

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
**Instituto de Ciencias Agrícolas**



**“EFECTOS POR MESOSULFURÓN METIL + IODOSULFURÓN  
METIL EN LA ACTIVIDAD FOTOSINTÉTICA Y ESTRÉS  
OXIDATIVO EN ALFALFA (*Medicago sativa L.*)”**

**T E S I S**

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**PRESENTA**

Juan José García Gerardo

**DIRECTOR** Dr. en C. Alejandro Manelik García López

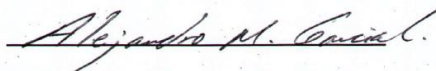
**Co-DIRECTOR** Dr. en C. Luis Miguel Tamayo Esquer

Ejido Nuevo León, Mexicali, B.C.

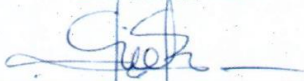
Agosto del 2016

La presente tesis "Efectos por Mesosulfurón metil + iodosulfurón metil en la actividad fotosintética y estrés oxidativo en alfalfa (*Medicago sativa* L.)" realizada por el **M.C. Juan José García Gerardo**, dirigido por el Dr. en C. Alejandro Manelik García López, ha sido evaluada y aprobada por el Comité Particular abajo indicado, como requisito parcial para obtener el grado de:

**Doctor en Ciencias Agropecuarias**  
Comité Particular



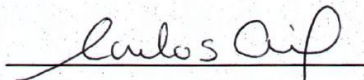
Dr. Alejandro Manelik García López  
Director de Tesis



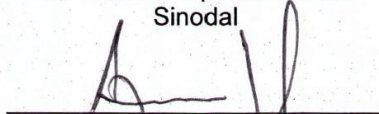
Dr. Luis Miguel Tamayo Esquer  
Co-Director de Tesis



Dr. Daniel González Mendoza  
Sinodal

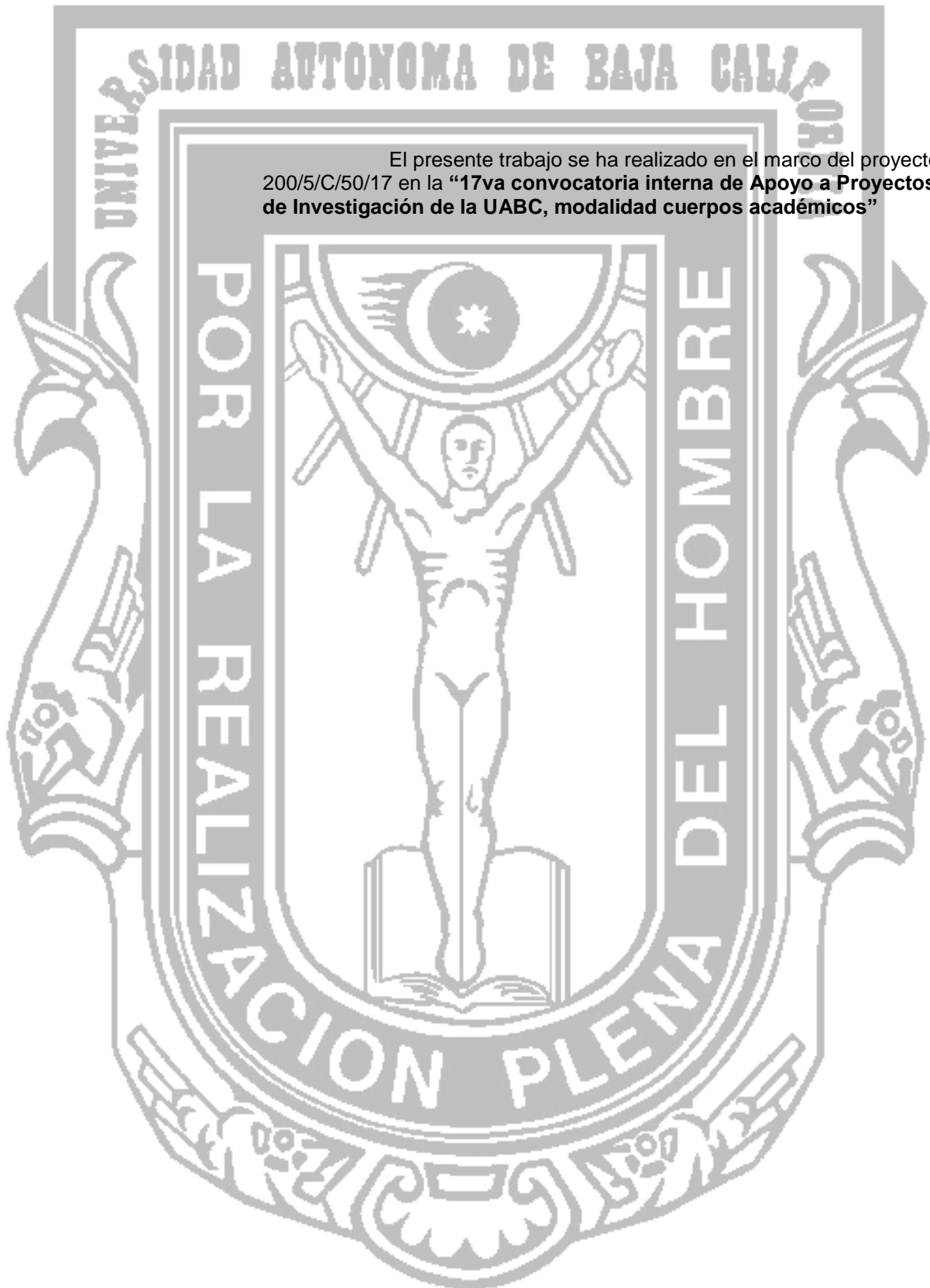


Dr. Carlos Enrique Ail Catzím  
Sinodal



Dr. Agustín Zárate Márquez  
Sinodal

!



El presente trabajo se ha realizado en el marco del proyecto 200/5/C/50/17 en la "17va convocatoria interna de Apoyo a Proyectos de Investigación de la UABC, modalidad cuerpos académicos"

## **AGRADECIMIENTOS**

**A la Universidad Autónoma de Baja California**, por brindarme la oportunidad de realizar estudios de posgrado en uno de sus programas reconocidos por el CONACYT.

**Al Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el apoyo que me proporcionó con beca a través de la Dirección General de Investigación y Posgrado.

**Al Instituto de Ciencias Agrícolas (ICA)** por darme la oportunidad de estudiar el Doctorado en Ciencias Agropecuarias, incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad del CONACYT.

**Al Dr. Alejandro Manelik García López**, mi director de tesis, el cual me apoyo con su amistad, comprensión, tiempo y paciencia, me ayudo a obtener nuevos conocimientos y para la culminación de esta tesis.

**Al Dr. Luis Miguel Tamayo Esquer**, por su apoyo y tiempo, así como su disponibilidad para ayudar a la finalización de esta etapa profesional.

**Al Dr. Daniel González Mendoza**, por estar siempre en la disponibilidad de ayudarme, el cual fue un gran apoyo en esta etapa profesional, además de contar con su amistad.

**Al Dr. Carlos Enrique Ail Catzím**, el cual desde el comienzo del Doctorado en Ciencias Agropecuarias, siempre me brindó su apoyo amistad y del cual obtuve muchos conocimientos.

**Al Dr. Agustín Zarate Márquez**, por su apoyo incondicional y amistad, siempre estar al pendiente en el transcurso del doctorado y por sus consejos valiosos.

**A todos mis maestros**, que con su apoyo obtuve nuevos conocimientos, para crecer profesionalmente.

**A mis compañeros, Pedro C., Martin V., Ramon, Tilus, Ali, entre otros**, por su apoyo que me proporciono durante mis estudios en el Doctorado en Ciencias Agropecuarias.

**Al Personal del Instituto de Ciencias Agrícolas**, Sandrita, Aispuro, Lamberto, Bernardo, Pedro, Leonel, Juan, Eleazar (Biblioteca), Noé V. C., Bedolla, entre otros. Los cuales aportaron su apoyo de alguna manera.

**Al Dr. Juan José Hernández Paz**, por su apoyo y consejos en los últimos meses, en los cuales obtuve conocimientos y experiencias, ¡gracias! Al igual gracias al **Ing. Javier Porras**.

## **DEDICATORIA**

### **A MIS PADRES**

A Juan José García Gerardo y Sonia Armida Gerardo López, quienes con todo su amor y apoyo incondicional me alentaron a seguir adelante. A quien sin escatimar tiempo y esfuerzo han logrado fomentar mis valores y deseos de superación, además de convertirme en un hombre de provecho, gracias a ustedes he logrado concluir una meta más en mi vida y espero seguir contando con su valioso apoyo, porque estos logros han sido también suyos. Por esto y más....! Gracias!

### **A MIS HERMANOS**

A Juan Carlos García Gerardo y Sonia Armida García Gerardo, por apoyarme con sus palabras y por darme ánimos.

### **A MI ABUELA**

Armida López Higuera (DEP), por todo su amor, cariño y consejos para superarme.

### **A MI FAMILIA**

Por todo su apoyo y su consejo los cuales me alentaron a seguir adelante en los momentos más difíciles de mi vida.

### **A TANIA**

Por su apoyo, su ayuda, estar en las buenas y las malas, la cual fue alguien muy importante en esta etapa la cual empezamos juntos en la cual vivimos muchas experiencias juntos, ¡gracias!

### **A FELIPE**

Por su apoyo y amistad, empezamos juntos el doctorado, a pesar de las adversidades, el cual siempre tuvo la disponibilidad de ayudarme y apoyarme.

---

*ÍNDICE GENERAL*

---

# Contenido

LISTA DE FIGURAS .....	X
ABREVIATURAS .....	XIII
I. INTRODUCCIÓN.....	3
II. Objetivo General.....	5
Objetivo Específicos .....	5
III. Hipótesis.....	5
Planteamiento del problema.....	5
IV. REVISIÓN DE LITERATURA .....	7
4.1. Origen y distribución mundial .....	7
4.2. Cultivo de la alfalfa en México y Baja California.....	8
4.3. Descripción agronómica de la alfalfa.....	9
4.4. Morfología de la alfalfa.....	10
4.5. Definición de Maleza.....	11
4.6. Características de las malezas .....	11
4.7. Clasificación de las malezas (Vega, 1987; Virgüez y González, 1998). .....	14
4.7.1. Por ciclo de vida:.....	14
4.7.2. Por la consistencia de tallo (González <i>et al.</i> , 1990: Virgüez y González, 1998): .....	14
4.7.3. Por su Hábitat (Zambrano, 1979; Virgüez y González, 1998):.....	15
4.7.4. Por su tipo de Hoja (Espinoza <i>et al.</i> , 1995): .....	15
a) De Hoja Ancha: A estas pertenecen la mayoría de las plantas dicotiledóneas (herbáceas, arbustivas y arbóreas). .....	15
b) De Hoja Fina o Angosta: Esta categoría incluye todas las especies de las familias de Gramíneas y Ciperáceas. ....	16
4.8. Efectos de las Malezas.....	16
4.9. Importancia agronómica de las malezas.....	17
4.10. Métodos de control de las malezas .....	17
4.11. Herbicidas .....	18
4.11.1. Nomenclatura de los herbicidas .....	18
4.11.2. Clasificación de los herbicidas .....	19
4.11.2.1. Época de aplicación.....	19
4.11.2.2. Selectividad .....	20

4.11.2.3. Tipo de acción (Ross y Lembi, 1985).....	21
4.12. Superficie tratada.....	21
4.14. Modo de acción.....	22
4.15. Acetolactato sintasa.....	26
4.16. Herbicidas inhibidores de la acetolactato sintasa .....	30
4.16.1.    Sulfonilureas.....	35
4.16.1.1.    Mesosulfurón metil .....	36
4.16.1.2.    Iodosulfurón metil .....	37
4.17. Toxicidad por Mesosulfurón metil + Iodosulfurón metil en alfalfa .....	37
4.18. Eficiencia fotosintética (Fv/Fm).....	40
4.19. Índice de verdor (SPAD-502) .....	40
4.20. Determinación de color (°Hue).....	41
4.21. Especies reactivas de oxígeno .....	43
4.22. Peroxidación lipídica.....	44
4.23. Estrés en plantas.....	45
4.23.1    Estrés en plantas por herbicidas .....	45
4.24. Sistemas antioxidantes en las plantas.....	46
4.24.1. Sistema antioxidante enzimático.....	47
4.24.1. Superóxido Dismutasa .....	47
4.24.2. Peroxidasas .....	48
4.24.3. Catalasa .....	49
4.24.4. Fenilalanina amonio liasa (PAL) .....	50
4.24.5. Antioxidantes no enzimáticos .....	51
4.25. Metabolismo de los herbicidas.....	51
4.25.1. Detoxificación .....	52
4.25.1.1. Citocromo P450.....	53
4.25.1.2. Glutación Transferasa (GST).....	54
4.26. Resistencia metabólica a herbicidas .....	55
4.    Materiales y Métodos .....	62
(Etapa 1).....	62
5.1. Desarrollo del experimento.....	62
5.2. Determinación de la eficiencia fotosintética (Fv/fm).....	63

5.3. Determinación de color.....	63
5.4. Determinación del índice de verdor. ....	63
5.5. Determinación de la Clorofila a, b, total y carotenoides totales.....	63
5.6. Determinación del peróxido de hidrógeno.....	64
5.7. Determinación de la peroxidación lipídica .....	64
<b>ETAPA 2</b> .....	67
5.9. Desarrollo del experimento. ....	67
5.10. Determinación de la eficiencia fotosintética.....	68
5.11. Determinación de color e Índice de Verdor.....	69
5.12. Determinación de la actividad enzimática de Peroxidasa.....	69
5.13. Determinación de la actividad enzimática de Catalasa.....	70
5.14. Determinación de la actividad enzimática de Fenilalanina amonio-liasa....	70
5.15. Determinación de la actividad enzimática de Superóxido dismutasa. ....	71
5.16. Diseño experimental y análisis estadístico.....	72
<b>6. Resultados y discusión</b> .....	74
<b>Etapa 1</b> .....	74
6.1. Eficiencia fotosintética.....	74
6.2. Tono (°Hue).....	75
6.3. Índice de verdor (Unidades spad).....	76
6.4. Concentraciones de clorofila a y b en alfalfa tratada con dosis de Mesosulfurón metil + Iodosulfurón metil.....	78
6.5. Concentraciones de clorofila total y carotenoides totales en alfalfa tratada con dosis de Mesosulfurón metil + Iodosulfurón metil. ....	80
6.6. Concentraciones de peróxido de hidrogeno y peroxidación de lípidos en alfafa tratada con dosis de Mesosulfurón metil + Iodosulfurón metil en alfalfa tratada con dosis de Mesosulfurón metil + Iodosulfurón metil.....	81
<b>Etapa 2</b> .....	83
6.7. Eficiencia fotosintética (Fv/Fm) .....	83
6.8. Índice De Verdor (Unidades Spad) y Tono (°Hue).....	84
6.9. Actividad enzimática de Superóxido dismutasa .....	86
6.10. Actividad enzimática de Peroxidasa .....	88
6.11. Actividad enzimática de catalasa.....	91
6.12. Actividad enzimática de Fenilalanina amonio-liasa .....	92

<b>Conclusiones</b> .....	95
<b>7. Literatura citada</b> .....	97

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Hojas, flores, tallo y raíz característicos de <i>Medicago sativa</i> L.	9
Figura 2	Representación esquemática del modo de acción de un herbicida en la planta.	22
Figura 3	Eventos desde la entrada del herbicida hasta la muerte de la planta.	25
Figura 4	Ruta biosintética de los aminoácidos valina, leucina e isoleucina.	27
Figura 5	Reacción catalizada por la ALS, formando a partir de dos moléculas de piruvato una de acetolactato.	28
Figura 6	Cofactores de la acetolactato sintasa (ALS).	29
Figura 7	Estructura química de las sulfonilureas.	30
Figura 8	Herbicidas inhibidores de ALS: sulfonilurea, imidazolinona, triazolopirimidina, pirimidiniltiobenzoato y sulfonilaminocarboniltrizolinona.	31
Figura 9	Estructuras químicas de herbicidas inhibidores de la ALS.	32
Figura 10	Estructura del Mesosulfurón metil.	36
Figura 11	Estructura del Iodosulfurón metil.	36
Figura 12	Letras A, B, C daño severo en plantas de alfalfa, D desarrollo normal en plantas de alfalfa.	38
Figura 13	Diagrama del sistema de notación de color L, a*, b*, cromaticidad y ángulo de matiz.	41
Figura 14	Participación relativa de diferentes enzimas en la fase 1 en el proceso de detoxificación.	53
Figura 15	Aplicación de tratamientos herbicidas en campo (Etapa 2).	66
Figura 16	Comparación de la eficiencia fotosintética en plantas de alfalfa tratada con dosis de Mesosulfurón metil + Iodosulfurón metil.	74
Figura 17	Comparación de la tonalidad en plantas de alfalfa tratadas con diferentes dosis de Mesosulfurón metil + Iodosulfurón metil.	75
Figura 18	Cambio en el índice de verdor en alfalfa tratada con dosis de Mesosulfurón metil + Iodosulfurón metil.	77
Figura 19	Comportamiento de la eficiencia fotosintética en plantas de alfalfa tratadas con Mesosulfurón metil + Iodosulfurón metil.	83

Figura 20	Comportamiento del índice de verdor y color en plantas de alfalfa tratadas con Mesosulfurón metil + Iodosulfurón metil. a: Índice de verdor; b: Tono.	84
Figura 21	Actividad enzimática de la Superóxido dismutasa en plantas de alfalfa tratadas con Mesosulfurón metil + Iodosulfurón metil.	87
Figura 22	Actividad enzimática de la Peroxidasa en plantas de alfalfa tratadas con Mesosulfurón metil + Iodosulfurón metil.	88
Figura 23	Actividad enzimática de la Catalasa en plantas de alfalfa tratadas con Mesosulfurón metil + Iodosulfurón metil en diferentes días de muestreos.	91
Figura 24	Actividad enzimática de Fenilalanina amonio-liasa en plantas de alfalfa tratadas con Mesosulfurón metil + Iodosulfurón metil.	92

### **LISTA DE CUADROS**

Cuadro 1.	Producción de semillas en algunas especies de malezas.	11
Cuadro 2.	Clasificación de los herbicidas por el modo de acción	23
Cuadro 3.	Dosis de I.A. de los tratamientos utilizados (Etapa 1).	61
Cuadro 4.	Dosis de I.A. de los tratamientos utilizados (Etapa 2).	67
Cuadro 5.	Comportamiento de clorofila a y b en alfalfa tratada con dosis de Mesosulfurón metil + Iodosulfurón metil.	78
Cuadro 6.	Comportamiento de clorofila y carotenoides totales en alfalfa tratada con dosis de Mesosulfurón metil + Iodosulfurón metil.	79
Cuadro 7.	Comportamiento de peróxido de hidrógeno y peroxidación de lípidos en alfalfa tratada con dosis de mesosulfurón metil + iodosulfurón metil.	80

---

# *ABREVIATURAS*

---

## ABREVIATURAS

ha	Hectárea
SIAP	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
ROS, en inglés	Especies reactivas de oxígeno
O <sub>2</sub> •-	Oxígeno singulete
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HO <sup>-</sup>	Radical hidroxilo
LPO	Peroxidación lipídica
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Social, Pesca y Alimentación
<i>et al</i>	<i>Et alii</i> (y otros)
°C	Grado centígrado
Ca	Calcio
Mg	Magnesio
Mn	Manganeso
Al	Aluminio
P	Fósforo
H	Hora
cm	Centímetro
Ej	Ejemplo
BSI	Instituto Británico de Estándares
WSSA	Sociedad Americana de Ciencia de Malezas
ISO	Sociedad Internacional para la Estandarización
PRE	Preemergencia
POST	Postemergencia
ALS	Acetolactato sintasa
AHAS	Acetohidroxiácido sintasa
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
FAD	Flavín adenín dinucleótido
TPP	Tiaminapirófosfato
g	Gramo
LD <sub>50</sub>	Dosis letal media
mL	Mililitro
pKa	logaritmo negativo de la concentración de iones hidrógeno
INEGI	Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática
etc	Etcétera
Fv	Fluorescencia variable
Fm	Fluorescencia máxima
PSII	Fotosistema II
m <sup>-2</sup>	Metro cuadrado
s	Segundo
nm	Nanómetros
µs	Microsegundo
SPAD	Soil Plant Analysis Development

O <sub>2</sub>	Oxígeno molecular
ADN	Ácido desoxirribonucleico
SOD	Superóxido dismutasa
PAL	Fenilalanina amonio-liasas
CAT	Catalasa
POD	Peroxidasa
APX	Ascorbato peroxidasa
Cu	Cobre
Zn	Zinc
Fe	Hierro
GPX	Glutación peroxidasa
Col	Colaboradores
NADPH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido
GS	Glutación sintasa
ATP	Adenosina trifosfato
GST	Glutación transferasa
SH	Grupo sulfidrilo
NH <sub>2</sub>	Grupo funcional amino
kg	Kilogramo
I.A.	Ingrediente activo
L	Litro
L·ha <sup>-1</sup>	Litros por hectárea
g·ha <sup>-1</sup>	Gramos por hectárea
Xg	Unidades de gravedad
mM	Minimolar
min	Minutos
TiCl <sub>4</sub>	Cloruro de titanio
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
MDA	Malondialdehído
TBA	Ácido thiobarbitúrico
PVP	Polivinil pirrolidona
Tris-HCl	Hidrocloruro tris(hidroximetil) amino metano
M	Molar
Ti	Tiempo inicial
Tf	Tiempo final
V	Volumen
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
U	Unidad
mg	Miligramo
μL	Microlitro
μmol	Micromol

## RESUMEN

El estudio se realizó para analizar los efectos producidos por fitotoxicidad con diferentes dosis del herbicida Mesosulfurón metil + Iodosulfurón metil en alfalfa (*Medicago sativa* L.) sobre el comportamiento de la eficiencia fotosintética (Fv/Fm), índice de verdor (Unidades Spad), la concentración de pigmentos fotosintéticos, peróxido de hidrógeno y peroxidación lipídica, así como el comportamiento de la actividad de enzimas relacionadas con el estrés (Peroxidasa, E.C. 1.11.1.7; Catalasa, E.C. 1.11.1.6; Superóxido Dismutasa, E.C. 1.15.1.1 y Fenilalanina Amonio-liasa, E.C. 4.3.1.24) como indicadores fotosintéticos y enzimáticos oxidativos de toxicidad en alfalfa. Los resultados de la aplicación de dosis de Mesosulfurón metil + Iodosulfurón metil, mostraron una tendencia a disminuir la eficiencia fotosintética, índice de verdor, concentración de clorofila y carotenoides totales, en comparación con el tratamiento testigo. Las concentraciones de peróxido de hidrógeno y peroxidación lipídica presentaron un incremento en comparación con el testigo; las mayores concentraciones de peróxido de hidrógeno y peroxidación lipídica se registraron en la dosis sub-comercial. Por otra parte, la actividad enzimática de Peroxidasa (POD), Catalasa (CAT) y Fenilalanina amonio-liasa (PAL), mostraron un incremento significativo con respecto al testigo al final del experimento (593.755 U·mg<sup>-1</sup> de proteína para POD; 0.5393 U·mg<sup>-1</sup> de proteína para CAT y 35 U·mg<sup>-1</sup> de proteína para PAL). Por su parte las actividades de Superóxido dismutasa mostraron una disminución desde los primeros días de exposición de las plantas a los herbicidas. Estos resultados demuestran que las plantas de alfalfa se ven afectadas por las dosis de los herbicidas, por inducción de estrés en la planta, así como una disminución en las variables fotosintéticas evaluadas, la dosis sobre-comercial fue extremadamente fuerte para la alfalfa ocasionando marchitez, nula capacidad fotosintética, lo cual llevo a la muerte de la planta.

**Palabras clave:** Sulfonilureas, Fitotoxicidad, Estrés, Acetolactato sintasa (ALS).

## ABSTRACT

A study was realized to demonstrate the phytotoxicity of the mesosulfuron methyl + iodosulfuron methyl in alfalfa (*Medicago sativa* L.) using different doses of the herbicide on the photosynthetic efficiency, photosynthetic pigments concentration, as well as changes in enzymatic activities behavior related with oxidative stress (Peroxidase, E.C. 1.11.1.7; Catalase, E.C. 1.11.1.6; Superoxide Dismutase, E.C. 1.15.1.1 and Phenylalanine ammonia-lyase, E.C. 4.3.1.24) as photosynthetic and enzymatic indicators of toxicity in alfalfa plants. The results of the treatments with application of mesosulfuron methyl + iodosulfuron methyl, inhibiting of the ALS, showed a tendency to decrease in photosynthetic efficiency, greenness index, chlorophyll and carotenoids, in comparison with the control treatment. The hydrogen peroxide and the lipid peroxidation concentrations had to increase in comparison with the control, the highest concentrations of hydrogen peroxide and lipid peroxidation were found in the sub-commercial dose. Moreover, the levels of enzyme activity of Peroxidase, Catalase and Phenylalanine Ammonia-lyase, showed a significant increase relative to the control at the end of the experiment (593.755 U·mg<sup>-1</sup> protein for POD; 0.5393 U·mg<sup>-1</sup> protein for CAT and 35 U·mg<sup>-1</sup> protein for PAL). Superoxide dismutase activity decreases since the first days of exposure of plants to the herbicide. These results suggest the plants of alfalfa are affected by the doses of herbicide inducing stress as well as a decrease in the photosynthetic variables evaluated, the dose on commercial was extremely strong for the alfalfa causing wilting, null photosynthetic capacity, which lead to the death of the plant.

**Keywords:** Sulfonylureas, Phytotoxicity, Stress, Acetolactate synthase (ALS).

---

# *INTRODUCCIÓN*

---

## **I. INTRODUCCIÓN**

En los forrajes que se cultivan en todo el mundo, la alfalfa (*Medicago sativa* L.) es la principal especie forrajera, la cual pertenece al género *Medicago*, el cual

comprende alrededor de 83 especies, de las cuales dos terceras partes son anuales y el resto son perennes (Small y Jomphe, 1988). La alfalfa es uno de los cultivos forrajeros más importantes en México debido a su alto valor nutricional; además mejora las propiedades físicas del suelo, la estabilidad de los agregados y el rango de infiltración del suelo (Jin *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2015). El Valle de Mexicali se caracteriza por ser una zona con gran actividad agrícola con una capa arable de 210930 ha. Entre los principales cultivos que son sembrados en éste Valle se encuentran, alfalfa, trigo y algodón (Vargas-Bejarano *et al.*, 2012). En el caso de la alfalfa, se ha sembrado una superficie de aproximadamente 29,545 ha (SIAP, 2012) en el Valle de Mexicali, Baja-California y el Valle de San Luis Río Colorado, Sonora, lo cual muestra la importancia de este cultivo en la economía de la región noroeste de México. El cultivo de la alfalfa en el Valle de Mexicali y San Luis Río Colorado ha presentado recientemente, síntomas de toxicidad por la aplicación indirecta de herbicidas utilizados principalmente para el control de malezas en parcelas de trigo aledañas al cultivo. Dentro de estos herbicidas encontramos una mezcla de mesosulfurón metil + iodosulfurón metil empleado en el control de malezas (hoja ancha y angosta) en el cultivo del trigo, la cual tiene la capacidad de inhibir la síntesis de la enzima acetolactato sintasa (E.C.2.2.1.6) la cual tiene un papel primordial en la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada, y que a su vez modifican la cadena de transporte del complejo fotosistema II (Zhoe *et al.*, 2007) y generan estrés oxidativo en las plantas consideradas como malezas debido a procesos de lipoperoxidación a nivel de membrana en el cloroplasto (Dayan *et al.*, 2012), La exposición de las plantas a los herbicidas incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radical hidroxilo ( $HO^{\bullet}$ ), las que al no eliminarse, producen daño a moléculas y a la membrana, un aumento en la peroxidación lipídica (LPO), alteraciones en la estructura y funcionamiento de las proteínas concluyendo con la muerte celular por oxidación (Sairam y Tyagi, 2004; Dayan y Watson, 2011). Sin embargo los estudios encaminados a determinar el impacto de mesosulfurón metil + iodosulfurón metil en algunas variables fotosintéticas y oxidativas en alfalfa son escasos.

## II. OBJETIVO GENERAL

Evaluar los cambios en los componentes fotosintéticos y producción de peróxido de hidrógeno, lipoperoxidación celular y actividad enzimática como posibles indicadores de toxicidad en plantas de alfalfa expuestas a mesosulfurón metil + iodosulfurón metil.

### Objetivo Específicos

- Evaluar los cambios en la eficiencia fotosintética, color e índice de verdor, determinación de clorofila total y carotenoides, así como también determinar peróxido de hidrogeno y peroxidación lipídica sobre alfalfa aplicada con Mesosulfurón metil + Iodosulfurón metil.
- Evaluar la actividad enzimática de algunas enzimas indicadoras de estrés, causada por la toxicidad del mesosulfurón metil + iodosulfurón metil en alfalfa.

## III. HIPÓTESIS

La aplicación del herbicida mesosulfurón metil + iodosulfurón metil causa cambios en componentes fotosintéticos, producción de peróxido de hidrógeno, lipoperoxidación y actividad enzimática relacionada con estrés oxidativo que conlleva a una toxicidad en la alfalfa (*Medicago sativa* L.).

### Planteamiento del problema

Recientemente, en diversas parcelas del cultivo de la alfalfa en el Valle de Mexicali y San Luis Río Colorado se han presentado síntomas de toxicidad por la aplicación indirecta o accidental del herbicida (Mesosulfurón metil + Iodosulfurón metil) empleado en el control de malezas en parcelas de trigo aledañas a estos cultivos. Sin embargo, estudios encaminados a determinar el impacto de Mesosulfurón metil + Iodosulfurón metil en algunas variables fotosintéticas y oxidativas en alfalfa son escasos.



---

# *REVISIÓN DE LITERATURA*

---

## **IV. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **4.1. Origen y distribución mundial**

La alfalfa, cuyo nombre científico es *Medicago sativa*, la cual pertenece a la familia de las leguminosas es el forraje más antiguo que se conoce; su conocimiento

como forraje para uso animal, se remonta a más de 1.500 años a.C. La cual es originaria de Irán y Asia Menor y es una de las plantas más utilizadas como forraje en el mundo, con aproximadamente 32000000 ha cultivadas; Estados Unidos de América y Argentina, con 16 millones de ha, tienen la mayor superficie sembrada (Hanson, 1972; Bouton, 2001). Esta especie fue introducida a América del Sur en el siglo XVI, por los portugueses y españoles y en 1870 fue introducida a Perú, México y a Estados Unidos, por misioneros españoles (Walton, 1983; Muslera y Ratera, 1991).

#### **4.2. Cultivo de la alfalfa en México y Baja California**

La alfalfa es uno de los cultivos forrajeros más importantes en México y en el mundo debido a su alto valor nutricional; además mejora las propiedades físicas del suelo, la estabilidad de los agregados y el rango de infiltración del suelo (Ji *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2015). En el Estado de México, la región del Bajío, así como en Hidalgo y Querétaro, se ubica la mayor parte de las unidades de producción lechera que dependen de la alfalfa. La producción nacional de alfalfa, así como la superficie sembrada, muestran una tendencia estable desde 1992 y la mayor superficie sembrada y cosechada se encuentra en los estados de Hidalgo, Guanajuato y Baja California y, en menor proporción, en Coahuila, Durango, Estado de México y Puebla (SAGARPA, 2002). En el Valle de Mexicali Baja-California se caracteriza por ser una zona con gran actividad agrícola con una capa arable de 210930 ha. Entre los principales cultivos que son sembrados en éste Valle se encuentran, alfalfa, trigo y algodón (Vargas-Bejarano *et al.*, 2012). En el caso de la alfalfa, se ha sembrado una superficie de aproximadamente 29,545 ha (SIAP, 2012) en el Valle de Mexicali, Baja-California y el Valle de San Luis Río Colorado, Sonora, con rendimientos promedio de 16,010 toneladas por hectárea y una producción de 414,067.01 toneladas de alfalfa henificada, en el año agrícola 2013-2014 en el Valle de Mexicali, Baja California (SAGARPA, 2015), lo cual presenta una relevancia dentro de los principales cultivos que incrementan la economía en la región Noroeste de México. De la producción de alfalfa antes mencionada se utiliza El 75% para alimentar aproximadamente 50 mil cabezas de

ganado lechero, 15% para bovinos productores de carne y el 10% restante para la elaboración de alimentos concentrados (Anónimo, 2010).

### **4.3. Descripción agronómica de la alfalfa**

Se cultiva en una amplia variedad de suelos y climas. Se adapta mejor en alturas comprendidas entre 700 y 2800 msnm. Es un cultivo que se adaptada a suelos profundos, bien drenados, alcalinos y tolera la salinidad moderada; sin embargo, no su desarrollo es limitado en pH inferior a 5, debido a la acidez provoca la supervivencia y multiplicación del *Rhizobium meliloti* específico y no soporta el encharcamiento, por lo que se considera una especie muy sensible a la acidez del suelo. El pH crítico para su desarrollo de 5-6, por debajo del cual es necesario, en ocasiones corregir la acidez del suelo. La temperatura óptima de crecimiento fluctúa entre los 15 y 25° C durante el día y de 10 a 20° C en la noche. Por la longitud y profundidad de sus raíces, es resistente a la sequía, pues obtiene agua de las capas profundas del suelo (Hanson, 1972; Hughes *et al.*, 1980; Muslera y Ratera, 1991). Por pertenecer a la familia de las *Fabaceae*, hace un notable consumo de Ca y Mg que, de contenerlos el suelo en proporciones suficientes para el requerimiento de la planta, hace necesario solamente el agregar fertilizantes fosfatados y potásicos (Juncafresca, 1983).

La toxicidad por Mn y Al, es una de las causas principales del escaso crecimiento de la alfalfa en suelos ácidos, afectando adversamente al desarrollo de las raíces. Existe, además, una interacción negativa entre el P y el Al, que hace que disminuya la cantidad de P disponible, cuando el contenido de Al libre en el suelo es alto (Muslera y Ratera, 1991).

La temperatura es una variable ambiental importante, que varía durante la estación de crecimiento e influye en la morfología de la alfalfa, por lo que se considera que ésta es una especie de día largo y la floración es mayor en regiones con fotoperíodo superior a 12 h (Muslera y Ratera, 1991; Horrocks y Vallentine, 1999).

#### 4.4. Morfología de la alfalfa

La alfalfa (*Medicago sativa* L.) es una planta perenne, de crecimiento erecto, tallo poco ramificado de 60 a 100 cm de altura; tiene hojas trifoliadas, con un pedicelo intermedio más largo que los laterales, folíolos ovalados, generalmente sin pubescencia, con márgenes lisos y bordes superiores ligeramente dentados figura 1 (SAGARPA, 2008; Muslera y Ratera, 1991). Esta planta varía un poco según la variedad, el medio ambiente donde se encuentre y la temperatura. Los tallos son delgados, sólidos o huecos y la raíz es pivotante y alcanza varios metros de longitud, con una corona, de la cual emergen los rebrotes, que dan origen a los nuevos tallos; las flores son de color azul o púrpura, dependiendo de la variedad (Del Pozo, 1983).



**Figura 1.** Hojas, Flores, tallo y raíz característicos de *Medicago sativa* L.

#### **4.5. Definición de maleza**

El concepto de “maleza” tiene definiciones antropocéntricas, ecológicas, o bien mixtas, algunos definen a las malezas como plantas que crecen en sitios no deseados por el hombre, por lo que puede ser considerada maleza toda planta que afecta negativamente el rendimiento de un cultivo y resulta tóxica para el ganado. Este concepto de maleza o de planta indeseable causa por lo general un rechazo especialmente por parte de botánicos que no admiten que se catalogue de esta manera a una especie vegetal; contrariamente, para un productor agropecuario, las malezas constituyen plantas nocivas que deben ser eliminadas de los campos en producción, debido a que en la mayoría de los cultivos y pasturas su presencia ocasiona perjuicios económicos de mayor o menor grado de severidad (Sabbatini *et al.*, 2008). García-Torres y Fernández-Quintanilla (1991), establecen que una o varias especies vegetales al proliferar interfieran los intereses del hombre, o que se les consideren desde el punto de vista de sus interacciones en el ecosistema, o bien, valorando su impacto al través del tiempo y del espacio en interacción con las actividades del ser humano. Dentro de las definiciones revisadas la más interesante es la de Pujadas y Hernández (1988), quienes consideran que “mala hierba o maleza es toda planta que crece siempre o de forma predominante en situaciones marcadamente alteradas por el hombre, que resulta no deseable por él en un lugar y momento determinado”. Sin duda, el éxito de una maleza se basa en su habilidad para invadir, dominar y persistir en el sistema (Cousens y Mortimer, 1995).

#### **4.6. Características de las malezas**

Según Rosario (2011), las características que confieren a las malas hierbas alto poder invasivo y, mayor capacidad de adaptación, supervivencia y crecimiento con respecto a los cultivos son:

- a) Cantidad de semilla: la producción de muchas semillas y generalmente pequeñas es una de las maneras de garantizar la persistencia de la especie (cuadro 1).
- b) Fácil dispersión: semillas de algunas especies de malezas poseen estructuras que les permiten ser fácilmente dispersadas por el viento o animales (trasladarse adheridas en los pelos) o por el agua de lluvia o riego (flotar o ser arrastradas).
- c) Los tamaños y formas de semillas similares a las especies de cultivo. Algunas especies de malezas son similares a las de las semillas de los cultivos en los cuales están presentes, por tanto son difíciles de distinguir y separar, pudiendo ocurrir mezclas entre ellas.
- d) Rápido desarrollo de la fase vegetativa y pronto inicio de la fase reproductiva.
- e) Capacidad de crecer en condiciones adversas. Especies tolerantes a suelos salinos, niveles de inundación, pH ácidos y básicos, entre otras.
- f) Capacidad de reproducción sexual, asexual y en muchos casos ambas formas de propagación, en las especies de mayor importancia a nivel mundial.
- g) Alta capacidad de persistencia, debido a:
- Producción de semillas en un amplio rango de condiciones ambientales. Producción de cientos y miles de semillas en condiciones favorables y muy pocas en condiciones adversas.
  - Largo periodo de viabilidad. Las semillas de malezas pueden permanecer viables en el suelo durante muchos años. Numerosas especies poseen semillas que se mantienen en latencia, esta alta longevidad unida a la gran cantidad de semilla producidas, da lugar a la existencia de unas enormes reservas de semillas viables en los suelos agrícolas (banco de semillas).
  - Germinación escalonada. Esta propiedad constituye una forma de dispersión en el tiempo, permitiéndolas evitar riesgos y persistir a pesar de la destrucción ocasional de sus poblaciones.

**Cuadro 1.** Producción de semillas en algunas especies de malezas.

Especie	Semillas por planta	Referencia
<i>Amaranthus spinosus</i>	235,000	Holm <i>et al.</i> , 1977
<i>Amaranthus retroflexus</i>	117,400	Stevens, 1957
<i>Ageratum conizoides</i>	40,000	Baker, 1965
<i>Avena fatua</i>	450-3000	Mailett, 1991
<i>Avena sterilis</i>	100	Ross y Lembi, 1985
<i>Cenchrus spinosus</i>	1,110	Ashton y Monaco,1991
<i>Cyperus esculentus</i>	2,420	Ashton y Monaco,1991
<i>Eleusine indica</i>	40,000	Schwerzel, 1970
<i>Echinochloa crus-galli</i>	7,000	Ross y Lembi, 1985
<i>Gallium aparine</i>	230	Ross y Lembi, 1985
<i>Lolium multiflorum</i>	1,100	Holm <i>et al.</i> , 1977
<i>Panicum maximun</i>	9,000	Javier, 1970
<i>Phalaris minor</i>	9,300	Franke, <i>et al.</i> , 2007
<i>Portulaca oleracea</i>	53,200	Stevens, 1957
<i>Rumex crispus</i>	60,000	Holm <i>et al.</i> , 1977
<i>Solanum nigrum</i>	178,000	Holm <i>et al.</i> , 1977

- h) Capacidad de interferencia. Se entiende como la capacidad que tiene una planta sobre el crecimiento y desarrollo de sus vecinos, efecto que se expresa como la alteración en el crecimiento y desarrollo de la planta. En términos generales, las interacciones entre plantas pueden ser consideradas positivas o negativas. La relación entre las especies de malas hierbas y los cultivos se consideran dentro del grupo de las interacciones negativas al tener establecida principalmente una relación de competencia por los recursos del medio. El nivel de competencia por los recursos se da cuando éstos se encuentran en bajas cantidades y es mayor, entre mayor

sea la similitud de los requerimientos de las plantas de cultivo y las malas hierbas (Radosevich *et al.*, 1997).

#### **4.7. Clasificación de las malezas** (Vega, 1987; Virgüez y González, 1998).

##### **4.7.1. Por ciclo de vida:**

Desde el punto de vista del ciclo vegetativo, las malezas pueden ser anuales, bianuales y perennes.

- a) **Anuales:** viven sólo un año, durante el cual producen semillas (su único medio de propagación) y mueren. Ejemplos de éstos lo constituyen el Bledo Espinoso (*Amaranthus spinosus*), Cadillo Bravo (*Cenchrus echinatus*), Cordón de Fraile (*Hyptis capitata*), etc.
  
- b) **Bianuales** (Ciclo de vida de dos años). En el primer año, el crecimiento es netamente vegetativo; en el segundo año florecen, producen semillas y mueren. Un representante de este grupo es la Escoba Amarilla (*Sida aggregata*).
  
- c) **Perennes:** Viven tres años y/o más). Se reproducen por rizomas, estolones, raíces y semillas. Ejemplos Palotal o Estoraque (*Vernonia brasiliiana*), Paja Johnson (*Sorghum halepense*), etc.

##### **4.7.2. Por la consistencia de tallo** (González *et al.*, 1990; Virgüez y González, 1998):

- a) **Herbáceas:** Malezas con tallos blandos, formado por tejido no leñosos (no lignificado). Aquí se incluyen la mayoría de las especies de gramíneas, ciperáceas y de hojas anchas anuales.
  
- b) **Semileñosas:** Las que tienen la base del tallo leñoso (material suberificado) y el resto no lignificado o herbáceo.

- c) **Leñosas:** Incluyen especies con tallos lignificados en toda su longitud a excepción de las partes terminales de las ramas. Casi todas las malezas perennes pertenecen a este grupo siendo las más difíciles de controlar, cualquiera que sea el método a emplear.

#### 4.7.3. Por su Hábitat (Zambrano, 1979; Virgüez y González, 1998):

- a) **Terrestres:** Deben indicarse las condiciones que le son propicias para su desarrollo (relieve, textura, exigencias en pH, humedad y nutrientes en el suelo).
- b) **Acuáticas:** Crecen en sitios con una lámina de agua permanente, dependiendo su persistencia de una humedad alta en el suelo, en alguna etapa de su desarrollo (crecimiento vegetativo). Estas a su vez pueden clasificarse en: **No ancladas** (Sumergidas y Flotantes). Ejemplos Repollo de agua (*Pistia stratiotes*), Buchón (*Limnocharis flava*), etc. y **Ancladas** (Sumergidas, Flotantes y Emergentes), Ejemplo: El lirio de Agua (*Eichornia crassipes*), etc.
- c) **Epífitas:** Viven sobre otras plantas, pero no obtiene de ellas sus nutrientes, Ejemplo: La tiña (*Tillandsia recurvata*), entre otras.
- d) **Parásitas:** Viven sobre o dentro de otras plantas, sustentándose de la planta parasitada y pueden ser parásitas de tallo o de raíces. Ej.: las diferentes especies de Guate Pajarito (*Phtrusa spp.* y *Phorandendrun spp.*), entre otras.

#### 4.7.4. Por su tipo de Hoja (Espinoza *et al.*, 1995):

- a) **De Hoja Ancha:** A estas pertenecen la mayoría de las plantas dicotiledóneas (herbáceas, arbustivas y arbóreas).

- b) **De Hoja Fina o Angosta:** Esta categoría incluye todas las especies de las familias de Gramíneas y Ciperáceas.

Existen otras clasificaciones de las malezas tales como el grado de nocividad (levemente perjudicial, medianamente perjudicial y altamente perjudicial), por la composición química del sustrato, entre otras (Rodríguez, 2000).

#### **4.8. Efectos de las malezas**

El hombre por necesidad se hizo agricultor y al alterar el ecosistema y practicar el monocultivo propició la invasión, colonización y persistencia de especies como las malezas, las cuales constituyen riesgos naturales dentro de los intereses y actividades del hombre (Mortimer, 1990), las cuales infestan los cultivos, e interfieren mediante la competencia por recursos ambientales que limitan el crecimiento de las plantas (Zimdahl, 2007), representando uno de los principales factores limitantes de la producción, al grado que ha sido estimado en forma general, que las pérdidas globales que ocasionan a la agricultura (42%), son mayores que las ocasionadas por las plagas inséctiles (28%), enfermedades (27%) y los nemátodos (3%) (Klighman y Ashton, 1982). La alteración de los ecosistemas y el monocultivo ocasionaron daños directos e indirectos. Los daños directos de las malezas son los relacionados con la economía del agricultor, que incluye aumento de costos de producción, disminución de cosechas y pérdida de calidad en la producción (García-Torres y Fernández-Quintanilla, 1991; Radosevich *et al.*, 1997). El principal ejemplo de daños indirectos de malas hierbas en los cultivos, es que sirven de hospederos alternos a artrópodos (plagas), agentes fitopatógenos (hongos, bacterias y nematodos), partículas virales y otros agentes (García-Torres y Fernández-Quintanilla, 1991). Además de los efectos negativos de las malezas pueden actuar como refugio para organismos benéficos (Capinera, 2005).

#### **4.9. Importancia agronómica de las malezas**

Las malezas, en el sentido agronómico, representan plantas sin valor económico o que crecen fuera de lugar interfiriendo en la actividad de los cultivos, afectando su capacidad de producción y desarrollo normal por la competencia de agua, luz, nutrientes y espacio físico, o por la producción de sustancias nocivas para el cultivo (FUSAGRI, 1985; Pitty y Muñoz, 1991), esto indica que las malezas, debido al efecto de interferencia causan pérdidas considerables en los rendimientos provocando problemas severos de la agricultura mundial ya que su acción invasora facilita su competencia con los cultivos a la vez que pueden comportarse como hospederas de plagas y enfermedades. Debido al problema que causan las malezas se deben implantar modelos de manejo que disminuyan su interferencia con el cultivo y de esta forma evitar el incremento considerable en los costos de producción.

#### **4.10. Métodos de control de las malezas**

Las malezas constituyen riesgos naturales dentro de los intereses y actividades del hombre (Mortimer 1990), por lo que la reducción del impacto de las Malezas sobre el crecimiento, desarrollo y producción de las plantas cultivadas debe de ser combatida, las cuales pueden ser controladas en forma mecánica, cultural, biológica o química o con su integración. El control químico presenta ciertas ventajas comparativas con el resto de los métodos comúnmente empleados, entre las que se pueden mencionar la facilidad y rapidez en la aplicación, menor costo de la labor, mayor eficiencia en el uso energético, entre otros (Abu-Qare y Duncan, 2002). El control químico de la maleza se realiza por medio de la aplicación de herbicidas y es una de las principales herramientas en la agricultura moderna. Sin embargo, el uso de herbicidas requiere de conocimientos técnicos para la elección correcta y aplicación eficiente y oportuna de estos productos (Anderson, 1996).

#### 4.11. Herbicidas

Etimológicamente la palabra herbicida se compone de dos vocablos; “herbi” que significa hierba y “cida”, que significa matar. En general, los herbicidas son compuestos químicos que se utilizan para la eliminación selectiva de malezas y otras plantas indeseables (Domenech, 1997), los cuales inhiben o interrumpen el crecimiento y desarrollo de una planta. Los herbicidas son usados extensivamente en la agricultura, industria y en zonas urbanas, debido a que si son utilizados adecuadamente proporcionan un control eficiente de maleza a un bajo costo (Peterson *et al.*, 2001). No obstante, si no son aplicados correctamente los herbicidas pueden causar daños a las plantas cultivadas, al medio ambiente, e incluso a las personas que los aplican. Tomando en cuenta lo anterior, se requieren conocimientos técnicos que permiten la elección correcta y la aplicación eficiente y oportuna de estos productos (Anderson, 1996). En la agricultura, los herbicidas han sido una herramienta importante para el manejo de maleza por muchos años. Desde la década de los 1940’s los herbicidas han sido cada vez más sofisticados en el espectro de control de maleza, duración del período de control y selectividad a los cultivos. Aunque los herbicidas son aplicados extensivamente, son probablemente el componente menos entendido de un sistema de manejo integrado de maleza (Baumann *et al.*, 1998).

##### 4.11.1. Nomenclatura de los herbicidas

Las etiquetas de herbicidas comerciales comúnmente relacionan tres nombres, que se ilustran aquí con referencia a glifosato (Labrada *et al.*, 1996):

1. **El nombre químico:** describe la composición química del compuesto, por ejemplo: N-(fosfometil) glicina.
2. **El nombre común:** "glifosato" está aprobado por autoridades apropiadas, incluyendo el Instituto Británico de Estándares (BSI), la Sociedad Americana de Ciencia de Malezas (WSSA) y la Sociedad Internacional para la Estandarización (ISO). A veces se aprueba por diferentes autoridades más de un nombre, por ej. "endotal" (BSI) y "endotall" (WSSA)

3. **El nombre comercial:** "Roundup" se usa con los propósitos de mercadeo y registro de la patente del producto. La compañía que desarrolló el producto tiene el uso exclusivo del mismo durante los 17 años que siguen a la aprobación de la patente.

Las compañías de agroquímicos obtienen una patente para sus nuevos herbicidas antes de introducirlos al mercado y tienen el uso exclusivo de los mismos durante los 17 años que siguen a la aprobación de la patente (Caseley, 1996; Murphy, 1999). Después de que expiran estas patentes, otras compañías pueden acceder al mercado con esos herbicidas, sin embargo, deben utilizar un nombre comercial diferente.

Los herbicidas se comercializan generalmente en formulaciones líquidas o sólidas dependiendo de la solubilidad en agua del ingrediente activo y de su forma de aplicación. La formulación del herbicida 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 cantidad de ingrediente activo en porcentaje y en gramos de ingrediente activo por litro o kilogramo del producto comercial. La mayoría de los herbicidas comerciales están formulados con un solo ingrediente activo, pero algunos consisten de la mezcla de dos o más ingredientes activos, por lo que es importante conocer los nombres comunes de los mismos (Rosales y Sánchez, 2006).

#### **4.11.2. Clasificación de los herbicidas**

Los herbicidas pueden ser clasificados de acuerdo a su época de aplicación, selectividad, tipo, familia química y modo de acción.

##### **4.11.2.1. Época de aplicación**

De acuerdo a su época de aplicación los herbicidas pueden clasificarse en forma general como preemergentes (PRE) y postemergentes (POST).

**Herbicidas PRE:** Por lo general, 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 a las malezas 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 son: textura, pH y materia orgánica que pueden afectar la cantidad de herbicida disponible en el suelo para controlar la maleza. Por lo general la dosis de este tipo de herbicidas se ajusta según el tipo de suelo y materia orgánica, requiriendo una mayor dosis en suelos arcillosos y con alto contenido de materia orgánica (Anderson, 1996).

**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 ser 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).

#### **4.11.2.2. Selectividad**

De acuerdo a su selectividad los herbicidas pueden ser clasificados como, **Selectivos:** herbicidas que a cierta 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. **No selectivos:** 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).

#### 4.11.2.3. Tipo de acción (Ross y Lembi, 1985).

Por su tipo de acción los herbicidas pueden ser:

- a) **De contacto:** herbicidas que eliminan sólo las partes de la planta con las que entran en contacto y tienen un transporte limitado dentro de la planta, por lo que se recomiendan para el control de maleza anual.
- b) **Sistémicos:** herbicidas que 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.

#### 4.12. Superficie tratada

En función de cómo se aplica el herbicida en la superficie tratada se puede distinguir entre (Rosales, 2005):

- a) **Aplicaciones totales:** el herbicida se aplica uniformemente en toda el área de cultivo.
- b) **Aplicaciones en banda:** cuando el herbicida se aplica solamente en las bandas en que se siembra el cultivo.
- c) **Aplicaciones dirigidas:** se aplican a las hierbas o al suelo en zonas muy localizadas pero de forma que no alcancen a las plantas cultivadas.

#### 4.13. Familia química

La clasificación de los herbicidas en familias químicas se basa en la composición 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 bupiridilos (Hance y Holly, 1990). En Estados Unidos en la actualidad existen alrededor de 200 ingredientes activos utilizados en la fabricación de aproximadamente 800 herbicidas comerciales (Vencill, 2002). En México, existen

65 ingredientes activos en alrededor de 300 herbicidas comerciales (Anónimo, 2007).

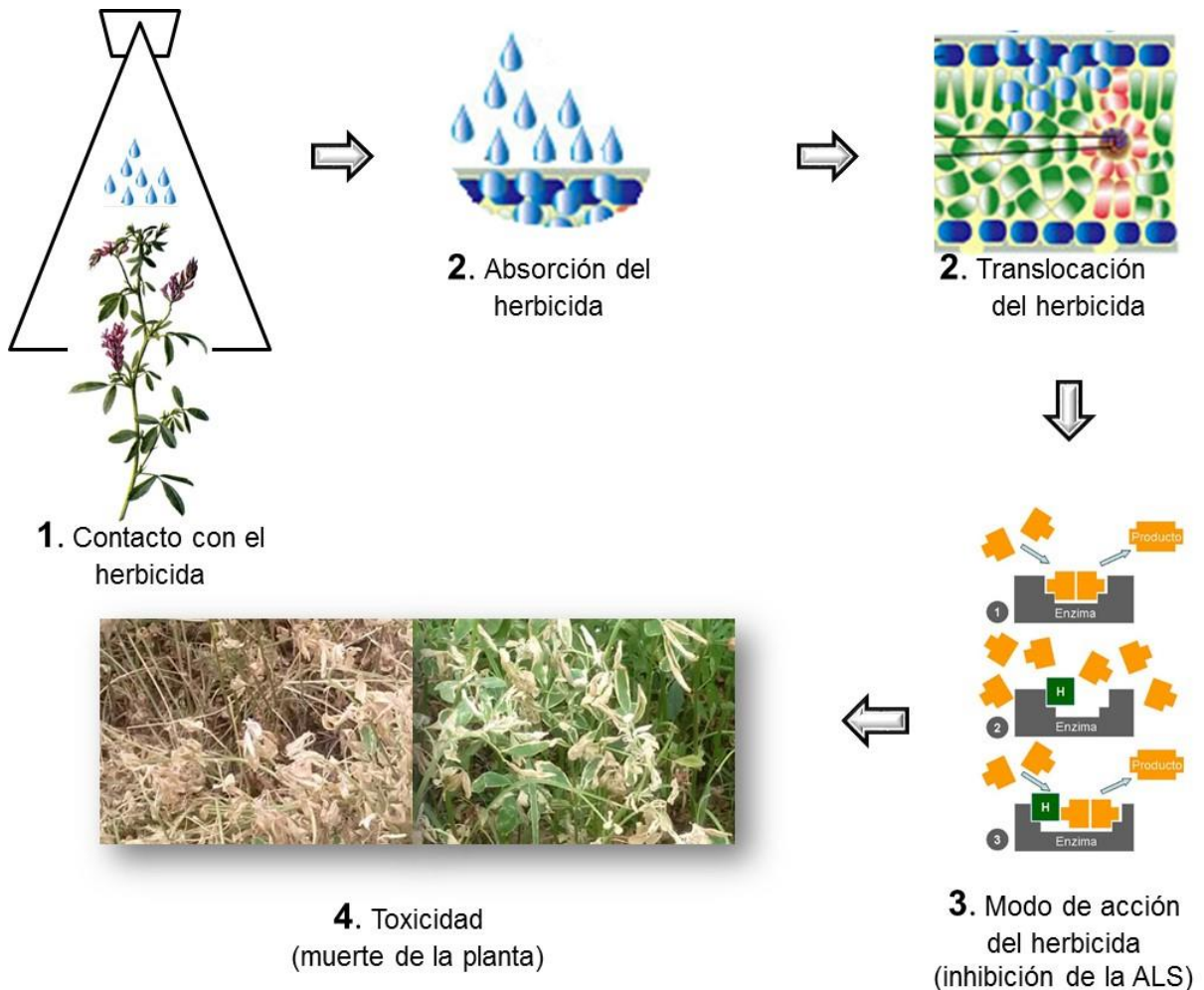
#### **4.14. Modo de acción**

De las clasificaciones utilizadas para los herbicidas, la más útil es según su modo de acción (Duke y Dayan, 2001; Schmidt, 2005). El modo de acción es la secuencia de eventos que ocurren desde la absorción del herbicida hasta la muerte de la planta (figura 2). Los herbicidas con el mismo modo de acción tienen el mismo comportamiento de absorción y transporte y producen síntomas similares en las plantas tratadas (Gusolus 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 Crafts, 1981). Finalmente este tipo de clasificación permite diseñar los programas de control químico de maleza más eficientes y evitar los posibles efectos negativos del uso de herbicidas como son la residualidad en el suelo, el cambio de especies de maleza y el desarrollo de biotipos de maleza resistentes a herbicidas (Heap, 2001; Regehr y Morishita, 1989).

Aunque es común que los términos modo y mecanismo de acción de los herbicidas sean usados como sinónimos, existen claras diferencias entre estos términos. El modo de acción se refiere a los eventos que provocan los herbicidas y el mecanismo de acción al sitio o proceso bioquímico específico que es afectado (Baumann *et al.*, 1998; Gunsolus y Curran, 1996).

Los herbicidas destruyen las malezas interfiriendo los procesos bioquímicos, como la fotosíntesis, que tiene lugar en el simplasto o sistema vivo de la planta. Para que la acción del herbicida tenga lugar deberá haber suficiente cantidad de ingrediente activo del compuesto para que este entre en la maleza y sea transportado hasta el lugar de acción adecuado. La mayoría de los grupos de

herbicidas afectan, bien la fotosíntesis o la división celular y el crecimiento, pero algunos herbicidas parecen afectar más de un punto (Altieri, 1988).



**Figura 2.** Representación esquemática del modo de acción de un herbicida de la familia de las sulfonilureas en la planta.

Se ha visto con anterioridad que el modo de acción es la clasificación más utilizada para los herbicidas en las plantas (Duke y Dayan, Schmidt, 2005), acentuando su importancia a nivel internacional como la clasificación más aceptada, agrupándose en 25 grupos químicos (cuadro 2). Esta clasificación nos brinda mayor información sobre las interacciones entre el herbicida y la planta, permitiendo la elección de un herbicida según su modo de acción, así como

mezclas de ingredientes activo con el fin de erradicar la aparición de malezas resistentes o disminuir la incidencia de resistencia.

**Cuadro 2.** Clasificación de los herbicidas por el modo de acción (HRAC, 2008)

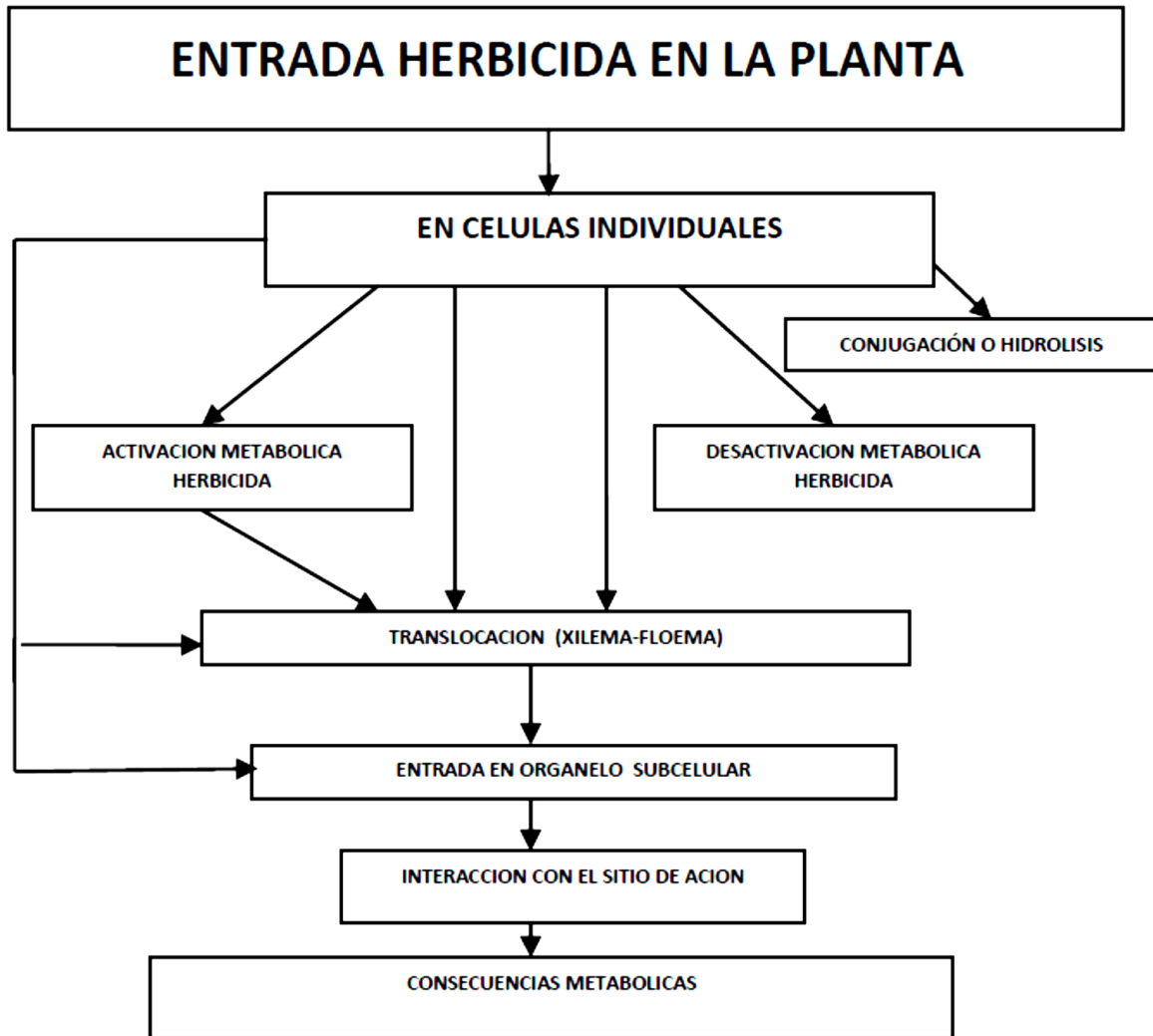
Grupo	Modo de acción	Familia química
A	Inhibición de la acetil CoA carboxilasa (ACCase)	Aniloxifenoxipropionatos, ciclohexanodionas, fenilpirazolinas
B	Inhibición de la acetolactato sintasa (ALS)	Imidazolinonas, sulfonilureas, triazolopirimidinas, pirimidiniltiobenzoatos, sulfonilaminocarboniltiazolinonas
C1	Inhibición de la fotosíntesis en el fotosistema II	Triazinas, triazinonas, uracilos, piridazinona, fenil-carbonatos
C2	Inhibición de la fotosíntesis en el fotosistema II	Ureas, amida
C3	Inhibición de la fotosíntesis en el fotosistema II	Nitrilos, benzotiadiazol, fenil-piridazina
D	Desviación del flujo electrónico en el fotosistema I	Bipiridilos
E	Inhibición del protoporfirinógeno oxidasa (PPO)	Difeniléteres, N-fenil-ftalamidas, tiadiazoles, oxadiazol, triazolinona
F1	Decoloración: inhibición de la síntesis de carotenoides a nivel de la fitoeno desaturasa (PDS)	Piridazinona, nicotinanilida, otros
F2	Decoloración: inhibición de la 4-hidroxifenil-piruvato-dioxigenasa (4-HPPD)	Trikenona, ixosazol, pirazol
F3	Decoloración: inhibición de la síntesis de carotenoides (punto desconocido)	Triazol, isoxazolidinona, urea
G	Inhibición de la EPSP sintetasa	Glicinas
H	Inhibición de la glutamino sintetasa	Acido fosfínico
I	Inhibición del DHP (dihidropterato) sintetasa	Carbamato
K1	Inhibición de la unión de los microtúbulos de la mitosis	Dinitroanilinas, fosforoamidatos, piridazina, ácido benzoico
K2	Inhibición de la mitosis	Carbamatos, benzileter
K3	Inhibición de la división celular	Cloroacetamidas, carbamato, acetamida, benzamida, oxiacetamida
L	Inhibición de la síntesis de la pared celular (celulosa)	Nitrilos, benzamida
M	Desacopladores (alteración de la membrana)	Dinitrofenoles
N	Inhibición de la síntesis de los lípidos (no ACCasa)	Tiocarbamatos, fosforoditioato, benzofurano, ácidos clorocarbónicos
O	Auxinas sintéticas (como la acción del ácido indolacético, AIA)	Acidos fenoxi-carboxílicos, ácido benzoico, ácido piridin-carboxílico, ácido quinolin-carboxílico, otros
P	Inhibición del AIA	Ftalamato, diflufenzopir
R/S/T/Z	Desconocido	Acido arilamino propiónico, organoarsenicales, otros

Desde el punto de vista más simple el modo acción de un herbicida en la planta se resume como las interacciones bioquímicas y fisiológicas del herbicida con la planta. Sin embargo, el modo de acción de un herbicida es algo más que estas

interacciones; implica todo un proceso de etapas relacionadas con la entrada, movimiento y llegada del herbicida hasta el sitio donde ejercerá el efecto fitotóxico en la planta (Devine *et al.*, 1993).

La mayoría de los herbicidas resultan letales para las plantas debido a su acción sobre un sitio primario de trascendental importancia biológica. Esta acción puede producir efectos fitotóxicos secundarios y terciarios que producen la muerte de la planta. En la figura 3, se resumen los pasos desde la entrada de los herbicidas en la planta hasta ocasionar la muerte. El sitio primario es el lugar donde se une el herbicida o interfiere de alguna forma, causando la muerte de la planta. La acción del herbicida se puede estudiar en dos fases: la primera fase, que conlleva el movimiento del herbicida al sitio de acción, mientras la segunda fase conlleva las consecuencias metabólicas resultantes de la interacción en el sitio de acción (Devine *et al.*, 1993).

La primera fase empieza con la entrada del herbicida en la planta, bien por vía foliar o por vía radical. La entrada en la planta es seguida rápidamente por una serie de pasos que preceden la llegada del herbicida a su sitio de acción. Aquí se incluye la entrada a las células, la difusión en distancias cortas, el transporte a largas distancias, la conversión metabólica del herbicida y la entrada en organelos subcelulares. La interacción del herbicida con el sitio de acción se puede considerar el primer paso de la segunda fase; esto está seguido por una serie de consecuencias tóxicas que producen la muerte de la planta.



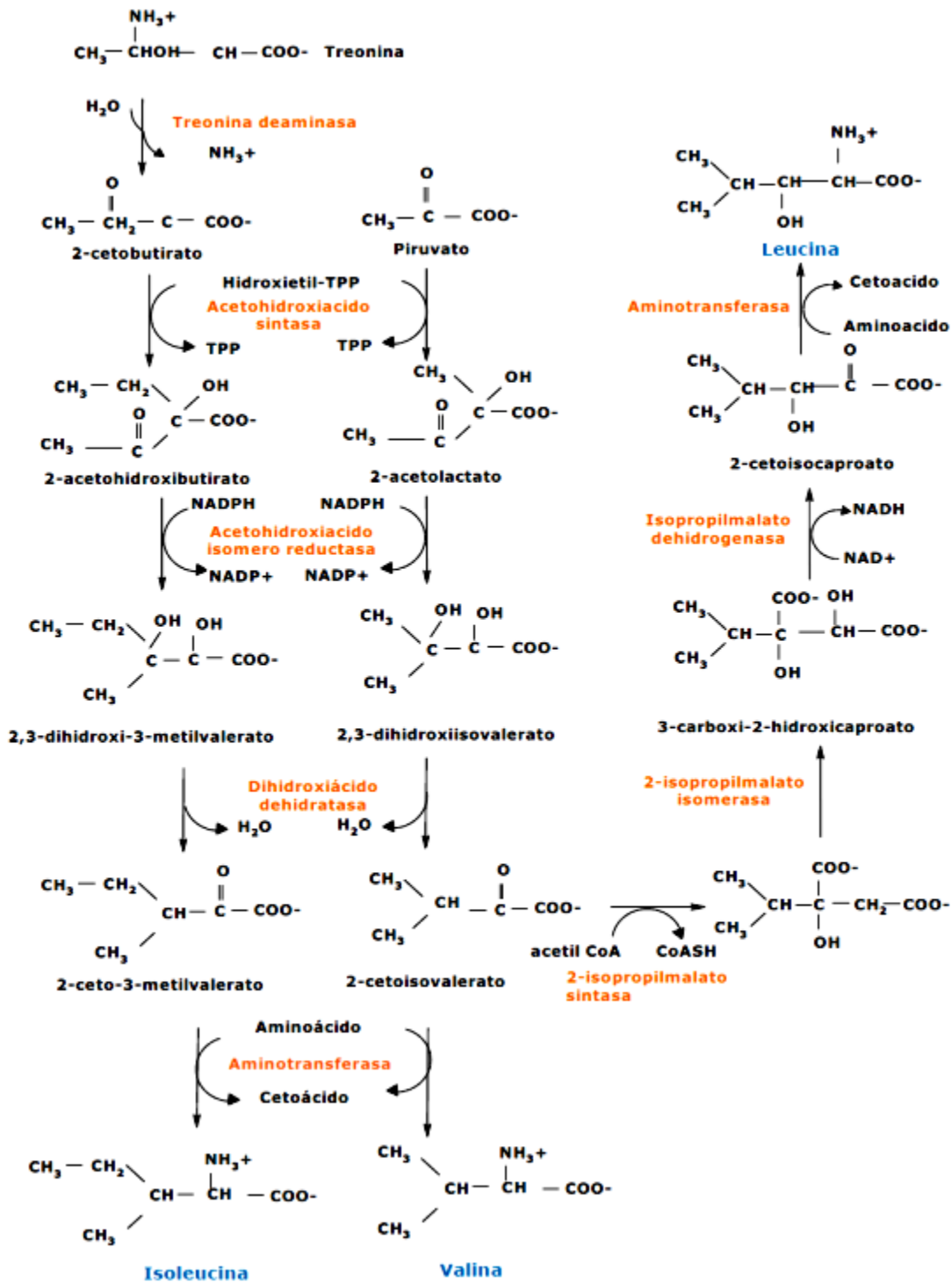
**Figura 3.** Eventos desde la entrada del herbicida hasta la muerte de la planta.

#### 4.15. Acetolactato sintasa

Las enzimas son catalizadores biológicos, que aceleran las reacciones químicas que hacen posible la vida tal como la conocemos (Peter J. y Víctor W., 2010). La enzima acetolactato sintasa (ALS, acetohidroxiácido sintasa, AHAS, E.C. 2.2.1.6) cataliza el primer paso común en la biosíntesis de los aminoácidos de cadena ramificada valina, leucina e isoleucina en plantas y microorganismos (figura 4) (Saari y Mauvais, 1996; Powles y Yu, 2010). Cuatro de las enzimas de la ruta son comunes a la síntesis de los tres aminoácidos de cadena ramificada. La acetolactato sintasa condensa dos moléculas de piruvato para formar  $\text{CO}_2$  y 2-acetolactato, que es el precursor de valina y leucina. La ALS también puede

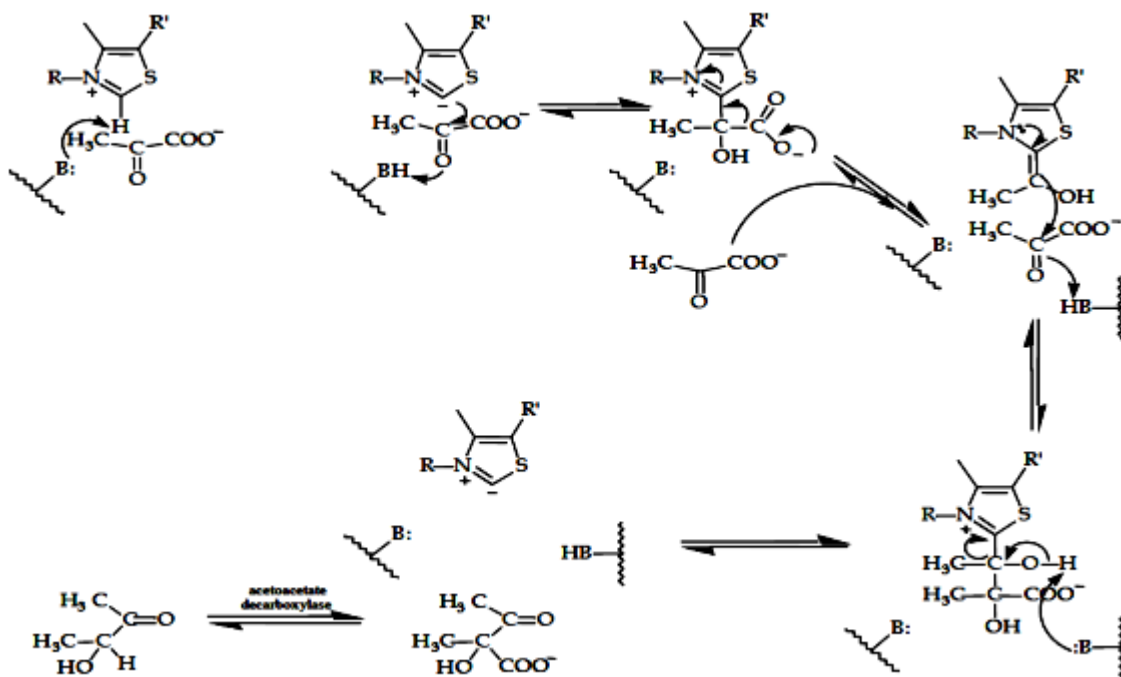
desarrollar la misma reacción con piruvato y 2-ketobutirato para formar  $\text{CO}_2$  y 2-acetohidroxi-butirato, un precursor de isoleucina. La ALS requiere FAD, tiaminapirofosfato (TPP), y Mg o Mn para su actividad, y la enzima produce hidroxietil-TPP (HETPP) como un producto intermedio. En presencia de FAD, la ALS es predominantemente de forma tetramérica. Existen dos formas de ALS en alguna, si no en todas, las plantas superiores. Cada forma tiene sensibilidad característica a los aminoácidos de cadena ramificada y a los herbicidas inhibidores de ALS. La ruta completa puede ser encontrada en los plastidios, aunque las enzimas son codificadas en el núcleo con péptido de tránsito para movimiento propio hacia el plastidio. Los genes que codifican para la síntesis de ALS han sido aislados y caracterizados en tabaco y *Arabidopsis thaliana*, con casi 85% de homología entre los 667 y 670 productos aminoácidos de la proteína, respectivamente (Devine *et al.*, 1993).

El estudio de esta ruta de biosíntesis en plantas es importante debido, entre otras razones: por ser la ruta donde se catalizan tres de los 10 aminoácidos esenciales y por presentar gran valor nutricional, y ser precursores de metabolitos secundarios, como glucosinolatos y glicósidos. La inhibición de esta enzima causa la desnutrición de la planta por falta de síntesis de estos aminoácidos. Este mecanismo primario, junto a los efectos secundarios de producción de 2 ketobutirato, alteración del transporte de fotosintatos y la disminución de la síntesis de proteínas se considera el mecanismo general causante de la muerte de las plantas sensibles a inhibidores de la ALS (Tranel y Wright, 2002).



**Figura 4.** Ruta biosintética de los aminoácidos valina, leucina e isoleucina (Coruzzi y Last, 2000).

En esta ruta existen varios pasos paralelos en los que están involucradas estas cuatro enzimas: acetolactato sintasa (ALS), acetohidroxiácido isomeroreductasa, dihidroxiácido deshidratasa y aminotransferasa. El precursor común para estos aminoácidos es el piruvato. Además para la síntesis de isoleucina se requiere un segundo precursor, el 2-cetobutirato. Este compuesto proviene de treonina que es deaminada por una treonina deaminasa. La reacción que cataliza la ALS incluye la descarboxilación irreversible del piruvato y la condensación del radical acetaldehído con una segunda molécula de piruvato para dar 2-acetolactato, o con una molécula de 2-cetobutirato para dar 2-acetohidroxibutirato. En ambas reacciones se forma un intermediario entre el piruvato y el TPP. La descarboxilación de este intermediario conlleva la formación de un anión de hidroxietil-TPP (HET-PP) el cual actúa como un nucleófilo en el grupo 2-ceto de una segunda molécula de piruvato o 2-oxobutirato, resultando TPP y acetolactato o acetohidroxibutirato (figura 5).



**Figura 5.** Reacción catalizada por la ALS, formando a partir de dos moléculas de piruvato una de acetolactato. La otra reacción catalizada por esta enzima es de la

condensación de una molécula de piruvato y otra de 2-cetobutirato para formar 2-acetohidroxibutirato (Rosario, 2011).

La ALS, requiere FAD lo cual no es justificable ya que esta reacción no conlleva ninguna oxidación o reducción. Se especula que el papel del FAD es un vestigio de una proteína ancestral similar a la piruvato oxidasa, en la cual el FAD juega un papel redox. Las estructuras de estos cofactores se muestran en la figura 6.

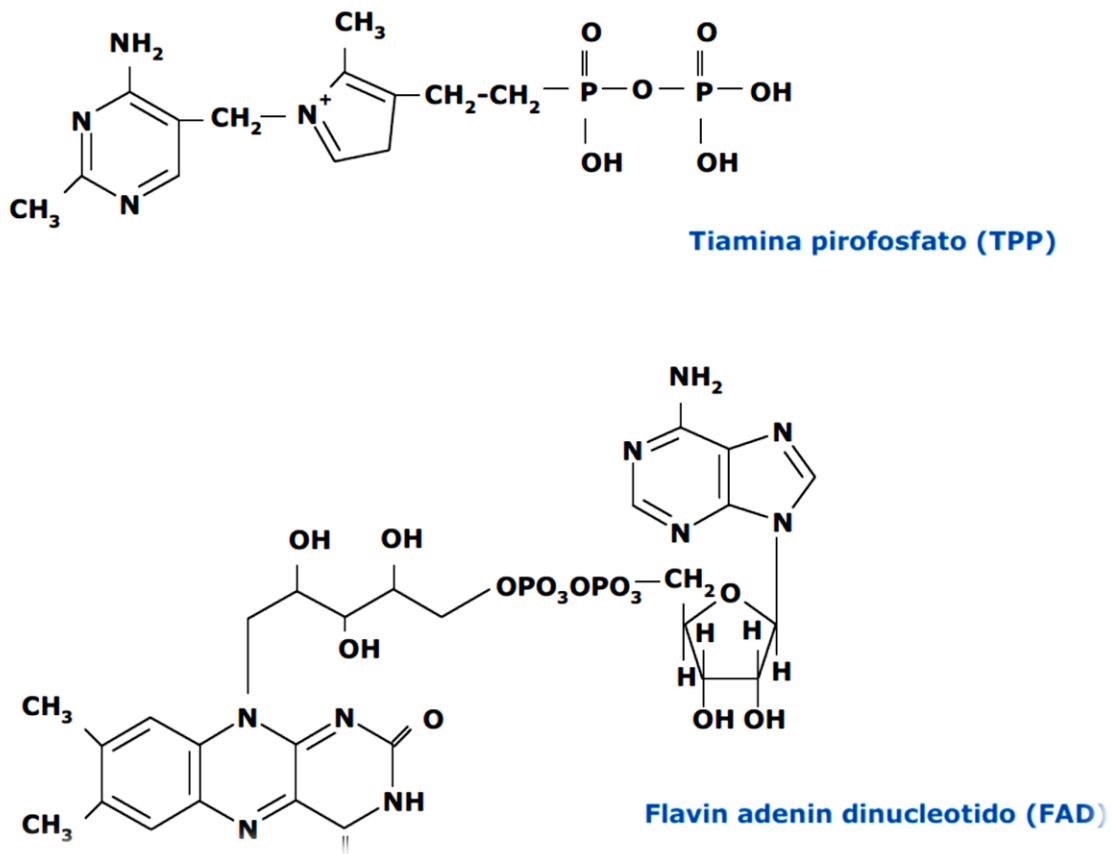


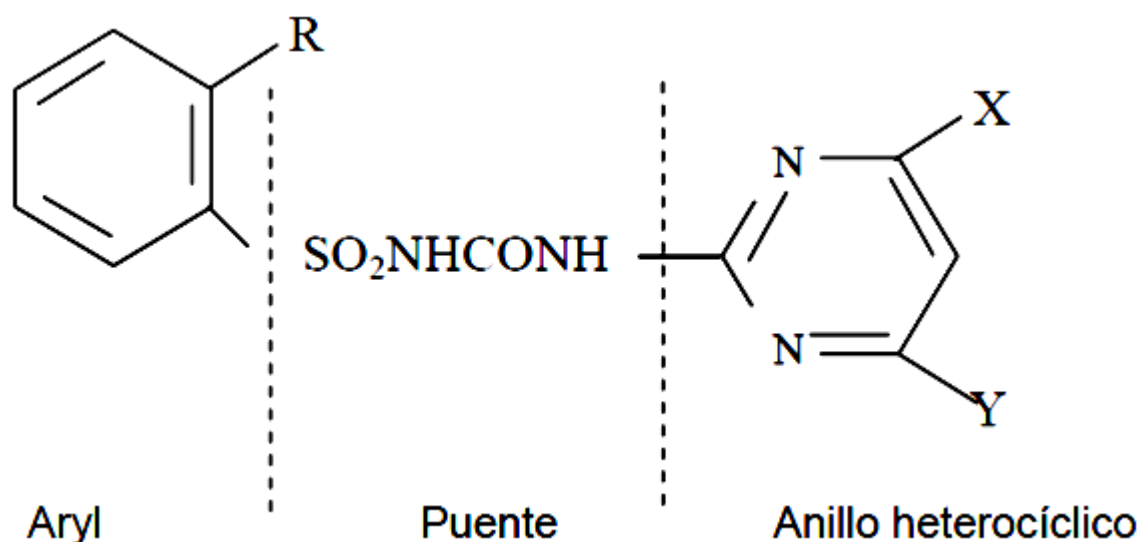
Figura 6. Cofactores de la acetolactato sintasa (ALS).

#### 4.16. Herbicidas inhibidores de la acetolactato sintasa

Dentro del grupo de herbicidas que inhiben la acetolactato sintetasa (ALS) se encuentran, las sulfonilureas como potentes inhibidores de la ALS fue descrita por científicos de Dupont a mediados de los 70 (Levitt, 1978). Desde entonces cientos

de compuestos han sido identificados como inhibidores de esta enzima. En la década de los 80, American Cyanamid desarrolló una serie de herbicidas con estructura de imidazolinona que también inhibían la ALS (Shaner *et al.*, 1984). Estos herbicidas Controlan un amplio rango de malezas gramíneas y de hoja ancha, siendo selectivas para los cultivos como arroz, trigo, cebada, soja y maíz, los cuales tienen la capacidad de metabolizarlas y detoxificarse (Yannicari, 2014).

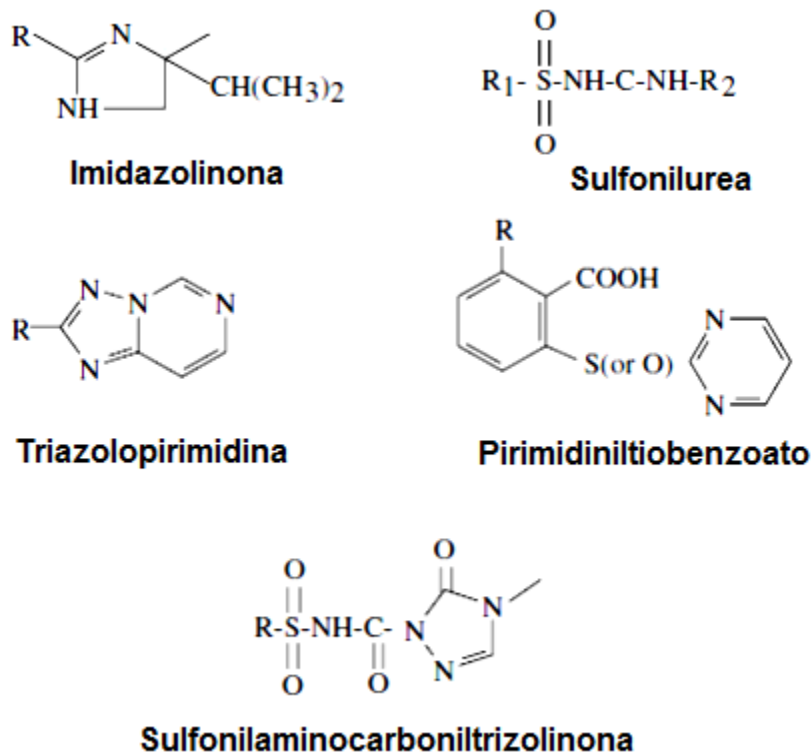
La molécula de este tipo de herbicidas consiste en tres partes: un grupo aryl, el puente sulfonilurea y un anillo heterocíclico que contiene nitrógeno. Cada una de estas partes tiene un rol importante en determinar el efecto herbicida final (figura 7).



**Figura 7.** Estructura química de las sulfonilureas (Hay, 1990).

En la actualidad se conoce que esta enzima es el sitio de acción de varias familias de herbicidas incluidas dentro del grupo B de la clasificación realizada por el Comité de Acción Contra la Resistencia de Herbicidas (figura 8 grupo de gran importancia en la agricultura moderna (Kishore y Shah, 1988; Hawkes, 1989; Hawkes *et al.*, 1989; Devine y Eberlein, 1997; Powles y Yu, 2010).





**Figura 9.** Estructuras químicas de herbicidas inhibidores de la ALS.

Este tipo de herbicidas que inhiben la ALS han tenido gran éxito dentro de la agricultura moderna, no solo por su alta eficacia, sino también por su baja toxicidad en mamíferos y bajo impacto ambiental, amplia selectividad en numerosos cultivos, uso en pre y post-emergencia; así como por el amplio espectro de control sobre varias especies de malas hierbas. En la actualidad este grupo presenta el mayor número de ventas en el mercado (Heap, 2002).

Uno de los aspectos más importantes de la evolución de poblaciones de malezas resistentes a los herbicidas inhibidores de ALS ha sido la alta frecuencia con que ocurre este fenómeno. La selección de biotipos resistentes a inhibidores de ALS, principalmente, es debida al uso repetido de herbicidas en grandes aéreas, no uso de herbicidas con diferentes modos de acción, alta eficacia del herbicida sobre los biotipos sensibles y la residualidad en el suelo del herbicida (Tranel y Wright, 2002).

Los mecanismos involucrados en la resistencia de malezas a herbicidas han sido clasificados por Dekker y Duke (1995), estos autores los agrupan en dos categorías principales:

### 1. Mecanismos de resistencia por exclusión

Dentro de este primer grupo, se distinguen cuatro posibles mecanismos diferenciables:

- a) **Deficiente absorción:** el herbicida no es eficientemente absorbido por la planta debido a características morfológicas como reducida área foliar, superproducción de ceras, mayor espesor de la cutícula, entre otros (Nandula *et al.*, 2008; Michitte *et al.*, 2007).
  
- b) **Traslocación diferencial del herbicida:** tanto por modificaciones a nivel del apoplasto o de la membrana plasmática, el principio activo no llega al sitio blanco. Una condición necesaria para lograr la efectividad de un herbicida es que éste alcance su sitio de acción en una concentración suficiente como para que su efecto sea letal. La falta de movimiento de un herbicida dentro de la planta va a limitar su concentración en el sitio de acción, lo que permitirá mantener su funcionalidad (Feng *et al.*, 2004; Wakelin *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2009).
  
- c) **Compartimentalización:** el herbicida es secuestrado en la vacuola y se limita la llegada al sitio de acción (Ge *et al.*, 2010)
  
- d) **Detoxificación metabólica:** el herbicida es metabolizado hasta perder su carácter fitotóxico lo suficientemente rápido como para que la planta no muera (Reade *et al.*, 2004).

### 2. Mecanismos de resistencia por modificaciones al sitio de acción

En esta gran categoría se distinguen dos mecanismos de resistencia por modificaciones en el sitio de acción:

- a) **Alteración del sitio de acción** por mutaciones en el sitio diana, impidiendo el acople del herbicida a la enzima blanco. Bien pueden haberse generado mutaciones en el sitio activo de la proteína o en regiones que condicionan su afinidad por el herbicida (Patzoldt y Tranel, 2007; Yu *et al.*, 2007; Délye *et al.*, 2008).
  
- b) **Superproducción del sitio de acción** de manera que los efectos del herbicida se “diluyen” y la planta mantiene su actividad metabólica. Esto se puede generar por amplificación génica, el número de copias del gen es mayor en plantas resistentes, o alteraciones en el promotor que favorecen el incremento en la síntesis de la enzima blanco (Gaines *et al.*, 2010).

#### **4.16.1. Sulfonilureas**

Este tipo de moléculas puede ser absorbido tanto por raíces como por follaje y las plantas pueden traslocar sulfonilureas tanto por xilema como por floema (Bayer *et al.*, 1988 citado por Dastghelb *et al.*, 1993), las cuales pueden usarse en pre y post-emergencia en una amplia variedad de cultivos (Beyer *et al.*, 1988).

El mecanismo de acción de la familia de las sulfonilureas es inhibiendo la actividad de la enzima acetolactato sintetasa (ALS). La ALS es la primera enzima y la fundamental en la biosíntesis de valina, leucina e isoleucina, que son las cadenas de amino ácidos esenciales para el crecimiento normal de plantas y bacterias (Saari y Mauvais, 1996; Powles y Yu, 2010).

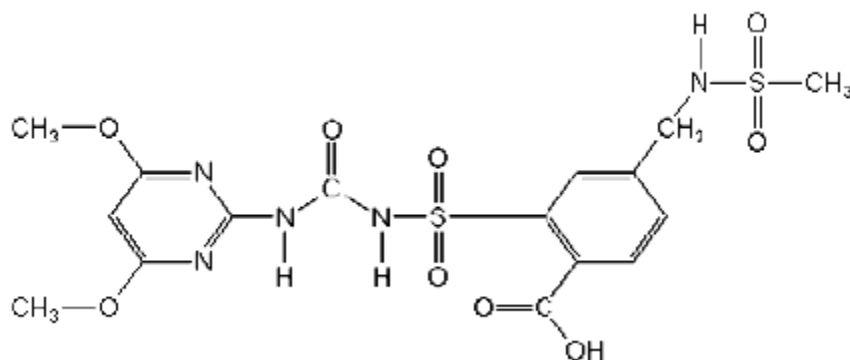
Al inhibirse la síntesis de valina, leucina e isoleucina en las plantas, se produce un rápido descenso de la cantidad de estos tres aminoácidos que podría traducirse en una menor síntesis de proteína. Esta menor tasa de síntesis de proteína, puede causar un enlentecimiento en la tasa de división celular y eventualmente la muerte de la célula. La actividad biológica de estos herbicidas es muy alta, con dosis de

campo que pueden llegar a ser de 2 g ha<sup>-1</sup>. Esta alta eficiencia en campo también se refleja *in vitro* en donde la actividad ALS requiere concentraciones del rango nM para su inhibición. En contraste, su toxicidad en animales es muy baja (ej. el clorsulfurón en ratas tiene un LD50 de aproximadamente 6 g por kg de peso) (Yanniccari, 2014).

Dentro de las sulfonilureas encontramos compuestos como el Mesosulfurón metil y al Iodosulfurón metil. El Mesosulfurón metil + Iodosulfurón metil, se caracteriza por afectar la actividad de la acetolactato sintasa (E.C.2.2.1.6) e inhibir la síntesis de aminoácidos de cadena ramificada, y que a su vez modifican la cadena de transporte del complejo fotosistema II (Zhou *et al.*, 2007) y generan estrés oxidativo en las plantas consideradas como malezas debido a procesos de lipoperoxidación a nivel de membrana en el cloroplasto (Dayan *et al.*, 2012).

#### 4.16.1.1. Mesosulfurón metil

Es activo como pirimidinilsulfonilurea, inhibiendo la ALS, con lo que se detiene el desarrollo y se produce la muerte de la planta (figura 10). Es de aplicación en postemergencia en cereales, para control de malas hierbas gramíneas y hojas anchas. Algunas de las malas hierbas que controla en postemergencia temprana son *Alopecurus myosuroides*, *Avena fatua*, *Apera spica-venti*, *Avena sterilis*, *Bromus sp.*, *Lolium spp.*, *Amaranthus Anagallis arvensis*, *Sinapis arvensis* y *Stellaria media*, entre otras (Senseman, 2007).



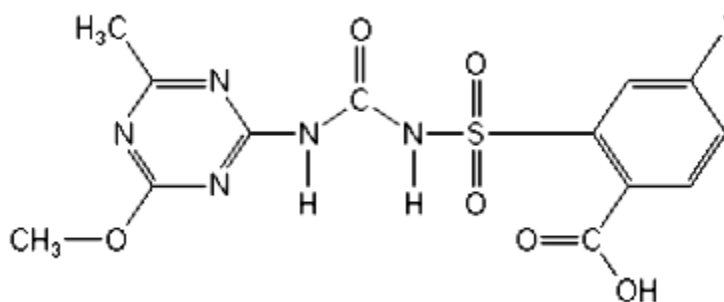
**Figura 10.** Estructura del Mesosulfurón metil.

La masa molecular y la formula química desarrollada del Mesosulfurón metil es:

- Masa molecular: 503.51
- Formula química: C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub>S<sub>2</sub>

#### 4.16.1.2. Iodosulfurón metil

Es un herbicida sulfonilurea inhibidor de la ALS, de aplicación en postemergencia para control de malezas de hojas anchas en cereales a 10 g i.a./ha (figura 11). Es fabricado por Aventis, y el formulado viene en mezcla con mefenpir dietil. Es absorbido por el follaje y las raíces, y la translocación ocurre por el floema. El mecanismo de resistencia es un sitio de acción alterado (ALS) (Senseman, 2007).



**Figura 11.** Estructura del Iodosulfurón metil.

Algunas de las propiedades físicas y químicas del producto puro son:

- Masa molecular: 529.24
- Estado físico: color blanco ligero y polvo cristalino
- Densidad: 0.7 g mL
- pKa: 3.22
- Formula química: C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>NaO<sub>6</sub>S

#### 4.17. Toxicidad por Mesosulfurón metil + Iodosulfurón metil en alfalfa

El Valle de Mexicali, Baja California México, se caracteriza por ser una zona con gran actividad agrícola de entre los principales cultivos sembrados destacan alfalfa, trigo y algodón (Vargas-Bejarano *et al.*, 2012). El cultivo de alfalfa alcanzó

una superficie de siembra de 26,490 hectáreas, con rendimiento promedio de 16,010 toneladas por hectárea y una producción de 414,067.01 toneladas de alfalfa henificada, en el ciclo agrícola 2013-2014 en el Valle de Mexicali, Baja California (SAGARPA 2015); lo cual, presenta una relevancia dentro de los principales cultivos que incrementan la economía en la región Noroeste de México. Este cultivo se realiza mayoritariamente en parcelas aledañas a la siembra de trigo.

Recientemente, en diversas parcelas del cultivo de la alfalfa en el Valle de Mexicali y San Luis Río Colorado se han presentado síntomas de toxicidad por la aplicación indirecta o accidental del herbicida (mesosulfuron metil + iodosulfuron metil) empleado en el control de malezas en parcelas de trigo aledañas a estos cultivos. Lo cual al presentar toxicidad ocasionada por los herbicidas usados en el cultivo de trigo, presenta un índice de siniestralidad de 2.4%, lo que se traduce en 599 hectáreas plantadas con alfalfa que no pudieron cosecharse debido a pérdidas totales del cultivo; dicho indicador está por encima de la media estatal, que es de 1.8 por ciento (INEGI, 2007).

Sin embargo hay poca o nula información sobre el efecto fitotóxico que se han venido presentando en diferentes lotes, por lo cual algunos productores han manifestado su denuncia a estancias gubernamentales ya que sus predios presentan problemas de desarrollo provocado por el arrastre de herbicida desde un predio vecino donde se aplicó este producto para el control de malezas en trigo. El efecto fitotóxico causado por el herbicida (Mesosulfurón metil + Iodosulfurón metil) se manifiesta en daños severo con alteraciones fisiológicas y plantas muertas (Figura 12: A, B, C daño severo en plantas de alfalfa, D desarrollo normal en plantas de alfalfa) en condiciones similares a las ocasionadas por la aplicación del producto; sin embargo, la única manera de determinar las causas que provocaron estas alteraciones, es mediante el análisis del follaje que permita identificar el compuesto químico causante del problema. Considerando la dificultad que se ha presentado por la carencia de servicios especializados que requiere

este análisis, se sugiere otra opción, en la que un técnico especialista en el manejo de este tipo de producto, pueda reproducir el efecto del herbicida del cual se sospecha es el causante del problema en el cultivo de la alfalfa.



**Figura 12.** Letras A, B, C daño severo en plantas de alfalfa, D desarrollo normal en plantas de alfalfa.

Para estudiar los efectos de diversas tensiones (incluyendo herbicidas) en las plantas, puede ser representado a través de las características agronómicas (área foliar, color de la hoja, velocidad de crecimiento de las plantas y del rendimiento, etc.), variaciones fisiológicas (contenido de clorofila, la fotosíntesis y la peroxidación lipídica, etc) (Kocurek V. *et al.*, 2009; Tan W. *et al.*, 2012), y el comportamiento en la actividad enzimática de proteínas relacionadas con el estrés

en plantas de alfalfa expuestas a Mesosulfurón metil + Iodosulfurón metil como posibles indicadores de toxicidad en plantas de alfalfa.

#### **4.17. Eficiencia fotosintética (Fv/Fm)**

Diversos factores físicos o químicos de estrés ambiental como temperaturas altas, heladas sequía, cambios en la intensidad luminosa, salinidad, deficiencias nutricionales, presencia de metales pesados, detergentes, herbicidas y ozono entre otros, afectan la función del PSII de manera directa o indirecta lo cual modifica la emisión de la fluorescencia. Por ello, los cambios en la emisión de la fluorescencia, pueden utilizarse para revelar mecanismos de respuesta, cuantificación de respuestas al estrés e identificación de ciertos contaminantes y sus fuentes (Maxwell y Johnson, 2000; Appenroth *et al.*, 2001). El parámetro más usado en la emisión de la fluorescencia es el rendimiento cuántico máximo para la fotoquímica primaria cuando todos los centros de reacción del PSII están oxidados o "abiertos" (Fv/Fm) Krause y Weis, 1991). Donde Fv es la fluorescencia variable y Fm es la fluorescencia máxima cuando una planta está adaptada a condiciones de luz (Gemel *et al.*, 1997; Maxwell y Johnson, 2000). La medición de la eficiencia a través de la fluorescencia se fundamenta en el proceso de transferencia de electrones durante la fotosíntesis (Gabriel A., 2006), la cual la hoja se adapta previamente a la oscuridad por 10-30 minutos, posteriormente se expone a luz de 650 nm con una intensidad de alrededor de  $3000 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  durante 1-10 segundos y simultáneamente se miden y almacenan los valores de la fluorescencia emitida únicamente por la clorofila del PSII, desde los 10  $\mu\text{s}$  hasta los segundos programados.

#### **4.19. Índice de verdor (SPAD-502) (Hawkins *et al.*, 2009)**

El medidor portátil de clorofila SPAD-502, es un instrumento que proporciona un método para una respuesta rápida y no destructiva para la estimación de la clorofila y otras variables relacionadas, proporcionando así una vía para evaluación inmediata de las variables fisiológicas y el seguimiento de los cambios

fisiológicos en el tiempo. Los medidores de clorofila se utilizan ampliamente en la agricultura para la estimación de la clorofila en numerosas especies vegetales.

El valor SPAD (Soil Plant Analysis Development) son medidas relativas del contenido de clorofila en la hoja, las cuales son medidos entre 650 nm (rojo) y 940 nm (infrarrojo). Los cuales se basan en el principio de que parte de la luz que llega a la hoja es absorbida por la clorofila y el resto que se refleja entra en contacto con la celda detectora del SPAD-502 y es convertida en una señal eléctrica. La cantidad de luz captada por la celda es inversamente proporcional a la cantidad de luz utilizada por la clorofila, la señal es procesada, y la absorbancia es cuantificada en valores dimensionales que van de 0 a 199, por lo que las unidades SPAD serán siempre las mismas de acuerdo con el tono verde de las hojas (Krugh *et al.*, 1994). El principio de medición del Minolta SPAD-502 es medida por la transmitancia, basada en la longitud de onda de los 650 nm (verde) y 940 nm (infrarrojo) usando la siguiente ecuación (Ahmad *et al.*, 1999):

$$SPAD = K \log_{10} \left[ \frac{IR_t / IR_o}{R_r / R_o} \right]$$

SPAD: Unidades SPAD de clorofila

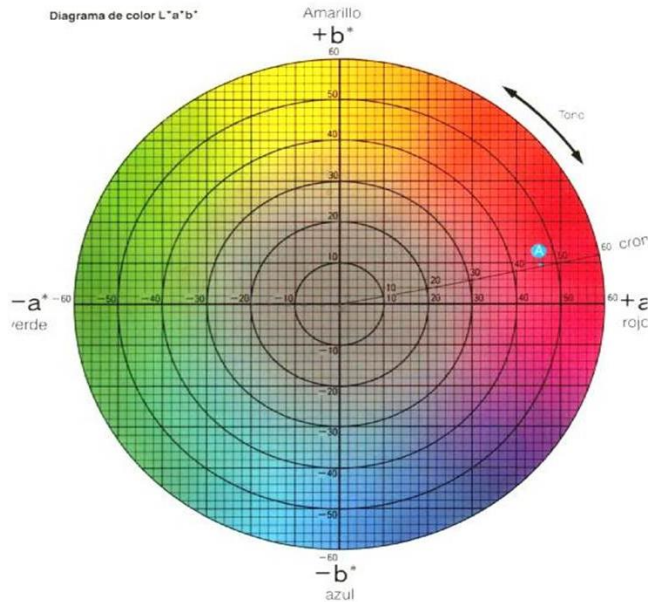
K: constante

IR<sub>t</sub>: Transmitancia de NIR (940 nm)

IR<sub>o</sub>: Poder de la luz de NIR

#### **4.20. Determinación de color (°Hue)**

La tonalidad se midió con un espectrofotómetro de esfera X-Rite 62 previamente calibrado, las mediciones se tomaron en base al disco de color (Figura 13). Los resultados se expresaron en tono (°Hue) según Little (1975).



**Figura 13.** Diagrama del sistema de notación de color L, a\*, b\*, cromaticidad y ángulo de matiz.

Los espectrofotómetros, que son equipos que miden la cantidad de luz transmitida o reflejada (según sean líquidos transparentes o sólidos opacos) con relación a una referencia estándar. En el caso de la medición del color se trabaja dentro de la zona visible del espectro (aproximadamente 380-750 nm) (Durán, 1984).

Consta, en esencia, de una fuente de luz blanca que al pasar a través de un prisma proporciona el espectro de la misma del cual pueden aislarse diferentes porciones mediante una red de difracción. La luz monocromática resultante pasa a través de la muestra dando lecturas de transmisión o reflexión. La luz procedente de la muestra es recogida por un fotodetector y transformada en lecturas de transmisión o reflexión para cada longitud de onda. (Calvo y Durán, 1997).

También permite evaluar los cambios de color a lo largo del tiempo sobre la misma muestra. Es una técnica rápida y fácil de realizar (Kropf *et al.*, 1984; Hunt *et al.*, 1991).

#### 4.21. Especies reactivas de oxígeno

Desde la introducción del oxígeno molecular ( $O_2$ ) en nuestra atmósfera y su relación con organismos fotosintéticos aproximadamente hace 2.7 billones de años, las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) han sido compañeras inoportunas de la vida aeróbica (Halliwell y Gutteridge, 1999). Las ROS son formas de oxígeno atmosférico (Halliwell y Gutteridge, 1999; Mittler, 2002).

Un radical libre es una especie química que contiene uno o más electrones desapareados en sus orbitales externos. Un compuesto puede convertirse en radical libre captando o perdiendo un electrón. Como consecuencia de poseer electrones desapareados, estas especies químicas son extremadamente reactivas, tienen, por tanto, una vida media corta y su concentración en el estado estacionario es baja (Armstrong *et al.*, 1984, Cadenas 1989; Pryor 1986; Webster y Nunn 1988). Para conseguir la estabilidad modifican a moléculas de su alrededor provocando la aparición de nuevos radicales, por lo que se crea una reacción en cadena que dañará a muchas células y puede ser indefinida si los antioxidantes no intervienen. Usualmente resultan de la excitación del  $O_2$  a una forma sencilla de oxígeno ( $O_2^1$ ) o de la transferencia de uno, dos o tres electrones del  $O_2$  para formar, radical superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) o un radical hidroxilo ( $HO^-$ ). En contraste con el oxígeno atmosférico, las ROS son capaces de oxidar sin restricción varios componentes celulares y pueden inducir la destrucción oxidativa de la célula (Asada, 1999; Dat *et al.*, 2000). Las ROS como  $O_2^1$ ,  $H_2O_2$ ,  $O_2^-$  y  $HO^-$  son moléculas tóxicas capaces de causar daño oxidativo a las proteínas, ADN y lípidos (Apel y Hirt, 2004).

Bajo condiciones óptimas de crecimiento, son principalmente producidas a bajos niveles en organelos como cloroplastos, mitocondria y peroxisomas. Las ROS pueden ser tóxicas cuando se acumulan en exceso, es por eso que los organismos aerobios han desarrollado sistemas de protección, que permiten el equilibrio entre su formación y eliminación. Estos sistemas reciben el nombre de antioxidantes (Gutteridge y Halliwell, 2000).

Sin embargo el equilibrio entre producción y eliminación de las ROS puede ser obstaculizado por diferentes situaciones ambientales, estreses abióticos tales como sequía, bajas temperaturas, salinidad, metales pesados, contaminantes o herbicidas entre otros; como resultado de éstas los niveles de ROS pueden elevarse rápidamente (Prasad *et al.*, 1994; Dat *et al.*, 2000; Sandalio *et al.*, 2001; Romero-Puertas *et al.*, 2004). Cuando el aumento del contenido intracelular de ROS sobrepasa las defensas antioxidantes de la célula se produce el estrés oxidativo, a través del cual se induce daño a moléculas biológicas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Gutteridge y Halliwell, 1999).

#### **4.22. Peroxidación lipídica**

Todas las células están rodeadas por una membrana que las separa del medio extracelular. La membrana celular contiene proteínas que juegan papeles vitales en la interacción de la célula con otras células, hormonas y agentes reguladores del líquido extracelular. La estructura básica de todas las membranas biológicas es la bicapa lipídica, la que funciona como una barrera de permeabilidad selectiva (Goodam, 1998). Éstas son ricas en ácidos grasos poliinsaturados y por lo tanto vulnerables al ataque de radicales libres que traen como consecuencia la peroxidación lipídica. Esta es generalmente inducida por un radical hidroxilo que sustrae un hidrógeno a la cadena lateral de un ácido graso formando un radical carbonado, lo que genera una cadena de reacciones oxidativas. La presencia de xenobióticos (Metales pesados, plaguicidas, etc.), causa un desequilibrio en las reacciones redox celulares, el cual permite la formación de ROS y subsecuente peroxidación lipídica (Halliwell y Gutteridge, 2000; Rodríguez-Serrano y col., 2006). En estas situaciones se ha observado un aumento en la peroxidación lipídica se utiliza como un indicador de estrés oxidativo (Gogorcena *et al.*, 1995; Sandalio *et al.*, 2001; Romero-Puertas *et al.*, 2004a; Sunohara y Matsumoto, 2008). Los antioxidantes, pueden formar complejos estables impidiendo la acción catabólica de los radicales libres en la membrana celular (Halliwell, 1990).

### **4.23. Estrés en plantas**

Los diferentes tipos de estrés ambientales como la salinidad, la sequía, la temperatura, la contaminación aérea, los metales pesados, los pesticidas y el pH del suelo representan los mayores factores que limitan la producción de las cosechas (Prasad *et al.*, 1994; Zhang y Kirkham, 1996; Badiani *et al.*, 1993; Gossett *et al.*, 1996), debido a que estos estreses afectan casi todas las funciones de las plantas (Hernández, *et al.*, 2001).

La exposición de las plantas a diferentes tipos de estrés contribuye a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) [radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radical hidroxilo ( $HO^{\cdot}$ )], las que al no eliminarse, producen daño a moléculas y orgánulos de la célula, concluyendo con la muerte celular por oxidación (Sairam y Tyagi, 2004).

Las plantas que son expuestas a estrés severo han mostrado una incrementada susceptibilidad a la fotoinhibición con el subsecuente desarrollo de la clorosis (Wise y Taylor, 1987). Los daños fotooxidativos son exacerbados por contaminantes atmosféricos, herbicidas, metales pesados y compuestos naturales como la cercosporina producida por hongos del género *Cercospora* (Arora *et al.*, 2002).

#### **4.23.1 Estrés en plantas por herbicidas**

Numerosos herbicidas generan especies activas del oxígeno ya sea por unión directa o por inhibición de rutas biosintéticas. Herbicidas como la bipyridinina y el paraquat generan radicales del oxígeno en presencia de luz, induciendo daños oxidativos en las plantas (Arora *et al.*, 2002). La reducción del paraquat dicatiónico (por medio del PSI) provoca la formación de un radical monocatiónico, el cual reacciona con el oxígeno molecular para producir  $O_2^{\cdot-}$  con la subsecuente producción de otras especies tóxicas como el  $H_2O_2$  y OH (Eltner *et al.*, 1988).

Los éteres difenílicos, las imidas cíclicas y los derivados de lutidina actúan inhibiendo rutas biosintéticas que provocan la acumulación de intermediarios

reactivos formadores de radicales (Arora *et al.*, 2002). El modo de acción de estos herbicidas está basado en la capacidad de inducir la acumulación de tetrapirroles fotosintetizadores anormales, específicamente protoporfirinas (Matringe y Scalla, 1988).

Otros compuestos como el diurón bloquean la cadena transportadora de electrones fotosintética, incrementando la transferencia de la energía de excitación de la clorofila en estado de triplete hacia el O<sub>2</sub>. Otros herbicidas como el norflurazón inhiben la biosíntesis de pigmentos carotenoides lo cual elimina la formación de importantes disipadores de energía de la clorofila en su estado de triplete excitado y O<sub>2</sub>. Lukatki *et al.* (2013), encontraron que en tratamientos con el herbicida TOPIK se indujeron cambios como un aumento en la peroxidación lipídica, en la generación de anión superóxido O<sub>2</sub><sup>(-)</sup>, en un incremento en la actividad antioxidante total, así como enzimas como catalasa, ascorbato peroxidasa, observando también que el nivel más alto de generación de O<sub>2</sub><sup>(-)</sup> fue observado en las hojas del maíz y el trigo en invierno tratado por 800 µ la g/L CP, tanto en corto como a largo plazo, así como un incremento en las enzimas antioxidantes lo que indujo el estrés oxidativo en plantas de trigo, maíz y centeno.

#### **4.24. Sistemas antioxidantes en las plantas**

La capacidad antioxidante celular está dada por mecanismos a través de los cuales la célula anula la reactividad y/o inhibe la generación de radicales libres (Thornalley y Vasak, 1985; Greenwald, 1990; Palamanda y Kehrer, 1992). Normalmente las plantas poseen mecanismos enzimáticos para la eliminación de las ERO (Kumar, 2011; Iturbe-Ormaetxe, Escudero, Arrese-Igor y Becana, 1998), cuentan con sistemas antioxidantes eficientes proveen protección a las mismas frente a los daños provocados por las especies reactivas del oxígeno. Estas defensas antioxidantes se encuentran localizados en diferentes compartimentos celulares (Alscher *at al.*, 1997).

#### **4.24.1. Sistema antioxidante enzimático**

Las enzimas antioxidantes constituyen un grupo de enzimas antiestrés que intervienen en la eliminación de las especies reactivas del oxígeno. Su función es prevenir la iniciación de las oxidaciones en cadena, al eliminar las especies de oxígeno parcialmente reducidas ( $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$ ) (Gutteridge y Halliwell, 2000). Entre las enzimas antioxidantes se encuentran: Superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), peroxidasa (POD), ascorbato peroxidasa (APX) y glutatión reductasa (Asada, 1992; Scandalias, 1990).

##### **4.24.1.1. Superóxido Dismutasa**

La superóxido dismutasa (EC. 1.15.1.1.; SOD) es una enzima importante en la defensa antioxidante y se da en diversos compartimientos celulares (Gill y Tuteja, 2010), la cual proporciona protección de las plantas y la tolerancia a los herbicidas. La superóxido dismutasa constituye una familia de metaloenzimas que cataliza la dismutación del radical superóxido a  $H_2O_2$  y  $O_2$  (Scandalios, 1993). Esta reacción es 10 000 veces más rápida que la dismutación espontánea del anión superóxido (Bowler *et al.*, 1992). Han sido reportadas 3 isoenzimas nombradas Mn-SOD, Cu-Zn-SOD y Fe-SOD en varias especies. Aunque recientemente se descubrió en *Streptomyces* otro tipo de SOD con níquel en su centro activo (Kim *et al.*, 1996).

La Mn-SOD se encuentra principalmente en mitocondria (Hernandez, *et al.*, 1999) y peroxisomas (Sandalo, *et al.*, 1987, Corpas, *et al.*, 1998), aunque también ha sido localizada en forma soluble en la fracción citosólica (Hernández *et al.*, 2000). Se ha encontrado además en organismos procariotas (Blokhina *et al.*, 2002). La Cu-Zn-SOD ha sido localizada tanto en la fracción citosólica (Hernandez *et al.*, 1999) como en cloroplastos, mitocondria y también en bacterias gram negativas (Blokhina, *et al.*, 2002).

De igual forma, la Fe-SOD aunque es detectada predominantemente en los cloroplastos (Gomez *et al.*, 1999), ha sido reportada en el citosol (Becana *et al.*,

1986), mitocondria (Salin, 1988) y peroxisomas (Droillard y Paulin, 1989), así como en organismos procariontes (Blokhina *et al.*, 2002). Estas isoenzimas se diferencian teniendo en cuenta la sensibilidad al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y al KCN (Bannister *et al.*, 1987).

Todas las SOD son expresadas en el núcleo, y los genes que codifican para las mismas han mostrado sensibilidad a estreses ambientales, debido probablemente al incremento en las concentraciones de las ERO (Blokhina, *et al.*, 2002).

#### **4.24.1.2. Peroxidasas**

Las peroxidasas (EC 1.11.1.7.; POD) constituyen un grupo de enzimas cuya función primaria es oxidar sustratos a expensas del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, encontrándose en plantas, mamíferos, hongos y organismos procariontes (Asada, 1992).

La peroxidasa es una hemoproteína monomérica que cataliza la oxidación de un amplio número de sustratos (fenoles, aminas aromáticas, e hidroquinonas) utilizando peróxido de hidrógeno como cofactor. Se encuentra en los peroxisomas, en los cloroplastos, en las vacuolas y en la pared celular (Narváez, 2002). Además de estar relacionada en la protección de la célula contra daños oxidativos causados por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, también interviene en el pardeamiento enzimático y en los procesos infecciosos, así como en la elongación de la raíz, en los procesos de lignificación de la pared celular y en la degradación oxidativa del ácido indol-3-acético (Jansen *et al.*, 2004). Así mismo, participa en varios procesos celulares como: desarrollo y organogénesis de la planta, senescencia, defensa de patógenos y heridas (Gechev *et al.*, 2003). En bacterias y organismos animales se han identificado y caracterizado diferentes enzimas dependientes de selenio, entre las que se incluyen la actividad glutatión peroxidasa (GPX) (Stadman, 1990; Läuchli, 1993).

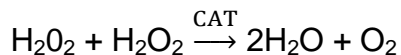
En animales se han llegado a determinar hasta cuatro grupos de GPXs caracterizadas por su estructura, especificidad de sustrato y distribución en el

tejido (Eshdat y col., 1997). Esta actividad se ha detectado también en cultivos celulares de espinaca y maíz, así como en plantas de *Lemna* (Drotar y col., 1985) y en semillas de guisante etioladas (Edwards, 1996).

Las peroxidasas utilizan una gran variedad de donadores de electrones y reciben distintos nombres en función de la naturaleza del sustrato. En general, se utiliza el término guayacol peroxidasas por ser el guayacol el donador más utilizado en los ensayos de laboratorio.

#### **4.24.1.3. Catalasa**

La catalasa (EC.1.11.1.6.; CAT) es una enzima que cataliza la descomposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, donde una molécula de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es reducida a agua, mientras que la otra es oxidada a O<sub>2</sub>:



Esta reacción se encuentra favorecida por concentraciones elevadas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Chance y col., 1997).

La catalasa contiene hierro en su estructura y cataliza la dismutación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en agua y oxígeno molecular (Arora *et al.*, 2002). La catalasa está localizada en peroxisomas, y previene la difusión de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a otros compartimentos celulares. Son numerosos los estudios que han puesto de manifiesto que la catalasa es una enzima esencial en el mecanismo de defensa frente a distintos tipos de estrés (Willekens y col., 1997). La actividad catalasa se encuentra localizada de forma exclusiva en peroxisomas/glioxisomas, por lo que se utiliza habitualmente como marcador de estos orgánulos celulares (del Río y col., 2006).

La catalasa fue una de las primeras enzimas en ser aislada y obtenida con un alto grado de pureza. Todas las formas enzimáticas de la catalasa son tetraméricas con pesos moleculares de aproximadamente 220 KDa. Se han descrito diferentes

isoformas de catalasa en plantas (Eising y col., 1990; Havir y col., 1996; Corpas y col., 1999). Estas formas han sido clonadas de maíz (Redinbaugh *et al.*, 1988; Sandalias, 1990) y genes homólogos que han sido clonados a partir de otro grupo de plantas.

En maíz se encuentran tres isoformas denominadas CAT-1, CAT-2 y CAT-3, cuyos genes se encuentran localizados en diferentes cromosomas y son expresados y regulados de manera diferente e independiente (Scandalios, 1990). CAT-1 y CAT-2 están localizados en peroxisomas y en el citosol, mientras que CAT-3 se encuentra en mitocondria. Estudios detallados de la estructura de la catalasa extraída de hígado de ganado vacuno ha mostrado cuatro sitios de unión al NADPH por cada unidad tetramérica (Fita y Rossmann, 1985), pero estos sitios no están en estrecha asociación con el centro activo involucrado en la degradación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; sino que el NADPH funciona en la catalasa animal protegiendo a la enzima frente a la inactivación por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Kirkman *et al.*, 1987). Sin embargo, la catalasa extraída de plantas de *Solanum tuberosum* no contienen NADPH en su estructura (Beaumont *et al.*, 1990).

Otro mecanismo enzimático es la enzima involucrada en la vía fenilpropanoide, como la fenilalanina amonio liasa, la cual participa de manera determinante en la generación de compuestos fenólicos (Dixon *et al.*, 1995) y estructuras de defensa en las plantas (Alain-M *et al.*, 2000).

#### **4.24.1.4. Fenilalanina amonio liasa (PAL)**

La PAL es la enzima que, al catalizar la primera reacción de la ruta fenilpropanoide, se ha encontrado que puede regular la generación de los diferentes metabolitos obtenidos por esta vía biosintética y ha sido relacionada, por ello, con mecanismos de defensa que se activan en otros modelos (Mohammadi *et al.*, 2002; Heather *et al.*, 2002 y Modafar *et al.*, 2001).

#### **4.24.2. Antioxidantes no enzimáticos**

También se denominan antioxidantes estequiométricos por su capacidad de neutralizar un radical libre por molécula. Los más importantes son el ascorbato y el glutatión (GSH), así como el tocoferol, flavonoides, alcaloides y carotenoides. Normalmente actúan a concentraciones relativamente elevadas (Halliwell y Gutteridge, 2000).

#### **4.25. Metabolismo de los herbicidas**

El metabolismo de los herbicidas en las plantas es definido como el conjunto de reacciones químicas que sufren los herbicidas luego de su entrada a la planta y que derivan en la modificación de sus características físico-químicas iniciales, el cual constituye el mecanismo más importante de selectividad de los herbicidas entre malezas y cultivos o entre malezas susceptibles y tolerantes (Anzalone A. 2008). Las plantas tolerantes detoxifican al herbicida con suficiente rapidez como para evitar que cantidades fitotóxicas del ingrediente activo se acumulen en el simplasto. El metabolismo de los herbicidas involucra transformaciones que aumentan la solubilidad en agua y esto regularmente es seguido por la conjugación con azúcares o aminoácidos. Bentazon tiene un margen de selectividad de 200 veces entre el arroz y *Cyperus serotinus* Rottb., debido a su rápida hidroxilación, seguida de su conjugación con glucosa en el arroz (Mine *et al* 1975). La selectividad al herbicida se basa en la capacidad de la planta para metabolizar rápidamente el herbicida, formando compuestos no fitotóxicos (Oliveira Jr. 2011, 2007). Estas reacciones pueden estar mediadas por enzimas o no. La complejidad de las reacciones bioquímicas que se suceden en el metabolismo de las plantas hace del estudio de estos procesos un campo fascinante, en especial por la variedad de dichas reacciones

#### 4.25.1. Detoxificación

Las plantas han desarrollado estrategias sofisticadas para hacer frente a los efectos adversos de los herbicidas mediante la atenuación de la fitotoxicidad (Kawahigashi, 2009).

Los procesos de detoxificación metabólica de herbicidas en tejidos vegetales pueden dividirse en tres fases (Shimabukuro, 1985; Hatzios, 1991), cada una de ellas mediadas por un grupo de enzimas. En la **Fase I o fase de transformación o conversión**, las propiedades iniciales del plaguicida son transformados a través de procesos de hidrólisis catalizados por esterasas o amidasas u oxidaciones catalizadas por enzimas como peroxidasas, lipooxigenasas o el conjunto enzimático citocromo P450 mono-oxigenasa, introducen grupos funcionales en la molécula original, generando metabolitos más polares. Posteriormente, durante la **Fase II o fase de conjugación**, enzimas como la glucosil transferasa, malonil transferasa o la glutatona-S-transferasa utilizan el grupo funcional introducido en la fase I como punto de “anclaje” para la conjugación de moléculas de glucosa, malonil o glutatona con el metabolito, incrementando su solubilidad en agua y reduciendo la toxicidad del compuesto conjugado. Generalmente, los metabolitos formados en la fase II tienen poca o nula fitotoxicidad. Por último, en la **fase III o fase de conjugación secundaria y compartimentalización**, complejos proteicos específicos ubicados en la membrana plasmática y con función dependiente del ATP, reconocen y transfieren los conjugados formados a través de la membrana para su excreción o inmovilización (Siminszky, 2006).

Tanto en plantas como en animales, estos complejos proteicos, reconocen a los compuestos tóxicos conjugados para su transferencia a través de la membrana; en animales este paso inicia los procesos de excreción del cuerpo por la orina o heces, pero en plantas, al no poseer sistemas tan eficientes de excreción, los metabolitos conjugados son secuestrados en la vacuola (en el caso de ser metabolitos solubles), o son transferidos al apoplasto (si son metabolitos insolubles). A estos últimos procesos se les ha denominado de forma genérica como “excreción por almacenaje” (Anzalone A. 2008).

#### 4.25.1.1. Citocromo P450

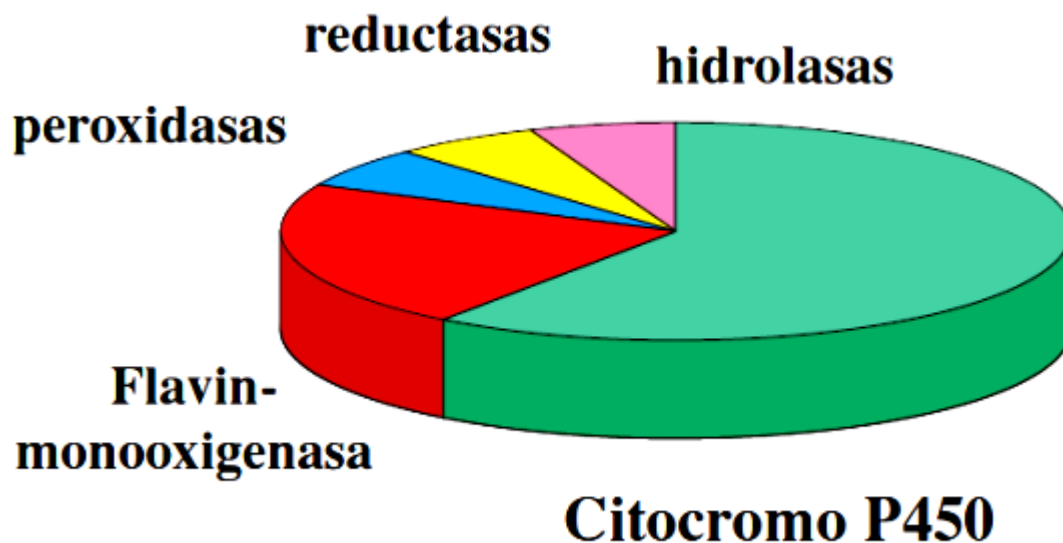
El citocromo P450 es uno de los principales protagonistas en la detoxificación de herbicidas, juegan un papel básico en las fases iniciales de la biotransformación de herbicidas en muchas plantas (Castillo F. 2005). El citocromo P450 es un conjunto de enzimas que tienen la capacidad de promover la degradación de muchos herbicidas, funcionando de igual forma como una vía importante de metabolización de muchos otros compuestos en la célula (Schuler M. 1996; Kawahigashi, 2009).

Los P450 son hemoproteínas catalíticas en las cuales un grupo tiol del aminoácido cisteína sirve como quinto ligando al átomo de hierro del grupo hemo y el sexto ligando es una molécula de agua (al menos así aparece en las estructuras de cristal del enzima libre de sustrato disponibles hasta el momento) (Montellano *et al.*, 2002). En general los P-450s de eucariotas tienen un peso molecular que oscila entre 50 y 60 kD. La similitud en la secuencia de aminoácidos entre los diferentes P-450s es relativamente baja, llegando a ser menor del 20% en algunos casos (Werck-Reichhar *et al.*, 2001).

Los P450s pueden clasificarse en cuatro clases en función de cómo acceden los electrones desde el NADPH hasta el centro catalítico del enzima (Werck-Reichhar *et al.*, 2001). Desde el momento del descubrimiento del P-450 la purificación e identificación de nuevos isoenzimas ha sido una constante (Omura, T. 1999). Los P450 se identifican con las siglas CYP seguido de un número que designa la familia, una letra que identifica la subfamilia y otro número que se corresponde con el gen (p. e. CYP1A1, CYP2C9)

En la actualidad se considera el sistema de enzimas más importante en la fase I (figura 13) del metabolismo de compuestos tóxicos en las plantas y su acción junto a la glutatona-S-transferasa (que actúa en la fase II de detoxificación), completan los procesos de metabolización de una gran parte de los químicos que entran a la planta desde el exterior. La acción general de la P450 participa sobre los herbicidas comienza por la formación de un metabolito hidroxilado de la molécula

original. En la desmetilación y desalquilación de herbicidas, el mecanismo de hidroxilación es seguido de una eliminación del grupo metil hidroxilado (alquil) como aldehído (Anzalone A. 2008). En muchos casos luego de la monoxigenación el metabolito obtenido se conjuga con moléculas hidrosolubles como la glucosa o la glutatona, proceso que sucede durante la fase II de detoxificación (Bolwell *et al.* 1994).



**Figura 14.** Participación relativa de diferentes enzimas en la fase 1 en el proceso de detoxificación.

Durante estas reacciones de biotransformación, el toxico sufre cambios en su estructura química que, con frecuencia, no sólo lo convierten en una molécula más polar, sino que además lo inactivan y lo convierten en un metabolito sin actividad.

#### 4.25.1.2. Glutación Transferasa (GST)

El glutatión (GS) es un tripeptido en células animales, en microorganismos y en vegetales. Este tripéptido se encuentra normalmente en su forma reducida (GSH), siendo el grupo sulfidrilo (SH) el que reacciona con los xenobióticos. La glutatión transferas (GSTs) (EC. 2.5.1.18) son una superfamilia de proteínas multifuncionales con papeles fundamentales en la desintoxicación de celular de una amplia gama de compuestos exógenos y endógenos. En las plantas y

animales GSTs son las principales enzimas en los procesos metabólicos de desintoxicación en la fase II (conjugación) donde se incrementa la solubilidad del compuesto electrofílico (e.g. herbicida, insecticida, entre otros), listo para ser excretados o compartimentada por la fase III de enzimas (Board *et al.*, 1994; Coleman *et al.*, 1997). Las glutatión-S- transferasas catalizan la conjugación con glutatión el cual constituye un mecanismo de detoxificación de gran importancia en muchos tejidos vegetales (Devine *et al.*, 1993).

Se observa que este tipo de enzimas (GSTs) actúa en los principales procesos metabólicos de desintoxicación. La conjugación de GSH con herbicidas es normalmente mediada por enzimas. En el caso de la conjugación enzimática, las enzimas que catalizan las reacciones son llamadas glutatión-S-transferasas. El primer sistema de glutatión-S-transferasas (GSTs) descrito como responsable del metabolismo del herbicida, es el que realizan las conjugaciones de herbicidas pertenecientes a la familia S-Triazinas, como son las cloro-s-triazinas (atrazina, simazina, terbutilazina y cianazina). A esta enzima también se le conoce como triazinil transferasa.

El uso de estos compuestos, ha sido estudiado especialmente en cultivos de cereales, donde en el caso particular de las GSTs pueden actuar aumentando el metabolismo de la conjugación con glutatión este aumento se debe a dos mecanismos, el primer (1) mecanismo es debido al incremento en la disponibilidad de la glutatión reducida para la transformación, en el segundo (2) mecanismo se incrementa el contenido de glutatión-S-transferasa. Entre los mecanismos bioquímicos que confieren resistencia a un amplio grupo de xenobióticos se encuentra la familia de la glutatión S-transferasa (Dauterman 1983; Board *et al* 2000).

#### **4.26. Resistencia metabólica a herbicidas**

Por resistencia debe entenderse como la habilidad hereditaria que algunos biotipos dentro de una población adquieren para sobrevivir y reproducirse a

determinada dosis de un herbicida, a la cual la población original era susceptible (WSSA, 1998). Se asume que cualquier población de malezas puede contener biotipos resistentes en baja frecuencia y que el uso repetido de un mismo herbicida o de herbicidas con el mismo modo de acción expone a la población a una presión de selección que conduce a un aumento en el número de individuos resistentes (Gresel J. *et al* 1978; Christoffoleti y López-Ovejero, 2004). Una de las primeras consideraciones que deben realizarse es no confundir este fenómeno con el de tolerancia. La tolerancia es una habilidad natural propia de la especie que le permite reproducirse y sobrevivir, y viceversa, ante la aplicación de herbicidas (Maxwell y Mortimer, 1994). A diferencia de las plantas tolerantes, las poblaciones resistentes suelen sobrevivir no solo a las dosis de aplicación agrícola del herbicida sino a otras bastante superiores (De prado *et al.*, 1996). En términos generales, el desarrollo de resistencia a cualquier herbicida involucra un proceso de selección ligado al de variabilidad intraespecífica. Se asume que cualquier población de malezas puede tener biotipos resistentes en baja frecuencia, debido a mutaciones que ocurren naturalmente. Así, el uso repetido de un mismo herbicida expone a la población a una presión de selección que conduce al aumento del número de individuos resistentes. Los biotipos susceptibles mueren mientras que los resistentes sobreviven produciendo propágulos. Si persiste la aplicación de herbicidas que actúan sobre el mismo sitio de acción, la proporción del biotipo resistente se incrementa en relación al biotipo susceptible. Indiquemos también que además de la resistencia que puede ocurrir de forma natural, existen posibilidades de inducirla por técnicas de ADN recombinante propuestas por la ingeniería genética o selección de variantes resistentes obtenidas por cultivos de tejidos o mutagénesis (De Prado R. *et al* 2005). Las poblaciones de malezas adquieren resistencia por la interacción de algunos elementos clave. Las plantas en general, y las malezas en particular, son variables. Los genes que confieren resistencia están presentes naturalmente en las poblaciones salvajes, pero se piensa, sin embargo, que las mutaciones para resistencia no son inducidas por los herbicidas (Jasienuk *et al.*, 1996). El conocimientos de los procesos biológicos

responsable de la resistencia a herbicidas en una determinada mala hierba es fundamental para el diseño de una estrategia de control (Fischer A. 2008).

La resistencia a herbicidas es un fenómeno mundial que se atribuye a dos mecanismos básicos (De Prado et al., 2009):

**El primero**, está referido al sitio de acción por pérdida de afinidad entre la proteína de enlace y el herbicida o por una sobre-expresión de esa proteína.

**El segundo**, corresponde a un mecanismo donde no está involucrado el sitio de acción del herbicida, también llamado mecanismo por exclusión, principalmente debido a un incremento de la detoxificación metabólica del herbicida en productos no tóxicos (resistencia por metabolismo) o en una falta de absorción/ penetración y posterior pérdida de transporte del herbicida a la proteína de enlace

El término **resistencia** suele ir adjetivado con diversos modificadores que hacen alusión a la posible pluralidad existente tanto en los mecanismos de resistencia que posee un individuo como en los herbicidas a los que éste es resistente. Surgen así los conceptos de **resistencia cruzada** y **resistencia múltiple**. Dependiendo de los autores consultados, estas definiciones se asociarán a mecanismos de resistencia (Jutsum y Graham, 1995): **Resistencia cruzada:** Aquella por la que un individuo es resistente a dos o más herbicidas debido a un solo mecanismo de resistencia. **Resistencia múltiple:** Aquella por la que un individuo posee más de un mecanismo de resistencia a uno o varios herbicidas. O a familia de herbicidas (Rubin, 1991).

El metabolismo de los herbicidas en las plantas constituye el mecanismo más importante de selectividad de los herbicidas entre malezas y cultivos o entre malezas susceptibles y tolerantes. Las plantas tolerantes detoxifican al herbicida con suficiente rapidez como para evitar que cantidades fitotóxicas del ingrediente activo se acumulen en el simplasto. El metabolismo de los herbicidas involucra transformaciones que aumentan la solubilidad en agua y esto regularmente es seguido por la conjugación con azúcares o aminoácidos (Mine *et al.* 1975).

Algunos mecanismos que implican la desintoxicación de los herbicidas son, el glutatión-S-transferasa (GST) (Tai *et al.* 1995) o citocromo P450 monooxigenasa (Christopher *et al.* 1991) y (Han *et al.* 2013) la reducción de la absorción (Koger *et al.* 2005) o la reducción de la translocación en la planta (Feng *et al.* 2004) y el secuestro de vacuolas (Ge *et al.* 2010). Cuando se habla de desintoxicación, es común confundir o usar indistintamente los términos metabolismo, degradación, y descomposición. Entonces es necesario definir estos términos: 1. Metabolismo: suma de procesos por los cuales una sustancia en particular es manejada en un organismo vivo; estos procesos corresponden a transformaciones biológicas. 2. Degradación: reducción de la complejidad de un compuesto químico. 3. Descomposición: la ruptura de una sustancia en sus constituyentes a través de sus cambios químicos. De acuerdo a las definiciones dadas, la desintoxicación es el resultado de las transformaciones biológicas o metabolismos que sufre un herbicida o xenobiótico en una planta, que llevan alteraciones de la estructura del herbicida y de su actividad como tal. El metabolismo de un herbicida que resulte de su activación puede ser deseable que ocurra en malezas, pero no en especies cultivadas. Por otra parte, el metabolismo que resulte en la pérdida de toxicidad del herbicida, frecuentemente base de la selectividad, es deseable que ocurra en las especies cultivadas, pero no en las malezas. El mayor conocimiento del metabolismo de los herbicidas en plantas superiores ha permitido entender los fundamentos bioquímicos de la selectividad de los herbicidas y estos avances se han logrado en relación directa con los avances en la química analítica y en la tecnología enzimática. El metabolismo de herbicidas en plantas se realiza principalmente debido a reacciones de oxidación, reducción, hidrólisis u conjugación. Así, debido a la introducción de grupos funcionales como OH, NH<sub>2</sub>, SH, Y COOH a la molécula herbicida, se producen metabolitos con una reducción en la actividad herbicida, o los que muestran una modificación en cuanto a su fitotoxicidad. Las reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis pueden ser o no catalizadas por sistemas enzimáticos (Kogan *et al.* 2013). Existen evidencias de que la actividad de metabolización diferenciada de herbicidas por las enzimas P450 puede producir que algunos cultivos sean más tolerantes que otros cultivos o

especies malezas a ciertos herbicidas en particular por el aumento en la capacidad detoxificadora de las plantas. Esto quiere decir que de la acción de las enzimas P450 puede quedar definida la *selectividad* del herbicida entre especies. (Anzalone A. 2008). La mayoría de las reacciones de detoxificación de herbicidas que están mediadas por las P450 suceden en herbicidas donde las dosis de aplicación son bajas o muy bajas ( $\text{g}\cdot\text{ha}^{-1}$ ), ya que para los herbicidas aplicados en altas dosis ( $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) el mecanismo típico de detoxificación se produce a través de la glutatona-S-transferasa o procesos de degradación química. Las transferasas de glutatión son una superfamilia de amplia distribución de enzimas multifuncionales que se encuentran en plantas, levaduras, bacterias, invertebrados y vertebrados (Liu *et al.*, 2013). Las enzimas glutatión-S-transferasas (GSTs) cumplen múltiples funciones dentro de las células vegetales, poseen la función de reconocimiento y transporte de una gran cantidad de compuestos reactivos electrofílicos, ya sean de origen externos (xenobióticos) o de origen interno, como metabolitos secundarios con potencial tóxico a la célula. La glutatión-S-transferasa posee un papel importante en muchos de los procesos de detoxificación de herbicidas en plantas actuando en la modulación de los procesos de señalización; ese rol detoxificador de estas enzimas puede definir la selectividad de herbicidas (Frova, 2006). Además Gsts pueden servir como peroxidasas, isomerasas, y transferasas (Jensson *et al.*, 1986, Bartling *et al.*, 1993, Fernandez-Cañon and Peñalva, 1998 y Board *et al.*, 2000). Las diferentes formas de GST no se distribuyen equitativamente entre las diferentes especies de plantas, por lo cual aquellas que posean alta actividad de GST podrán soportar mejor la exposición a ciertos herbicidas que, por el contrario, eliminarán las especies que posean baja actividad de GSTs. Otra forma en que las GSTs intervienen en la selectividad de los herbicidas es a través del uso de antídotos. El uso de estos compuestos, tal como se ha comentado, ha sido estudiado especialmente en cultivos de cereales, donde en el caso particular de las GSTs pueden actuar aumentando el metabolismo de la conjugación con glutatona; este aumento puede conseguirse por dos mecanismos: (1) incremento en la disponibilidad de la glutatona reducida para la conjugación e (2) incrementando el contenido de glutatona-S-transferasa

(Anzalone A. 2008). Otro mecanismo de resistencia a los herbicidas en malezas es la reducción de la absorción, la reducción de la translocación del herbicida desde el sitio de absorción al sitio diana, una rápida desintoxicación metabólica del herbicida, y una alteración del sitio diana herbicida (Clifford *et al* 2005). En las décadas de los cincuenta y sesenta se realizaron trabajos importantes de investigación que produjeron suficiente evidencia que indicaba que el herbicida (2-4D) se movía más dentro de las especies sensibles que en aquellas tolerantes (Ashton, 1958; Rincon, 1966). También se ha demostrado que el estado de desarrollo podría afectar el movimiento del herbicida (Petersen, 1966). Como mecanismo de desintoxicación el aislamiento o secuestro consiste en retirar el herbicida o sus metabolitos de las regiones metabólicamente activas y llevarlos a sitios menos activos, donde son inocuos para el crecimiento, como es el caso de las vacuolas (Del prado *et al.*, 2005; Zelaya *et al.*, 2007). Los mecanismos de secuestro 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 secuestro son todavía desconocidos.

---

*MATERIALES Y  
MÉTODOS  
(ETAPA 1)*

---

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### (Etapa 1)

#### 5.1. Desarrollo del experimento

El estudio se realizó de los meses de octubre de 2013 a febrero de 2014 en una parcela ubicada en la colonia Esperanza del Valle de San Luis Río Colorado (32° 19' 23.1" N; 114° 58' 32.9" O), en una superficie de 200 m<sup>2</sup>. Para la siembra del cultivo se utilizó semilla de alfalfa de la variedad CUF-101 sembrada en melgas el 15 de octubre de 2013, además se le aplicaron de 10 a 12 riegos, así como una dosis de fertilización de 50 kg de ácido fosfórico en los 5 primeros riegos de auxilio (Anónimo, 2010). Las parcelas útiles fueron lotes de 5.0 m de largo por 10.0 m de ancho por tratamiento.

Los tratamientos fueron 3 concentraciones de ingrediente activo (I.A.) de mesosulfurón metil + iodosulfurón metil y un testigo (cuadro 3), que fueron aplicados el 27 de enero del 2014, con una mochila aspersora de motor de la marca FORZA 25, con una boquilla 80-02 a una presión de 40 PSI y con un gasto de agua de 200 L·ha<sup>-1</sup>.

**Cuadro 3.** Dosis de I.A. de los tratamientos utilizados (Etapa1).

Tratamiento	Dosis de I.A (g·ha <sup>-1</sup> )	
	Mesosulfurón metil	Iodosulfurón metil
Testigo	0	0
1.Dosis sub-comercial	6.25	1.25
2.Dosis comercial	12.5	2.5
3.Dosis sobre-comercial	25.0	5.0

Se realizaron seis muestreos *in situ* para evaluar la eficiencia fotosintética, color e índice de verdor cada tercer día por 15 días, tomando el día de la aplicación como día inicial o cero. Se cosecharon 10 plantas por tratamiento en los mismos días de muestreo y fueron llevadas inmediatamente al Laboratorio de Fisiología de la Universidad Autónoma de Baja California y almacenadas en un ultracongelador a

-40 °C hasta realizar las determinaciones de clorofila y carotenoides totales, peróxido de hidrógeno y peroxidación lipídica.

### **5.2. Eficiencia fotosintética (Fv/fm)**

La eficiencia fotosintética fue determinada por medio de un fluorómetro portátil Chlorophyll Fluorometer OS-30p (OPTI-SCIENCE, USA) usando una intensidad de luz actínica de  $2100 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de intensidad por un período de 2 s y así obtener la Fv/Fm en 10 plantas por tratamiento, previamente aclimatadas por 15 min de oscuridad, para garantizar que todos los centros de reacción estuviesen abiertos. Las mediciones se realizaron por la mañana, utilizando las hojas apicales según Maxwell y Johnson (2000).

### **5.3. Color**

Se evaluó en 10 plantas de alfalfa por cada uno de los tratamientos. Para determinar este parámetro se utilizó un espectrofotómetro de esfera X-Rite 62 previamente calibrado. Los valores fueron reportados como el tono (°Hue) obtenido a través de los días del experimento. Este parámetro se evaluó siguiendo la metodología reportada por Kuehni (2005).

### **5.4. Índice de verdor.**

Las mediciones se llevaron a cabo mediante un medidor de clorofila portátil SPAD-502 (Minolta), donde se tomaron tres lecturas por planta de 10 repeticiones de cada uno de los tratamientos (García-López, 2004). Los resultados se expresaron en Unidades Spad.

### **5.5. Cuantificación de clorofila a, b, total y carotenoides totales.**

Se determinó mediante la metodología propuesta por la AOAC (1998). Se pesó 0.1 g de la muestra, posteriormente se agregó 5 mL de acetona fría al 80%(V/V), ésta fue homogenizada durante 30 s en un homogenizador de tejidos ultraturax (IKA®T18) posteriormente se adicionaron nuevamente 5 mL de acetona y se volvió a homogenizar. La mezcla fue centrifugada a  $3,000 \text{ xg}$  durante 15 min y se recuperó el sobrenadante. Las muestras fueron analizadas en un

espectrofotómetro UV/Vis (GENESYS 10S UV-Vis) a longitudes de onda de 645, 663 y 470 nm. Se utilizaron los coeficientes de absorción específicos para cada uno de los pigmentos según Lichtenthaler (1987).

#### **5.6. Cuantificación de peróxido de hidrógeno.**

Se determinó mediante la metodología de Chen *et al.* (2000). Se pesó 0.5 g de la muestra y se le añadieron 3 mL de buffer fosfato (50 mM, pH 6.8) para después ser homogenizada durante 30 segundos en un homogenizador de tejidos Ultraturrax (IKA®T18), posteriormente se centrifugó a 3,000 *xg* por 15 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se le agregó 1 mL de TiCl<sub>4</sub> al 0.1% en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 20%. La solución de reacción fue mezclada cuidadosamente y centrifugada nuevamente a 3,000 *xg* por 15 min. a 4°C para posteriormente registrar la absorbancia en un espectrofotómetro UV/Vis (GENESYS 10S UV-Vis) a 410 nm. La concentración de peróxido de hidrógeno se calculó mediante el coeficiente de extinción molar 0.28  $\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

#### **5.7. Cuantificación de la peroxidación lipídica.**

Se estimó por el nivel de producción de malondialdehído (MDA) con una ligera modificación del método del ácido thiobarbitúrico (TBA) descrito por Kuk *et al.* (2003). Se tomó 0.1 g de tejido vegetal y se mezcló con 5 mL de solución de TBA al 0.5 % en ácido tricloroacético al 20% en un homogenizador de tejidos. Posteriormente se centrifugó a 20,000 *xg* por 15 min y el sobrenadante fue calentado en un “baño maría” (90 °C) por 25 minutos, transcurrido el tiempo rápidamente se enfrió bajo hielo. Después se centrifugó nuevamente la muestra a 3,000 *xg* por 10 min y el sobrenadante se utilizó para la determinación espectrofotométrica de malonildialdehído. La absorbancia a 532 nm fue registrada y corregida por la absorbancia no específica a 600 nm. La concentración de MDA se calculó usando el coeficiente de extinción de 156  $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

### **5.8. Diseño experimental y análisis estadístico**

Los resultados obtenidos se analizaron mediante ANDEVA de una vía en un diseño completamente al azar, con 4 tratamientos y 10 repeticiones por tratamiento para las variables de eficiencia fotosintética, color e índice de verdor, y cinco para el resto (Clorofila a, b, total y carotenoides totales, peróxido de hidrogeno y peroxidación lipídica). Se tomó como unidad experimental una planta. En las variables donde la diferencia fue significativa, se realizó comparación múltiple de Tukey ( $\alpha < 0.05$ ) con el paquete estadístico Statistix 8.0 (2003).

---

*MATERIALES Y  
MÉTODOS  
(ETAPA 2)*

---

## ETAPA 2

### 5.9. Desarrollo del experimento.

En los meses de mayo a octubre del 2015 se realizó un estudio en una parcela ubicada en el Ejido Nuevo León del Valle de Mexicali Baja California ( $32^{\circ}24' 34''$  N;  $115^{\circ} 11' 16''$  S), en una superficie de  $250 \text{ m}^2$ . Para la siembra del cultivo se utilizó semilla de alfalfa de la variedad CUF-101 sembrada en melgas el 15 de octubre de 2014, además se le aplicaron de 10 a 12 riegos, así como una dosis de fertilización de 50 kg de ácido fosfórico en los 5 primeros riegos de auxilio (Anónimo, 2010). Las parcelas útiles fueron lotes de 5.0 m de largo por 10.0 m de ancho por tratamiento. Los tratamientos se aplicaron el 5 de mayo del 2015, con una mochila aspersora de motor de la marca FORZA 25, con una boquilla 8002 a una presión de 40 PSI y con un gasto de agua de  $200 \text{ L}\cdot\text{ha}^{-1}$  (figura 14).



**Figura 15.** Aplicación de tratamientos herbicidas en campo (Etapa2).

Los tratamientos fueron cuatro concentraciones de ingrediente activo (I.A.) de Mesosulfurón metil + Iodosulfurón metil y un testigo (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Dosis de I.A. de los tratamientos utilizados (Etapa 2).

Tratamiento	Dosis de I.A (g·ha <sup>-1</sup> )	
	Mesosulfurón	Iodosulfurón metil
Testigo	0	0
Dosis sub-sub-comercial	3.12	0.62
Dosis sub-comercial	6.25	1.25
Dosis comercial	12.5	2.5
Dosis sobre-comercial	25.0	5.0

El efecto de las concentraciones sobre la eficiencia fotosintética, índice de verdor y color se evaluó durante siete muestreos *in situ*, cada tercer día por 18 días, tomando el día de la aplicación como día inicial o cero. De manera aparte, se cosecharon 10 plantas por tratamiento en los mismos días de muestreo, que fueron transportadas al Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Autónoma de Baja California y se mantuvieron almacenadas en un ultracongelador a -40 °C hasta realizar las determinaciones de actividad enzimática de las enzimas Peroxidasa (POD), Catalasa (CAT), Fenilalanina amonio-liasa (PAL) y Superóxido dismutasa (SOD).

#### **5.10. Eficiencia fotosintética**

Se determinó mediante un fluorómetro portátil Chlorophyll Fluorometer OS-30p (OPTI-SCIENCE, USA) usando una intensidad de luz actínica de 2100  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  de intensidad por un período de 2 s y así obtener la Fv/Fm (eficiencia variable/eficiencia máxima) en 10 plantas por tratamiento, previamente aclimatadas por 15 min de oscuridad, para garantizar que todos los centros de reacción estuviesen abiertos. Las mediciones se realizaron por la mañana, utilizando las hojas apicales según Maxwell y Johnson (2000).

### **5.11. Color e Índice de verdor**

Para determinar el parámetro de color se utilizó un espectrofotómetro de esfera X-Rite 62 previamente calibrado. Los valores fueron reportados como el tono (°Hue) obtenido a través de los días del experimento. Este parámetro se evaluó siguiendo la metodología reportada por Kuehni (2005). Se evaluaron 10 plantas de alfalfa por cada uno de los tratamientos.

Para la obtención del índice de verdor se llevó a cabo mediante la utilización de un medidor de clorofila portátil SPAD- 502 (Minolta), donde se tomaron tres lecturas por planta de 10 repeticiones de cada uno de los tratamientos (García-López, 2004). Los resultados se expresaron en Unidades Spad.

### **5.12. Proteína soluble**

La concentración de proteína se cuantificó para reportar la actividad enzimática específica en cada enzima analizada por el método de Bradford (Bradford, 1976) en un espectrofotómetro (Thermo scientific, Biomate 3) a 595 nm. La curva estándar se realizó con albumina suero de bovino (BSA) a diferentes concentraciones conocidas.

### **5.13. Actividad enzimática de Peroxidasa**

La enzima se extrajo a partir de 0.2 g de muestra con 5 mL de Tris-HCl frío, 100 mM (pH 7.1), el cual contenía 1% de polivinil pirrolidona (PVP), éstas fueron extraídas con nitrógeno líquido y posteriormente la mezcla se centrifugó por 20 min a 10,000 xg a 4 °C. La cuantificación de la actividad se realizó según el método continuo descrito por Frick (1976) utilizando como sustratos el guayacol y peróxido de hidrógeno, determinándose la velocidad de la reacción de oxidación del guayacol en presencia de peróxido de hidrógeno. Se tomó la variación de densidad óptica durante un minuto con intervalos de 5 segundos, registrando la absorbancia a 470 nm. El cálculo de la actividad enzimática para este método se realizó según la ecuación:

$$\text{Actividad enzimática} = \frac{\Delta DO \cdot 1 \cdot V_{\text{ens}}}{\Delta T \cdot \epsilon \cdot V_{\text{enz}}} \cdot \text{dil}$$

Dónde: D.O.= densidad óptica

$\epsilon$ = coeficiente de extinción molar del guayacol que es  $5570 \cdot 10^{-6} \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$

$V_{\text{ens}}$ = Volumen del ensayo

$V_{\text{enz}}$ = Volumen de la enzima

Dil= dilución

La actividad enzimática se expresó como  $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína, donde una unidad es la formación de  $1 \mu\text{mol}$  de tetraguaiacol por minuto.

#### **5.14. Actividad enzimática de Catalasa**

La extracción de la enzima Catalasa se realizó con buffer de extracción Tris-HCl 0.1M (pH 8.5) con 1% de PVP. La mezcla se centrifugó a  $12,000 \times g$  por 20 min a  $4^\circ \text{C}$ . La actividad se evaluó mediante el método continuo descrito por Blackwell *et al.*, (1990), en donde se utilizaron 2.85 mL de buffer Tris-HCl 10 mM (pH 8.5), 0.1 mL de peróxido de hidrógeno al 1% y 0.5 mL de extracto. La reacción comenzó al adicionar el extracto crudo, registrando el cambio de absorbancia a 240 nm. La actividad enzimática se reportó como  $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína, donde una unidad es igual a la descomposición de  $1 \mu\text{mol}$  por minuto de peróxido de hidrógeno.

#### **5.15. Actividad enzimática de Fenilalanina amonio-liasa**

Esta enzima se extrajo a partir de 0.4 g de tejido vegetal pulverizado con nitrógeno líquido e inmediatamente se le adicionó 15 mL de buffer de borato de sodio 0.1 M (pH 8.8) con 0.02 M de mercaptoetanol, posteriormente se agregó sulfato de amonio ( $27\text{g} \cdot 100 \text{mL}^{-1}$ ), para centrifugar a 12,000 rpm por 20 min a  $4^\circ \text{C}$ . El precipitado se resuspendió en acetato de amonio 0.1 M. La actividad enzimática de la PAL fue cuantificada por el método discontinuo propuesto por Paynet *et al.* (1971) el cual utiliza como sustrato L-Fenilalanina. En este caso la velocidad de reacción se calculó a partir de la absorbancia a 275 nm, donde se mide el ácido transcinámico formado. El cálculo para esta actividad fue igual a:

$$\text{Actividad enzimática} = \frac{(B-A)(33.75)}{(G)(t_i-t_f)(V)}$$

Dónde:

B= a la absorbancia final

A= a la absorbancia inicial

G= al peso de la muestra

V= al volumen que se le añade de sulfato de amonio

t<sub>i</sub>= tiempo inicial

t<sub>f</sub>= tiempo final

Usando como factor de corrección la constante 33.75 U·mL<sup>-1</sup>.

La actividad enzimática se reportó como U·mg<sup>-1</sup> de proteína, donde una unidad es igual a la formación de 1 μmol de ácido transcinámico por hora.

#### **5.16. Actividad enzimática de Superóxido dismutasa.**

La enzima fue extraída a partir del método descrito por Bonnet *et al.* (2000), consistió en la homogenización con nitrógeno líquido de 0.5 g de muestra con 1 mL de buffer de fosfato de potasio 0.1M (pH 7.8). Posteriormente se centrifugó a 17000 x g por 20 min a 4°C. El sobrenadante se utilizó para el ensayo enzimático. Se siguió la metodología utilizada por Beyer y Fridovich (1987), donde se propuso la siguiente mezcla de reacción; 27 mL de Buffer de Fosfato de Potasio 0.05 M (pH 7.8), conteniendo 0.1 mM de EDTA, 1.5 mL de L-metionina (30 mg·mL<sup>-1</sup> en agua desionizada), 1 mL de Nitro Blue Tetrazolium (1.41 mg·mL<sup>-1</sup> en agua desionizada) y 0.75 mL de Triton X-100 al 1% (en agua desionizada). A 1 mL de esta mezcla de reacción se le adicionó 10 μL de Riboflavina (4.4 mg·100 mL<sup>-1</sup> en agua desionizada) y 160 μL del sobrenadante, la mezcla se iluminó por 7 minutos con lámparas de luz fluorescente de 20 watts GroLux, después de transcurrido el tiempo se determinó la absorbancia a 560 nm. La formación de Nitro Blue Tetrazolium Formazan debida al incremento en la absorbancia fue la velocidad de reacción; la absorbancia en ausencia de SOD y en presencia de varias cantidades de SOD fue utilizada para determinar el número de Unidades·mL<sup>-1</sup> de SOD en la solución (Stauffer, 1989). Una unidad (U·mg<sup>-1</sup> de peso fresco) de SOD es igual a la

cantidad de sobrenadante que fotoinhibe el 50% de la formación de Nitro Blue Tetrazolium Formazan (Giannopolitis y Ries, 1977).

### **5.17. Diseño experimental y análisis estadístico**

Los datos obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía en un diseño completamente al azar, con 5 tratamientos y 10 repeticiones por tratamiento en las variables medidas *in situ* (eficiencia fotosintética, color e índice de verdor), y seis repeticiones para las variables de actividad enzimática (POD, CAT, PAL y SOD). Además, en las variables donde la diferencia fue significativa, se realizó comparación múltiple de Tukey ( $\alpha < 0.05$ ) con el paquete estadístico Statistix 8.0 (2003).

---

*RESULTADOS Y  
DISCUSIÓN  
(ETAPA 1)*

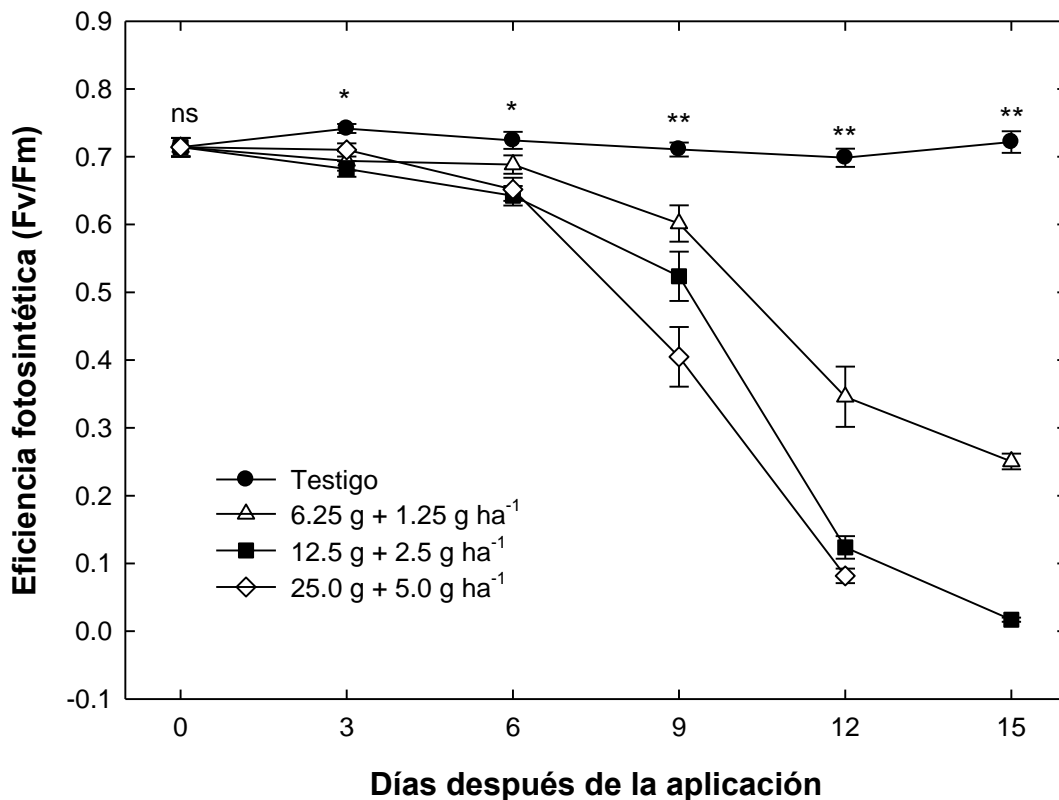
---

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Etapa 1

#### 6.1. Eficiencia fotosintética

La eficiencia fotosintética en plantas tratadas con diferentes dosis del herbicida fueron estadísticamente diferentes con respecto al testigo ( $\alpha=0,05$ ) (Figura 16). En las mediciones del día 9 se observan diferencias significativas entre todos los tratamientos con valores que oscilan 0.600 (dosis sub-comercial) y 0.403 (sobrecomercial) en comparación con el valor promedio de Fv/Fm para plantas control de 0.712, estos resultados concuerdan con (Guo X *et al.*, 2009) quienes indican que con dosis altas de mesosulfurón metil + iodosulfuron metil se reduce la eficiencia fotosintética. En el día 12 la eficiencia fotosintética se encuentra por debajo del 0.071 en la concentración de sobredosis (125.0 + 25.0) siendo que para esta misma concentración en el día 15 las hojas de las plantas se encuentran en un estado de marchitez. En general se observó una disminución en los valores de Fv/Fm en los tratamientos aplicados a medida que el tiempo transcurrió independientemente de la dosis evaluada. Los valores de la relación Fv/Fm fueron más bajos para las plantas expuestas al herbicida en comparación al testigo, lo cual pudiera estar relacionado a la inhibición de la enzima acetolactato sintasa al inhibir la ALS hay una interrupción del transporte de electrones en la fotosíntesis, y se interrumpe la síntesis de aminoácidos de cadena ramificada los cuales juegan un papel importante en la cadena de transportes del complejo fotosistema II (Zhou Q.Y *et al.*, 2007).



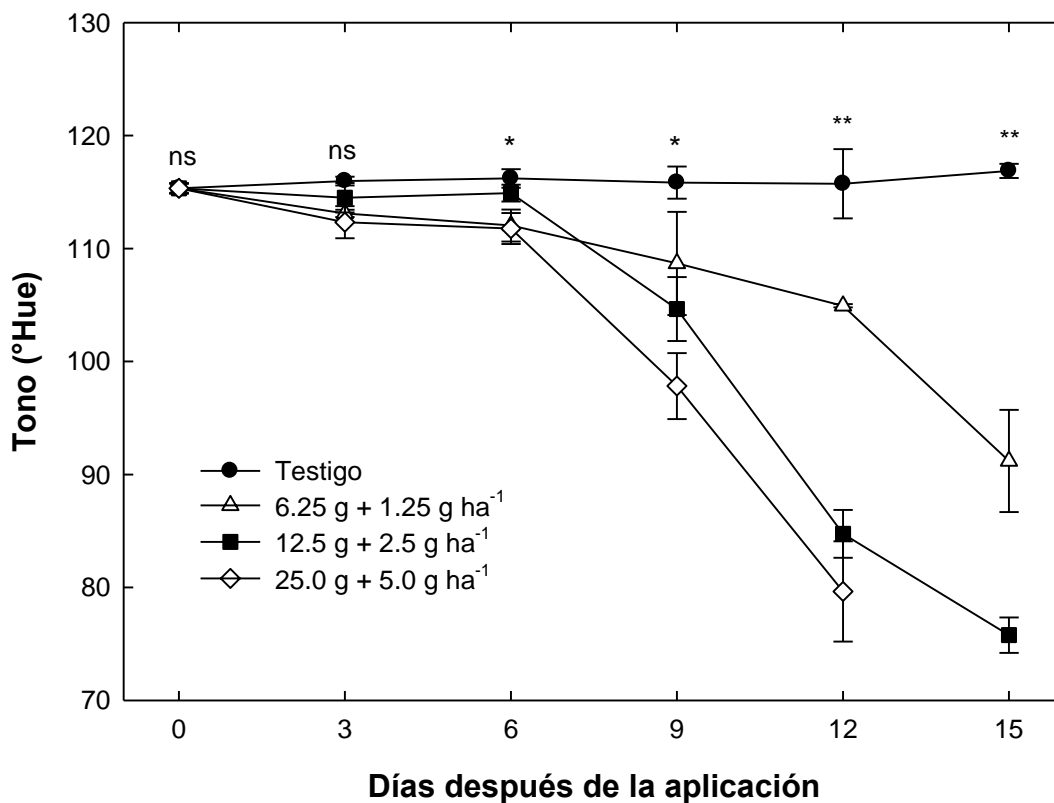
**Figura 16.** Comparación de la eficiencia fotosintética en plantas de alfalfa tratada con dosis de Mesosulfurón metil + Iodosulfurón metil.

## 6.2. Tono (°Hue)

Se puede observar que las plantas tratadas con las diferentes dosis de mesosulfurón metil + iodosulfurón metil, presentaron valores de tono menores en comparación con el testigo ( $\alpha=0,05$ ). En las dosis comercial y sobre-comercial los valores de tonalidad fueron iguales estadísticamente ( $\alpha=0,05$ ). Sin embargo, en el día 6 se detectaron diferencias significativas entre todos los tratamientos (figura 17), presentaron valores menores a medida que la concentración del herbicida se incrementó.

Esta disminución de los valores del tono en los tratamientos con herbicida se pueda deber a que a medida que los días pasaron las hojas presentaban una tonalidad clorótica ya que hay una degradación de la clorofila, probablemente inducida por la inhibición de los aminoácidos ramificados, lo que causa una

desnutrición en la planta, provocando que las hojas tengan un cambio en la tonalidad (Tranel y Wright, 2002).

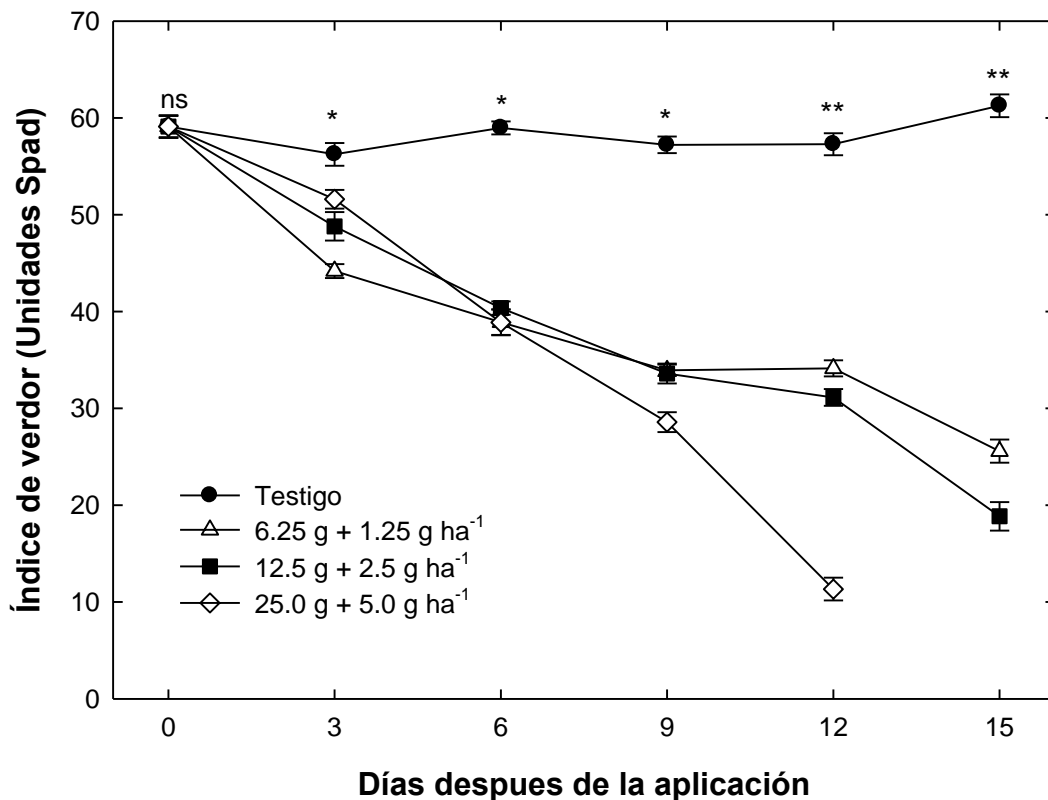


**Figura 17.** Comparación de la tonalidad en plantas de alfalfa tratadas con diferentes dosis de Mesosulfurón metil + Iodosulfurón metil.

### 6.3. Índice de verdor (Unidades Spad)

En la figura 18, se observa que todas las concentraciones del herbicida disminuyeron el índice de verdor en plantas de alfalfa, con respecto al testigo ( $\alpha=0,05$ ), independientemente al periodo de evaluación. En el día 6 se puede observar que entre los tratamientos con herbicida, no existe diferencia significativa en los valores de índice de verdor ( $\alpha=0,05$ ). Pero en el día 9 el tratamiento con la dosis sobre-comercial presentó menor valor (25.10 Unidades Spad) de índice de verdor en comparación con la dosis comercial (29.40 Unidades Spad) y la dosis sub-comercial (31.60 Unidades Spad) ( $\alpha=0,05$ ). Comportamiento similar se obtuvo en el día 12. El contenido de pigmentos fotosintéticos muestra un cambio en el

índice de verdor en alfalfa, debido al efecto de las diferentes concentraciones del herbicida. En el día 6 se puede observar claramente que los tratamientos con concentraciones de herbicida, disminuyen su índice de verdor hasta los valores de 38.13 (dosis sobre-comercial) en comparación con el testigo con valores de 59.12 unidades spad, los tratamientos dosis comercial y dosis sub-comercial tiene valores muy similares a los de la concentración de dosis sobre-comercial. En el día 9 se ve más marcado el daño en la dosis sobre-comercial en comparación con los demás tratamientos, en esta misma concentración para el día 12 los valores de índice de verdor se encuentran debajo de las 10.76 unidades spad, teniendo para el día 15 hojas con un mínimo o nulo verdor. El contenido de pigmentos fotosintéticos es un indicador importante para la relación fotosíntesis de las plantas. El herbicida redujo el contenido de pigmentos fotosintéticos en hojas de alfalfa (*Medicago sativa L.*) significativamente, debido a que hay una influencia indirecta sobre la estructura de los cloroplastos, lo que ocasiona una disminución en el índice de verdor. Se puede sugerir que mesosulfurón metil + idosulfuron metil puede destruir la estructura del cloroplasto de (*Medicago sativa L.*), reducir el nivel de apilamiento de los tilacoides (Liu Z.H. *et al.*, 2007), aumenta el riesgo de daños por foto-oxidación, reduce la absorción de luz, transmisión, distribución entre el fotosistema I y fotosistema II (Murata N, S. *et al.*, 2007) y afecta la síntesis de ATP Y NADPH.



**Figura 18.** Cambio en el índice de verdor en alfalfa tratada con dosis de Mesosulfurón metil + Iodosulfurón metil.

#### 6.4. Concentraciones de clorofila a y b en alfalfa tratada con dosis de Mesosulfurón metil + Iodosulfurón metil

En relación al contenido de pigmentos en las hojas de alfalfa (*Medicago sativa L.*) se encontró con base en el análisis de varianza diferencias significativas en las 3 concentraciones del herbicida y el tratamiento control, después del día tres de la aplicación. La más alta concentración de este pigmento se encontró en el día 9 en el testigo con  $2.25 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , para este mismo día la concentración de clorofila a disminuyó en  $0.96 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  para la dosis sobre-comercial. Para el día 12 las concentraciones dosis sub-comercial, comercial y sobre-comercial tuvieron valores similares. En cuanto el contenido de clorofila a en la dosis comercial se cuantificó por debajo de  $0.65$  al día 15. La clorofila b presentó tendencias similares al disminuir conforme pasaban los días, con diferencia significativa con el testigo y

las tres concentraciones de herbicida, los valores oscilaron entre 0.471 mg·g<sup>-1</sup> (testigo) y 0.178 mg·g<sup>-1</sup> (dosis sobre-comercial los cuales se muestran en el cuadro 5. Estos resultados son similares con los publicados por Yuan X. *et al.*, 2013 quienes encontraron que al aumentar la dosis de mesosulfurón metil + iodosulfuron metil, sobre *Radix isatidis* (*Isatis indigotica* Fort.) disminuía la concentraciones de clorofila a y b. La disminución en la clorofila a y b, se debió al inhibir la ALS que bloquea la síntesis de clorofilas y hay una degradación en los cloroplastos.

**Cuadro 5.** Comportamiento de clorofila a y b en alfalfa tratada con dosis de Mesosulfurón metil + Iodosulfurón metil.

	Clorofila a (mg·g <sup>-1</sup> de peso fresco) <sup>£</sup>					Clorofila b (mg·g <sup>-1</sup> de peso fresco) <sup>¶</sup>				
	Días después de la aplicación					Días después de la aplicación				
	3	6	9	12	15	3	6	9	12	15
Testigo	1.75 <sup>a‡</sup>	1.87 <sup>a</sup>	2.25 <sup>a</sup>	1.95 <sup>a</sup>	2.14 <sup>a</sup>	0.386 <sup>ab</sup>	0.385 <sup>a</sup>	0.458 <sup>a</sup>	0.426 <sup>a</sup>	0.471 <sup>a</sup>
6.25 g + 1.25 g·ha <sup>-1</sup>	1.67 <sup>a</sup>	1.28 <sup>b</sup>	1.50 <sup>b</sup>	0.87 <sup>b</sup>	0.84 <sup>b</sup>	0.555 <sup>a</sup>	0.262 <sup>b</sup>	0.235 <sup>ab</sup>	0.171 <sup>b</sup>	0.173 <sup>b</sup>
12.5 g + 2.5 g·ha <sup>-1</sup>	1.88 <sup>a</sup>	1.39 <sup>b</sup>	1.14 <sup>b</sup>	0.76 <sup>b</sup>	0.64 <sup>b</sup>	0.389 <sup>ab</sup>	0.286 <sup>ab</sup>	0.259 <sup>ab</sup>	0.184 <sup>b</sup>	0.199 <sup>b</sup>
25.0 g + 5.0 g·ha <sup>-1</sup>	1.57 <sup>a</sup>	1.00 <sup>c</sup>	0.96 <sup>b</sup>	0.76 <sup>b</sup>	-	0.337 <sup>b</sup>	0.215 <sup>b</sup>	0.189 <sup>b</sup>	0.178 <sup>b</sup>	-
CV (%)	17.85	9.11	10.52	11.24	10.03	23.52	20.55	21.44	15.09	

£ Valor promedio de clorofila a al día 0 = 1.84 mg·g<sup>-1</sup> de peso fresco.

¶ Valor promedio de clorofila b al día 0 = 0.387 mg·g<sup>-1</sup> de peso fresco.

‡ Diferencia de medias dentro de columnas con prueba de Tukey, P≤0.05.

### 6.5. Concentraciones de clorofila total y carotenoides totales en alfalfa tratada con dosis de Mesosulfurón metil + Iodosulfurón metil

En cuanto a los resultados obtenidos de clorofila total y carotenoides totales, se reportan valores de disminución en los tratamientos sometidos al herbicida, en comparación con el tratamiento control (cuadro 6). Respecto al contenido de carotenoides totales en el día 15 se encontró que la mayor concentración se encuentra en el tratamiento control registrándose  $12.88 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  y el menor contenido de carotenoides se encontró en este mismo muestreo en la dosis comercial con  $3.58 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ . Se observó una clara tendencia a disminuir a medida que el tiempo pasaba en las concentraciones de clorofila total y carotenoides totales en los tratamientos sometidos al herbicida. Los diferentes grados de disminución en el contenido de pigmentos fotosintéticos en hojas de alfalfa (*Medicago Sativa L.*) fueron acompañados con el aumento de la concentración del herbicida antes mencionado. Esta disminución pueda deberse, al degradarse los carotenoides a medida que el tiempo pasa, van dejando de cumplir su función de protección de los componentes fotosintéticos contra el daño foto-oxidativo, por lo cual también tiende a presentar una disminución en el contenido de clorofila total (Fraser y Brambley, 2004).

**Cuadro 6.** Comportamiento de clorofila y carotenoides totales en alfalfa tratada con dosis de Mesosulfurón metil + Iodosulfurón metil.

	Clorofila total ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso fresco)*					Carotenoides totales ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso fresco)*				
	Días después de la aplicación					Días después de la aplicación				
	3	6	9	12	15	3	6	9	12	15
Testigo	2.14 <sup>a†</sup>	2.13 <sup>a</sup>	2.71 <sup>a</sup>	2.37 <sup>a</sup>	2.87 <sup>a</sup>	9.53 <sup>a</sup>	9.78 <sup>a</sup>	12.85 <sup>a</sup>	11.09 <sup>a</sup>	12.88 <sup>a</sup>
6.25 g + 1.25 g·ha <sup>-1</sup>	2.31 <sup>a</sup>	1.59 <sup>b</sup>	1.74 <sup>b</sup>	1.04 <sup>b</sup>	0.90 <sup>b</sup>	8.46 <sup>a</sup>	6.80 <sup>b</sup>	8.13 <sup>b</sup>	6.02 <sup>b</sup>	5.40 <sup>b</sup>
12.5 g + 2.5 g·ha <sup>-1</sup>	2.27 <sup>a</sup>	1.75 <sup>ab</sup>	1.40 <sup>b</sup>	0.94 <sup>b</sup>	0.85 <sup>b</sup>	9.60 <sup>a</sup>	8.28 <sup>ab</sup>	6.83 <sup>b</sup>	5.35 <sup>b</sup>	3.58 <sup>b</sup>
25.0 g +	1.97 <sup>a</sup>	1.16 <sup>c</sup>	1.05 <sup>b</sup>	0.91 <sup>b</sup>	-	8.78 <sup>a</sup>	6.46 <sup>b</sup>	6.16 <sup>b</sup>	6.00 <sup>b</sup>	-

5.0 g·ha<sup>-1</sup>

CV (%) 14.79 11.51 22.05 11.80 13.73 18.04 11.28 16.96 9.89 8.98

\* Valor promedio de clorofila total al día 0 = 2.22 mg·g<sup>-1</sup> de peso fresco.

¥ Valor promedio de carotenoides totales al día 0 = 10.23 mg·g<sup>-1</sup> de peso fresco.

‡ Diferencia de medias dentro de columnas con prueba de Tukey, P≤0.05.

### 6.6. Concentraciones de peróxido de hidrogeno y peroxidación de lípidos en alfalfa tratada con dosis de Mesosulfurón metil + Iodosulfurón metil en alfalfa tratada con dosis de Mesosulfurón metil + Iodosulfurón metil

En el cuadro 7 se observan los cambios que hubo en las concentraciones de peróxido de hidrogeno y peroxidación de lípidos en los tratamientos aplicados con el herbicida en contraste con el tratamiento control a medida que el tiempo pasa después de la aplicación. Los valores de peróxido de hidrógeno fluctuaron de 40.2 a 19.62  $\mu\text{M}\cdot\text{g}^{-1}$ . Las hojas de alfalfa bajo las concentraciones del herbicida, mostraron un aumento del índice de la peroxidación de lípidos de la membrana en contraste con el tratamiento testigo.

**Cuadro 7.** Comportamiento de peróxido de hidrógeno y peroxidación de lípidos en alfalfa tratada con dosis de mesosulfurón metil + iodosulfurón metil.

	Peróxido de hidrógeno ( $\mu\text{M}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso fresco) <sup>§</sup>					Peroxidación de lípidos ( $\mu\text{M}$ de MDA·g <sup>-1</sup> de peso fresco) <sup>Ω</sup>				
	Días después de la aplicación					Días después de la aplicación				
	3	6	9	12	15	3	6	9	12	15
Testigo	40.2 <sup>a‡</sup>	33.3 <sup>a</sup>	31.4 <sup>a</sup>	33.1 <sup>b</sup>	31.8 <sup>a</sup>	16.9 <sup>a</sup>	17.5 <sup>b</sup>	18.6 <sup>b</sup>	18.2 <sup>c</sup>	18.3 <sup>c</sup>
6.25 g + 1.25 g·ha <sup>-1</sup>	31.4 <sup>b</sup>	26.4 <sup>b</sup>	26.9 <sup>b</sup>	37.1 <sup>ab</sup>	19.62 <sup>b</sup>	16.0 <sup>a</sup>	20.6 <sup>ab</sup>	23.1 <sup>ab</sup>	26.3 <sup>b</sup>	26.2 <sup>b</sup>
12.5 g + 2.5 g·ha <sup>-1</sup>	30.1 <sup>b</sup>	25.4 <sup>b</sup>	26.7 <sup>b</sup>	40.1 <sup>ab</sup>	43.4 <sup>b</sup>	20.2 <sup>a</sup>	19.4 <sup>b</sup>	27.1 <sup>ab</sup>	34.1 <sup>ab</sup>	38.2 <sup>a</sup>
25.0 g + 5.0 g·ha <sup>-1</sup>	23.5 <sup>c</sup>	22.4 <sup>b</sup>	21.5 <sup>b</sup>	43.6 <sup>a</sup>	-	17.2 <sup>a</sup>	26.5 <sup>a</sup>	34.0 <sup>a</sup>	27.5 <sup>a</sup>	-
CV (%)	9.41	10.94	10.99	11.54	11.94	11.33	16.50	20.48	11.96	17.30

§ Valor promedio de peróxido de hidrógeno al día 0 = 30.9  $\mu\text{M}\cdot\text{g}^{-1}$  de peso fresco.

Ω Valor promedio de producción de MDA al día 0 = 17.2  $\mu\text{M}\cdot\text{g}^{-1}$  de peso fresco.

‡ Diferencia de medias dentro de columnas con prueba de Tukey, P≤0.05.

---

*RESULTADOS Y  
DISCUSIÓN  
(ETAPA 2)*

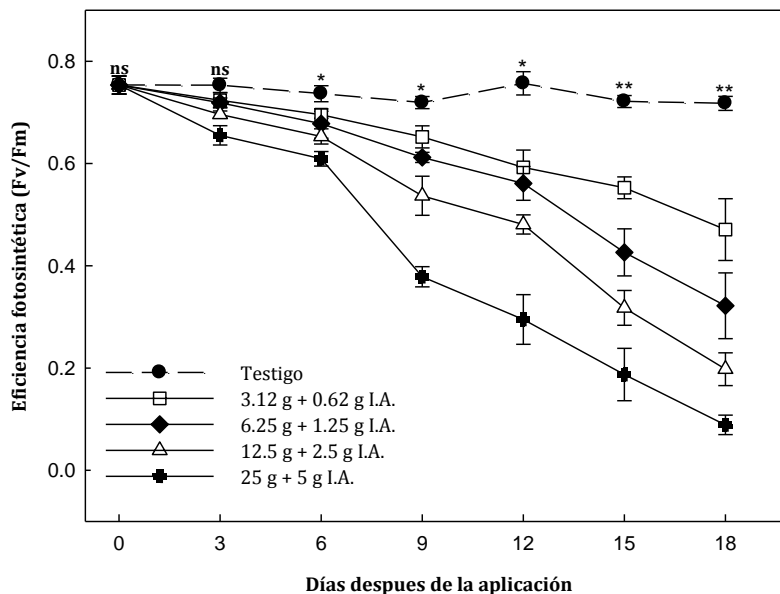
---

## Etapa 2

### 6.7. Eficiencia fotosintética (Fv/Fm)

Se encontró diferencia del testigo con respecto a las cuatro concentraciones en la mayoría de los días de evaluación, la cual es más notoria a partir del día seis después de aplicadas las dosis del herbicida (figura 19), la diferencia encontrada de eficiencia fotosintética en plantas tratadas con diferentes dosis de Mesosulfurón metil + Iodosulfurón metil fueron estadísticamente diferentes con respecto al testigo ( $\alpha=0,05$ ). Al sexto día, los valores de eficiencia fotosintética disminuyeron de 0.771 (testigo) a 0.586 (sobre-comercial), y en la dosis comercial (12.5 g + 2.5 g I.A.) de este mismo día tenemos valores de 0.617 (Fv/Fm). En los días 15 y 18 después de la aplicación, se presenta diferencia estadística del testigo con respecto a todas dosis de I. A. del herbicida, también se observa que la dosis que contiene la menor cantidad de ingrediente activo de la mezcla del Mesosulfurón metil + Iodosulfurón metil podemos ver la afectación de la eficiencia fotosintética con valores por debajo de 0.454 al día 18 después de aplicado. En todas las dosis se observó una disminución en los valores de Fv/Fm a medida que el tiempo transcurrió. Haynes *et al.* (2004) mencionan que las plantas al estar expuestas a un factor estresante, se ve afectada su actividad fotosintética manifestando cambios fisiológicos externos en la planta, lo cual concuerda con los resultados obtenidos, en donde la aplicación de diferentes dosis de Mesosulfurón metil + Iodosulfurón metil ocasionan toxicidad en plantas de alfalfa observado en cambios en su actividad fotosintética. Por otra parte se ha visto que los herbicidas pueden ocasionar una fitotoxicidad no específica dañando en cierta manera a las partes del organismo de interés (Dalton y Boutin, 2010), en nuestro caso el herbicida Mesosulfurón metil + Iodosulfurón metil inhibe a la enzima Acetolactato sintasa, que a su vez esta inhibición causa la desnutrición de la planta por falta de síntesis de aminoácidos como valina, leucina e isoleucina, alterando el transporte de fotosintatos y la disminución de la síntesis de proteínas causando la muerte de las plantas (Tranel y Wright, 2002). Además, Guo X *et al.* (2009) mencionan que en dosis altas (0.15 kg/hm<sup>2</sup>) de Mesosulfurón metil + Iodosulfurón metil en plantas de

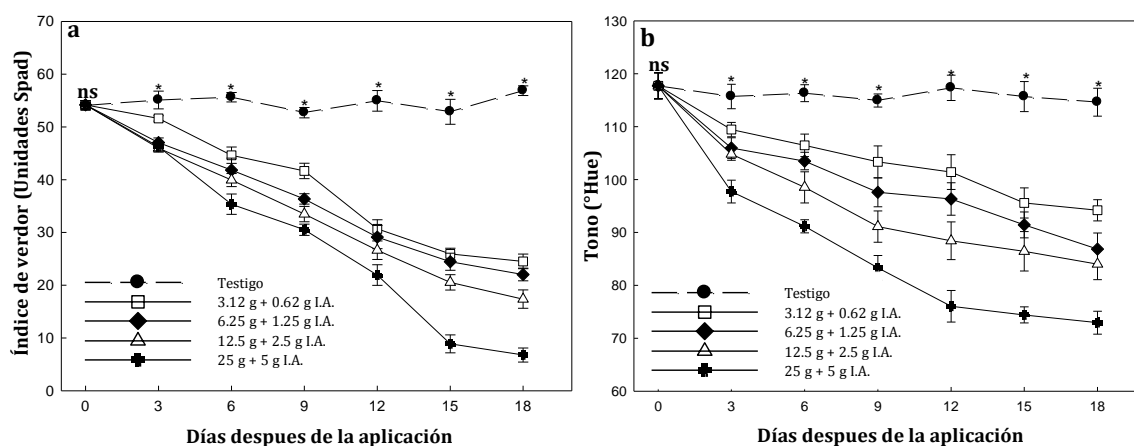
trigo, se reduce la eficiencia fotosintética, lo cual coincide con los resultados obtenidos en este estudio.



**Figura 19.** Comportamiento de la eficiencia fotosintética en plantas de alfalfa tratadas con Mesosulfurón metil + Iodosulfurón metil.

### 6.8. Índice De Verdor (Unidades Spad) y Tono (°Hue)

Los valores de índice de verdor y tono en plantas tratadas con diferentes dosis de Mesosulfurón metil + Iodosulfurón metil fueron estadísticamente diferentes con respecto al testigo ( $\alpha=0,05$ ) (figura 20). Se puede observar como las plantas tratadas con las dosis del herbicida fueron disminuyendo en su índice de verdor expresado en unidades Spad con respecto al testigo, desde el día tres después de la aplicación, se observó el efecto del herbicida en dosis por debajo de la sub-comercial (6.25 g + 1.25 g I.A.). Los valores en el testigo se mantuvieron entre 50.40 y 57.60 unidades Spad, a diferencia de las plantas sometidas a las dosis utilizadas; en el caso de la sobre-dosis (25 g + 5 g I.A.) se presentaron valores de 19.20 unidades Spad al día 12 y mientras que para el día 18 en esta misma dosis, valores de 5 unidades Spad (Figura 20a).



**Figura 20.** Comportamiento del índice de verdor y color en plantas de alfalfa tratadas con Mesosulfurón metil + Iodosulfurón metil. **a:** Índice de verdor; **b:** Tono.

Los valores de índice de verdor en dosis sub-comercial y comercial son muy similares en todos los días de muestreo con valores al día 18 de 19.80 y 15.20 unidades Spad, respectivamente. Se ha encontrado que los herbicidas causan fitotoxicidad tanto en malezas como en cultivos, dentro de la fitotoxicidad que causan los herbicidas, ocasionan directamente o indirectamente la interrupción del flujo de electrones, lo que provoca la destrucción de la clorofila y carotenoides, lo que causa la clorosis, y la formación de radicales libres que destruyen las membranas celulares provocando la necrosis (Duke y Dayan, 2001). Los resultados aquí presentados concuerdan con los reportados por Pavlovic (2005) y Pavlovic *et al.* (2007) donde observaron una disminución de 25.00 a 20.31 en plantas de *Amaranthus retroflexus*, por otra parte para las plantas de *A. teophrastila* la disminución fue de 25.27 a 23.95 y de 37.99 a 33.14 para plantas de *Chenopodium álbum*. Por otra parte Pavlovic (2010) observó los cloroplastos dañados en las plantas de *Conyza canadensis*, *C. bonariensis* y *Lolium rigidum* después de la aplicación de glifosato trimesium.

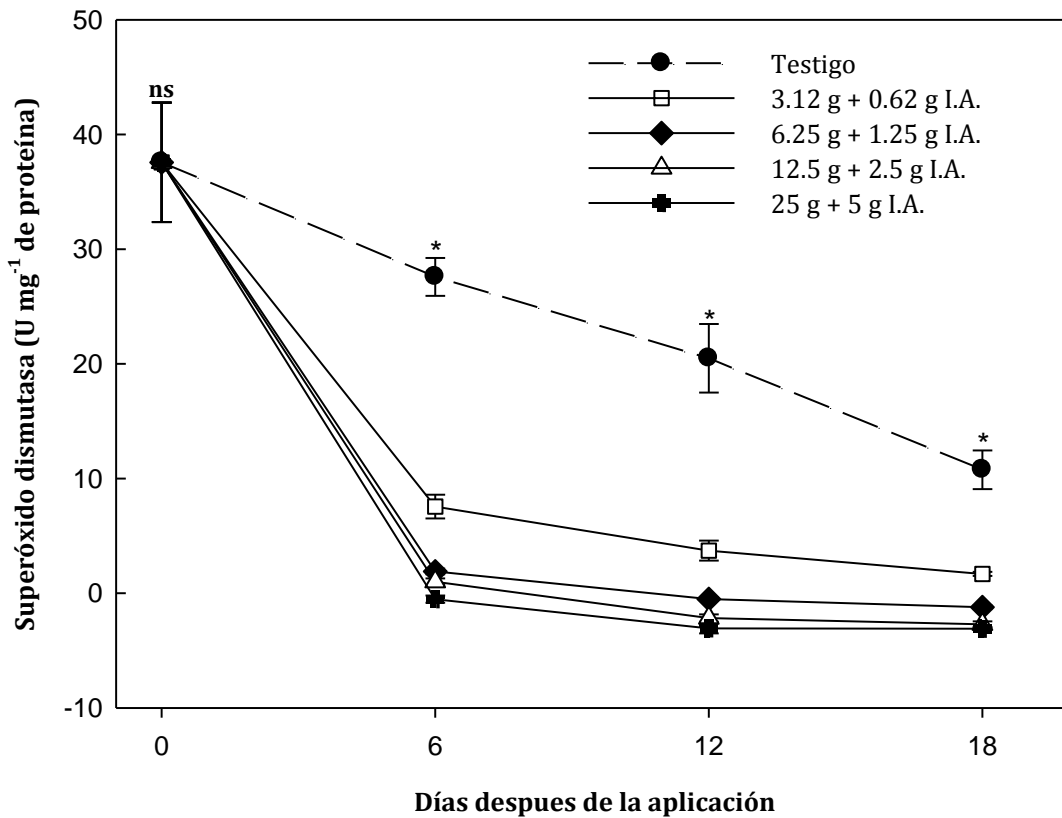
En la Figura 20b, se puede observar que las plantas de alfalfa tratadas con todas las concentraciones utilizadas de Mesosulfurón metil + Iodosulfurón metil,

mostraron una disminución en sus valores de tono ( $^{\circ}$ Hue) con respecto al testigo. Las dosis sub-sub-comercial, sub-comercial y comercial (3.12 g + 0.62 g, 6.25 g + 1.25 g, y 12.5 g + 2.5 g I.A.) mostraron alta similitud entre ellas en todos los días de muestreo, excepto en el día 18 en el cual hubo diferencia con la dosis sub-sub-comercial (3.12 g + 0.62 g I.A.). En todas las dosis a partir del día tres se muestra una diferencia significativa con respecto al testigo ( $\alpha=0,05$ ), sin embargo, la dosis que muestra una mayor diferencia es la sobre-dosis (25 g + 5 g I.A.) donde desde el día tres presenta valores de 93.88  $^{\circ}$ Hue en comparación con el testigo que para ese mismo día tuvo valores de 120.90  $^{\circ}$ Hue. En estas mismas dosis para el día 18 se muestran valores de 70.00 y el testigo tuvo 116.50  $^{\circ}$ Hue, lo cual muestra la alta degradación del color ocasionada por la mezcla del Mesosulfurón metil + Iodosulfurón metil. Esta degradación del color puede deberse como hemos visto anteriormente al haber una inhibición de la enzima Acetolactato sintasa lo que causa la desnutrición de la planta por falta de síntesis de aminoácidos ramificados (valina, leucina e isoleucina) alterando el transporte de fotosintatos y la disminución de la síntesis de proteínas, lo que provoca la destrucción de la clorofila y carotenoides, lo que ocasiona la clorosis, y la formación de radicales libres que destruyen las membranas celulares (Tranel y Wright, 2002; Duke y Dayan, 2001). Posiblemente debido a que existe una influencia indirecta del herbicida utilizado sobre la estructura de los cloroplastos, ocasione una disminución en el índice de verdor, que puede sugerir que el Mesosulfurón metil + Iodosulfurón metil puede destruir la estructura del cloroplasto al reducir el nivel de apilamiento de los tilacoides (Liu *et al.*, 2007), aumentar el riesgo de daños por foto-oxidación, reducir la absorción de luz, transmisión, y distribución entre el fotosistema I y fotosistema II (Murata N, S. *et al.*, 2007).

### **6.9. Actividad enzimática de Superóxido dismutasa**

La actividad de Superóxido dismutasa en plantas de alfalfa ocasionado por la aplicación del herbicida, disminuyeron en todos los tratamientos desde el día 6. La disminución de la actividad de SOD fue similar en las dosis sub-comercial, comercial y sobre comercial (6.25 g + 1.25; 12.5 g + 2.5 g y 25 g + 5 g de I.A.), en

la dosis sobre-comercial los valores promedio fueron de 31.93 U·mg<sup>-1</sup> de proteína en el día 0 a -1.4470 U·mg<sup>-1</sup> de proteína del día 18. En la dosis sub-sub-comercial (3.12 g + 0.62 g de I. A.) encontramos una diferencia con respecto a las dosis antes mencionadas en todos los días de muestreo los valores obtenidos disminuyen de 31.93 U·mg<sup>-1</sup> de proteína en el día 0 a 1.5327 U·mg<sup>-1</sup> de proteína en el día 18. En el testigo los valores fluctuaron de 31.93 U·mg<sup>-1</sup> de proteína en el día 0 a 9.0547 U·mg<sup>-1</sup> de proteína en el día 18 lo cual muestra una clara diferencia en comparación con las dosis y la disminución de la actividad en SOD (figura 21). Como se ha descrito anteriormente en todas las dosis se ha mostrado una reducida actividad de SOD durante el transcurso del tiempo, obteniéndose las más bajas actividades en el día 18 en todos los tratamientos lo cual al haber una disminución en dicha actividad puede contribuir a la acumulación de superóxido e incrementar el estrés oxidativo (Rogiers *et al.*, 1998). Se han visto resultados similares en la reducción de la actividad de SOD debido a la aplicación de fluometurón y atrazina, lo que sugiere que esta disminución es atribuida en activación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sandalo *et al.*, 2001), además se ha evaluado en hojas de frijol y maíz, que conforme aumenta el tiempo de exposición del herbicida en la planta, los niveles de la enzima SOD se ven disminuidos, lo que significa una menor actividad de la enzima (Hassan y Mamdouh, 2005).

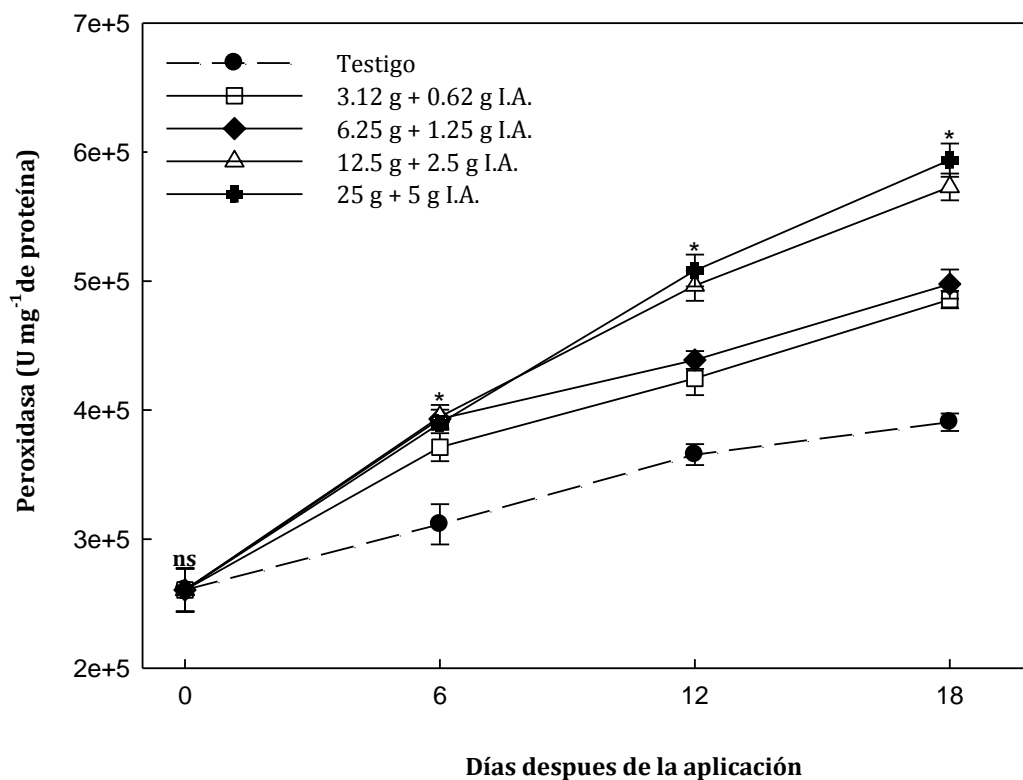


**Figura 21.** Actividad enzimática de la Superóxido dismutasa en plantas de alfalfa tratadas con Mesosulfurón metil + Iodosulfurón metil.

### 6.10. Actividad enzimática de Peroxidasa

La actividad enzimática de Peroxidasas en plantas de alfalfa sometidas a distintas dosis de aplicación de Mesosulfurón metil + Iodosulfurón metil siguieron una misma tendencia, con un incremento conforme transcurrió el tiempo después de la aplicación del herbicida (figura 22). El mayor incremento de la enzima POD se encontró a los 18 días después de la aplicación con la dosis de sobre-dosis (25 g + 5 g de I.A.), la cual aumentó 1.27 veces la actividad de esta enzima con respecto al testigo, con un valor de 593, 765 U·mg<sup>-1</sup> de proteína. Para el día 12 después de la aplicación los valores de actividad específica de POD se mantuvieron cercanos a las 380,000 U·mg<sup>-1</sup> de proteína para las cuatro dosis de aplicación, presentando una tendencia de mayor actividad para las dosis de mayor

concentración de ingrediente activo. Estos incrementos pueden estar asociados a la generación de un estrés oxidativo provocado por el mayor tiempo de exposición, así como las concentraciones más altas de ingrediente activo del herbicida, generando una mayor liberación de la POD al citoplasma de la célula incrementando así su actividad.



**Figura 22.** Actividad enzimática de la Peroxidasa en plantas de alfalfa tratadas con Mesosulfurón metil + Iodosulfurón metil.

Uno de los mecanismos de reacción bioquímica más importante con que una planta cuenta para contender ante diversos cambios dañinos del ambiente, es el complejo enzimático de defensa, el cual incluye a la PX y la SOD. La PX, al igual que la catalasa, es una hemo-proteína que cataliza la dismutación del  $H_2O_2$  en  $H_2O$  y  $O_2$  y desarrolla otros roles fisiológicos (como enzimas de lignificación y como oxidasa del indolacético) (Salvador-Figueroa *et al.*, 2013). Las peroxidases participan en muchos procesos fisiológicos y en la respuesta a varios factores

externos tales como interacciones con patógenos, heridas u otros estreses ambientales (Passardi *et al.*, 2004), promoviendo una defensa pasiva, mediante el estímulo del engrosamiento de las paredes celulares, o activa, controlando el daño oxidativo y/o participando en la degradación de compuestos.

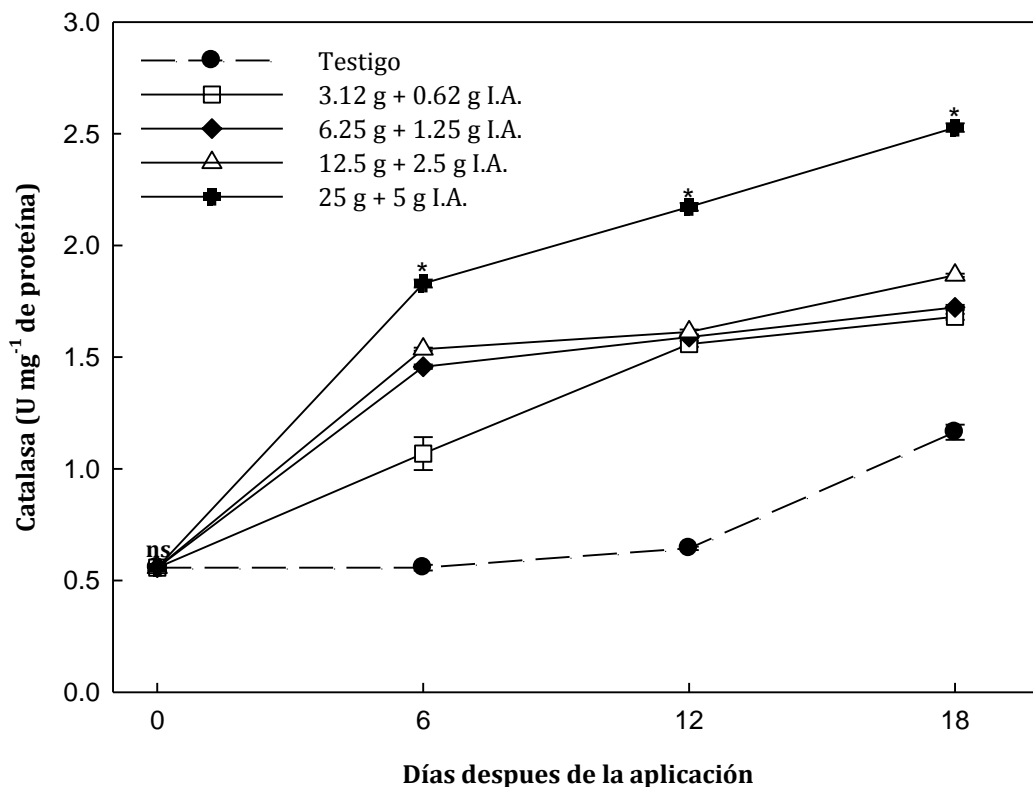
Estos resultados conciben con los obtenidos por Basantani *et al.* (2011), los cuales trabajaron con *Vigna radiata* en donde encuentran que el glifosato induce la expresión de peroxidasas reflejándose en incrementos de aproximadamente una a tres veces los niveles de actividad con respecto al control. Estudios anteriores como los de Cañal *et al.* (1988) encontraron que el glifosato incrementó la expresión de peroxidasas en *Cyperus esculentus*, entre éstas han detectado tres fracciones isoenzimáticas las cuales variarían su nivel de actividad dependiendo de la dosis de herbicida empleada.

Los radicales superóxido y peróxido de hidrógeno son tóxicos en la naturaleza, causa daños en la membrana y la inactivación de diversas enzimas, al ver un aumento de la actividad de peroxidasa en hojas *Vigna mungo* L. por la acción de un herbicida es un indicativo de un aumento de la desintoxicación de aniones de  $H_2O_2$  que se producen en respuesta al estrés causado por el herbicida Quizalofop-*p*-etil (Mahakavi *et al.*, 2014).

Sergiev *et al.* (2006) indicaron que en post-aplicación de glifosato, los efectos del herbicida sobre la generación de  $H_2O_2$  en maíz no son inmediatos, luego de tres días de realizado el tratamiento registró un incremento significativo de los niveles de  $H_2O_2$  y *a posteriori* la actividad de peroxidasas respondió alcanzando valores 10 veces superiores al del control, a los 10 días de efectuada la aplicación. Sin embargo, estudios sobre la actividad enzimática de peroxidasas por el uso del herbicida Sigma Forte en cultivo de alfalfa no ha sido reportados, por lo que estos son los primeros estudios sobre el uso de este herbicida en la actividad enzimática de POD en plantas de alfalfa.

### **6.11. Actividad enzimática de Catalasa**

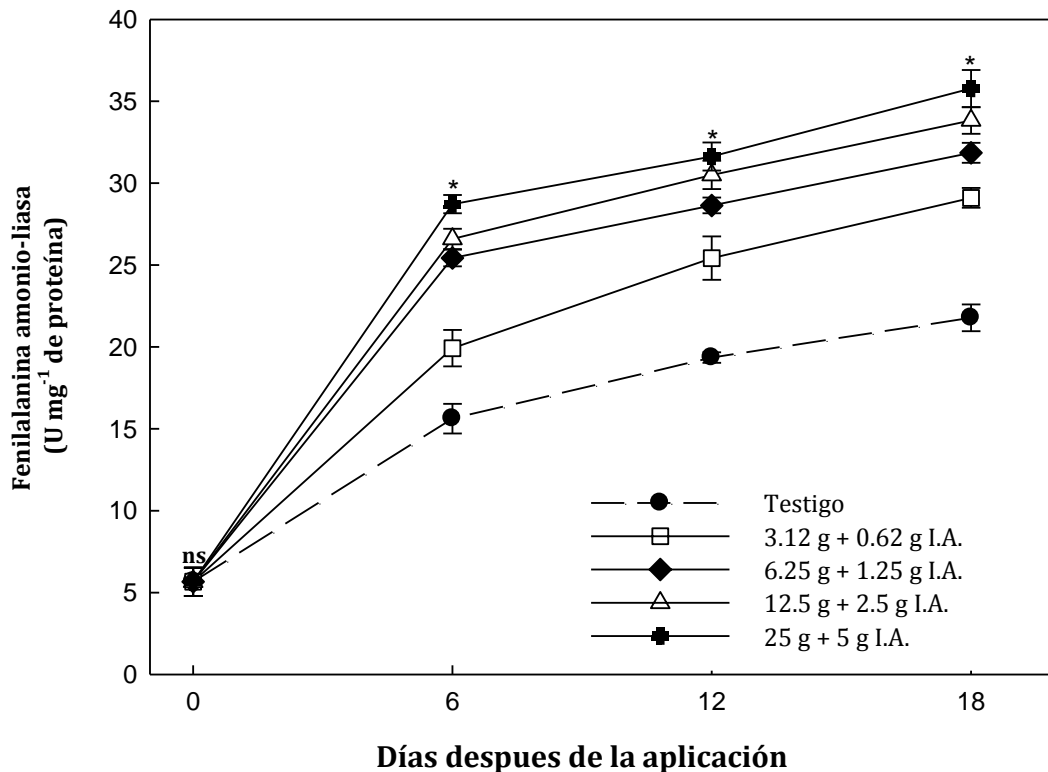
En los resultados obtenidos en la actividad específica de la catalasa (figura 23) muestran un aumento en todos los tratamientos, siendo el menor incremento en el testigo de  $0.5393 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteína en el día 0 a  $1.5902 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteína día 18; el tratamiento que presentó mayor actividad específica fue la sobre-dosis (25 g + 5 g I.A.) con valores que oscilan en  $0.5393 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteína al día inicial y  $2.5471 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteína al día 18. Con estos resultados se sugiere que la actividad específica de la Catalasa, es una de las vías contra el estrés oxidativo ocasionado por lo herbicidas, debido a su respuesta por las diferentes concentraciones con respecto al testigo. Además, estos resultados son similares a los reportados por Peixoto *et al.* (2008), en donde evaluaron diferentes dosis y tipos de herbicidas en cultivo de papa, y observaron un mayor incremento en la actividad de Catalasa, así como de otras enzimas relacionadas con el estrés oxidativo de la planta.



**Figura 23.** Actividad enzimática de la Catalasa en plantas de alfalfa tratadas con Mesosulfurón metil + Iodosulfurón metil en diferentes días de muestreos.

### 6.12. Actividad enzimática de Fenilalanina amonio-liasa (PAL)

La actividad enzimática de PAL tuvo cambios significativos en los tratamientos aplicados a las plantas de alfalfa con respecto al testigo, sin embargo, tanto el testigo como los tratamientos siguieron la misma tendencia de actividad específica, la cual conforme se incrementó la dosis del herbicida, esta actividad fue mayor (figura 24).



**Figura 24.** Actividad enzimática de Fenilalanina amonio-liasa en plantas de alfalfa tratadas con Mesosulfurón metil + Iodosulfurón metil.

Las mayores actividades se presentaron a los días 18 después de la aplicación del herbicida, con el valor máximo para la sobre-dosis (25 g + 5 g de I.A.) con un promedio de 35 U·mg<sup>-1</sup> de proteína, mientras que el valor mínimo lo presentó el testigo. Las actividades específicas para las mayores dosis de concentración de ingrediente activo utilizadas presentaron las actividades más altas. Esto sugiere que conforme aumenta la concentración del IA del herbicida, la actividad específica de PAL se ve incrementada, así como un incremento de esta con respecto a los días después de la aplicación. La enzima PAL es una de las principales enzimas involucradas en la ruta fenilpropanoide, esa ruta se encarga de la producción de ciertos metabolitos secundarios de la planta que se utilizan como defensa frente al estrés producido en la planta, y se ha visto que en el caso de la aplicación de glifosato, esta enzima incrementó su actividad, generando un

mayor contenido de compuestos fenólicos en la planta (Cole *et al.*, 1980). Se ha visto también que los compuestos expulsados en una fitotoxicidad por un herbicida aumentan el contenido de fenoles simples, el ácido benzoico y sus derivados, el ácido cinámico y sus derivados, coumarinas, sulfuros, glicósidos, alcaloides, cianhidrinas, algunos de los derivados de quinonas y taninos hidrolizables y condensados, flavonoides entre otros, en donde en cuya síntesis proviene de la ruta catalizada por PAL (Dongre *et al.*, 2004).

## **VI. CONCLUSIONES**

### **Etapa 1**

La mezcla de Mesosulfurón metil + Iodosulfurón metil en el cultivo de alfalfa, ocasiona un efecto negativo en la eficiencia fotosintética, tono, índice de verdor, clorofila a y b, clorofila total y carotenoides totales. Además, generan incrementos en la concentración de peróxido de hidrogeno y peroxidación lipídica. Estos efectos fueron mucho más evidentes y notorios al utilizar dosis comerciales y más concentradas.

### **Etapa 2**

La presencia de Mesosulfurón metil + Iodosulfurón metil en plantas de alfalfa muestran una alteración negativa en la eficiencia fotosintética, índice de verdor y tono, además de un aumento en la actividad enzimática de Peroxidasa, Catalasa y Fenilalanina amonio-liasa, así como una disminución en la actividad enzimática de la Superóxido dismutasa, derivado de una toxicidad por parte del herbicida.

---

*LITERATURA CITADA*

---

## VII. LITERATURA CITADA

- Abu-Qare A. y Duncan J., 2002. Herbicide safeners: uses, limitations, metabolism, and mechanisms of action. *Chemosphere* 48: 965-974.
- Ahmad I. S., Reid J. F., Noguchi N. and Hansen A. C., 1999. Nitrogen sensing for precision agriculture using chlorophyll maps. ASAE/CSAE-SCGR Annual International Meeting. July 18-21. Paper No. 993035.
- Alain-M. B., 2000. Lignins and lignification: Selected issues. *Plant Physiol. Biochem.* 38: 81-96.
- Alscher R. G., Donahue J. L., Cramer C.L., 1997. Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells. *Physiologia Plantarum* 100: 224-233.
- Amstrong R. S., Sohal R. G., Cutler R. G. and Slater T. F., 1984. Free Radicals Molecular Biology, Aging and Disease. Raven, New York.
- Anderson W. P., 1996. Weed Science: Principles. 3rd edition. West Publishing Co., St. Paul, MN. 338 p.
- Anónimo. 2010. Guía técnica para el área de influencia del campo experimental Valle de Mexicali. Centro de Investigación Regional del Noroeste, Campo experimental Valle de Mexicali. Primera edición. Mexicali, B.C. 148p.
- Anónimo. Diccionario de Especialidades Agroquímicas PLM. 2007. 17ª Edición.
- Anzalone A., 2008. Herbicidas: Modos y Mecanismos de acción en Plantas. Fondo Editorial de la Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". 144 pp.

- Apel K. and Hirt H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55:373–399.
- Appenroth K. J., Stöckel J., Srivastava A., Strasser R. J., 2001. Multiple effects of chromate on the photosynthetic apparatus of *Spirodela polyrhiza* as probed by OJIP chlorophyll a fluorescence measurements. *Environ Pollut* 115:49-64.
- Arora A., Sairam, R. K. & Srivastava G. C., 2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants. Review article. *Current Science*, 82, 1227-1238.
- Asada K. 1992. Ascorbate peroxidase: a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 85: 2235-2241.
- Asada K., 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 50: 601–639.
- Ashton F. M. and Crafts A. S., 1981. Mode of action of herbicides. Wiley-Interscience, New York, NY. 525 p.
- Badiani M., Schenone G., Paolacci A.R. & Fumagalli I., 1993. Daily fluctuations of antioxidants in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) leaves as affected by the presence of ambient air pollutants. *Plant Cell Physiol*, 34: 271-279.
- Bannister J.V., Bannister W.H., Rotilio G., 1987. Aspects of the structure, function and applications of superoxide dismutase. *Critical Reviews in Biochemistry* 22: 111–180.

- Baumann P. A., Dotray P. A. and Prostko E. P., 1998. Herbicide mode of action and injury symptomology. Texas Agriculture Extension Service. The Texas A&M University System. SCS-1998-07. 10 p.
- Becana M., Aparicio T. P., Irigoyen J. J. & Sanchez D. M., 1986. *Ibid.* 82, 1169–1171.
- Blokhina O., Virolainen E. & Fagerstedt K. V., 2002. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review. *Annals of Botany* 91: 179-194.
- Board P, Russell R. J., Marano R. J., Oakeshott J. G., 1994. Purification, molecular cloning and heterologous expression of a glutathione s-transferase from Australian sheep blowfly (*Lucilia cuprina*). *Biochem J.*299:425-30.
- Board P. G., Coggan M., Chelvanayagam G., Easteal S., Jermiin L. S., Schulte G. K., 2000. Identification, characterisation, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases. *J Biol Chem.* 275:247.98-806.
- Bolwell G. P., Bozak K. y Zimmerlin A., 1994. Plant cytochrome P450. *Phytochemistry* 37, 1491-1506.
- Bouton J. H. 2001., Alfalfa. In: Proceedings of the XIX International Grassland Congress. Sao Pedro, Sao Paulo, Brazil. pp: 545-547.
- Bowler C., Montague M. V. & Oxborough, K., 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 43: 83–116.
- Buhler D. D., 1998. Tillage systems and weed population dynamics and management. pp: 223-246. *In:* J.L. Hatfield, D.D. Buhler and B.A Stewart, eds. *Integrated Weed and Soil Management*. Ann Arbor Press. Chelsea, MI.

- Cadenas E., 1989. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu. Rev. Biochem.*, 51: 79-110.
- Capinera J., 2005. Relationships between insect pests and weeds: an evolutionary perspective. *Weed Science* 53: 892-901.
- Caseley J.C., 1996. Herbicidas. *In*: Labrada, R., J. C. Caseley y C. Parker, 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. <http://www.fao.org/docrep/T1147S/t1147s0e.htm#TopOfPage>.
- Castillo F., 2005. Biotecnología ambiental. Editorial Tebar. p.510.
- Christoffoleti P. J., López-Ovejero R. F., 2004. Definições e situação da resistência de plantas daninhas aos herbicidas no Brasil e no Mundo. *In*: (Coord.) Aspectos da resistência de plantas daninhas a herbicidas. 2.ed. Campinas: Associação Brasileira de Ação a Resistência de Plantas aos Herbicidas (HRAC-BR) p.3-22.
- Christopher J.T., Powles S.B., DLiljegren.R., Holtum J.A.M., 1991. Cross-resistance to herbicides in annual ryegrass (*Lolium rigidum*) II. Chlorsulfuron resistance involves a wheat-like detoxification system. *Plant Physiol.*, 95 pp. 1036–1043.
- Clifford H. K., Krishna N., 2005. Reddy. Role of absorption and translocation in the mechanism of glyphosate resistance in horseweed (*Conyza canadensis*). *Weed Science*, 53:84–89.

- Coleman J. O. D., Blake-Kalff M. M. A., Davies T. G. E., 1997. Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends Plant Sci.* 2, 144–151.
- Corpas F. J., Sandalio L. M., del Rio L. A. & Trelease R. N., 1998. *New Phytol.* 11138, 307–31.
- Coruzzi G. and Last R., (2000) Amino acids. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (eds. B Buchanan, W. Gruissem y RL Jones), pp 358-411, John Wiley & Sons, New York.
- 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.
- Cousens R., Mortimer M., 1995. *Dynamics of Weed Populations*. Cambridge. Cambridge University Press. 332pp.
- Dat J., Vandenameele S., Vranová E., Van Montagu M., Inzé D., Van Breusegem F., 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 57: 779-795.
- Dat J., Vandenameele S., Vranová E., Van Montagu M., Inzé D., Van Breusegem F., 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 57: 779-795.
- Dauterman W. C., 1983. The role of hydrolases and glutathione S-transferases in insecticide resistance. In Georghiou GP, Saito T eds. *Pest resistance to pesticides*. New York: Plenum. pp. 229-48.

- Dayan F. and Watson S., 2001. Plant cell membrane as a marker for light-dependent and light-independent herbicide mechanisms of action. *Pestic. Biochem. Physiol.* 101:182–190.
- Dayan F., Owens D. and Duke S., 2012. Rationale for a natural products approach to herbicide discovery. *Pest Manag Sci.* 68: 519-528.
- De Prado J., Cruz-Hipolito H. y De Prado R., 2009. Mecanismo de resistencia de malezas a herbicidas. *In: Seminario Internacional: Diagnostico y manejo de la resistencia a herbicidas.* Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Serie Actas N° 44. Carillanca-Chile. 19 p.
- De Prado R, Plaisance K. L., Menendez J. y Gronwald J. W., 1996. Effect of graminicide herbicides on growth and ACCase activity in a chlortoluron-resistant biotype of *Alopecurus myosuroides*. En: *Proceedings of the International Symposium on Weed and Crop Resistance to Herbicides* (eds. R De Prado, J Jorrín, L García-Torres y G Marshall), pp. 59-61, Universidad de Córdoba, España.
- De prado R. y Cruz-Hipolito H., 2005. Mecanismos de resistencia de las plantas a los herbicidas. [www.inia.org.uy/estaciones/laestanzuela/webseminariomalezas/articulos/depradorafael.pdf](http://www.inia.org.uy/estaciones/laestanzuela/webseminariomalezas/articulos/depradorafael.pdf).
- Del Pozo M., 1983. La Alfalfa. Su Cultivo y Aprovechamiento. Editorial MundiPrensa. Madrid, España. 380 p.
- DEVIN, M. D., DUKE S. O., FEDTKE C., 1993. Physiology of herbicide action, (eds. Prentice Hall), Englewood Cliffs, pp, 441.
- Devine M. D., Duke S. O., Fedtke C., 1993. Physiology of herbicide action, (eds. Prentice Hall), Englewood Cliffs, USA. 441 pp.

- Devine M.D., Eberlein C. V., 1997. Physiological, biochemical and molecular aspects of herbicide resistance based on altered target sites. In: *Herbicide Activity: Toxicology, Biochemistry and Molecular Biology* (eds. RM Roe, JD Burton y RJ Kuhr), pp. 159-185, IOS Press, Amsterdam, The Netherlands.
- Dixon R. A., Pavia N. L., 1995. Stress- induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*. 7: 1085- 1097.
- Domenech X., 1997. "Química Ambiental". Miraguano Ediciones (2ª Ed), Madrid 48.
- Droillard M. J. & Paulin A.,1989. Isozymes of Superoxide Dismutase in Mitochondria and Peroxisomes Isolated from Petals of Carnation. *Plant Physiol*. 89(3):728–731.
- Drotar A., Phelps P., Fall R., 1985. Evidence for glutathione peroxidase activities in cultured plant cells. *Plant Science* 42: 35-40.
- Duke S. O. and Dayan F. E., 2001. Classification and mode of action of the herbicides. Pp: 31-44. *In: Uso de Herbicidas en la Agricultura del Siglo XXI*. De Prado, R. y J. V. Jorrín. eds. Servicio de Publicaciones. Universidad de Córdoba, España.
- Durand P., 1984. "Aditivos de Productos Cárnicos". *Noticiteca*, 14 (85/86), p. 268-279.
- Edwards R.,1996. Characterisation of glutathione transferases and glutathione peroxidases in pea (*Pisum sativum*). *Physiologia Plantarum* 98: 594-604.

- Elstner E.F., Wagner G.A. & Schutz, W., 1988. Activated oxygen in green plants in relation to stress situations. *Curr. Topics. Plant Biochem. Physiol.* 7: 159-187, 1988.
- Eshdat Y., Holland D., Faltin Z, Ben-Hayyim G., 1997. Plant glutathione peroxidases. *Physiologia Plantarum* 100: 234-240.
- Espinoza I., Rodríguez E. y Mendt R., 1995. *Guía de Teoría de Protección Vegetal II*. U.C.V., Facultad de Agronomía. Maracay, Venezuela. pp: 14 – 50.
- Feng P.C.C., Tran M., Chiu T., Sammons R.D., Gregory R., Jacob C.A., 2004. Investigations into glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*): retention, uptake, translocation, and metabolism *Weed Sci.*, 52. pp. 498–505.
- Frova C., 2006. Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives. *Biomol. Eng.* 23, 149–169.
- Fusagri., 1985. *Control de Malezas Serie petróleo y Agricultura*. Fundación servicio para el agricultor (FUSAGRI) N° 8, pp. 9-26.
- Gabriel A. Pinilla, 2006. Evaluación de la eficiencia fotosintética del fitoplancton en un lago amazónico (Lago Boa) y en un lago andino (Lago Guatavita). *Acta Amazonica*. VOL. 36(2) P 222.
- García-Torres L. y Fernández-Quintanilla C., 1991. *Fundamentos sobre malas hierbas y herbicidas*. MAPA - Eds Mundi-Prensa. Madrid.
- Ge X., D'Avignon D.A., Ackerman J.J.H., Sammons R.D., 2010. Rapid vacuolar sequestration: the horseweed glyphosate resistance mechanism. *Pest Manage. Sci.*, 66. pp. 345–348.

- Gechev T., Willekens H., Van Montagu M., Inze D., 2003. Different responses of tobacco antioxidant enzymes to light and chilling stress. *Journal of Plant Physiology* 160(5): 509-515.
- Gill S. S., Tuteja N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48(12):909-930.
- Gomez J. M., Hernandez J. A., Jimenez A., del Rio L. A. & Sevilla F., 1999. Differential response of antioxidative systems of chloroplasts and mitochondria to long term NaCl stress of pea plant. *Free Radical Res. (Suppl.)*, 31: 11–18.
- González M., Mariño N., Parra P., Parra R. y Suárez G., 1990. Guía de Teoría de Morfología Vegetal. U.C.V., Facultad de Agronomía. Maracay, Venezuela. pp: 23 – 31.
- Goodman S. T., 1998. Medical cell biology, vol. II, pp. 27-65, USA: Goodman, S.T., ed. Lippincott-Raven Publishers.
- Gossett D.R., Banks S.W., Millhollon E.P. & Lucas C., 1996. Antioxidant response to NaCl stress in a control and an NaCl-tolerant cotton cell line grown in the presence of paraquat, buthionine sulfoximine and exogenous glutathione. *Plant Physiol.*, 112: 803-809.
- Greenwald R., 1990. “Current approaches to the development of oxygen radical scavengers”, in *Drugs of Today*. 26, pp. 299-307.
- Gressel J. y Segel L. A., 1978. The paucity of genetic adaptive resistance of plants to herbicides: possible biological reasons and implications. *J. Theor. Biol.* 75: 349–371.

- Gressel J. y Segel L., 1978. The paucity of plants evolving genetic resistance to herbicides; possible reasons and implications. *Journal of Theoretical Biology*, 75, 349-371.
- Gunsolus J. L. and Curran W. S., 1996. Herbicide mode of action and injury symptoms. North Central Extension Publication 377. 14 p.
- Gutteridge J. & Halliwell B., 1999. Reactive oxygen species in biological systems, pp. 189-218, New York, USA: D.L. Gilbert and C.A. Colton, eds.
- Gutteridge J. and Halliwell B., 2000. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci.*136-147.
- Halliwell B. and Gutteridge J.1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford, U.K.: Oxford University Press.
- Halliwell B., 1990. "How to characterize a biological antioxidant", in *Free Radical Research Communication* 9, pp. 1-32.
- Han H., Yu Q., 2013. Cawthray, S.B. Powles. Enhanced herbicide metabolism induced by 2,4-D in herbicide susceptible *Lolium rigidum* provides protection against diclofop-methyl. *Pest Manage. Sci.*, 69. pp. 996–1000.
- Hance R. J. and Holly K., 1990. *Weed Control Handbook: Principles*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK. 582 p.
- Hanson A., 1972. Grass varieties in the United States. *Agriculture Handbook* No. 170. USDA-ARS. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.

- Hatzios K.K. 1991. Biotransformations of herbicides in higher plants. En: "Environmental Chemistry of Herbicides", (eds. Grover R y Cessna AJ), Boca Raton, FL, CRC Press, pp. 141-185.
- Hawkes T. R., 1989. Studies of herbicides which inhibit branched chain amino acid biosynthesis. Brighthon Crop Protection Conference Monography 42: 131-38.
- Hawkes T. R., Howard J. L., Pontin S. E., 1989. Herbicides that inhibit the biosynthesis of branched chain amino acids. En: Herbicides and Plant Metabolism (ed. A. D. Dodge), pp. 113-136, Cambridge University Press, Cambridge.
- Hawkins T. S., Gardiner E.S. and Comer G. S., 2009. Modeling the relationship between extractable chlorophyll and SPAD-502 readings for endangered plant species research. J. Nat. Conserv. 17: 123–127.
- Hay J.V., 1990. Chemistry of sulfonylurea herbicides. Pesticide Sciences, 29:247-261.
- Heap I., 2001. International Survey of Herbicide-Resistant Weeds. Classification of Herbicides by Mode of Action. [www.weedscience.com](http://www.weedscience.com).
- Heather M. W., Kemal K., Neena M., Kenneth C., Goulter, Robert G., Birch and John M., Manners. 2002. Constitutive expression of a phenylalanine ammonia-lyase gene from *Stylosanthes humilis* in transgenic tobacco leads to enhanced disease resistance but impaired plant growth. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 60:275-282.
- Hernandez J. A., Campillo A., Jimenez A., Alarcon J. J. & Sevilla F.,1999. Response of antioxidant systems and leaf water relations to NaCl stress in pea plants. *New Phytol*. 141: 241– 251.

- Hernández J. A., Jiménez A., Mullineaux P. M. & Sevilla F., 2000. Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant Cell Environ.* 23:853-862.
- Hernández A. J., Ferrer A.M., Jiménez A., Barcel R.A. and Francisca S., 2001. Antioxidant system and O<sub>2</sub> /H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiol.*, 127: 817-831.
- Holm L., D. Plucknett, J. Pancho, and J. Herberger., 1977. *The World's Worst Weeds: Distribution and Biology*. University of Hawaii Press, Honolulu. xii + 609 pp.
- Horrocks D. and Valentine J., 1999. *Harvested Forages*. Academic Press. San Diego, California, United States of America. 426 p.
- Hughes R., Ellery P., Harry T., Jenkins V. and Jones E., 1980. The dietary potential of the common nettle. *J. Sci. Food Agric.* 31:12: 1279-1286.
- Hunt M. C., Acton J. C., Benedict R. C., Calkins C.R., Cornforth, D.P., Jeremiah L.E., Olson D.P., Salm C.P., Savell J.W. & Shivas S.D., 1991. "American meat Science Association, Guidelines for meat colour evaluation". Chicago, National Live Stock and Meat Board.
- Iturbe-Ormaetxe I., Escudero P. R., Arrese-Igor C. and Becana M., 1998. Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or paraquat. *Plant Physiology.* 116: 173-181.

- Jansen M., Elfstrand M., Heggie L., Sitbon F., Dix P., Thorneley R., 2004. Over-expression of phenol-oxidising peroxidases alters the UV-susceptibility of transgenic *Nicotiana tabacum*. *New Phytologist* 163: 585-594.
- Jasieniuk M., Brûlé-Babel A. L. y Morrison I. N., 1996. The evolution and genetics of herbicide resistance in weeds. *Weed Sci.* 44: 176-193.
- Jensson *et al.*, 1986. H. Jensson, C. Guthenberg, P. Alin, B. Mannervik. Rat glutathione transferase 8-8, an enzyme efficiently detoxifying 4-hydroxyalk-2-enals *FEBS Lett.*, 203: 207–209.
- Jiang J., Yang B., Xia T., Yu S., Wu Y., Jin H. y Li J., 2015. Analysis of genetic diversity of salt-tolerant alfalfa germplasms. *Genetics and Molecular Research*. 14:2: 4438-4447.
- Jin H., Sun Y., Yang Q., Chao Y., Kang J, Jin H., Li Y. y Margaret G., 2010. Screening of genes induced by salt stress from Alfalfa. *Mol. Biol. Rep.* 37: 745-753.
- Jutsum A. R. y Graham J. C., 1995. Managing weed resistance: the role of the agrochemical industry. *Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference Weeds*: 557-566.
- Kawahigashi H., 2009. Transgenic plants for phytoremediation of herbicides *Curr. Opin. Biotechnol.*, 20 (2009), pp. 22–230.
- Kawahigashi H., 2009. Transgenic plants for phytoremediation of herbicides. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20, 22–230.

- Kim F.J., Kim H.P., Hah Y.C. & Roe J.H., 1996. Differential expression of superoxide dismutases containing Ni and Fe/Zn in *Streptomyces coelicolor*. *European Journal of Biochemistry* 241: 178–185.
- Kishore G. M., Shah D. M., 1988. Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. *Annu. Rev. of Biochem.* 57: 27-63.
- Klighman C. and Ashton F., 1982. *Weed Science Chap 1. Principles and Practices* 2da. Edition. USA.
- Kocurek V., Smutny V., Filova J., 2009. Chlorophyll fluorescence as an instrument for the assessment of herbicide efficacy, *Cereal Res. Commun.* 37: 289-292.
- Kogan, Marcelo, Pérez J., Alejandro, 2013. Fundamentos fisiológicos y bioquímicos del modo de acción ISSN 0718-1620, Vol. 31, N°. 2, 2004, pag. 213.
- Koger K., Reddy C., 2005. Role of absorption and translocation in the mechanism of glyphosate resistance in horseweed (*Conyza canadensis*). *Weed Sci.*, 53. pp. 84–89.
- Krause G. H., Weis E., 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 42:313-349.
- Kropf D. H., Olson D.G. & West R.L., 1984. "Objective measures of meat colour". *Proc. 37th Annual Reciprocal Meat Conference*. Lubbock (Texas), American Meat Association and National Live Stock and Meat Board. P. 24-32.
- Krugh B., Bichham L. y Miles D., 1994. The solid-state chlorophyll meter, a novel instrument for rapidly and accurately determining the chlorophyll

concentrations in seedling leaves. *Maize genetics cooperation*. News Letter 68:25-27.

Kumar K. R., 2011. Plant responses to water stress: Role of reactive oxygen species. *Plant Signaling & Behavior*. 6:11, 1741-1745.

Labrada R., Caseley J. y Parker C., 1996. Manejo de Malezas para Países en Desarrollo. Roma. Capítulo 10. Estudio FAO producción y protección vegetal. [http://www.fao.org/3/contents/17f8d4f6-977b-5489-9e9e-12e786f05106/t1147s0e.htm#introducción10\\_1](http://www.fao.org/3/contents/17f8d4f6-977b-5489-9e9e-12e786f05106/t1147s0e.htm#introducción10_1).

Läuchli A., 1993. Selenium plants: uptake, functions and environmental toxicity. *Botanica Acta* 106: 455-468.

Levitt G., 1978. Herbicidal sulfonamides. US patent 4127405.

Liu D. Y., Liu J., Rao G., Wang H., Li F., Ge C., Chen. 2013. Overexpression of the glutathione S-transferase gene from *Pyrus pyrifolia* fruit improves tolerance to abiotic stress in transgenic tobacco plants.

Lukatkin A. S. *et al.*, 2013. Treatment with the herbicide topic induces oxidative stress in cereal leaves. *Pestic. Biochem. Physiol.* 105(1): 44-49.

Matringe M. & Scalla R., 1988. Effects of acifluofen-methyl on cucumber cotyledons: porphyrin accumulation [J]. *Pestic Biochem Physiol.* 32(2):164-172.

Maxwell K, Johnson G. N., 2000. Chlorophyll fluorescence. A practical guide. *J Exp Bot* 51: 659-668.

- Maxwell M. D. y Mortimer M., 1994. Selection for herbicide resistance. En: *Herbicide Resistance in Plants: Biology and Biochemistry* (eds. SB Powles y JAM Holtum), pp 1-25, CRC Press, Boca Raton.
- Milliman L.D., Riechers D.E., Wax L.M., Simmons F.W., 2002. Characterization of two biotypes of imidazolinone-resistant eastern black nightshade, *Weed Sci.* 51:139–144.
- Mine A., Miyakado M. y Matsunaka S., 1975. The mechanism of bentazon selectivity. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 5: 566-576.
- Mittler R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7:9:405-10.
- Modafar E. I., Tantaoui A., Boustani E. I., 2001. Differential induction of Phenylalanine ammonia-lyase activity in date palm roots in response to inoculation with *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* and to elicitation with fungal wall elicitor. *Journal of Plant Physiology.* 158:715-722.
- Mohammadi M.; Kamesi H., 2002. Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. *Plant Science.* 162: 491-498.
- Mortimer A. M., 1990. The biology of weeds. En: R.J. Hance y K. Holly (Eds.), *Weed control handbook: Principles*, pp 1-42. 8va edn. Blackwell Scientific Publications.
- Mortimer A. M., 1990. The biology of weeds. En: R.J. Hance y K Holly (Eds.), *Weed control handbook Principles*, pp 1-42. 8va edn. Blackwell Scientific Publications.

- Murphy T. R., 1999. Turfgrass herbicide mode of action and environmental fate. The University of Georgia. College of Agriculture and Environmental Sciences. <http://www.griffin.peachnet.edu/grf/dept/cropsci/turf/weedcontrol/TURFMOA.htm>.
- Muslera Pardo E. y Ratera García C., 1991. Praderas y forrajes. Producción y aprovechamiento. Ediciones Mundi-Prensa. 674 pp. Madrid (España).
- Narváez C. E., 2002. Estudio de la maduración y evaluación de los daños por frío del fruto de uva caimaroná (*Pouruma cecropiifolia*). Químico. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Bogotá.
- Oliveira J. R. S. Constantin J., Inoue M., 2011. Mecanismo de ação de herbicidas. In: *Biologia e manejo de plantas daninhas*. (Ed.). Curitiba: Omnipax. p. 141-192.
- Omura T., 1999. Forty years of cytochrome P-450. *Biochem Biophys Res Commun* 266, 690-698.
- Ortiz de Montellano P. R. & De Voss J. J., 2002. Oxidizing species in the mechanism of cytochrome P-450. *Nat Prod Rep* 19, 477-493.
- Owen W. y Pallutt B., 1991. How the crop rotation affects weeds. *PSP Pflanzenschutz Praxis* 3:14-16.
- Palamada J. & Kehrer J., 1992. "Inhibition of protein carbonyl formation and lipid peroxidation by glutathione in rat liver microsomes", in *Archives of Biochemistry and Biophysics* 293, pp. 103-109.
- Peter J. Kennelly y Victor W. Rodwell., 2010. HARPER Bioquímica ilustrada. México, D.F., ed. McGRAW-HILL. 28ª edición. Capítulo 7. PP 51-52.

- Petersen D. P., 1966: Compatibility of various commercial herbicide formulations with the Bifluid spray system and Instemul herbicides. Proc. sth. Weed Conf, 1966. 324-8.
- Peterson D. E., C. R. Thompson D. L. Regehr and Al-Khatib K., 2001. Herbicide mode of action. Kansas State University. C-715. 24 p.
- Pitty A. y R. Muñoz., 1991. Guía práctica para el manejo de malezas. El Zamorano. Escuela Agrícola Panamericana. Tegucigalpa. 223 p.
- Powles S. B; Yu, Q., 2010. Evolution in action: Plants resistant to herbicides. Annu. Rev. Plant Biol. 2010.61:317-347.
- Prasad T. K., Anderson M. D., Martin B. A. Stewart C. R., 1994. Evidence for chilling induced oxidative stress in Maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. The Plant Cell 6: 65-74.
- Prasad T., Anderson M. and Stewart C., 1994. Acclimation, Hydrogen Peroxide, and Abscisic Acid Protect Mitochondria against Irreversible Chilling Injury in Maize Seedlings. Plant Physiol. 105: 619-627.
- Pryor W. A., 1986. Oxy-radicals and related species: their formation, life-times, and reactions. Annu. Rev. Physiol., 48: 657-667.
- Radosevich S., Holt J. and Ghera C., (1997) Weed Ecology. Implications for Management, 589 p., John Wiley and Sons, New York.
- Regehr D. L. and Morishita D. W., 1989. Questions and answers on managing herbicide resistant weeds. Kansas State University Extension Publication MF-926. 10 p.

- Retzinger E. J. and Mallory-Smith C., 1997. Classification of herbicides by site of action for weed resistance management strategies. *Weed Technology* 11:384-393.
- Rodríguez E., 2000. Capítulo 6 "Protección y Sanidad Vegetal". Sección 1 Combate y Control de Malezas. En: Fontana, H. y González, C. (2000). *El Maíz en Venezuela*. Fundación Polar. Caracas, Venezuela. 800 p.
- Romero-Puertas M. C., McCarthy I., Mez M., Sandalio L. M., Corpas F. J., del Río L. A., Palma J. M., 2004. Reactive oxygen species-mediated enzymatic systems involved in the oxidative action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Plant, Cell & Environment* 27: 1135-1148.
- Romero-Puertas M., McCarthy I., Gómez M., Sandalio L., Corpas F., del Río L. and Palma J., 2004. Reactive oxygen species-mediated enzymatic systems involved in the oxidative action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Plant, Cell and Environment*.27:1135–1148.
- Rosales E., y Sánchez R. 2006. Clasificación y Uso de los Herbicidas por su Modo de acción. Folleto técnico No. 35. Inifap. ISBN: 968-800-666-1.<http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/bitstream/handle/123456789/686/34.pdf?sequence=1>.
- Rosales-Conrado N., 2005. Desarrollos metodológicos en cromatografía líquida capilar y quiral: aplicación a la determinación de herbicidas fenoxiácido en muestras complejas. Ciudad Universitaria. Madrid, España. ISBN: 84-669-2844-8.

- Rosario-Socorro J., 2011. Resistencia de *Sinapis alba* L.A herbicidas inhibidores de la ALS: bases agronómicas bioquímicas y moleculares. Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. ISBN-13: 978-84-694-4763-5.
- Ross M. A. and Lembi C. A., 1985. Applied Weed Science. Burgess Publishing Co. Minneapolis, MN. 340 p.
- Rubin B., 1991. Herbicide resistance in weeds and crops, progress and prospects. En: *Herbicide Resistance in Weeds and Crops* (eds. JC Caseley, GW Cussans y RK Atkin, eds.), Butterworth-Heinemann, Oxford. pp. 387-414.
- Saari L. L., Mauvais C. J., 1996. Sulfonylurea herbicide resistant-crops. In: *Herbicide Resistant Crops* (ed. SO Duke), pp. 127-143, CRC Press, Boca Raton.
- Sabbatini M., Irigoyen J. y Vernavá M., 2008. Estrategias para el manejo integrado de malezas: problemática, resistencia a herbicidas y aportes de la biotecnología. Capítulo 11. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. 343p.
- SAGARPA, 2008. Producción Agrícola en México. Centro de Estadística Agropecuaria. Servicio de información y estadística agroalimentaria y pesquera. <http://www.siap.gob.mx/>.
- SAGARPA., 2002. Producción Agrícola en México. Centro de Estadística Agropecuaria. Servicio de información y estadística agroalimentaria y pesquera.
- Sairam R.K. and Tyagi A., 2004. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plant. *Current Sci.* 86(3): 407-421.

- Salin M. L., 1988. Toxic oxygen species and protective systems. of the chloroplast. *Physiol. Plant.* 72: 681-689.
- Sandalio L. M. , Dalurzo H. C., Gomez M., Romero-Puertas M. C., del Rio L. A., 2001. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany* 52: 2115-2126.
- Sandalio, L.M., Palmam J.M. & del Rio, L.A. 1987. Localization of manganese superoxide dismutase in peroxisomes isolated from *Pisum sativum* L. *Plant Science.* 51: 1-8.
- Scandalias J. G., 1990. Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress. *Adv. Genet.* 28:1-41.
- Scandalios J. G., 1993. Oxygen Stress and Superoxide Dismutases. *Plant Physiol* 101: 7-12.
- Schmidt R. R., 2005. Clasificación de los herbicidas según su modo de acción. Comité de acción contra la resistencia a herbicidas (HRAC). [www.plantprotection.org/HRAC/Spanish\\_classification.htm](http://www.plantprotection.org/HRAC/Spanish_classification.htm).
- Schuler M. A., 1996. Plant cytochrome P450 monooxygenases. *Crit. Rev. Plant Sci.*,15, pp. 235–284.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Social, Pesca y Alimentación (SAGARPA)., 2015. Boletín. Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/bajacalifornia/Boletines/Paginas/B1012015.aspx> (Fecha de consulta: 11/02/2016).
- Senseman S. A., 2007. *Herbicide Handbook*. 9th edition. WSSA. Lawrence, KS 66044-8897. USA. 458 p.

- Shaner D. L., Anderson P. C., Stidham M. A., 1984. Imidazolinones: potent inhibitors of acetohydroxyacid synthase. *Plant Physiol.*, 76: 545-546.
- Shimabukuro R.H., 1985. Detoxification of herbicides. En: "*Weed Physiology*", Vol. 2, (ed. Duke SO), CRC Press, Boca Raton, pp. 215-240.
- SIAP. 2012. Subsecretaria de Agricultura. SAGARPA. México. <http://www.siap.gob.mx/>.
- Siminszky B., 2006. Plant cytochrome P450-mediated herbicide metabolism *Phytochem. Rev.*, 5 (2006), pp. 445–45.
- Small E. y Jomphe M., 1988. A sinopsis of the genus *Medicago* (*Leguminoceae*). *Can J. Bot.* 67:3260-3294.
- Stadman T. 1990. Selenium biochemistry. *Annual Review of Biochemistry* 59: 111-127.
- Tal J.A., Hall J.C., Stephenson G.R., 1995. Non-enzymatic conjugation of fenoxaprop-ethyl with glutathione and cysteine in several grass species *Weed Res.*, 35 pp. 133–139.
- Tan W., Li Q.L., Zhai H., 2012. Photosynthesis and growth responses of grapevine to acetochlor and fluoroglyphofen, *Pestic. Biochem. Physiol.* 103: 210-218.
- Thompson PLM, S.A. de C.V. Versión en CD.
- Thornalley P.J., Vasak M., 1985. "Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its

reaction with superoxide and hydroxyl radicals”, en *Biochimica et Biophysica Acta* 827, pp. 36-44.

Tranel P. J., Wright T. R., 2002. Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: What have we learned? *Weed Sci.* 50: 700-712.

Vargas-Bejarano E., Méndez-Trujillo V., Vázquez Angulo J., González-Mendoza D. y Grimaldo-Juárez O., 2012. Cambios fisiológicos en algodón transgénico inoculado con *Trichoderma* spp. *FYTON.* 81: 101-105.

Vega N., 1987. *Las Malezas y su Combate: Aspectos Generales.* Ediciones de la Biblioteca. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. pp: 7 – 32.

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

Virgüez G. y González E., 1998. *Las Malezas en los Pastizales. I Cursillo sobre manejo de pastos y otros recursos alimentarios para la producción de leche y carne con bovinos a pastoreo.* En: Chacón, E. y Baldizán, A. (Eds). U.C.V, Facultad de Agronomía. Maracay, Venezuela. pp: 136 – 162.

Walton D.P., 1983. *Production and management of cultivated forages.* Prentice Hall. Reston Virginia. United States of America. pp: 161-168.

WEBSTER N. R. and NUNN J. P., 1988. Molecular structure of free radicals and their importance in biological reactions. *Br. J. Anaesth.*, 60: 98-108.

Werck-Reichhart, D. & Feyereisen R., 2001. Cytochromes P-450: a success story. *Gen Biol* 1, 1-8.

- Whitcomb C.E., 1999. An introduction to ALS-inhibiting herbicides, *Toxic. Ind. Health* 15:232–240.
- Wise R.R. & Taylor A.W., 1987. Chilling-Enhanced Photooxidation: Evidence for the Role of Singlet Oxygen and Superoxide in the Breakdown of Pigments and Endogenous Antioxidants. *Plant Physiology* 83:278-282.
- Yannicari M., 2014. “Estudio Fisiológico y Genético de Biotipos de *Lolium perenne* L. resistentes a glifosato”. Universidad Nacional de la Plata, Facultad de Ciencias Biológicas.
- Zambrano J., 1979. Formas de Propagación en Hidrófilos. *Revista de la Facultad de Agronomía. Universidad del Zulia (LUZ). Maracaibo, Venezuela.* 6(1): 610 – 627.
- Zelaya I., Owen M. y Vangessel M., 2007. Transfer of glyphosate resistance: evidence of hybridization in *Conyza* (Asteraceae), en: *Amer. Jour. Botany.* 94(4): 660-673.
- Zhang J. & Kirkham M.B., 1996. Lipid peroxidation in sorghum and sunflower seedling as affected by ascorbic acid, benzoic acid and propyl gallate. *J. Plant Physiol.*, 149: 489-493.
- Zhou Q., Liu W., Zhang Y. y Liu K., 2007. Action mechanisms of acetolactate synthase-inhibiting herbicides, *Pestic. Biochem. Physiol.* 89:89–96.
- Zimdahl R., 2007. *Weed-crop competition: a review.* Iowa. Blackwell Publishing. 220pp.