los formulados comerciales fueron suministrados por Bayer CropScience, BASF y Dow Agrosiences. Su estructura molecular se muestra en la Tabla 3.4.

3.1.3. Condiciones de crecimiento

Las semillas se germinaron en placas Petri sobre papel de filtro (Whatman N° 1). Las placas se sellaron con parafilm y se colocaron en la cámara de crecimiento a 23/18°C (día/noche), un fotoperiodo de 16 h y 80% de humedad relativa. Una vez germinadas fueron trasplantadas en macetas de 7 x 7 cm, utilizando una mezcla de arena y turba mezclados en proporción 2:1 (v/v) (Osuna *et al.*, 2002), colocando tres plantas en cada maceta. En cada bandeja, se dispusieron 15 macetas, destinándose tres como control y 12 plantas por cada dosis de los distintos herbicidas.

3.1.4. Tratamiento con herbicidas

Para evaluar el efecto de los distintos herbicidas sobre el crecimiento y desarrollo de biotipos de *P. minor*, se realizaron aplicaciones simulando las condiciones de campo, utilizando una máquina de tratamiento de laboratorio (Devries Manufacturing, Hollandale, Minnesota) equipada con boquillas de abanico plano TeeJet 80.02 E. VS. (abertura uniforme de 80° y un volumen de 0.2 galones/min) (Figura 3.10).

Las plantas fueron tratadas con un volumen de caldo de 200 L/ha, una presión de 200 kPa (Menéndez, 1997) y una altura desde la base del tallo de 50 cm. El tratamiento se realizó cuando las plantas alcanzaron el estado de desarrollo de tres a cuatro hojas, equivalente a BBCH 13-14 (BBCH, 2001), utilizando las dosis que aparecen en la Tabla 3.5. Después de la aplicación, las plantas se dejaron un día fuera de la cámara de crecimiento y se volvieron a introducir de nuevo en las condiciones anteriormente descritas. A los 21 días, se evaluó la reducción de peso fresco (%) de las plantas tratadas con respecto a un control no tratado.

Tabla 3.4. Relación de herbicidas empleados en los bioensayos de postemergencia en biotipos resistentes y sensibles de *P. minor*.
Abreviaturas: CE, concentrado emulsionable, LE, líquido emulsionable.

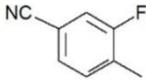
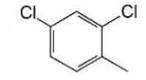
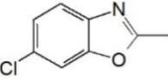
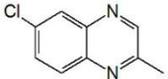
Ariloxifenoxipropanoatos								
Nombre común	R ₁	R ₂	Estado	IUPAC	CAS	Reg. No.	Fórmula	Peso molecular
cihalofop-butil		C ₄ H ₉	ISO 1750 (publicado)	Ácido (R)-2-[4-(4-ciano-2-fluorofenoxi)fenoxi]propiónico	Ácido (2R)-2-[4-(4-ciano-2-fluorofenoxi)fenoxi]propanoico	122008-78-0	C ₁₆ H ₁₂ FNO ₄	357.4
diclofop-metil		CH ₃	ISO 1750 (publicado)	Ácido (RS)-2-[4-(2,4-diclorofenoxi)fenoxi]propiónico	Ácido 2-[4-(2,4-diclorofenoxi)fenoxi]propanoico	40843-25-2	C ₁₅ H ₁₂ Cl ₂ O ₄	341.2
fenoxaprop-etil		C ₂ H ₅	ISO 1750 (aprobado provisionalmente)	Ácido (R)-2-[4-(6-cloro-1,3-benzoxazol-2-iloxi)fenoxi]propiónico	Ácido (2R)-2-[4-[(6-cloro-2-benzoxazolil)oxi]fenoxi]propanoico	113158-40-0	C ₁₆ H ₁₂ ClNO ₅	361.8
propaquizafop		(CH ₃)C=NOCH ₂ CH ₂	ISO 1750 (aprobado)	2-isopropilideneaminoxietil (R)-2-[4-(6-cloroquinoxalin-2-iloxi)fenoxi]propionato	2-[[[(1-metiletilideno)amino]oxi]etil (2R)-2-[4-[(6-cloro-2-quinoxalinil)oxi]fenoxi]propanoato	111479-05-1	C ₂₂ H ₂₂ ClN ₃ O ₅	443.8

Tabla 3.4. Continuación

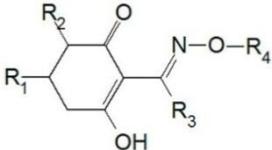
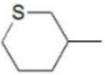
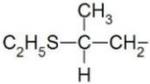
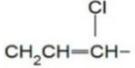
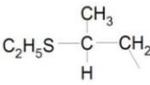
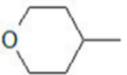
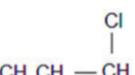
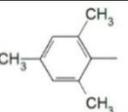
Ciclohexanodionas										
										
Nombre común	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Estado	IUPAC	CAS	Reg. No.	Fórmula	Peso molecular
cicloxidim		H ₂	C ₃ H ₇	C ₂ H ₅	ISO 1750 (aprobado)	(<i>RS</i>)-(<i>EZ</i>)-2-[1-(etoxi amino)butil]-3-hidroxi-5-tian-3-ilciclohex-2-en-1-ona	2-[1-(etoximino)butil]-3-hidroxi-5-(tetrahydro-2 <i>H</i> -tiopiran-3-il)-2-ciclohexen-1-ona	101205-02-1	C ₁₇ H ₂₇ NO ₃ S	325.5
cletodim		H ₂	C ₂ H ₅		ISO 1750 (publicado)	(5 <i>RS</i>)-2-[(<i>E</i>)-1-[(2 <i>E</i>)-3-cloroaliloximino]propil]-5-[(2 <i>RS</i>)-2-(etiltilio)propil]-3-hidroxiciclohex-2-eno-1-ona	2-[(1 <i>E</i>)-1-[[[(2 <i>E</i>)-3-cloro-2-propenil]oxi]imino]propil]-5-[2-(etiltilio)propil]-3-hidroxi-2-ciclohexeno-1-ona	99129-21-2	C ₁₇ H ₂₆ ClNO ₃ S	359.1
setoxidim		H ₂	C ₃ H ₇	C ₂ H ₅	ISO 1750 (publicado)	2-[1-(etoxiamino)butilideno]-5-(2-etilsulfanilpropil)ciclohexano-1,3-dione	2-[(1 <i>E</i>)- <i>N</i> -etoxibutanimidoyl]-5-[2-(etilsulfanil)propil]-3-hidroxiciclohex-2-en-1-ona	74051-80-2	C ₁₇ H ₂₉ NO ₃ S	327.5
tepraloxidim		H ₂	C ₂ H ₅		ISO 1750 (publicado)	(5 <i>RS</i>)-2-[(<i>EZ</i>)-1-[(2 <i>E</i>)-3-cloroaliloximino]propil]-3-hidroxi-5-perhidropiran-4-ilciclohexeno-2-en-1-ona	2-[1-[[[(2 <i>E</i>)-3-cloro-2-propenil]oxi]imino]propil]-3-hidroxi-5-(tetrahydro-2 <i>H</i> -piran-4-yl)-2-ciclohexeno-1-ona	149979-41-9	C ₁₇ H ₂₄ ClNO ₄	341.8
tralkoxidim		H ₂	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	ISO 1750 (aprobado)	(<i>RS</i>)-2-[(<i>EZ</i>)-1-(etoximino)propil]-3-hidroxi-5-mesitilciclohex-2-eno-1-ona	2-[1-(etoximino)propil]-3-hidroxi-5-(2,4,6-trimetilfenil)-2-ciclohexeno-1-ona	87820-88-0	C ₂₀ H ₂₇ NO ₃	329.4



Figura 3.10. Máquina de laboratorio de aplicación de herbicidas, donde se controla la presión, el volumen, la velocidad y la altura de la aplicación.

Se calculó la dosis efectiva (ED_{50}), representando gráficamente el porcentaje de peso fresco (crecimiento) con respecto al control no tratado a la concentración de herbicida. Los datos se ajustaron a un modelo de regresión no-lineal (Streibig y Kudsk, 1993), utilizando para ello un ajuste por medio de una curva sigmoideal (cuatro parámetros).

$$Y = c + \{(d-c)/[1+(x/g)^b]\},$$

donde Y representa el peso fresco expresado como porcentaje del control no tratado, c y d son los coeficientes que corresponden a las asíntotas superior (máximo crecimiento) e inferior (mínimo crecimiento), b es la pendiente de Hill, g es la dosis de herbicida (ED_{50}) en el punto de inflexión medio entre la asíntota superior y la inferior, y x (variable independiente) es la dosis de herbicida.

Sustituyendo las literales la ecuación queda:

$$Y = \text{Mínimo} + \{(\text{Máximo}-\text{Mínimo})/[1+(\text{dosis del herbicida}/ ED_{50})]^{\text{pendiente de Hill}}\}$$

Los análisis de regresión no lineal, se realizaron utilizando el programa estadístico SigmaPlot 10.0 (2008).

Tabla 3.5. Dosis de herbicidas utilizadas para el cálculo de parámetros de la curva sigmoideal de *P. minor* provenientes de Guanajuato, México.

Biotipo	Herbicida	Dosis (g i. a./ha)
Biotipo S	Cihalofop-butil	(20, 30, 40, 50, 70)
	Diclofop-metil	(72, 144, 216, 360)
	Fenoxaprop-etil	(20, 30, 40, 45, 50)
	Propaquizafop	(20, 40, 60, 100)
	Cicloxiidim	(20, 40, 60, 100)
	Cletodim	(40, 80, 100, 150, 200)
	Tralkoxidim	(200, 300, 400, 500)
Biotipo R	Cihalofop-butil	(100, 300, 600, 700, 900)
	Diclofop-metil	(3000, 3500, 4000, 5000)
	Fenoxaprop-etil	(200, 300, 400, 500, 600)
	Propaquizafop	(3000, 3500, 4000, 5000)
	Cicloxiidim	(2000, 3000, 3500, 4000)
	Cletodim	(80, 100, 150, 200, 400)
	Tralkoxidim	(300, 400, 500, 600)

3.2. Mecanismos de resistencia fuera del sitio de acción

3.2.1. Absorción y translocación de ¹⁴C-diclofop-metil

3.2.1.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento

Las semillas de los biotipos R y S provinieron de la localidad descrita en 3.1.1. Estas fueron germinadas como se describió en el apartado 3.1.3. Una o cuatro semillas pregerminadas (para los ensayos de absorción/translocación y los de metabolismo, respectivamente) fueron plantadas por maceta de plástico (7 cm de diámetro, 7 cm de alto) en una mezcla arena/turba (2/1, v/v). Las plantas se cultivaron en una cámara de crecimiento bajo las mismas condiciones que para la germinación.

3.2.1.2. Herbicidas y reactivos

En la Tabla 3.4. se describen los herbicidas usados en este trabajo, por orden alfabético de su materia activa, resaltando algunas de sus propiedades más destacadas

3.2.1.3. Metodología utilizada

El origen de los herbicidas se describió en 3.1.2. El ¹⁴C-DM se mezcló con la formulación comercial de DM para preparar una emulsión con una actividad específica de 37,9 Bq/mg y una concentración de MS de 6,6 g/L (que corresponde a 1,0 kg/ha de DM a 150 L/ha). Mediante un microaplicador (Hamilton PB-600), se aplicaron cuatro gotas de 0,5 µL de esta formulación del herbicida a la cara adaxial de la segunda hoja de cada planta, cuando éstas alcanzaron el estado de desarrollo de tres a cuatro hojas (BBCH 13-14). Un total de 833.33 Bq se aplicaron en cada planta (Cruz *et al.* 2011).

Las plantas se cosecharon en lotes de tres, a las 6, 12, 24, 48 y 72 h después de la aplicación del herbicida, y se separaron en hojas tratadas y resto de plantas. Las raíces fueron descartadas, debido a que la translocación del herbicida de hoja a raíces se ha descrito como indetectable en el trigo (Brezeanu *et al.*, 1976). El herbicida no absorbido fue retirado de la superficie de la hoja lavando el área tratada con 1,5 mL de acetona. El lavado de cada lote se agrupó y se analizó por espectrometría de centelleo líquido (LSS) (Beckman LS 6000 TA). El tejido se secó a 60°C durante 48 h, y se combusionó en un oxidador (Packard 307). El CO₂ que se produjo fue atrapado y cuantificado en 10 mL de una mezcla de Carbosob E/Permafluor (7.3 v/v) (Packard Instruments Co. La radiactividad se cuantificó por LSS y se expresó como el porcentaje de la radioactividad recuperada, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de absorción} = \left[\frac{{}^{14}\text{C en tejido combustionado}}{({}^{14}\text{C en tejido combustionado} + {}^{14}\text{C en lavado de hojas})} \right] \times 100$$

El experimento se repitió tres veces.

3.2.1.4. Autorradiografías

Se realizaron a través de un sistema automático de medidas "Fósforo Imagen", que permite la visualización del movimiento de ¹⁴C-DM (Cyclone, Parking-Elmer, Packard Bioscience BV). Las plantas fueron tratadas como se describe en los ensayos de absorción y translocación. Las plantas enteras fueron lavadas y secadas a temperatura ambiente (25°C) durante una semana; posteriormente, fueron colocadas sobre un film de fósforo, se presionaron sobre éste durante 10 h y finalmente la dispersión de ¹⁴C fue escaneada y visualizada a través de la pantalla del ordenador que contenía el programa correspondiente.

3.2.2. Metabolismo de ¹⁴C-diclofop-metil

3.2.2.1. Material vegetal y herbicidas

El metabolismo de ¹⁴C-DM fue examinado en el tejido foliar de los biotipos R y S en un estadio de dos hojas, como fue realizado en los estudios de la absorción; el origen de los herbicidas se describió en 3.1.2.

3.2.2.2. Metodología utilizada

El herbicida se aplicó a la superficie adaxial de la segunda hoja en 10 gotas de 0,5 µL con un microaplicador. Se aplicó un total de 5.000 Bq en cada planta. Las plantas R y S se muestrearon 6, 12, 24 y 48 h después del tratamiento. Las hojas tratadas se lavaron siguiendo las indicaciones anteriores. Una alícuota de la solución de lavado de la hoja fue tomada para cuantificar la radiactividad, y la solución restante se almacenó a -20°C hasta su análisis. Las plantas tratadas fueron separadas en raíces y resto de la planta. La parte aérea de cada planta fue pulverizada en nitrógeno líquido con un mortero. El polvo se extrajo a 4°C con 4 mL de metanol al 80%, y el homogenizado se centrifugó a 20000G durante 20 min. El pellet se lavó con metanol al 80% hasta que ya no se extrajo ningún resto de ¹⁴C. Los pellets fueron secados en un horno y quemados como se mencionó anteriormente. Los sobrenadantes se combinaron, se evaporaron a 40°C bajo una corriente de N₂ a 10 kPa, y se disolvieron en 500 mL de metanol al 80%. El DM y sus metabolitos en el sobrenadante fueron identificados por cromatografía en capa fina, de 250 µ placas de gel de sílice de 20 cm × 20 cm, 250 µm (Merck, gel de sílice 60) y como fase móvil una mezcla de tolueno/etanol/ácido acético (150/7/7, v/v/v). Las zonas radiactivas fueron detectadas con un escáner radiocromatógrafo (Berthold LB 2821) y su naturaleza química fue identificada mediante la comparación de sus valores R_f con los de los patrones (DM, 0,70; diclofop-ácido, 0,44; hidroxidiclofop, 0,34; conjugados polares, 0,00). Para las determinaciones cuantitativas, las manchas radiactivas se desprendieron, se extrajeron con metanol al 80%, y fueron cuantificadas por LSS. El experimento se repitió tres veces.

3.2.3. Efecto de ABT sobre el metabolismo de diclofop metil

Se ha demostrado que el ABT (1-aminobenzotriazol) inhibe el metabolismo de ¹⁴C-DM en *L. rigidum* (Preston *et al.*, 1996; De Prado *et al.*, 2005). En este ensayo, las plantas con dos hojas completamente expandidas fueron retiradas de las macetas y las raíces se lavaron cuidadosamente. Las plantas individuales se colocaron en 50 mL de contenedores llenos con solución nutritiva los cuales contenían 7,5 mg/L de ABT. La solución nutritiva fue aireada con aire filtrado. Después de ocho días de incubación en ABT, las plantas fueron tratadas con DM como se describió previamente y se cosecharon 72 h después del tratamiento (HDT) de herbicidas.

El DM y sus metabolitos fueron extraídos, cromatografiados, e identificados como se describió anteriormente.

3.3. Mecanismos de resistencia dentro del sitio de acción

3.3.1. Extracción y actividad acetyl CoA carboxilasa (ACCasa)

3.3.1.1. Material vegetal

Cariópsides de *P. minor* se germinaron directamente en bandejas y se dejaron crecer bajo las condiciones descritas anteriormente, hasta que alcanzaron un estadio variable entre cuatro hojas y dos hijos.

3.3.1.2. Herbicidas y reactivos empleados

3.3.1.2.1. Herbicidas

La inhibición de la ACCasa se evaluó para cinco diferentes herbicidas, tres de los cuales son ariloxifenoxipropanoatos y dos ciclohexanodionas. Para los ensayos de determinación del valor I_{50} de la enzima ACCasa, se prepararon dos concentraciones madre de cada herbicida (6×10^{-5} y 6×10^{-3} M) en un volumen final de 2 mL de metanol puro. Todos estos ingredientes activos puros fueron suministrados por Bayer CropScience, BASF y Dow Agrosciences. Su estructura molecular se muestra en la Tabla 3.4. Las características principales se enlistan a continuación:

- Cihalofop-ácido

Nombre químico: Ácido 2-(4-(4-ciano-2-fluorofenoxi)fenoxi) propanoico

Nombre común: Cihalofop, DE-537 K-183984, X014603

Formula molecular: $C_{16}H_{12}FNO_4$

Peso molecular: 301.4

Estado físico: sólido

Pureza: 99.4%

-Diclofop-ácido

Nombre químico: Ácido (RS)-2-[4-[(2,4-diclorofenoxi) fenoxi] ácido propanoico

Nombre común: Diclofop M (BSI, borrador E-ISO; AE-F023408)

Fórmula molecular: $C_{15}H_{12}Cl_2O_4$

Peso molecular: 327.16

Estado físico: polvo fino

Pureza: 99%

-Fenoxaprop-ácido

Nombre químico: Ácido (R)-2-[4-[(6-cloro-2-benzoxazolil)oxi]fenoxi] propanoico

Nombre común: Fenoxaprop-p (BSI, borrador E-ISO; AE-F088406)

Fórmula molecular: $C_{16}H_{12}ClNO_5$

Peso molecular: 333.5

Estado físico: polvo fino

Pureza: 99%

-Setoxidim

Nombre químico: (5RS)-2-[(EZ)-1-(ethoximino)butil]-5-[(2RS)-2-(etiltio)propil]-3-hidroxiciclohex-2-eno-1-ona

Nombre común: Setoxidim

Fórmula molecular: $C_{17}H_{29}NO_3S$

Peso molecular: 327.48

Estado físico: polvo fino

Pureza: 99%

-Tepraloxidim

Nombre químico: (RS)-2-[(EZ)-1-(etoximino) propil]-3-hidroxi-5-mesitilciclohex-2-eno-1-ona

Nombre común: Tepraloxidim

Fórmula molecular: $C_{17}H_{24}ClNO_4$

Peso molecular: 341.83

Estado físico: polvo fino

Pureza: 99%

3.3.1.2.2. Reactivos

Acetil Coenzima A ($C_2:0$, sal de litio), F.M.: $C_{23}H_{38}N_7O_{17}P_3S$, ref. A2181, Sigma-Aldrich

Ácido clorhídrico, F.M.: HCl, P.M.: 36.46, pureza: 37%, lot.: 66165 NKN, Panreac Químico, S.A.

ATP, Adenosina 5' trifosfato (sal disódica, grado I), F.M.: $C_{10}H_{14}N_5O_{13}P_3Na_2$, P.M.: 551.1, pureza: 99%, lot. 52H7828, ref. A-2383, Sigma-Aldrich.

^{14}C -Bicarbonato sódico (Actividad específica: 44 KBq/mg), P.M.: 84, cód.: CFA.431, Amersham Biosciences Europe GMBH, Parc Tecnologic del Vallés, Barcelona (España).

Carbonato de sodio hidrógeno, F.M.: $NaHCO_3$, P.M.: 84.01, pureza: 99.5%, ref.: 6329, Merck.

Cloruro de magnesio, F.M.: $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, P.M.: 203.3, pureza: 99%, ref.: 5833, E. Merck, D-6100, Darmstadt WGKO.

Cloruro potásico, F.M.: KCl, P.M.: 74.56, pureza: 99%, ref.: 0502K, lot.: 149852270, Panreac Químico, S.A.

DTT, Ditiotreitól, F.M.: $C_4H_{10}O_2S_2$, P.M.: 154.3, pureza: 99%, ref: D-9779, lot: 072K0915, Sigma.

Etanol, F.M.: CH_3CH_2OH , P.M.: 46.07, pureza: 99.5%, ref: 1005K, lot: 149957990, Panreac Químico, S.A.

Glicerol, F.M.: $C_3H_8O_3$, P.M.: 92.10, pureza: 99%, ref.: 2411K, lot.: 149970320, Panreac Químico S.A.

Hepes, N-2-(hidroxietil)piperazina-N'-(2-ácido-etanosulfónico), P.M.: 238.3, F.M.: $C_8H_{18}N_2O_4S$, pureza: 99%, ref.: H-0891, lot.: 48H5432, Sigma.

Hidróxido potásico, F.M.: KOH, P.M.: 56.11, pureza: 85%, ref.: P-5958, lot.: 97H0852, Sigma.

Na₂EDTA, Ácido etilendiamino tetracético (sal disódica, dihidrato), F.M.: C₁₀H₁₄N₂O₈Na₂·2H₂O, P.M.: 372.2, pureza: 99%, ref.: E-5134, lot.: 87H0089, Sigma.

PMSF, Fluoruro fenilmetilsulfonil, F.M.: C₇H₇FO₂S, P.M.:174.2, pureza: 99%, ref.: P-7626, lot.: 072K0246, Sigma.

Sulfato amónico, F.M.: (NH₄)₂SO₄, P.M.: 132.14, pureza: 98%, ref: 2906L, lot: 142056500, Panreac Químico, S.A. E-08110 Montcada I Reixac Barcelona (España).

Tricina, N-Tris[hidroximetil]metilglicina, F.M.: C₆H₁₃NO₅, P.M.: 179.2, pureza: 99%, ref.: T-0377, lot.: 121K5403, Sigma.

Bicarbonato sódico (frío) 0.644M 0.54 g/10 ml H₂O. Almacenado en frigorífico a 4°C.

MgCl₂ 50mM 0.1 g/10 mL H₂O

ATP 3.75 mM

16.4 mg ATP
6 mL S-400 (con DTT fresco)
2 mL MgCl₂ 50 mM

Acetil Coenzima A 10 mM, 10 mg/1 mL H₂O (congelado a -20°C en alícuotas de 500 µL)

PMSF 0.1M, 0,35 g/20 mL isopropanol 99%

KOH 10N, 14 g/25 mL H₂O

¹⁴C-bicarbonato sódico

75 µL ¹⁴C-bicarbonato sódico
928 µL bicarbonato frío 0.644 M
1037 µL S-400 (con DTT añadido). Congelado a -20°C en alícuotas de 250 µL.

Tampón S-400	
(Volumen final 100 mL de agua destilada)	
<u>0,1 M Tricina</u>	<u>1,792 g</u>
<u>0,5 M Glicerol</u>	<u>3,6 mL</u>
<u>2 mM Na₂EDTA</u>	<u>0,076 g</u>
<u>50 mM KCl</u>	<u>0,372 g</u>
<u>0,5 mM DTT(*)</u>	<u>7,72 mg</u>

Se ajustó el pH a 8.3 con KOH 10N y luego se completó el volumen

(*) Se añadió DTT al momento de prepararlo.

**Tampón de extracción
(Volumen final de 100 mL)**

0,1 M HEPES-KOH	2,4 g
0,5 M glicerol	3,6 mL
2 mM Na ₂ EDTA	0,075 g
0,32 mM PMSF	320 µL
5 mM DTT	0,07 g

**Se ajustó el pH a 7.5 con KOH 10N.
Se añadió PMSF y DTT al momento de utilizarlo.**

3.3.1.3. Extracción de la enzima

Una vez que las plantas de *P. minor* alcanzaron el estadio óptimo, se cortó el material vegetal (3 g de peso fresco) y se pulverizó con N₂ líquido en un mortero de porcelana. Se utilizó tanto material fresco como congelado a -80°C. El polvo obtenido se homogeneizó en tampón de extracción en una proporción 1:4 (tejido:volumen tampón) durante 5 min, usando un agitador magnético. El homogenizado fue posteriormente filtrado a través de cuatro capas de cheesecloth y el filtrado se centrifugó a 24000 g (14086 rpm) durante 30 min a una temperatura de 4°C. El sobrenadante se fraccionó con sulfato amónico durante 15 min en agitador magnético y posteriormente se centrifugó durante 20 min a 12000 g (9960 rpm) a 4°C. El material precipitado al 45% se resuspendió en 1 mL de tampón S-400.

El pellet resuspendido fue aplicado a una minicolumna Sephadex G-25 de 10 mL equilibrada previamente con 25 mL de tampón S-400. Las fracciones fueron eluidas utilizando el mismo tampón, utilizándose para ello 4 mL y recogiendo el extracto enzimático en los últimos 2 mL. Todas las operaciones de extracción se llevaron a cabo dentro de la cámara fría (4°C). Las centrifugaciones se llevaron a cabo en centrífuga Beckman-Coulter modelo Avanti J-25.

3.3.1.4. Ensayo de actividad de la ACCasa

La determinación de la actividad enzimática se realizó por medida de la radioactividad estable en medio ácido presente tras la reacción (cantidad de NaH¹⁴CO₃ incorporado a la síntesis de malonil-CoA a partir de acetyl-CoA). Los ensayos se realizaron en viales de contador de centelleo de 7 mL, añadiendo a éstos la mezcla de reacción que

contenía tampón S-400, ATP 3,75 mM, $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ ($33 \mu\text{Ci} / \mu\text{mol}$), 50 μL de extracto crudo y acetil-coenzima A 10 mM y metanol con las diferentes concentraciones de los herbicidas a estudiar en un volumen de 200 μL . La temperatura del ensayo fue de 34°C. Todos los componentes de la mezcla de ensayo, excepto acetil CoA, fueron preincubados a 34°C durante 1 min, tras lo cual se añadió en intervalos de 20 s el acetil-coenzima A (30 μL) comenzando así la reacción. Tras 5 min, la reacción se detuvo añadiendo 30 μL de HCl 4 N cada 20 s y se añadió a cada repetición un trozo de papel de filtro (2,3 x 0,5 cm) donde quedó retenido todo el ^{14}C -malonil-CoA formado. Las muestras se llevaron a la sequedad a 30°C bajo una corriente de nitrógeno, evaporando así todo el $\text{NaH}^{14}\text{CO}_2$ no incorporado y posteriormente se agregó 0,5 mL de etanol 50% (v/v) y 3 mL de líquido de centelleo. La radiactividad en forma de ^{14}C -malonil-CoA se determinó mediante un contador de centelleo Beckman-Coulter modelo LS-6500. Como blanco se utilizó la misma mezcla de reacción pero sin acetil-CoA. Los resultados se expresaron como la concentración de herbicida necesaria para inhibir la actividad ACCasa un 50% (I_{50}). Las pruebas se realizaron por triplicado, con dos repeticiones por cada ensayo (Tabla 3.6).

3.3.1.5. Análisis estadístico

El cálculo del valor I_{50} se realizó representando gráficamente el porcentaje de actividad enzimática con respecto a un control no tratado (sin herbicida) frente a las dosis crecientes de herbicida (μM). Los datos procedentes de los tres experimentos fueron reunidos y ajustados a un modelo de regresión no-lineal (Streibig y Kudsk, 1993), utilizando para ello un ajuste por medio de una curva sigmoideal de cuatro parámetros.

$$Y=c + \{(d-c)/[1+(x/g)^b]\}$$

Donde Y es la actividad enzimática expresada como porcentaje del control incubado sin herbicidas, c y d son los coeficientes que corresponden a las asíntotas superior (máxima actividad) e inferior (mínima actividad), b es la pendiente de Hill, g es la dosis de herbicida (I_{50}) en el punto de inflexión medio entre la asíntota superior y la inferior, y x (variable independiente) es la dosis de herbicida. Los análisis de regresión sigmoideal se realizaron utilizando el programa estadístico SigmaPlot 8.0 (2002).

Tabla 3.6. Resumen de ensayos de actividad ACCasa para diferentes concentraciones de herbicida en los ensayos *in vivo* de ACCasa.

Los volúmenes utilizados aparecen expresados en μL .

	Control ^{14}C	Blanco	Control actividad	0.3 μM	3 μM	30 μM	300 μM
Tampón S-400	190	50	20	20	20	20	20
ATP 3.75 mM	-----	80	80	80	80	80	80
Herbicida	-----	-----	-----	μL (0.06 μM)	10 μL (0.06 μM)	1 μL (6 μM)	10 μL (6 μM)
Metanol	-----	10	10	9	-----	9	-----
Extracto enzimático	-----	50	50	50	50	50	50
^{14}C -bicarbonato	10	10	10	10	10	10	10
Mantener en baño de agua a 34°C durante 1 min.							
Una vez transcurrido el tiempo se añadió acetil-coenzima A cada 20 s.							
Acetil coenzima A 10 mM	-----	-----	30	30	30	30	30
Trascurrido el tiempo de adición de acetil-coenzima A, para parar la reacción se añadió HCl, cada 20 s.							
HCl	-----	30	30	30	30	30	30

*Para el caso de fenoxaprop-ácido el solvente utilizado fue acetona.

3.3.2. Secuenciación del dominio carboxil-transferasa (CT)

3.3.2.1. Material vegetal

Se tomaron muestras de la parte aérea de plantas individuales jóvenes en estadio de tres a cuatro hojas, ya que éstas contienen habitualmente menos cantidad de polifenoles y polisacáridos que pueden interferir en los ensayos. Cada una de estas plantas fue etiquetada individualmente. Tras la recogida del material vegetal, las plantas, en un estadio de tres hojas, se trataron con fenoxaprop a una dosis de 180 g de i. a./ha. Todas las plantas sensibles murieron con este tratamiento, mientras que las resistentes sobrevivieron. Esto sirvió para confirmar la resistencia o sensibilidad de cada planta individual utilizada en este estudio.

3.3.2.2. Extracción de ADN

Las muestras de material vegetal (100 a 200 mg) fueron homogeneizadas en un mortero utilizando nitrógeno líquido, hasta obtener un polvo fino. El resto del proceso se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del kit DNeasy Plant Mini kit, suministrado por la casa QIAGEN GmbH, Alemania. El ADN obtenido se eluyó en un volumen final de 100 μ L.

Como se muestra en la Figura 3.11, las bandas son nítidas, demostrando la integridad del ADN.

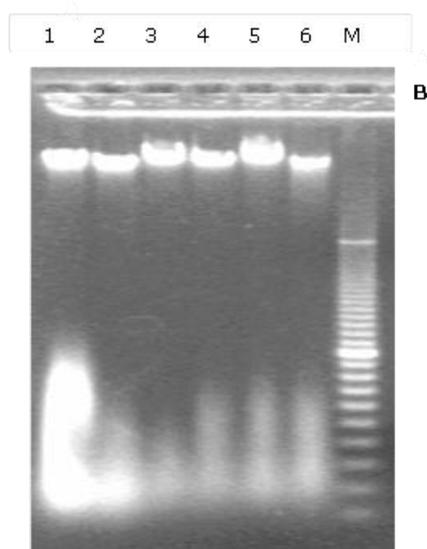


Figura 3.11. Gel de agarosa al 1,5%. Muestras de ADN procedentes de plantas individuales de *P. minor* (1-3: R; 4-6: S); M: marcador de peso molecular 100 pares de bases (pb). En ambos casos se analizaron 3 μ L de la preparación de ADN + 2 μ L de tampón de carga.

3.3.2.3. Cuantificación del ADN

La concentración y pureza del ADN contenido en las muestras se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm (A_{260}) y a 280 nm (A_{280}) en un espectrofotómetro. Se realizaron las correspondientes diluciones para conseguir una absorbancia entre 0.1 y 1. Una A_{260} equivale a una cantidad de ADN de 50 $\mu\text{g/mL}$. La pureza del ADN se determinó calculando la relación de A_{260} con respecto a A_{280} . El ADN puro tendría un valor de esta relación entre 1.7 y 1.9.

El método utilizado para la separación e identificación de moléculas de ADN fue la electroforesis en geles de agarosa (1,5%) disuelta en tampón TAE 1X (40 mM Tris-acetato; 10 mM EDTA). La electroforesis se realizó en cubetas horizontales con el mismo tampón, a un voltaje de 1 a 4 voltios/cm. Antes de cargarlas en el gel, las muestras de ADN se mezclaron en proporción 4:1 (v:v) con el tampón de carga para ADN (0,25% azul de bromofenol, 30% glicerol en H_2O destilada). Para visualizar la separación de las moléculas de ADN en el gel, éste se coloreó en un baño conteniendo bromuro de etidio (0,5 $\mu\text{g/mL}$) durante 20 min. Los geles fueron analizados bajo luz UV (254 nm) y documentados realizando fotografías de los distintos geles. La longitud de los fragmentos del ADN extraído se determinó utilizando un patrón de ADN (0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, Roche Diagnostic GmbH, Alemania).

3.3.2.4. Amplificación de las regiones A y B del dominio CT

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, polymerase chain reaction) se utilizó para amplificar los distintos fragmentos de interés del ADN genómico extraído de *P. minor* para amplificar dos regiones de interés, A y B en el dominio carboxiltransferasa (CT) del gen ACCasa.

3.3.2.5. Diseño de los cebadores

Para la amplificación de las regiones A y B del dominio CT, las cuales pudieran albergar sustituciones nucleotídicas (SNP, single nucleotide polymorphism), se diseñaron cebadores no degenerados tomando como referencia los cebadores utilizados para *P. paradoxa* en el trabajo desarrollado por Cruz-Hipólito (2010). Los cebadores Up/Low ACCase n600 avena (Tabla 3.7) produjeron un fragmento de 600 pares de bases (pb), el cual abarcaba el triplete de isoleucina (Ile) en posición aminoacídica 1.781. Los cebadores Up/Low ACCase n591 (Tabla 3.7) produjeron un fragmento de 591 pb, el cual abarcaba los tripletes codificantes para Trp 2.027, Ile 2.041, Asp 2.078 y Gly 2.096 (Délye, 2005). Los cebadores fueron sintetizados por Carl Roth GMBH (Karlsruhe, Alemania) (Tabla 3.7).

Tabla 3.7. Cebadores utilizados en la amplificación de los fragmentos conteniendo las principales sustituciones aminoacídicas descritas en la región A (Up n600/ Low n600) y B (Up n591/ Low n591) del dominio CT.

	Primer	Secuencia (5' - 3')
A	Up ACCase n600 avena	GCGTGCTGCTGGGCTCAAT
	Low ACCase n600 avena	CCAGTTAAGATAATGGGCTGGTC
B	Up ACCase n591	AAGGATGGGCGAAGACAGTAGTTA
	Low ACCase n591	CTCCATCAGATAGGCTTCCATTT

Los programas de amplificación se muestran en la Tabla 3.8. Una vez finalizadas las reacciones de PCR, se tomó una alícuota de 3 µL de cada una y se mezcló con 2 µL de tampón de carga y se analizó mediante electroforesis determinándose el tamaño de los fragmentos obtenidos, con una escalera de peso molecular de 100 pb (GeneRuler™, MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Alemania). Las muestras se conservaron a -20°C para usos posteriores.

Tabla 3. 8. Programas de amplificación por PCR de las regiones A y B del dominio CT del gen de la ACCasa.

Etapas	Up/Low ACCase n600 Avena	Up/Low ACCase n591
Desnaturalización inicial	94°C/2 min	94°C/2 min
Desnaturalización	94°C/30 s	94°C/30 s
Alineamiento	60,8°C/30 s	60°C/30 s
Extensión (35 ciclos)	72°C/1 min	72°C/1 min
Extensión final	72°C/7 min	

3.3.2.6. Purificación de los fragmentos obtenidos en la PCR

Para la secuenciación de los productos obtenidos en la PCR, todos los restos de cebadores, sales y Taq-polimerasa deben ser retirados. Hay diversas formas de purificar estos fragmentos. Se puede hacer directamente una purificación desde la solución obtenida en la PCR o cortando el fragmento del gel. En este caso, se realizó la purificación desde la solución obtenida tras la PCR, ya que una sola banda fue obtenida en el gel cuando se comprobó la calidad del ADN.

Para ello, los fragmentos obtenidos de siete reacciones de PCR de independientes repeticiones se juntaron y purificaron obteniendo un volumen final 175 µL. La

purificación se realizó siguiendo las instrucciones del kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania). Finalmente cada muestra fue concentrada en un volumen final de 21 μL . Se tomó 1 μl de cada muestra para comprobar la cantidad y calidad mediante electroforesis.

3.3.2.7. Secuenciación del gen ACCasa

La secuenciación de las muestras de ADN genómico purificado fue realizada en la Unidad de Genómica del Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba.

4. Resultados

4.1. Ensayos de dosis-respuesta (cálculo del ED₅₀)

Los resultados para *P. minor* se muestran en la Figura 3.12. Se puede ver una diferencia en la eficacia, sobre todo si se presta atención a las últimas dosis, donde la fitotoxicidad al biotipo S que se presenta a 50 g, es mayor a la del biotipo R que ha sido tratado con 500 g, dicho de otra forma, superando la dosis 10 veces.

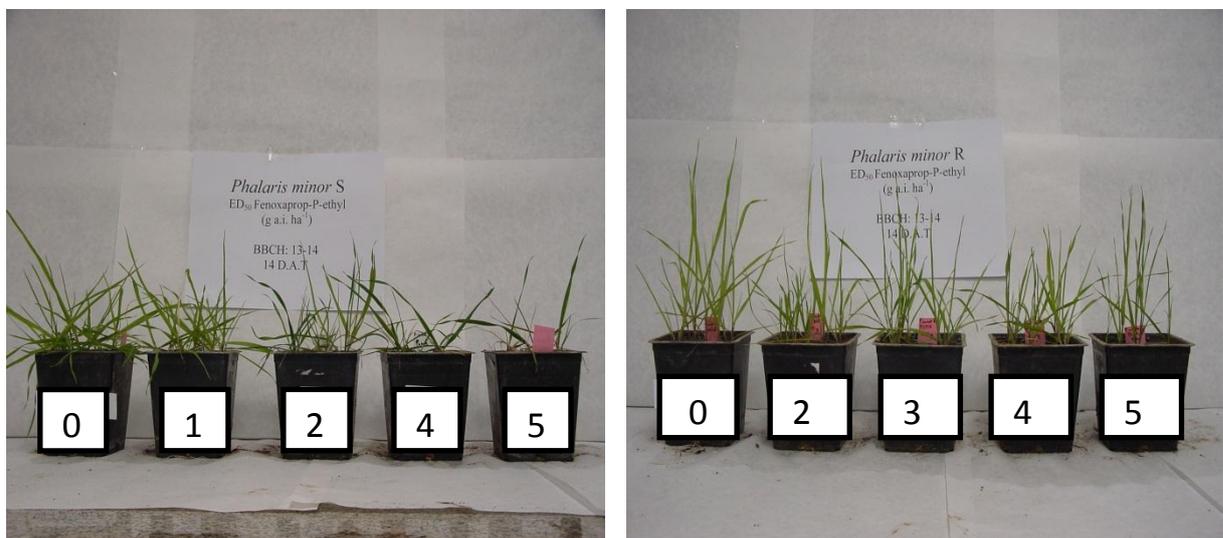


Figura 3.12. Efecto de fenoxaprop (g i. a./ha) aplicado en postemergencia sobre los biotipos S (izquierda) y R (derecha) de *P. minor* proveniente de México, evaluado 21 días después del tratamiento.

En la Tabla 3.9 se pueden ver los siete distintos herbicidas evaluados, de los cuales, cuatro son APPs y tres CHDs. Estas pruebas estuvieron encaminadas a determinar la existencia de resistencia cruzada.

Al analizar el diclofop-metil, se observa que el valor en el biotipo R es muy alto, pues se requiere más de 1 kg de materia activa para reducir al 50% el peso fresco. La dosis máxima recomendada para este herbicida y mala hierba es de 900 g de i. a./ha, constatando con esto la resistencia observada en campo.

El nivel de la resistencia para fenoxaprop varió entre ambos biotipos, en la Tabla 3.9 se puede observar que la ED₅₀ del sensible es 23 g de i. a./ha, y para el biotipo resistente se necesitaron más de 300 g. i. a./ha para reducir a un 50% el peso fresco.

Para el cihalofop, el biotipo S presenta valores ED_{50} de 34 g. i. a./ha, mientras que el biotipo R supera en más de 15 veces este valor (Tabla 3.9).

Tabla 3.9. Resultados de los ensayos dosis-respuesta de *P. minor*. Parámetros de la ecuación de la curva sigmoïdal utilizada para calcular la dosis de herbicida necesarias para reducir un 50% del peso fresco (ED_{50}) de los biotipos de *P. minor* en los ensayos dosis-respuesta llevados a cabo y las relaciones obtenidas (FR: factor de resistencia) del biotipo resistente. Los datos se ajustaron por medio de un modelo de regresión no lineal.

Herbicida	Accesión	Máximo	Mínimo	Pendiente de Hill	R ²	ED ₅₀ (g. i. a./ha)	FR
Diclofop-metil	S	96,93	31,77	5,64	0,99	103,93	--
	R	96,93	1,09	0,47	0,99	1018,27	9,79
Fenoxaprop-p-etil	S	100,00	5,76	4,57	0,99	23,77	--
	R	100,00	8,70	10,39	0,99	331,97	13,96
Cihalofop-butil	S	95,76	1,07	2,53	0,94	34,39	--
	R	99,73	1,02	0,76	0,96	601,76	17,49
Propaquizafop	S	99,70	2,64	2,92	0,99	29,66	--
	R	100,00	1,07	3,23	0,98	520,54	17,55
Tralkoxidim	S	99,36	1,76	4,17	0,94	221,6	--
	R	100,00	4,18	3,41	0,96	460,71	2,07
Cletodim	S	100,00	3,18	0,85	0,99	8,71	--
	R	99,77	3,56	3,06	0,97	45,04	5,17
Cicloxidim	S	100,00	19,26	5,63	0,94	24,80	--
	R	100,00	2,80	1,97	0,99	294,60	11,87

En la Tabla 3.9 se puede ver la respuesta del biotipo R a la aplicación de propaquizafop, en donde el FR supera las 10 veces la dosis del biotipo S; estos resultados concuerdan con los herbicidas anteriores, pertenecientes a la misma familia química.

En cuanto a los herbicidas CHD's, en la Tabla 3.9 se aprecia la existencia de resistencia cruzada para los tres herbicidas, en donde los FR calculados son 2,07, 5,17 y 11,87, para tralkoxidim, cletodim y cicloxidim, respectivamente. Se ha mencionado que el tralkoxidim es el herbicida más usado para el control de estas

gramíneas, y que el fabricante recomienda una dosis máxima de 400 g i. a./ha, dosis que no es suficiente para ejercer un control satisfactorio.

4.2. Mecanismos de resistencia fuera del sitio de acción

4.2.1. Absorción y traslocación de ^{14}C diclofop-metil

4.2.1.1. Absorción de ^{14}C -diclofop-metil

Los ensayos sugieren que la absorción no está involucrada en la resistencia de *P. minor*. En general no se observaron diferencias significativas en la absorción de DM en los biotipos R y S de *P. minor* (Tabla 3.10). Después de 24 HDT, aproximadamente entre el 30 y 40% de la radioactividad recuperada había penetrado en el tejido foliar de los biotipos R, y S de *P. minor*. La absorción fue lenta en ambos biotipos, el máximo de penetración ($\approx 60\%$) de DM se obtuvo después de 72 HDT.

Tabla 3.10. Absorción de ^{14}C -diclofop-metil en diferentes biotipos de *P. minor* en diferentes tiempos después del tratamiento. El experimento se realizó por triplicado: media (n=8) \pm EE.

Biotipo	^a Absorción (% radioactividad recuperada)				
	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
R	24,5 \pm 2,3a	29,3 \pm 4,1b	34,8 \pm 3,2c	45,7 \pm 2,2d	56,3 \pm 3,9e
S	23,8 \pm 1,9a	31,6 \pm 6,1b	41,2 \pm 4,4c	47,1 \pm 3,6d	58,9 \pm 4,5e

^aLos valores seguidos de la misma letra indican que no hay diferencia significativa a un 5% de confianza, de acuerdo a la prueba de Tukey. Valores medios \pm el error estándar de la media.

4.2.1.2. Translocación de ^{14}C -diclofop-metil

Como se puede observar en la Tabla 3.11, la translocación del herbicida vía floema en ambos biotipos fue inapreciable, quedando más del 95% en la hoja tratada 72 HDT.

Tabla 3.11. Traslocación de radiactividad en hojas de biotipos R y S de *P. minor* 72 h después de haber sido tratadas con ^{14}C -diclofop-metil. El experimento fue realizado por triplicado: media (n=8) \pm EE.

Biotipo	% de absorción	Translocación* (% absorbido)	
		Hoja tratada	Resto de la planta
R	59,3 \pm 4,7a	96,9 \pm 1,2b	3,1 \pm 0,7c
S	62,1 \pm 5,3a	95,3 \pm 2,7b	4,7 \pm 0,9c

* Los valores seguidos de la misma letra indican que no hay diferencia significativa a un 5% de confianza, de acuerdo a la prueba de Tukey. Valores medios \pm el error estándar de la media.

4.2.1.3. Visualización de ^{14}C -diclofop-metil

Los resultados cualitativos mostrados en la visualización de ^{14}C -DM de las plantas de ambos biotipos R y S de *P. minor*, muestran claramente que el herbicida no se mueve (acrópetala/basípetala) fuera de la hoja donde se depositó la gota de herbicida (Figura 3.13).

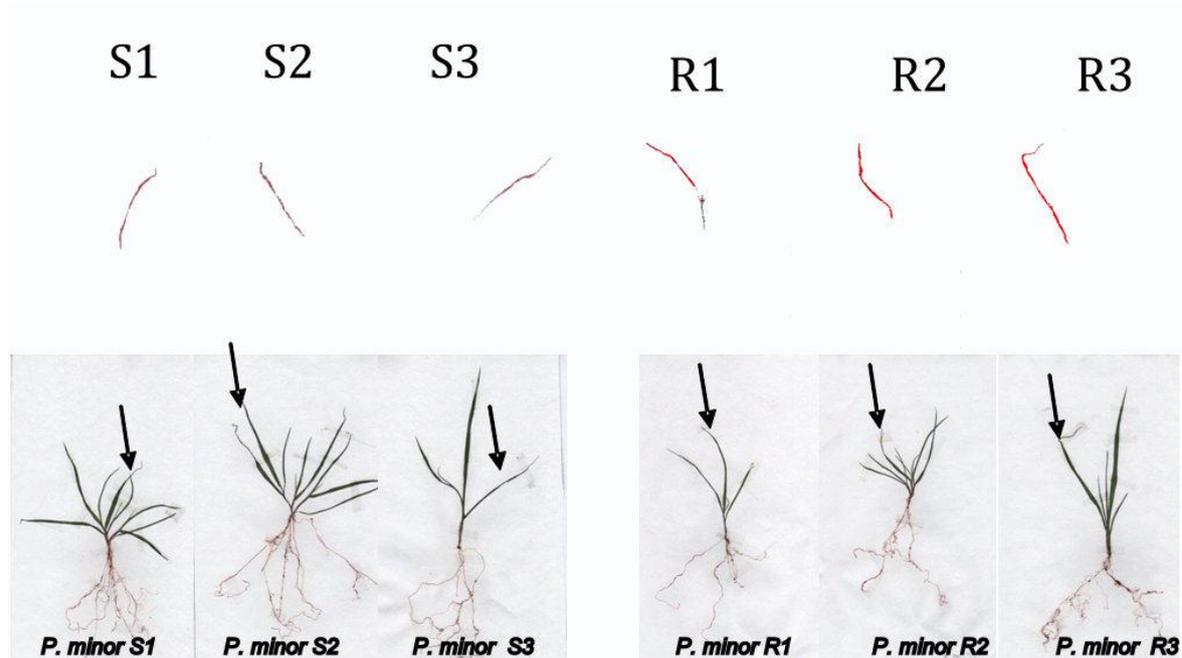


Figura 3.13. Autorradiografías de biotipos sensibles (izquierda) y resistentes (derecha) de *P. minor* 72 h después del tratamiento foliar con ^{14}C -DM.

4.2.2. Metabolismo de ^{14}C -diclofop-metil

Cualitativamente, los metabolitos encontrados no difieren entre los biotipos sensibles y resistentes de *P. minor* a diclofop-metil (DM). DM se transforma en diclofop-ácido, y este compuesto es metabolizado a otros compuestos que son más polares que el diclofop-ácido. Estos compuestos son principalmente conjugados éster con azúcar del diclofop-ácido y del hidroxidiclofop. Todos estos metabolitos (DM, diclofop-ácido, y conjugados polares) se encontraron en todos los biotipos estudiados. Sin embargo, DM se metaboliza a un compuesto no tóxico significativamente más rápido en el R que en S. Los biotipos R y S hidrolizaron rápidamente el DM penetrado a la forma ácido a través de la actividad esterasa, quedando aproximadamente menos del 11% de DM a las 72 HDT (Tabla 3.12).

La concentración de diclofop-ácido fue 3,6 veces mayor en el biotipo S que en el biotipo R de *P. minor* a las 72 HDT. Esto se correlaciona con la cinética de la forma-conjugada mostrada por los biotipos S y R, donde después de 72 HDT de DM, la cantidad de conjugado formado fue 4,6 veces mayor en el biotipo R que en el biotipo S.

La preincubación en la solución de ABT inhibió significativamente el metabolismo de DM a conjugados polares en todos los biotipos ensayados (Tabla 3.13).

En los biotipos R y S, la cantidad de conjugados no tóxicos formados 72 HDT se redujo en más de una cuarta parte de la cantidad observada en las plantas no preincubadas. Como la cantidad de metabolitos polares disminuyó, una acumulación significativa de diclofop-ácido se observó en R+ABT, lo que ya se había visto en otros experimentos utilizando inhibidores del Cit P₄₅₀.

Tabla 3.12. Metabolismo de ¹⁴C-DM en biotipos de *P. minor* resistente (R) y susceptible (S) 12, 24, 48 y 72 h después del tratamiento (HDT).

Metabolitos	% radioactividad extraída (HDT)							
	12		24		48		72	
	R	S	R	S	R	S	R	S
DM	26,20(3,2) ^a	18,57(1,3)	21,57(1,3)	16,83(3,2)	16,12(1,1)	13,75(6,9)	11,22(1,1)	9,33(3,2)
Diclofop ácido	60,48(2,1)	77,63(5,2)	58,23(3,2)	76,88(2,3)	33,92(3,3)	74,73(4,4)	21,32(3,2)	75,87(6,7)
Conjugado	13,32(0,1)	3,80(1,2)	20,20(0,4)	6,29(0,1)	49,96(2,4)	11,52(2,2)	67,46(4,1)	14,80(4,2)

^aValores medios (± error estándar de las medias).

Tabla 3.13. Efecto de ABT (70 µM) sobre el metabolismo de ¹⁴C-DM en hojas de biotipos resistentes (R) y sensibles (S) de *P. minor*. Las plantas fueron incubadas en herbicida durante 72 h.

		Radioactividad (%)		
Biotipo		Metabolito		
		Diclofop-metil	Diclofop-ácido	Conjugado
- ABT	S	10,25 ±2,5	76,21 ±5,6	13,54 ±3,6
	R	14,3 ±5,4	24,38 ±7,6	61,32 ±6,9
+ ABT	S	11,08 ±3,5	74,8 ±6,9	14,12 ±4,1
	R	11,90 ±2,8	72,4 ±8,1	15,68 ±3,6

Valores medios ± error estándar de las medias

4.3. Mecanismos de resistencia dentro del sitio de acción

4.3.1. Estudio de la actividad de la ACCasa

Los resultados se muestran en la Tabla 3.14, donde aparece el valor I_{50} , definido como la cantidad de herbicida necesaria para disminuir un 50% la actividad de la ACCasa en *P. minor*.

Tabla 3.14. Parámetros de la ecuación de la curva sigmoideal utilizada para calcular la dosis de herbicida necesaria para reducir un 50% la actividad enzimática (I_{50}) de los biotipos R y S de *P. minor* proveniente de México y las relaciones obtenidas (FR factor de resistencia) de la población resistente.

Herbicida	Accesión	Máximo	Mínimo	Pendiente de Hill	R ²	I ₅₀ (μM)	FR
Diclofop-metil	S	100,00	12,58	1,04	0,97	10,34	
	R	98,78	19,84	0,70	0,98	44,21	4,3
Cihalofop-butil	S	100,00	8,53	0,96	0,98	1,48	
	R	99,75	3,19	0,59	0,99	9,18	6,2
Fenoxaprop-etil	S	99,96	1,85	0,67	0,99	0,64	
	R	100,00	1,23	0,57	0,99	5,4	8,4
Setoxidim	S	100,00	2,04	1,37	0,99	601,07	
	R	99,26	33,73	1,31	0,98	1439,34	2,3
Tepaloxidim	S	98,93	10,08	1,32	0,98	1,29	
	R	100,00	0,02	1,23	0,97	10,93	8,4

En el apartado de análisis estadístico, se mencionó que los datos se analizaron en SigmaPlot v.8.02, dándonos los parámetros de una curva sigmoideal, que muestran si existen diferencias o no entre los biotipos al adicionar el herbicida directamente a la enzima. Como se puede observar en la Tabla 3.14, que el factor de resistencia es considerable para todos los herbicidas, siendo menor para setoxidim (2,3). Los valores indican que se necesitan entre cuatro y ocho veces más herbicida para inhibir la ACCasa del biotipo R de *P. minor*, que el que se necesita para el biotipo S.

4.3.2. Secuenciación del dominio carboxil-transferasa (CT)

Las ocho variaciones de aminoácidos que se han descrito como responsables de la resistencia a herbicidas inhibidores de la ACCasa en distintos biotipos de malas hierbas están localizadas en el dominio CT del gen ACCasa (Tabla 3.2) (Powles y Yu, 2010).

Utilizando dos parejas de cebadores diferentes, se amplificaron las dos regiones del dominio CT (regiones A y B) (Figuras 3.14 y 3.15), donde se han descrito las cinco mutaciones más importantes (SNP, single nucleotide polymorphism) asociadas con la resistencia a herbicidas. La primera con un tamaño de 600 pb y en la segunda con 591 pb. En la primera de ellas se encuentra localizada la mutación en la posición aminoacídica 1.781, y en la segunda, las otras cuatro mutaciones descritas (2.027, 2.041, 2.078 y 2.096).

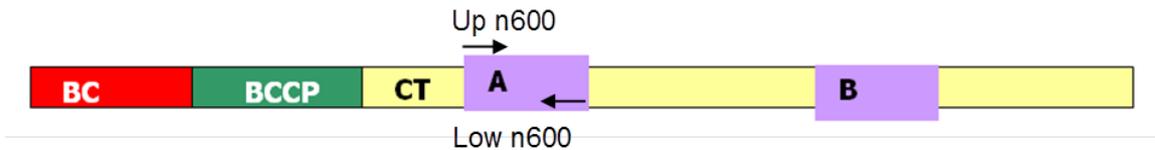


Figura 3.14. Amplificación del fragmento conteniendo el dominio A (longitud 600 pb), utilizando los cebadores Up n600/Low n600.

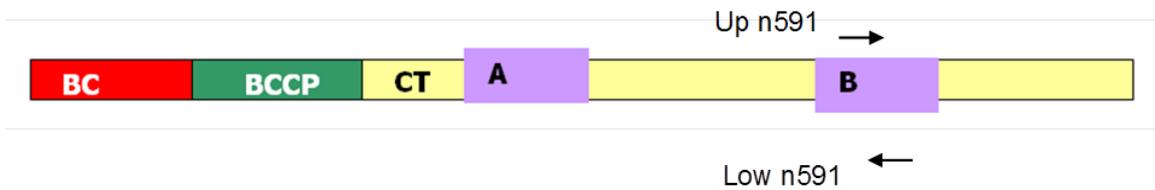


Figura 3.15. Amplificación del fragmento conteniendo el dominio A (591 pb), usando los cebadores Up n591/Low n591.

El siguiente paso en este estudio fue la identificación de la mutación responsable de la resistencia a herbicidas inhibidores de la ACCasa.

Los distintos fragmentos purificados se secuenciaron siguiendo el protocolo indicado en el apartado de materiales y métodos. Las secuencias obtenidas revelaron que en el dominio A no existían cambios en la secuencia nucleotídica

En la Figura 3.16, se muestran las secuencias obtenidas del dominio B para los distintos biotipos R y S estudiados, comparándolas con la secuencia conocida de un biotipo sensible de *A. myosuroides* y otras accesiones de gramíneas. Los estudios hechos para el dominio B revelaron la existencia de un cambio de Ser-2079-Gly.

El sitio donde se ha descrito la mutación en biotipos de malas hierbas resistentes a herbicidas inhibidores de la ACCasa, está con la letra correspondiente a la sustitución aminoacídica.

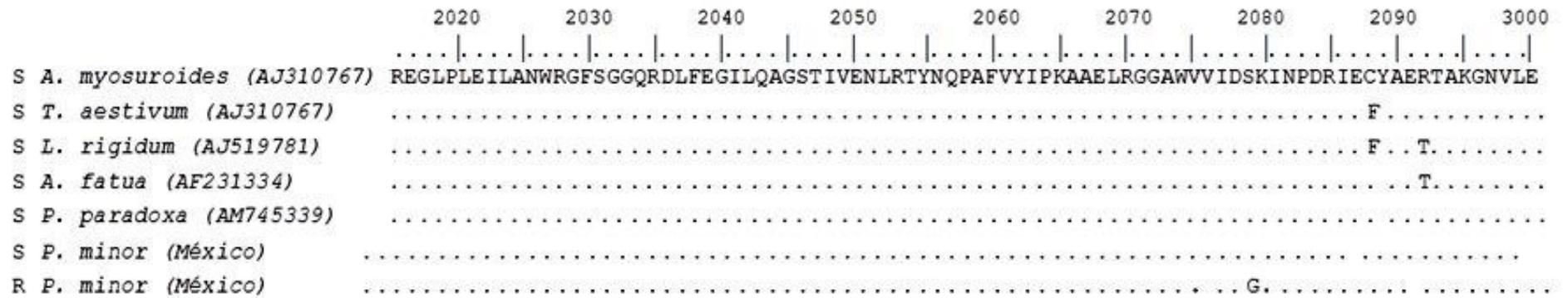


Figura 3.16. Resultados de una parte de secuencia de la región B del dominio carboxil-transferasa del gen ACCasa y comparación con la encontrada con el biotipo S.

5. Discusión

Se realizó el estudio de un biotipo de *P. minor* recolectado de un campo de trigo del estado de Guanajuato, México donde los herbicidas inhibidores de la acetil coenzima A carboxilasa (ACCasa) habían sido continuamente utilizados en la última década. Los estudios con herbicidas de las familias APP, CHD y PPZ fueron realizados a nivel de plantas enteras (*in vivo*) y a nivel bioquímico y molecular (*in vitro*).

Los ensayos dosis-respuesta confirmaron la resistencia de *P. minor* a todos los herbicidas probados. Este hecho está en concordancia con la problemática que presentan los gramínicos por su alto riesgo de evolución de resistencia (Gressel, 2002). En los biotipos R, la resistencia cruzada a APPs se desarrolló de manera rápida, al presentar resistencia a diclofop-metil, fenoxaprop-P-etil, cihalofop-butil, propaquizafop, tralkoxidim, cletodim y cicloxidim. Lo anterior, era de esperarse, pues la región donde se realizó la colecta, ha sido sometida a fuerte presión de selección con estos herbicidas por más de ocho campañas, y normalmente el índice del desarrollo de la resistencia se relaciona con la intensidad en la que es sometido a esta presión (Martínez-Ghersa *et al.*, 1997). La magnitud de la dificultad en la elección de un herbicida capaz de controlar el biotipo R de las malas hierbas resistentes, se manifiesta en los resultados de los tratamientos en postemergencia con herbicidas inhibidores de la ACCasa.

En términos generales, los factores de resistencia (FR) fueron bastante elevados, siendo el mayor, el mostrado para propaquizafop (17,55), seguido de cihalofop-butil (17,49) y fenoxaprop (13,96), los tres, herbicidas APP's.

Son varias las gramíneas que presentan resistencia cruzada a los APP's y CHDs (Mansooji *et al.*, 1992; Heap *et al.*, 1993; Tardiff *et al.*, 1993; Cocker *et al.*, 1999; Cruz-Hipólito, 2010; Cruz-Hipólito *et al.*, 2012). Los autores antes mencionados han obtenido resultados similares, aumentando la sospecha que el mecanismo de resistencia se debe a una alteración en el sitio de acción. Con respecto a las CHD's, el mayor FR lo presentó cicloxidim (11,87), seguido nuevamente por diclofop-metil, otro APP's. Finalmente, los menores valores los presentaron cletodim (5,17) y tralkoxidim (2,07).

Ante tales restricciones, las alternativas de control químico se reducen a la introducción de una rotación de cultivos (no siempre posible o económicamente rentable), que permita el uso de gramínicos autorizados en cultivos de hoja ancha, o bien al empleo de una combinación de métodos culturales y químicos, como el retraso

de la fecha de siembra, que permita controlar las malas hierbas emergidas mediante un herbicida total de baja persistencia. Por todo ello, es necesario un estudio en profundidad de los procesos fisiológicos subyacentes al fenómeno de resistencia desarrollado por los biotipos resistentes y tolerantes a graminicidas tan específicos de las especies anteriormente citadas.

El problema aun mayor que supone este hecho, es que en la actualidad hay pocos herbicidas eficaces y selectivos en cereales, y prácticamente el abanico de posibilidades para controlar satisfactoriamente la maleza se ve reducido a menos materias activas disponibles y autorizadas para su uso en estos cultivos. Los herbicidas no se han perdido para la agricultura, ya que son y seguirán siendo herramientas indispensables para el control de muchas malas hierbas, y bien usados prolongarán su uso sin la aparición de biotipos resistentes.

Los estudios de absorción y/o translocación de ^{14}C -DM en ambos biotipos R y S de *P. minor*, no mostraron diferencias significativas en la habilidad entre estos biotipos (Tablas 3.10 y 3.11 y Figura 3.12), lo cual sugiere que la absorción y translocación del herbicida no está involucrada en la resistencia a DM. Similares resultados han sido encontrados en otras gramíneas (Devine *et al.*, 1992; Menéndez y De Prado, 1996; De Prado *et al.*, 2005; Cruz-Hipólito *et al.*, 2011).

Tanto los biotipos R como los S, mostraron un patrón de metabolización del diclofop-metil cualitativamente similar, detectándose la presencia en ambos biotipos de los metabolitos diclofop-metil, diclofop-ácido y conjugados polares. Por el contrario, cuantitativamente sí se encontraron diferencias, dado que el diclofop-metil fue metabolizado significativamente más rápido en el biotipo R que en el S (Tabla 3.12). La hidrólisis vía actividad esterasa del diclofop-metil a diclofop-ácido se realizó en ambos biotipos de manera similar. Sin embargo, la concentración de diclofop fitotóxico en las plantas sensibles era 3.6 veces mayor que en las resistentes a las 72 HDT. Este hecho se correlaciona con las cinéticas de formación de conjugados mostradas por los biotipos R y S (Tabla 3.12). Aun cuando la rápida conjugación del hidroxidiclofop con azúcares confiere a este metabolito una vida extremadamente corta, se pudieron detectar trazas de este compuesto en algunos radiocromatogramas de plantas R (Cruz-Hipólito, *et al.* 2012; Menéndez, 1997).

La preincubación en una solución de ABT inhibió de manera significativa la metabolización del diclofop-metil a compuestos polares (Tabla 3.13). En plantas del biotipo R la cantidad de conjugados polares se redujo a una cuarta parte de lo observado en ausencia de ABT a las 72 HDT.

Los procesos de selectividad y resistencia a diclofop-metil se ven en gran manera afectados por las reacciones de oxidación e hidroxilación iniciadas durante la Fase I (Devine *et al.*, 1993). El diclofop-metil es hidrolizado rápidamente a la forma ácida fitotóxica una vez absorbido vía foliar, tanto en especies sensibles como resistentes. En cultivos resistentes de hoja estrecha como el trigo, el diclofop es detoxificado mediante una aril-oxidación (Jacobson y Shimabukuro, 1984; Devine *et al.*, 1992), y la posterior conjugación irreversible de los productos de esta oxidación como O-glucósidos (Shimabukuro *et al.*, 1987). El resultado final en especies resistentes es un rápido descenso de la concentración de diclofop en el medio intracelular y la consecuente acumulación de aril-glucósidos (Figura 3.17). En especies sensibles como *Avena fatua* estos procesos de hidroxilación se ven limitados, y la principal vía metabólica del diclofop es su conjugación a éster glucósido, el cual puede ser hidrolizado de nuevo para dar diclofop debido a la naturaleza débil del enlace éster formado (Figura 3.16). Por lo que se refiere a especies dicotiledóneas, muchos cultivos de hoja ancha muestran una significativa capacidad para detoxificar APPs mediante aril oxidación y posterior conjugación o por escisión de la molécula herbicida en diversos derivados fenólicos, aun cuando cuentan con ACCasas procariotas resistentes (Wink *et al.*, 1984; Lefsrud y Hall, 1989; Koeppe *et al.*, 1990; Shimabukuro, 1990).

La reacción clave en los procesos de detoxificación de diclofop-metil en monocotiledóneas, la aril-hidroxilación del diclofop, está catalizada por un grupo de enzimas llamadas citocromo P₄₅₀ (McFadden *et al.*, 1989; Zimmerlin y Durst, 1990). Esta actividad diclofop-hidroxilasa presenta cinéticas enzimáticas y respuestas similares a la actividad ω -1-ácido láurico hidroxilasa, por lo que se estima que ambas puedan estar catalizadas por una misma isoforma de P₄₅₀ (Zimmerlin y Durst, 1992; Zimmerlin *et al.*, 1992). Por el contrario, las diferencias observadas en los patrones de inducción e inhibición entre esta actividad y la responsable de la oxidación del clortolurón, indican que ambas reacciones son catalizadas por P₄₅₀ distintas (Zimmerlin y Durst, 1992).

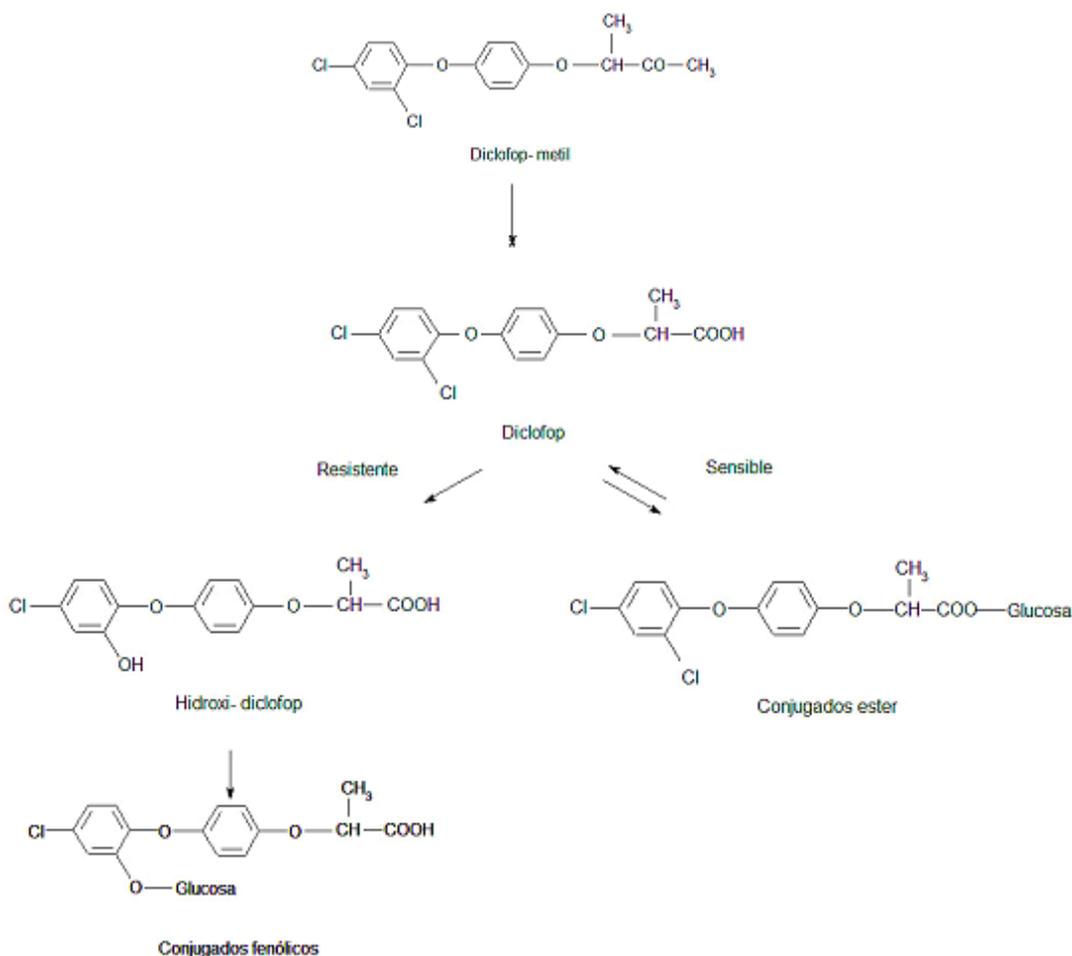


Figura 3.17. Metabolismo de diclofop-metil en plantas resistentes y sensibles (Jacobson y Shimabukuro, 1984).

El siguiente paso en este estudio, fue la identificación de la mutación responsable de la resistencia a herbicidas inhibidores de la ACCasa. Ya han sido descritos numerosos casos en gramíneas, en los cuales, los mecanismos de resistencia están asociados con mutaciones del sitio de acción, siendo un problema mucho más difícil de solucionar, pues pueden presentar resistencia cruzada a casi todos los herbicidas con el mismo modo de acción (Volenberg y Stoltenberg, 2002), principalmente debido a mutaciones en el dominio carboxiltransferasa (CT) (Délye *et al.*, 2003).

Las secuencias obtenidas en la población resistente de *P. minor* proveniente de México, estudiadas en este trabajo para el dominio A, revelaron que no existían cambios en la secuencia nucleotídica. Los estudios hechos para el dominio B revelaron la existencia de un cambio de Ser-2079-Gly (Figura 3.16).

6. Conclusiones

Los resultados del presente trabajo de investigación han permitido obtener las siguientes conclusiones:

Ensayos de dosis-respuesta realizados en cámara de crecimiento bajo condiciones controladas permitieron confirmar el carácter resistente de *P. minor* de México a los ariloxifenoxipropanoatos (APP's).

Ensayos *in vitro* de absorción y/o translocación de ^{14}C -DM no explican la diferencia de resistencia entre ambos biotipos R y S de *P. minor*.

Ensayos de metabolismo de ^{14}C -DM muestran una rápida metabolización del herbicida a compuestos conjugados no tóxicos en el biotipo R –DM. De forma indirecta utilizando ABT (inhibidor de Cit P₄₅₀), se confirma que esta monooxigenasa está involucrada en el metabolismo de DM en el biotipo resistente.

Ensayos *in vitro* de la actividad ACCasa realizados con extractos procedentes de plantas de *P. minor*, mostraron diferencias marcadas entre los biotipos R y S.

La secuencia del dominio CT del gen ACCasa de plantas de *P. minor* reveló que en el biotipo R existe un cambio de nucleótido que da lugar a una sustitución de serina por glicina en la posición 2079, confirmando la mutación en el sitio de acción (ACCasa) como mecanismo de resistencia a este grupo de herbicidas.

7. Bibliografía

- Anónimo. 2004. Crop Protection Handbook. Vol. 90. Meister Publishing Co. Willoughby, Ohio, USA. 897 p.
- Baumann, P. A., Dotray, P. A. & Prostko, A. E. 1998. Herbicide mode of action and injury symptomology. SCS-1998-07. Texas A & M University. Texas Agricultural Extension Service. College Station, TX, USA. 10 p.
- BBCH (Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt and Chemical industry). 2001. Estadios de las plantas mono y dicotiledóneas. Centro Federal de Investigaciones Biológicas para Agricultura y Silvicultura. Limburgerhof, Alemania. 144 p.
- Betts, K. J., Ehlke, N. J., Wyse, D. L., Gronwald, J. W. & Somers, D. A. 1992. Mechanism of inheritance of diclofop resistance in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*). Weed Sci. 40:184-189.
- Brezeanu, A. G., Davis, D. G. & Shimabukuro, R. H. 1976. Ultrastructural effects and translocation of methyl 2-[(2,4-dicloro-fenoxi)fenoxi] propionato in wheat (*Triticum aestivum*) and wild oat (*Avena fatua*). Can. J. Bot. 54:2038-2048.
- CESAVEG. 2007. Campaña de manejo fitosanitario de trigo. Manejo integrado de malezas: Comité estatal de sanidad vegetal de Guanajuato. [consultado el 30 de mayo de 2012]. http://www.cesaveg.org.mx/html/folleto/folleto_malezas_07.pdf
- Christoffers, M. J., Berg, M. L. & Messersmith, C. G. 2002. An isoleucine to leucine mutation in acetyl-CoA carboxylase confers herbicide resistance in wild oat. Genome 45:1049-1056.
- Cobb, A. & Reade, J. 2010. Herbicides and plant physiology 2nd ed. Wiley-Blackwell. Singapore. 286 p.
- Cocker, K., Moss, S. & Coleman, J. 1999. Multiple mechanisms of resistance to fenoxaprop-P in United Kingdom and other European populations of herbicide-resistant *Alopercurus myosuroides* (black-grass). Pestic. Biochem. Physiol. 65:169-180.
- COFEPRIS. 2011. Registros de plaguicidas por categoría toxicológica. [consultado el 1 de junio de 2012]. <http://www.encuentra.gob.mx/resultsAPF.html?q=plaguicidas&client=salud>
- Cruz-Hipólito, H. 2010. Gramíneas resistentes a herbicidas en Latinoamérica: aspectos agronómicos, bioquímicos y moleculares. Tesis de doctorado. Universidad de Córdoba. Córdoba, España.
- Cruz-Hipólito, H., Osuna, M. D., Domínguez-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. 59:7261-7267.
- Cruz-Hipólito, H., Domínguez-Valenzuela, J. A., Osuna, M. D. & De Prado, R. 2012. Resistance mechanism to acetyl coenzyme A carboxylase inhibiting herbicides in *Phalaris paradoxa* collected in Mexican wheat fields. Plant Soil. 355:121-130.
- De Prado, J. L., Osuna, M. D., Heredia, A. & De Prado, R. 2005. *Lolium rigidum*, a pool of resistance mechanisms to ACCase inhibitor herbicides. J. Agric. Food Chem. 53:2185-2191.
- De Prado, R., López-Martínez, N. & Giménez-Espinosa, R. 1997. Herbicide-resistant weeds in Europa: Agricultural, physiological and biochemical aspects. p. 17-27. In: De Prado, R., Jorin, J. & García-Torres, L. (eds.). Weed and crop resistance to herbicides. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht, The Netherlands.
- Délye, C. 2005. Weed resistance to acetyl.coenzyme A carboxylase inhibitors: An update. Weed Sci. 53:728-746.
- Délye, C., Matějček, A. & Gásquez, J. 2002. PCR-based detection of resistance to acetyl-CoA carboxylase-inhibiting herbicides in black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds) and ryegrass (*Lolium rigidum* Gaud). Pest Manag. Sci. 58: 474-478.
- Délye, C., Zhang, X. Q., Chalopin, C., Michael, S. & Powles, S. B. 2003. An isoleucine residue within the carboxyl-transferase domain of multidomain acetyl-coenzyme A carboxylase is a major determinant of sensitivity to aryloxyphenoxypropionate but not to cyclohexanedione inhibitors. Plant Physiol. 132:1716-1723.
- Devine, M. D. 1997. Mechanisms of resistance to acetyl-coenzyme A carboxylase inhibitors: A review. Pestic. Sci. 51:259-264.
- Devine, M. D., Duke, S. O. & Fedtke, C. 1993. Physiology of herbicide action. Prentice Hall. Englewood Cliffs, NJ, USA. 441 p.
- Devine, M. D., Macisaac, S. A., Romano, M. L. & Hall, J. C. 1992. Investigation of the mechanism of diclofop resistance in two biotypes of *Avena-fatua*. Pestic. Biochem. Physiol. 42:88-96.
- Devine, M. D. & Shimabukuro, R. H. 1994. Resistance to acetyl coenzyme A carboxylase inhibiting herbicides. p. 141-169. In: Powles, S. B. & Holtum, J. (eds.). Herbicide resistance in plants: Biology and biochemistry. CRC Press. Boca Raton, FL, USA.
- Duke, S. & Dayan, F. 2011. Bioactivity of herbicides. p. 23-35. In: Moo-Young, M. (ed.). Comprehensive biotechnology. 2nd ed. Vol. IV. Elsevier Science. Amsterdam, The Netherlands.

- Duke, S. O. & Kenyon, W. H. 1988. Polycyclic alkanolic acids. p. 71-116. *In*: Kearney, P. & Kaufman, D. (eds.). *Herbicides: Chemistry, degradation and mode of action*. Vol. 3. Marcel Dekker. New York, NY, USA.
- Gressel, J. 2002. *Molecular biology of weed control*. Taylor & Francis. London, UK. 504 p.
- Harwood, J. L. 1988. Fatty acid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39:101-138.
- Harwood, J. L. 1999. Graminicides which inhibit lipid synthesis. *Pest. Outlook* 8:154-158.
- Harwood, J. L. 2012. Plant lipid biochemistry. Plant fatty acid synthesis. [consultado el 2 enero de 2012]. http://lipidlibrary.aocs.org/plantbio/fa_biosynth/index.htm
- Heap, J. & Knight, R. 1990. Variation in herbicide cross-resistance among populations of annual ryegrass (*Lolium rigidum*) resistant to diclofop-methyl. *J. Austr. Instit. Agric. Sci.* 41:121-128.
- Hofer, U., Muehlebach, M., Hole, S. & Zoschke, A. 2006. Pinoxaden- For broad spectrum grass weed management in cereal crops. *J. Plant Dis. Prot.* 20:989-995.
- Holtum, J. A., Matthews, J. M., Häusler, R. E. & Powles, S. B. 1991. Cross-resistance to herbicides in annual ryegrass (*Lolium rigidum*). III. On the mechanism of resistance to diclofop-methyl. *Plant Physiol.* 97:1026-1034.
- Holtum, J. A. & Powles, S. B. 1992. Annual ryegrass - a plethora of resistance, a minimum of dogma. *Abstr. Papers Am. Chem. Soc.* 204(Part 1):65.
- Jacobson, A. & Shimabukuro, R. H. 1984. Metabolism of diclofop-methyl in root-treated wheat and oat seedlings. *J. Agric. Food Chem.* 32:742-746.
- Kansas State University. 2012. Herbicide mode of action. C-715. Kansas State University Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service. [consultado el 6 de abril de 2012]. <http://www.ksre.ksu.edu/library/crpsl2/c715.pdf>
- Knowles, J. 1989. The mechanism of biotin-dependent enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 58:195-221.
- Koeppel, M. K., Anderson, J. J. & Shalaby, L. M. 1990. Metabolism of ¹⁴C quizalofop-ethyl in soybean and cotton plants. *J. Agric. Food Chem.* 38:1085-1091.
- Lefsrud, C. & Hall, J. C. 1989. Basis of sensitivity differences among crabgrass, oat and wheat to fenoxaprop-ethyl. *Pestic. Biochem. Physiol.* 34:218-227.
- Marles, M. A., Devine, M. D. & Hall, C. J. 1993. Herbicide resistance in *Setaria viridis* conferred by a less sensitive form of acetyl coenzyme A carboxylase. *Pestic. Biochem. Physiol.* 46:7-14.

- Martinez-Ghersa, C., Vila-Aiub, M., Satorre, E. & Radosevich, S. 1997. Evolution of resistance to diclofop-methyl in ryegrass (*Lolium multiflorum*): Investigation of the role of introgression with related species. *Pestic. Sci.* 51:305-308.
- Matthews, J. M., Holtum, J. A., Liljegren, D. R., Furness, B. & Powles, S. B. 1990. Cross-resistance to herbicides in annual ryegrass (*Lolium rigidum*). I. Properties of the herbicide target enzymes acetyl-coenzyme-A carboxylase and acetolactate synthase. *Plant Physiol.* 94:1180-1186.
- McFadden, J. J., Frear, D. S. & Mansager, E. R. 1989. Aryl hydroxylation of diclofop by a cytochrome P₄₅₀ dependent monooxygenase from wheat. *Pestic. Biochem. Physiol.* 34:92-100.
- Menéndez, J. 1997. Mecanismos de resistencia a herbicidas en biotipos de *Alopecurus myosuroides* Huds. Tesis de doctorado. Universidad de Córdoba. Córdoba, España.
- Menéndez, J. & De Prado, R. 1996. Diclofop-methyl cross-resistance in a chlortoluron-resistant biotype of *Alopecurus myosuroides*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 56: 123-133.
- Morrison, I. N., Heap, I. M. & Murria, B. 1992. Herbicide resistance in wild oat -the canadian perspective. p. 36-40. *In: Proceedings of the Fourth International Oat Conference.* Adelaide, Australia.
- Moss, S. R., Cocker, K. M., Brown, A. C., Hall, L. & Field, L. M. 2003. Characterization of target-site resistance to ACCase-inhibiting herbicides in the weed *Alopecurus myosuroides* (blackgrass). *Pest Manag. Sci.* 59:190-201.
- Nikolskaya, T., Zagnitko, O., Tevzadze, G., Haselkorn, R. & Gornicki, P. 1999. Herbicide sensitivity determinant of wheat plastid acetyl-CoA carboxylase is located in a 400-amino acid fragment of carboxyltransferase domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:14647-14651.
- Osuna, M., Vidotto, F., Fischer, A., Bayer, D., De Prado, R. & Ferrero, A. 2002. Cross-resistance to bispyribac-sodium and bensulfuron-methyl in *Echinochloa phyllopogon* and *Cyperus difformis*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 73:9-17.
- Page, R., Okada, S. & Harwood, J. 1994. Acetyl-CoA carboxylase exerts strong flux control over lipid synthesis in plants. *Biochem. Biophys. Acta* 1210:369-372.
- Parker, W., Somers, D. A., Wyse, D. L., Keith, R. A., Burton, J. D., Gronwald, J. W. *et al.* 1990. Selection and characterization of sethoxydim-tolerant maize tissue cultures. *Plant Physiol.* 92:1220-1225.
- Powles, S. B. & Yu, Q. 2010. Evolution in action: Plants resistant to herbicides. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61:317-347.
- Preston, C., Tardif, F. J. & Powles, S. B. 1996. Multiple mechanisms and multiple herbicide resistance in *Lolium rigidum*. *ACS Symp. Series* 645:117-129.

- Raffel, H., Nielsen, P. & Rüegg, W. 2006. AXIAL Einfluss des Anwendungszeitpunktes auf die Wirkungssicherheit gegen Schadgräser in Getreide. J. Plant. Dis. Prot. 20:989-995.
- Sandin-España, P., Sevilla-Morán, B., Alonso-Prados J. L. & Santín-Montanyá, I. 2012. Chemical Behaviour and Herbicidal Activity of Cyclohexanedione Oxime Herbicides. *In*: Intech. Herbicides Properties, Synthesis and Control of Weeds. [consultado el 29 de mayo de 2012]. <http://www.intechopen.com/books/herbicides-properties-synthesis-and-control-of-weeds/chemical-behaviour-and-herbicidal-activity-of-cyclohexanedione-oxime-herbicides>
- Shimabukuro, R. H. 1990. Selectivity and mode of action of the postemergence herbicide diclofop-methyl. Plant Growth Regul. Soc. Am. Q. 18:37-54.
- Shimabukuro, R. H. & Hoffer, B. L. 1997. Perturbation of the transmembrane proton gradient and resistance to AOPP Herbicides. p. 71-79. *In*: De Prado, R., Jorrín, J. & Garcia-Torres (eds.). Weed and crop resistance to herbicides. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht, The Netherlands.
- Shimabukuro, R. H., Walsh, W. C. & Hoerauf, R. A. 1979. Metabolism and selectivity of diclofop-methyl in wild oat and wheat. J. Agric. Food Chem. 27:615-623.
- Shimabukuro, R. H., Walsh, W. C. & Jacobson, A. 1987. Aryl-O-glucoside of diclofop a detoxification product in wheat shoots and wild oat cell suspension culture. J. Agric. Food Chem. 35:393-397.
- SigmaPlot . 2008. Systat Software Inc. (computer program) versión 8. SYSTAT®
- Streibig, J. & Kudsk, P. 1993. Herbicide bioassays. CRC Press. Boca Raton, FL, USA. 270 p.
- Tal, A. & Rubin, B. 2004. Molecular characterization and inheritance of resistance to ACCase-inhibiting herbicides in *Lolium rigidum*. Pest. Manag. Sci. 60(10): 1013-1018.
- Volenberg, D. & Stoltenberg, D. 2002. Altered acetyl-coenzyme A carboxylase confers resistance to clethodim, fluzifop and sethoxydim in *Setaria faberi* and *Digitaria sanguinalis*. Weed Res. 42:342-350.
- Walker, K. A., Ridley, S. M., Lewis, T. & Harwood, J. L. 1989. Action ariloxy-phenoxy carboxylic acids on lipid metabolism. Weed Sci. 4:71-84.
- Wink, O., Dorn, E. & Beyermann, K. 1984. Metabolism of the herbicide Hoe 33171 in soybeans. J. Agric. Food Chem. 32:187-192.
- WSSA. 2012. International Survey of Herbicide Resistant Weeds. [consultado el 31 de mayo de 2012]. <http://www.weedscience.org/Summary/UniqueCountry.asp?IstCountryID=29&FmCountry=Go>

- Zimmerlin, A. & Durst, F. 1990. Xenobiotic metabolism in plants Aryl hidroxylation of diclofop by a cytochrome P₄₅₀ dependent monooxygenase from wheat. *Phytochemistry* 29:1729-1732.
- Zimmerlin, A. & Durst, F. 1992. Aryl hydroxylation of the herbicide diclofop by a wheat P₄₅₀ monooxygenase substrate specificity and physiological activity. *Plant Physiol.* 100:874-881.
- Zimmerlin, A., Salaún, J. P., Durst, F. & Miokowski, C. 1992. Cytochrome P₄₅₀ dependent hydroxylation of lauric acid at the subterminal position and oxidation of unsaturated analogs in wheat microsomes. *Plant Physiol.* 100:868-873.

Capítulo IV

Curriculum Vitae

RESUMEN CURRICULAR GLORIA DE LOS ÁNGELES ZITA PADILLA

La Maestra Zita posee el título de Bióloga por la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y el de Máster en Ciencia Tecnología y Sociedad por la Universidad de Salamanca, España (USAL). Aprobó la suficiencia investigadora doctoral, obtuvo el diploma de estudios avanzados con calificación de sobresaliente y es candidata al grado de doctor. Así mismo cuenta con la Diplomatura en Educación Ambiental por la UNAM. Ha aprobado 50 cursos de especialización y actualización. Ha recibido 34 reconocimientos a su trayectoria profesional, ha ganado seis premios y ha dictado 5 conferencias magistrales. Actualmente tiene una antigüedad en la UNAM de 34 años donde se desempeña como profesora Titular “A” de tiempo completo definitiva con nivel de PRIDE “B”.

Es autora y coautora de siete artículos científicos y cinco libros. Ha publicado antologías, materiales de apoyo a la docencia, artículos de divulgación, un programa de televisión, así como más de 140 comunicaciones en congresos nacionales e internacionales. Se ha desempeñado como webmaster de las páginas <http://www.agricolaunam.org.mx/> (materiales de apoyo a la docencia) y <http://www.asomecima.org/> (pagina oficial de la Asociación Mexicana de la Ciencia de la Maleza). Es experta Nacional en Bioseguridad, Tercero Especialista Fitosanitario aprobada por la SAGARPA. Actualmente funge como Vicepresidente de la Asociación Mexicana de la Ciencia de la Maleza (2012-2013) de la cual fue Presidente en el período 2010-2011.

En cuanto a formación de recursos humanos ha dirigido 12 tesis de licenciatura, algunas con mención honorífica. Ha impartido 24 cursos extracurriculares de actualización y especialización a graduados. Pertenece a 11 sociedades científicas.

Es fundadora del Herbario de la FES Iztacala y curadora del Herbario de Malezas de la FES Cuautitlán, así como responsable de la asignatura de Control de Malezas (1983-2004) y posteriormente de Control de la Maleza de 2004 a la fecha. En investigación se ha desenvuelto en cuatro vertientes: Resistencia y tolerancia a Herbicidas (PAPIIT 227907), Flora arvense útil de México (Proyectos PACIVE), Control microbiológico de malezas (Proyectos PACIVE) y Efecto del CO₂ en el metabolismo del carbono (Unión Europea, IRNA, CSIC , Salamanca).

A continuación se presenta de manera sintética una relación de las actividades más relevantes de 2007 a la fecha. Alguna información anterior a 2007 y que se consideró relevante, también ha sido incluida.

CURRICULUM VITAE

GLORIA DE LOS ÁNGELES ZITA PADILLA

1. Datos generales

Apellidos: Zita Padilla Nombres: Gloria de los Ángeles

Fecha de nacimiento: 14 de Junio de 1956. Sexo: Femenino

Lugar de nacimiento: Méico D.F., México

Nacionalidad: mexicana Pasaporte: G06246635

2. Formación académica

Licenciatura: Bióloga. Homologado por el MEC a Licenciado en Biología

2.1.1. Centro académico: Universidad Nacional Autónoma de México

2.1.2. Fecha de examen profesional: 6 de enero de 1983

Estudios de Postgrado:

2.1.3. **Diplomado.** Educación Ambiental. Plantel: FES Iztacala. UNAM. 1997.

2.1.4. **Máster.** Máster en Ciencia Tecnología y Sociedad: Cultura en comunicación en ciencia y tecnología. Centro académico: Universidad de Salamanca, España (USAL). Fecha de expedición del Título propio: 29 de noviembre de 2002.

2.1.5. **Doctorado:** Diploma de Estudios Avanzados. Manejo y Conservación de Recursos Naturales. Aplicación a la Gestión Ambiental. Examen ante tribunal presentado el 15 de noviembre de 2001. Trabajo de Investigación: “Determinación de la residualidad en suelo mediante cromatografía de gases de tres herbicidas aplicados en un cultivo de remolacha, en Peñaranda, Salamanca”. Título Propio Registrado en el Folio 140, número 2399. Diploma de estudios avanzados con calificación de sobresaliente. Centro académico: Universidad de Salamanca, España. Fecha de expedición: 21 de julio de 2008.

2.1.6. **Técnico especialista.** Signatario de Laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario con Clave 08-715-001-TEF-SIG-M.

3. Cursos de actualización y especialización

Constancia de acreditación del curso: Operación, mantenimiento y calibración de espectro-fotómetros, pHmetros y electroforesis, del 6 al 9 de agosto de 2007 con una duración de 20 horas. FES Cuautitlán

Constancia de acreditación del curso: Signatario de Laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario, del 10 al 14 de septiembre de 2007, con una duración de 40 horas. DGSV Coyoacán, D.F. México.

Asistencia al Curso Nacional de Resistencia de Malezas y Cultivos a Herbicidas. Organizado por el Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Chapingo, del 20 al 22 de julio de 2009.

Asistencia al Curso de técnicas básicas en Biología Molecular (Curso Práctico) Organizado por la Sección de Ciencias Morfológicas Agropecuarias, el proyecto PAPIME PE201909, el proyecto PAPIME PE202907 y el proyecto PACIVE CON-105, del 28 al 31 de julio de 2009 con una duración de 20 horas. FESC-UNAM, Cuautitlán Izcalli, México.

Aprobación del Curso de Espectrofotometría en el marco del Programa de Actualización y Superación Docente (PASD) para profesores de Licenciatura. FESC-UNAM, Cuautitlán Izcalli, México.

Idiomas

3.1.1. Inglés 70%

3.1.2. Francés 50%

4. Situación profesional actual

Información del puesto desempeñado:

Profesora de carrera Titular A de tiempo completo, definitiva. Antigüedad: 34 años.

Organismo: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México. Dirección: Carretera Cuautitlán-Teoloyucan Km. 2.5, San Sebastián Xhala, Cuautitlán Izcalli, Edo. México. Teléfono: 0052 (55) 56231834. Fax: 0052 (55) 56231841. Correo electrónico: zitagloria@gmail.com

Funciones desempeñadas.

Asignaturas Impartidas en la licenciatura de Ingeniero Agrícola: Control de la Maleza, Seminario de Tesis e Impacto Ambiental.

Responsable académico de la cátedra de Control de la Maleza.

Responsable del Laboratorio de Control de la Maleza. Certificado conforme a la norma ISO-9001.

Curadora del Herbario de Malezas.

Responsable de calidad de la Sección de Agroecosistemas.

Miembro del Directorio Nacional de Expertos en Bioseguridad.

Especialización (Código UNESCO): 310304, 310106, 310109 y 310315.

5. Artículos en revistas científicas con arbitraje Internacionales e Indexadas en ISI

- Pérez, P., Alonso, A., Zita, G., Morcuende, R. and Martínez-Carrasco, R. 2011. Down-regulation of Rubisco activity under combined increases of CO₂ and temperature minimized by changes in Rubisco kcat in wheat. *Plant Growth Regul.* 65(3):439-447. ISSN versión impresa: 0167-6903. ISSN versión electrónica: ISSN: 1573-5087. Disponible en: <http://www.springerlink.com/content/k188071462451q16/>
- Pérez, P., Zita P., G., Morcuende, R. and Martínez-Carrasco, R. 2007. Elevated CO₂ and temperature differentially affect photosynthesis and resource allocation in flag and penultimate leaves of wheat. *Photosynthetica* 45(1):9-17. ISSN version impresa: 0300-3604. ISSN versión electrónica: 1573-9058. Disponible en: <http://www.springerlink.com/content/a6541x168547941n/>
- Aranjuelo, I., Pérez, P., Hernández, L., Irigoyen, J., Zita G. and Martínez-Carrasco, R. 2005. The response of nodulated alfalfa to water supply, temperature and elevated CO₂: photosynthetic downregulation. *Physiol. Plant.* 123:348-358. ISSN versión impresa: 0031-9317. ISSN versión electrónica: 1399-3054. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/advanced/search/results?start=1&resultsPerPage=20>
- Espadas R., M. y Zita P., G. 1995. Contribución al conocimiento de la fitopatología del mirasol morado (*Cosmos bipinnatus* Cav.). *Revista Chapingo* 4:113-116. ISSN: 0186-3231.
- Fernández, M. R., Zita P. G. y Espadas R., M. 1994. Potencial ornamental del género *Cosmos* en México. *Revista Chapingo*. 1:162-170. ISSN: 0186-3231.

6. Libros publicados

- Zita P., G. (ed.). 2012. Especies de la familia Asteraceae exóticas a la flora de México. Villaseñor, J. L., Ortiz, E., Hinojosa-Espinosa, O. y Segura-Hernández, G. CONACOFI-ASOMECEMA. México. 162 p.
- Sánchez-Ken, J. G., Zita P., G. y Mendoza, C., M. 2012. Catálogo de las gramíneas malezas nativas e introducidas de México. 1ª ed. CONACOFI-ASOMECEMA, A. C. México. 430 p.
- Zita P., G. 2012. Manual de prácticas de control de la maleza. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuautitlán Izcalli, México. 63 p.

Bojórquez B., G., Rosales R., E., Zita P., G., Vargas T., V. y Esqueda E., V. A. (coords.). 2011. Manejo de malezas en México. Vol. 1. Maleza terrestre. Universidad Autónoma de Sinaloa. UNAM. ASOMECEIMA, A. C. SENASICA. Fundación Produce Sinaloa. Junta Local de Sanidad Vegetal del Valle del Évora. Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología de Sinaloa. Culiacán, Sin., México. 327 p. ISBN obra completa: 978-607-7929-79-6. ISBN volumen: 978-607-7929-80-2. Tiraje 500 ejemplares.

Bojórquez B., G., Vargas T., V., Zita P., G., Rosales R., E. y Esqueda E., V. A. (coords.). 2011. Manejo de malezas en México. Vol. 2. Maleza acuática. Universidad Autónoma de Sinaloa. UNAM. ASOMECEIMA, A. C. SENASICA. Fundación Produce Sinaloa. Junta Local de Sanidad Vegetal del Valle del Évora. Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología de Sinaloa. Culiacán, Sin., México. 181 p. ISBN obra completa: 978-607-7929-79-6. ISBN volumen: 978-607-7929-81-9. Tiraje 500 ejemplares.

7. Capítulos de libros

Zita-Padilla, G. 2011. Biología y ecología de la maleza. p. 13-52. *In*: Bojórquez B., G., Vargas T., V., Zita P., G., Rosales R., E. y Esqueda E., V. A. (coords.). Manejo de malezas en México. Vol. 1. Maleza terrestre. Universidad Autónoma de Sinaloa. UNAM. ASOMECEIMA, A. C. SENASICA. Fundación Produce Sinaloa. Junta Local de Sanidad Vegetal del Valle del Évora. Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología de Sinaloa. Culiacán, Sin., México.

Esqueda E., V. A., Zita-Padilla, G. y Rosales R., E. 2011. Resistencia a herbicidas. p. 219-243. *In*: Bojórquez B., G., Vargas T., V., Zita P., G., Rosales R., E. y Esqueda E., V. A. (coords.). Manejo de malezas en México. Vol. 1. Maleza terrestre. Universidad Autónoma de Sinaloa. UNAM. ASOMECEIMA, A. C. SENASICA. Fundación Produce Sinaloa. Junta Local de Sanidad Vegetal del Valle del Évora. Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología de Sinaloa. Culiacán, Sin., México.

8. Edición de memorias de eventos científicos.

XXXII Congreso Mexicano de la Ciencia de la Maleza. "Manejo proactivo de resistencia de maleza a herbicidas en cultivos tolerantes a herbicidas". 2011. ASOMECEIMA, A.C. del 9 al 11 de noviembre de 2011 en la Ciudad de Toluca, Estado de México. En versión electrónica CD.

XXXI Congreso Mexicano de la Ciencia de la Maleza. I Simposio internacional sobre Biodiversidad y Plantas Invasoras. III Simposio Internacional de Resistencia y Tolerancia a Herbicidas. VII Simposio Internacional de Maleza Acuática. III Simposio sobre la Enseñanza de la Ciencia de la Maleza. 2010. ASOMECEIMA, A.C. Cancún, Quintana Roo, México del 10 al 12 de noviembre de 2010. En versión electrónica CD.

XXX Congreso Mexicano de la Ciencia de la Maleza, VI Simposio Internacional sobre Maleza Acuática, II Simposio Internacional sobre Resistencia y Tolerancia a Herbicidas y II Simposio sobre la Enseñanza de la Ciencia de la Maleza. ASOMECEIMA, A.C. Culiacán, Sinaloa, México del 21 al 23 de octubre de 2009. En versión electrónica CD.

XXIX Congreso Mexicano de la Ciencia de la Maleza, V Simposio Internacional sobre Maleza Acuática, I Simposio Internacional sobre Resistencia y Tolerancia a Herbicidas y I Simposio sobre la Enseñanza de la Ciencia de la Maleza. ASOMECEIMA, A.C. Tapachula, Chiapas, México del 22 al 24 de octubre de 2008. En versión electrónica CD.

9. Comunicaciones en eventos académicos publicados en memoria con arbitraje

Zita, P., G. and Esqueda E., V. A. 2012. The current status of research on weed resistance in Mexico. p. 141. *In*: De Prado, R. and Costa J. (eds). International Workshop on Glyphosate Weed Resistance: European Status and Solutions. 2012. Cordoba, Spain.160 p.

Silva V., M., Monroy M., S., Espadas R., M. y Zita P., G. 2011. Hongos asociados a *Typha domingensis* en canales de riego en tres regiones de México. *In*: XXXII Congreso Mexicano de la Ciencia de la Maleza. ASOMECEIMA, A. C. Toluca, Estado de México, del 9 al 11 de noviembre de 2011.

Monroy M., S., Espadas R., M. y Zita P., G. 2011. Evaluación de dosis creciente de fenoxaprop-p-etil sobre poblaciones de *Phalaris minor* Retz. del estado de Guanajuato. *In*: XXXII Congreso Mexicano de la Ciencia de la Maleza. ASOMECEIMA, A. C. Toluca, Estado de México, del 9 al 11 de noviembre de 2011.

Zita P., G., Esqueda E., V. A. y De Prado A., R. 2010. El género *Phalaris* en México. *In*: XXXI Congreso Mexicano de la Ciencia de la Maleza. ASOMECEIMA, A. C. Cancún, Quintana Roo, México, del 10 al 12 de noviembre de 2010.

- Zita P., G., Esqueda E., V. A. y De Prado A., R. 2010. La necesidad de una estrategia nacional para prevenir el desarrollo de biotipos de maleza resistentes a herbicidas. *In: XXXI Congreso Mexicano de la Ciencia de la Maleza*. ASOMECEIMA, A. C. Cancún, Quintana Roo, México, del 10 al 12 de noviembre de 2010.
- Silva V., M., Bojórquez B., G. A., Zita P., G., Hernández V., J. A., Torres B., R. y Espadas R., M. 2010. Hongos asociados a *Typha domingensis* en canales de riego de Culiacán, Sinaloa. *In: XXXI Congreso Mexicano de la Ciencia de la Maleza*. ASOMECEIMA, A. C. Cancún, Quintana Roo, México, del 10 al 12 de noviembre de 2010.
- Silva V., M., Austria M., A., Hernández F., N., Sánchez M., S. M., Monroy M., S., Espadas Z., D. G. y Zita P., G. A. 2010. Análisis de riesgo de *Ischaemum rugosum* maleza cuarentenaria en México. *In: XXXI Congreso Mexicano de la Ciencia de la Maleza*. ASOMECEIMA, A. C. Cancún, Quintana Roo, México, del 10 al 12 de noviembre de 2010.
- Sánchez M., S. M., Monroy M., S., Silva V., M., Austria M., A., Espadas Z., D. G., Hernández F., N., Espadas R., M. y Zita P., G. 2010. Análisis de riesgo de *Galium spurium* L., maleza contaminante en alpiste de importación. *In: XXXI Congreso Mexicano de la Ciencia de la Maleza*. ASOMECEIMA, A. C. Cancún, Quintana Roo, México, del 10 al 12 de noviembre de 2010.
- Sánchez M., S. M., Monroy M., S., Silva V., M., Austria M., A., Espadas Z., D. G., Hernández F., N., Espadas R., M. y Zita P., G. 2010. Análisis de riesgo de *Agrostemma githago* L., maleza cuarentenaria en México *In: XXXI Congreso Mexicano de la Ciencia de la Maleza*. ASOMECEIMA, A. C. Cancún, Quintana Roo, México, del 10 al 12 de noviembre de 2010.
- Ramírez M., N., Espadas R. M. y Zita P., G. 2010. Plantas arvenses mexicanas utilizadas como medicinales en la sierra norte de Puebla. *In: XXXI Congreso Mexicano de la Ciencia de la Maleza*. ASOMECEIMA, A. C. Cancún, Quintana Roo, México, del 10 al 12 de noviembre de 2010.
- Monroy M., S., Esqueda E., V. A., Zita P., G. 2010. Evaluación del efecto de herbicidas en arroz y *Sorghum halepense* (L.) Pers. en condiciones de invernadero. *In: XXXI Congreso Mexicano de la Ciencia de la Maleza*. ASOMECEIMA, A. C. Cancún, Quintana Roo, México, del 10 al 12 de noviembre de 2010.

- Austria M., A. A., Silva V., M., Hernández F., N., Sánchez M., S. M., Monroy M., S., Espadas Z., D. y Zita P., G. 2010. Análisis de riesgo de *Thlaspi arvense* L. maleza cuarentenaria en México. *In: XXXI Congreso Mexicano de la Ciencia de la Maleza*. ASOMECEIMA, A. C. Cancún, Quintana Roo, México, del 10 al 12 de noviembre de 2010.
- Monroy M. S., Zita P., G., Esqueda E., V. A., Espadas R. M. 2010. *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn. Hongo asociado a la semilla de *Echinochloa colona*. *In: XXXI Congreso Mexicano de la Ciencia de la Maleza*. ASOMECEIMA, A. C. Cancún, Quintana Roo, México, del 10 al 12 de noviembre de 2010.
- Monroy M., S., Austria M., A. A., Hernández F., N., Espadas Z., D. G., Silva V., M., Sánchez M., S. M. y Zita P., G. 2010. Análisis de riesgo de *Rottboellia cochinchinensis* maleza cuarentenaria en México. *In: XXXI Congreso Mexicano de la Ciencia de la Maleza*. ASOMECEIMA, A. C. Cancún, Quintana Roo, México, del 10 al 12 de noviembre de 2010.
- Hernández F., N., Austria M., A. A., Monroy M., S., Silva V., M., Sánchez M., S. M., Espadas R., M., Espadas Z., D. G. y Zita P., G. 2010. Análisis de riesgo de *Commelina benghalensis* maleza cuarentenaria en México. *In: XXXI Congreso Mexicano de la Ciencia de la Maleza*. ASOMECEIMA, A. C. Cancún, Quintana Roo, México, del 10 al 12 de noviembre de 2010.
- Espadas Z., R., Espadas Z., D. G., Sánchez M., S. y Zita P., G. 2010. Restating English language learning programs for consensual terminology in agronomic science. *In: XXXI Congreso Mexicano de la Ciencia de la Maleza*. ASOMECEIMA, A. C. Cancún, Quintana Roo, México, del 10 al 12 de noviembre de 2010.
- Espadas Z., D. G., Monroy M., S., Austria M., A., Silva V., M., Hernández F., N., Sánchez M., S. M., Espadas R., M. y Zita P., G. 2010. Análisis de riesgo de *Aegilops cylindrica*, maleza cuarentenaria en México. *In: XXXI Congreso Mexicano de la Ciencia de la Maleza*. ASOMECEIMA, A. C. Cancún, Quintana Roo, México, del 10 al 12 de noviembre de 2010.
- Espadas R., M., Silva V., M., Hernández F., N., Sánchez M., S. M., Monroy M., S. y Zita P., G. 2010. Propuesta de un formulario para coleccionar microorganismos en malezas enfermas con potencial para micoherbicidas. *In: XXXI Congreso Mexicano de la Ciencia de la Maleza*. ASOMECEIMA, A. C. Cancún, Quintana Roo, México, del 10 al 12 de noviembre de 2010.

- Zita P., G., Carmona M., M. A., Espadas R., M. y Esqueda, E. V. 2009. Catálogo de identificación de semillas de maleza cuarentenaria en México. *In: XII Congreso SEMh, XIX Congreso ALAM e II Congreso IBCM, Lisboa, Portugal, noviembre de 2009.*
- Zita P., G., Espadas R., M., Valencia I., C. E., Hernández D., M., Carmona M. O., M. A. 2009. Colecciones virtuales como herramienta en la enseñanza de la Malherbología. *In: el XII Congreso SEMh, XIX Congreso ALAM e II Congreso IBCM. Lisboa, Portugal, noviembre de 2009.*
- Zita P., G., Espadas R., M., Valencia I., C. E., Hernández D., M. y Carmona M. O., M. A. 2009. Colecciones virtuales como herramienta en la enseñanza de la Malherbología. *In: XXX Congreso Mexicano de la Ciencia de la Maleza, VI Simposio Internacional sobre Maleza Acuática, II Simposio Internacional sobre Resistencia y Tolerancia a Herbicidas y II Simposio sobre la Enseñanza de la ciencia de la Maleza. Culiacán, Sinaloa, México, del 21 al 23 de octubre de 2009.*
- Carmona M., M. A., Espadas R., M. y Esqueda E., V. 2009. Catálogo de identificación de semillas cuarentenadas en México. *In: XXX Congreso Mexicano de la Ciencia de la Maleza, VI Simposio Internacional sobre Maleza Acuática, II Simposio Internacional sobre Resistencia y Tolerancia a Herbicidas y II Simposio sobre la Enseñanza de la Ciencia de la Maleza. Culiacán Sinaloa, México, del 21 al 23 de octubre de 2009.*
- Zita P., G. 2009. Análisis de riesgo de *Conringia orientalis*, Maleza Cuarentenaria en México. *In: XXX Congreso Mexicano de la Ciencia de la Maleza, VI Simposio Internacional sobre Maleza Acuática, II Simposio Internacional sobre Resistencia y Tolerancia a Herbicidas y II Simposio sobre la Enseñanza de la Ciencia de la Maleza. Culiacán Sinaloa, México, del 21 al 23 de octubre de 2009.*
- Zita, P.G. 2009. Análisis de riesgo de *Solanum viarum* Dun. maleza cuarentenaria en México. *In: XXX Congreso Mexicano de la Ciencia de la Maleza, VI Simposio Internacional sobre Maleza Acuática, II Simposio Internacional sobre Resistencia y Tolerancia a Herbicidas y II Simposio sobre la Enseñanza de la Ciencia de la Maleza. Culiacán Sinaloa, México, del 21 al 23 de octubre de 2009.*
- Zita P., G. 2008. La enseñanza de la Malherbología en el contexto del México actual. *In: XXIX Congreso mexicano de la ciencia de la maleza y 1er. Symposium sobre la Enseñanza de la Ciencia de la Maleza. Tapachula, Chiapas, México, del 22 al 24 de octubre de 2008.*

- Zita P., G., Paulin R., D. F., Silva V., M., Hernández F., N. C., Camacho M., D., Espadas R., M. 2008. Hongos asociados a enfermedades foliares del tepozán *Buddleja cordata* HBK (maleza con potencial forrajero). *In: XXIX Congreso mexicano de la ciencia de la maleza y 1er. Simposium sobre la Enseñanza de la Ciencia de la Maleza*. Tapachula, Chiapas, México, del 22 al 24 de octubre de 2008.
- Sánchez G., J. L., Zita P., G., Cuervo U., Y., Espadas R., M., Valencia I., C. E., Hernández D., M., Carmona M de O., M. A. y Cruz M., P. Y. 2008. Mejoramiento de la enseñanza a través de la innovación educativa y colecciones virtuales de conocimiento. *In: XXIX Congreso mexicano de la ciencia de la maleza y 1er. Simposium sobre la Enseñanza de la Ciencia de la Maleza*. Tapachula, Chiapas, México, del 22 al 24 de octubre de 2008.
- Carmona M., M. A., Espadas R., M., Esqueda E., V., Sánchez G., J. L., Martínez V., A., Monroy M., S. y Zita P., G. 2008. Comparación de métodos de detección de resistencia de alpiñillo (*Phalaris minor*) a Fenoxaprop-p-etil. *In: XXIX Congreso mexicano de la ciencia de la maleza y 1er. Simposium sobre la Enseñanza de la Ciencia de la Maleza*. Tapachula, Chiapas, México, del 22 al 24 de octubre de 2008.
- Espadas R., M., Zita P., G. y Zabalgozcoa, I. 2008. Identificación de hongos endofíticos en plantas de *Lolium perenne*. *In: XXVI Congresso Brasileiro da Ciencia das Plantas Daninhas e do XVIII Congreso de la Asociación Latinoamericana de Malezas*. Ouro Preto, no Estado de Minas Gerais, Brasil, del 4 a 8 mayo de 2008.
- Zita P., G., Esqueda E., V. A., Carmona M., M. A.; Sánchez G., J. L., Martínez V., A. y Espadas R., M. 2008. Comparación de métodos de detección de resistencia de alpiñillo (*Phalaris minor*) a fenoxaprop-p-etil. *XXVI Congresso Brasileiro da Ciencia das Plantas Daninhas e do XVIII Congreso de la Asociación Latinoamericana de Malezas*. Ouro Preto, no Estado de Minas Gerais, Brasil, del 4 al 8 mayo de 2008.
- Carmona M., M. A., Martínez V., A., Sánchez G., J. L., Espadas R., M. y Zita P., G. 2007. Inmersión de plántulas de *Phalaris minor* en diferentes tiempos y concentraciones de herbicida. Semana de AGROPECUS AGROPECUS. FES-C. UNAM. Cuautitlán Izcalli, Edo. de México, México, del 23 al 24 de noviembre de 2007.
- Zita P., G. 2007. Calentamiento global y su Impacto en el control de la maleza. *In: XXXIII Simposio Nacional de Parasitología Agrícola*. México, D.F., México, 29 de noviembre de 2007.

- Espadas R., M. y Zita P., G. 2007. Hongos asociados al tule (*Typha latifolia* L.) en canales de riego. *In: XXVIII Congreso Nacional de la Ciencia de la Maleza. ASOMECEIMA A.C. Mazatlán Sinaloa, México, del 14 al 16 de noviembre 2007.*
- Zita P., G. y Espadas R., M. 2007. “Calidad de semilla y requerimientos de germinación de alpistillo”. *In: XXVIII Congreso Nacional de la Ciencia de la Maleza. ASOMECEIMA A.C. Mazatlán Sinaloa, México, del 14 al 16 de noviembre 2007.*
- Zita P., G y Espadas R., M. 2007. Calidad de semilla y requerimientos de germinación de alpistillo. *In: I Simposio Sobre Resistencia a Herbicidas. FES-Cuautitlán. Cuautitlán Izcalli Edo. de México, México, 5 de octubre de 2007.*
- Zita P., G. y Espadas R., M. 2007. Evaluación de resistencia por el método de germinación en cajas de Petri. *In: I Simposio sobre Resistencia a Herbicidas. FES-Cuautitlán. Cuautitlán Izcalli Edo. de México, México, 5 de octubre 2007.*
- Austria M., I. A., Silva V., A.M., Grajales M., U. O., Quintana S., I. M., Zita P., G. y Espadas R., M. 2007. Hongos asociados a semillas de cuatro variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *In: X Congreso Nacional de Ciencias Agronómicas. Chapingo, Edo. de México, México, del 25 al 26 de abril de 2007.*

10. Proyectos de investigación y/o docencia

- Proyecto PACIVE 2012. Manejo integrado de plagas y agroecología.
Cátedra Recursos Fitogenéticos y Agroecología. REFIGA. (Investigador principal)
- Proyecto PAPIIT IN227907. Evaluación de técnicas de detección de resistencia a herbicidas. (Investigador principal)
- Proyecto PAPIME PE202407. Mejoramiento de la enseñanza a través de la innovación educativa y colecciones virtuales de conocimiento. (Investigador principal)
- Efecto del CO₂ en el metabolismo del carbono (Unión Europea, IRNA, CSIC, Salamanca. (Becaria doctoral)

11. Distinciones académicas

- Vice-presidenta de ASOMECEIMA para el periodo 2012-2013.
- Presidenta de la Mesa Directiva de ASOMECEIMA en el periodo 2010-2011.
- Vocal del Jurado Calificador del Premio Nacional de Sanidad Vegetal 2011.
Otorgado por la Presidencia de la República Mexicana. Convocatoria disponible en: <http://www.presidencia.gob.mx/2011/09/convoca-sagarpa-al-premio-nacional-de-sanidad-vegetal-2011/>

Vocal del Jurado Calificador del Premio Nacional de Sanidad Vegetal 2010.
Otorgado por la Presidencia de la República Mexicana.

Miembro del Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario. 2010-2011.

Nivel B del Programa de primas al desempeño de profesores de carrera, de 2000 a la fecha.

Reconocimiento por el trabajo desplegado durante el periodo correspondiente de enero a agosto del 2009, en el mantenimiento del Sistema de Gestión de Calidad FESC como responsable de calidad de la Sección de Agro ecosistemas de su área.

Secretaria de la Mesa directiva de ASOMECEMA por el periodo 2008-2009.

Miembro del Comité Académico para la Definición de Conocimientos, Habilidades y Especificaciones Operacionales para el Examen General de Egreso de la Licenciatura en Ciencias Agronómicas. Campo Fitotecnia. Organizado por el Centro Nacional de Evaluación para la Educación Superior, A.C. (CENEVAL).

Miembro del Comité Académico de Validación de Especificaciones para el Examen General de Egreso de la Licenciatura en Ciencias Agronómicas. Campo Fitotecnia (EGEL – CAFi). Organizado por el Centro Nacional de Evaluación para la Educación Superior, A.C. (CENEVAL).

Participación activa en la Sesión de Validación de Reactivos para el Examen General de Egreso de la Licenciatura en Ciencias Agronómicas. Campo Fitotecnia Organizado por el Centro Nacional de Evaluación para la Educación Superior, A.C. (CENEVAL) los días 15, 16 y 17 de junio de 2009, con una duración de 27 horas.

Reconocimiento “Al Mérito Universitario” por meritoria labor académica durante 25 años. Otorgado el 15 de mayo de 2003.

Becaria de 2000 a 2005 del Programa de Apoyo a la Superación del Personal Académico, con el objeto de obtener el grado de doctor en España.

12. Dirección de tesis de licenciatura (Proyecto de fin de carrera)

Monroy Martínez, Sonia. 2011. Evaluación de dosis crecientes de fenoxaprop-p-etil sobre poblaciones de *Phalaris minor* en el estado de Guanajuato. Tesis para obtener el título de Ingeniera Agrícola. Fecha de examen profesional: 21 de septiembre de 2011. Calificación: aprobada con mención honorífica.

Carmona Montes de Oca María de los Ángeles. 2009. Detección de resistencia a fenoxaprop-p-etil de *Phalaris minor* mediante bioensayos con semillas y plantas enteras. Tesis para obtener el título de Ingeniera Agrícola. Fecha de examen profesional: 7 de octubre de 2009. Calificación: aprobada con mención honorífica.

Chagoya Villanueva, Fidencio. 2006. Bioensayo para determinar el efecto en la germinación de la semilla de dos variedades de sorgo con dos protectantes, bajo dos diferentes texturas de suelo. Tesis para obtener el título de Ingeniero Agrícola. FES Cuautitlán UNAM. Fecha de examen profesional: 24 de agosto de 2006. Calificación: aprobado.

13. Cursos extracurriculares impartidos, dirigidos a graduados y técnicos de campo

Biología y ecología de malezas. *In:* Curso de actualización en el manejo de malezas. Facultad de Ciencias Agrícolas. UAEM. ASOMECEIMA A.C. Toluca, Estado de México, México, 8 y 9 de noviembre de 2011.

Aplicación del análisis de riesgo de malezas. *In:* Curso de actualización en el manejo de malezas. Facultad de Ciencias Agrícolas. UAEM. ASOMECEIMA A.C. Toluca, Estado de México, México, 8 y 9 de noviembre de 2011.

Resistencia de malezas a herbicidas. *In:* Curso de actualización en el manejo de malezas. Facultad de Ciencias Agrícolas. UAEM. ASOMECEIMA A.C. Toluca, Estado de México, México, 8 y 9 de noviembre de 2011.

Metodología para el envío y preservación de muestras de maleza. Metodología para el muestreo de bancos de semilla (teoría). Metodología para el muestreo de bancos de semilla (práctica en campo). Colecta de ejemplares de herbario (práctica de campo). Prensado y montaje de ejemplares de herbario (práctica) *In:* Evento de autorización de profesionales fitosanitarios en la campaña contra especies de malezas reglamentadas. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Dirección General de Sanidad Vegetal. Dirección de Protección Fitosanitaria. Departamento de Campañas de Importancia Económica. ASOMECEIMA, A. C. Celaya, Guanajuato, México, del 22 al 25 de agosto de 2011.

Metodología para la elaboración de catálogo de plagas agrícolas. DGPA-UNAM. Programa de apoyo a la superación del personal académico. FES Cuautitlán. Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México, del 13 al 17 de diciembre de 2010.

Biología y ecología de malezas. *In*: Actualización en el manejo de malezas. ASOMECEMA A. C. UNAM. Cancún, Quintana Roo, México, del 8 al 9 de noviembre de 2010.

Resistencia a Herbicidas. *In*: Actualización en el manejo de malezas. ASOMECEMA A. C. UNAM. Cancún, Quintana Roo, México, del 8 al 9 de noviembre de 2010.

Análisis de riesgo para maleza. *In*: Jornada técnica: Plagas de interés cuarentenario. Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Estado de Sinaloa. Guamúchil, Sinaloa, México, del 18 al 19 de marzo de 2010

Resistencia a herbicidas dirigido a técnicos de campo. *In*: Actualización Técnica sobre Manejo de Malezas. ASOMECEMA-Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato. Celaya, Guanajuato, México, 6 y 7 de agosto de 2009

Metodología para el envío y preservación de plantas, Metodología para el muestreo de Banco de Semillas y Práctica de Campo de Banco de semillas de maleza cuarentenaria *In*: Evento de autorización de profesionales fitosanitarios autorizados en la campaña contra las especies de maleza cuarentenaria. SAGARPA-SENASICA-IAP. Celaya, Guanajuato, México, del 13 al 17 de abril de 2009.

Normatividad en seguridad, higiene y medio ambiente de trabajo necesaria para el proceso de certificación de laboratorios. *In*: Programa de actualización y superación docente (PASD) para profesores de Licenciatura, FESC-Cuautitlán, Cuautitlán Izcalli, Edo. de México, México, del 12 al 16 de enero de 2009.

Biología y ecología de malezas. *In*: Actualización en el manejo de malezas. ASOMECEMA A. C. Universidad Autónoma de Chiapas. Tapachula, Chiapas, México, del 22 al 24 de octubre de 2008.

14. Producción de material electrónico

Webmaster de las páginas <http://www.agricolaunam.org.mx/> (materiales de apoyo a la docencia) y <http://www.asomecima.org/> (página oficial de la Asociación Mexicana de la Ciencia de la Maleza).

Capítulo V

Publicaciones

The response of nodulated alfalfa to water supply, temperature and elevated CO₂: photosynthetic downregulation

Iker Aranjuelo^a, Pilar Pérez^b, Libia Hernández^b, Juan José Irigoyen^a, Gloria Zita^{b,1}, Rafael Martínez-Carrasco^b and Manuel Sánchez-Díaz^{a,*}

^aDepartamento de Fisiología Vegetal, Facultades de Ciencias y Farmacia, Universidad de Navarra, Irunlarrea s/n, 31008, Pamplona, Spain

^bInstituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca, CSIC, Cordel de Merinas 40–52, 37008, Salamanca, Spain

¹Permanent address: Departamento de Ciencias Agrícolas, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, Mexico

*Corresponding author, e-mail: msanchez@unav.es

Received 27 May 2004; revised 18 October 2004

Plants grown in an environment of elevated CO₂ and temperature often show reduced CO₂ assimilation capacity, providing evidence of photosynthetic downregulation. The aim of this study was to analyse the downregulation of photosynthesis in elevated CO₂ (700 μmol mol⁻¹) in nodulated alfalfa plants grown at different temperatures (ambient and ambient + 4°C) and water availability regimes in temperature gradient tunnels. When the measurements were taken in growth conditions, a combination of elevated CO₂ and temperature enhanced the photosynthetic rate; however, when they were carried out at the same CO₂ concentration (350 and 700 μmol mol⁻¹), elevated CO₂ induced photosynthetic downregulation, regardless of

temperature and drought. Intercellular CO₂ concentration measurements revealed that photosynthetic acclimation could not be accounted for by stomatal limitations. Downregulation of plants grown in elevated CO₂ was a consequence of decreased carboxylation efficiency as a result of reduced rubisco activity and protein content; in plants grown at ambient temperature, downregulation was also induced by decreased quantum efficiency. The decrease in rubisco activity was associated with carbohydrate accumulation and depleted nitrogen availability. The root nodules were not sufficiently effective to balance the source–sink relation in elevated CO₂ treatments and to provide the required nitrogen to counteract photosynthetic acclimation.

Introduction

The global atmospheric CO₂ partial pressure (C_a) is steadily increasing (Keeling et al. 1989) and may double by the end of this century (IPCC 2001), primarily as a result of the consumption of fossil fuel and rapid deforestation. Furthermore, atmospheric general circulation models predict that the increase in CO₂ and other greenhouse gases may cause global warming, possibly by as much as 1.4–5.8°C (IPCC 2001).

When analysing the effect of climate change on plant development, it must be considered that most results have been obtained from fully controlled environments

using constant temperatures and electric lighting. However, plant behaviour in growth chamber facilities frequently differs from that in the field. There are substantial differences in the absolute values of key factors (growth chambers are poorly illuminated, evaporative demands are higher in the field) and also in their variability and coupling. A field-grown crop may be subjected to rapid changes in temperature, humidity, radiation, wind speed, etc. during the course of a day or season which, however, are not reflected in growth chambers. If the aim of these studies is to understand how

Abbreviations – A , net photosynthesis; C_a , atmospheric CO₂ concentration; C_i , leaf internal CO₂ concentration; F_v/F_m , maximal photochemical efficiency; g , leaf conductance; IPCC, Intergovernmental Panel on Climate Change; ISA, ionic strength adjuster; PCR cycle, photosynthetic carbon reduction cycle; P_i , inorganic orthophosphate; PMSF, phenylmethylsulphonyl fluoride; PPFD, photosynthetic photon flux density; PVPP, polyvinylpyrrolidone; q_N , non-photochemical quenching coefficient; q_P , photochemical quenching coefficient; rubisco, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase; RuBP, ribulose-1,5-bisphosphate; RWC, relative water content; TSP, total soluble protein; TSS, total soluble sugar; V_{max} , maximum photosynthetic rate; ϕ_{PSII} , quantum yield of photosystem II electron transport; θ_v , soil volumetric water content.

plants will respond to predicted climate change, the more realistic the experimental conditions, the more likely it is that the resultant predictions will reflect the reality of the future. The experiment in this work was performed in temperature gradient tunnels (TGTs) placed over a naturally growing alfalfa field in order to simulate near-field conditions. TGT systems generally consist of tunnels enclosing naturally growing plants with a transparent cladding material. TGTs provide a variety of CO₂-temperature-water availability regimes, following diurnal and seasonal variations of outdoor temperature, solar radiation and humidity, at modest construction and running costs (Horie et al. 1995, Aranjuelo 2004).

The CO₂ partial pressure is an important limiting factor for photosynthesis, largely as a consequence of the characteristics of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase (rubisco). The CO₂ concentration present in the atmosphere is generally limiting for C₃ photosynthesis, primarily because of the bifunctional nature of rubisco and its low affinity for CO₂ (Woodrow and Berry 1988, Bowes 1993). Assuming that there are no other limitations, an increase in C_a will increase photosynthesis through its direct effect on rubisco (Farquhar et al. 1980, Woodrow and Berry 1988, Bowes 1993). According to measurements obtained by Cure and Acock (1986), plants exposed to elevated CO₂ accumulate more biomass as a result of the initial increase in net CO₂ fixation rate; after longer exposure, however, photosynthetic rates tend to be reduced. This enzyme catalyses both photosynthesis and photorespiration, but the current atmospheric CO₂ concentration is insufficient to saturate rubisco in C₃ plants. Thus, an increase in C_a increases the leaf internal [CO₂] and the [CO₂]/[O₂] ratio at the rubisco site, which favours carboxylation rather than oxygenation of ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP) (Andrews and Lorimer 1987). Sharkey (1988) calculated that doubling the present atmospheric CO₂ concentration would result in a 50% decrease in the ratio of photorespiration to photosynthesis. However, the degree to which these potential benefits are manifested will depend upon how rubisco activity and content change with increasing CO₂.

Although the initial stimulation of net photosynthesis associated with elevated CO₂ is sometimes retained during long-term exposure to elevated CO₂ (Idso and Kimball 1992, Long and Drake 1992, Gunderson et al. 1993), it is often partially reversed (Ainsworth et al. 2004) in an acclimation process often referred to as 'downregulation'. Downregulation is usually accompanied by alterations in the gas exchange characteristics that are indicative of a decreased carboxylation capacity (Drake et al. 1997, Ainsworth et al. 2004). Photosynthetic downregulation may be caused by stomatal and non-stomatal limitations. Stomatal limitations explain the decrease in photosynthesis as being due to the depletion of the intercellular CO₂ concentration (C_i) as a result of stomatal closure phenomena (Sánchez-Díaz et al. 2004). Non-stomatal limitations explain the decreased photosynthetic efficiency as being a result of

reduced light capture (PSII activity) and/or decreased carboxylation of RuBP catalysed by rubisco. According to Kalina et al. (1997), inhibition is caused by decreased PSII efficiency as a result of the accumulation of inactive PSII reaction centres and the decrease in light harvesting complexes. Other authors suggest that non-stomatal limitation of photosynthesis is attributable to a reduced carboxylation efficiency (Long et al. 2004), or to a reduced amount/activity of rubisco. In any case, considerable variations have been found in photosynthesis and rubisco responses to C_a. When analysing the effect of C_a on plant growth, it must be considered that growth, and therefore the photosynthetic response, will depend on the genetically determined potential and on the relative availability of other co-limiting environmental factors. Moreover, other environmental variables, such as temperature, atmospheric humidity, solar radiation and wind speed, together with soil factors (the nutrient and water content exploited by the roots), will interact with the CO₂ effect.

Some of the changes in metabolism that occur in elevated [CO₂] may be indirect effects of nitrogen limitation (Stitt and Krapp 1999). When plants are nitrogen limited, downregulation in CO₂-enriched plants may be due to the reallocation of nitrogen away from the photosynthetic carbon-fixing apparatus (especially away from rubisco). The leaves of plants grown in elevated CO₂ often contain a higher carbohydrate content and a lower nitrogen concentration [N] than the leaves of plants grown in ambient CO₂ (Geiger et al. 1999). Low leaf [N] could lead to either a proportional (Geiger et al. 1999) or a selective (Reviere-Rolland et al. 1996) reduction in rubisco. There is also some evidence that the carbohydrate-mediated repression of photosynthetic genes is more severe in nitrogen-deficient than in nitrogen-replete plants (Stitt and Krapp 1999). Plants capable of symbiotic N₂ fixation may be able to adjust to enhanced nitrogen needs in elevated CO₂. In addition, when assessing the relevance of nitrogen availability on photosynthetic acclimation, source-sink interactions should be considered. In the long term, photosynthetic responses to elevated CO₂ are dependent on the plant's ability to develop new sinks for carbon, and on its ability to acquire adequate nitrogen and other resources to support growth potential (Wolfe et al. 1998). The source-sink relation may be modified in nodulated plants. Studies determining the effect of elevated CO₂ on photosynthetic downregulation in nodulated and non-nodulated plants have shown that increased CO₂ decreases the photosynthetic efficiency only in non-nodulated plants, as a consequence of a decreased sink capacity (Ainsworth et al. 2004).

Most experiments analysing photosynthetic acclimation in the context of climate change have studied the effect of CO₂ or CO₂ × temperature in optimal conditions of hydration. However, when studying the effect of climate change on Mediterranean environments, it should be borne in mind that circulation models predict drier conditions for the Mediterranean basin as a result

of an increase in temperature and water deficit (IPPC 2001). These observations prompted us to test the photosynthetic response to elevated CO₂ of nitrogen-fixing alfalfa plants in different temperature and sustained water availability conditions. The following parameters were measured: leaf relative water content (RWC), gas exchange parameters, chlorophyll fluorescence, rubisco activity and concentration, leaf nitrogen, leaf total soluble protein (TSP), total soluble sugars (TSS) and starch concentrations. Details of the measurement techniques are given below.

Materials and methods

Plant material

The experiment was carried out in two consecutive years (2001 and 2002). In the second year, it was repeated in order to confirm the results of the first year. In both years, the experiment was carried out in the months of June and July. The measurements given in this paper correspond to the mean values of the data collected in both years.

Alfalfa seedlings (*Medicago sativa* L. cv. Aragón) were transplanted into 13 l pots (20 plants per pot) containing a mixture of inert perlite and vermiculite (2:1 ratio). During the first month, the plants were inoculated three times with *Sinorhizobium melloti* strain 102F78 (The Nitragin Co., Milwaukee, WI) and grown in a glasshouse at 25°C/15°C (day/night). The photoperiod was 14 h under natural daylight, supplemented with fluorescent lamps (Sylvania DECOR 183, Professional-58W, Erlangen, Germany), which provided a photosynthetic photon flux density (PPFD) of about 300–400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The plants were watered twice a week with Evans nitrogen-free nutrient solution (Evans 1974) and once a week with tap water to avoid salt accumulation in the pots.

Experimental design

When plants were 30 days old, they were transferred to two TGTs located in an alfalfa field at the Muñovela farm of the Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología (CSIC, Salamanca, Spain). The design of the TGTs was as described by Rawson (1995) and Rawson et al. (1995). CO₂ concentration, temperature, relative humidity and solar radiation were continuously monitored and regulated by a computerized system. The plants were divided according to the different combinations of CO₂ concentration, temperature and water availability to which they were subjected. One tunnel was maintained at an ambient CO₂ concentration level (approximately 395 ± 23 and 400 ± 15 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ CO₂ for the years 2001 and 2002, respectively) and the other was maintained at an elevated CO₂ level (approximately 715 ± 17 and 722 ± 15 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ CO₂ for the years 2001 and 2002, respectively). Each tunnel was divided into three modules, thereby providing different temperature values. The central module was regarded as a transition module

and no experimental plants were included in it. In each tunnel, the inlet module was maintained at a temperature equivalent to the average ambient temperature (18.5 and 19.3°C for the years 2001 and 2002, respectively) and the outlet module was maintained at this average ambient temperature + 4°C. Inside the tunnels, the pots were placed in holes made in the soil in order to provide for natural temperature fluctuations, thus approximating field conditions (Aranjuelo 2004). Well-watered plants were irrigated until a maximum soil volumetric water content (θ_v) of approximately 0.4 $\text{cm}^3 \text{cm}^{-3}$ was reached. The applied drought level corresponded to 50% θ_v of well-watered plants (approximately 0.2 $\text{cm}^3 \text{cm}^{-3}$). In studies which analysed CO₂ and drought interaction, it should be borne in mind that, in most cases, plants grown in an environment of elevated CO₂ deplete soil water at a lower rate than those grown in an environment of ambient CO₂ (as a result of lower stomatal conductance and lower transpiration rates). As a consequence, and as many experiments have demonstrated, elevated CO₂ increases the time needed to reach a particular water stress (De Luis et al. 1999). Therefore, this drought tolerance, i.e. the ability to maintain plant productivity under a given soil water stress (Jones 1992), induced by elevated CO₂, remains incompletely elucidated. In order to investigate this response further, we designed an experiment in which all the treatments were subjected to the same soil water content. θ_v levels were maintained throughout the experiment by measuring daily transpired water (calculated by weighing the pots) and replenishing the lost water. In order to reduce soil evaporation, the pots were covered with plastic sheets perforated with very small holes to allow the stems to pass through. The desired drought level was reached around 15 days after the beginning of the treatment, when the plants were 45 days old. Fully irrigated plants were alternately watered with Evans nitrogen-free nutrient solution (Evans 1974) and distilled water, whereas drought-exposed plants were always watered with Evans solution, in order to provide all the treatments with the same quantity of nutrients. The pots were rotated daily, within the corresponding tunnel compartment, to avoid edge effects. The experimental plants (in pots) were surrounded by alfalfa plants, and the shading of natural over experimental plants was avoided by regular trimming in order to maintain a similar height in all the plants.

Water status

The water status of the plants was evaluated by measuring the leaf RWC (Weatherley 1950) in the youngest fully expanded leaves. Each year in which the experiment was carried out, four leaves were chosen for each treatment.

Gas exchange

Fully expanded apical leaves from 54-day-old plants were enclosed in a gas exchange leaf chamber (1010-M, Waltz, Effeltrich, Germany), and the gas exchange rate was measured with a portable photosynthesis system

(HCM-1000, Waltz). The gas exchange response to CO₂ was measured from 0 to 1000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ CO₂. Each year, four trials of each of the eight treatment combinations were conducted. Net photosynthesis (*A*) and leaf conductance (*g*) were calculated as described by Long and Hallgreen (1985) and Olsson and Leverenz (1994). The leaf internal CO₂ concentration (*C_i*) was estimated from the net photosynthesis and leaf conductance measurements following Farquhar and Sharkey (1982). *A/C_i* curve measurements were used to assess the maximum photosynthetic rate (*V_{max}*), employing the formulae utilized in 'Photosynthesis Assistant', V 9.0 software (Dundee Scientific, Dundee, UK).

Chlorophyll fluorescence

Chlorophyll fluorescence was measured in the same expanded leaves and at the same time as the gas exchange measurements with a portable modulated fluorometer (PAM-2000, Waltz), with the fibre optics passing through the radiation shield of the leaf chamber at an angle of 60°. The quantum yield of PSII electron transport (ϕ_{PSII}) and photochemical (q_p) and non-photochemical (q_N) quenching coefficients were measured at midday in 360 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ CO₂ and with an irradiance of 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ photon flux density provided by red light emitting diodes (maximum at 655 nm). Leaves were darkened for 20 min with a dark clip (DLC8, Walz) before determining the maximal photochemical efficiency (F_v/F_m), as described by Genty et al. (1989).

Leaf nitrogen content

Leaf samples, previously dried at 60°C for 48 h, were ground in a mill with titanium blades and stored in vials in desiccators above silica gel. The nitrogen concentration was determined by means of sulphuric acid digestion in a Büchi K-424 (Büchi, Flawil, Switzerland). Samples of 100 mg were digested by adding 20 ml of H₂SO₄ and a Kjeldhal Cu–Se catalytic pill. The digestion process was left to run its course (for 1 h at 250°C) until the samples were clarified. The samples were then diluted to 50 ml with distilled water. In order to determine the nitrogen concentration, 5 ml of ionic strength adjuster (ISA, Ref. 951211, Orion, NY) was added to 5 ml of measuring solution. Measurements were performed with an ammonia-selective electrode (Orion, NY, 9512BN) using 0.1 mM of ammonium chloride as a standard.

TSP, TSS and starch

The TSP, TSS and starch concentrations were quantified by grinding and filtering 100 mg of (fresh-weighed) frozen leaf tissue in a cold mortar using an extraction buffer containing 50 mM K-phosphate (pH 7.5). The extract was filtered and centrifuged at 28 710 *g* for 15 min at 4°C. The supernatant was used for TSP and TSS quantification, whereas starch was measured in the pellet as described by Jarvis and Walker (1993). TSP was meas-

ured using the protein–dye binding method of Bradford (1976). TSS, on the other hand, was determined using the method proposed by Yemm and Willis (1954).

Rubisco protein concentration (EC 4.1.1.39)

The proteins were extracted from frozen leaf subsamples, ground to a fine powder [in 50 mM Tricine buffer (pH 8.0), 1 mM EDTA, 5 mM 6-aminocaproic acid, 2 mM benzamidine, 8 mM β -mercaptoethanol and 100 mM phenylmethylsulphonylfluoride (PMSF)] for 20 min on ice. This was followed by centrifugation at 12 000 *g* at a temperature of 4°C for 25 min. The protein concentration was measured in the decanted supernatant (Bradford 1976), and five volumes of cold acetone were added to an aliquot containing 300 μg of protein, which was left overnight in the freezer. The sample was then centrifuged at 12 000 *g* at a temperature of 4°C for 15 min. The acetone was allowed to evaporate. The precipitate was dissolved in 65 mM Tris-HCl (pH 6.8), 25% glycerol (v/v), 0.6 M β -mercaptoethanol, 2.5% SDS (w/v) and 0.01% bromophenol blue at a temperature of 96°C for 7 min. The samples were cooled to room temperature and loaded onto a 13% SDS-PAGE gel (Martín del Molino et al. 1995). The solubilized proteins were separated by a discontinuous SDS-PAGE system (Laemmli 1970) using a 0.75 mm thick gel (13% separating, 4% stacking). Electrophoresis was carried out at room temperature and at a constant current of 200 V. Aliquots of the SDS dissociated extracts, containing 9 μg of protein, were applied to each well. The gels were stained in 0.1% (w/v) Coomassie blue dissolved in 5:5:2 (v/v/v) water–methanol–acetic acid overnight, and subsequently destained in 12.5% (v/v) isopropanol and 10% (v/v) acetic acid. Finally, the gels were scanned with a Molecular Dynamics (Sunnyvale, CA) densitometer. The percentage of rubisco relative to TSP was calculated, taking the value of TSP as 100%.

Rubisco activity assay (EC 4.1.1.39)

The leaves were harvested mid-morning, and immediately plunged into liquid nitrogen. The samples were stored at –80°C, awaiting analysis. The leaf tissue was powdered in liquid nitrogen and homogenized in a cold mortar with an extraction buffer containing 100 mM Bicine-NaOH (pH 7.8), 10 mM MgCl₂, 10 mM 2-mercaptoethanol, 2% PVPP (w/v), 1% BSA (w/v) and 1% Triton X-100 (v/v). An aliquot of the extract was used to determine the chlorophyll content (Arnon 1949). Another aliquot was clarified, by centrifugation at 13 000 *g*, and used to determine enzyme activity by measuring the oxidation of NADH at 340 nm (Sharkey et al. 1991). The time period between extraction and the measurement of the initial activity was less than 2.5 min. The activation state was calculated by considering the initial activity as a percentage of the total activity.

Statistical analysis

The experiment was carried out in two consecutive years, and in almost the same growth conditions. In the second year, the growth conditions inside and between the tunnels were interchanged. In other words, when, in a given tunnel, a microenvironment of ambient CO₂ was maintained in the first year, this was changed to a microenvironment of elevated CO₂ in the second year, and vice versa. Similarly, in the modules in which an ambient temperature was maintained during the first year, an elevated temperature was set for the second, and vice versa. In conclusion, this experiment provided a total of 16 plots comprising a combination of two different CO₂ levels, two different temperature regimes, two different conditions of water availability and two repetitions.

The effects of CO₂, temperature (*T*) and water availability (H₂O) on plant development were tested by a split-split-plot multiple analysis of variance (ANOVA) with three factorial treatments (CO₂, temperature and water availability) (Montgomery 1984). The CO₂ treatment was the main plot factor, temperature was the split-plot treatment and the water level was regarded as the split-split-plot treatment. The main plot analysis contained the sum of squares for CO₂ divided by the main plot error sum of squares. The split-plot test included temperature and CO₂ × *T* mean square and subplot error sums of square. Finally, the split-split-plot test included the mean squares corresponding to H₂O, H₂O × CO₂, H₂O × *T* and H₂O × CO₂ × *T* divided by the split-subplot error. The means ± SE were calculated for each parameter. When a particular *F* test was significant, we compared the means using an LSD multiple comparison. The results were accepted as significant at *P* < 0.05.

Results

No significant differences in leaf RWC were found between the different treatments (Table 1). Gas exchange measurements revealed that, in growth conditions, photosynthesis was stimulated in plants grown in elevated CO₂ and temperature (Fig. 1). However, CO₂ fixation rates were not altered by water availability. When measurements were performed at 350 μmol mol⁻¹ CO₂, elevated CO₂ had a negative effect on the photosynthetic rate (*F* = 6.09, *P* = 0.048): in fully

watered plants grown at an elevated temperature, photosynthesis decreased by 39%, and in partially watered plants grown at an ambient temperature, it decreased by 47%. No growth CO₂ concentration effect was observed in the other treatments (Fig. 1). When measured at 700 μmol mol⁻¹ CO₂, the photosynthetic rate was not altered by the growth CO₂ concentration (*F* = 7.07, *P* = 0.038), except in fully watered plants grown at ambient temperature, where elevated CO₂ reduced the value by 35% (Fig. 1). *C*_i determinations in growth conditions showed that, although elevated CO₂ enhanced *C*_i (Fig. 1), no CO₂ concentration effect was observed in *C*_{i350} (*F* = 0.69, *P* = 0.436) and *C*_{i700} (*F* = 2.19, *P* = 0.19). Leaf conductance (*g*) measurements in growth conditions at 350 and 700 μmol mol⁻¹ CO₂ indicated that the responsiveness of *g* to the growth CO₂ concentration interacted with water availability (Fig. 1). Elevated CO₂ had an inhibitory effect on both *g*₃₅₀ (*F* = 15.69, *P* = 0.008) and *g*₇₀₀ (*F* = 18.55, *P* = 0.005) values in plants subjected to drought conditions, whereas no significant differences were detected in fully watered plants. The inhibitory effect of elevated CO₂ on *g* was reflected in the lower average water transpiration rates in plants grown in elevated CO₂ (0.66 ml H₂O cm⁻² day⁻¹) compared with ambient CO₂ (0.93 ml H₂O cm⁻² day⁻¹) (Aranjuelo 2004). Regardless of temperature and water availability, elevated CO₂ significantly reduced the maximum photosynthetic rate (*V*_{max}) (*F* = 38.38, *P* = 0.000; Fig. 2).

The maximal photochemical efficiency in the dark-adapted state (*F*_v/*F*_m) increased by 11% in conditions of elevated CO₂ (*F* = 16.92, *P* = 0.006; Fig. 3). This increase was solely due to a decrease in *F*_o, as *F*_m was not significantly affected by the treatments. *F*_v/*F*_m values in ambient CO₂ were below 0.8. However, in the light, the effect of CO₂ treatment on photochemistry was temperature dependent (*F* = 6.61, *P* = 0.042). Elevated CO₂ decreased the quantum yield of PSII electron transport (Φ_{PSII}) at an ambient temperature, but did not affect it at elevated temperature (Fig. 4). Photochemical quenching (*q*_p) was not modified by CO₂, temperature or water availability. Irrespective of the temperature and the water regime, non-photochemical quenching (*q*_N) (Fig. 4) was stimulated by 25% in plants exposed to elevated CO₂ (*F* = 21.75, *P* = 0.003), except in the case of fully watered plants grown at an elevated temperature, in which no effect was observed.

Table 1. The effect of CO₂, temperature (*T*) and water availability (H₂O) on leaf relative water content (RWC, %) and nitrogen [mg N g⁻¹ dry matter (DM)], total soluble sugars (TSS, mg g⁻¹ DM) and starch (mg g⁻¹ DM) concentrations in nodulated alfalfa. Each value represents the mean ± SE (*n* = 12). The different letters indicate significant differences (*P* < 0.05) between the treatments as determined by LSD.

Treatments (H ₂ O–CO ₂ – <i>T</i>)	RWC	Leaf N	TSS	Starch
Control–Amb–Amb	91.3 ± 0.2 a	20.4 ± 2.2 a	35.9 ± 1.6 bc	82.2 ± 4.8 d
Control–700–Amb	91.2 ± 0.6 a	13.8 ± 0.6 c	48.0 ± 3.2 a	137.0 ± 0.1 ab
Control–Amb–Amb + 4°C	88.9 ± 1.9 a	20.2 ± 0.6 a	47.0 ± 0.7 ab	91.9 ± 4.7 c
Control–700–Amb + 4°C	90.9 ± 1.7 a	17.9 ± 0.4 bc	49.2 ± 2.5 a	159.0 ± 1.9 a
Drought–Amb–Amb	91.8 ± 1.3 a	20.4 ± 0.9 a	41.9 ± 3.6 abc	77.8 ± 4.9 d
Drought–700–Amb	89.5 ± 1.6 a	15.1 ± 0.6 bc	41.4 ± 2.5 abc	159.1 ± 4.5 a
Drought–Amb–Amb + 4°C	91.8 ± 0.6 a	18.3 ± 1.1 ab	30.9 ± 3.8 c	61.1 ± 3.6 d
Drought–700–Amb + 4°C	92.5 ± 0.6 a	16.6 ± 1.5 bc	51.9 ± 2.2 a	119 ± 9.4 bc

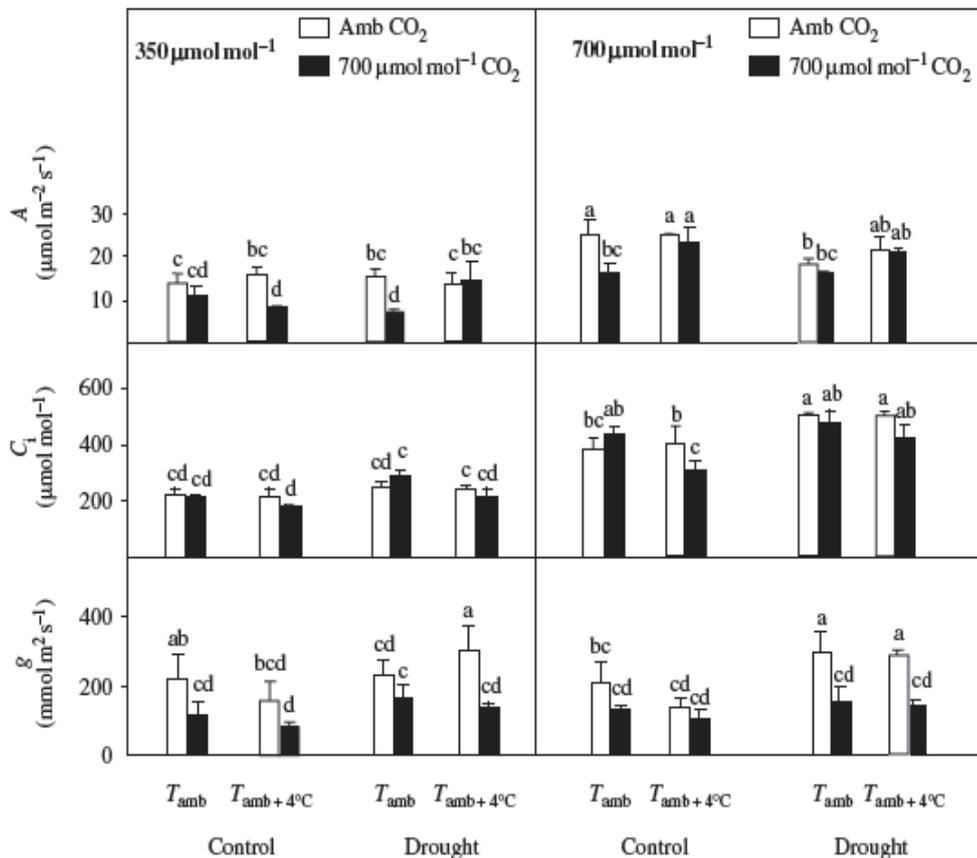


Fig. 1. The effect of CO₂, temperature and water availability on leaf photosynthesis (*A*), internal CO₂ concentration (*C_i*) and conductance (*g*) in nodulated alfalfa, measured at 350 and 700 μmol mol⁻¹ CO₂. The measurements were carried out when the plants were 56 days old. Each value represents the mean ± SE (*n* = 8). The different letters indicate significant differences (*P* < 0.05) between treatments as determined by LSD.

Elevated CO₂ reduced the leaf nitrogen concentration ($F=12.17$, $P=0.025$) by 20%, with the exception of drought-exposed plants grown at an elevated temperature (Table 1). The concentrations of leaf TSS (Table 1) were not altered by CO₂, temperature or drought, except in well-watered plants grown at ambient temperature and drought-exposed plants grown at elevated temperature. The leaf starch concentration was enhanced by elevated CO₂ ($F=70.10$, $P=0.000$), whereas elevated temperature ($F=5.68$, $P=0.060$) and water availability ($F=6.83$, $P=0.052$) had no effect, except in drought-exposed plants grown in elevated CO₂, for which an

increased temperature reduced the leaf starch concentration (Table 1).

Elevated CO₂ depleted the rubisco protein concentration ($F=22.05$, $P=0.003$) by 34%, especially in

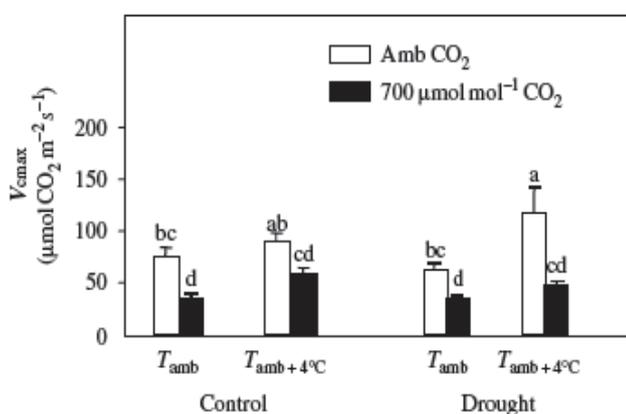


Fig. 2. The effect of CO₂, temperature and water availability on the maximum photosynthetic rate (V_{max}) in nodulated alfalfa. Each value represents the mean ± SE (*n* = 8). Levels of significance as for Fig. 1.

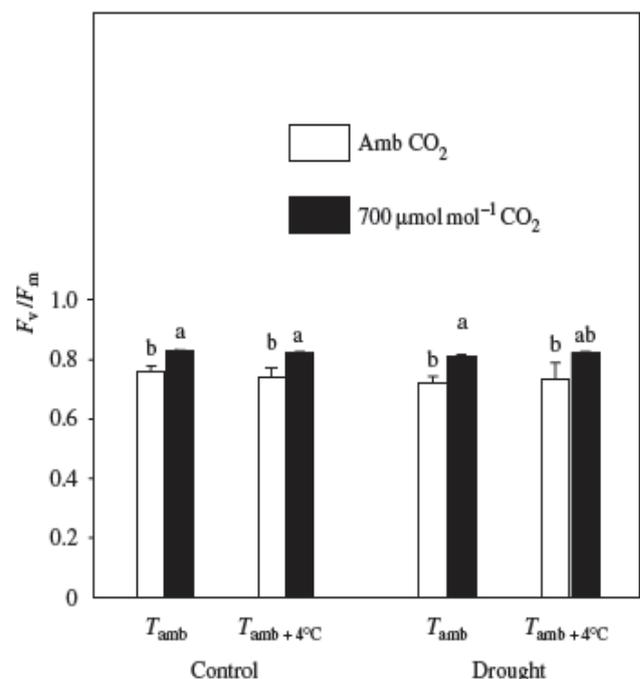


Fig. 3. The effect of CO₂, temperature and water availability on the maximal photochemical efficiency (F_v/F_m) in nodulated alfalfa. Each value represents the mean ± SE (*n* = 8). Levels of significance as for Fig. 1.

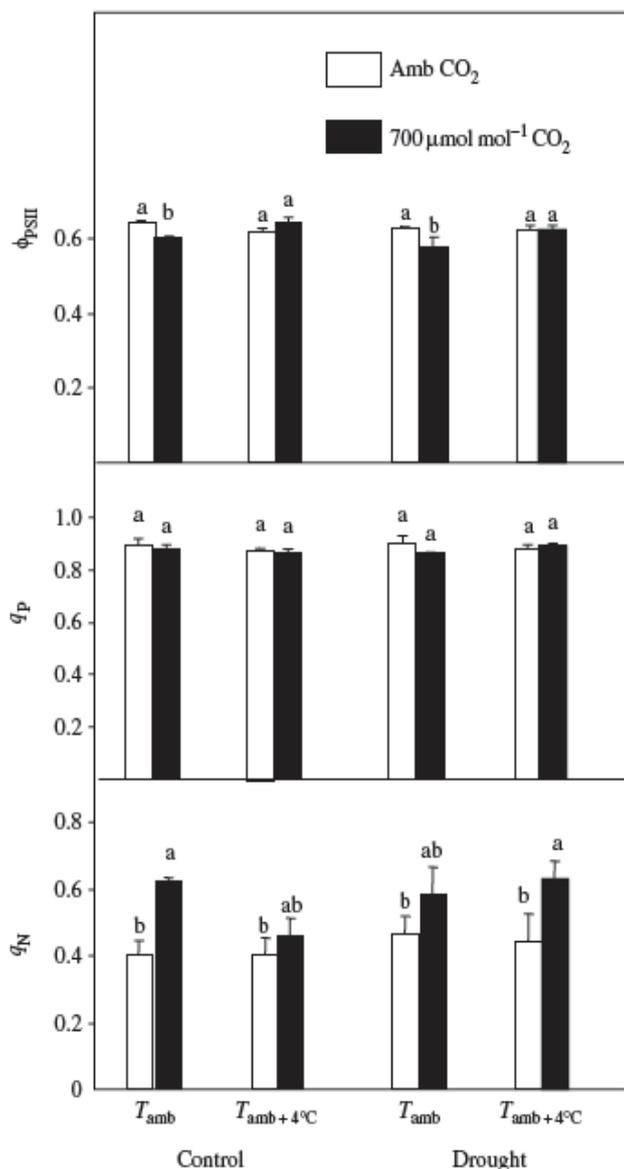


Fig. 4. The effect of CO₂, temperature and water availability on the quantum yield of PSII electron transport (ϕ_{PSII}) and photochemical (q_P) and non-photochemical (q_N) quenching coefficients in nodulated alfalfa. Each value represents the mean \pm SE ($n=8$). Levels of significance as for Fig. 1.

drought-exposed plants (Fig. 5). A 4°C increase in temperature led to an increase in the rubisco protein content in both fully and partially watered plants ($F=38.15$, $P=0.002$); this effect was more pronounced in plants grown in ambient CO₂ (Fig. 5). The concentration of leaf TSP showed the same response pattern (Fig. 5). The concentration of rubisco relative to that of TSP was not markedly altered by CO₂ ($F=0.29$, $P=0.608$; Fig. 5).

Elevated CO₂ reduced the initial rubisco activity by 42% ($F=17.53$, $P=0.014$) and the total activity by 47% ($F=21.78$, $P=0.010$; Fig. 6). Furthermore, elevated CO₂ and temperature interacted positively on both the initial ($F=11.57$, $P=0.027$) and total ($F=12.09$, $P=0.025$) rubisco activity. In drought-exposed plants, elevated

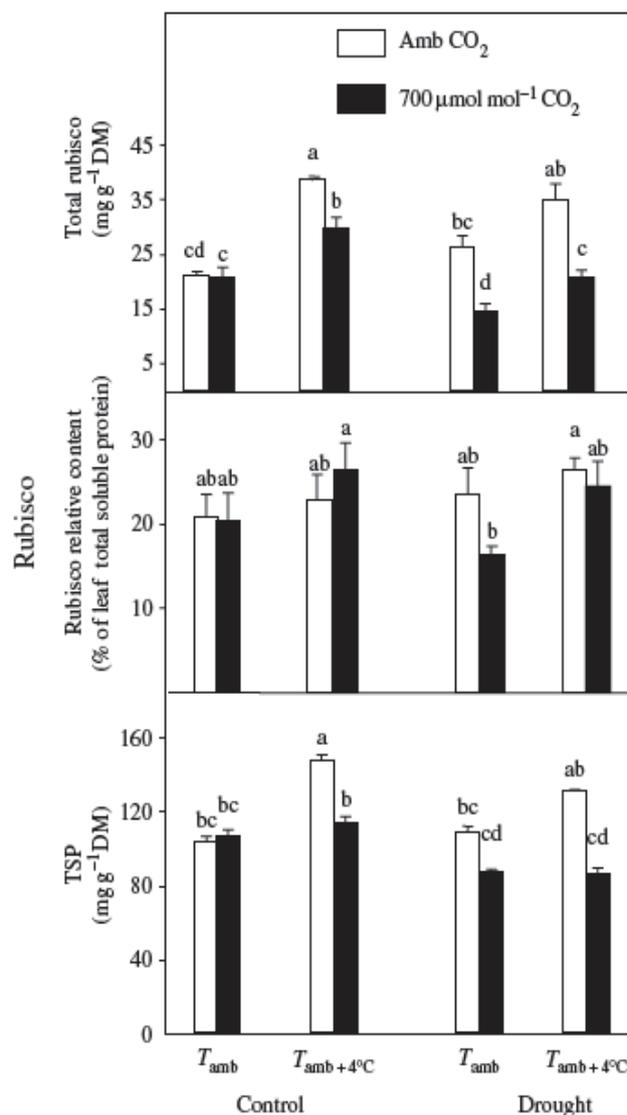


Fig. 5. The effect of CO₂, temperature and water availability on the total rubisco protein content, rubisco relative to the total soluble protein (TSP) content and the TSP content in nodulated alfalfa. Each value represents the mean \pm SE ($n=12$). Levels of significance as for Fig. 1. DM, dry matter.

CO₂ reduced the initial and total enzyme activity in plants grown at ambient temperature, but not in plants grown at elevated temperature. No significant change was detected in the rubisco activation state associated with CO₂ concentration ($F=6.23$, $P=0.057$), temperature ($F=1.59$, $P=0.276$) and water availability ($F=0.35$, $P=0.570$; Fig. 6).

Discussion

The current atmospheric CO₂ concentration is insufficient to saturate rubisco in C₃ plants; consequently, in short-term studies, it has been demonstrated that elevated CO₂ results in an increase in the photosynthetic rate (Drake et al. 1997, Norby et al. 1999). This is partly because CO₂ is the substrate of the reaction and partly because high CO₂ inhibits the oxygenase reaction of

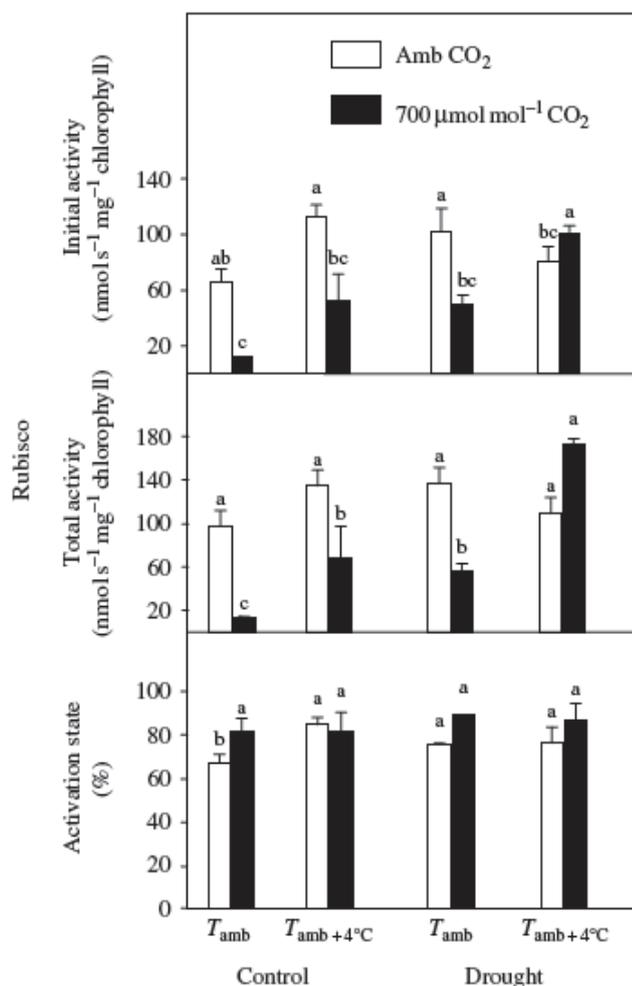


Fig. 6. The effect of CO₂, temperature and water availability on the initial and total rubisco activities and the rubisco activation state (%) in nodulated alfalfa. Each value represents the mean ± SE (n = 12). Levels of significance as for Fig. 1.

rubisco, thus avoiding a loss of CO₂ through photorespiration (Bowes 1993). However, for some species, longer exposure to elevated CO₂ results in an acclimation of photosynthesis (Jifon and Wolfe 2002, Long et al. 2004). In our case, when photosynthesis was measured at the same CO₂ concentration (Fig. 1) (700 μmol mol⁻¹ and especially at 350 μmol mol⁻¹), the rates in plants grown at 700 μmol mol⁻¹ were generally lower than those in plants grown in ambient CO₂ (Davey et al. 1999, Stitt and Krapp 1999). It is also worthy of note that there was no change in the photosynthesis rate associated with water availability, as also observed by De Luis (2000). According to Jones (1980) and McCree (1986), photosynthesis does not decline as fast as growth. Photosynthetic inhibition may be caused by stomatal and/or non-stomatal limitations of photosynthesis. Stomatal limitation of photosynthesis is understood to be a decrease in photosynthetic CO₂ assimilation as a result of a depletion of CO₂ (Sánchez-Díaz et al. 2004). As can be seen in Fig. 1, gas exchange measurements carried out at 350 and 700 μmol mol⁻¹ revealed that, even though *g* was

decreased by elevated CO₂, especially in drought-exposed plants, there were no corresponding differences in C_i. This implies that plants grown in ambient and elevated CO₂ environments have the same intercellular CO₂ concentration available for photosynthesis. These results argue against stomatal limitations and suggest that non-stomatal limitations are the main cause of the decreased carboxylation efficiency observed in elevated CO₂ treatments. Figure 1 also shows that no drought effect on C_i was observed, which means that fully and partially watered plants had the same CO₂ supply. These results may explain why the same photosynthetic rates were observed in fully and partially watered plants. The fact that there were no differences in leaf RWC (Table 1), photosynthesis, conductance, intercellular CO₂ concentration or rubisco activity suggests that drought-exposed plants adapt their growth to the lower water availability without suffering stressful conditions.

Photosynthetic non-stomatal limitations are proposed to explain the decreased PSII and/or carboxylation efficiency. Chlorophyll fluorescence was measured in order to test whether photosynthetic acclimation was a result of reduced light capture at PSII. The chlorophyll fluorescence measurements in ambient CO₂ concentration indicated that photosynthetic acclimation was not caused by a decreased maximal photochemical efficiency (F_v/F_m), which actually increased in plants grown in elevated CO₂, results that are similar to those obtained by Jones et al. (1995). As F_m remained unchanged, while the dark-adapted F_o decreased, the higher F_v/F_m in elevated CO₂ may have resulted from an increased connectivity of light harvesting antenna to PSII reaction centres (Peterson and Haver 2003). This increased concentration differs from previous reports of decreased F_v/F_m and increased F_o caused by elevated CO₂ in plants at high temperature (Roden and Ball 1996). F_v/F_m values lower than 0.8 in plants grown in ambient CO₂ suggest that these plants were under stress. As water availability did not modify this response, and the recorded leaf temperature during fluorescence measurements was not higher in ambient CO₂ (data not shown), the decreased F_v/F_m suggests that plants grown in ambient CO₂ may have been subjected to light stress. Elevated CO₂ prevented this photoinhibition. It should be highlighted that the measurements were carried out in August in high light intensity conditions. In contrast, in dark-adapted leaves, elevated CO₂ at ambient temperature reduced ϕ_{PSII} in the light. The relationship between this decrease in quantum yield and decreased F_v'/F_m' (data not shown), rather than q_p , points to changes in antenna configuration, leading to a reduced energy transfer to PSII reaction centres. Spunda et al. (1998) reported a decreased size of the antenna under CO₂ enrichment, and decreases in F_v'/F_m' have also been observed in plants acclimated to elevated CO₂ (Hymus et al. 2001). The higher excess excitation energy in plants grown in elevated CO₂, as indicated by higher F_v/F_m (Fig. 3) and reduced carboxylation efficiency (Fig. 2), induced an increase in q_N , which protects the photosynthetic apparatus from photo-oxidative damage.

As mentioned above, photosynthetic non-stomatal limitation may be caused by a decreased carboxylation of RuBP. V_{cmax} , representing rubisco carboxylation efficiency, decreased in plants grown in elevated CO_2 (Fig. 2). A decrease in rubisco content is often correlated with a decrease in photosynthesis after exposure to elevated CO_2 (Urban 2003). Figure 2 also shows that photosynthetic downregulation, observed in elevated CO_2 concentration, was independent of temperature and water availability. Decreased V_{cmax} in alfalfa plants was a consequence of inhibited rubisco activity (Fig. 6). The fact that there was no change in the enzyme activation state (Fig. 6) implies that decreased initial and total rubisco activity, especially in fully watered plants, was a result of a depleted content of rubisco protein (Fig. 5) (Drake et al. 1997, Moore et al. 1999). This kind of regulation of the amount of rubisco probably serves to optimize CO_2 acquisition, with the utilization of fixed carbon (Woodrow 1994). The content of rubisco relative to that of TSP was not markedly altered by the change in growth C_a (Fig. 5) (Jacob et al. 1995), indicating that this decrease was due to a non-specific decrease in leaf protein (Fig. 5). According to several authors (Bowes 1991, Nakano et al. 1997, Sicher and Bunce 1997), there is some evidence that, besides rubisco, other photosynthetic carbon reduction (PRC) cycle enzymes also decrease with CO_2 enrichment. According to Stitt and Krapp (1999), increased growth rates in elevated CO_2 may lead to plants becoming nitrogen limited or may exacerbate an existing nitrogen limitation. Some authors have suggested that, because plants tend to maximize resource use efficiency (Bloom et al. 1985), photosynthetic acclimation would imply a reallocation of the nitrogen away from the CO_2 fixation machinery – mainly away from rubisco, which is the single largest sink of nitrogen in the photosynthetic apparatus (Sage et al. 1987) – into more limiting processes such as carbohydrate synthesis and non-photochemical processes (Bowes 1991). Such processes may contribute to an increase in sink activity (Hocking and Meyer 1991, Conroy and Hocking 1993). Although these plants were capable of fixing atmospheric N_2 via nodules (as shown in Table 1), irrespective of temperature and water availability, plants grown in $700 \mu\text{mol mol}^{-1} \text{CO}_2$ consistently had a lower leaf nitrogen concentration (Table 1); however, the inhibitory effect of CO_2 was most clearly observable in the case of plants grown at ambient temperature. These results suggest that, in the elevated CO_2 treatments, the nodules were not efficient enough to supply the required nitrogen and to solve the nitrogen availability problems. As rubisco is the single largest sink of nitrogen in the photosynthetic apparatus, nitrogen depletion was reflected in a decreased rubisco protein content (Fig. 5). A correlation between the decrease in leaf nitrogen and the activity of photosynthetic enzymes (Zerihun and BassiriRad 2000) was to be expected, as rubisco alone comprises 25–50% of leaf nitrogen (Eichelmann and Laisk 1999). According to these explanations, photosynthetic acclimation of plants grown in elevated CO_2

is a result of limiting nitrogen. From this perspective, downregulation is an expression of suboptimal nitrogen nutrition.

Jifon and Wolfe (2002) observed that the effect of nitrogen on acclimation to elevated CO_2 depends on the balance between the supply of and demand for nitrogen during the growth period, and on the effect this has on biomass allocation and the source–sink carbon balance of the whole plant. A sink is defined as the parts of the plant that, at a given stage of development, utilize photosynthates in construction, storage or respiration (Ainsworth et al. 2004). The decreased nitrogen availability problems observed in elevated CO_2 treatments may affect plant growth and their capacity to develop new sinks. When applied at ambient temperature, elevated CO_2 did not modify the dry matter, whereas, at elevated temperature (ambient + 4°C), the dry matter increased by 28% in fully watered conditions and by 20% in partially watered conditions (Aranjuelo 2004). These results suggest that plants grown in elevated CO_2 and at ambient temperature may have problems developing new sinks.

A decrease in photosynthetic capacity in conditions of elevated CO_2 has been put down to end product inhibition, in which the demand for carbohydrates is insufficient to offset the enhanced carbohydrate supply in elevated CO_2 . A frequent acclimation response, particularly in nitrogen-limited conditions, is the accumulation of leaf carbohydrates in elevated CO_2 (Wolfe et al. 1998, Jifon and Wolfe 2002). In this experiment, no CO_2 concentration effect on TSS was observed (Table 1). An apparent discrepancy between the leaf sugar signalling theory and our results could be explained if we consider that the element of sugar signalling which is related to rubisco gene expression is hexose metabolism, rather than sugar abundance (Moore et al. 1999, Stitt and Krapp 1999). Several mechanisms via which sink activity may affect photosynthesis have been proposed. For example, when the utilization rate of sucrose in the sinks is lower than the rate of synthesis, the sucrose concentration at the source may increase, resulting in negative feedback on the enzymes involved in sucrose synthesis (Stitt and Krapp 1999). Control mechanisms are initiated by an enhanced concentration of mesophyll carbohydrates, originating transduction responses that target the transcription of specific photosynthetic and non-photosynthetic nuclear genes (Moore et al. 1999). In turn, this sucrose accumulation in leaf cells leads to lower concentrations of inorganic orthophosphate (P_i) for the PCR cycle and higher rates of starch synthesis. In the alfalfa used in our studies, a massive production and build-up of carbohydrates in the plants grown in $700 \mu\text{mol mol}^{-1} \text{CO}_2$ was reflected in an enhanced starch content (Table 1). Although an increased starch concentration may contribute to an imbalanced sink–source inhibition of rubisco activity, an accumulation of starch grains in the leaf can directly affect photosynthesis by damaging (Cave et al. 1981, Wulff and Strain 1982) or changing (Du Cloux et al. 1989) the structure of the

chloroplasts, or by increasing the length of the diffusion path for CO₂ in the chloroplasts (Neals and Incoll 1968, Nafziger and Collier 1976).

In conclusion, we found that photosynthetic down-regulation in elevated CO₂ was independent of temperature and water availability. Downregulation was a consequence of decreased carboxylation efficiency as a result of decreased rubisco activity, although in plants grown at ambient temperature it was also the result of decreased quantum efficiency. Low rubisco activity was caused by a depleted rubisco protein content, which was a result of carbohydrate build-up and a reallocation of nitrogen away from leaves to other processes more limiting for growth. There was no change in CO₂ fixation rates, V_{cmax} , leaf nitrogen, TSS or starch concentration associated with a 4°C temperature increase or water availability. This implies that the magnitude of photosynthetic acclimation in elevated CO₂ is not altered by temperature or drought. Furthermore, the decreased photosynthetic efficiency and leaf nitrogen concentration values registered in plants grown in 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ CO₂ suggest that the nodule activity was not sufficiently effective to increase sink activity and provide the required nitrogen to counteract photosynthetic acclimation.

Acknowledgements – This work was supported by the Spanish Science and Technology Ministry (BF12000-0154 and BFU2004-05096/BF1) and the Fundación Universitaria de Navarra I. Aranjuelo Michelena was the recipient of a research grant from the Spanish Science and Technology Ministry (FP2000-52313). The temperature gradient tunnels used in this study were funded by the Spanish Commission of Science and Technology (AMB96-0396). Professor Robert S. Nowak's (University of Nevada, Reno) valuable help in reviewing the manuscript was greatly appreciated.

References

- Ainsworth EA, Rogers A, Nelson R, Long SP (2004) Testing the 'source-sink' hypothesis of down-regulation of photosynthesis in elevated [CO₂] in the field with single gene substitutions in *Glycine max*. *Agric For Meteorol* 122: 85–94
- Andrews JT, Lorimer GH (1987) Rubisco: structure, mechanisms and prospects for improvement. In: Hatch MD, Broadman NK (eds) *Biochemistry of Plants*, Vol. 10. Academic Press, New York, pp 132–207
- Aranjuelo I (2004) PhD Thesis, Universidad de Navarra, Pamplona, Navarra, Spain
- Arnon DI (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol* 73: 681–686
- Bloom AJ, Chapin FS III, Mooney HA (1985) Resource limitation in plants – an economic analogy. *Annu Rev Ecol Syst* 16: 363–392
- Bowes G (1991) Growth at elevated CO₂: photosynthetic responses mediated through Rubisco. *Plant Cell Environ* 14: 795–806
- Bowes G (1993) Facing the inevitable: Plants and increasing atmospheric CO₂. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 44: 309–322
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Ann Biochem* 72: 248–254
- Cave G, Tolley LC, Strain BR (1981) Effect of carbon dioxide enrichment on chlorophyll content, starch content and starch grain structure in *Trifolium subterraneum* leaves. *Physiol Plant* 51: 171–174
- Conroy J, Hocking P (1993) Nitrogen nutrition of C₃ plants at elevated atmospheric CO₂ concentrations. *Physiol Plant* 89: 570–576
- Cure JD, Acock B (1986) Crop responses to carbon dioxide doubling: a literature survey. *Agric For Meteorol* 38: 127–145
- Davey PA, Parsons AJ, Atkinson L, Wadge K, Long SP (1999) Does photosynthetic acclimation to elevated CO₂ increase photosynthetic nitrogen use efficiency? A study of three native UK grassland species in open-top chambers. *Funct Ecol* 13: 21–28
- De Luis I (2000) PhD Thesis, Universidad de Navarra, Pamplona, Navarra, Spain
- De Luis I, Irigoyen JJ, Sánchez-Díaz M (1999) Elevated CO₂ enhances plant growth in droughted N₂-fixing alfalfa without improving water status. *Physiol Plant* 107: 84–89
- Drake BG, González-Meler MA, Long SP (1997) More efficient plants: a consequence of rising atmospheric CO₂. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 609–639
- Du Cloux H, Andre M, Gerbaud A, Dagueuet A (1989) Wheat response to CO₂ enrichment: effect on photosynthetic and photorespiratory characteristics. *Photosynthetica* 23: 145–153
- Eichelmann H, Laik A (1999) Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase content, assimilatory charge, and mesophyll conductance in leaves. *Plant Physiol* 119: 179–189
- Evans HJ (1974) Symbiotic nitrogen fixation in legume nodules. In: Moore TC (ed) *Research Experiences in Plant Physiology*. Springer-Verlag, New York, NY, pp 417–426
- Farquhar GD, Sharkey TD (1982) Stomatal conductance and photosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol* 33: 317–345
- Farquhar GD, von Caemmerer S, Berry JA (1980) A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C₃ species. *Planta* 149: 78–90
- Geiger M, Haake V, Ludewig F, Sonnewald U, Stitt M (1999) The nitrate and ammonium nitrate supply have a major influence on the response of photosynthesis, carbon metabolism and growth to elevated carbon dioxide in tobacco. *Plant Cell Environ* 22: 1177–1199
- Genty B, Briantais JM, Baker NR (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta* 990: 87–92
- Gunderson CA, Norby RJ, Wullschlegel SD (1993) Foliar gas exchange of two deciduous hardwoods during three years of growth in elevated CO₂: no loss of photosynthetic enhancement. *Plant Cell Environ* 16: 797–807
- Hocking PJ, Meyer CP (1991) Effects of CO₂ enrichment and nitrogen stress on growth and partitioning of dry matter and nitrogen in wheat and maize. *Aust J Plant Physiol* 18: 339–356
- Horie T, Nakagawa H, Nakano J, Hamotani K, Kim HY (1995) Temperature gradient chambers for research on global environment change. III. A system designed for rice in Kyoto, Japan. *Plant Cell Environ* 18: 1064–1069
- Hymus GJ, Baker NR, Long SP (2001) Growth in elevated CO₂ can both increase and decrease photochemistry and photoinhibition of photosynthesis in a predictable manner. *Dactylis glomerata* grown in two levels of nitrogen nutrition. *Plant Physiol* 127: 1204–1211
- Idso SB, Kimball BA (1992) Effects of atmospheric CO₂ enrichment on photosynthesis, respiration and growth of four orange trees. *Plant Physiol* 99: 341–343
- IPCC (2001) In: Houghton JT, Ding Y, Griggs DJ, Noguer M, van Der Linden PJ, Xiasou D (eds) *The Scientific Basis*. Third Assessment Report of Working Group I. Cambridge University Press, Cambridge
- Jacob J, Greifner C, Drake BG (1995) Acclimation of photosynthesis in relation to Rubisco and non-structural carbohydrate contents and in situ carboxylase activity in *Scirpus obeyi* grown at elevated CO₂ in the field. *Plant Cell Environ* 18: 875–884
- Jarvis CE, Walker JRL (1993) Simultaneous, rapid, spectrophotometric determination of total starch, amylose and amylopectin. *J Sci Food Agric* 63: 53–57
- Jifon JL, Wolfe DW (2002) Photosynthetic acclimation to elevated CO₂ in *Phaseolus vulgaris* L. is altered by growth response to nitrogen supply. *Global Change Biol* 8: 1018–1027
- Jones HG (1980) Interaction and integration of adaptive responses to water stress: the implications of an unpredictable environment. In: Turner NC, Kramer PJ (eds) *Adaptation of Plants to Water and High Temperature Stress*. Wiley and Sons, New York, pp 353–365

- Jones HG (1992) *Plants and Microclimate: A Quantitative Approach to Environmental Plant Physiology*. Cambridge University Press, Cambridge
- Jones M, Clifton Brown J, Raschi A, Miglietta F (1995) The effects on *Arbutus unedo* L. of long term exposure to elevated CO₂. *Global Change Biol* 1: 295–302
- Kalina J, Čajánek M, Špunda V, Marek MV (1997) Changes of the primary photosynthetic reactions of Norway spruce under elevated CO₂. In: Mohren GMJ, Kramer K, Sabaté S (eds) *Impacts of Global Change on Tree Physiology and Forest Ecosystems*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 59–69
- Keeling CD, Bacastow RB, Carter AF, Piper SC, Whorf TP, Heimann M, Mook WG, Roeloffzen H (1989) A 3-dimensional model of atmospheric CO₂ transport based on observed winds: 1. Analysis of observational data. In: Peterson DH (ed) *Aspects of Climate Variability in the Pacific and the Western Americas*. Geophysical Monographs 55. American Geophysical Union, Washington, pp 165–235
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685
- Long SP, Ainsworth EA, Rogers A, Ort DR (2004) Rising atmospheric carbon dioxide. Plants FACE the future. *Annu Rev Plant Biol* 55: 591–628
- Long SP, Drake BG (1992) Photosynthetic CO₂ assimilation and rising atmospheric CO₂ concentration. In: Baker NR, Thomas H (eds) *Crop Photosynthesis: Spatial and Temporal Determinations*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp 69–103
- Long SP, Hallgreen JE (1985) Measurement of CO₂ assimilation by plants in the field and in the laboratory. In: Coombs J, Hall DO, Long SP, Scurlock JMO (eds) *Techniques in Bioproductivity and Photosynthesis*. Pergamon Press, Oxford, pp 62–94
- Martín del Molino IM, Martínez-Carrasco R, Pérez P, Hernández L, Morcuende R, Sánchez de la Puente L (1995) Influence of nitrogen supply and sink strength on changes in leaf nitrogen compounds during senescence in two wheat cultivars. *Physiol Plant* 95: 51–58
- McCree KJ (1986) Whole plant carbon balance during osmotic adjustment to drought and salinity stress. *Aust J Plant Physiol* 13: 33–44
- Montgomery DC (1984) *Designs and Analyses of Experiments*, 2nd edn. Wiley and Sons, New York
- Moore BE, Cheng SH, Sims D, Seemann JR (1999) The biochemical and molecular basis for acclimation to elevated CO₂. *Plant Cell Environ* 22: 567–582
- Nafziger ED, Collier R (1976) Influence of leaf starch concentration on CO₂ assimilation in soybean. *Plant Physiol* 57: 560–563
- Nakano H, Makino A, Mae T (1997) The effect of elevated partial pressures of CO₂ on the relationship between photosynthetic capacity and N content in rice leaves. *Plant Physiol* 115: 191–198
- Neals TF, Incoll LD (1968) The control of leaf photosynthesis rate by the level of assimilate concentration in the leaf: a review of the hypothesis. *Bot Rev* 34: 107–125
- Norby RJ, Wullschlegel SD, Gunderson CA, Johnson DW, Ceulemans R (1999) Tree responses to rising CO₂ in field experiments: implications for the future forest. *Plant Cell Environ* 22: 683–714
- Olsson T, Leverenz JW (1994) Non-uniform stomatal closure and the apparent convexity of the photosynthetic photon flux density response curve. *Plant Cell Environ* 17: 701–710
- Peterson RB, Havir EA (2003) Contrasting modes of regulation of PS II light utilization with changing irradiance in normal and psbS mutant leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Photosynth Res* 75: 57–70
- Rawson HM (1995) Yield responses of two genotypes to carbon dioxide and temperature in field studies using temperature gradient tunnels. *Aust J Plant Physiol* 22: 23–32
- Rawson HM, Gifford RM, Condon BN (1995) Temperature gradient chambers for research on global environment change. I. Portable for research on short-stature vegetation. *Plant Cell Environ* 18: 1048–1054
- Reviere-Rolland H, Contard P, Betsche T (1996) Adaptation of pea to elevated CO₂: Rubisco, phosphoenolpyruvate carboxylase and chloroplast phosphate translocator at different levels of nitrogen and phosphorus nutrition. *Plant Cell Environ* 19: 109–117
- Roden JS, Ball MC (1996) The effect of elevated [CO₂] on growth and photosynthesis of two eucalyptus species exposed to high temperatures and water deficits. *Plant Physiol* 111: 909–919
- Sage RF, Percy RW, Seeman JR (1987) The nitrogen use efficiency of C₃ and C₄ plants. III. Leaf nitrogen effects on the activity of carboxylation enzymes in *Chenopodium album* L. and *Amaranthus retroflexus* L. *Plant Physiol* 85: 355–359
- Sánchez-Díaz M, Irigoyen JJ, Gómez-Casanovas N, Pardo A, Azcón-Bieto J (2004) El cambio climático global. Efecto previsible del CO₂ sobre los vegetales. In: Reigosa M, Pedrol N, Sánchez-Moreiras A (eds) *La Ecofisiología Vegetal. Una Ciencia de Síntesis*. Universidade de Vigo, Vigo, Spain
- Sharkey TD (1988) Estimating the rate of photorespiration in leaves. *Physiol Plant* 73: 147–152
- Sharkey TD, Savitch LV, Butz ND (1991) Photometric method for routine determination of k_{cat} and carbamylation of rubisco. *Photosynth Res* 28: 41–48
- Sicher RC, Bunce JA (1997) Relationship of photosynthetic acclimation to changes of Rubisco activity in field-grown winter wheat and barley during growth in elevated carbon dioxide. *Photosynth Res* 52: 27–38
- Špunda V, Kalina J, Čajánek M, Pavlickova H, Marek MV (1998) Long-term exposure of Norway Spruce to elevated CO₂ concentration induces changes in photosystem II mimicking an adaptation to increased irradiance. *J Plant Physiol* 152: 413–419
- Stitt M, Krapp A (1999) The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. *Plant Cell Environ* 22: 583–621
- Urban O (2003) Physiological impacts of elevated CO₂ concentration ranging from molecular to whole plant responses. *Photosynthetica* 41: 9–20
- Weatherley PE (1950) Studies in the water relations of the cotton plant. I. The field measurement of water deficits in leaves. *New Phytol* 49: 81–87
- Wolfe DW, Gifford RM, Hilbert D, Luo Y (1998) Integration of photosynthetic acclimation to CO₂ at the whole-plant level. *Global Change Biol* 4: 879–893
- Woodrow IE (1994) Optimal acclimation of the C₃ photosynthetic system under enhanced CO₂. *Photosynth Res* 39: 401–412
- Woodrow IE, Berry JA (1988) Enzymatic regulation of photosynthetic CO₂ fixation in C₃ plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 39: 533–594
- Wulff RD, Strain BR (1982) Effects of CO₂ enrichment on growth and photosynthesis in *Desmodium paniculatum*. *Can J Bot* 60: 1084–1091
- Yemm EW, Willis AJ (1954) The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochem J* 57: 508–514
- Zerihun A, BassiriRad H (2000) Photosynthesis of *Helianthus annuus* does not acclimate to elevated CO₂ regardless of N supply. *Plant Physiol Biochem* 38: 897–903

Elevated CO₂ and temperature differentially affect photosynthesis and resource allocation in flag and penultimate leaves of wheat

P. PÉREZ, G. ZITA**, R. MORCUENDE, and R. MARTÍNEZ-CARRASCO*

*Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca, CSIC, Apartado 257, E-37071 Salamanca, Spain**

Abstract

Differences in acclimation to elevated growth CO₂ (700 μmol mol⁻¹, EC) and elevated temperature (ambient +4 °C, ET) in successive leaves of wheat were investigated in field chambers. At a common measurement CO₂, EC increased photosynthesis and the quantum yield of electron transport (Φ) early on in the growth of penultimate leaves, and later decreased them. In contrast, EC did not change photosynthesis, and increased Φ at later growth stages in the flag leaf. Contents of chlorophyll (Chl), ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBPCO), and total soluble protein were initially higher and subsequently lower in penultimate than flag leaves. EC decreased RuBPCO protein content relative to soluble protein and Chl contents throughout the development of penultimate leaves. On the other hand, EC initially increased the RuBPCO:Chl and Chl *a/b* ratios, but later decreased them in flag leaves. In the flag leaves but not in the penultimate leaves, ET initially decreased initial and specific RuBPCO activities at ambient CO₂ (AC) and increased them at EC. Late in leaf growth, ET decreased Chl contents under AC in both kinds of leaves, and had no effect or a positive one under EC. Thus the differences between the two kinds of leaves were due to resource availability, and to EC-increased allocation of resources to photon harvesting in the penultimate leaves, but to increased allocation to carboxylation early on in growth, and to light harvesting subsequently, in the flag leaves.

Additional key words: acclimation; ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase; temperature; *Triticum aestivum*.

Introduction

Many studies of the responses of photosynthesis to elevated air CO₂ concentration (EC) have focused on the youngest, actively photosynthesising leaves. We are aware of two studies of leaves in different positions within the canopy of wheat (Osborne *et al.* 1998, Adam *et al.* 2000). In these studies, EC caused no decrease in the carboxylation capacity of flag leaves, but during grain development—and not before anthesis—it led to a decrease in net photosynthetic rate (P_N) and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBPCO) content, together with an increase in content of light-harvesting proteins, in the lower shaded leaves. However, the interactive effects of EC and elevated temperature (ET)

on leaves in different positions were not addressed in these studies. We found previously a downward acclimation of P_N in flag leaves under EC as early as at ear emergence; with ET (ambient +4 °C) and a high N supply, this acclimation decreased (Martínez-Carrasco *et al.* 2005). Nie *et al.* (1995) observed an early decrease of RuBPCO content in wheat leaves under EC, followed by a more marked and later decrease in contents of this and other proteins and chlorophyll (Chl), which could reflect an acceleration of senescence. Leaf constituents exhibit changes with age, with increases followed by decreases in contents of proteins, Chl, and other compounds; soluble proteins reach a maximum before Chl and insoluble or

Received 14 October 2005, accepted 2 May 2006.

*Corresponding author; fax: +34923219609, e-mail: rafaelmc@usal.es

**Present address: Departamento de Ciencias Agrícolas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cautitlan-Izcalli, 54712 Mexico.

Abbreviations: AC – ambient CO₂ concentration; AT – ambient temperature; EC – enhanced CO₂ concentration; DA – days after anthesis; ET – enhanced temperature; F_m' – maximum fluorescence yield in the light-adapted state; F_t – light-adapted steady-state fluorescence yield; P_N – net photosynthetic rate; PS2 – photosystem 2; RuBP – ribulose-1,5-bisphosphate; RuBPCO – ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase; Φ – quantum yield of electron transport; Φ_{max} – maximum quantum yield of electron transport in light-adapted leaves.

Acknowledgments: The technical cooperation of A. Verdejo and L. Hernández is acknowledged. The staff of the INRASA experimental farm helped with crop sowing and fertilizer application. G.Z. was the recipient of a grant from the Autonomous University of Mexico. R.M. had an I3P postdoctoral contract from the CSIC-European Social Fund. This work has been funded by the Spanish Programme of Research and Development (Grant no. BFI2000-0871).

membrane proteins (Martín del Molino *et al.* 1995). Since prolonged growth at EC alters the contents of these constituents (Stitt and Krapp 1999), the question arises as to whether their balance and pattern of change with time is affected, and whether variations occur among leaves in a stem.

During development, a transition from sink to source for assimilates occurs in leaves. In addition to the irradiance, sink demand may be different for source leaves in different positions on a stem. In warm environments, where temperatures rapidly increase in spring and accelerate plant development, flag leaf growth in wheat takes place while a strong demand for assimilates is posed by the rapidly elongating last stem internode and, later on, by the ear and grains. Moreover, Rogers *et al.* (1998) have suggested that acclimation to EC is caused by a limitation in sink development when N content is low, rather than being a direct effect of the N supply on photosynthesis.

Leaves of cereals emerge under full irradiance and are progressively shaded by organs higher up in the leaf canopy (Osborne *et al.* 1998). In the low irradiance down in the canopy, leaf P_N is limited by the capacity of regeneration of ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP) and electron transport. Although acclimation to EC may decrease RuBPCO activity, an increase in CO_2 concentration under such conditions will increase the efficiency of P_N because photorespiration is decreased (Long 1991, Osborne *et al.* 1997). In addition to this, the response of leaves to low irradiance involves changes in photosynthetic capacity, with decreases in the Chl *a/b* ratio that are consistent with an increase in the light-harvesting antenna, and decreases in cytochrome *b₆f* and RuBPCO contents and ATPase activity (Bailey *et al.* 2001). This shade acclimation could vary with acclimation to EC, which increases the light-harvesting complex (Osborne *et al.* 1998).

When carbon fixation is inhibited, photosynthetic electron transport is down regulated to match the decline in electron demand; at the same time, non-photochemical quenching increases (Golding and Johnson 2003). Seasonal decreases in photochemistry and increases in photo-inhibition under EC have been found (Hymus *et al.* 1999). CO_2 enrichment can either increase or decrease the

photochemistry, depending on whether a down-regulation of photosynthetic capacity occurs; with N deficiency, there is an acclimatory decrease in RuBPCO that decreases the electron transport destined to photosynthetic carbon reduction (Hymus *et al.* 2001). We have observed that the quantum yield of photosystem 2 (PS2) electron transport (Φ) decreases in EC in wheat; at later stages of growth, ET decreased the maximal photochemical efficiency with low N, but not with high N (Martínez-Carrasco *et al.* 2005). Moreover, plants grown at EC maintain the maximal photochemical efficiency of PS2 up to significantly higher temperatures than in leaves at ambient CO_2 (AC), so it has been concluded that growth in EC protects against high-temperature lesions (Taub *et al.* 2000).

Under CO_2 enrichment, carboxylation becomes more efficient and, in theory, for maximum photosynthesis rates per unit N, a decrease in RuBPCO relative to RuBP-regeneration would be expected (Sage 1994). There is some evidence for re-balancing, but this is small and frequently absent (Sage 1994, Sage *et al.* 1995, Nakano *et al.* 1997, Mitchell *et al.* 2000), although N from the decreased RuBPCO in anti-sense rice plants induces an increase in contents of other photosynthetic components for any given content of leaf N (Makino *et al.* 1997). The question of whether acclimation to EC reduces the excess RuBPCO investment thus remains open.

The aim of this work was to learn whether the effects on photosynthesis of growth EC and ET vary between leaves of different age and position on wheat stems. In particular, we investigated possible differences between the leaves in the response of the balance between carboxylation and electron transport to EC and ET. With this purpose, we analysed the content of Chl, all of which is bound to thylakoid proteins (Markwell *et al.* 1979) and may therefore reflect the size of the photochemical apparatus, contents of RuBPCO and soluble proteins, and the activity of RuBPCO during growth of the penultimate and flag leaves. To investigate the effects of EC and ET on Φ and P_N of light-adapted leaves, rapid irradiance-response curves of Chl fluorescence, and carbon fixation under saturation irradiance and AC or EC were determined.

Materials and methods

After harvesting an alfalfa crop on a clay soil, spring wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Alcázar) was sown at a rate of 190 kg ha⁻¹ and 0.13 m row spacing, on 26 February. Before sowing, N (as NH_4NO_3), P, and K fertilizers (28, 48, and 28 kg ha⁻¹, respectively) were added. An additional application of 108 kg ha⁻¹ N was made on 27 March. Pests were prevented with herbicides and insecticides. The crop was watered weekly with a drip irrigation system supplying the average rain water in the area during the period of the experiment (198 mm between February and June). The experimental site was

located in the IRNASA farm in Salamanca (41°N, 800 m above sea level), Spain.

Two temperature-gradient chambers were mounted on the crop on 2 April, rather than at sowing, to select crop areas with a uniform plant cover. The chambers followed the design of Rawson *et al.* (1995). They were 9.0 m long, 2.2 m wide, and 1.7 m high at the ridge and consisted of three longitudinal modules separated by polycarbonate septa. These chambers were described in Pérez *et al.* (2005). One chamber was kept at AC (360 $\mu\text{mol mol}^{-1}$), and another at EC, *i.e.* twice this

concentration (700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$). An inlet module in a chamber closely tracked the AT fluctuations, while the temperature was increased by 4 °C in the opposite module. Samplings in the four combinations of CO₂ and temperature were repeated in three consecutive sections within each of the module halves (six repeated measurements). Leaves were sampled at full emergence (penultimate leaves, Chl fluorescence), 2 (flag leaves), 12–14, 25–28, and 39–41 (penultimate leaves) d after leaf emergence, corresponding to –22, –9 to –7, 3–5, and 17–19 d from the start of anthesis (DA), respectively (anthesis took place on 25 and 28 May for plants at EC and AC, respectively).

P_N : An infrared gas analyser (*LCA-2, ADC*, Hoddesdon, Herts., UK) with differential operation in an open system was used for gas exchange measurements. Air flow rate was adjusted to 83 $\text{cm}^3 \text{s}^{-1}$ with a mass flow regulator (*ASUM, ADC*), and the leaves were individually enclosed in a leaf chamber having an 11 cm^2 window [*PLC(N)-2, ADC*] to which a new quantum sensor and an additional humidity sensor had been added (codes *LCH-030/S* y *LCH-032/s*, respectively, *ADC*) allowing simultaneous measurement of inlet and outlet air vapour pressures. Measurements were performed on clear days between 2 and 8 h after dawn, with a $1\,300 \pm 140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ quantum flux density, obtained by maintaining the leaf chamber facing the sun. Ambient air taken from 3 m above the soil at a place separated from the operator, or air from a gas cylinder containing 700 $\mu\text{mol}(\text{CO}_2) \text{mol}^{-1}$ was humidified by passing through a bubbler and the vapour pressure deficit was adjusted to 1.7 kPa by passing through columns filled with silica gel. Leaf area within the chamber was calculated by multiplying the chamber length by the average leaf width at the two ends of the chamber. Gas exchange parameters were calculated according to Long and Hallgreen (1985). A replicate leaf from each treatment, with treatments in random order, was measured before the next replicate, so that differences during the day could be included in the replicate effect in the analysis of variance.

Rapid irradiance-response curves of Chl fluorescence: In addition to estimating the maximum rate of electron transport and the quantum yield under saturating irradiance (Rascher *et al.* 2000), fluorescence-irradiance response curves without previous darkening of leaves allowed the maximum quantum yield in light-adapted leaves (Φ_{max}) to be calculated. Rapid light-response curves of Φ at AC were obtained with the *PAM-2000* modulated fluorometer with the *2030-B* leaf clip (Walz, Effeltrich, Germany), using the red “actinic light” (peak at 655 nm) provided by the instrument. Φ was calculated as $(F_m' - F_t)/F_m'$, where F_t is the fluorescence yield in the light-adapted sample and F_m' is the maximum fluorescence yield in the light-adapted state when a saturating pulse of approximately 3 000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ is

superimposed for 0.8 s over the prevailing radiation. Light-adapted leaves were placed in the leaf clip and covered with a black cloth to exclude sunlight, and the “actinic light” was increased in eight 20 s-steps, each separated by a saturating pulse, from less than 10 to 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (White and Critchley 1999, Rascher *et al.* 2000). Hyperbolic regressions [$y = a + b/(1 + dx)$] were fitted to the Φ -irradiance data for the different treatments and were compared as detailed in the section on statistical analysis (see below). Φ_{max} in light-adapted leaves is given by $a + b$, while the initial slope of the curve corresponds to $b \times d$. The number and order of repeated measurements for each treatment combination was as described for the determinations of P_N .

Leaf analyses: Samples consisting of three leaves per replicate were rapidly transferred *in situ* to liquid nitrogen and stored at –80 °C until analysis. The fresh mass, area, and Chl contents in sub-samples of frozen leaves were determined as described (Pérez *et al.* 2005), thus allowing the results to be expressed on a leaf area basis.

Chls were extracted from a sub-sample of frozen leaves with 80 % acetone and determined according to Arnon (1949). A procedure (Pérez *et al.* 2005) based on the NADH oxidation-coupled spectrophotometric assay of Lilley and Walker (1974) was used to determine RuBPCO activity before (initial activity) and after (total activity) carbamylation of active sites; RuBPCO activation was estimated as the percent ratio of initial to total activities. The amounts of RuBPCO and total soluble protein in sub-samples of frozen leaves were measured after extraction, spectrophotometric analysis, and gel electrophoresis followed by densitometric scanning (Aranjuelo *et al.* 2005). RuBPCO specific activity was determined by dividing total activity by the number of moles of active sites, which was taken as equivalent to the moles of RuBPCO large subunit. This would include any RuBPCO sites bound to inhibitors and yield low specific activities compared to methods determining free RuBPCO sites (Sharkey *et al.* 1991).

Statistical analyses: The significance of treatment effects was assessed through variance analyses using a nested design, according to Snedecor and Cochran (1967), with temperature as a stratum included in CO₂, replicates as a stratum included in temperature, and the sampling date as a further stratum included in that for replicates. Additional details about this analysis are described by Pérez *et al.* (2005).

Fitting of the Φ -irradiance curves [$y = a + b/(1 + dx)$] was performed by non-linear regression with the *GenStat 6.2* statistical package. The regressions for the different treatments were compared by analysis of parallelism (*GenStat 6.2*), which successively fits four models with different degrees of parallelism among the curves for these treatments. Thus, the model is first fitted with the same parameters for all treatments; then different a para-

meters are fitted for each of the treatments, after which separate a and b parameters are fitted and, finally, different values for all parameters are fitted to each treatment. With these four models, an accumulated analysis of

Results

P_N : In the penultimate leaf 9 d before the beginning of anthesis, growth EC increased irradiance-saturated P_N measured with $360 \mu\text{mol}(\text{CO}_2) \text{mol}^{-1}$ at AT, and did not affect it at EC (Fig. 1). At later dates, EC decreased P_N . The effect on P_N of a 4°C increase in the growth temperature did not reach significance. Neither CO_2 nor temperature had significant effects on flag leaf P_N on the different measurement dates. When CO_2 assimilation was measured at EC in the second sampling, the effects of growth in EC (data not shown) were similar to those measured at $360 \mu\text{mol}(\text{CO}_2) \text{mol}^{-1}$. Nevertheless, when measured at the respective growth CO_2 , P_N was higher at growth EC than AC (data not shown).

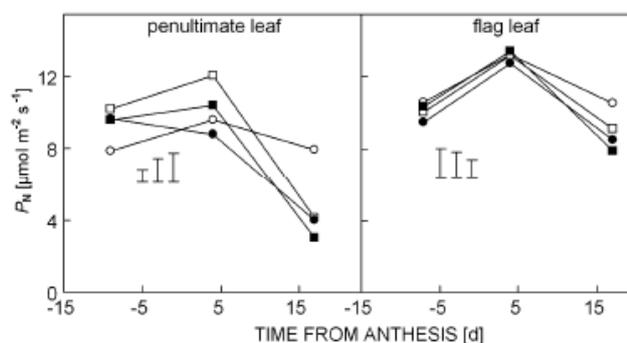


Fig. 1. Photon-saturated net photosynthetic rate (P_N) measured under $360 \mu\text{mol}(\text{CO}_2) \text{mol}^{-1}$ in leaves in different positions in the stem of wheat grown at 360 (open symbols) or 700 (closed symbols) $\mu\text{mol}(\text{CO}_2) \text{mol}^{-1}$ and ambient (circles) or ambient + 4°C (squares) temperatures, at different dates from the start of anthesis. Plants were grown in the field under temperature gradient chambers. Vertical bars represent least significant differences ($p < 0.05$) for effects of CO_2 (left), temperature (middle), and date (right) derived from the pooled analysis of variance for CO_2 concentrations, temperatures, and dates.

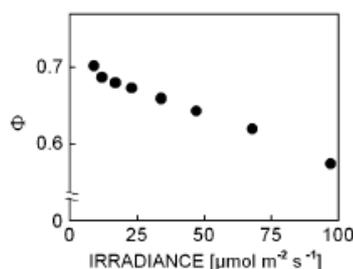


Fig. 2. Typical responses of the quantum yield of electron transport (Φ) to irradiance in rapid measurements of light-adapted wheat leaves. Irradiance was increased from <10 to $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in 20-s-steps.

Rapid Chl-irradiance response curves: Typical responses to irradiance of Φ in light-adapted leaves are shown in Fig. 2. Φ decreased in the range of irradiances from <10 to $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A hyperbolic regression [$y = a + b/(1 + dx)$] showed good fitting to the Φ data.

variance is carried out to assess whether common or separate parameters should be fitted to the regressions for the treatments compared.

Comparison of regressions showed that the b and d parameters were common for the four treatments on each sampling date, except for a significant difference in b for the 3-DA penultimate leaf (Table 1). Thus, with this exception, the irradiance-response curves of Φ for the different treatments were parallel, showing that decreases in Φ with irradiance did not differ among the treatments, which is consistent with the absence in the rapid irradiance-curves of appreciable increases in non-photochemical quenching, up to irradiances higher than $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (White and Critchley 1999). In contrast, significant differences between the CO_2 -temperature combinations for the a parameter were found (Table 1), revealing that Φ_{max} when irradiance tended to zero, was affected by the treatments. In the penultimate leaf, EC and ET increased Φ_{max} in the early growth stages, but the enhancement disappeared with the progress of development and was later reversed. In contrast, in the flag leaf EC and ET did not increase Φ_{max} at the beginning of growth, but EC increased it in later samplings. Under EC, ET had only a small positive effect on Φ_{max} at intermediate and later growth stages, while ET under AC decreased Φ_{max} in the last sampling.

RuBPCO activity: The first sampling for analysis of constituents of the penultimate leaf coincided with the first measurements of photosynthesis, 13 d after the first Chl fluorescence determinations. EC decreased initial and total RuBPCO activity throughout the development of the penultimate leaf (Fig. 3). In the flag leaf at AT, EC decreased total RuBPCO activity before anthesis and both initial and total RuBPCO activities after anthesis, while at ET it initially increased, but later did not affect this activity. CO_2 enrichment increased the activation state of RuBPCO in flag leaves in the first two samplings. EC also decreased RuBPCO specific activity at AT, but increased it at ET.

In the penultimate leaf, at the beginning of growth an increase in temperature decreased initial and total RuBPCO activities, the activation of the enzyme and, under AC, also RuBPCO specific activity. Later, ET had little effect on RuBPCO activity in the penultimate leaf. In the flag leaf, ET also decreased RuBPCO specific activity at AC and increased it at EC. This led to a decrease with temperature in total and initial RuBPCO activities in plants grown at AC, and, in the first sampling, to a slight increase of these activities at EC.

RuBPCO and soluble protein contents: In the penultimate leaf, EC decreased the RuBPCO contents (Fig. 3)

and the RuBPCO protein : soluble protein ratio (Fig. 4) throughout leaf development. In the flag leaf, EC induced an early increase in RuBPCO as a fraction of soluble protein (Fig. 4) and, when combined with AT, an increase in content of RuBPCO protein (Fig. 3), while in successive samplings EC significantly decreased the

RuBPCO : soluble protein ratio and RuBPCO protein content. Soluble protein contents decreased with EC in both kinds of leaves. The increase in temperature by 4 °C had no significant effects on RuBPCO : protein contents in both leaves.

Table 1. Parallel model analysis for the rapid irradiance-response curves of Φ in wheat leaves grown at 360 (AC) or 700 (EC) $\mu\text{mol}(\text{CO}_2) \text{mol}^{-1}$ at ambient (AT) or ambient + 4 °C (ET) temperatures. Measurements were recorded at AC. Irradiances ranged from <10 to 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in 20 s-steps. Separate parameters in the $\Phi = a + b/(1 + d \cdot \text{light})$ model for each treatment had to be fitted when a change in regression was significant. Φ_{max} ($a + b$) and initial slope ($-b \times d$) values for each treatment were derived from the parallel model analysis. DA – time from anthesis [d].

Leaf	Time [DA]		Change in regression		<i>a</i> and <i>b</i>	<i>a</i> , <i>b</i> , <i>d</i>
			Common	Separate		
			<i>a</i>			
			Degrees of freedom			
			2	3	3	3
Penultimate	-22	F	373.47	16.19	2.320	1.500
		Prob	<0.001	<0.001	0.076	0.216
	4	F	173.91	29.39	6.660	0.600
		Prob	<0.001	<0.001	<0.001	0.616
	17	F	258.00	13.09	2	0.430
		Prob	<0.001	<0.001	0.115	0.730
Flag	-7	F	176.15	3.56	1.390	0.620
		Prob	<0.001	0.015	0.246	0.600
	4	F	30.53	8.58	0.430	0.120
		Prob	<0.001	<0.001	0.731	0.948
	17	F	136.34	11.88	1.490	0.890
		Prob	<0.001	<0.001	0.219	0.448

		[DA]	Treatment			
			AC AT	AC ET	EC AT	EC ET
Penultimate	Φ_{max}	-22	0.681	0.704	0.694	0.717
		4	0.727	0.681	0.719	0.723
		17	0.740	0.729	0.714	0.699
	Initial slope	-22	-0.0014			
		4	-0.0010	-0.0009	-0.0011	-0.0017
		17	-0.0023			
Flag	Φ_{max}	-7	0.703	0.706	0.709	0.694
		4	0.693	0.690	0.708	0.717
		17	0.741	0.699	0.723	0.729
	Initial slope	-7	-0.0009			
		4	-0.0010			
		17	-0.0023			

Chl content: The effect of EC on the Chl contents of the penultimate leaf (Fig. 5) was positive in the first sampling, while later it was reversed. In contrast, at the beginning of flag leaf growth, EC decreased Chl contents and increased the Chl *a/b* ratios, suggesting a relative decrease in the light-harvesting complex. At later dates, EC still decreased Chl contents, but the decreases in these contents over time were smaller than with AC. These effects of EC were concurrent with a slight but significant decrease in the Chl *a/b* ratio, pointing to an increase in

the light-harvesting complex. The RuBPCO protein : Chl ratio decreased under EC throughout development in the penultimate leaf (Fig. 5), while in the flag leaf it initially increased, and then decreased at later stages of development. In the penultimate leaf at the end of development, and in the flag leaf in the last two samplings, ET decreased Chl contents in plants grown under AC (Fig. 5), while it had no effect, or the effect was positive, at EC.

Discussion

In measurements with AC, the penultimate and flag leaves displayed different responses of P_N and Φ_{max} to increases in CO_2 and temperature. Thus, EC and ET caused an early enhancement, followed by an inhibition, of both parameters in the penultimate leaf. In contrast, EC and ET did not induce early increases in P_N and Φ_{max} in the flag leaf, or later changes in photosynthesis, while they enhanced Φ_{max} during the intermediate and late stages of development. Varying degrees of development in both kinds of leaves at the sampling times can not account for the difference between them, first, in the responses of P_N , since in this case the stimulation found in the penultimate leaf in the first sampling (later growth stage than in the flag leaf) should be observed at intermediate stages of growth of the flag leaf. Second, the first measurement of Φ_{max} was carried out at comparable developmental stages in both leaves. The early P_N and Φ_{max} enhancements in the penultimate leaf, but not the flag leaf, resemble the increase in growth due to EC observed in young plants, which later disappears (Geiger *et al.* 1998). Similarly, the late acclimation of photosynthesis in the penultimate leaf, but not the flag leaf, is consistent with the results of Osborne *et al.* (1998), although flag leaf photosynthesis may be down-regulated by growth EC (Martínez-Carrasco *et al.* 2005).

The observed differences between penultimate and flag leaves in the response to CO_2 and temperature of irradiance-saturated P_N were not closely associated with the responses to these factors of the amount and *in vitro* activity of RuBPCO. This may be due to changes in the activation state of RuBPCO under high irradiance relative to the growth irradiance at which leaves were sampled, as observed previously (Osborne *et al.* 1998, Martínez-Carrasco *et al.* 2005). Growth EC increased enzyme activation in the *in vitro* assay in the flag, but not penultimate leaf. This increase in activation, which has been observed previously (Pérez *et al.* 2005), compensates in part the decrease in total activity and amount of RuBPCO at EC. The stronger activation of the enzyme under growth EC could be due to an increase in RuBPCO activase, although in tobacco this was observed only in plants not undergoing marked acclimation to EC (Geiger *et al.* 1999). Another difference between consecutive leaves was in the response to EC and ET of RuBPCO specific activity. Decreases in the specific activity of RuBPCO previously observed under similar environmental conditions have been attributed (Pérez *et al.* 2005) to the presence in wheat and other plants of a day-time inhibitor(s) (Keys *et al.* 1995, Parry *et al.* 1997). An accumulation of precursor metabolites could increase the contents of the RuBPCO inhibitor (Andralojc *et al.* 2002). We have previously found that EC increases, and ET decreases, the contents of metabolites, which also decrease as leaves age (Pérez *et al.* 2005). This may account for a more marked decrease in specific activity under EC

at AT in the flag than penultimate leaf. It may also explain that EC combined with ET increased RuBPCO specific activity in flag leaves, but not in the penultimate ones. EC also increased content of RuBPCO protein relative to soluble protein early on in growth of the flag leaf; a similar increase in penultimate leaves prior to the first sampling cannot be excluded. At later stages,

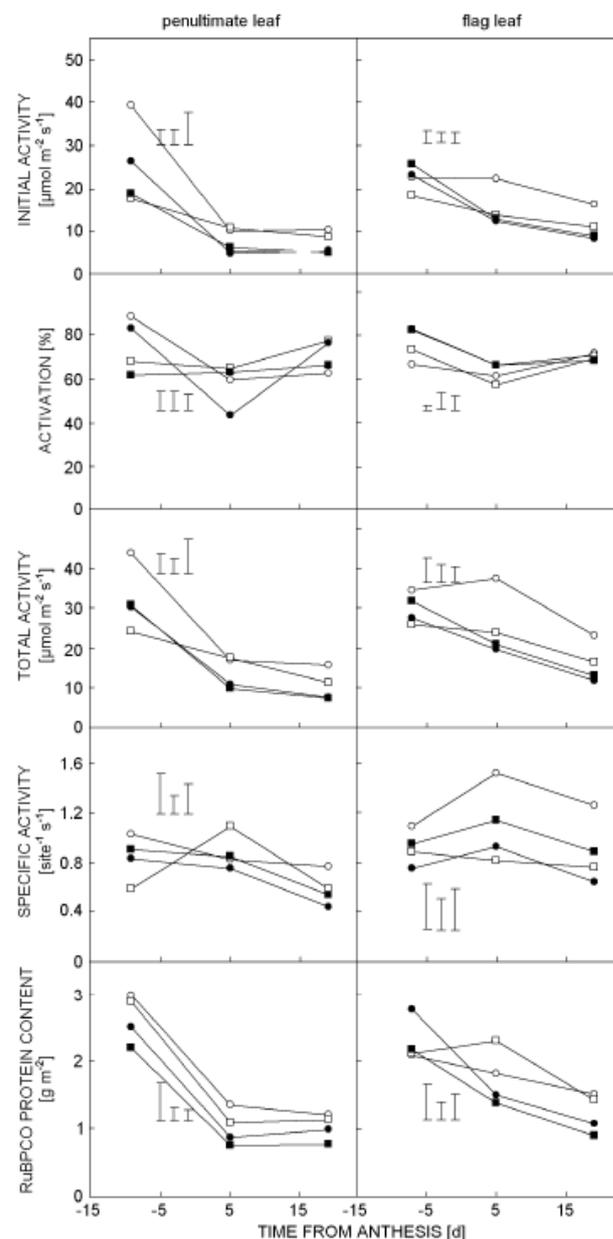


Fig. 3. *In vitro* activity, activation state, and specific activity of RuBPCO, and RuBPCO protein content at various dates from anthesis in leaves in different positions in the stem of wheat grown at 360 or 700 $\mu mol mol^{-1} CO_2$ and ambient or ambient + 4 °C temperatures, at various dates from the start of anthesis. Symbols as in Fig. 1.

this was followed in both kinds of leaves by a down-regulation of RuBPCO activity and protein content with CO₂ enrichment, as observed in many previous studies

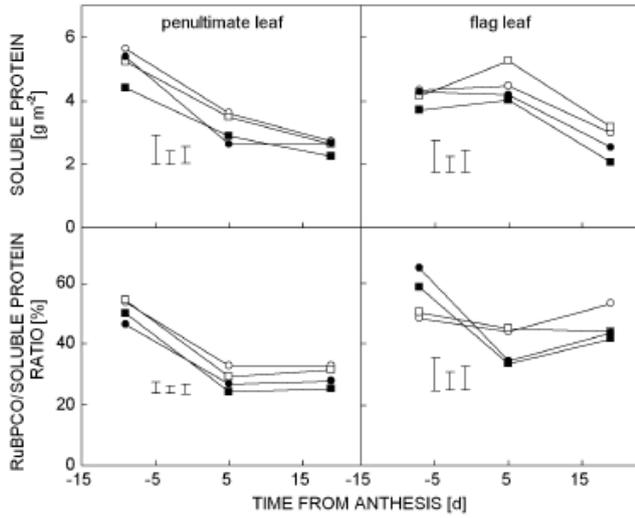


Fig. 4. Soluble protein contents and percent ratio of RuBPCO to soluble protein in leaves in different positions in the stem of wheat grown at 360 or 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ CO₂ and ambient or ambient + 4 °C temperatures at different dates from the start of anthesis. Symbols as in Fig. 1.

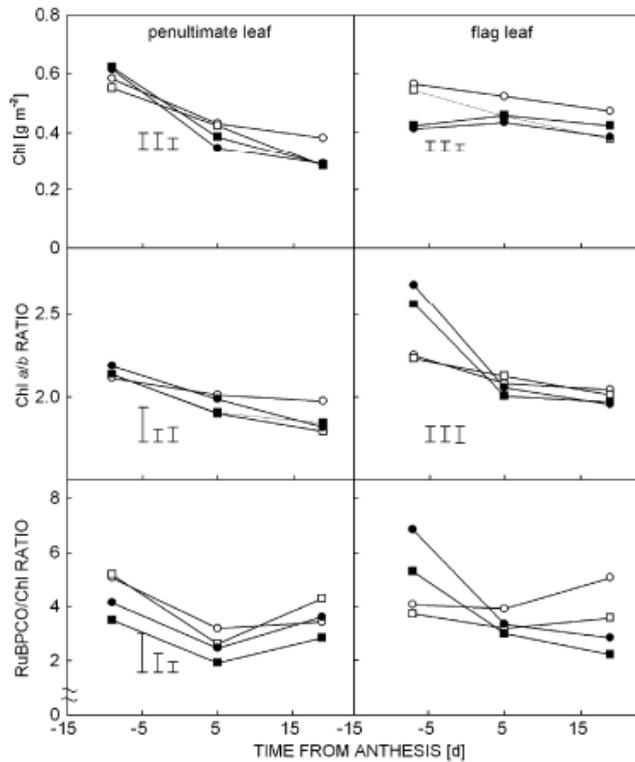


Fig. 5. Chlorophyll (Chl) content, the Chl *a/b* and RuBPCO protein : Chl ratios (m : m) in leaves in different positions in the stems of wheat grown at 360 or 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ CO₂ at ambient or ambient + 4 °C temperatures at different dates from the start of anthesis. Symbols as in Fig. 1.

(Nie *et al.* 1995, Drake *et al.* 1997, Stitt and Krapp 1999, Pérez *et al.* 2005), which is consistent with an earlier decrease in leaf protein under EC (Stitt and Krapp 1999).

The increases with EC in Φ_{max} at the beginning of growth of the penultimate, but not the flag, leaf may be related to the increases in Chl contents in the former, and its decreases in the latter and, in the flag leaf, with decreases in the light-harvesting complex, as indicated by higher Chl *a/b* ratios. EC also had different effects on the photochemistry of both leaves at the later stages of growth, with decreases in Φ_{max} in penultimate leaves and increases in it in flag leaves, concurrent with decreases in Chl contents in both leaves, although with an increase in the light-harvesting antenna (decreased Chl *a/b* ratio) in the flag leaf.

Notably, an increase in temperature by 4 °C decreased Chl contents at later stages of growth in both kinds of leaves at AC, though not at EC; the response of Φ_{max} in the flag leaf was similar. This interaction is consistent with the observation by Taub *et al.* (2000) of a protection by EC of lesions in photochemistry caused by high temperatures. Several mechanisms increasing thermostability have been reported, such as the synthesis of zeaxanthin (Havaux 1998), or the increase in contents of saturated fatty acids (Alfonso *et al.* 2001). Significantly, EC decreases lipid unsaturation (Huang *et al.* 1999).

The effects on Φ_{max} and Chl contents, together with the changes in P_N , RuBPCO content, and the RuBPCO : Chl ratios suggest that EC increases the allocation of resources from carboxylation to light-harvesting in penultimate leaves. In flag leaves, the effects of EC are indicative of an increase in the allocation of resources to carboxylation early on in leaf growth, followed later by a shift towards higher photon harvesting and lower carboxylation. The observed alterations in the balance between RuBPCO and electron transport caused by growth EC are not consistent with some reports (Sage *et al.* 1995, Nakano *et al.* 1997), but are in agreement with those of Makino *et al.* (1997), Osborne *et al.* (1998), and Mitchell *et al.* (2000). The functional significance of these effects may be that under EC RuBPCO may be less necessary (Makino *et al.* 1997), so that greater allocation of resources to excitation energy capture would represent an optimisation of resource use. However, EC actually decreased Φ_{max} later in the growth of penultimate leaves, in which an increased balance of light reactions to carboxylation would seem more advantageous because these leaves gradually become shaded. On the other hand, the biochemical models of leaf photosynthesis (Farquhar *et al.* 1980, Humphries and Long 1995) predict that EC should allow higher rates of photon-limited photosynthesis to be maintained even with substantial losses in the potential rate of electron transport. Thus, the response of the shaded penultimate leaf to CO₂ enrichment would be adaptive.

Higher contents of protein (Fig. 4) and Chl (Fig. 5) in the first sampling, and lower contents in the successive

ones were found in the penultimate leaf (delayed first sampling) as compared with the flag leaf. This leads to the conclusion that a different availability of resources for leaf growth and function during development would be the cause of the contrasting responses to EC between the two kinds of leaves, both in P_N and Φ_{max} . EC increases the N content in young N-sufficient plants, but not in older plants (Geiger *et al.* 1998). In field crops, N uptake

frequently lags behind growth (Olesen *et al.* 2002), so that N and protein contents decrease with time and also in successive leaves at comparable stages of leaf development. Competition with stem elongation and ear growth in the warm Mediterranean environment of our experiments (see Introduction) may also contribute to lower resource contents early on in the growth of flag leaves than in penultimate leaves.

References

- Adam, N.R., Wall, G.W., Kimball, B.A., Pinter, P.J., Jr., LaMorte, R.L., Hunsaker, D.J., Adamsen, F.J., Thompson, T., Matthias, A.D., Leavitt, S.W., Webber, A.N.: Acclimation response of spring wheat in a free-air CO₂ enrichment (FACE) atmosphere with variable soil nitrogen regimes. 1. Leaf position and phenology determine acclimation response. – *Photosynth. Res.* **66**: 65-77, 2000.
- Alfonso, M., Yruela, I., Almárcegui, S., Torrado, E., Pérez, M.A., Picorel, R.: Unusual tolerance to high temperatures in a new herbicide resistant D1 mutant from *Glycine max* (L.) Merr. cell cultures deficient in fatty acid desaturation. – *Planta* **212**: 573-582, 2001.
- Andralojc, P.J., Keys, A.J., Kossmann, J., Parry, M.A.J.: Elucidating the biosynthesis of 2-carboxyarabinitol 1-phosphate through reduced expression of chloroplastic fructose 1,6-bisphosphate phosphatase and radiotracer studies with ¹⁴CO₂. – *Proc. nat. Acad. Sci. USA* **99**: 4742-4747, 2002.
- Aranjuelo, I., Pérez, P., Hernández, L., Irigoyen, J.J., Zita, G., Martínez-Carrasco, R., Sánchez-Díaz, M.: The response of nodulated alfalfa to water supply, temperature and elevated CO₂: photosynthetic downregulation. – *Physiol. Plant.* **123**: 348-358, 2005.
- Arnon, D.I.: Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. – *Plant Physiol.* **24**: 1-15, 1949.
- Bailey, S., Walters, R.G., Jansson, S., Horton, P.: Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to the light environment: the existence of separate low light and high light responses. – *Planta* **213**: 794-801, 2001.
- Drake, B.G., González-Meler, M.A., Long, S.P.: More efficient plants: A consequence of rising atmospheric CO₂? – *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant mol. Biol.* **48**: 609-639, 1997.
- Farquhar, G.D., Caemmerer, S. von, Berry, J.A.: A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C₃ species. – *Planta* **149**: 78-90, 1980.
- Geiger, M., Haake, V., Ludewig, F., Sonnewald, U., Stitt, M.: The nitrate and ammonium nitrate supply have a major influence on the response of photosynthesis, carbon metabolism, nitrogen metabolism and growth to elevated carbon dioxide in tobacco. – *Plant Cell Environ.* **22**: 1177-1199, 1999.
- Geiger, M., Walch-Liu, P., Engels, C., Harnecker, J., Schulze, E.D., Ludewig, F., Sonnewald, U., Scheible, W.R., Stitt, M.: Enhanced carbon dioxide leads to a modified diurnal rhythm of nitrate reductase activity in older plants, and a large stimulation of nitrate reductase activity and higher levels of amino acids in young tobacco plants. – *Plant Cell Environ.* **21**: 253-268, 1998.
- Golding, A.J., Johnson, G.N.: Down-regulation of linear and activation of cyclic electron transport during drought. – *Planta* **218**: 107-114, 2003.
- Havaux, M.: Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. – *Trends Plant Sci.* **3**: 147-151, 1998.
- Huang, Y., Eglinton, G., Ineson, P., Bol, R., Harkness, D.D.: The effects of nitrogen fertilisation and elevated CO₂ on the lipid biosynthesis and carbon isotopic discrimination in birch seedlings (*Betula pendula*). – *Plant Soil* **216**: 35-45, 1999.
- Humphries, S.W., Long, S.P.: WIMOVAC: A software package for modelling the dynamics of plant leaf and canopy photosynthesis. – *Comput. appl. Biosci.* **11**: 361-371, 1995.
- Hymus, G.J., Baker, N.R., Long, S.P.: Growth in elevated CO₂ can both increase and decrease photochemistry and photoinhibition of photosynthesis in a predictable manner. *Dactylis glomerata* grown in two levels of nitrogen nutrition. – *Plant Physiol.* **127**: 1204-1211, 2001.
- Hymus, G.J., Ellsworth, D.S., Baker, N.R., Long, S.P.: Does free-air carbon dioxide enrichment affect photochemical energy use by evergreen trees in different seasons? A chlorophyll fluorescence study of mature loblolly pine. – *Plant Physiol.* **120**: 1183-1191, 1999.
- Keys, A.J., Major, I., Parry, M.A.J.: Is there another player in the game of Rubisco regulation? – *J. exp. Bot.* **46**: 1245-1251, 1995.
- Lilley, R.McC., Walker, D.A.: An improved spectrophotometric assay for ribulosebisphosphate carboxylase. – *Biochim. biophys. Acta* **358**: 226-229, 1974.
- Long, S.P.: Modification of the response of photosynthetic productivity to rising temperature and atmospheric CO₂ concentrations: Has its importance been underestimated? – *Plant Cell Environ.* **14**: 729-739, 1991.
- Long, S.P., Hallgren, J.-E.: Measurement of CO₂ assimilation by plants in the field and in the laboratory. – In: Coombs, J., Hall, D.O., Long, S.P., Scurlock, J.M.O. (ed.): *Techniques in Bioproductivity and Photosynthesis*. 2nd Ed. Pp. 62-94. Pergamon Press, Oxford – New York – Toronto – Sydney – Frankfurt 1985.
- Makino, A., Shimada, T., Takumi, S., Kaneko, K., Matsuoka, M., Shimamoto, K., Nakano, H., Miyao-Tokutomi, M., Mae, T., Yamamoto, N.: Does decrease in ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by antisense *RbcS* lead to a higher N-use efficiency of photosynthesis under conditions of saturating CO₂ and light in rice plants? – *Plant Physiol.* **114**: 483-491, 1997.
- Markwell, J.P., Thornber, J.P., Boggs, R.T.: Higher plant chloroplasts: evidence that all the chlorophyll exists as chlorophyll-protein complexes. – *Proc. nat. Acad. Sci. USA* **76**: 1233-1235, 1979.
- Martín del Molino, I.M., Martínez-Carrasco, R., Pérez, P., Hernández, L., Morcuende, R., Sánchez de la Puente, L.: Influence of nitrogen supply and sink strength on changes in leaf nitrogen compounds during senescence in two wheat cultivars. – *Physiol. Plant.* **95**: 51-58, 1995.
- Martínez-Carrasco, R., Pérez, P., Morcuende, R.: Interactive effects of elevated CO₂, temperature and nitrogen on photosynthesis of wheat grown under temperature gradient tunnels.

- Environ. exp. Bot. **54**: 49-59, 2005.
- Mitchell, R.A.C., Theobald, J.C., Parry, M.A.J., Lawlor, D.W.: Is there scope for improving balance between RuBP-regeneration and carboxylation capacities in wheat at elevated CO₂? – J. exp. Bot. **51**: 391-397, 2000.
- Nakano, H., Makino, A., Mae, T.: The effect of elevated partial pressures of CO₂ on the relationship between photosynthetic capacity and N content in rice leaves. – Plant Physiol. **115**: 191-198, 1997.
- Nie, G.Y., Long, S.P., Garcia, R.L., Kimball, B.A., Lamorte, R.L., Pinter, P.J., Jr., Wall, G.W., Webber, A.N.: Effects of free-air CO₂ enrichment on the development of the photosynthetic apparatus in wheat, as indicated by changes in leaf proteins. – Plant Cell Environ. **18**: 855-864, 1995.
- Olesen, J.E., Berntsen, J., Hansen, E.M., Petersen, B.M., Petersen, J.: Crop nitrogen demand and canopy area expansion in winter wheat during vegetative growth. – Eur. J. Agron. **16**: 279-294, 2002.
- Osborne, C.P., Drake, B.G., LaRoche, J., Long, S.P.: Does long-term elevation of CO₂ concentration increase photosynthesis in forest floor vegetation? – Plant Physiol. **114**: 337-344, 1997.
- Osborne, C.P., LaRoche, J., Garcia, R.L., Kimball, B.A., Wall, G.W., Pinter, P.J., LaMorte, R.L., Hendrey, G.R., Long, S.P.: Does leaf position within a canopy affect acclimation of photosynthesis to elevated CO₂? Analysis of a wheat crop under free-air CO₂ enrichment. – Plant Physiol. **117**: 1037-1045, 1998.
- Parry, M.A.J., Andralojc, P.J., Parmar, S., Keys, A.J., Habash, D., Paul, M.J., Alfred, R., Quick, W.P., Servaites, J.C.: Regulation of Rubisco by inhibitors in the light. – Plant Cell Environ. **20**: 528-534, 1997.
- Pérez, P., Morcuende, R., Martín del Molino, I., Martínez-Carrasco, R.: Diurnal changes of Rubisco in response to elevated CO₂, temperature and nitrogen in wheat grown under temperature gradient tunnels. – Environ. exp. Bot. **53**: 13-27, 2005.
- Rascher, U., Liebig, M., Lüttge, U.: Evaluation of instant light-response curves of chlorophyll fluorescence parameters obtained with a portable chlorophyll fluorometer on site in the field. – Plant Cell Environ. **23**: 1397-1405, 2000.
- Rawson, H.M., Gifford, R.M., Condon, B.N.: Temperature gradient chambers for research on global environment change. I. Portable chambers for research on short-stature vegetation. – Plant Cell Environ. **18**: 1048-1054, 1995.
- Rogers, A., Fischer, B.U., Bryant, J., Frehner, M., Blum, H., Raines, C.A., Long, S.P.: Acclimation of photosynthesis to elevated CO₂ under low-nitrogen nutrition is affected by the capacity for assimilate utilisation. Perennial ryegrass under free-air CO₂ enrichment. – Plant Physiol. **118**: 683-689, 1998.
- Sage, R.F.: Acclimation of photosynthesis to increasing atmospheric CO₂: The gas exchange perspective. – Photosynth. Res. **39**: 351-368, 1994.
- Sage, R.F., Santrucek, J., Grise, D.J.: Temperature effects on the photosynthetic response of C₃ plants to long-term CO₂ enrichment. – Vegetatio **121**: 67-77, 1995.
- Sharkey, T.D., Savitch, L.V., Butz, N.D.: Photometric method for routine determination of k_{car} and carbamylation of rubisco. – Photosynth. Res. **28**: 41-48, 1991.
- Snedecor, G.W., Cochran, W.G.: Statistical Methods. 6th Ed. – Iowa State University Press, Ames 1967.
- Stitt, M., Krapp, A.: The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. – Plant Cell Environ. **22**: 583-621, 1999.
- Taub, T.R., Seemann, J.R., Coleman, J.S.: Growth in elevated CO₂ protects photosynthesis against high-temperature damage. – Plant Cell Environ. **23**: 649-656, 2000.
- White, A.J., Critchley, C.: Rapid light curves: A new fluorescence method to assess the state of the photosynthetic apparatus. – Photosynth. Res. **59**: 63-72, 1999.

Down-regulation of Rubisco activity under combined increases of CO₂ and temperature minimized by changes in Rubisco k_{cat} in wheat

Pilar Pérez · Aitor Alonso · Gloria Zita · Rosa Morcuende · Rafael Martínez-Carrasco

Received: 10 January 2011 / Accepted: 7 July 2011
© Springer Science+Business Media B.V. 2011

Abstract Increases in growth temperature have been observed to affect photosynthesis differently under long-term exposure to ambient- and twice ambient-air CO₂ concentrations. This study investigates the causes of this interaction in wheat (*Triticum aestivum* L.) grown in the field over two consecutive years under temperature gradient chambers in ambient (370 μmol mol⁻¹) or elevated (700 μmol mol⁻¹) atmospheric CO₂ concentrations and at ambient or ambient +4°C temperatures, with either a low or a high nitrogen supply. The photosynthesis-internal CO₂ response curves and the activity, activation state, k_{cat} and amount of Ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) were measured, as well as the soluble protein concentration in flag leaves at ear emergence and 8–15 days after anthesis. A high nitrogen supply increased V_{cm_{max}}, the Rubisco amount and activity and soluble protein contents, but did not significantly change the Rubisco k_{cat}. Both elevated CO₂ and above ambient temperatures had negative effects on V_{cm_{max}} and Rubisco activity, but at elevated CO₂, an increase in temperature did not decrease V_{cm_{max}} or Rubisco activity in relation to ambient temperature. The amounts of Rubisco and soluble protein decreased with elevated CO₂ and temperature. The negative impact of elevated CO₂ on Rubisco properties was somewhat counteracted at elevated temperatures by an

increase in k_{cat}. This effect can diminish the detrimental effects on photosynthesis of combined increases of CO₂ and temperature.

Keywords *Triticum aestivum* · Climate change · Elevated CO₂ · Elevated temperature · Photosynthetic acclimation · Rubisco · Rubisco k_{cat}

Abbreviations

J_{max} Maximum rate of photosynthetic electron transport
RuBP Ribulose-1, 5-bisphosphate
V_{cm_{max}} Maximum Rubisco-limited rate of carboxylation

Introduction

Nitrogen supply (Schulze et al. 1994; Lawlor et al. 1989), temperature (Ford and Thorne 1975; Delgado et al. 1994; Ainsworth and Ort 2010) and atmospheric CO₂ concentration (Long et al. 2004) are factors that greatly affect plant productivity and photosynthesis. Continued emissions of CO₂ into the atmosphere stimulate photosynthesis because Ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) is not substrate-saturated at current atmospheric CO₂ concentrations, and oxygenation is inhibited (Long et al. 2004). This enhancement, however, diminishes over time (days to years), a phenomenon known as CO₂ acclimation or down-regulation of photosynthesis. The most pronounced change in the photosynthetic apparatus with prolonged growth in elevated atmospheric CO₂ is a decrease in Rubisco activity and amount (Long et al. 2004). This is often associated with decreased expression of genes

P. Pérez (✉) · A. Alonso · G. Zita · R. Morcuende · R. Martínez-Carrasco
Institute of Natural Resources and Agrobiological of Salamanca, IRNASA-CSIC, Apartado 257, 37071 Salamanca, Spain
e-mail: pilar.perez@imasa.csic.es

Present Address:
G. Zita
Departamento de Ciencias Agrícolas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

encoding the small subunit of Rubisco (*rbcS*) (Drake et al. 1997; Moore et al. 1999). Other studies suggest a strong link between the decrease in Rubisco protein under elevated CO₂ and the plant nitrogen status (Riviere-Rolland et al. 1996; Nakano et al. 1997; Farage et al. 1998; Geiger et al. 1999; Ellsworth et al. 2004; Pérez et al. 2005). Acclimation of photosynthesis to elevated CO₂ is usually more marked in nitrogen-limited plants than in well-fertilized plants (Webber et al. 1994; Drake et al. 1997; Farage et al. 1998; Stitt and Krapp 1999). Acclimation of photosynthesis at low nitrogen has been viewed as an indirect effect resulting from the nitrogen limitation of the development of sinks for photoassimilate (Rogers et al. 1998). We have previously reported that atmospheric CO₂ enrichment combined with nitrogen abundance reversed or prevented the diurnal increase in Rubisco k_{cat} observed in wheat plants grown in ambient CO₂ concentrations, which was attributed to a slow release of an inhibitor from the enzyme (Pérez et al. 2005).

The rise in atmospheric CO₂ concentration will increase temperature by 1.5°C–6°C (Schneider 1992), or by 2.5°C–4.3°C, according to the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) A1B scenario (Christensen et al. 2007). Photosynthesis is most sensitive to inhibition by elevated temperatures, with inhibition occurring at temperatures only slightly higher than those optimal for growth (Salvucci 2008). Decreased discrimination by Rubisco for oxygen and increased solubility of oxygen relative to CO₂ with rising temperatures inhibit net photosynthesis in C₃ plants due to increased photorespiration (Long 1991; Ainsworth and Ort 2010).

Relevant information has been provided by studies on plant responses to separate increases in CO₂ and temperature. However, plant responses to combined increases of CO₂ and temperature have received relatively less attention, particularly in cereals. Research on climate change should include interactions of both environmental factors. An interactive effect of elevation of temperature and CO₂ can be expected because the inhibition of oxygenation by rising atmospheric CO₂, and hence an increase in net photosynthesis, will have its greatest effects where oxygenation is greater, namely, at higher temperatures (Long 1991). It has been reported that temperature increases have variable effects on the photosynthesis response to rising CO₂, with positive effects in soybean (Vu et al. 1997), no effect in several British native species from different functional groups (Stirling et al. 1997), rice (Vu et al. 1997), or *Taraxacum officinale* (Bunce 2000), and negative effects in peanut (Vu 2005) and *Poa annua* (Stirling et al. 1997). Soybean leaves showed an increasing stimulation of photosynthesis by CO₂ as growth temperature increased from 25°C to 35°C (Ziska and Bunce 1997). The enhancement of photosynthesis by CO₂ in *Albutilon*

theophrasti was greater at low measurement temperatures for plants grown at low temperatures, and vice versa for plants grown and measured at high temperatures, indicating that long-term adjustments in V_{cmax} and J_{max} occurred (Ziska 2001). Furthermore, in *Medicago sativa*, the CO₂ stimulation of photosynthesis was suppressed at 30°C growth temperatures (Ziska and Bunce 1994). We have previously shown that warmer growth temperatures did not modify the photosynthesis response to measurement temperatures from 20 to 35°C, while growth in elevated CO₂ enhanced the response of both photosynthesis and Rubisco activity to temperature (Alonso et al. 2008).

Our previous studies conducted on field crops of wheat over four different years, using temperature gradient chambers, have shown that down-regulation of photosynthesis caused by elevated CO₂ was smaller at 4°C above ambient temperatures with a high nitrogen supply (del Pozo et al. 2005; Martínez-Carrasco et al. 2005). Photosynthesis rates at 370 and 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ CO₂ reported in these studies did not shed light on the reasons for the beneficial interaction between elevated CO₂ and warmer temperatures. In this study, the main objective was to assess whether the effects of combined increases in CO₂ and temperature could be due to changes in RuBP regeneration or in Rubisco carboxylation, determined in vivo from photosynthesis—CO₂ response curves. Furthermore, the activity, activation state, k_{cat} and abundance of the enzyme, together with the amount of soluble protein, were determined in order to evaluate possible changes in Rubisco.

Materials and methods

Experimental setup

The details of this 2-year experiment have been described elsewhere (del Pozo et al. 2005). Briefly, wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Alcalá) was sown in the field in January–February in two consecutive years. The experiment site (40° 95' N, 5° 5' W, 800 m a.s.l.) has a clay-sand soil. The climate is Mediterranean. The long-term (20 year) average for the minimum temperature in the coldest month (January) is 0.0°C and the maximum temperature for the warmest month (July) is 27.2°C. Mean annual rainfall is 506 mm.

After emergence, two temperature gradient chambers were placed on the crop on different field sites each year. The chambers were adapted from Rawson et al. (1995) and have been described previously (Pérez et al. 2005; Aranjuelo et al. 2005). The chambers were 9 m long, 2.2 m wide and 1.7 m high at the ridge, with a polyethylene sheet roof, rigid

polycarbonate walls and containing three longitudinal modules separated by slotted polycarbonate septa to reduce the mixing of air between modules through convection. Inlet fans and outlet fans and heaters kept the inlet module at temperatures similar to those outside, and the final outlet module at a temperature 4°C higher, whilst the central module was left as a spacer. One chamber was kept at ambient CO₂ (370 μmol mol⁻¹), while in the other CO₂ was increased to 700 μmol mol⁻¹ (elevated CO₂) by injecting pure CO₂ at the two inlet fans during daylight hours. Since there appear to be no or only minor positive (Davey et al. 2004) direct effects of growth CO₂ on leaf dark respiration, with reports in the literature even suggesting these might be attributed to experimental artefacts (Jahnke and Krewitt 2002), the lack of CO₂ enrichment during the night is probably irrelevant. In addition, two amounts of nitrogen (ammonium nitrate) were applied to the longitudinal halves of the chambers; these were 52 and 122 kg ha⁻¹ in the first year and none and 70 kg ha⁻¹ in the second, when fertilizer was applied 22 days later than in the first year (2 and 30 April for the first and second year, respectively). The crop was watered weekly through a drip irrigation system providing the average rainfall in the area during the period of the experiment (198 mm). Light intensity inside the tunnels was 89 ± 3% that outside. CO₂ concentration and temperature in the chambers were very close to set values (del Pozo et al. 2005).

Gas exchange measurements

The photosynthesis-internal CO₂ concentration response curves were measured in flag leaves at ear emergence and 8–15 days after anthesis in both years. An infrared gas analyser (CIRAS-2, PP Systems, Hitchin, Herts., UK) was used with differential operation in an open system. Measurements were taken from 3 to 8 h after the start of the photoperiod using a leaf chamber with a 1.7 cm² window, 300 ml min⁻¹ air flow rate, 1,500 μmol m⁻² s⁻¹ irradiance, 25°C and 1.6 ± 0.23 kPa vapour pressure deficit. CO₂ concentrations were increased in steps from 60 to 1,900 μmol mol⁻¹. Four consecutive areas of equal length were marked out in the three-metre long chamber modules, with a leaf randomly chosen from each area being measured. A replicate leaf from each treatment was measured before the next leaf, with treatments in random order, so that differences during the day could be absorbed within the replicated leaves. V_{max} and J_{max} were estimated from the response of photosynthesis to intercellular CO₂ concentration in leaves using the model proposed by Farquhar et al. (1980), with the help of the Photosynthesis Assistant software (<http://www.scientific.force9.co.uk>).

Rubisco activity

At mid-morning on the photosynthesis measurement dates, four leaves from each of the four sampling areas in a treatment plot were harvested and rapidly plunged in situ into liquid nitrogen and then stored at -80°C until analysed. The fresh weight, leaf area and chlorophyll content of sub-samples of frozen leaves were determined as described (Pérez et al. 2005). This allowed the results to be expressed on a leaf area basis.

Rubisco (EC 4.1.1.39) activity before (initial activity) and after (total activity) active site carbamylation was assayed at 23°C by a spectrophotometric procedure coupled to NADH oxidation (Pérez et al. 2005). Rubisco activation was estimated as the percent ratio of initial to total activities for each sample. The amounts of soluble protein and Rubisco in frozen sub-samples were measured after extraction, spectrophotometric analysis and gel electrophoresis followed by densitometry, using BSA as protein standard, as described (Aranjuelo et al. 2005). To calculate the molar concentration of Rubisco subunits, molecular masses of 52 and 15 kDa were assumed for the large and small subunits, respectively. The k_{cat} of Rubisco was determined for each sample by dividing total activity by the number of moles of active sites, which was taken as equivalent to the moles of the large Rubisco subunit. This would include any Rubisco site bound to inhibitors and would yield low k_{cat} as compared to methods determining free Rubisco sites (Sharkey et al. 1991).

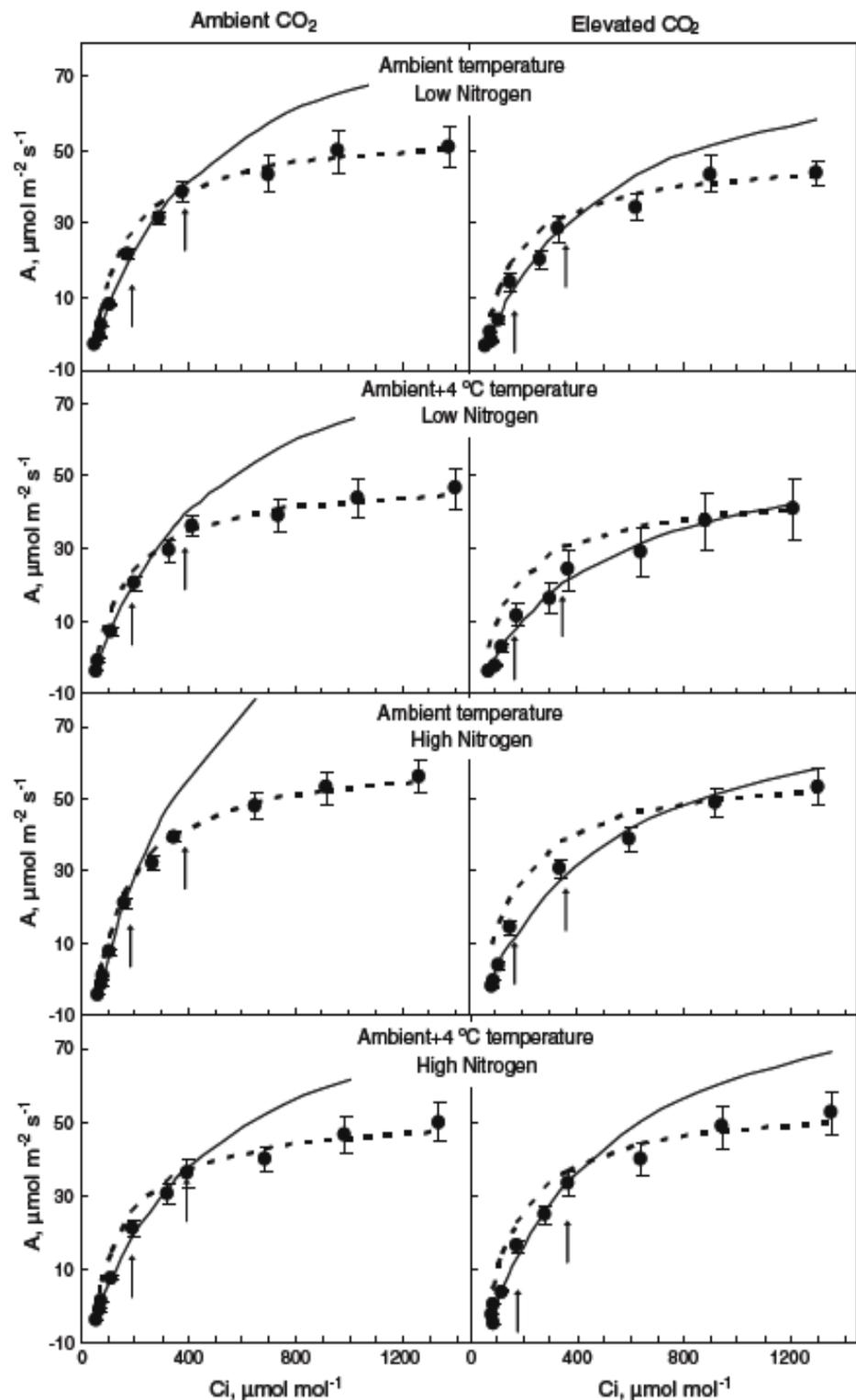
Statistical analyses

The experiment was analysed as a randomized-block strip-plot design, with year as the blocking factor, CO₂ allocated to whole-plots within blocks, temperature and nitrogen allocated, respectively, to rows and columns within whole-plots, and sampling date in a subplot stratum within rows and columns. The variance was estimated using the method of residual maximum likelihood (REML; Genstat 6.2). As there were only two blocks, the threshold for significance was chosen as *P* < 0.055 to avoid the possibility of a Type II error.

Results

The effects of elevated CO₂, temperature and nitrogen supply plus sampling date on photosynthesis and Rubisco characteristics were analyzed. In a previous article (del Pozo et al. 2005), we have shown that photosynthesis rates measured at 370 and 700 μmol mol⁻¹ CO₂ were decreased by growth in elevated CO₂. The photosynthesis-internal CO₂ response curves for each treatment combination

Fig. 1 Photosynthesis-intercellular CO_2 concentration response curves in flag leaves of wheat grown in the field under temperature gradient chambers with ambient ($370 \mu\text{mol mol}^{-1}$) or elevated ($700 \mu\text{mol mol}^{-1}$) CO_2 , ambient or ambient +4°C temperatures, and high or low nitrogen supply. The lines represent rates of Rubisco-limited (solid lines) and RuBP regeneration-limited (broken lines) carboxylation, fitted using the functions of Farquhar et al. (1980). Mean values for two sampling dates (ear emergence and 8–15 days after anthesis) and for 2 years. Each point is the mean of 16 samples. Arrows represent intercellular CO_2 concentrations corresponding to measurement air CO_2 levels of 370 and $700 \mu\text{mol mol}^{-1}$



averaged over years and sampling dates (Fig. 1) show that in plants grown in ambient CO_2 photosynthesis with intercellular CO_2 concentrations of 182 ± 36 and $383 \pm 77 \mu\text{mol mol}^{-1}$ (corresponding to air CO_2 levels of 370 and $700 \mu\text{mol mol}^{-1}$, respectively) was limited by Rubisco and RuBP regeneration, respectively. By comparison, photosynthesis at the respective intercellular CO_2 concentrations of 166 ± 29 and $352 \pm 39 \mu\text{mol mol}^{-1}$ in plants

grown in elevated CO_2 was limited by Rubisco activity. The reported effects on photosynthesis measured at ambient or elevated CO_2 (del Pozo et al. 2005) induced by CO_2 enrichment or by combined increases in CO_2 and temperature were therefore due to changes in Rubisco activity.

Elevated CO_2 did not change the gas exchange-determined J_{max} (Tables 1, 2), while it significantly decreased V_{cmax} , initial and total Rubisco activities (Table 3), and

Table 1 REML analysis (χ^2 probability) for J_{\max} , V_{\max} , activity, activation, content and k_{cat} of Rubisco, and soluble protein concentration in flag leaves of wheat grown in the field under temperature gradient chambers with ambient ($370 \mu\text{mol mol}^{-1}$) or elevated ($700 \mu\text{mol mol}^{-1}$) CO_2 , ambient or ambient $+4^\circ\text{C}$ temperatures, and high or low nitrogen supply, at ear emergence and 8–15 days after anthesis

	J_{\max} , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	V_{\max} , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Initial Rubisco activity, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Rubisco activation, %	Total Rubisco activity, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Rubisco protein $\mu\text{mol m}^{-2}$	Rubisco, % soluble protein	Soluble protein, g m^{-2}	k_{cat} , s^{-1}
CO_2 (C)	0.631	0.005	< 0.001	0.053	< 0.001	0.054	0.002	< 0.001	0.119
Temperature (T)	0.028	< 0.001	0.005	0.847	0.098	0.01	0.337	0.043	0.011
Nitrogen (N)	0.032	0.012	< 0.001	0.024	< 0.001	< 0.001	0.067	0.014	0.893
Date (D)	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.22	< 0.001	< 0.001	0.049	< 0.001	0.218
C.T	0.163	0.581	0.003	0.761	0.102	0.966	0.827	0.863	0.032
C.N	0.556	0.903	0.435	0.157	0.931	0.939	0.326	0.879	0.745
T.N	0.279	0.088	0.697	0.678	0.61	0.537	0.219	0.934	0.716
C.D	0.078	0.167	0.063	0.346	0.899	0.987	0.004	0.737	0.983
T.D	0.171	0.276	0.365	0.909	0.591	0.395	0.175	0.522	0.357
N.D	0.01	0.655	0.164	0.952	0.317	0.111	0.554	0.243	0.546
C.T.N	0.639	0.238	0.322	0.783	0.535	0.591	0.249	0.892	0.233
C.T.D	0.415	0.918	0.587	0.897	0.884	0.956	0.675	0.852	0.687
C.N.D	0.15	0.604	0.351	0.543	0.377	0.752	0.44	0.752	0.641
T.N.D	0.083	0.987	0.852	0.981	0.729	0.752	0.27	0.909	0.891
C.T.N.D	0.035	0.431	0.203	0.873	0.624	0.936	0.383	0.921	0.793

Mean values for 2 years. Numbers in bold represent significant effects ($P < 0.055$)

Table 2 Photosynthetic parameters J_{\max} and V_{\max} in flag leaves of wheat grown in the field under temperature gradient chambers with ambient ($370 \mu\text{mol mol}^{-1}$) or elevated ($700 \mu\text{mol mol}^{-1}$) CO_2 , ambient (T) or ambient $+4^\circ\text{C}$ (T+4) temperatures, and high or low nitrogen supply

		J_{\max} , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	V_{\max} , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
CO_2 (C)	Amb. CO_2	426.2	121.3
	Elev. CO_2	431.8	102.4
	SED	11.60	6.75
Temperature (T)	T	463.3	119.7
	T+4	394.7	104.0
	SED	31.20	4.61
Nitrogen (N)	Low N	395.5	106.1
	High N	462.5	117.7
	SED	31.20	4.61
Date (D)	Ear emergence	476.4	122.1
	After anthesis	381.6	101.6
	SED	23.03	4.82
Leaves were measured at ear emergence and 8–15 days after anthesis. Only significant interactions are shown. Mean values for 2 years SED standard error of the difference between means	Nitrogen. Date (N·D)	Low N· Ear emer.	413.2
		Low N· After anth.	377.9
		High N· Ear emer.	539.7
		High N· After anth.	385.2
		SED	36.71

Rubisco activation. Rubisco protein contents (Table 4) significantly decreased in elevated CO_2 , and total soluble protein had a similar response to CO_2 . As a fraction of soluble protein, Rubisco was similar with both CO_2 levels at ear emergence, while it was lower with elevated rather than ambient CO_2 after anthesis (Tables 1, 4). This

pointed to a specific decrease with time of Rubisco in elevated CO_2 . In ambient, but not high temperature, elevated CO_2 decreased Rubisco k_{cat} (Table 3).

Warmer temperatures had no significant effects on photosynthesis measured at 370 or $700 \mu\text{mol mol}^{-1}$, probably because they increased stomatal conductance

Table 3 Rubisco activity, activation and k_{cat} in flag leaves of wheat grown in the field under temperature gradient chambers with ambient ($370 \mu\text{mol mol}^{-1}$) or elevated ($700 \mu\text{mol mol}^{-1}$) CO_2 , ambient (T) or ambient $+4^\circ\text{C}$ (T+4) temperatures, and high or low nitrogen supply

		Initial Rubisco activity $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	Total Rubisco activity $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	Rubisco activation (%)	k_{cat} , s^{-1}
CO_2 (C)	Amb. CO_2	45.73	58.95	78.64	1.47
	Elev. CO_2	27.95	39.23	74.88	1.35
	SED	4.56	4.50	1.94	0.075
Temperature (T)	T	39.11	51.69	77.04	1.31
	T+4	34.57	46.49	76.48	1.51
	SED	1.62	ns	ns	0.077
Nitrogen (N)	Low N	33.02	41.54	80.05	1.41
	High N	40.66	56.64	73.48	1.40
	SED	1.62	3.15	2.91	0.077
Date (D)	Ear emergence	46.19	63.24	73.7	1.35
	After anthesis	27.5	34.95	79.82	1.47
	SED	1.37	4.02	ns	0.101
CO_2 ·Temp (C·T)	Amb CO_2 · T	50.45			1.45
	Amb CO_2 · T+4	41.02			1.48
	Elev. CO_2 · T	27.77			1.17
	Elev. CO_2 · T+4	28.13			1.53
	SED	3.995			0.108

Leaves were measured at ear emergence and 8–15 days after anthesis. Only significant interactions are shown

Mean values for 2 years. *SED* standard error of the difference between means, *ns* not significant

Table 4 Soluble and Rubisco protein contents, and Rubisco as a percentage of soluble protein in flag leaves of wheat grown in the field under temperature gradient chambers with ambient ($370 \mu\text{mol mol}^{-1}$) or elevated ($700 \mu\text{mol mol}^{-1}$) CO_2 , ambient (T) or ambient $+4^\circ\text{C}$ (T+4) temperatures, and high or low nitrogen supply

		Soluble protein g m^{-2}	Rubisco protein $\mu\text{mol m}^{-2}$	Rubisco % soluble protein
CO_2 (C)	Amb CO_2	6.08	5.25	36.81
	Elev. CO_2	4.79	3.90	33.06
	SED	0.26	0.70	1.23
Temperature (T)	T	6.09	5.12	34.13
	T+4	4.79	4.03	35.74
	SED	0.64	0.43	ns
Nitrogen (N)	Low N	4.65	3.84	33.40
	High N	6.22	5.31	36.48
	SED	0.64	0.43	ns
Date (D)	Ear emergence	7.37	6.07	33.53
	After anthesis	3.50	3.08	36.34
	SED	0.69	0.70	1.43
CO_2 ·Date (C·D)	Amb. CO_2 · Ear emer.			33.36
	Amb. CO_2 · After anth.			40.26
	Elev. CO_2 · Ear emer.			33.70
	Elev. CO_2 · After anth.			32.42
	SED			1.93

Leaves were measured at ear emergence and 8–15 days after anthesis. Only significant interactions are shown

Mean values for 2 years. *SED* standard error of the difference between means, *ns* not significant

(del Pozo et al. 2005). Above-ambient temperatures decreased J_{max} (Tables 1, 2) and V_{cmax} , except with high nitrogen and elevated CO_2 (non-significant interactions). Initial Rubisco activity (Tables 1, 3) decreased as the temperature increased under ambient CO_2 , but not under

elevated CO_2 ; total Rubisco activity followed the same trend, although it did not reach statistical significance. Rubisco protein contents significantly decreased with above-ambient temperatures (Table 4). Therefore, a temperature increase under elevated CO_2 did not decrease

activity, but reduced the amount of Rubisco. Warmer temperatures also decreased total soluble protein contents (Table 4) and did not affect Rubisco as a percentage of soluble protein, which suggested that temperature effects on Rubisco protein were due to an alteration of soluble protein contents, rather than being a specific change in this enzyme. Rubisco k_{cat} (Table 3) increased with temperature under elevated CO_2 , but not under ambient CO_2 .

A high nitrogen supply generally increased photosynthesis (del Pozo et al. 2005). In turn, J_{max} (Tables 1, 2) was higher with a high rather than a low nitrogen supply at anthesis, but the difference disappeared 8–15 days later. V_{cmax} (Table 2), initial and total Rubisco activities (Table 3), as well as Rubisco and soluble protein contents (Table 4), increased with nitrogen supply, but enzyme activation (Table 3) was reduced with high rather than low nitrogen. Nitrogen did not significantly change Rubisco as a percentage of soluble protein or the Rubisco k_{cat} . Most experimental parameters decreased from ear emergence to 8–15 days after anthesis (Tables 1, 2, 3, 4); exceptions were Rubisco activation and k_{cat} (Table 3), which did not vary significantly between dates.

Discussion

The cause of the smaller down-regulation of photosynthetic capacity with elevated CO_2 in warmer rather than ambient temperatures in these experiments (del Pozo et al. 2005) and in previous ones (Martínez-Carrasco et al. 2005) had not been identified beyond doubt. The photosynthesis- CO_2 responses reported here (Fig. 1) show that photosynthesis in plants grown in elevated CO_2 was limited by Rubisco activity up to CO_2 concentrations above those prevailing during growth. This was due, first, to the low stomatal conductance and intercellular CO_2 concentrations in the warm, dry environment of the experiments (del Pozo et al. 2005), and, second, to the decrease in Rubisco activity with long-term growth in elevated CO_2 (Tables 1, 2) that has also been observed in preceding studies (Drake et al. 1997; Long et al. 2004; Pérez et al. 2005). Accordingly, the smaller decrease in photosynthetic capacity caused by elevated CO_2 at warmer rather than ambient temperatures is attributable to changes in Rubisco-limited carboxylation. We have also found that growth in elevated CO_2 increases the response of photosynthesis and Rubisco activity to temperature (Alonso et al. 2008).

To further explore the involvement of changes in Rubisco activity in responses to growth in elevated temperature and CO_2 , we estimated V_{cmax} using gas exchange measurements and the *in vitro* activity of Rubisco. Separately, both elevated CO_2 and above-ambient temperatures had negative effects on V_{cmax} and Rubisco activity, with CO_2

generally having a greater impact than temperature. When applied together, elevated CO_2 and warmer temperature did not have a cumulative negative effect; that is, increasing the temperature by 4°C for plants grown in elevated CO_2 did not decrease V_{cmax} and Rubisco activity to a larger extent than in plants grown at ambient temperature. Thus, with combined increases in CO_2 and temperature, V_{cmax} and Rubisco activity decreased in relation to ambient CO_2 , but not in relation to ambient temperature under elevated CO_2 .

The decrease in Rubisco activity under CO_2 enrichment was a result of the well established decrease in enzyme amount (Long et al. 2004) and—at low nitrogen—of the decarbamylation of the enzyme that is observed in some studies (Sage et al. 1988), though not in others (Nakano et al. 1997). It is conceivable that at low nitrogen, with low Rubisco amounts and activities, RuBP may be in excess and therefore bind tightly to any uncarbamylated Rubisco sites. Consistent with studies relating down-regulation of Rubisco in elevated CO_2 to a low plant nitrogen status (Riviere-Rolland et al. 1996; Nakano et al. 1997; Farage et al. 1998; Geiger et al. 1999; Ellsworth et al. 2004; Pérez et al. 2005), the loss of Rubisco amount in elevated CO_2 was part of a general decrease in soluble protein, although after anthesis there was a preferential loss of Rubisco. When not applied at a high temperature, CO_2 enrichment decreased Rubisco k_{cat} . Decreases in Rubisco catalysis not associated with deactivation (decarbamylation) have been observed when carbohydrates build up upon the transfer of plants from low to high light intensity (Grub and Machler 1990), after blocking export from leaves by cold-girdling (Krapp and Stitt 1995), when grown in elevated CO_2 (Pérez et al. 2005) and in anti-Rubisco activase plants, particularly in high CO_2 (He et al. 1997). Diurnal changes in the activity of carbamylated Rubisco have also been found, but these were similar in ambient and elevated CO_2 (Mckee et al. 2000). Tightly bound Rubisco inhibitors could decrease the carbamylated enzyme turnover rate, although He et al. (1997) found that most of this decrease disappeared after rapid extraction for *in vitro* assays of Rubisco activity; in our experiment, the extraction procedure preserved the inhibitor binding to Rubisco. We take the variations in Rubisco k_{cat} as evidence of the presence of a daytime inhibitor of the enzyme, as reported for wheat and other plants (Keys et al. 1995; Parry et al. 1997). This inhibitor has properties similar to those of pentodiulose-bisphosphate (Kane et al. 1998), which is produced by the oxygenation of the enediol intermediate formed from RuBP in Rubisco catalysis (Pearce and Andrews 2003). It has been speculated that the inhibitor may be formed non-enzymatically from RuBP in the chloroplast, given its favourable conditions for this process (Kane et al. 1998). In this case, the levels of the inhibitor could increase in response to an accumulation of precursor metabolites,

as reported for the nocturnal inhibitor of Rubisco, carboxyarabinitol 1-phosphate (Andralojc et al. 2002). Consistent with this, we have found that elevated CO₂ increased the levels of carbohydrates and, possibly, of phosphorylated metabolites (Pérez et al. 2005).

Rubisco activity did not decrease with temperature in elevated CO₂ as it did in ambient CO₂. However, warmer temperatures in both ambient and elevated CO₂ decreased the amounts of Rubisco, in agreement with other studies (Yamasaki et al. 2002; Pérez et al. 2005), and total soluble protein. There was no compensating increase in Rubisco activation to account for the interaction of elevated CO₂ and temperature over enzyme activity. In elevated CO₂, the decrease in Rubisco amount caused by ambient +4°C temperature was counteracted by an enhancement of the (apparent) k_{cat} of Rubisco (Tables 1, 2). This finding is consistent with the observation of a decrease in Rubisco protein in soybean at high temperatures, but not in total activity, implying that the k_{cat} of Rubisco was up-regulated (Vu et al. 1997). The catalytic activity of Rubisco is known to increase with temperature (Sage 2002), but this would not explain the observed change in k_{cat} measured in vitro at the same temperature in all treatments. The smaller decrease in Rubisco catalysis in elevated CO₂ caused by warm temperatures is probably due to decreases in the daytime inhibitor of the enzyme. This may be associated with less accumulation of metabolites at warm temperatures, as the decreased levels of carbohydrates suggest (Pérez et al. 2005).

Both the modeling of the photosynthetic responses to internal CO₂ concentration and Rubisco activity measurements indicate that Rubisco is a major determinant of photosynthetic inhibition at elevated CO₂ and at elevated temperature. We have shown how these two factors interact on photosynthesis, whereby warm temperatures reduce the inhibition of Rubisco k_{cat} caused by elevated CO₂. This interaction is different from the displacement of the temperature optimum for photosynthesis to higher values in elevated CO₂, due to the decrease in photorespiration (Long 1991). The reported effect on Rubisco k_{cat} diminishes the negative impact on photosynthesis of combined increases in CO₂ and temperature.

Acknowledgments The technical cooperation of A. L. Verdejo in gas exchange measurements and Rubisco activity assays is acknowledged. L. Hernández analyzed Rubisco and soluble protein. We thank the staff at this Institute's experimental farm for their technical assistance in crop husbandry. This work was funded by the Spanish Research and Development Plan (Projects no. BFI2000-0871 and AGL2006-13541-C02-02/AGR) and the CSIC intramural contract no. 200640II48. R. Morcuende had I3P and Ramon y Cajal research contracts, and A. Alonso an I3P pre-doctoral fellowship, from the CSIC-European Social Fund. G. Zita was the recipient of a grant from the Autonomous University of Mexico. We thank the anonymous

referee whose constructive comments were very helpful in improving the quality of this work.

References

- Ainsworth EA, Ort DR (2010) How do we improve crop production in a warming world? *Plant Physiol* 154:526–530
- Alonso A, Pérez P, Morcuende R, Martínez-Carrasco R (2008) Future CO₂ concentrations, though not warmer temperatures, enhance wheat photosynthesis temperature responses. *Physiol Plant* 132:102–111
- Andralojc PJ, Keys AJ, Kossmann J, Parry MAJ (2002) Elucidating the biosynthesis of 2-carboxyarabinitol 1-phosphate through reduced expression of chloroplastic fructose 1, 6-bisphosphate phosphatase and radiotracer studies with ¹⁴CO₂. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:4742–4747
- Aranjuelo I, Pérez P, Hernández L, Irigoyen JJ, Zita G, Martínez-Carrasco R, Sánchez-Díaz M (2005) The response of nodulated alfalfa to water supply, temperature and elevated CO₂: photosynthetic down-regulation. *Physiol Plant* 123:348–358
- Bunce JA (2000) Acclimation to temperature of the response of photosynthesis to increased carbon dioxide concentration in *Taraxacum officinale*. *Photosynth Res* 64:89–94
- Christensen JH, Hewitson B, Busuioc A, Chen A, Gao X, Held I, Jones R, Kolli RK, Kwon WT, Laprise R et al. (2007) Regional climate projections. In: S Solomon, D Qin, M Manning, Z Chen, M Marquis, KB Averyt, M Tignor, HL Miller (eds) *Climate change 2007: the physical science basis. Contribution of working group I to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, and New York, pp 847–940
- Davey PA, Hunt S, Hymus GJ, DeLucia EH, Drake BG, Karnosky DF, Long SP (2004) Respiratory oxygen uptake is not decreased by an instantaneous elevation of [CO₂], but is increased with long-term growth in the field at elevated [CO₂]. *Plant Physiol* 134:520–527
- Del Pozo A, Pérez P, Morcuende R, Alonso A, Martínez-Carrasco R (2005) Acclimatory responses of stomatal conductance and photosynthesis to elevated CO₂ and temperature in wheat crops grown at varying levels of N supply in a Mediterranean environment. *Plant Sci* 169:908–916
- Delgado E, Mitchell RAC, Parry MAJ, Driscoll SP, Mitchell VJ, Lawlor DW (1994) Interacting effects of CO₂ concentration, temperature and nitrogen supply on the photosynthesis and composition of winter wheat leaves. *Plant Cell Environ* 17:1205–1213
- Drake BG, González-Meler MA, Long SP (1997) More efficient plants: a consequence of rising atmospheric CO₂? *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48:609–639
- Ellsworth DS, Reich PB, Naumburg ES, Kochs GW, Kubiske ME, Smith SD (2004) Photosynthesis, carboxylation and leaf nitrogen responses of 16 species to elevated pCO₂ across four free-air CO₂ enrichment experiments in forest, grassland and desert. *Glob Change Biol* 10:2121–2128
- Farage P, McKee I, Long SP (1998) Does a low nitrogen supply necessarily lead to acclimation of photosynthesis to elevated CO₂? *Plant Physiol* 118:573–580
- Farquhar GD, von Caemmerer S, Berry JA (1980) A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C₃ species. *Planta* 149:78–90
- Ford MA, Thorne GN (1975) Effects of variation in temperature and light intensity at different times on growth and yield of spring wheat. *Ann Appl Biol* 80:283–299

- Geiger M, Haake V, Ludewig F, Sonnwald U, Stitt M (1999) The nitrate and ammonium nitrate supply have a major influence on the response of photosynthesis, carbon metabolism, nitrogen metabolism and growth to elevated carbon dioxide in tobacco. *Plant Cell Environ* 22:1177–1199
- Grub A, Machler F (1990) Photosynthesis and light activation of ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase in the presence of starch. *J Exp Bot* 41:1293–1301
- He Z, von Caemmerer S, Hudson GS, Price GD, Badger MR, Andrews TJ (1997) Ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase deficiency delays senescence of Ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase but progressively impairs its catalysis during tobacco leaf development. *Plant Physiol* 115:1569–1580
- Jahnke S, Krewitt M (2002) Atmospheric CO₂ concentration may directly affect leaf respiration measurement in tobacco, but not respiration itself. *Plant Cell Environ* 25:641–651
- Kane HJ, Wilkin JM, Portis AR, Andrews TJ (1998) Potent inhibition of ribulose-bisphosphate carboxylase by an oxidized impurity in ribulose-1, 5-bisphosphate. *Plant Physiol* 117:1059–1069
- Keys AJ, Major I, Parry MAJ (1995) Is there another player in the game of Rubisco regulation? *J Exp Bot* 46:1245–1251
- Krapp A, Stitt M (1995) An evaluation of direct and indirect mechanisms for the “sink-regulation” of photosynthesis in spinach: changes in gas exchange, carbohydrates, metabolites, enzyme activities and steady-state transcript levels after cold-girdling source leaves. *Planta* 195:313–323
- Lawlor DW, Konturi M, Young AT (1989) Photosynthesis by flag leaves of wheat in relation to protein, ribulose bisphosphate carboxylase activity and nitrogen supply. *J Exp Bot* 40:43–52
- Long SP (1991) Modification of the response of photosynthetic productivity to rising temperature by atmospheric CO₂ concentrations: has its importance been underestimated? *Plant Cell Environ* 14:729–739
- Long SP, Ainsworth EH, Rogers A, Ort DR (2004) Rising atmospheric carbon dioxide: plants FACE the future. *Annu Rev Plant Biol* 55:591–628
- Martínez-Carrasco R, Pérez P, Morcuende R (2005) Interactive effects of elevated CO₂, temperature and nitrogen on photosynthesis of wheat grown under temperature gradient tunnels. *Environ Exp Bot* 54:49–59
- Mckee IF, Mulholland BJ, Craigon J, Black CR, Long SP (2000) Elevated concentrations of atmospheric CO₂ protect against and compensate for O₃ damage to photosynthetic tissues of field-grown wheat. *New Phytol* 146:427–435
- Moore BD, Cheng SH, Sims D, Seemann JR (1999) The biochemical and molecular basis for photosynthetic acclimation to elevated atmospheric CO₂. *Plant Cell Environ* 22:567–582
- Nakano H, Makino A, Mae T (1997) The effect of elevated partial pressures of CO₂ on the relationship between photosynthetic capacity and N content in rice leaves. *Plant Physiol* 115:191–198
- Parry MAJ, Andralojc PJ, Parmar S, Keys AJ, Habash D, Paul MJ, Alred R, Quick WP, Servaites JC (1997) Regulation of Rubisco by inhibitors in the light. *Plant Cell Environ* 20:528–534
- Pearce FG, Andrews TJ (2003) The relationship between side reactions and slow inhibition of Ribulose-bisphosphate carboxylase revealed by a loop 6 mutant of the tobacco enzyme. *J Biol Chem* 278:32526–32536
- Pérez P, Morcuende R, Martín del Molino I, Martínez-Carrasco R (2005) Diurnal changes of Rubisco in response to elevated CO₂, temperature and nitrogen in wheat grown under temperature gradient tunnels. *Environ Exp Bot* 53:13–27
- Rawson HM, Gifford RM, Condon BN (1995) Temperature gradient chambers for research on global environment change. I. Portable chambers for research on short-stature vegetation. *Plant Cell Environ* 18:1048–1054
- Riviere-Rolland H, Contard P, Betsche T (1996) Adaptation of pea to elevated atmospheric CO₂: Rubisco, phosphoenolpyruvate carboxylase and chloroplast phosphate translocator at different levels of nitrogen and phosphorus nutrition. *Plant Cell Environ* 19:109–117
- Rogers A, Fischer BU, Bryant J, Frehner M, Blum H, Raines CA, Long SP (1998) Acclimation of photosynthesis to elevated CO₂ under low-nitrogen nutrition is affected by the capacity for assimilate utilization. Perennial ryegrass under free-air CO₂ enrichment. *Plant Physiol* 118:683–689
- Sage RF (2002) Variation in the k_{cat} of Rubisco in C₃ and C₄ plants and some implications for photosynthetic performance at high and low temperature. *J Exp Bot* 53:609–620
- Sage RF, Sharkey TD, Seemann JR (1988) The in vivo response of the ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase activation state and the pool sizes of photosynthetic metabolites to elevated CO₂ in *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* 147:407–416
- Salvucci ME (2008) Association of Rubisco activase with chaperonin-60 β : a possible mechanism for protecting photosynthesis during heat stress. *J Exp Bot* 59:1923–1933
- Schneider SH (1992) The climatic response to greenhouse gases. *Adv Ecol Res* 22:1–30
- Schulze ED, Kelliher FM, Korner C, Lloyd J, Leuning R (1994) Relationships among maximum stomatal conductance, ecosystem surface conductance, carbon assimilation rate, and plant nitrogen nutrition: a global ecology scaling exercise. *Annu Rev Ecol Syst* 25:629–660
- Sharkey TD, Savitch LV, Butz ND (1991) Photometric method for routine determination of k_{cat} and carbamylation of Rubisco. *Photosynth Res* 28:41–48
- Stirling CM, Davey PA, Williams TG, Long SP (1997) Acclimation of photosynthesis to elevated CO₂ and temperature in five British native species of contrasting functional type. *Global Change Biol* 3:237–246
- Stitt M, Krapp A (1999) The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. *Plant Cell Environ* 22:583–621
- Vu JCV (2005) Acclimation of peanut (*Arachis hypogaea* L.) leaf photosynthesis to elevated growth CO₂ and temperature. *Environ Exp Bot* 53:85–95
- Vu JCV, Allen LH, Boote KJ, Bowes G (1997) Effects of elevated CO₂ and temperature on photosynthesis and Rubisco in rice and soybean. *Plant Cell Environ* 20:68–76
- Webber AN, Nie GY, Long SP (1994) Acclimation of photosynthetic proteins to rising atmospheric CO₂. *Photosynth Res* 39:413–425
- Yamasaki T, Yamakawa T, Yamane Y, Koike H, Satoh K, Katoh S (2002) Temperature acclimation of photosynthesis and related changes in photosystem II electron transport in winter wheat. *Plant Physiol* 128:1087–1097
- Ziska LH (2001) Growth temperature can alter the temperature dependent stimulation of photosynthesis by elevated carbon dioxide in *Albutilon theophrasti*. *Physiol Plant* 111:322–328
- Ziska LH, Bunce JA (1994) Increasing growth temperature reduces the stimulatory effect of elevated CO₂ on photosynthesis or biomass in two perennial species. *Physiol Plant* 91:183–190
- Ziska LH, Bunce JA (1997) The role of temperature in determining the stimulation of CO₂ assimilation at elevated carbon dioxide concentration in soybean seedlings. *Physiol Plant* 100:126–132

