



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA**  
**POSTGRADO EN AGRONOMÍA**  
**MARACAY-EDO ARAGUA**



**CARACTERIZACIÓN DE LA TOLERANCIA DIFERENCIAL AL HERBICIDA  
NICOSULFURON EN PROGENITORES E HÍBRIDOS DE MAÍZ (*Zea mays* L.)**

**Ingeniero Agrónomo Joad Manuel Jiménez V.**  
**Tutor: Ing. Agr. Msc. Konstantinos Matzavraco P.**

**Maracay, Abril 2016**

Trabajo de grado presentado como requisito final para optar al título de  
*Magíster Scientiarum* en Agronomía, orientación Mejoramiento de Plantas y  
Biotecnología.

Comité Consejero:



Ing. Agr. Msc Konstantinos Matzavraco  
(Tutor)

Dra. Catalina Ramis  
(Asesor)

Dra. Aida Ortiz  
(Asesor)



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA  
COMISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO  
POSTGRADO EN AGRONOMÍA  
**VEREDICTO**

Comisión de Estudios  
de Postgrado

Quienes suscriben, miembros del jurado designado por el Consejo de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela, para examinar el **Trabajo de Grado** presentado por: **JOAD MANUEL JIMÉNEZ VÁSQUEZ, C.I. 11.808.015**, bajo el título **“CARACTERIZACIÓN DE LA TOLERANCIA DIFERENCIAL AL HERBICIDA NICOSULFURON EN PROGENITORES E HÍBRIDOS DE MAÍZ (*Zea mays* L.)”**, a fin de cumplir con el requisito legal para optar al grado académico de **Magíster Scientiarum en Agronomía**, dejan constancia de lo siguiente:

1.- Leído como fue dicho trabajo por cada uno de los miembros del jurado, se fijó el día 18 de abril de 2016 a las 09:00 am., para que el autor lo defendiera en forma pública, lo que éste hizo en el Salón “D” del Doctorado en Ciencias Agrícolas, mediante un resumen oral de su contenido, luego de lo cual respondió satisfactoriamente a las preguntas que le fueron formuladas por el jurado, todo ello conforme con lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado.

2.- Finalizada la defensa del trabajo, el jurado decidió **APROBARLO**, por considerar, sin hacerse solidario con la ideas expuestas por el autor, que se ajusta a lo dispuesto y exigido en el Reglamento de Estudios de Postgrado.

Para dar este veredicto, el jurado estimó que el trabajo examinado representa un aporte sobre el efecto y mecanismo de acción del Nicosulfuron en la producción de semillas y maíz comercial. Además mostró evidencias sobre la desmitificación de la susceptibilidad per se de los maíces amarillos ante el herbicida, demostrando adicionalmente la posibilidad de discriminar materiales por la susceptibilidad al producto, vía marcadores moleculares.

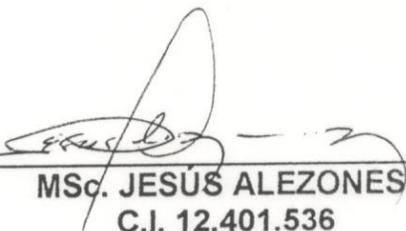
El Jurado recomendó dar la calificación de **EXCELENTE**.



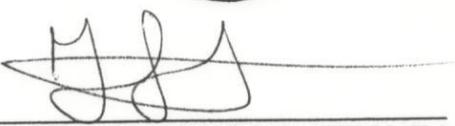
*(Handwritten signatures)*

En fe de lo cual se levanta la presente ACTA, a los 18 días del mes de abril del año 2016, conforme a lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado, actuó como Coordinador del jurado el MSc. Konstantinos Matzavraco.

  
**PHD. JOSÉ VICENTE LAZO**  
C.I. 3.054.595  
AGRONOMÍA-UCV

  
**MSc. JESÚS ALEZONES**  
C.I. 12.401.536  
FUNDACIÓN DANAC



  
**MSc. KONSTANTINOS MATZAVRACO**  
C.I. 10.457.869  
SEHIVECA  
Tutor

KM/zp  
18/04/16

## **Dedicatoria**

A la memoria de mi Padre José Manuel Jiménez Carrillo y mi Abuela Esther Cecilia Carrillo. Conmigo estarán siempre, recordándome que todos somos seres luminosos, no solo esta materia tosca.

## **Agradecimientos**

A la Casa que Vence la Sombra, la Universidad Central de Venezuela, por cada una de las experiencias que me ha permitido vivir a través de los años

A SEHIVECA y a todo el personal con quien tuve la oportunidad de compartir en estos años, especialmente a Marisela Pereira, Mahily Bejarano, Harool Casanova, Luis Castellanos y Carmen Licón.

A todo el personal que labora en el Laboratorio de Genética Molecular del Instituto y Departamento de Genética, así como al del Laboratorio de Malezas del Instituto y Departamento de Agronomía

A la Dra. Catalina Ramis, que siempre mantuvo su fe en mí, impulsándome a seguir adelante en todo momento.

A Zuly, Carina y Jaqueline del Postgrado de Agronomía, gracias eternas por su apoyo y colaboración

A mis hermanos del Coro Voces Oscuras, especialmente a Cesar “el negro” Liendo. A mis compañeros y compañeras del Coro Universitario

A todas las bandas y músicos con quienes he compartido ideas a lo largo de los años tanto dentro como fuera del país.

A mi madre Ada Virginia Vásquez, mis hermanas Janis y Jazmín, mi Tía Judith Jiménez, no hay manera de medir todo el amor y el cariño.

A Loli Padron, Julio Miguel Jiménez y Victoria Jiménez por su apoyo amor y cariño.

A los Profesores Pedro Torrecilla, Aída Ortiz, Oscar Silva, Castor Zambrano y Elio Rodríguez

A mi tutor Konstantino Matzavracos quien constantemente trató de inculcarme una lección importante: LA PACIENCIA

A Fabiana y Maria Ines Malacarne, por su apoyo incondicional

A Yexibí Rodríguez, por toda la amistad el cariño y por supuesto por haberme permitido su computadora mientras la mia seguía en terapia intensiva.

A mi amada esposa Marilyn Castro, gracias por cada uno de los maravillosos momentos que me has hecho pasar a tu lado, por tu apoyo incondicional y por hacerme vivir la más hermosa de las aventuras: una vida juntos.

A la Música, que siempre ha sido un motor impulsor, una fuente de inspiración y energía.

## TABLA DE CONTENIDO

	PAG.
<b>DEDICATORIA</b>	v
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	vi
<b>TABLA DE CONTENIDO</b>	viii
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b>	xii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	xvi
<b>RESUMEN</b>	xviii
<b>ABSTRACT</b>	xix
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>OBJETIVOS</b>	4
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	4
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	4
<b>ANTECEDENTES</b>	5
<b>Generalidades del maíz</b>	5
Importancia económica	5
Origen y domesticación del maíz	5
Clasificación taxonómica, morfología y características generales	6
Mejoramiento genético y desarrollo de híbridos de maíz	8
Mejoramiento genético en Venezuela	10
Manejo integrado de malezas en el maíz	11
Las Sulfonilureas	12
Resistencia / tolerancia a herbicidas	14
Modo y mecanismo de acción de los herbicidas, clasificación	16
Selectividad	17
Mezclas de herbicidas / productos químicos	19

Antagonismo	19
Sinergismo	20
Mecanismos de resistencia	21
Clasificación de los tipos de resistencia a herbicidas	22
Resistencia a los inhibidores de la acetolactato sintetasa (ALS)	23
El Citocromo P450 y su papel en la resistencia a Herbicidas	24
Resistencia / tolerancia al nicosulfuron	27
Pruebas utilizadas para caracterizar resistencia a los inhibidores de la ALS	31
Índices de tolerancia	35
Hormesis	37
Hormesis en la agricultura	38
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	40
Material vegetal	40
Evaluación del efecto de la aplicación de nicosulfuron en la fenología y productividad de progenitores e híbridos de maíz amarillo en campo	42
Ubicación del ensayo	42
Siembra	42
Control de malezas	42
Control de insectos plagas	43
Riego	43
Fertilización	43
Diseño experimental	43
Parcela experimental	43
Distribución en Campo	44
Aplicación del herbicida nicosulfurón	44

VARIABLES EVALUADAS	45
Análisis estadístico	48
Confirmación tanto de la tolerancia como la susceptibilidad de progenitores de maíz amarillo al herbicida nicosulfuron mediante experimentos de respuesta a dosis	50
Experimento de respuesta a dosis	50
VARIABLES EVALUADAS	52
Evaluación del efecto sinérgico o antagónico de la adición de inhibidores del complejo enzimático citocromo P450 monooxigenasa en un genotipo tolerante a nicosulfuron	53
Prueba de inhibición de la P450 monooxigenasa	53
Asociación de la tolerancia diferencial de progenitores e híbridos de maíz amarillo al herbicida nicosulfurón con marcadores moleculares tipo RAPD's	56
Marcadores moleculares RAPD	56
Amplificación de Fragmentos RAPDs por PCR	57
Análisis de datos	58
Similitud genética	59
Identificación de bandas RAPD asociadas a la tolerancia al herbicida nicosulfurón	59
<b>RESULTADOS Y DISCUSION</b>	60
<b>Evaluación del efecto de la aplicación de nicosulfuron en la fenología y productividad de progenitores e híbridos de maíz amarillo en campo</b>	60
Daño visual del herbicida	60
Índice de afectación	61
Variables vegetativas	65
Variables de floración	73
Variables asociadas a los componentes del rendimiento de	78

maíz	
Variables de productividad	84
Índice de tolerancia a stress (ITS)	91
ITS para variables vegetativas	91
ITS para variables de floración masculina y floración Femenina	94
ITS para variables de productividad	96
<b>Confirmación tanto de la tolerancia como la susceptibilidad de progenitores de maíz amarillo al herbicida nicosulfuron mediante experimentos de respuesta a dosis</b>	99
Experimento de respuesta a dosis	99
<b>Evaluación del efecto sinérgico o antagónico de la adición de inhibidores del complejo enzimático citocromo P450 monooxigenasa en un genotipo tolerante a nicosulfuron.</b>	102
Experimento de Inhibición de P450	102
<b>Asociación de la tolerancia diferencial de progenitores e híbridos de maíz amarillo al herbicida nicosulfurón con marcadores moleculares tipo RAPD´s</b>	103
<b>Asociación de Bandas RAPD con el comportamiento de los genotipos bajo el efecto del herbicida nicosulfuron</b>	108
<b>Conclusiones</b>	112
<b>Recomendaciones</b>	114
<b>Bibliografía</b>	116

## INDICE DE CUADROS

	PAG.
<b>Cuadro 1.</b> Propuesta de clasificación de los herbicidas	17
<b>Cuadro 2.</b> Identificación, tipo de material, y notación del material vegetal utilizado en los ensayos de tolerancia de cultivares de maíz al nicosulfuron.	41
<b>Cuadro 3.</b> Escala de ALAM (1974). Daño al cultivo por el herbicida	46
<b>Cuadro 4.</b> Cuadrados medios esperados para el análisis de la varianza utilizado para las variables de desarrollo del cultivo del maíz ( <i>Zea mays</i> L.) en campo	49
<b>Cuadro 5.</b> Dosis del herbicida nicosulfuron y tratamientos para el experimento de respuesta a dosis en genotipos de maíz ( <i>Zea mays</i> L.)	51
<b>Cuadro 6.</b> Cuadrados medios esperados del ANAVAR para las variables del experimento de inhibición del P-450 ( <i>Zea mays</i> L.) en invernadero	55
<b>Cuadro 7.</b> Buffer de extracción de ADN utilizado	57
<b>Cuadro 8.</b> Iniciadores decaméricos de la serie Operón Technologies, utilizados para la amplificación de RAPD, a partir de ADN de tejido foliar, de progenitores e híbridos de maíz ( <i>Zea mays</i> L.)	58
<b>Cuadro 9.</b> Análisis no paramétrico del daño visual de la aplicación de nicosulfuron sobre progenitores e híbridos de maíz ( <i>Zea mays</i> L.), en cuatro fechas de evaluación.	61
<b>Cuadro 10.</b> Cuadrados medios del Anavar del Índice de Afectación (I.A.) del cultivo por el herbicida nicosulfuron de acuerdo al genotipo en cuatro evaluaciones	62
<b>Cuadro 11.</b> Índice de afectación (I.A.) del cultivo de maíz ( <i>Zea mays</i> L.) por el herbicida nicosulfuron de acuerdo al genotipo en cuatro evaluaciones.	63
<b>Cuadro 12.</b> Anavar de cuadrados medios para las variables vegetativas de genotipos de maíz ( <i>Zea mays</i> L.) evaluadas en campo	66
<b>Cuadro 13.</b> Plantas cosechadas por genotipo evaluado de maíz ( <i>Zea</i>	67

<i>mays</i> L.) con y sin nicosulfuron en campo.	
<b>Cuadro 14.</b> Altura de planta por genotipo de maíz ( <i>Zea mays</i> L.) evaluado en campo con y sin nicosulfuron	69
<b>Cuadro 15.</b> Altura de mazorca de maíz ( <i>Zea mays</i> L.) por genotipo evaluado en campo con y sin nicosulfuron.	71
<b>Cuadro 16.</b> Diámetro del tallo por genotipo de maíz ( <i>Zea mays</i> L.) evaluado en campo con y sin nicosulfuron.	72
<b>Cuadro 17.</b> ANAVAR de cuadrados medios para la floración masculina y femenina de genotipos de maíz ( <i>Zea mays</i> L.) evaluados en campo	74
<b>Cuadro 18.</b> Floración masculina por genotipo de maíz ( <i>Zea mays</i> L.) evaluado en campo con y sin nicosulfuron.	75
<b>Cuadro 19.</b> Floración femenina por genotipo de maíz ( <i>Zea mays</i> L.) evaluado en campo con y sin nicosulfuron.	76
<b>Cuadro 20.</b> ANAVAR de cuadrados medios para el número de mazorcas, número de hileras / mazorca y número de granos por mazorca de genotipos de maíz ( <i>Zea mays</i> L.) evaluados en campo.	79
<b>Cuadro 21.</b> Mazorcas cosechadas por genotipo de maíz ( <i>Zea mays</i> L.) evaluado en campo con y sin nicosulfuron.	80
<b>Cuadro 22.</b> Hileras por mazorca por genotipo de maíz ( <i>Zea mays</i> L.) evaluado en campo con y sin nicosulfuron.	82
<b>Cuadro 23.</b> Granos por hilera por genotipo de maíz ( <i>Zea mays</i> L.), evaluado en campo con y sin nicosulfuron.	83
<b>Cuadro 24.</b> ANAVAR de cuadrados medios para peso de mazorca, peso de grano y rendimiento para los genotipos de maíz ( <i>Zea mays</i> L.) evaluados en campo.	84
<b>Cuadro 25.</b> Peso de mazorca por genotipo de maíz ( <i>Zea mays</i> L.) evaluado en campo con y sin nicosulfuron.	86
<b>Cuadro 26.</b> Peso de grano por genotipo de maíz ( <i>Zea mays</i> L.) evaluado en campo con y sin nicosulfuron.	88
<b>Cuadro 27.</b> Rendimiento de grano (kg/ha) por genotipo de maíz ( <i>Zea mays</i> L.) evaluado en campo con y sin nicosulfuron.	90

<b>Cuadro 28.</b> ANAVAR de los cuadrados medios del ITS para variables vegetativas de genotipos de maíz ( <i>Zea mays</i> L.) evaluados en campo con y sin nicosulfuron.	92
<b>Cuadro 29.</b> Índice de tolerancia a estrés (ITS) por genotipo de maíz ( <i>Zea mays</i> L.) evaluado en campo con y sin nicosulfuron.	93
<b>Cuadro 30.</b> ANAVAR de cuadrados medios para el Índice de Tolerancia a stres (ITS) de variables de floración de genotipos de maíz ( <i>Zea mays</i> ) evaluados	94
<b>Cuadro 31.</b> Medias y agrupamiento de los índices de tolerancia a stres (ITS) de las variables días a floración masculina y femenina.	95
<b>Cuadro 32.</b> Cuadrados medios del ANAVAR del índice de tolerancia a estrés de las variables de productividad del cultivo al herbicida nicosulfuron de acuerdo al genotipo a cosecha (125 dds).	96
<b>Cuadro 33.</b> Índice de tolerancia del cultivo (ITS) al herbicida nicosulfuron según genotipo para las variables peso de mazorca, y rendimiento de grano por hectárea a cosecha (125 dds).	98
<b>Cuadro 34.</b> Parámetros de regresión para los genotipos de maíz ( <i>Zea mays</i> ) T1 y T5 evaluados en condiciones de invernadero	100
<b>Cuadro 35.</b> Peso fresco (gr) del genotipo tolerante (T1), según el insecticida utilizado para inducir la inhibición del complejo citocromo P-450.	102
<b>Cuadro 36.</b> Tratamientos y peso promedio de materia fresca del genotipo de maíz T1 tolerante a nicosulfuron al ser tratado con los insecticidas malation, Clorpirifos y Metomilo	103
<b>Cuadro 37.</b> Análisis de la varianza (ANAVAR) de presencia o ausencia de bandas RAPD, con respecto a las variables Índices de Afectación a los 7 y a los 14 días después de la aplicación del herbicida nicosulfuron (7 y 14 dda), y los Índices de Tolerancia al Estrés (ITS) para las variables altura de planta, peso de mazorca y rendimiento, de progenitores e híbridos de maíz.	109
<b>Cuadro 38.</b> Medias y desviación para las variables Índices de	111

Afectación a los 7 y a los 14 días después de la aplicación del herbicida nicosulfuron (7 y 14 dda), y los Índices de Tolerancia al Estrés (ITS) para las variables altura de planta, peso de mazorca y rendimiento, de progenitores e híbridos de maíz, en relación a la presencia o ausencia de bandas RAPD.

## INDICE DE FIGURAS

	PAG.
<b>Figura 1.</b> Estructura química de las sulfonilureas	13
<b>Figura 2.</b> Mecanismo de acción del complejo P450	25
<b>Figura 3.</b> Representación gráfica de la distribución utilizada en campo de los genotipos de maíz ( <i>Zea mays</i> L), acorde con un diseño en alfa lattice con arreglo en parcelas divididas	44
<b>Figura 4.</b> Aplicación del herbicida nicosulfuron sobre los diversos genotipos de maíz ( <i>Zea mays</i> L.) en campo	45
<b>Figura 5.</b> Siembra de genotipos de maíz, ( <i>Zea mays</i> L.) en invernadero	50
<b>Figura 6.</b> Aplicación de nicosulfuron sobre genotipos de maíz ( <i>Zea mays</i> L.) , para el experimento de respuesta a dosis	51
<b>Figura 7.</b> Aplicación de inhibidores de P450 sobre un genotipo tolerante de maíz ( <i>Zea mays</i> L.)	54
<b>Figura 8.</b> Medición de peso fresco del genotipo tolerante de ( <i>Zea mays</i> L.) para el experimento de inhibición de P450	54
<b>Figura 9.</b> Parte del procedimiento de extracción de ADN y visualización de bandas de RAPD	58
<b>Figura 10.</b> Distintos grados de afectación en diferentes genotipos de maíz ( <i>Zea mays</i> L.) a lo largo de las semanas	62
<b>Figura 11.</b> Grado de afectación del genotipo susceptible (T5) a lo largo de las semanas	64
<b>Figura 12.</b> Grado de afectación del genotipo originalmente escogido como testigo susceptible (T16) a lo largo de las semanas	64
<b>Figura 13.</b> Genotipo susceptible (T5) en campo a los 28 dda de nicosulfuron	68
<b>Figura 14.</b> Variación en los días a floración masculina y femenina de T13 y T14	77
<b>Figura 15.</b> Variación en los días a floración masculina y femenina	78

de T7 y T8

**Figura 16.** Grafico sobre el efecto de la dosis de nicosulfuron sobre el peso fresco de los genotipos tolerante (T1) y susceptible (T5) desarrollado en invernadero. 101

**Figura 17.** Electroforesis en geles de agarosa 0,8% mostrando resultados de la extracción de ADN a partir de tejido foliar de plántulas de maíz, según el procedimiento descrito por CIMMYT (A) ó (B) Barra *et al.* (2012). 104

**Figura 18.** Dendrograma UPGMA de agrupamiento de progenitores e híbridos de maíz (*Zea mays* L.) 106

**Figura 19.** Análisis de correspondencia simple de progenitores e híbridos de maíz (*Zea mays* L.) 107

## **RESUMEN**

El maíz es un cereal originario del sur de México y norte de Guatemala, (Doolittle y Mabry, 2006). En Venezuela, forma parte vital de la dieta de la población, alcanzando en el año 2014, 1.930.808 de toneladas de producción (FEDEAGRO, 2016). Sin embargo, el desarrollo de malezas representa un factor limitante de suma importancia para su producción (Rodríguez, 2000), siendo el uso de herbicidas la estrategia más común para su manejo (Zita, 2012). El nicosulfuron (sulfonilureas), el cual inhibe la acción de la enzima acetolactato sintetasa (ALS), es utilizado desde 1989 para el control de malezas en maíz a nivel mundial, por ser un herbicida selectivo al cultivo (Carriquiry y Ríos, 2007). La tolerancia del maíz a las sulfonilureas se debe a la acción del complejo enzimático citocromo P450 monooxigenasa (Pataky y Meyer, 2008). En la producción de semillas no se recomienda la aplicación de herbicidas sulfonilureas debido a los diferentes grados de susceptibilidad que presentan los progenitores de los híbridos (Stefanovic *et al.*, 2010). Con la finalidad de evaluar y caracterizar la tolerancia diferencial de algunos progenitores e híbridos de maíz amarillo del programa de mejoramiento genético de SEHIVECA e HIMECA al nicosulfuron, se realizó un ensayo de campo así como pruebas de respuesta a dosis, inhibición de la enzima P450 y una evaluación con marcadores moleculares RAPD. Se encontró un genotipo altamente susceptible y otro altamente tolerante al nicosulfuron. Se obtuvo una posible asociación de la susceptibilidad al herbicida con una banda RAPD, así como evidencias claras de sinergismo al combinar nicosulfuron con el insecticida clorpirifos. Se demostró la naturaleza metabólica de la tolerancia al nicosulfuron en los cultivares de maíz bajo estudio. Se generaron recomendaciones para la producción de semillas de diversos cultivares.

**Palabras Clave:** Maíz, malezas, sulfonilureas, nicosulfuron, herbicidas, citocromo P450, RAPD, tolerancia, susceptibilidad.

## **ABSTRACT**

Corn is a cereal native of south of Mexico and north of Guatemala, (Doolittle and Mabry, 2006), and it's part of the staple of diet for Venezuelan people, reaching in 2014, 1.930.808 tons of production (FEDEAGRO, 2016). However, weed development represents an important limiting factor for corn production (Rodríguez, 2000). Herbicides is the most common strategy for weed management (Zita, 2012). Nicosulfuron (sulfonylurea) enzyme acetolactate synthase (ALS) inhibitor, is worldwide recommended in corn for weed control since 1989 due to its selectivity (Carriquiry and Rivers, 2007). Corn tolerance to sulfonylurea is due to cytochrome P450 monooxygenase enzyme complex (Pataky and Meyer, 2008). In seed production the sulfonylurea's use is not recommended due to the different susceptibility degrees of parental lines, which vary significantly (Stefanovic *et al.*, 2010). In order to study descript and evaluate the differential tolerance of some parents and hybrid of yellow corn of breeding program of SEHIVECA and HIMECA to the herbicide nicosulfuron a field experiment was conducted, then laboratory tests of dose response, P450 monooxygenase inhibition (with clorpirifos, malation and metomilo insecticides) and RAPD'S molecular marker were conducted. We found a highly susceptible genotype and a highly tolerant genotype to nocosulfuron herbicide. RAPDS shown a possible association between this susceptibility and one of the primers used and strong evidence of synergism when nicosulfuron and clorpirifos were combined. The evidence shown that the tolerance to nicosulfuron of the different corn cultivars under this study was metabolic. Specific weed management recommendations for producers of hybrid seed in Venezuela were established.

**Keywords:** Corn, seed, weeds, sulfonylureas, nicosulfuron, herbicides, cytochrome P450, RAPD, tolerance, susceptibility.

## INTRODUCCION

El maíz es un cereal originario del sur de México y norte de Guatemala, cuyo ancestro más aceptado es el Teocintle, (Matsuoka *et al.*, 2002; Doolittle y Mabry, 2006). En Venezuela, forma parte vital de la dieta de la población, siendo utilizado para la elaboración de harinas, aceites, alimentos precocidos y alimento concentrado para animales entre otros productos (López, 2012), alcanzando en el año 2014 de acuerdo a las cifras proporcionadas por el Ministerio de Agricultura y Tierras, un total de 1.930.808 de toneladas de producción a nivel nacional (FEDEAGRO, 2016).

Dada la importancia que este rubro representa para Venezuela, los entes públicos y privados han desarrollado diversas líneas de investigación gracias a las cuales se han introducido al mercado nuevos materiales de maíz de alto rendimiento y adaptación a nuestras condiciones. Sin embargo, existen algunos factores limitantes para su producción, siendo el desarrollo de malezas uno de los más importantes, Rodríguez (2000).

El uso de herbicidas es la estrategia más utilizada en la agricultura intensiva para el manejo de malezas debido a la combinación de algunos factores como eficacia, rapidez y costo, aunque presenta ciertas desventajas como el desarrollo de biotipos resistentes y el deterioro ambiental (Zita, 2012).

Dentro del grupo de herbicidas utilizados para el control de malezas en maíz encontramos a la familia de las sulfonilureas, las cuales inhiben la acción de la enzima acetolactato sintetasa (ALS), controlando un amplio rango de malezas gramíneas y hoja ancha (Anzalone, 2008). Entre los herbicidas de este grupo se encuentra el nicosulfuron utilizado para el control de malezas en maíz a nivel mundial desde el año 1989 (Mejía, 1993, Saari *et al.*, 1994, Mónaco *et al.*, 2002, Carriquiry y Ríos, 2007).

Desde la década de los años cuarenta, los herbicidas han sido cada vez más sofisticados en cuanto al espectro y duración del periodo de control (Baumann *et al.*, 1998), sin embargo, en los últimos años el desarrollo de resistencia a herbicidas en las malezas se ha constituido en un serio problema (Saari *et al.*, 1994). La primera maleza registrada en la literatura que evidenció resistencia a un herbicida inhibidor de la ALS data de 1987 y fue *Lactuca serriola* L. al compuesto clorosulfurón, habiéndose liberado este herbicida en 1982 (Mallory-Smith *et al.*, 1990).

Se ha encontrado que los mecanismos de la resistencia a inhibidores de ALS podría deberse a mutaciones en el sitio de acción del herbicida o al metabolismo acelerado del xenobiótico (Corbett y Tardif, 2006; Devine y Shukla, 2000; Fischer, 2013). La modificación del sitio de acción del herbicida, generalmente ocurre por la sustitución de un nucleótido en el gen de la ALS. Dicha sustitución modifica la secuencia de aminoácidos en la enzima confiriendo la resistencia (Boutsalis *et al.*, 1999; Bernasconi *et al.*, 1995; Guttieri *et al.*, 1992, Devine y Shukla, 2000).

Los distintos estudios de herencia realizados en malezas resistentes a los inhibidores de la ALS arrojaron que dicha resistencia viene dada por un solo gen nuclear con variaciones en el grado de dominancia (dominancia completa o incompleta) (Boutsalis *et al.*, 1999, Boutsalis y Powles, 1995; Thompson *et al.*, 1994; Mallory-Smith *et al.*, 1990).

Fuentes y Leroux (2001); Sebastian *et al.*, (1989); Mallory-Smith *et al.*, (1990,1991); Green y Ulrich (1993,1994); Hart *et al.*, (1993), señalaron que en la mayoría de los estudios de control genético de la tolerancia a las sulfonilureas, el principal método de evaluación utilizado era la calificación visual de la fitotoxicidad, agregan además que dicho carácter era estudiado como un carácter de tipo mendeliano.

Simpson *et al.*, (1995), señalaron que la tolerancia del maíz a los herbicidas del grupo de las sulfonilureas se basa principalmente en la rapidez con que este es metabolizado por la planta, proceso realizado inicialmente por el sistema de las monooxigenasas y el citocromo P450. Sin embargo, la tolerancia a los herbicidas del grupo de las sulfonilureas no siempre se debe al metabolismo de las plantas en sí, sino que existen una serie de factores que pueden interactuar y determinar el grado de susceptibilidad de un genotipo dado a cualquiera de los herbicidas de este grupo (Stefanovic *et al.*, 1996; Carey *et al.*, 1997). Green y Ulrich, (1993,1994), a través de estudios de herencia, indicaron que la sensibilidad a herbicidas sulfonilureas como nicosulfurón, primisulfuron y rimsulfuron está controlada por un gen recesivo.

Aún cuando el herbicida nicosulfurón ha sido ampliamente utilizado para el combate de malezas en el cultivo de maíz blanco en Venezuela, no ocurre lo mismo con el cultivo de maíz amarillo, debido a que no todos los híbridos poseen en su base genética tolerancia para el uso de este compuesto (González, 2005).

En la producción de semillas no se recomienda el uso de herbicidas sulfonilureas debido a los diferentes grados de susceptibilidad que presentan las diferentes líneas progenitoras, los cuales pueden variar significativamente dependiendo del genotipo de la línea entre otros factores (Stefanovic *et al.*, 1997, 2010; Zaric *et al.*, 1998).

Por lo antes expuesto, el objetivo del presente trabajo es caracterizar la tolerancia diferencial de algunos progenitores e híbridos de maíz amarillo del programa de mejoramiento genético de SEHIVECA e HIMECA, al herbicida nicosulfurón bajo condiciones de campo e invernadero con la finalidad de establecer recomendaciones específicas de manejo de malezas a los productores de semilla según el híbrido a sembrar.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Caracterizar la tolerancia diferencial al herbicida nicosulfurón de progenitores e híbridos de maíz amarillo bajo condiciones de campo e invernadero en Venezuela.

### **Objetivos Específicos:**

- 1) Evaluar en condiciones de campo, el efecto de la aplicación de nicosulfuron en la fenología y productividad de progenitores e híbridos de maíz amarillo
- 2) Confirmar la tolerancia y susceptibilidad de progenitores de maíz amarillo al herbicida nicosulfuron mediante experimentos de respuesta a dosis.
- 3) Evaluar el efecto sinérgico o antagónico de la adición de inhibidores del complejo enzimático citocromo P450 monooxigenasa en un genotipo tolerante a nicosulfuron.
- 4) Asociar la tolerancia diferencial de progenitores e híbridos de maíz amarillo de HIMECA y SEHIVECA al herbicida nicosulfurón con marcadores moleculares tipo RAPD's.
- 5) Generar recomendaciones de uso de nicosulfurón sobre progenitores en la producción de semilla de maíz amarillo de HIMECA y SEHIVECA.

## **Antecedentes**

### **1. Generalidades del maíz**

#### **1.1 Importancia económica:**

El maíz (*Zea mays* L.) es un cultivo que ha estado ligado íntimamente al desarrollo de las poblaciones mesoamericanas, siendo utilizado por las civilizaciones precolombinas no solo como alimento sino como parte fundamental de su entorno social incluyendo su uso en cultos de tipo mágico-religioso (Carrillo, 2012). Actualmente, es el cereal más importante en producción a nivel mundial, conformando junto al trigo y el arroz la base alimenticia de la población (Cartay, 2000; FAO, 2015).

En Venezuela es extensamente utilizado tanto de forma directa como indirecta en la elaboración de harinas, aceites, alimentos precocidos y alimento concentrado para animales entre otros productos (López, 2012). Ha sido catalogado como rubro estratégico a nivel nacional siendo los principales estados productores Portuguesa, Guárico, Monagas, Barinas, Yaracuy y Bolívar. Para el año 2013, de acuerdo a las cifras suministradas por la FAO, la producción de maíz en Venezuela alcanzó una cifra de 2.247.024 toneladas (FAO, 2015), mientras que las estadísticas del Ministerio del Poder Popular Para la Agricultura y Tierras citadas por FEDEAGRO, reflejan que los volúmenes de producción del rubro en el año 2014 fueron de 1.930.808 toneladas (FEDEAGRO, 2016).

#### **1.2 Origen y domesticación del maíz**

Desde finales del siglo XIX se han postulado diversas hipótesis que intentan dilucidar el origen del maíz; siendo una de las más influyentes la denominada “teoría tripartita” formulada en los años 30 del siglo pasado (Mangelsdorf y Reeves, 1959a). Posteriormente, a finales de la década de 1980, la misma fue

desacreditada cuando la teoría del origen del maíz con base en la evolución progresiva del teocintle ganó el acuerdo entre la comunidad científica internacional (Beadle, 1980; Doebley, 1990; Matsuoka *et al.*, 2002; Doolittle y Mabry, 2006).

Hoy en día es comúnmente aceptado el hecho de que el maíz es la forma cultivada del género *Zea* siendo el teocintle su ancestro (Beadle, 1932a,b 1939, 1972; Emerson y Beadle, 1932; Reeves y Mangelsdorf, 1942, Mangelsdorf y Reeves, 1959a; Matsuoka *et al.*, 2002; Doolittle y Mabry, 2006).

Paterniani (2000), estableció que la domesticación del maíz a través de la selección hecha por el hombre, eliminó prácticamente por completo las características ancestrales de sobrevivencia de éste en la naturaleza y que gracias a un proceso de selección masal, realizado a través de cientos de generaciones de los antiguos pobladores de América, se obtuvieron más de trescientas razas y miles de variedades adaptadas a diversos ambientes.

En Venezuela, McClintock *et al.*, (1981), sostuvo que el maíz se originó gracias a introducciones hechas por el hombre, que probablemente tengan conexión con las razas mexicanas y centro americanas de los maíces Nal-Tel, Zapalote Chico, Zapalote de nudos grandes, Tepecintle y Salvadoreño.

### **1.3 Clasificación taxonómica, morfología y características generales**

De acuerdo a la descripción dada por Linneo en 1737, el maíz es un cereal perteneciente al reino Plantae, phylum Angiosperma, clase Monocotiledónea (Liliopsida según Cronquist), orden Graminales, familia Gramineae, (Poaceae según Cronquist), tribu Maydae, género *Zea* y especie *mays* (Bejarano, 2000).

Es una planta de hábito anual, con tallo tipo caña, flores masculinas y femeninas bien diferenciadas en la misma planta y de polinización abierta (anemófila) siendo propensa al cruzamiento (Jugenheimer, 1988; Bejarano, 2000; Reyes, 1990).

Las flores son unisexuales, presentando flores masculinas y femeninas bien diferenciadas en la misma planta, la inflorescencia masculina se localiza en la parte final del tallo, de tipo panícula, la cual consta de un eje central o raquis y ramas laterales. A lo largo de dicho eje se distribuyen los pares de espiguillas de forma polística y en las ramas con arreglo dístico. Cada espiguilla está protegida por dos brácteas o glumas que a su vez contienen en forma apareada las flores estaminadas. En cada florecilla componente de la panícula hay 3 estambres donde se desarrollan los granos de polen. (Jugenheimer, 1988; Reyes, 1990; Bejarano, 2000)

La inflorescencia femenina (mazorca) es de tipo espiga y se localiza en las yemas axilares de las hojas. De forma cilíndrica, consiste en un raquis central u olote en el cual se insertan las espiguillas por pares, cada una con dos flores pistiladas, una fértil y otra abortiva, dichas flores se arreglan en hileras paralelas. Esta inflorescencia puede formar alrededor de 400 a 1000 granos arreglados en promedio de 8 a 24 hileras por mazorca la cual está encerrada en numerosas brácteas o vainas de las hojas. (Jugenheimer, 1988; Reyes, 1990; Bejarano, 2000)

A nivel radical, presenta raíces primarias fibrosas con una serie de raíces adventicias, las cuales se desarrollan en los primeros nudos por encima de la superficie del suelo, tanto estas como las raíces primarias tienen entre otras funciones la de mantener a la planta erecta. (Jugenheimer, 1988).

El maíz es un cultivo que presenta una alta productividad y diversos autores afirman que ello se debe a su abundante aérea foliar, así como a una modificación de su ruta fotosintética conocida con el nombre de C<sub>4</sub>. Dicho mecanismo actúa gracias a una particular anatomía foliar (tipo Kranz), en la cual la hoja presenta dos compartimientos celulares definidos, el mesófilo radial y la vaina vascular. En el primero de estos, ocurre la fijación de CO<sub>2</sub> para formar el ácido dicarboxílico de 4 carbonos, mientras que en el segundo se produce la descarboxilación, permitiendo que el CO<sub>2</sub> liberado enriquezca la atmosfera endógena y esté

disponible alrededor de los cloroplastos. Todo ello hace que la enzima conocida como rubisco (1,5 fosfato descarboxilasa oxigenasa), fije una mayor cantidad de CO<sub>2</sub> en lugar de oxígeno, aumentando en consecuencia la tasa fotosintética en detrimento de la fotorespiración, formando mayor cantidad de fotoasimilados, energía y materia seca por unidad de área transpirada. (Ascencio, 2000; Mejías, 2004)

#### **1.4.- Mejoramiento genético y desarrollo de híbridos de maíz**

Schlegel (2003), define mejoramiento genético como una ciencia multidisciplinaria aplicada dentro de la cual se incluye el fitomejoramiento, el cual no es más que el estudio de los principios genéticos y de las prácticas relacionadas con el desarrollo de híbridos y variedades más adaptadas a las necesidades de los seres humanos, teniendo como base el conocimiento combinado de la agronomía, la botánica, la genética, citogenética, genética molecular, fisiología, patología, la entomología, la bioquímica y la estadística. El origen de dicha ciencia aplicada se atribuye a la selección de las mejores plantas realizada por el hombre civilizado a través del tiempo hasta lograr las llamadas variedades criollas.

Sin embargo, el descubrimiento del llamado “vigor híbrido” (realizado de manera accidental), provocó el desarrollo de diversos cruzamientos intencionales con rendimientos superiores a las variedades originales (Paterniani, 2000), con lo cual, se establecen los llamados planes de mejoramiento genético, cuyo objetivo principal es el desarrollo de cultivares mejorados que posean características agronómicas, fisiológicas y morfológicas superiores a los materiales originales.

Estos cultivares mejorados son obtenidos a través de un proceso exhaustivo de selección secuencial, que depende de números y escalas basada en la estimación de parámetros fenotípicos y genéticos en las poblaciones (Medina y Segovia, 1995). Hoy en día, se han incorporado diversas técnicas de biología molecular y análisis de ADN lo cual ha permitido avances sustanciales en este campo.

El uso intencional de la hibridación para el desarrollo de híbridos fue iniciado por Beal en 1880, quien sembró dos variedades de maíz en surcos adyacentes, escogiendo una de estas como progenitor femenino (despanojándola) fungiendo la segunda como progenitor masculino. El híbrido resultante del cruce tuvo un rendimiento superior al de las variedades parentales de polinización abierta (Beal, 1880). Sin embargo, los híbridos entre variedades no encontraron gran aceptación entre los agricultores en aquellas días por diversas razones, entre ellas y de acuerdo a lo reportado por algunos autores, porque las ganancias en rendimiento eran modestas (Lonnquist y Gardner, 1961; Moll, Salhuana y Robinson, 1962) o probablemente porque el concepto de híbrido era demasiado avanzado para esa época (Poehlman, 1987).

Posteriormente, las investigaciones desarrolladas por Shull (1908, 1909), sobre el método de mejoramiento de maíz basado en líneas puras sentaron las bases para un exitoso desarrollo de los híbridos, obteniéndose maíces vigorosos y de alto rendimiento en grano. No obstante, no fue sino hasta que Jones (1918) sugirió que dos cruces simples podían ser cruzadas entre sí para producir híbridos dobles, que el maíz híbrido fue una realidad comercial.

El mejoramiento genético del maíz resulta entonces un proceso complejo, el cual comprende la evaluación de varias características de selección, varias etapas de pruebas y el descarte de miles de líneas e híbridos de múltiples descendencias. En él se utilizan técnicas de autopolinización, de polinización cruzada, se desarrollan líneas puras y se producen cruces entre líneas derivadas. Todo ello con la finalidad de lograr la identificación de híbridos que tengan un rendimiento constante y confiable a través de un gran número de ambientes que permita la producción de una buena semilla que pueda llegar al productor final (Hallauer y Carena, 2009).

La mayoría de las características de importancia económica en el cultivo de maíz se heredan cuantitativamente y la limitación principal de los métodos de mejoramiento convencional es la determinación del valor genético de las líneas en las diferentes combinaciones híbridas. En este sentido, el advenimiento de herramientas y técnicas moleculares como los QTL (Quantitative Trait Loci) y la selección asistida por marcadores moleculares, han resultado de gran ayuda no solo en la caracterización de genotipos, sino también en estudios de similitud o distancia genética. Aún así, el factor clave dentro de cualquier programa de mejoramiento genético es la buena selección de germoplasma (Hallauer y Carena, 2009; Perdomo, 2012).

Los procedimientos involucrados en el desarrollo de híbridos están evolucionando continuamente y desde el año 2002 el mayor esfuerzo se ha enfocado hacia el desarrollo de híbridos simples en sustitución de híbridos multiparentales (tri lineares y dobles). Este tipo de evolución ha sido drástica en los países desarrollados, donde la totalidad del área es sembrada con híbridos simples (Duvick, 2002).

### **1.5 Mejoramiento Genético en Venezuela**

Las evidencias más antiguas en Venezuela ubican el maíz en la margen norte del Orinoco, aproximadamente 25 mil años antes de la llegada de Cristóbal Colon (Mangelsdorf y Sanoja, 1965; Galinat, 1971; Van der Merwe *et al.*, 1981). Aunque Mangelsdorf y Sanoja (1965), también señalaron la presencia de restos arqueológicos de maíz en el estado Lara y, de acuerdo a lo reportado por Oviedos (1824) y Gumilla (1791), las diversas etnias indígenas de Venezuela cultivaban maíces de diferentes formas y colores. Para 1965, Grant *et al.*, describieron al menos 19 grupos germoplasmicos de maíz en nuestro país.

Agudelo (1976), señaló que los programas de mejoramiento genético del maíz en Venezuela se iniciaron en 1939, bajo la dirección del Instituto Experimental de Agricultura y Zootecnia del Ministerio de Agricultura y Cría, realizando diversas

pruebas con materiales introducidos desde Cuba, Puerto Rico, Colombia y Estados Unidos. Como resultado de ello, en 1942 se desarrolla la primera variedad de maíz venezolano (Venezuela-1), lograda a partir de dos variedades cubanas (Langham, 1942a). Posteriormente, producto de una serie de investigaciones y cruzamientos entre variedades nacionales, extranjeras y líneas autofecundadas procedentes de México, Cuba, Colombia, Perú y Brasil, el Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA) Maracay lanza en 1957 tres híbridos triples (trilineales) “Guaicaipuro”, “Tiuna” y “Mara” (Obregón, 2000).

El mejoramiento genético del maíz en Venezuela, se ha enfocado en la búsqueda de lograr un aumento de su capacidad productiva, resistencia a plagas y enfermedades, volcamiento, así como a las exigencias tanto de los productores agrícolas como de los consumidores (altura de planta, facilidad para cosecha mecanizada, contenido alimenticio, dureza de grano, entre otros) (Obregón, 2000)

Hoy en día el mejoramiento genético del cultivo continúa con el desarrollo de variedades y principalmente de híbridos por entes públicos y privados, los cuales introducen al mercado nuevos materiales de alto rendimiento y adaptación a las condiciones agroecológicas de Venezuela (Matzavracó, 2015. Comunicación personal).

## **2. Manejo integrado de malezas en el maíz**

Rodríguez (2000), define a las malezas como plantas indeseables que crecen como organismos macroscópicos junto con las plantas cultivadas interfiriendo con el normal desarrollo de estas, siendo una de las principales causas en la disminución de los rendimientos en maíz. Agrega además, que el manejo de estas plantas indeseables se originó en la antigüedad cuando la especie humana dio sus primeros pasos en la agricultura, controlándolas primero de forma manual para posteriormente emplear diversos artefactos, herramientas y equipos para mejorar la eficiencia de dicho control. Los diferentes métodos de manejo y control de las

malezas incluyen estrategias de control no químico y métodos químicos, Zita (2012) lo resume de la siguiente manera:

En el primer grupo se incluyen todas aquellas estrategias que implican cortar, enterrar, cubrir y quemar la vegetación indeseada; mientras que el segundo grupo está basado en el uso de herbicidas, siendo en la actualidad la estrategia más utilizada en la agricultura intensiva, debido a la combinación de algunos factores como eficacia, rapidez y costo.

Peterson *et al.*, (2001), sostienen que un herbicida es un producto químico que inhibe o interrumpe el crecimiento y desarrollo de una planta, siendo utilizados extensivamente en la agricultura, industria y en zonas urbanas, debido a que al emplearse de manera adecuada proporcionan un control eficiente a un bajo costo. No obstante, también presenta desventajas, como el desarrollo de biotipos resistentes y el deterioro ambiental.

Zita (2012), señala que el concepto de “manejo integrado de malezas” fue introducido por primera vez en 1967, como una terminología que englobaba todas las estrategias de control, aplicando principios ecológicos al control de plagas en sistemas de producción y que posteriormente fue incluido el concepto de la sustentabilidad. El manejo integrado de malezas requiere de un profundo conocimiento sobre la biología y ecología de las mismas, haciendo especial énfasis en la integración de múltiples medidas de control utilizadas de manera racional. (Sanyal *et al.*, 2008).

### **3. Las Sulfonilureas**

Esta familia de herbicidas descubierta en 1975 por el investigador George Levitt (Carriquiry y Ríos, 2007), es de amplio uso en la agricultura y su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la enzima acetolactato sintetasa (ALS), la cual es necesaria para la síntesis de los aminoácidos alifáticos de cadenas ramificadas como isoleucina, leucina y valina (Anzalone, 2008).

Mónaco *et al.*, (2002) refieren que los herbicidas sulfonilureas poseen un amplio espectro de control de acuerdo a la molécula utilizada, bajas dosis de ingrediente activo y producto comercial por área tratada, controlando un amplio rango de malezas gramíneas y hoja ancha, siendo además selectivos para cultivos como arroz, trigo, cebada, soya y maíz. Son considerados seguros para el ambiente por su baja toxicidad en animales y humanos, convirtiéndose en los herbicidas de mayor utilización en el mundo para el control de las malezas en los diferentes cultivos anuales (Saari *et al.*, 1994, Carriquiry y Ríos, 2007)

### **3.1 Estructura química**

La molécula de las sulfonilureas consiste en tres partes: un grupo aril, el puente sulfonilurea y un anillo heterocíclico que contiene nitrógeno, siendo su fórmula molecular  $C_{14}H_{17}N_5O_7S_2$  (Vencill, 2002).

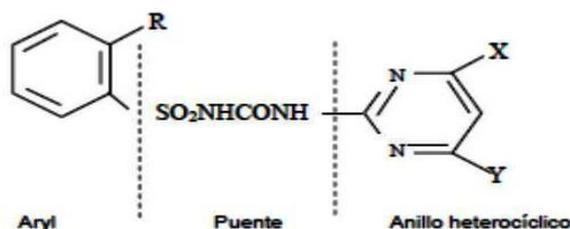


Figura 1 Estructura química de las sulfonilureas (Hay, 1990).

Hay (1990), comenta que cada uno de los tres componentes de la molécula puede ser modificado de forma de obtener una mayor actividad herbicida y que los compuestos utilizados en el radical R del grupo Aryl, el tipo de puente sulfonilurea o el tipo de grupo heterocíclico son los que determinan el aumento o no de dicha actividad.

Dentro de los herbicidas pertenecientes a esta familia química comúnmente utilizados en el control de malezas en el maíz en Venezuela se encuentra el nicosulfurón, conocido comercialmente como Accent® o Sanson® (Gámez, *et al.*,

2000), también está en el mercado el Equiplus® (iodosulfuron+foransulfuron) (Ortiz *et al.*, 2014).

#### **4. Resistencia/tolerancia a herbicidas**

Aunque algunos profesionales del Agro utilizan los términos “tolerancia” y “resistencia” como sinónimos, en los últimos años diversos autores han tratado de marcar una diferencia entre dichos términos en relación a los herbicidas.

Powles *et al.*, (1997), establece que la resistencia a herbicidas es la capacidad hereditaria natural de un biotipo dentro de una población, la cual le permite sobrevivir y reproducirse después del tratamiento con un herbicida que, bajo condiciones normales de utilización, controla efectivamente a todos los demás individuos de la misma población, mientras que tolerancia es la capacidad hereditaria natural que tienen los individuos de todas las poblaciones de una determinada maleza para sobrevivir sin resultar afectadas y reproducirse normalmente después del tratamiento con herbicida

La Sociedad de la Ciencia de la Maleza de Estados Unidos (WSSA), en el 2011, sostuvo que la resistencia a herbicidas es la capacidad hereditaria de una planta para sobrevivir y reproducirse después de su exposición repetida a una dosis de herbicida normalmente letal para el tipo silvestre, (es decir es provocada) pudiendo presentarse dicha resistencia de manera natural o inducida por ingeniería genética o por la selección de variantes producidas por cultivo de tejidos o mutagénesis (por ejemplo el Clearfield, de BASF).

La tolerancia a herbicidas por el contrario, es la capacidad inherente de una especie para sobrevivir y reproducirse después de un tratamiento con herbicida, es decir que no hubo un mecanismo de selección o inducción de la tolerancia, ni fue manipulada genéticamente sino que es naturalmente tolerante. (Heap, 1997, 2005; Tieska y Nisensohn, 2001; Papa *et al.*, 2000; Pérez y Kogan, 2001).

De acuerdo a lo expuesto por Valverde (2000), se considera que los genes de resistencia a herbicidas están presentes en las poblaciones silvestres pero en una proporción muy baja y, según Chaleff y Mauvais (1984), se estima que la frecuencia de genes de resistencia a las triazinas (que se hereda a través del genoma de los cloroplastos), es de alrededor de  $10^{-18}$ , mientras que la de las sulfonilureas es de alrededor de  $10^{-6}$  (Chaleff y Mauvais, 1984).

El primer caso reportado de resistencia a herbicidas a nivel mundial fue el de plantas de *Senecio vulgaris* a la simazina y otras triazinas (Ryan, 1970). A partir de ese momento, este fenómeno se ha expandido con rapidez. Para el año 2011, se habían reportado más de 350 biotipos de malezas resistentes en 197 especies de malezas a nivel mundial (Heap, 2011). Actualmente, existen 249 especies (145 dicotiledóneas y 105 monocotiledóneas), con 464 biotipos de malezas que presentan resistencia a herbicidas. Dicha resistencia se ha observado en 22 de los 25 sitios de acción conocidos hasta ahora y con 159 herbicidas diferentes en 86 cultivos en 66 países alrededor del mundo (Weedscience, 2016).

Según Jasienuk *et al.*, (1996), dentro de la serie de factores que condicionan el desarrollo y evolución de la resistencia a herbicidas el más importante es la presión de selección que impone el uso del herbicida. La mayor presión de selección ocurre al utilizar altas dosis de herbicidas de compuestos altamente efectivos y/o persistentes que son aplicados con frecuencia (Reznick y Cameron, 2001). En otras palabras, el uso repetido de uno o varios herbicidas que presenten un mismo mecanismo de acción, somete a las poblaciones vegetales a una presión de selección, incrementando con el tiempo el número de individuos resistentes que logran sobrevivir a la aplicación del herbicida (Pérez y Kogan, 2001).

#### **4,1 Modo y mecanismo de acción de los herbicidas, clasificación**

Para el estudio de la tolerancia y resistencia a herbicidas es importante conocer e identificar tanto el modo como el mecanismo de acción de los mismos: El modo de acción se refiere a la secuencia de eventos que ocurren desde la absorción del herbicida hasta la muerte de la planta. Aquellos herbicidas con el mismo modo de acción tendrán el mismo comportamiento de absorción y transporte, produciendo síntomas similares en las plantas afectadas (Gunsolus y Curran, 1996).

De acuerdo a Zita, (2012), la clasificación de los herbicidas según su modo de acción permite predecir, en forma general, el espectro de control de estos en la maleza, época de aplicación, selectividad a cultivos y persistencia en el suelo. Ashton y Craft (1981) y Cobb y Reade (2010), distinguen siete grandes grupos de herbicidas basándose en su modo de acción y dentro de los cuales se incluyen uno o más mecanismos de acción.

El mecanismo de acción de un herbicida puede ser definido como la principal reacción bioquímica o biofísica afectada en la planta por el herbicida y que usualmente incluye el bloqueo de algún proceso enzimático vital. Aunque el mecanismo de acción está incluido en el modo de acción, los herbicidas pueden ser clasificados también según su mecanismo de acción, teniendo como base los diferentes síntomas que provocan en las plantas afectadas. En ese sentido, la Sociedad Americana de la Ciencia de la Maleza (WSSA) ha desarrollado un sistema de clasificación numérico, mientras que la clasificación del Comité de Acción Contra la Resistencia a Herbicidas (HRAC) desarrolló un sistema basado en letras (Zita, 2012).

Numerosos autores han propuesto diversas clasificaciones de herbicidas basadas en su modo y mecanismo de acción, cada una de estas clasificaciones presenta diferencias importantes entre si y los criterios utilizados por los autores no siempre coinciden, Zita (2012). Es por ello que intentando unificar los diferentes criterios de

clasificación, Zita en el 2012, propone un sistema basado tanto en el modo como en el mecanismo de acción de los herbicidas tal y como se muestra en el Cuadro 1

**Cuadro 1. Propuesta de clasificación de los herbicidas.**

<b>Modo de Acción</b>	<b>Mecanismo de Acción</b>
Fotosíntesis	Fotosistema I Fotosistema II
Síntesis de Pigmentos	Fitoenodesaturasa Deoxi-xilulosa-5-fosfato sintasa Hidroxifenilpiruvatodioxigenasa Protoporfirinógeno oxidasa
Auxínicos	Auxinas Sintéticas Transporte de Auxinas
Biosíntesis de Lípidos	Síntesis de Ácidos Grasos a través de la ACCasa Formación de Ácidos Grasos de cadena muy larga
Biosíntesis de Aminoácidos	5-enolpiruvil shikimato 3-fosfato sintasa Acetato lactato sintasa Glutaminosintetasa
División celular	Síntesis de tubulina y de la organización de los microtúbulos Síntesis de celulosa
Otros	Dihidropteroatosintetasa, Proteína fosfatasa

Fuente: Zita (2012)

#### **4.2 Selectividad**

Caseley, (1996), refiere que, según su espectro de fitotoxicidad, los herbicidas también pueden ser clasificados como selectivos y no selectivos. Se conocen como selectivos aquellos herbicidas que a ciertas dosis, formas y épocas de aplicación eliminan a algunas plantas sin dañar significativamente a otras,

mientras que los herbicidas no selectivos son aquellos 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.

De acuerdo Perez y Kogan (2003), la selectividad es una característica de los herbicidas que hace posible la aplicación de estos para el control de malezas sin que se produzca daño al cultivo. Dicha característica depende de una amplia gama de factores interrelacionados, por lo cual es más relativa que absoluta y no siempre es atribuible al herbicida en sí.

Estos autores, afirman que la Selectividad puede clasificarse en:

- a) **Selectividad de tipo física:** Determinada principalmente por las características morfológicas de las especies vegetales que conllevan a una retención diferencial de la aspersion (posición de las hojas, pubescencia, serosidad etc).
- b) **Selectividad por transporte diferencial:** Se refiere a la facilidad con que el herbicida se moviliza dentro de la planta ya que no todos los productos sistémicos se mueven con la misma facilidad dentro de una especie particular
- c) **Selectividad de tipo bioquímica:** Involucra la conversión de una molécula toxica en una inocua por vías enzimáticas de la planta (oxidación, reducción, hidrolisis), aunque es importante señalar que existen casos donde la desintoxicación es meramente química.

## 5. Mezclas de herbicidas/productos químicos

La combinación de dos herbicidas o bien de un herbicida y un insecticida sobre un cultivo suele ser una práctica común en los sistemas de producción agrícola. Las razones para la utilización de dichas combinaciones de productos químicos por parte de los agricultores son muy variadas, entre estas podemos mencionar la búsqueda de una mejoría en espectro del control aplicado, el manejo de casos de resistencia, así como el ahorro de tiempo y dinero (Vidal *et al.*, 2010; Fisher, 2010).

Sin embargo, dichas mezclas deben ser estudiadas y hechas a conciencia, puesto que las interacciones entre los productos químicos mezclados pueden traer ciertas desventajas, como por ejemplo la disminución de la acción fitotóxica de alguno de los productos combinados, lo cual se traduce en pérdidas económicas y un bajo nivel de control de plagas. (Fisher, 2010).

De acuerdo a Vidal *et al.*, (2010), los resultados de la combinación de los diversos productos químicos pueden ser de antagonismo, sinergismo o efecto neutro, (también llamado efecto aditivo), ello como consecuencia de las diferentes interacciones químicas, fisiológicas o cinéticas (absorción, translocación o metabolismo) entre los productos químicos mezclados. En ese sentido, podemos definir lo siguiente:

- **Antagonismo**: se refiere a la interacción negativa entre dos o más compuestos químicos, es decir que la acción combinada de estos elementos disminuyen o anulan la efectividad del control de uno o más componentes de la mezcla sobre una o más especies, con lo cual dicha efectividad es menor que con el mejor componente de forma individual, pudiendo presentarse además una pérdida de la selectividad de uno de sus componentes, trayendo como consecuencia un daño directo sobre el cultivo (Kruse *et al.*, 2006 a, b; Fisher, 2010).

Es importante destacar que el antagonismo puede presentarse tanto al mezclar dos herbicidas como al mezclar herbicidas con otros productos fitosanitarios por lo cual resulta de vital importancia el conocer las posibilidades de mezcla que poseen los distintos agroquímicos a utilizar (Kruse *et al.*, 2006 a, b; Fisher, 2010).

- **Sinergismo**: ocurre cuando el efecto de los herbicidas (o productos químicos) mezclados es mayor que la suma de los efectos individuales de cada componente, pudiendo presentarse cuando: los componentes de mezcla coinciden en la selectividad sobre ciertas especies; cuando los componentes poseen diferentes sitios de acción en la misma planta (pudiendo activar complejas redes de efectos secundarios) o cuando un componente interfiere con la detoxificación del otro. Así mismo, es importante destacar que para estos casos se toma en cuenta no solo el grado de control sino la afectación o no del nivel de selectividad deseado hacia el cultivo (Fisher, 2010).

En ese sentido, el mismo autor refiere que el sinergismo no resulta en pérdida de selectividad cuando:

- a) Uno o ambos componentes de la mezcla es detoxificado por el cultivo y no por la maleza (bispiribac-tiobencarbo en arroz).
- b) Cuando un componente bloquea a una isoenzima detoxificadora en la maleza y no en el cultivo (*Echinochloa* y arroz).
- c) Cuando el sinergista forma inhibidores estables en la maleza y no en el cultivo (caso de tridifane y atrazina en maíz vs. *Setaria* spp.).

Para determinar la existencia o no del sinergismo, existen diversas metodologías dentro de las cuales destacan: la detección y cuantificación de las modificaciones en la I50 (o GR50, LD50, etc.) usando curvas de respuesta a dosis; el análisis de

isóbatas, y el método de Limpel (1962), de comparación de efectos “esperados” adaptado y popularizado por Colby (1967) (Kruse *et al.*, 2006 a, b; Fisher, 2010).

## 6. Mecanismos de Resistencia

Algunos autores como Anzalone (2008), WRAG (2003), Devine y Shukla, (2000) y Friesen *et al.*, (2000) coinciden en señalar la existencia de diversos mecanismos de resistencia a herbicidas, los cuales pueden ser clasificados en:

- a) **Alteración o sobreproducción del sitio de acción del herbicida:** Ocurre por una modificación en los aminoácidos de la enzima afectada por el herbicida. Dicha modificación impide la interacción enzima-herbicida y el mecanismo de acción de este último no se manifiesta generándose una especie de “dilución” del efecto tóxico del herbicida. Este mecanismo de resistencia ha sido identificado actuando en herbicidas de diferentes grupos químicos entre ellos el de las sulfonilúreas (Devine y Shukla, 2000).
  
- b) **Diferencias en la absorción, traslocación o compartimentalización del herbicida:** Ocurre cuando las plantas realizan o desarrollan cambios en sus procesos metabólicos y fisiológicos para evitar que el herbicida alcance el sitio de acción, (por ejemplo, el herbicida es aislado en la vacuola de la célula). Lasat *et al.*, (1997), utilizaron este mecanismo para explicar la resistencia al herbicida paraquat en algunas malezas.
  
- c) **Aumento en la tasa de metabolización del herbicida:** Los herbicidas suelen ser metabolizados en mayor o menor grado por las plantas, dependiendo de la selectividad de los mismos. Algunas plantas han aumentado significativamente su capacidad para metabolizar el herbicida, degradando este a metabolitos no tóxicos rápidamente.

La velocidad de degradación enzimática puede variar debido a factores endógenos y exógenos como el estadio de crecimiento de la planta o las

condiciones climáticas, entre otros (Zita, 2012) De acuerdo con Anzalone (2008), este mecanismo de detoxificación puede funcionar de manera simultánea con diferentes herbicidas, pudiendo originar resistencia múltiple.

Una de las causas del aumento en la tasa de metabolización del herbicida se debe a la presencia de enzimas específicas y no específicas, como la citocromo P450 o la glutatona-S-transferasa las cuales actúan sobre un gran número de sustratos (Anzalone, 2008).

De acuerdo a Shimabukuro, (1985) y Hatzios (1991) Los procesos que implican la detoxificación metabólica de los herbicidas en tejidos vegetales pueden dividirse en tres fases: conversión, donde las propiedades iniciales del herbicida de partida son transformadas a través de reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis, para producir un compuesto más soluble en agua y menos tóxico. Conjugación, donde el herbicida o sus metabolitos son conjugados con un azúcar, aminoácido o glutatión incrementando su solubilidad en agua y reduciendo la toxicidad del compuesto y finalmente la transformación, en la cual los metabolitos de la fase anterior son transformados a conjugados secundarios con nula toxicidad. Esta división no constituye una regla general, dado que alguna de las fases puede no estar presente en los procesos de detoxificación (Hatzios, 1991).

## **7. Clasificación de los tipos de resistencia a herbicidas**

Según Heap (1997) y Valverde (2000), existen 2 tipos de resistencia claramente definidas que son:

- I. **Resistencia cruzada**: Cuando un biotipo de una especie determinada es resistente a dos o más herbicidas de diferentes familias químicas como consecuencia de un mismo mecanismo de resistencia; lo cual no implica que la población de las malezas sea resistente a la totalidad de los herbicidas que afectan el mismo sitio de acción (es decir a la ruta bioquímica sobre la que

actúa el herbicida en la planta) ni a todos los miembros de un grupo químico específico

- II. **Resistencia múltiple:** Aquella resistencia a herbicidas con diferentes mecanismos de acción como consecuencia del desarrollo de más de un mecanismo de resistencia.

### **8. Resistencia a los inhibidores de la acetolactato sintetasa (ALS)**

La acetolactato sintetasa (ALS) o también conocida como acetohidroxitobutirato sintetasa (AHAS EC 2.2.1.6), es la primera enzima común en la síntesis de los aminoácidos de cadena ramificada, (valina, leucina e isoleucina) los cuales son esenciales para la síntesis de proteínas (Stidham, 1991; Chaleff y Mauvais, 1984; Ray, 1984; Shaner *et al.*, 1984). La reacción catalizada por la ALS condensa dos moléculas de piruvato para formar  $\alpha$ -acetolactato, (precursor de la leucina y valina), de igual manera puede reaccionar con piruvato y  $\alpha$ -ketobutirato para formar  $\alpha$ -aceto- $\alpha$ -hidroxibutilato, (precursor de la isoleucina). Esta enzima es codificada en el núcleo, producida en el citoplasma y transportada vía tránsito de péptido a los cloroplastos (Corbett y Tardif, 2006)

Existen diversos grupos químicos de herbicidas utilizados en la agricultura cuyo sitio de acción es la ALS (imidazolinonas, triazolopirimidinas, pirimidinil (tio)-benzoatos, sulfonilamino-carboniltriazolinonas y sulfonilúreas), (Anzalone, 2008; Ferguson *et al.*, 2001). Por otro lado, de acuerdo a Duke y Dayan (2001) y Anzalone *et al.*, (2006), el efecto inhibitor de dicha enzima produce en la planta una interrupción de la mitosis, reducción en los niveles de aminoácidos de cadena ramificada, incrementos en los niveles de  $\alpha$ -ketobutirato, aumento en los niveles de antocianinas, interrupción del metabolismo de aminoácidos, paralización del crecimiento, disminución de la síntesis de ADN y la muerte.

La resistencia a herbicidas pertenecientes a estos grupos se ha constituido en los últimos años en un serio problema puesto que la aparición de biotipos resistentes

puede ocurrir en períodos relativamente cortos (Saari *et al.*, 1994), Devine y Preston (2000), señalaron que el rápido incremento de la resistencia a los herbicidas inhibidores de la ALS se debe en parte a la alta frecuencia de mutación sobre el sitio de acción de la enzima, no obstante, también se ha reportado que el mecanismo de resistencia no asociado al sitio de acción como el aumento en la tasa de metabolización del herbicida puede influir en la generación de resistencia a estos herbicidas. (Corbett y Tardif, 2006; Devine y Shukla, 2000).

De acuerdo a Boutsalis *et al.*, (1999); Bernasconi *et al.*, (1995); y Guttieri *et al.*, (1992), la ocurrencia del mecanismo de resistencia basada en la modificación del sitio de acción del herbicida se debe a la sustitución de un solo nucleótido en el gen de la ALS, dicha sustitución modifica la secuencia de aminoácidos en la enzima ALS y diversos estudios de herencia en malezas resistentes a inhibidores de la ALS (por ejemplo en *Lactuca serriola*, *Kochia scoparia* y *Sonchus oleraceus*) mostraron que la resistencia es conferida por un solo gen nuclear con variaciones en el grado de dominancia, pudiendo presentarse dominancia completa o incompleta (Boutsalis *et al.*, 1999, Boutsalis y Powles, 1995; Thompson *et al.*, 1994; Mallory-Smith *et al.*, 1990).

## **9. El Citocromo P450 y su papel en la resistencia a herbicidas**

El complejo citocromo P450, es una súper familia de hemoproteínas de función catalítica, ampliamente distribuido en animales, plantas y protistas (Black y Coon, 1986), pudiendo localizarse en diferentes tejidos dentro de un mismo organismo (Guengerich, 2013). Existe una amplia variedad de formas de las enzimas P450, el tamaño de las mismas puede variar de 45 a 62 kDa y se presentan grandes diferencias en la secuencias de aminoácidos entre los diferentes tipos de P450, llegando en algunos casos a tener una similitud en dicha secuencia de apenas 16% (Anzalone, 2008).

Las principales enzimas P450 funcionan como monoxigenasas, utilizando electrones del NADPH para activar el oxígeno y reaccionar con sustratos

hidrofóbicos para producir compuestos más hidrofílicos, por lo que la reacción de este sistema enzimático implica la incorporación de un átomo de oxígeno molecular ( $O_2$ ) al sustrato, mientras el otro es reducido a  $H_2O$  por el NADPH (Siminszky *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 2004; Anzalone, 2008). Su implicación en la resistencia a herbicidas se demostró mediante experimentos con inhibidores de P450 como piperonilbutoxido y malathion, (insecticidas organofosforados), los cuales son metabolizados por la citocromo P450, generando un reactivo intermediario del metabolismo que inhibe a la misma. (Gressel, 1990; Baerg *et al.*, 1996; Kreuz y Fonné-Pfister, 1992; Christopher, *et al.*; 1994; Yu *et al.*, 2004). El mecanismo de acción de estas enzimas se resume en la figura 2

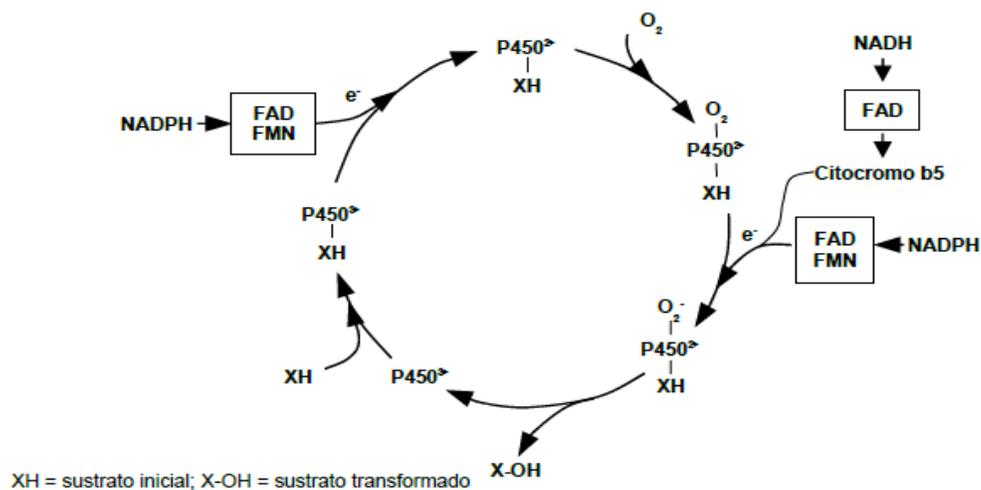


Figura 2 Mecanismo de acción del P450 (Anzalone 2008)

Anzalone (2008), destaca que las enzimas P450 monooxigenasas también intervienen en la biosíntesis de compuestos importantes en la planta como hormonas, fenilpropanoides, ácidos grasos y terpenoides, a través de un amplio rango de reacciones que incluyen la dimerización, deshidratación e isomerización; además actúan como enzimas desulfurasas en el metabolismo de insecticidas organofosforados.

La gran diversidad de formas del P450 hace pensar que estas enzimas son la mayor clase de proteínas presentes en plantas, sin embargo, dado que aún se

desconoce la mayoría de las funciones de los genes P450 estudiados, algunos autores como Anzalone (2008), indican que es probable que el metabolismo de los herbicidas en las plantas se produzca por el ajuste fortuito de este en el sitio activo de las P450 que están envueltas en el metabolismo secundario. El mismo autor señala que muchas enzimas P450 que intervienen en rutas de biosíntesis del metabolismo secundario son capaces de utilizar diversos herbicidas como sustratos independientemente de la familia química de estos y que un mismo herbicida puede ser metabolizado por diferentes formas de P450. Por todo lo anterior, determinar cuál tipo de enzima P450 es responsable en la metabolización de un herbicida en particular es extraordinariamente difícil en especial en experimentos *in vivo* (Gonzalez-Mendoza, 2007; Anzalone, 2008)

A través de diversas investigaciones se ha encontrado que la metabolización diferenciada de herbicidas por la P450 puede producir que algunos cultivos sean más tolerantes que otros a determinados herbicidas, en otras palabras la acción de la P450 puede definir la selectividad de un herbicida entre especies, ello se ha comprobado a través del uso tanto de productos inhibidores de la P450 como de productos que estimulen su acción, siendo algunos utilizados como sinergistas y otros como antídotos de herbicidas. Un ejemplo de ello son algunos insecticidas organofosforados (como el malatión o el terbufos y sus metabolitos), cuya acción inhibidora sobre el P450 disminuye la tolerancia de ciertas especies al herbicida (Anzalone, 2008)

Forthoffer (2001), reportó que la tolerancia natural de las especies vegetales a los herbicidas se basaba principalmente en la habilidad diferencial de la planta para desintoxicar el herbicida mediante la participación de las enzimas del P450, mientras que Koeppe *et al.*, (2000), estableció que en aquellos casos de tolerancia del maíz a algunas sulfonilureas el P450 tenía una función clave en la rápida transformación del herbicida en compuestos no tóxicos para la planta.

De acuerdo a Spider y Vidal (2001) así como Fonne Pfister *et al.*, (1990), la tolerancia del maíz al nicosulfuron, viene dada gracias a la rápida detoxificación por la acción de la P450 en reacciones de hidrólisis y glicolisis.

Frey *et al.*, (1995), afirmaron que el maíz presentaba un amplia variedad de genes de P450 y según lo reportado por Kreuz *et al.*, (1996), la molecula del nicosulfuron es metabolizada a través de reacciones de hidrólisis por el citocromo P450 en la fase I de la reacción de detoxificación en este cultivo.

#### **10.- Resistencia / tolerancia al nicosulfurón**

El nicosulfurón es un herbicida post-emergente, sistémico y altamente selectivo en maíz (Beyer, 1988), perteneciente al grupo de las sulfonilureas. Su ingrediente activo actúa sobre la enzima acetolactato sintetasa (ALS), controlando eficazmente un amplio número de especies de gramíneas anuales y algunas hoja ancha (Siminszky *et al.*, 1995, Hernández y Mejía, 1996), siendo utilizado de manera regular para el control de malezas en maíz desde 1989 (Mejía, 1993).

El nicosulfuron es absorbido tanto por vía foliar como radicular, inhibiendo el crecimiento de malezas susceptibles, traslocándose con rapidez hacia los tejidos meristemáticos y no es compatible con insecticidas fosforados. Los principales síntomas de toxicidad en las plantas como decoloración, enrojecimiento del follaje, necrosis de los tejidos y finalmente muerte de plantas sensibles, se manifiestan de 1 a 3 semanas después de la aplicación, dependiendo del estado de desarrollo la misma y la susceptibilidad que presenten (Oredeñana, 1994; De Liñan, 2004).

Diversos estudios relacionados con la resistencia de las malezas al nicosulfuron, han encontrado que aunque dicha resistencia está influenciada por el metabolismo de las plantas, la mutación en el sitio de acción del herbicida es un factor de vital importancia en aquellos biotipos catalogados como resistentes. En ese sentido, Gamez (2013), caracterizó enzimática y metabólicamente la resistencia a

nicosulfuron de la maleza *Rottboelia cochinchinensis* (Lour) W.D.Clayton, confirmando su existencia en el biotipo “Gómez”, donde además de observar la insensibilidad de la ALS al nicosulfurón, descartó la resistencia por metabolismo acelerado en el mencionado biotipo.

En el cultivo del maíz, la selectividad a las sulfonilureas viene dada por la rapidez de las plantas para transformar el herbicida en compuestos no tóxicos gracias a la acción del complejo enzimático citocromo P450 monooxigenasa (Siminszky *et al.*, 1995). Sin embargo, esta selectividad no es absoluta en la especie y se han observado importantes diferencias en la tolerancia de distintos cultivares de maíz al nicosulfuron a través de estudios como los realizados por Morton (1992), quien reportó diferencias entre los niveles de tolerancia de distintos genotipos de maíz a la sulfonilúreas.

Green *et al.*, (1993), realizaron un estudio genético probando diferentes híbridos de maíz y líneas progenitoras con los herbicidas nicosulfurón, primisulfuron y thifensulfuron, encontrando una tolerancia diferencial que dependía del material en el caso de los híbridos. Agregaron además, que al cruzar líneas susceptibles con líneas tolerantes se obtenía una generación filial tolerante por lo que consideraron que dicha tolerancia era aportada por un gen semidominante.

Mejía (1993), reporta una mayor sensibilidad al nicosulfurón en híbridos dobles de maíz amarillo que en híbridos dobles blancos. Posteriormente, Hernández y Mejía (1996), obtuvieron disminuciones de peso seco entre el 14 y el 35%, en plantas de un híbrido doble de maíz amarillo debido al tratamiento con nicosulfurón, mientras que en el híbrido doble blanco la disminución fue apenas del 4%. Así mismo, demostraron que el nicosulfuron aplicado sólo o en mezcla ocasionó significativas disminuciones en la altura y el peso seco en plantas de cuatro híbridos dobles de maíz, y adicionalmente redujo el rendimiento de granos entre 10 y 34 % (Hernández y Mejía, 2000).

Spider y Vidal (2001), afirmaron que el nivel de tolerancia de los híbridos de maíz así como la selectividad del nicosulfuron dependía del estadio de desarrollo de la planta al momento de la aplicación del herbicida, afirmando que el momento idóneo es el estadio V6.

Mejías (2004), estudió la tolerancia al nicosulfuron en siete híbridos tropicales de maíz amarillo, encontrando dos materiales visiblemente afectados por el herbicida y obteniendo resultados prometedores relacionados con resistencia en otros dos los cuales presentaban la misma línea parental. Posteriormente González (2005) estudió la tolerancia en siete híbridos de maíz amarillo a la mezcla de thifensulfuron + rimsulfuron, encontrando que los materiales SK-247, SK-421 y el híbrido HTS3 presentaron alta tolerancia a dichos herbicidas y que los materiales experimentales HT4, HT5, HT6 fueron altamente susceptibles, reportando además que tanto los materiales tolerantes como el más susceptible presentaron resultados muy similares en un estudio previo con el mismo herbicida.

Adames (2008), evaluó la tolerancia de 7 cultivares de maíz amarillo al nicosulfurón, encontrando que solo dos de estos mostraron problemas de fitotoxicidad.

Estudios realizados por Barrett *et al.*, 1997; Green y Ulrich, 1993; y Kang, 1993, demostraron que la susceptibilidad al nicosulfuron en el maíz dulce, era condicionada por un solo gen recesivo designado con los nombres *nsf1* o *ben1*.

Williams *et al.*, (2006) reportaron que el alelo dominante *Nsf1*, proveniente de una línea endocriada tolerante al nicosulfuron (conocida como B73), había sido secuenciado y localizado en el cromosoma 5S. Dicho alelo, se ubicaba en el segundo locus en un cluster de 4 genes muy cercanos entre sí, los cuales mostraron homologías con los genes del citocromo P450, (genes CYP).

Pataky *et al.*, 2006b; Nordby *et al.*, 2008 y Williams y Pataky, 2008, confirmaron que la susceptibilidad o tolerancia del maíz dulce a diversos herbicidas metabolizados por el citocromo P450, era una característica de herencia simple, y que los alelos ubicados en un solo locus del citocromo P450 o en un grupo de varios loci estrechamente ligados en el extremo corto del cromosoma 5S, eran los responsables de condicionar la respuesta de los cultivares de maíz dulce a diversos herbicidas incluyendo: bentazon, carfentrazone, dicamba + diflufenzopyr, foramsulfuron, imazethapyr, mesotrione, nicosulfuron, primisulfuron, rimsulfuron y tembotrione.

Pataky *et al.*, (2008), realizaron un estudio sobre niveles de tolerancia de 149 híbridos de maíz dulce en función a la presencia de alelos que condicionaban tolerancia o no del material a los herbicidas nicosulfuron, foramsulfuron y mesotrione. A partir de diversos cruzamientos observaron tolerancia diferencial a los mismos, y separaron estos materiales en 3 grupos: 95 materiales con alelos homocigotas (dominantes) para la tolerancia, 47 heterocigotas que mostraban un alelo para tolerancia y otro para susceptibilidad y 2 homocigotas (recesivos) para susceptibilidad.

Los resultados obtenidos por estos investigadores, mostraron una alta susceptibilidad en los individuos con alelos homocigotas (recesivos) para esta condición, una tolerancia intermedia para aquellos individuos heterocigotas y una alta tolerancia para los materiales con alelos homocigotas (dominantes) para dicha condición. Esto permitió concluir que la tolerancia al nicosulfurón en estos maíces estaba gobernada por alelos ubicados en un solo locus.

En el 2009, Pataky y colaboradores confirmaron la existencia de tolerancia diferencial de daño al nicosulfurón y mesotrione entre diferentes líneas endocriadas e híbridos de maíz dulce, demostrando además, que dicha tolerancia era de dominancia parcial y de herencia simple. Así mismo, observaron la presencia de genes modificadores, que podrían explicar los diferentes niveles de

daño a los cultivares en los diversos ambientes en que se desarrollan. Adicionalmente, encontraron materiales susceptibles a nicosulfuron, mesotrione y bentazon pero asociados a otro gen mayor, diferente al encontrado inicialmente.

Torcatt, (2010), evaluó bajo condiciones de invernadero la fitotoxicidad del herbicida nicosulfurón sobre los híbridos comerciales de maíz amarillo Dow 2B710, Dow 2B688, la variedad CENIAP DMR y el híbrido de maíz blanco H-2020, encontrando que el nicosulfurón no producía daño significativo en ninguno de los materiales estudiados.

## **11. Pruebas utilizadas para caracterizar resistencia a los inhibidores de la ALS**

Con el paso del tiempo y los avances de la tecnología, se han desarrollado diferentes métodos de diagnóstico que permiten caracterizar adecuadamente la resistencia a herbicidas. En ese sentido, Corbett y Tardif (2006) señalaron que entre las pruebas de diagnóstico disponibles para detectar resistencia a los herbicidas inhibidores de la ALS se encontraban: las llamadas pruebas de respuesta a dosis, las pruebas basadas en la actividad de la enzima y las pruebas basadas en ADN, las cuales describen a continuación:

### **11.1 Prueba de respuesta a dosis**

Se basa en la comparación entre la respuesta de un biotipo susceptible y uno resistente a diferentes dosis de herbicida, para ello, usualmente se selecciona un cierto número de dosis (entre 6 y 8), que varían desde una dosis baja hasta una normalmente letal para plantas susceptibles (Heap, 1994; Beckie *et al.*, 2000).

La respuesta a estas dosis es evaluada de manera visual y la resistencia se confirma si dicha respuesta es estadísticamente diferente entre los biotipos evaluados (Beckie *et al.*, 2000). Los resultados obtenidos suelen analizarse mediante modelos de regresión no lineal entre ellos el modelo log-logístico, el cual

según Seefeldt *et al.*, (1995), es uno de los más apropiados para los análisis de los estudios de respuesta a dosis.

### **11.2 Pruebas de la actividad de la enzima**

Existen distintos ensayos cuya finalidad es la medición de la actividad de la ALS extraída en presencia de algún inhibidor, tales como los desarrollados *in vitro* para medir la acumulación de acetoína, la cual absorbe luz en más o menos 525 nm, pudiendo ser cuantificada con un espectrofotómetro. En una planta susceptible la cantidad de acetoína será mínima mientras que en una planta resistente ocurrirá lo contrario (Ray, 1984; Chaleff y Mauvais, 1984; Shaner *et al.*, 1984; Westerfeld, 1945; Hall *et al.*, 1998). Este método ha sido aplicado para la detección de resistencia en *Galiumspurium* (Hall *et al.*, 1998), *Amaranthus rudis* (Hinz y Owen, 1997) y *Kochiascoparia* (Kwon y Penner, 1995).

Estos ensayos suelen ser bastante complicados y requieren de largo tiempo, por lo que han sido modificados inhibiendo la enzima KARI para forzar la acumulación de acetoína. Este tipo de modificación ha sido utilizada para la caracterización de la resistencia a herbicidas en *Abutilon theophrasti*, *Xanthium strumarium*, *Amaranthus hybridus*, *Zea mays*, *Sorghum bicolor*, *Glycine max* (Taylor *et al.*, 1996; Simpson *et al.*, 1995; Gerwick *et al.*, 1993), así como en *Bidens pilosa* y *Amaranthus quitensis* (Monqueiro *et al.*, 2003). En todos los casos se usó CPCA (ácido 1,1-ciclopropanodicarboxílico) como inhibidor de la KARI.

### **11.3 Pruebas basadas en ADN**

Desde hace poco más de 20 años, los estudios genéticos basados en el ADN de las especies se han visto fortalecidos gracias al auxilio de una serie de técnicas que generan señaladores de diferentes regiones del genoma conocidos como marcadores moleculares, diseñándose diversas pruebas de acuerdo al tipo de marcador a utilizar (Picca *et al.*, 2004).

La mayoría de estas técnicas están basadas en la llamada reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), la cual amplifica exponencialmente una región de ADN. Para ello se utiliza la enzima *taq* polimerasa, dos cebadores, nucleótidos y catalizadores como el magnesio, más la repetición de ciclos de temperatura, con la finalidad de lograr los procesos de desnaturalización, síntesis y polimerización, que llevan al aumento exponencial del número de segmentos replicados (Ferreira y Grattapaglia, 1995).

Dentro de los diversos tipos de marcadores moleculares utilizados en el estudio genético de las especies vegetales tenemos a los RAPD, también conocido como ADN polimórfico amplificado al azar. Esta técnica ha sido descrita en detalle por numerosos autores (Williams *et al.*, 1990; Hinrichsen *et al.*, 1996) y se basa en la metodología de la PCR, utilizando un solo iniciador o “primer” el cual puede unirse al azar a las secuencias complementarias ubicadas en diferentes regiones del genoma (Waugh *et al.*, 1992), desconociéndose la secuencia de ADN que se va a amplificar.

Estos marcadores fueron sugeridos por primera vez por Williams *et al.*, (1990), recomendando el uso de iniciadores de diez nucleótidos de longitud, con una composición de guanina y citosina mayor del 50%, los cuales se alinean con el ADN genómico y se aparean de manera cíclica, gracias a la temperatura, se sintetizan bandas de 200 a 2000 pb por la acción de una enzima ADN polimerasa termoestable (Williams *et al.*, 1990, Klein-Lankhorst *et al.*, 1991, McDonald *et al.*, 1994).

Los fragmentos amplificados se despliegan según su peso molecular durante la electroforesis en agarosa o poliacrilamida, algunos de ellos pueden ser “genotípicos específicos” y por tanto útiles para determinar la identidad varietal (Zhang *et al.*, 1996), así como para el fitomejoramiento asistido por marcadores moleculares.

Los polimorfismos entre genotipos se manifiestan por la presencia o ausencia de una o más bandas por lo que se consideran dominantes (Williams *et al.*, 1990, Penner 1996), de manera que no es posible distinguir si se trata de un locus heterocigótico u homocigótico (Valadez y Kahl 1999). Las bandas diferenciales entre genotipos se originan por el cambio de un par de bases, por rupturas y fragmentaciones estructurales, por deleciones que modifican o eliminan el sitio de inserción del iniciador o por translocaciones que separan los sitios de acoplamiento del iniciador a una distancia mayor a 2500 nucleótidos, a la cual ya no hay amplificación (Xena, 2000).

Narváez *et al.*, (2000), señalaron que las ventajas de los análisis con RAPD estriban en su simplicidad y bajo costo, pero agregan que al ser un marcador de tipo dominante no es posible discernir sobre la heterocigocidad de los *loci* observados, adicionalmente, la reacción es muy sensible a las condiciones de amplificación y a la calidad y concentración del ADN, pudiendo influir notablemente en la reproducibilidad del método. La estimación de las frecuencias alélicas en los análisis de RAPD, se debe hacer de manera indirecta, asumiendo el equilibrio de Hardy-Weinberg (Aagaard *et al.*, 1998).

Lanza *et al.*, (1997) evaluaron la diversidad genética de 18 líneas mejoradas de maíz, determinando la correlación entre distancia genética y el comportamiento de híbridos simples a través de marcadores RAPD. Posteriormente, Gutiérrez *et al.*, (2009), realizaron una comparación molecular de identidad genética en maíces de distinta edad, encontrando que los marcadores RAPD permitieron una clara diferenciación de edades y genotipos genéticamente relacionados entre y dentro de las líneas, mientras que Hernández *et al.*, (2010), utilizaron marcadores RAPD y microsatélites para evaluar y caracterizar la divergencia genética de líneas parentales de híbridos de maíz.

## 12. Índices de Tolerancia

Desde hace varios años, se recomienda la utilización de índices de tolerancia a diversas clases de stress ya que los mismos permiten detectar que parte de la diferencia en rendimiento se debe a una condición de stress particular, pudiendo así identificar genotipos tolerantes (Saba *et al.*, 2001). Aunque originalmente se les conoce como Índices de tolerancia a sequía, estos son utilizados de manera genérica como Índices de tolerancia a stress, entre los cuales tenemos:

- a) **Índice de susceptibilidad a la sequía (ISS)**: propuesto por Fischer y Maurer (1978), en el cual  $Y_s$  representa el rendimiento de cada genotipo bajo condiciones de estrés hídrico,  $Y_p$  es el rendimiento bajo condiciones de irrigación y  $\bar{Y}_s$  y  $\bar{Y}_p$  representa los promedios del rendimiento experimental de todos los genotipos creciendo bajo condiciones de estrés y sin estrés, respectivamente. Los valores más bajos de ISS indica baja susceptibilidad de genotipos al estrés hídrico, en otras palabras significa mayor tolerancia al estrés por sequía. La fórmula del ISS es:

$$ISS = 1 - \frac{Y_s}{Y_p} / 1 - \frac{\bar{Y}_s}{\bar{Y}_p}$$

- b) **Índice relativo a la sequía (RDI)**: desarrollado por Fischer y Maurer (1978). Se calcula de acuerdo a la relación del rendimiento de cada genotipo bajo condiciones de estrés ( $Y_s$ ) y bajo condiciones óptimas de irrigación ( $Y_p$ ), así como a la relación del rendimiento promedio de todos los genotipos bajo condiciones de estrés ( $\bar{Y}_s$ ) y bajo óptimas condiciones ( $\bar{Y}_p$ ). Si el índice arroja valores por encima de 1 indica que el genotipo debería tener mayor tolerancia relativa a la sequía. Caso contrario, ocurre cuando los valores se encuentran por debajo

de 1 indicando mayor susceptibilidad relativa bajo condiciones de estrés. La fórmula del RDI es

$$RDI = \frac{Y_S}{Y_P} / \frac{\square_S}{\square_P}$$

- c) **Índice de tolerancia (TOL)**: representado por la diferencia entre el rendimiento de cada cultivar bajo condiciones de óptima irrigación ( $Y_P$ ) y estrés hídrico ( $Y_S$ ). Este índice fue propuesto por Rosielle y Hamblin en 1981. Si la diferencia entre  $Y_P$  y  $Y_S$  es amplia, los valores de TOL deberían incrementarse indicando que el cultivar es más sensible a la sequía, por lo que la fórmula del TOL sería:

$$TOL = Y_P - Y_S$$

- d) **Índice de la media aritmética (MP)**: El cual se refiere al rendimiento promedio de cada genotipo bajo las condiciones óptimo ( $Y_p$ ) y estrés ( $Y_s$ ). Fue propuesto por Rosielle y Hamblin en 1981 y su fórmula es:

$$MP = \frac{Y_P + Y_S}{2}$$

- e) **Índice de tolerancia a estrés (ITS)**: Presentado por Fernández (1992). donde,  $Y_s$  es igual al rendimiento bajo condiciones de estrés hídrico,  $Y_p$  es el rendimiento bajo condiciones de irrigación y  $Y_p^2$  viene siendo el promedio del rendimiento experimental de todos los genotipos creciendo bajo condiciones de irrigación. Valores alto de ITS indica que los genotipos tienen alta tolerancia a la sequía.

$$ITS = Y_p * Y_s / Y_p^2$$

- f) **Índice de la media geométrica (GMP)**: Introducido por Fernández (1992), el mismo es calculado mediante la siguiente fórmula

$$GMP = \sqrt{Y_p (Y_s)}$$

De esta gama de índices, los más utilizados son el índice de susceptibilidad (ISS), el índice de tolerancia al estrés (ITS) y la tolerancia (TOL) (Saba *et al.*, 2001).

### **13. Hormesis**

La hormesis es un concepto biológico relacionado directamente con el fenómeno de dosis-respuesta y se refiere al proceso mediante el cual la exposición a dosis bajas de un agente químico que es dañino a dosis altas, induce una respuesta adaptativa y/o un efecto benéfico en los organismos expuestos a estas (Rattan, 2004; Calabrese, 2008; Hoffman, 2009)

De acuerdo a Belz y Duke (2014), el término hormesis fue sugerido por Paracelsus hacia 1493, al afirmar que “todas las sustancias son tóxicas y ninguna es tóxica; es la dosis la que determina la toxicidad”. Posteriormente, Schulz (1887, 1888), observó en los procesos de fermentación con levaduras, que la aplicación de agentes tóxicos en bajas concentraciones estimulaban la producción de CO<sub>2</sub> mientras que al aplicarse en dosis altas la inhibían. Sin embargo, el término fue utilizado formalmente por primera vez por Southam y Ehrlich (1943) cuando demostraron que dosis bajas de un extracto fenólico de cedro rojo aumentaban el metabolismo de los hongos de la madera, mientras que dosis elevadas lo inhibían.

Con la finalidad de aclarar las dudas existentes en relación a una adecuada definición de la hormesis, Calabrese y Baldwin (2002) señalaron que dicho fenómeno era un tipo de respuesta adaptativa de las especies y que además, era de tipo bifásico, ya que exhibe tanto estimulación a bajas dosis como inhibición a

altas dosis. Ambas condiciones (estimulación e inhibición) deben estar presentes para satisfacer la definición. Señalaron además que la hormesis puede inducirse de manera directa o indirecta.

### **13.1 Hormesis en la Agricultura**

Calabrese y Baldwin (1998), afirmaron que los herbicidas (aplicados en dosis bajas o subletales) podían estimular parámetros biológicos como la sobrevivencia y reproducción en cultivos, además de incrementar respuestas tanto metabólicas como fisiológicas entre las cuales mencionan el consumo de oxígeno, la tasa fotosintética, la regeneración de tejidos, la respuesta inmunológica y la germinación de semillas entre otros.

Duke *et al.*; (2006), reportaron que el beneficio de las dosis bajas de un químico sobre un organismo era algo bastante complejo siendo aplicable únicamente en situaciones muy particulares, asegurando además que la hormesis no pretende predecir si un efecto es bueno o malo para un organismo sino, más bien, un indicador de la existencia de un estímulo para un parámetro específico determinado.

A pesar de ello, Calabrese (2008), afirmó que para ese entonces existían grandes vacíos en la información sobre el efecto hormético de los herbicidas en las plantas debido a una combinación de diversos factores, predominantemente relacionados con la aplicación de diseños experimentales no apropiados para la evaluación del fenómeno. Adicionalmente, refirió que la idea de un efecto beneficioso asociado al concepto de la hormesis resultaba difícil de definir ya que la relación de la dosis-respuesta era frecuentemente observada en relación a un escenario específico y relativo, es decir que existía cierta subjetividad en su determinación.

Appleby (1998), afirmó que para ese momento se habían llevado a cabo numerosos estudios de hormesis utilizando insecticidas, herbicidas, fungicidas,

antibióticos y solventes de laboratorio. Algunos de estos estudios han estado orientados específicamente hacia las respuestas metabólicas y fisiológicas de las plantas al ser expuestas a dosis bajas de herbicidas, al punto tal de que el MCPA (uno de los primeros herbicidas), fue desarrollado con la finalidad de incrementar el rendimiento en las cosechas (Allen, Downes, Mees y Springett, 1978; Duke *et al.*, 2006)

En ese sentido, vale la pena mencionar los trabajos desarrollados por Wiedman y Appleby (1972) quienes estudiaron el efecto de 16 herbicidas sobre el aumento de biomasa en cultivos de avena (*Avena sativa*, L.) y pepino (*Cucumis sativus*, L.), evidenciando un efecto de hormesis sobre el crecimiento de la raíz así como un aumento del peso seco en ambas especies al aplicar dosis subletales de herbicidas inhibidores del fotosistema II, obteniendo resultados estadísticamente significativos con 13 de ellos.

Velini, Alves, Godoy, Meschede, Souza y Duke (2008), observaron que el glifosato inducía un efecto de hormesis en diversos cultivos como: soya, café, sorgo y maíz (entre otros), evidenciando un incremento en el peso seco de las plantas al ser expuestas a dosis subletales de dicho herbicida así como también un aumento en la concentración del ácido siquímico en los cultivos de soya y maíz, incrementando la inhibición de la síntesis de aminoácidos aromáticos en estas plantas.

Así mismo Wagner, Kogan y Parada (2003) estudiando el efecto fitotóxico del glifosato en el maíz (*Zea mays* L.), evidenciaron un aumento en el peso húmedo en plantas cuya absorción radicular del herbicida fue menor a los 0.6 µg. La absorción del herbicida en cantidades mayores produjo efectos fitotóxicos como la inhibición del crecimiento y clorosis, demostrándose una respuesta bifásica sobre el sistema.

Según Urbizo (2011), los ejemplos anteriores indican que el concepto de hormesis es un fenómeno que ha sido documentado en plantas, siendo generalizable e

independiente de la especie, el fenómeno evidenciado y la clase de agente tóxico con el que se pruebe, por lo cual estudió el efecto hormético sobre el cultivo de caraota (*Phaseolus vulgaris*) en Guatemala, encontrando que la aplicación de dosis subletales del herbicida Paraquat produjo un aumento efectivo del área foliar de las plantas, atribuible a la hormesis puesto que, se evidenció un estímulo en los valores del Índice de Área Foliar (IAF) utilizado como parámetro biológico en el estudio, de igual modo, afirma que la presencia de la característica bifásica típica del fenómeno hormético, y el hecho de que ésta mostrase un poder estadístico significativo, demostró que la dosis-respuesta evidenciada fue debida a una estimulación real y no producto de la variabilidad normal en el parámetro biológico utilizado.

Belz y Duke (2014), afirmaron que la hormesis inducida a través de la utilización de bajas dosis de herbicidas en las plantas era un fenómeno real que debía ser tomado en cuenta en la agricultura. Sin embargo, Aclara que dicho fenómeno no ha sido aún del todo comprendido, asegurando que el mismo es el resultado de la interacción entre la exposición de las plantas a dosis bajas de herbicida y la influencia de diversos factores, por lo cual no podía considerarse al herbicida como el inductor directo del efecto hormético puesto que los resultados no son del todo consistentes para todas las situaciones y ambientes, lo cual afecta su estudio tanto en el laboratorio como en campo y por ende su utilización como estrategia comercial en la agricultura.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Material Vegetal**

Se utilizaron 16 materiales de maíz amarillo, los híbridos SK-5007, SK-5071, SK-5050, H-62A19, H-3005 y sus respectivos progenitores. Se utilizó como testigo susceptible tanto en campo como en laboratorio el híbrido P-3031. La identificación de los materiales en la parcela experimental, el tipo de cruce y la notación utilizada se muestran en el Cuadro 2, donde L= Línea Endocriada, H= Híbrido y T= tratamiento, siendo el P-3031 el testigo susceptible y el H-3005 el testigo tolerante.

**Cuadro 2. Identificación, tipo de material y notación del material vegetal utilizado en los ensayos de tolerancia de cultivares de maíz al nicosulfuron.**

	<b>Genotipo</b>	<b>Tipo de material</b>	<b>Parentesco</b>	<b>Notación en la Figura 2</b>
1	Madre SK-5007	Hibrido Simple	Madre de T3 (Igual a T4)	T1
2	Padre SK-5007	Hibrido Simple	Padre de T3	T2
3	SK-5007	Hibrido Doble	Híbrido Doble	T3
4	Madre SK-5050	Hibrido Simple	Madre de T6 (Igual A T1)	T4
5	Padre SK-5050	Línea Endocriada	Padre de T6 (Madre de T2)	T5
6	SK-5050	Híbrido Trilineal	Híbrido Trilineal	T6
7	Madre SK-5071	Línea Endocriada	Madre de T9 (Madre de T1 y T4)	T7
8	Padre SK-5071	Línea Endocriada	Padre de T9	T8
9	SK-5071	Hibrido Simple	Híbrido Simple	T9
10	Madre H-62A19	Hibrido Simple	Madre de T12	T10
11	Padre H-62A19	Hibrido Simple	Padre de T12	T11
12	H-62A19	Hibrido Doble	Híbrido Doble	T12
13	Madre H-3005	Hibrido Simple	Madre de T15	T13
14	Padre H-3005	Línea Endocriada	Padre de T15, (Madre de T11)	T14
15	H-3005	Hibrido Trilineal	Híbrido Trilineal	T15
16	P3031	Hibrido Doble	Híbrido Doble (Testigo)	T16

## **Evaluación del efecto de la aplicación de nicosulfuron en la fenología y productividad de progenitores e híbridos de maíz amarillo en campo**

### **Ubicación del ensayo**

La fase de campo se realizó en la parcela experimental de SEHIVECA, ubicada en la carretera Flor Amarillo-Guigue, asentamiento El Olivo, sector Flor Amarillo, Municipio Los Guayos, colindando con el Municipio Carlos Arvelo km 5, Estado Carabobo, coordenadas N 10°72'52"- W 67°57'52". La fase de laboratorio se realizó en 2 etapas, la primera de ellas en el Invernadero del Instituto de Agronomía, Laboratorio de Control de Malezas y la segunda en el Laboratorio de Genética Molecular-CIBA (Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola), ambos de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela, Maracay, Estado Aragua.

### **Siembra**

El suelo de la parcela experimental de SEHIVECA, se caracteriza por ser de textura franco arcillosa, pH alcalino (7,6), Calcio alto (6.200 ppm) y alta conductividad eléctrica (2,29 mmhos/cm). Después de la preparación del terreno, se efectuó la siembra en camellones, con 4 hileras de 6 m de longitud, separadas a 0,8 m, colocando 2 semillas por punto, a una distancia de 0,2 m entre plantas, con raleo a 1 planta por punto a los 15 días después de siembra.

### **Control de malezas**

Al momento de la siembra, se aplicaron los herbicidas pre emergentes DualGold® (metolaclo) y Triazol® (atrazina) en dosis de 2 y 2,5 l ha<sup>-1</sup> respectivamente. Posteriormente se efectuó control manual de la maleza, para eliminar los escapes.

## **Control de insectos plagas**

Se realizó una aplicación de Karate® (lambdacihalotrina) + Atabron® (clorfuazuron) a los 17 días después de la siembra (dds) a una dosis de 0,5 l ha<sup>-1</sup> y 0,5 l ha<sup>-1</sup>, respectivamente. Posteriormente a los 31 dds se aplicó Karate® a razón de 0,5 l ha<sup>-1</sup> y por último una aspersion con Lannate® (metomilo) a razón de 1,5 l ha<sup>-1</sup> a los 45 dds.

**Riego:** Por lo tardío de las lluvias, se complementó la humedad necesaria, con riego por surcos.

## **Fertilización**

Se aplicó fertilizante a los 17 días después de la siembra de fórmula 10:20:20 a razón de 400 kg ha<sup>-1</sup>. Se realizó un reabonamiento a los 30 días después de la siembra con 200 kg ha<sup>-1</sup> de fórmula 10:20:20 + 200 kg ha<sup>-1</sup> de urea perlada.

## **Diseño experimental**

Se utilizó un diseño experimental de tipo Alfa Lattice, con arreglo en parcelas divididas, donde las parcelas principales fueron:

- Parcela Principal 1: Sin aplicación de nicosulfurón.
- Parcela Principal 2: Aplicación de nicosulfurón (Dosis 37,5 g i.a. ha<sup>-1</sup>, Máxima recomendada por el fabricante).
- Parcelas Secundarias: Genotipos.

## **Parcela Experimental**

Constó de las 2 hileras centrales de 6 m de largo, separados a 0,8 m entre ellas (9,6 m<sup>2</sup>).

## Distribución en Campo

Los híbridos SK-5007, SK-5071, SK-5050, H-62A19, H-3005 y sus respectivos progenitores, además del testigo susceptible, fueron distribuidos en campo acorde al diseño experimental y arreglo escogido tal como se muestra en la Figura 3, donde la parcela principal 1 se representa como el área sombreada y la parcela principal 2 como el área sin sombrear. Adicionalmente, T representa a los genotipos y R a la repetición. La unidad experimental consta de 4 hileras de 6 m de largo cada una.

T3 (P32)	T7 (P31)	T13 (P30)	T12 (P29)	R1	T6 (P64)	T13 (P63)	T9 (P62)	T4 (P61)	R2	T9 (P96)	T16 (P95)	T13 (P94)	T5 (P93)	R3
T1 (P25)	T10 (P26)	T2 (P27)	T9 (P28)		T15 (P57)	T16 (P58)	T7 (P59)	T14 (P60)		T10 (P89)	T3 (P90)	T8 (P91)	T12 (P92)	
T15 (P24)	T11 (P23)	T6 (P22)	T8 (P21)		T5 (P56)	T8 (P55)	T12 (P54)	T1 (P53)		T4 (P88)	T1 (P87)	T11 (P86)	T14 (P85)	
T16 (P17)	T4 (P18)	T14 (P19)	T5 (P20)		T10 (P49)	T11 (P50)	T2 (P51)	T3 (P52)		T7 (P81)	T6 (P82)	T2 (P83)	T15 (P84)	
T16 (P16)	T15 (P15)	T14 (P14)	T13 (P13)		T11 (P48)	T6 (P47)	T8 (P46)	T1 (P45)		T13 (P80)	T15 (P79)	T3 (P78)	T11 (P77)	
T9 (P9)	T10 (P10)	T11 (P11)	T12 (P12)		T5 (P41)	T9 (P42)	T3 (P43)	T13 (P44)		T16 (P73)	T5 (P74)	T10 (P75)	T7 (P76)	
T8 (P8)	T7 (P7)	T6 (P6)	T5 (P5)		T15 (P40)	T7 (P39)	T4 (P38)	T12 (P37)		T2 (P72)	T14 (P71)	T1 (P70)	T6 (P69)	
T1 (P1)	T2 (P2)	T3 (P3)	T4 (P4)		T16 (P33)	T10 (P34)	T2 (P35)	T14 (P36)		T9 (P65)	T12 (P66)	T4 (P67)	T8 (P68)	

**Figura 3: Representación gráfica de la distribución utilizada en campo de los genotipos de maíz (*Zea mays* L), con un diseño en alfa lattice y arreglo en parcelas divididas**

## Aplicación del herbicida Nicosulfurón

El nicosulfurón (bajo el nombre comercial de Accent<sup>®</sup>) fue aplicado a los 24 días después de la siembra a una dosis de 37,5 g i.a. ha<sup>-1</sup> (dosis máxima recomendada por el fabricante del producto) para lo cual se utilizó una asperjadora de 16 l de capacidad, eléctrica de flujo constante tal y como se muestra en la Figura 4. Se realizó además un mejoramiento previo de la calidad del agua (control de pH) con

el producto conocido como Mamvert Optim pH<sup>®</sup>, cuya dosis fue de 20 cc / asperjadora



**Figura 4. Aplicación del herbicida nicosulfuron sobre los diversos genotipos de maíz (*Zea mays* L.) en campo**

### **Variables Evaluadas:**

A los 7, 14, 21 y 28 días después de aplicación (dda) del nicosulfurón, se evaluó la sintomatología visible de daño por sulfonilúreas, según una escala numérica que se desarrolló a partir de la escala de ALAM (1974), la cual puede observarse en el Cuadro 3. Esta nueva escala numérica utilizó como referencia la escala de ALAM (1974) para la valoración individual de plantas en vez de la parcela experimental en su totalidad. La apreciación visual de daño de cada planta se comparó con el número total de plantas de la parcela expresándose en porcentaje. De este modo, evaluaron los siguientes aspectos:

- a) Número de Plantas Totales (N°):** Número de plantas totales establecidas por tratamiento.
- b) Plantas sin síntoma visual de daño o No afectadas (N°):** Número de plantas que no presentaron ninguna sintomatología de daño por tratamiento.
- c) Plantas Levemente afectadas (N°):** Número de plantas que presentaron síntomas leves de afectación según la escala de ALAM utilizada (Cuadro 3) por tratamiento.
- d) Plantas Moderadamente afectadas (N°):** Número de plantas que presentaron síntomas moderados de afectación según la escala de ALAM utilizada (Cuadro 3) por tratamiento.

**e) Plantas Severamente Afectadas (N°):** Número de plantas que presentaron síntomas severos de afectación según la escala de ALAM utilizada (Cuadro 3) por tratamiento.

**f) Plantas Muertas (N°):** Número de plantas muertas por tratamiento.

**Cuadro 3. Escala de ALAM (1974). Daño al cultivo por el herbicida**

Índice	Denominación	Descripción del daño
0	Ningún Daño	Apariencia similar al testigo sin tratamiento
10		Leve clorosis, retardo en el crecimiento
20	Daño Leve	Leve clorosis, retardo en el crecimiento
30		Clorosis más pronunciada, aparición de mal formaciones y manchas cloróticas
40		Clorosis, necrosis y mal formaciones más pronunciadas, sin embargo el cultivo se recupera
50	Daño Moderado	Los síntomas son más marcados, el cultivo se recupera pero con dificultad
60		Se manifiesta la toxicidad, el cultivo no se desarrolla adecuadamente
70		Severo daño al cultivo, pérdida de plantas
80	Daño Severo	Muerte significativa de plantas, pocas sobreviven
90		Muerte casi total de las plantas
100	Muerte Total	Destrucción del cultivo

Fuente: ALAM, 1974.

Se realizó además un seguimiento semanal de la fenología del cultivo, a fin de observar la fecha de floración masculina y femenina, evaluándose las siguientes variables:

- **Fecha de Floración (Importante para las coincidencias en la producción de híbridos):** se registró en campo la fecha después de

siembra (dds) en la cual se alcanzó el 50 % de emisión de polen y la emisión de estigmas y se comparó con la información pre existente de cada cultivar.

- **Altura de Planta:** La cual se midió en campo, con cinta métrica, desde la superficie del suelo hasta la primera ramificación de la panícula.
- **Altura de Mazorca:** La cual se midió en campo, con cinta métrica, desde la superficie del suelo hasta la inserción del pedúnculo de la mazorca al tallo.
- **Diámetro del tallo:** Medido a cosecha, en campo, con un vernier en la mitad del segundo entrenudo desde la superficie del suelo.
- **Número de plantas cosechadas:** Se contabilizaron las plantas que llegaron a la fase de cosecha.
- **Número total de mazorcas:** Se contabilizó el número de mazorcas cosechadas por cultivar.
- **Número de hileras/mazorca:** Se contabilizó el número de hileras/mazorca de cada cultivar de forma manual en el Laboratorio de Calidad de la empresa SEHIVECA.
- **Número de granos/hilera:** Se contabilizó el número de granos/hilera/mazorca de cada cultivar, de forma manual en el Laboratorio de Calidad de la empresa SEHIVECA

- **Peso de mazorca:** Se utilizó una balanza electrónica para tomar el peso de las mazorcas cosechadas por cultivar antes del pesaje de grano.
- **Peso de grano al 12% de humedad:** Las mazorcas cosechadas fueron desgranadas por medio de una desgranadora eléctrica y su humedad medida a través de un determinador de humedad marca Steinlite en el laboratorio de calidad de SEHIVECA.

### **Análisis Estadístico:**

Con respecto al daño visual del herbicida, para cada fecha de observación el análisis se realizó según dos estrategias: Por una parte, con base en las categorías ALAM asignadas a cada parcela se realizó una prueba no paramétrica; mientras que por otra parte, se contabilizaron en campo el número de plantas para cada nivel de afectación de ALAM y se abordaron con una metodología paramétrica, para lo cual se calculó el Índice de Afectación (IA), utilizando una media ponderada. Luego de verificar el cumplimiento de los supuestos del análisis para dicho índice, se realizó un ANAVAR y la prueba de medias de Duncan.

Los datos relacionados con el desarrollo del cultivo y los componentes de rendimiento generados fueron tabulados en una hoja de cálculo de Excel. Se realizó el análisis de varianza según el diseño seleccionado para evidenciar los posibles efectos de la aplicación o no del herbicida, de los distintos genotipos y de la interacción genotipo x herbicida, a través del programa estadístico MSTATC versión 2.1. En aquellos donde se evidenciaron diferencias estadísticas significativas para la fuente de variación se realizó una prueba de comparación de medias de rangos múltiples de Duncan.

Los cuadrados medos esperados para el análisis de la varianza (ANAVAR) se presentan en el Cuadro 4.

**Cuadro 4. Cuadrados medios esperados para el análisis de la varianza utilizado para las variables de desarrollo del cultivo del maíz (*Zea mays* L.) en campo**

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Cuadrados Medios Esperados
Repetición (Rep)	(3-1) 2	$ECM \text{ Bloque} = \sigma^2 + b\sigma_{\omega}^2 + ab\sigma_r^2$
Parcela Principal (Pp)	(2-1) 1	$ECM \text{ PPal} = \sigma^2 + b\sigma_{\omega}^2 + br \frac{\sum_{i=1}^a \alpha_i^2}{a-1}$
Efecto de la interacción (Pp x Rep)	(1x 2) 2	$ECM \text{ ErrorPPal} = \sigma^2 + b\sigma_{\omega}^2$
Genotipos (gen)	(16-1) 15	$ECM \text{ Genotipo} = \sigma^2 + ar \frac{\sum_{j=1}^b \beta_j^2}{b-1}$
Interacción Pp x Gen	(1 x 15) 15	$ECM \text{ Genotipo} \times \text{PPal} = \sigma^2 + r \frac{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \alpha\beta_{ij}^2}{a-1 \quad b-1}$
Error	18	$ECM \text{ EE} = \sigma^2$
Total	48	

Para aquellas variables donde se obtuvo un efecto estadístico significativo para la interacción herbicida x genotipo, se calculó el índice de tolerancia a sequía (ITS), establecido por Fernández (1992), según la fórmula:  $ITS = Y_p * Y_s / Y_p^2$ , donde **Ys** = valor obtenido bajo condiciones de estrés hídrico, **Yp** = valor obtenido bajo condiciones de irrigación, **Ys** y **Yp** = Promedio de los valores experimentales de todos los genotipos creciendo bajo condiciones de estrés y sin estrés, respectivamente, **Yp<sup>2</sup>** = Promedio de los valores experimentales de todos los genotipos creciendo bajo condiciones de irrigación.

Al seleccionar por valores altos de ITS, se escoge indirectamente para mayor tolerancia al estrés y potencial de rendimiento alto. En la fórmula del ITS está incorporado el factor intensidad del estrés de Fishcher y Maurer (1978).

## **Confirmación tanto de la tolerancia como la susceptibilidad de progenitores de maíz amarillo al herbicida nicosulfuron mediante experimentos de respuesta a dosis.**

Se realizó en el invernadero del departamento e instituto de agronomía (Facultad de Agronomía) de la Universidad Central de Venezuela (UCV) y en el laboratorio de control de malezas de la misma institución.

### **Experimento de respuesta a dosis**

Con la finalidad de confirmar lo observado en campo, se escogieron los tratamientos T1 (tolerante) y T5 (susceptible) para la realización de un experimento de respuesta a dosis. Para ello se sembraron ambos genotipos en potes o macetas de plástico, a razón de 4 semillas por pote y se colocaron en el invernadero tal y como se muestra en la figura 5



**Figura 5. Siembra de genotipos de maíz (*Zea mays* L.) en invernadero.**

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado, a razón de 10 repeticiones por genotipo y 8 dosis de herbicida, donde la unidad experimental correspondió a una planta (envase plástico) para un total de 160 potes utilizados. Previo a la aplicación del herbicida se realizaron labores de entresaque y se dejó solo una planta por pote.



**Figura 6. Aplicación de nicosulfuron sobre genotipos de maíz (*Zea mays* L.) para el experimento de respuesta a dosis**

A los 18 días después de la siembra (dds), se aplicaron las diferentes dosis de herbicida en el laboratorio de malezas utilizando una cámara de aplicación de plaguicidas electrónica, la cual se calibró a una descarga de  $200 \text{ l ha}^{-1}$  a 250 kpa y disponía de una boquilla de abanico plano TeeJet 8002 (Figura 6). Las dosis utilizadas pueden ser observadas en el Cuadro 5, siendo la dosis comercial del herbicida representada con la letra, “x”):

**Cuadro 5. Dosis del herbicida nicosulfuron y tratamientos para el experimento de respuesta a dosis en genotipos de maíz (*Zea mays* L.)**

Tratamientos	Dosis	
	T1 (Tolerante)	T5 (Susceptible)
1	0x	0x
2	1/32x	1/32x
3	1/16x	1/16x
4	1/8x	1/8x
5	1/4x	1/4x
6	1/2x	1/2x
7	1x	1x
8	2x	2x

### **Variables Evaluadas:**

**Peso fresco (g):** a los 14 días después de aplicado el tratamiento, se cortaron las plantas a nivel del cuello y se pesaron en una balanza digital.

**Determinación del efecto de la dosis media ( $ED_{50}$ ):** se refiere a la dosis del herbicida que inhibe el 50% del crecimiento de las plantas tratadas en relación con las plantas sin aplicación de herbicida. Este cálculo se realiza mediante un análisis de regresión utilizando el programa Sigma Plot v. 12 (2014). Los valores de  $ED_{50}$  se calculan con base a la curva de respuesta a la dosis, utilizando el modelo logarítmico descrito por Striebig (1988) y Seefeldt *et al.*, (1995). Para ello se utiliza la siguiente ecuación (expresando la biomasa fresca como porcentaje de control y de la dosis X del herbicida):

$$Y = c + (d - c) / [1 + (x / ED_{50})^b]$$

Donde “Y” es el porcentaje de crecimiento, “c” es la respuesta media a la dosis de herbicida más alta, “d” es la respuesta media cuando la dosis de herbicida tiende a cero, “b” es la pendiente de la curva, el “ $ED_{50}$ ” es la dosis de herbicida en el punto de inflexión a mitad de camino entre c y d, y “x” es la dosis de herbicida.

El índice de tolerancia (IT) se determina dividiendo el  $ED_{50}$  de cada genotipo resistente sobre el valor de  $ED_{50}$  de cada genotipo susceptible, teniendo en cuenta que si el IT es mayor o igual a 2, el genotipo evaluado es tolerante al herbicida, debido a que para inhibir el 50% del crecimiento de las plantas necesitaríamos una dosis igual o superior al doble de la utilizada normalmente para lograr dicha inhibición. (Valverde *et al.*, 2000). El análisis de regresión se realizó utilizando el programa Sigma Plot v. 12 (2014).

## **Evaluación del efecto sinérgico o antagónico de la adición de inhibidores del complejo enzimático citocromo P450 monooxigenasa en un genotipo tolerante a nicosulfuron.**

### **Prueba de inhibición de la P450 monooxigenasa**

Se realizó un experimento sobre sinergismo de inhibidores del complejo enzimático citocromo P450 monooxigenasa, con el propósito de detectar si la tolerancia al herbicida nicosulfuron se basa en el metabolismo acelerado.

Con la finalidad de suprimir la tolerancia del genotipo mas tolerante al nicosulfuron observado en campo (identificado como T1, el cual es la madre del Híbrido doble SK-5007), se diseñó un ensayo de laboratorio con 5 tratamientos, el cual presentaba un testigo absoluto, un tratamiento solo con el herbicida nicosulfuron y tres tratamientos con herbicida + insecticida (dos fosforados y un carbamato). Estos últimos fueron aplicados en las siguientes dosis: 960 g i.a. ha<sup>-1</sup> de Clorpirifos (2 l.ha<sup>-1</sup> del insecticida Memphis<sup>®</sup>), 1.140 g i.a. ha<sup>-1</sup> de Malatión (2 l.ha<sup>-1</sup> de Malathion 57<sup>®</sup>) y finalmente 494 g i.a. ha<sup>-1</sup> de Metomilo (2 l.ha<sup>-1</sup> de Mecarmil S<sup>®</sup>).

Estos tres productos están reportados como inhibidores del citocromo P-450 y su uso tuvo por objeto, determinar con cuál de ellos se podría demostrar mejor la causa (metabólica o de otra naturaleza) de la tolerancia de ese cultivar al nicosulfuron (Gressel, 1990; Baerg *et al.*, 1996; Osuna *et al.*, 2002). La aplicación de los insecticidas se realizó a los 19 dds y fue seguida (24 horas después) por la del herbicida nicosulfuron a la dosis máxima recomendada por el fabricante (37,5 g i.a.h<sup>-1</sup>). Los tratamientos entonces quedaron definidos de la siguiente manera: Testigo sin herbicida, Nicosulfuron sin insecticida, Nicosulfuron + Malathion, Nicosulfuron + Clorpirifos y Nicosulfuron + Metomilo.

Tanto los insecticidas como el nicosulfuron utilizados en este estudio se asperjaron en una cámara de aplicación de plaguicidas electrónica, la cual se

calibró a una descarga de 200 l ha<sup>-1</sup> a 250 kpa y disponía de una boquilla de abanico plano TeeJet 8002. Tal y como se observa en la Figura 7



**Figura 7. Aplicación de inhibidores de P450 sobre un genotipo tolerante (T1) de maíz (*Zea mays* L.)**

A los 28 días después de la aplicación, se cortó la parte aérea de las plantas al ras del suelo y se pesó en una balanza digital. Los datos de peso fresco se vaciaron en una matriz de Excel, y se compararon por medio de una prueba de medias tal y como se muestra en la Figura 8



**Figura 8. Medición de peso fresco del genotipo tolerante (T1) de maíz (*Zea mays* L.) para el experimento de inhibición de P450**

Se efectuó la comparación con efectos “esperados” predichos por el modelo de Colby para detectar sinergismo o antagonismo en la aplicación de los herbicidas con malatión (Fischer, 2010). Se utilizó la fórmula:  $E = (100 - \text{Biomasa tratada} / \text{Biomasa testigo sin herbicida} \times 100)$ , donde se aplicará el análisis siguiente:

Si:

$E < \% \text{ control observado}$ : los efectos son mayores a lo esperado (sinergismo)

$E = \% \text{ de control observado}$ : no hay interacción

$E > \% \text{ de control observado}$ : el efecto es menos de lo esperado (antagonismo)

Se realizó un análisis de varianza para comprobar si hay un efecto significativo de la interacción en el experimento factorial (Fischer, 2010), los cuadrados medios esperados se muestran en el cuadro 7.

**Cuadro 6. Cuadrados medios esperados del ANAVAR para las variables del experimento de inhibición del P-450 (*Zea mays* L.) en invernadero**

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Cuadrados Medios
Repetición	(5-1)	$ECM(B) = \sigma^2 + a \frac{\sum_{j=1}^b \beta_j^2}{b-1}$
Tratamientos	(5-1)	$ECM B = \sigma^2 + acr \frac{\sum_{j=1}^b \beta_j^2}{b-1}$
Error	16	$ECM EE = \sigma^2$
Total	24	

## **Asociación de la tolerancia diferencial de progenitores e híbridos de maíz amarillo al herbicida nicosulfuron con marcadores moleculares tipo RAPD's.**

### **Marcadores Moleculares RAPD**

Se aplicaron 3 metodologías de extracción de ADN a partir de tejido foliar y tejido de semillas. Los procedimientos utilizados fueron los descritos por Doyle y Doyle (1987), considerando dos repeticiones por cada muestra, Barra *et al* (2012) y los descritos por el CIMMYT (2006). Luego de la verificación en geles de agarosa al 0,8% de la cantidad y calidad de ADN extraído (comparándolos con un patrón de referencia de ADN Lambda de concentración conocida), se decidió trabajar siguiendo la metodología del CIMMYT (2006) a partir de tejido foliar, cuyo procedimiento es descrito a continuación:

1. Macerado del tejido vegetal en un mortero con nitrógeno líquido.
2. Transferencia del tejido pulverizado a un tubo Eppendorf.
3. Se agregó 1 ml de solución amortiguadora CTAB.
4. Incubación durante 60 minutos agitando continuamente con suavidad (55 °C).
5. Retiro de los tubos de la incubadora, dejándolos enfriar y luego se adicionó 1ml de cloroformo etanol. Mezclado durante 10 minutos.
6. Centrifugado durante 10 minutos a 8000 rpm y 4 °C.
7. Retiro de 700 µl de la capa acuosa superior.
8. Adición de 10 mg/ml de ARNasa A. Mezcla, e incubación durante 30 minutos.
9. Se agregó 1 ml de isopropanol y mezclado posterior.
10. Centrifugado a 12.000 rpm por 15 minutos para precipitar el ADN.
11. Retiro de la capa de sobrenadante y secado del ADN a temperatura ambiente.
12. Resuspensión en 200 µl de TE.

El buffer de extracción utilizado fue el descrito por el CIMMYT (2006) y se muestra en el Cuadro 7:

**Cuadro 7. Buffer de extracción de ADN utilizado.**

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración Inicial</b>	<b>Concentración Final</b>	<b>50 ml</b>	<b>100 ml</b>
<b>Tris HCl</b>	1M	100mM	5 ml	10 ml
<b>NaCl</b>	2M	700mM	17,5 ml	35 ml
<b>EDTA</b>	0,5	50mM	5 ml	10 ml
<b>B-mercaptoetanol (99%)</b>	14 M	1%=140 mM	0,5 ml	1 ml
<b>CTAB</b>		1%	0,5 gr	1 gr

Fuente: CIMMYT (2006)

### **Amplificación de Fragmentos RAPDs por PCR**

Para la PCR se siguieron los procedimientos descritos por Hernández *et al.*, (2010). Las amplificaciones de los RAPD se realizaron con iniciadores de las series OPA, OPB, OPC y OPD (cuadro 8), provenientes de Operon Technologies Inc. (Alameda, CA, EEUU), en un termociclador PTC 200 i Cycler BIO-RAD, en las siguientes condiciones: Desnaturalización inicial 94°C por 5 minutos, seguida de 45 ciclos de amplificación a 94°C por 1 minuto, hibridación a 36°C por 30 segundos y extensión 72°C por 2 minutos. Se realizó un ciclo final de extensión a 72°C por 7 minutos.

**Cuadro 8. Iniciadores decaméricos de la serie Operón Technologies, utilizados para la aplicación de RAPD, a partir de ADN de tejido foliar, de progenitores e híbridos de maíz (*Zea mays* L.)**

Iniciador	Secuencia
OPA-02	5'-TGCCGAGCTG-3'
OPA-07	5'-GTCCCGACGA-3'
OPA-09	5'-GGGTAACGCC-3'
OPC-01	5'-TTCGAGCCAG-3'
OPC-02	5'-GTGAGGCGTC-3'
OPC-05	5'-GATGACCGCC-3'
OPC-07	5'-GTCCCGACGA-3'

La visualización de las bandas RAPD se realizó en geles de electroforesis de agarosa al 2%, en presencia de bromuro de etidio al 0,05%, durante 2 horas y media a 80 Voltios y 25mA. Los geles fueron visualizados en un transiluminador UV y fotografiados con un analizador de imágenes BIO-RAD. La identificación de los fragmentos de amplificación de RAPD se realizó a través del programa QuantityOne Gel Doc. Parte del procedimiento se muestra en la Figura 9:



**Figura 9. Parte del procedimiento de extracción de ADN y visualización de bandas de RAPD**

### **Análisis de los Datos**

Las bandas de ADN presentes en ambas repeticiones de RAPD de cada muestra, fueron consideradas para generar una matriz de presencia (1) o ausencia (0) de productos amplificados. Con dicha matriz se estudió:

### **Similitud genética**

A fin de observar las posibles relaciones genéticas entre los progenitores y sus descendientes. Se calculó el coeficiente de similitud de Jacard, a través de la fórmula:

$$Sd= a/(a+b+c),$$

Donde “a” corresponde al número de bandas comunes entre dos genotipos; y, “b” y “c”, representan el número de bandas presentes en un genotipo y ausentes en el otro (Díaz, 2005).

Finalmente, a partir de la matriz generada por el índice seleccionado, se obtuvo un dendrograma UPGMA (ligamiento promedio no ponderado), mediante el programa PAST, versión 1.60. Para el análisis de los resultados de la presencia de bandas, se realizó un análisis factorial de correspondencia múltiple (A.F.C.M.), por medio del programa PAST, versión 1.60.

### **Identificación de bandas RAPD asociadas a la tolerancia al herbicida nicosulfurón.**

A fin de esclarecer la posible asociación de cada banda RAPD con el nivel de tolerancia al nicosulfuron para cada banda, se agruparon los valores en dos grupos: presencia o ausencia de banda con respecto a las variables de campo índice de Afectación a los 7 y a los 14 días después de aplicación del herbicida, altura de planta, peso de mazorca y rendimiento. Con tal matriz se realizó un análisis de la varianza de una sola vía ( $\alpha=0,05$ ) para verificar la diferencia entre ambos tratamientos. Diferencias significativas para algunas de las variables entre la presencia o ausencia de una banda RAPD dada podrían revelar la posible asociación entre la banda y el comportamiento de tolerancia al herbicida.

## **RESULTADOS Y DISCUSION**

### **Evaluación del efecto de la aplicación de nicosulfuron en la fenología y productividad de progenitores e híbridos de maíz amarillo en campo**

Se realizaron los análisis estadísticos para generar tanto los ANAVAR como los cuadros de medias y agrupamientos de los datos generados por las diversas variables analizadas.

#### **Daño visual del herbicida**

Luego de la aplicación del herbicida nicosulfuron, se observó a los pocos días la aparición de clorosis y arrugamiento en las láminas de las hojas nuevas en expansión de varios de los materiales evaluados. Posteriormente se pudieron apreciar franjas amarillentas en el limbo foliar y/o clorosis en el centro de las láminas de las hojas. En algunos de los cultivares mas sensibles, se observaron coloraciones purpúrea en las hojas, así como un desaceleramiento del crecimiento de las plantas con posterior estrangulamiento y/o enrollamiento de las mismas.

La sintomatología visual de daño, observado en las plantas afectadas de los diferentes cultivares coinciden con lo reportado por Môro y Damião Filho (1999); O'Sullivan *et al.*, (2002) y Cavalieri *et al.*, (2008), como síntomas de fitotoxicidad para híbridos de maíz tratados con nicosulfuron.

Siguiendo la escala de ALAM se evaluó el daño visual a los 7, 14, 21 y 28 días después de la aplicación del nicosulfuron. Con dichas evaluaciones se realizó un análisis no paramétrico según la prueba de Kruskal-Wallis. En el Cuadro 9, se muestran las medias para cada genotipo y fecha, así como el estadístico de prueba *H*.

**Cuadro 9. Análisis no paramétrico del daño visual de la aplicación de nicosulfuron sobre progenitores e híbridos de maíz (*Zea mays* L.), en cuatro fechas de evaluación.**

Tratamiento	Genotipo	Daño visual a distintos días después de aplicación del herbicida (dda)							
		7dda (H=30,94 **)		14dda (H=36,34**)		21dda (H=33,35**)		28dda (H=31,26**)	
T1	<b>M-5007</b>	5	A	10	AB	0	A	0	A
T2	<b>P-5007</b>	20	CDE	20	CDE	20	BCD	10	ABC
T3	<b>H-5007</b>	10	ABC	10	ABC	10	ABC	5	AB
T4	<b>M-5050</b>	5	AB	0	A	0	A	0	A
T5	<b>P-5050</b>	40	E	70	E	80	D	90	C
T6	<b>H-5050</b>	10	ABC	10	ABCD	10	ABC	5	AB
T7	<b>M-5071</b>	10	ABC	10	ABC	0	A	0	A
T8	<b>P-5071</b>	10	ABC	20	CDE	5	AB	0	A
T9	<b>H-5071</b>	5	AB	0	A	0	A	0	A
T10	<b>M-62A19</b>	10	ABCD	10	ABC	10	ABC	10	ABC
T11	<b>P-62A19</b>	10	ABC	10	ABCD	10	ABC	0	A
T12	<b>H-62A19</b>	10	ABCD	10	ABCD	10	ABC	10	ABC
T13	<b>M-3005</b>	10	ABCD	20	CDE	10	ABC	10	ABC
T14	<b>P-3005</b>	10	AB	10	ABCD	0	A	0	A
T15	<b>H-3005</b>	10	ABCD	10	ABCD	10	ABC	10	ABC
T16	<b>Pioneer 3031</b>	30	DE	40	DE	30	CD	30	BC

Como se aprecia en el mencionado cuadro, para todas las fechas de observación se obtuvieron diferencias altamente significativas entre los parentales e híbridos. Tales diferencias se deben al comportamiento extremo del T5 (padre del híbrido SK-5050) así como del testigo Pioneer 3031, los cuales mostraron evidencias de una alta susceptibilidad al herbicida; teniendo en el caso de T5 la muerte total de las plantas mientras que el T16 a pesar de ser moderadamente afectado mostró cierta recuperación hacia le final del ciclo.

### **Índice de Afectación:**

El índice de Afectación fue calculado en función de una media ponderada, considerando el número de plantas contabilizadas para cada nivel de daño según la escala de ALAM (Cuadro 3).

**Cuadro 10. Cuadrados medios del Anavar del Índice de Afectación (I.A.) del cultivo por el herbicida nicosulfuron de acuerdo al genotipo en cuatro evaluaciones.**

Fuente de variación	Gl	I.A. 7 dda		I.A. 14 dda		I.A. 21 dda		I.A. 28 dda	
Repetición	2	0,556		0,024		0,055	n.s.	0,017	
Aplicación de herbicida (A)	1	45,121	*	10,172	**	10,401	**	9,716	**
Error	2	0,556		0,024		0,055		0,017	
Genotipos (B)	15	1,305	**	3,407	**	4,25	**	5,078	**
AxB	15	1,305	**	3,407	**	4,25	**	5,078	**
Error	60	0,204		0,008		0,04		0,056	
Total	95	49,047		17,042		19,051		19,962	
CV (%)		26,78		6,83		14,96		17,9	

Nota: \* y \*\* = diferencias significativas al 5 y 1 % respectivamente.

Dda= días después de la aplicación del herbicida

En el Anavar de cuadrados medios (Cuadro 10) se observó que para la variable Índice de Afectación (IA), se encontraron diferencias significativas y altamente significativas dependiendo de la fecha de evaluación, lo cual coincide con lo observado por Cavalieri *et al.*, 2008. En el campo, dichas diferencias fueron claramente visibles entre los diferentes genotipos, sobretodo en la primera y segunda evaluación, (Figura 10), lo cual justificó la comparación entre los diferentes materiales, observándose una gama de resultados que iban desde muerte de todas las plantas, hasta tratamientos aparentemente “inmunes” al herbicida.



**Figura 10. Distintos grados de afectación en diferentes genotipos de maíz (*Zea mays*) a lo largo de las semanas**

En el cuadro de medias, (Cuadro 11), observamos como los materiales evaluados se ubican en tres grupos a los 28 días después de la aplicación, a saber: T5 (altamente sensible), seguido por el material originalmente denominado testigo susceptible (T16) y luego un gran grupo más o menos uniforme donde se encuentran el resto de los materiales dado que estos lograron recuperarse de forma relativamente satisfactoria con el transcurso de los días.

**Cuadro 11. Índice de afectación (I.A.) del cultivo de maíz (*Zea mays* L.) por el herbicida nicosulfuron de acuerdo al genotipo en cuatro evaluaciones.**

T	Genotipos	Material	I.A. 7 dda		I.A. 14 dda		I.A. 21 dda		I.A. 28 dda	
			Media	Grupo	Media	Grupo	Media	Grupo	Media	Grupo
1	<b>M-5007</b>	HS	1,023	F	1,073	DEF	1	D	1	C
2	<b>P-5007</b>	HS	2	BC	1,455	C	1,373	C	1,2	C
3	<b>H-5007</b>	HD	1,424	CDEF	1,011	F	1,023	D	1,006	C
4	<b>M-5050</b>	HS	1,035	F	1	F	1	D	1	C
5	<b>P-5050</b>	LINEA	<b>2,667</b>	<b>A</b>	<b>4,057</b>	<b>A</b>	<b>4,356</b>	<b>A</b>	<b>4,704</b>	<b>A</b>
6	<b>H-5050</b>	HT	1,966	BCD	1,051	DEF	1,022	D	1,017	C
7	<b>M-5071</b>	LINEA	1,367	DEF	1,101	DEF	1	D	1	C
8	<b>P-5071</b>	LINEA	1,423	CDEF	1,147	DE	1,034	D	1	C
9	<b>H-5071</b>	HS	1,439	CDEF	1	F	1	D	1	C
10	<b>M-62A19</b>	HS	1,705	BCDE	1,034	EF	1,04	D	1,045	C
11	<b>P-62A19</b>	HS	1,931	BCD	1,114	DEF	1,034	D	1	C
12	<b>H-62A19</b>	HD	2	BC	1,056	DEF	1,01	D	1,118	C
13	<b>M-3005</b>	HS	2	BC	1,167	D	1,207	CD	1,196	C
14	<b>P-3005</b>	LINEA	1,129	EF	1,079	DEF	1	D	1	C
15	<b>H-3005</b>	HT	1,564	CDEF	1,117	DEF	1,139	CD	1,106	C
16	<b>P-3031</b>	HD	<b>2,298</b>	<b>AB</b>	<b>1,746</b>	<b>B</b>	<b>1,937</b>	<b>B</b>	<b>1,699</b>	<b>B</b>

Nota 1: dda: días después de aplicado el herbicida

Nota 2: Prueba Rangos Múltiples de Duncan al 5 %. Misma letra = no hay diferencias significativas

Nota 3: HS = Híbrido simple; HT = Híbrido trilineal; HD: Híbrido doble; Linea: Linea endocriada

El tratamiento identificado como T5 (Padre del híbrido SK-5050), resultó altamente afectado a la dosis comercial máxima de nicosulfuron ( $37,5 \text{ g i.a. ha}^{-1}$ ), observándose los efectos del herbicida desde la primera evaluación a los 7 días después de la aplicación (Figura 11). La sintomatología de daño observada, superaba a la del híbrido seleccionado como testigo susceptible del ensayo (híbrido P-3031, identificado como T16).

Finalmente, una vez analizados los resultados, el grado de afectación del material identificado como T5 (padre SK-5050) fue estadísticamente superior a todos los demás materiales, lo cual es un indicativo claro de una alta susceptibilidad de este genotipo al herbicida nicosulfuron, (Figura 11).



**Figura 11. Grado de afectación del genotipo susceptible (T5) a lo largo de las semanas**

El cultivar escogido como testigo susceptible e identificado como T16 (P-3031), fue el segundo material más afectado de todo el ensayo, mostrando un nivel de daño estadísticamente superior al resto de los materiales evaluados exceptuando al del T5. En las evaluaciones de campo, T16 mostró un nivel de afectación moderado en casi todas las evaluaciones, recuperándose de manera aceptable al avanzar el ciclo del cultivo. (Figura 12)



**Figura 12. Grado de afectación del genotipo testigo (T16) a lo largo de las semanas.**

El tratamiento 2, (P-5007), fue el tercer genotipo más afectado por la aplicación del herbicida, aunque también mostró recuperación favorable sobretodo hacia la cuarta evaluación (28 dda). Si observamos el agrupamiento luego del análisis de las medias (Cuadro 11), vemos como dicho material se ubica junto con el resto de los genotipos en un gran grupo de cultivares que mostraron buena tolerancia al herbicida (Exceptuando por supuesto, al T5 y T16).

Los genotipos T1 y T4, mostraron una aparente “inmunidad” al tratamiento con la dosis comercial máxima de nicosulfuron ( $37,5 \text{ g i.a. ha}^{-1}$ ), al punto tal de no mostrar en campo ningún síntoma de afectación en las primeras evaluaciones y posteriormente a medida que avanzaban las mismas, mostraron síntomas muy leves de afectación, de los cuales las plantas se recuperaron rápidamente.

### **Variables Vegetativas:**

Se logró un porcentaje de establecimiento de plantas superior al 95% en el campo, lo cual nos indica que el ensayo estuvo bien realizado y con la densidad de siembra adecuada, no ocurriendo fallas en la germinación de ninguno de los genotipos en las diferentes parcelas.

Se realizó el ANAVAR para las principales variables vegetativas evaluadas en el presente estudio. Los datos del mencionado ANAVAR y sus respectivos cuadrados medios se observan en el Cuadro 12:

**Cuadro 12. ANAVAR de cuadrados medios para las variables vegetativas de genotipos de maíz (*Zea mays* L.) evaluados en campo**

Fuente de variación	gl	Plantas cosechadas (N°)		Altura de planta (cm)		Altura mazorca (cm)		Diámetro del tallo (cm)	
Repetición	2	4,156	ns	617,556		327,638	ns	0,362	
Aplicación de herbicida (A)	1	201,26	**	3896,402	ns	1176	ns	53,7	ns
Error	2	0,948		750,611		272,416		15,403	
Genotipos (G)	15	329,083	**	8265,897	**	3245,654	**	67,619	**
AxG	15	318,349	**	2639,599	**	760,635	**	41,328	**
Error	60	2,108		88,674		53,524		1,03	
Total	95	855,904		16258,739		5835,867		179,442	
CV (%)		2,58		4,83		7,4		5	

Nota: \* y \*\* = diferencias significativas al 5 y 1 % respectivamente

### **Número de plantas cosechadas (N°)**

Para esta variable, las fuentes de variación, aplicación de herbicida, genotipos e interacción genotipo x herbicida, arrojaron diferencias altamente significativas, (Cuadro 12). Esto implica que existen diferencias entre los genotipos bajo estudio en cuanto al número de plantas que llegaron a cosecha en función de la aplicación o no del herbicida. Este hecho se corresponde con lo observado en campo, donde la aplicación del nicosulfuron afectó ostensiblemente el número de plantas cosechadas, particularmente al genotipo identificado como T5 (donde ninguna planta llegó a cosecha).

Si observamos el cuadro de medias (Cuadro 13) vemos como aparentemente en el promedio simple no existe una gran diferencia entre el número de plantas con y sin herbicida (menos de 1 planta) ello se debe a que este promedio fue calculado sin incluir el tratamiento 5, donde tal y como podemos observar en el Cuadro 13 y en la Figura 13, la aplicación del herbicida eliminó todas las plantas, no llegando

ninguna de estas a la fase de cosecha, con lo cual quedó demostrada la alta susceptibilidad al nicosulfuron de este genotipo.

**Cuadro 13. Plantas cosechadas por genotipo evaluado de maíz (*Zea mays* L.) con y sin nicosulfuron en campo.**

T	Genotipos	Tipo de Material	Plantas cosechadas (N°)			
			Con herbicida	Grupo	Sin herbicida	Grupo
1	<b>M-5007</b>	HS	58,3	ABCDEF	58,7	ABCDE
2	<b>P-5007</b>	HS	59,0	ABCD	57,0	CDEFG
3	<b>H-5007</b>	HD	58,7	ABCDE	59,0	ABCD
4	<b>M-5050</b>	HS	57,7	ABCDEFG	57,7	ABCDEFG
5	<b>P-5050</b>	LINEA	0,0	H	57,3	BCDEFG
6	<b>H-5050</b>	HT	59,0	ABCD	59,0	ABCD
7	<b>M-5071</b>	LINEA	58,0	ABCDEFG	57,7	ABCDEFG
8	<b>P-5071</b>	LINEA	58,7	ABCDE	55,7	G
9	<b>H-5071</b>	HS	59,7	AB	60,0	A
10	<b>M-62A19</b>	HS	58,3	ABCDEF	56,7	DEFG
11	<b>P-62A19</b>	HS	57,3	BCDEFG	59,3	ABC
12	<b>H-62A19</b>	HD	59,0	ABCD	58,0	ABCDEFG
13	<b>M-3005</b>	HS	59,3	ABC	58,3	ABCDEF
14	<b>P-3005</b>	LINEA	58,0	ABCDEFG	56,3	EFG
15	<b>H-3005</b>	HT	58,7	ABCDE	57,0	CDEFG
16	<b>P-3031</b>	HD	57,7	ABCDEFG	56,0	FG
T	<b>Promedio</b>		<b>58,5</b>		<b>57,8</b>	

**Nota 1: No se incluyó el T5 en el promedio por muerte total de plantas con nicosulfuron**

**Nota 2: Prueba Rangos Múltiples de Duncan al 5 %. Misma letra = no hay diferencias significativas**

**Nota 3: HS = Híbrido simple; HT = Híbrido trilineal; HD: Híbrido doble; Linea: Linea endocriada**

Al efectuar el análisis de agrupamiento de medias, se encontraron 2 grupos bien diferenciados, comenzando por el conformado exclusivamente por el T5 que tuvo muerte total de las plantas mientras que el resto de los genotipos se encuentran en un gran grupo en el que pueden diferenciarse al menos 3 subgrupos en función del número de plantas que llegaron a cosecha. Sin embargo, ello no permitió

establecer diferencias entre los niveles de tolerancia de los cultivares del mencionado grupo al nicosulfuron.



**Figura 13. Genotipo susceptible (T5) en campo a los 28 dda de nicosulfuron**

### **Altura de Planta (cm)**

La variable altura de planta mostró en el ANAVAR para los cuadrados medios (Cuadro 12), que tanto los genotipos como la interacción genotipo x herbicida, presentaban diferencias altamente significativas, lo cual se reflejó en lo observado en el cuadro 14 de medias y su agrupamiento. En promedio, existió una cierta disminución de la altura entre aquellos cultivares a los que se les aplicó nicosulfuron en relación a los que no recibieron aplicación (aunque esta diferencia no es significativa). Por otra parte, es necesario saber, que la razón de las diferencias observadas entre genotipos, es debida a su origen (tipo de híbrido, línea, entre otros), y no al herbicida.

Llaman la atención algunos casos donde pareciera que la acción del herbicida contribuyó a un aumento en la altura de las plantas, lo cual sería indicativo de una posible respuesta metabólica de la planta a la acción del herbicida. Por todo lo anteriormente mencionado, en este caso tiene más sentido comparar genotipo por genotipo entre el tratado con nicosulfuron y aquel que no tuvo aplicación.

Aunque las diferencias generales promedio entre las parcelas principales con y sin nicosulfuron no fueron importantes (de 203,6 disminuyó a 201,2), en producción de semillas es necesario considerar las alturas de las madres y los padres de los híbridos, pues eso puede afectar la calidad de la polinización. En nuestro caso, al aplicar el herbicida, la mayoría de los progenitores paternos resultaron más altos

que los maternos (lo cual es una característica deseable), aumentando la relación de altura sobre la madre, con excepción del híbrido SK-5071, donde el padre sufre una pequeña pérdida de altura, aunque a pesar de ello, sigue siendo más alto que la madre.

**Cuadro 14. Altura de planta por genotipo de maíz (*Zea mays* L.) evaluado en campo con y sin nicosulfuron.**

T	Genotipos	Tipo de Material	Altura de planta (cm)			
			Con herbicida	Grupo	Sin herbicida	Grupo
1	M-5007	HS	199	EF	206,3	BCDEF
2	P-5007	HS	218,6	ABCD	215,6	ABCDE
3	H-5007	HD	216,5	ABCDE	205,3	BCDEF
4	M-5050	HS	203,4	CDEF	206,3	BCDEF
5	P-5050	LINEA	0	I	166,3	G
6	H-5050	HT	195,4	F	210,8	BCDEF
7	M-5071	LINEA	132,6	H	136,3	H
8	P-5071	LINEA	165,6	G	175,9	G
9	H-5071	HS	197	F	209,8	BCDEF
10	M-62A19	HS	194,5	F	195,2	F
11	P-62A19	HS	215,7	ABCDE	210,6	BCDEF
12	H-62A19	HD	223,4	AB	220,9	ABC
13	M-3005	HS	206,8	BCDEF	222,7	AB
14	P-3005	LINEA	208,1	BCDEF	201,2	DEF
15	H-3005	HT	218,8	ABCD	205,7	BCDEF
16	P-3031	HD	221,9	ABC	232,1	A
T	Promedio		201,2		203,6	

**Nota 1: No se incluyó el T5 en el promedio por muerte total de plantas con nicosulfuron**

**Nota 2: Prueba Rangos Múltiples de Duncan al 5 %. Misma letra = no hay diferencias significativas**

**Nota 3: HS = Híbrido simple; HT = Híbrido trilineal; HD: Híbrido doble; Linea: Linea endocriada**

Las respuestas de esta variable en relación al tratamiento con nicosulfuron y otras sulfonilureas no ha presentado una tendencia uniforme a través de los años, tal y como lo demuestran los trabajos de Sikkema *et al.*, (2008), quienes reportaron que la aplicación de la sulfonilurea halosulfuron no ocasionó pérdidas de altura de

planta significativas en 8 híbridos de maíz dulce. Resultados similares fueron observados por Spader y Vidal (2001) y Spader y Antonazzi (2006), sobre diferentes híbridos de maíz en dosis que variaban desde los 30 a los 80 g.i.a. h<sup>-1</sup>.

Por otro lado, Robinson *et al.*, 1993; Damião Filho *et al.*, (1996); O'Sullivan *et al.*, 2000 y Cavalieri *et al.*, (2008), luego de realizar estudios con diferentes cultivares utilizando el mismo rango de dosis (30 a los 80 g.i.a. h<sup>-1</sup>), afirman que a medida que se aumenta la dosis de nicosulfuron, la altura de las plantas disminuye de forma significativa, con lo cual aseguran que las sulfonilureas tienen el potencial de disminuir la altura de las plantas tratadas en relación con las no tratadas en al menos el 99% de los casos.

### **Altura de Mazorca (cm)**

En el cuadro de ANAVAR de los cuadrados medios para esta variable (Cuadro 12), se observa que los genotipos y su interacción con el herbicida presentan diferencias altamente significativas; mientras que en el cuadro de medias y agrupamiento (Cuadro 15), observamos que existen ciertas diferencias entre los genotipos para la altura promedio de mazorca (incluso teniendo en cuenta que este cálculo promedio fue realizado sin incluir el T5, el cual fue destruido completamente por el herbicida).

Esto coincide con lo observado en la variable anterior donde se apreciaron algunas diferencias en relación con la aplicación o no del herbicida (no significativas). Las diferencias observadas entre genotipos son atribuibles al tipo de material (línea, híbrido simple, trilineal o doble), y no al efecto del herbicida.

En cuanto a las variaciones dentro del mismo genotipo (comparando con y sin nicosulfuron), estas no fueron muy significativas (nunca superaron los 20 cm) siendo poco probable que afecten la calidad de la polinización en la producción de semilla de estos cultivares, bajo las condiciones del presente estudio.

**Cuadro 15. Altura de mazorca de maíz (*Zea mays* L.) por genotipo evaluado en campo con y sin nicosulfuron.**

T	Genotipos	Tipo de Material	Altura de mazorca (cm)			
			Con herbicida	Grupo	Sin herbicida	Grupo
1	M-5007	HS	88,73	K	91,5	JK
2	P-5007	HS	105,6	DEFGHI	108	CDEFG
3	H-5007	HD	114,2	BCDE	107,4	CDEFGH
4	M-5050	HS	96,8	GHIJK	95,5	HIJK
5	P-5050	LINEA	0	M	87,13	K
6	H-5050	HT	105,2	DEFGHI	114,9	BCD
7	M-5071	LINEA	44,13	L	45,83	L
8	P-5071	LINEA	86,47	K	94,67	IJK
9	H-5071	HS	98,17	GHIJK	108,6	CDEFG
10	M-62A19	HS	112,9	CDEF	112,5	CDEF
11	P-62A19	HS	105	DEFGHI	104,3	DEFGHI
12	H-62A19	HD	125,7	AB	118,9	ABC
13	M-3005	HS	111,6	CDEF	127,8	A
14	P-3005	LINEA	101,2	FGHIJ	98,27	GHIJK
15	H-3005	HT	114,4	BCDE	102,9	EFGHIJ
16	P-3031	HD	115,6	BCD	119,4	ABC
T	Promedio		101,7		103,4	

Nota 1: No se incluyó el T5 en el promedio por muerte total de plantas con nicosulfuron

Nota 2: Prueba Rangos Múltiples de Duncan al 5 %. Misma letra = no hay diferencias significativas

Nota 3: HS = Híbrido simple; HT = Híbrido trilineal; HD: Híbrido doble; Línea: Línea endocriada

### **Diámetro del Tallo (mm)**

En el cuadro de ANAVAR (Cuadro 12), podemos observar que las fuentes de variación genotipos e interacción genotipo x herbicida presentan diferencias altamente significativas, lo cual implica que en función de las características de cada material y su respuesta a la aplicación del nicosulfuron existe una cierta variación en los valores de esta variable.

En el cuadro de medias (Cuadro 16) y su agrupamiento observamos que existen diferencias entre los genotipos, atribuibles al tipo de material (línea endocriada, híbrido). Destaca una vez más y en correspondencia con lo observado en las variables anteriores el hecho de que los valores promedio de diámetro de tallo disminuyeron como respuesta a la dosis de herbicida aplicada. Sin embargo, algunos materiales como el SK-5007 evidenciaron un aumento en el valor tanto de esta como de otras variables al recibir la aplicación del nicosulfuron.

**Cuadro 16. Diámetro del tallo por genotipo de maíz (*Zea mays* L.) evaluado en campo con y sin nicosulfuron.**

T	Genotipos	Tipo de Material	Diámetro del tallo (mm)			
			Con herbicida	Grupo	Sin herbicida	Grupo
1	M-5007	HS	20,87	EFGH	20,97	EFGH
2	P-5007	HS	21,57	CDEFG	21,93	BCDEF
3	H-5007	HD	23,13	ABC	21,53	CDEFG
4	M-5050	HS	21,33	DEFG	20,87	EFGH
5	P-5050	LINEA	0	L	20,73	EFGHI
6	H-5050	HT	21,9	BCDEF	24,17	A
7	M-5071	LINEA	16,83	K	18,7	J
8	P-5071	LINEA	15,73	K	15,77	K
9	H-5071	HS	20,5	FGHI	19,4	HIJ
10	M-62A19	HS	20,1	GHIJ	20,9	EFGH
11	P-62A19	HS	21,33	DEFG	23,53	AB
12	H-62A19	HD	22,23	BCDE	22,07	BCDEF
13	M-3005	HS	19,2	IJ	19,4	HIJ
14	P-3005	LINEA	22,93	ABCD	22,03	BCDEF
15	H-3005	HT	21,1	EFG	21	EFGH
16	P-3031	HD	24,2	A	23,9	A
T	Promedio		20,9		21,1	

**Nota 1: No se incluyó el T5 en el promedio por muerte total de plantas con nicosulfuron**

**Nota 2: Prueba Rangos Múltiples de Duncan al 5 %. Misma letra= no hay diferencias significativas**

**Nota 3: HS = Híbrido simple; HT = Híbrido trilineal; HD: Híbrido doble; Linea: Línea endocriada**

Aunque la disminución observada en algunos genotipos particulares luego de la aplicación del nicosulfuron pudiera debilitar un poco el tallo, no parece ser lo suficientemente significativa como para aumentar el acame de este, por lo cual, la producción de semillas no debería verse afectada.

El análisis de esta variable no permitió una clara diferenciación entre cultivares susceptibles y tolerantes al herbicida

### **Variables de Floración**

#### **Días a floración masculina y femenina (dds):**

En los sistemas de producción de semilla híbrida, es una práctica común verificar las fechas de siembra del progenitor masculino y el progenitor femenino, con la finalidad de asegurar una fecundación efectiva que maximice la producción de semilla.

Según las características de los materiales, las fechas de siembra son determinadas de forma tal de garantizar que la emisión de al menos 50% de polen del progenitor masculino, coincida con la emergencia del 50 % de los estigmas o barbas por parte del progenitor femenino. De esta forma, se asegura la polinización de las barbas de la base de la mazorca, sin poner en riesgo las del ápice de la misma. Cualquier variación en dicha relación pudiera provocar fallas en la producción de semilla, a menos que el progenitor masculino sea un excelente polinizador y el movimiento de días no sea extremo.

En el Cuadro 17 se muestra el ANAVAR para las variables “días a floración masculina” y “días a floración femenina”, en el cual observamos como la fuente de variación “aplicación del herbicida” arrojó diferencias significativas para ambas variables, mientras que “genotipos” y la “interacción genotipo x herbicida” se revelaron altamente significativas para ambas variables.

**Cuadro 17. ANAVAR de cuadrados medios para la floración masculina y femenina de genotipos de maíz (*Zea mays* L.) evaluados en campo**

Fuente de variación	gl	Días a floración masculina		Días a floración femenina	
Repetición	2	2,073		4,448	
Aplicación de herbicida (A)	1	442,042	*	477,042	*
Error	2	15,823		25,51	
Genotipos (G)	15	3027,656	**	388,286	**
AxG	15	425,131	**	415,019	**
Error	60	1,27		1,59	
Total	95	3913,995		1311,895	
CV (%)		2,09		2,03	

**Nota: \* y \*\* = diferencias significativas al 5 y 1 % respectivamente**

En el Cuadro 18, se muestran los valores de los días promedio de floración masculina por genotipo evaluado, (con y sin nicosulfuron), con su respectivo agrupamiento. En el Cuadro 19, se muestran los días promedio de floración femenina por genotipo evaluado (con y sin nicosulfuron), también con su respectivo agrupamiento. Aunque a primera vista pareciera no observarse ningún cambio importante en las fechas de floración masculina y femenina (Cuadros 18 y 19) el análisis individual por genotipo muestra diferencias importantísimas a tener en cuenta para la producción de semilla híbrida de algunos genotipos, las cuales se describen a continuación:

- 1) El material identificado como T5, (Padre SK-5050), resultó severamente afectado por la aplicación de nicosulfuron, observándose la muerte de la totalidad de las plantas. Ello implica que en una siembra de producción de semilla híbrida donde se utilice este material como padre (por ejemplo en la producción del híbrido SK-5050) no habría forma de producir tan siquiera una semilla del cruzamiento ya que el mismo es altamente susceptible al Nicosulfuron. Su nivel de susceptibilidad es tal, que no se recomendaría ni

siquiera en aplicaciones dirigidas, pues a dosis de 1/32 de nicosulfuron el daño sobre esta línea endocriada todavía es significativo.

**Cuadro 18. Floración masculina por genotipo de maíz (*Zea mays* L.) evaluado en campo con y sin nicosulfuron.**

T	Genotipos	Tipo de Material	Floración masculina (dds)*			
			Con herbicida	Grupo	Sin herbicida	Grupo
1	M-5007	HS	64,67	CD	65,00	64,67
2	P-5007	HS	63,67	CDEFG	63,33	63,67
3	H-5007	HD	62,00	GHI	63,33	62,00
4	M-5050	HS	64,33	CDE	65,00	64,33
5	P-5050	LINEA	0,00	J	67,33	0,00
6	H-5050	HT	64,00	CDEF	62,67	64,00
7	M-5071	LINEA	67,67	B	68,33	67,67
8	P-5071	LINEA	70,33	A	68,67	70,33
9	H-5071	HS	63,33	CDEFGH	62,33	63,33
10	M-62A19	HS	0,00	J	0,00	0,00
11	P-62A19	HS	62,00	GHI	62,33	62,00
12	H-62A19	HD	62,00	GHI	62,67	62,00
13	M-3005	HS	0,00	J	0,00	0,00
14	P-3005	LINEA	61,67	HI	63,00	61,67
15	H-3005	HT	61,00	I	62,00	61,00
16	P-3031	HD	62,33	FGHI	61,67	62,33
T	Promedio		55,27		55,36	

**Nota 1:** dds: días después de siembra

**Nota 2:** No se incluyó el T5 en el promedio por muerte total de plantas con nicosulfuron

**Nota 3:** Prueba Rangos Múltiples de Duncan al 5 %. Misma letra = no hay diferencias significativas

**Nota 4:** HS = Híbrido simple; HT = Híbrido trilineal; HD: Híbrido doble; Linea: Línea endocriada

**Cuadro 19. Floración femenina por genotipo de maíz (*Zea mays* L.) evaluado en campo con y sin nicosulfuron.**

T	Genotipos	Tipo de Material	Floración femenina (dds)			
			Con herbicida	Grupo	Sin herbicida	Grupo
1	M-5007	HS	66,00	DEF	66,00	DEF
2	P-5007	HS	63,33	GHIJK	63,33	GHIJK
3	H-5007	HD	61,67	JKL	63,67	GHIJ
4	M-5050	HS	65,33	DEFG	66,33	CDE
5	P-5050	LINEA	0,00	M	66,67	CD
6	H-5050	HT	63,67	GHIJ	62,33	HIJKL
7	M-5071	LINEA	68,33	BC	69,00	AB
8	P-5071	LINEA	70,67	A	69,00	AB
9	H-5071	HS	64,33	EFGH	63,33	GHIJK
10	M-62A19	HS	62,00	IJKL	64,00	FGHI
11	P-62A19	HS	64,00	FGHI	64,00	FGHI
12	H-62A19	HD	61,33	KL	63,00	HIJKL
13	M-3005	HS	62,00	IJKL	61,33	KL
14	P-3005	LINEA	61,67	JKL	63,33	GHIJK
15	H-3005	HT	61,00	L	62,33	HIJKL
16	P-3031	HD	63,33	GHIJK	62,33	HIJKL
T	Promedio		63,91		64,22	

**Nota 1:** dds: días después de siembra

**Nota 2:** No se incluyó el T5 en el promedio por muerte total de plantas con nicosulfuron

**Nota 3:** Prueba Rangos Múltiples de Duncan al 5 %. Misma letra = no hay diferencias significativas

**Nota 4:** HS = Híbrido simple; HT = Híbrido trilineal; HD: Híbrido doble; Linea: Linea endocriada

- 2) En el caso de los padres del híbrido H-3005, (T13 y T14), la aplicación del nicosulfuron provocó una pérdida parcial de la sincronización en la floración de los padres; observándose un adelanto en la fecha de floración masculina del progenitor padre (T14) en 1,3 días y, al mismo tiempo, un atraso en la emisión de barbas de la madre (T13) de 0,7 días.

En una siembra comercial de semilla, esto provocaría que la coincidencia planificada originalmente entre la emisión de polen del padre y la

emergencia de barbas de la madre exista una separación de hasta 2 días (Figura 14), con lo cual pudieran ocurrir fallas en la polinización del ápice de la mazorca, ocasionando pérdidas de rendimiento en la producción del híbrido, mas aún si el progenitor masculino es afectado en forma tal que disminuya la cantidad de polen producido.

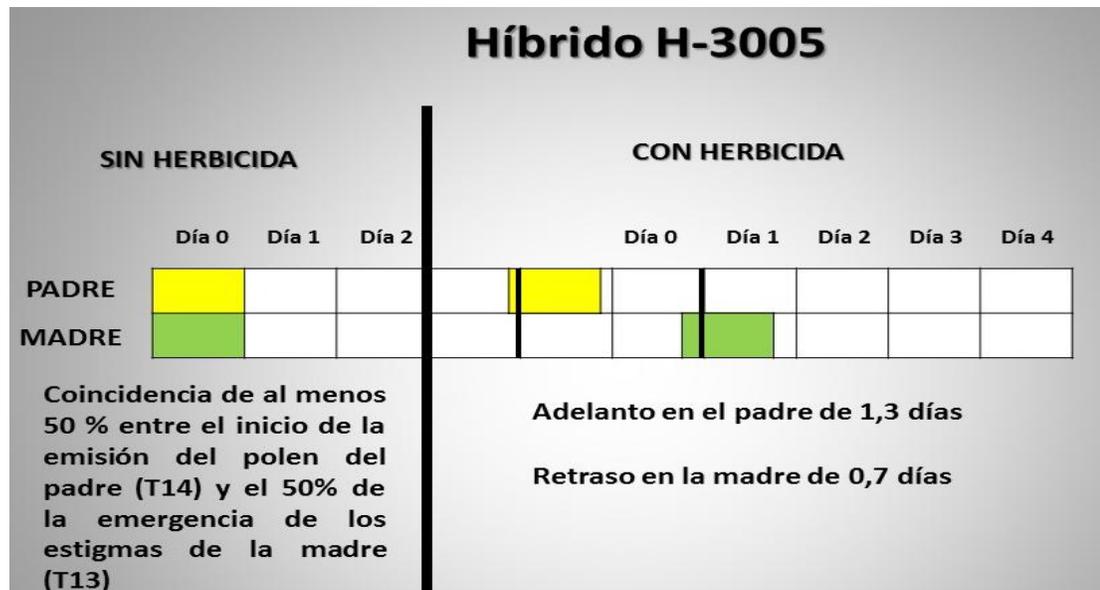
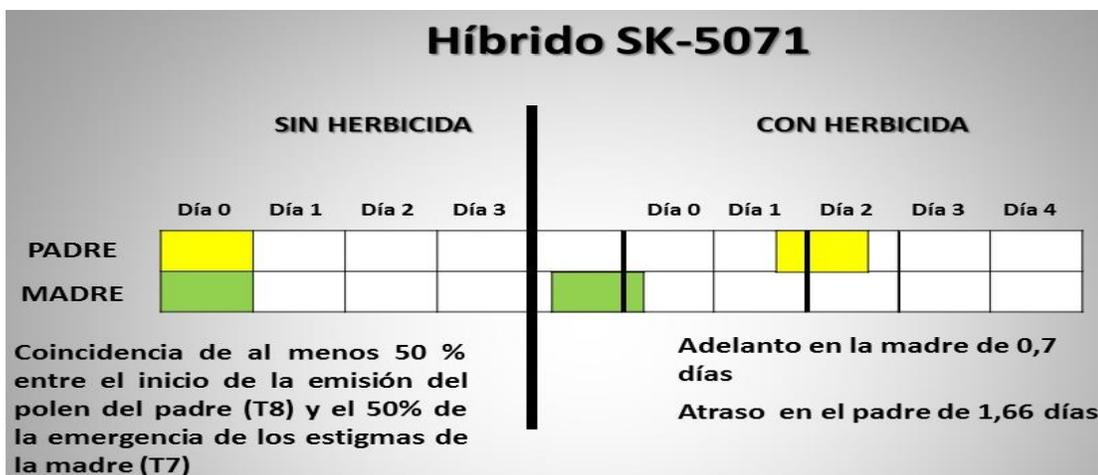


Figura 14. Variación en los días a floración masculina y femenina de los genotipos T13 y T14 de maíz (*Zea mays* L.)

- 3) En los tratamientos T7 y T8, (padres del híbrido SK-5071), la situación es la contraria al caso anterior. El progenitor masculino (T8) se atrasa 1,66 días, y el femenino (T7), se adelanta en 0,7 días, con lo cual tendríamos una separación entre la floración de ambos progenitores de 2,33 días, en lugar de la coincidencia planificada originalmente antes de la siembra. Esto implicaría que los estigmas estarían aflorando casi dos días y medio antes de iniciarse la emisión del polen. Esto podría causar fallas en la polinización del ápice de la mazorca, afectando la fecundación y por ende la cantidad de semillas producida (Figura 15).



**Figura 15. Variación en los días a floración masculina y femenina de los genotipos T7 y T8 de maíz (*Zea mays* L.)**

- 4) Los tratamientos T10 y T11 (padres del híbrido H-62A19), se comportaron de manera similar a la descrita en el punto 3.
- 5) El resto de los genotipos evaluados fueron menos afectados y, en algunos casos, las relaciones de siembra se mantuvieron muy similares a las originales, es decir, se movieron de forma similar las fechas de emisión de polen de los progenitores masculinos y la emisión de barbas (estigmas) de los progenitores femeninos, con lo cual pudiera decirse que esta variable no se vería afectada con la aplicación del herbicida.

Estos resultados indican que para que ocurra una polinización adecuada, el productor de semillas debería realizar ajustes en las fechas de siembras de los progenitores (de ser necesario y en función a los cultivares a sembrar), para así compensar los movimientos en las fechas de floración.

### **Variables asociadas a los componentes del rendimiento de maíz**

En el Cuadro 20, se presentan los ANAVAR de cuadrados medios para las variables N° de mazorcas, N° de hileras por mazorca y N° de granos por hilera de mazorca, variables consideradas indicadores de productividad en maíz.

**Cuadro 20. ANAVAR de cuadrados medios para el número de mazorcas, número de hileras / mazorca y número de granos por mazorca de genotipos de maíz (*Zea mays* L.) evaluados en campo.**

Fuente de variación	gl	Mazorcas (N°)		Hileras/ mazorca (N°)		Granos/hilera por mazorca (N°)	
Repetición	2	14,76	ns	0,335	ns	29,32	ns
Aplicación de herbicida (A)	1	326,344	*	16,834	*	46,621	ns
Error	2	4,344		0,18		13,543	
Genotipos (G)	15	364,833	**	21,306	**	348,879	**
AxG	15	409,522	**	17,929	**	75,429	**
Error	60	10,652		0,241		2,612	
Total	95	1130,455		9,4708		516,404	
CV (%)		<b>5,63</b>		<b>3,62</b>		<b>4,75</b>	

Nota: \* y \*\* = diferencias significativas al 5 y 1 % respectivamente

### **Número de mazorcas por tratamiento (N°)**

Para esta variable, el ANAVAR de cuadrados medios muestra valores significativos y altamente significativos para las fuentes de variación aplicación de herbicida, genotipos e interacción genotipo x herbicida. Esto puede explicarse debido a que en el tratamiento identificado como T5, no sobrevivió ninguna planta con lo cual el valor fue cero (0).

Si al analizar el cuadro de medias y su respectivo agrupamiento (Cuadro 21), calculamos un promedio simple de las mazorcas cosechadas (excluyendo al T5, para no desviar en exceso el promedio), observamos como las diferencias entre los tratamientos con y sin herbicida son muy pequeñas. Sin embargo, al analizar individualmente tenemos el caso del T16 (originalmente escogido como testigo susceptible), el cual reflejó una disminución del número de mazorcas promedio cosechadas en el tratamiento con herbicida de 5 mazorcas aproximadamente, en relación al tratamiento sin herbicida, confirmando lo observado en campo y lo arrojado por los resultados de las variables anteriormente estudiadas en relación a la susceptibilidad y afectación de este material.

Adicionalmente, observamos algunos casos donde el comportamiento en el tratamiento con herbicida fue superior en relación al tratamiento sin herbicida (mostrando un aumento en el número de mazorcas). Estos valores parecieran corresponder con el fenómeno conocido como hormesis, en el cual dosis sub letales de un herbicida pudieran incrementar los rendimientos de algunas especies como respuesta metabólica para restablecer la homeostasis del sistema Calabrese y Baldwin (1998).

**Cuadro 21. Mazorcas cosechadas por genotipo de maíz (*Zea mays* L.) evaluado en campo con y sin nicosulfuron.**

T	Genotipos	Tipo de Material	Mazorcas cosechadas (N°)			
			Con herbicida	Grupo	Sin herbicida	Grupo
1	M-5007	HS	57,67	FGHIJ	57,00	GHIJ
2	P-5007	HS	60,33	CDEFGHI	59,00	DEFGHIJ
3	H-5007	HD	63,00	ABCDE	63,67	ABCD
4	M-5050	HS	58,00	EFGHIJ	58,00	EFGHIJ
5	P-5050	LINEA	0,00	M	65,00	ABC
6	H-5050	HT	61,33	BCDEFGH	61,00	BCDEFGH
7	M-5071	LINEA	56,67	GHIJ	55,67	IJK
8	P-5071	LINEA	57,00	GHIJ	50,67	KL
9	H-5071	HS	60,33	CDEFGHI	62,33	ABCDEF
10	M-62A19	HS	64,67	ABC	62,67	ABCDEF
11	P-62A19	HS	61,33	BCDEFGH	63,00	ABCDE
12	H-62A19	HD	62,33	ABCDEF	60,33	CDEFGHI
13	M-3005	HS	66,00	AB	67,33	A
14	P-3005	LINEA	58,67	DEFGHIJ	56,33	HIJ
15	H-3005	HT	61,67	BCDEFG	61,33	BCDEFGH
16	P-3031	HD	49,33	L	54,00	JKL
T	Promedio		59,89		59,49	

**Nota 1: No se incluyó el T5 en el promedio por muerte total de plantas con nicosulfuron**

**Nota 2: Prueba Rangos Múltiples de Duncan al 5 %. Misma letra=no hay diferencias significativa**

**Nota 3: HS = Híbrido simple; HT = Híbrido trilineal; HD: Híbrido doble; Linea: Linea endocriada**

El agrupamiento del cuadro de medias deja ver al menos 5 grupos, destacándose T5 y T16 (lo más afectados) por estar en 2 grupos aparte del resto de los genotipos evaluados por las razones antes descritas. Estas diferencias al igual que en los casos anteriores (con excepción de estos dos tratamientos), se deben a la naturaleza de los materiales y no al efecto del herbicida. El efecto promedio del herbicida fue mínimo en esta variable, sin embargo se observaron algunos casos particulares, donde las diferencias fueron mayores, pero como hemos visto por los resultados de variables determinantes (como el Índice de Afectación), estos no son necesariamente reflejo de susceptibilidad o tolerancia de dichos materiales.

Con excepción de aquellos materiales moderada o altamente sensibles al nicosulfuron, esta variable no permitió diferenciar fácilmente la susceptibilidad de los genotipos al herbicida. Resultados similares obtuvieron Cavalieri *et al.*, (2008), trabajando con 33 híbridos de maíz de diferentes empresas en Brasil.

### **Hileras por mazorca (N°)**

Para esta variable, el ANAVAR muestra diferencias significativas para la fuente de variación aplicación de herbicida y altamente significativas para genotipos e interacción genotipo x herbicida. Esto puede explicarse, como se observa en el cuadro de medias y su respectivo agrupamiento (Cuadro 22), en que existen al menos 5 grupos más o menos diferenciados, debido principalmente a su naturaleza (tipo de material), y en menor medida por el efecto del herbicida (con excepción de T5).

Si calculamos un promedio simple del número de hileras por mazorca (excluyendo al T5), observamos como las diferencias entre los tratamientos con y sin herbicida son prácticamente inexistentes. Del mismo modo, que al analizar individualmente vemos existe una leve diferencia del número de hileras en los tratamientos con herbicida de algunos materiales en relación con aquellos sin herbicida.

**Cuadro 22. Hileras por mazorca por genotipo de maíz (*Zea mays* L.) evaluado en campo con y sin nicosulfuron.**

T	Genotipos	Tipo de Material	Hileras / mazorca (N°)			
			Con herbicida	Grupo	Sin herbicida	Grupo
1	M-5007	HS	14,80	AB	14,67	ABC
2	P-5007	HS	13,40	HIJKL	12,67	L
3	H-5007	HD	14,13	BCDEFGH	14,47	ABCDEF
4	M-5050	HS	14,60	ABCD	15,20	A
5	P-5050	LINEA	0,00	M	13,67	FGHIJ
6	H-5050	HT	14,07	BCDEFGHI	14,20	BCDEFGH
7	M-5071	LINEA	13,87	CDEFGHI	13,00	JKL
8	P-5071	LINEA	12,80	KL	12,80	KL
9	H-5071	HS	14,47	ABCDEF	14,27	BCDEFG
10	M-62A19	HS	14,07	BCDEFGHI	13,80	DEFGHIJ
11	P-62A19	HS	14,80	AB	14,40	ABCDEF
12	H-62A19	HD	14,60	ABCD	13,93	CDEFGHI
13	M-3005	HS	13,93	CDEFGHI	14,53	ABCDE
14	P-3005	LINEA	13,80	DEFGHIJ	13,87	CDEFGHI
15	H-3005	HT	13,60	GHIJK	14,40	ABCDEF
16	P-3031	HD	13,27	IJKL	13,73	EFGHIJ
T	Promedio		14,01		14,00	

**Nota 1: No se incluyó el T5 en el promedio por muerte total de plantas con nicosulfuron**

**Nota 2: Prueba Rangos Múltiples de Duncan al 5 %. Misma letra=no hay diferencias significativas**

**Nota 3: HS = Híbrido simple; HT = Híbrido trilineal; HD: Híbrido doble; Linea: Linea endocriada**

Por todo lo anteriormente observado, esta variable no refleja con claridad el grado de afectación de las plantas por parte del herbicida (A menos que el material sea altamente susceptible).

### **N° de Granos por hilera**

Para esta variable, el ANAVAR (Cuadro 19) muestra diferencias altamente significativas para las fuentes de variación genotipos e interacción genotipo x herbicida. Esto puede explicarse por la presencia del T5 (donde todas las plantas murieron) y debido a la formación de cuatro grupos bien definidos, y un quinto

grupo menos claro con varios niveles para esta variable, pero que no se diferencian entre ellos (Cuadro 23). Si calculamos un promedio simple del número de granos por hilera por mazorca (excluyendo al T5), observamos como las diferencias entre los tratamientos con y sin herbicida son prácticamente inexistentes, aunque al analizar individualmente vemos como en la mayoría de los casos existe un leve aumento del número de hileras en los tratamientos con herbicida de algunos materiales en relación con aquellos sin herbicida.

**Cuadro 23. Granos por hilera por genotipo de maíz (*Zea mays* L.), evaluado en campo con y sin nicosulfuron.**

T	Genotipos	Tipo de Material	Granos / hilera (N°)			
			Con herbicida	Grupo	Sin herbicida	Grupo
1	M-5007	HS	37,80	ABCD	36,23	BCD
2	P-5007	HS	35,67	D	35,77	D
3	H-5007	HD	38,67	ABC	37,13	ABCD
4	M-5050	HS	36,03	CD	35,80	D
5	P-5050	LINEA	0,00	G	27,83	E
6	H-5050	HT	39,17	A	38,13	ABCD
7	M-5071	LINEA	21,83	F	20,57	F
8	P-5071	LINEA	22,33	F	22,33	F
9	H-5071	HS	38,73	AB	38,27	ABCD
10	M-62A19	HS	37,50	ABCD	37,17	ABCD
11	P-62A19	HS	36,90	ABCD	36,97	ABCD
12	H-62A19	HD	39,13	A	38,63	ABC
13	M-3005	HS	37,53	ABCD	38,63	ABC
14	P-3005	LINEA	37,40	ABCD	37,50	ABCD
15	H-3005	HT	36,63	ABCD	37,47	ABCD
16	P-3031	HD	38,23	ABCD	37,43	ABCD
T	Promedio		35,57		35,20	

**Nota 1:** No se incluyó el T5 en el promedio por muerte total de plantas con nicosulfuron

**Nota 2:** Prueba Rangos Múltiples de Duncan al 5 %. Misma letra=no hay diferencias significativas

**Nota 4:** HS = Híbrido simple; HT = Híbrido trilineal; HD: Híbrido doble; Linea: Linea endocriada

Al igual que en la variable anterior, es difícil inferir el grado de afectación a partir de los resultados obtenidos de esta variable para este grupo de genotipos.

## **Variables de productividad**

### **Peso de mazorca (kg/unidad experimental)**

Para la variable Peso de Mazorca, el ANAVAR (Cuadro 24), nos muestra que las fuentes de variación Genotipos y la Interacción genotipo x herbicida arrojaron diferencias altamente significativas. Esto puede explicarse (como ha sido mencionado anteriormente) por el valor arrojado por el T5 al no presentar ninguna planta a cosecha debido a la muerte de todos los individuos por la acción del herbicida.

**Cuadro 24. ANAVAR de cuadrados medios para peso de mazorca, peso de grano y rendimiento para los genotipos de maíz (*Zea mays* L.) evaluados en campo.**

Fuente de variación	gl	Peso de mazorca (kg/U.E)		Peso de grano (kg/UE)		Rendimiento (kg.h <sup>-1</sup> )	
Repetición	2	2,855		0,389		421951,464	
Aplicación de Herbicida (A)	1	0,258		0,518		559935,547	
Error	2	5,358		2,328		2521333	
Genotipos (G)	15	54,222	**	38,507	**	41770252,71	**
AxG	15	5,716	**	3,552	**	3851879,89	**
Error	60	0,555		0,351		381129,888	
Total	95	68,964		45,645		49506482,5	
CV (%)		<b>7,97</b>		<b>7,89</b>		<b>7,89</b>	

Nota: \* y \*\* = diferencias significativas al 5 y 1 % respectivamente

En el Cuadro 25 podemos apreciar el análisis de medias y su respectivo agrupamiento. La comparación del promedio simple no muestra grandes diferencias entre los tratamientos con y sin herbicida.

El comportamiento general, mostró dos grandes grupos en cuanto a la afectación por el herbicida nicosulfuron, un primer grupo (más afectados) formado por el padre del SK-5050 (T5) con todas las plantas muertas (cuando fue tratado), y por el Pioneer 3031 (T16), que fue el testigo seleccionado como susceptible para el ensayo, y un segundo grupo constituido por el resto de los genotipos.

Sin embargo, al comparar dentro de cada genotipo diferenciando el efecto de la aplicación herbicida, se observaron resultados interesantes: Grupos de materiales (que se encuentran emparentados entre ellos), como T1, T2, T3 y T4, evidenciaron un aumento del peso de mazorca al comparar las observaciones con y sin nicosulfuron, pudiéndose explicar este efecto como una respuesta metabólica de las plantas quizá relacionada con el fenómeno de Hormesis.

Un comportamiento similar (aunque mayor) se notó en el H-62A19 (T12), mientras que el resto de los materiales mostró diferencias menos importantes.

En el agrupamiento observado en el cuadro de medias (Cuadro 25), la conformación de aproximadamente 5 grupos (en la columna con herbicida), fue causada principalmente por la naturaleza de los diferentes tipos de materiales, y en segundo término por el efecto del herbicida (T5 y T16, los cuales fueron más susceptibles y conformaron grupos aparte del resto de los materiales).

**Cuadro 25. Peso de mazorca por genotipo de maíz (*Zea mays* L.) evaluado en campo con y sin nicosulfuron.**

T	Genotipos	Tipo de Material	Peso de mazorca / Parcela (kg)			
			Con herbicida	Grupo	Sin herbicida	Grupo
1	<b>M-5007</b>	HS	10,94	BCDEFGH	9,52	IJ
2	<b>P-5007</b>	HS	11,13	ABCDEF	10,26	DEFGHI
3	<b>H-5007</b>	HD	12,21	A	11,35	ABCD
4	<b>M-5050</b>	HS	10,73	CDEFGHI	9,90	GHIJ
5	<b>P-5050</b>	LINEA	0,00	N	6,98	K
6	<b>H-5050</b>	HT	11,97	AB	11,79	ABC
7	<b>M-5071</b>	LINEA	3,80	LM	4,09	L
8	<b>P-5071</b>	LINEA	2,96	LM	2,63	M
9	<b>H-5071</b>	HS	10,89	BCDEFGH	11,32	ABCDE
10	<b>M-62A19</b>	HS	10,39	DEFGHI	10,43	DEFGHI
11	<b>P-62A19</b>	HS	10,70	CDEFGHI	10,03	FGHIJ
12	<b>H-62A19</b>	HD	11,03	ABCDEF	9,76	HIJ
13	<b>M-3005</b>	HS	11,18	ABCDEF	10,92	BCDEFGH
14	<b>P-3005</b>	LINEA	10,58	CDEFGHI	10,50	DEFGHI
15	<b>H-3005</b>	HT	11,24	ABCDEF	10,66	CDEFGHI
16	<b>P-3031</b>	HD	8,89	J	10,13	EFGHI
T	<b>Promedio</b>		9,91		9,55	

**Nota 1: No se incluyó el T5 en el promedio por muerte total de plantas con nicosulfuron**

**Nota 2: Prueba Rangos Múltiples de Duncan al 5 %. Misma letra=no hay diferencias significativas**

**Nota 3: HS = Híbrido simple; HT = Híbrido trilineal; HD: Híbrido doble; Linea: Linea endocriada**

Es evidente, que al intentar producir semillas del Híbrido SK-5050, el uso de nicosulfuron, estaría completamente prohibido, pues la muerte total de las plantas del padre, impedirían el cruce y con ello la producción de semilla híbrida. Con el resto de los materiales habría simplemente que tomar en cuenta las recomendaciones realizadas en función de lo observado en las variables de floración.

## **Peso del Grano**

Para la variable Peso del grano, el ANAVAR (Cuadro 24), nos muestra que las fuentes de variación Genotipos y la Interacción genotipo-herbicida arrojaron valores altamente significativos. Esto puede explicarse (como ha sido mencionado anteriormente) arrojado por el T5 al no presentar ninguna mazorca a cosecha debido a la muerte de todos los individuos por la acción del herbicida.

En el cuadro 26, en el cual se muestran los valores de las medias y sus respectivos agrupamientos, observamos la conformación de aproximadamente 5 grupos; tres de ellos con un solo genotipo cada uno: T5, T16 (los más susceptibles) y el T3 (que al igual que con peso de mazorca, presentó el valor mayor).

Un cuarto grupo formado por las líneas progenitoras del híbrido simple SK-5071 (madre y padre) y un quinto grupo poco diferenciado entre ellos.

De forma lógica, se repite lo observado en la variable anterior con T1, T2, T3 y T4, y T12, con aumentos de peso de grano al aplicar nicosulfuron, lo cual pudiera atribuirse a una respuesta metabólica de los materiales a la aplicación del herbicida

**Cuadro 26. Peso de grano por genotipo de maíz (*Zea mays* L.) evaluado en campo con y sin nicosulfuron.**

T	Genotipos	Tipo de Material	Peso de Grano / Parcela (kg)			
			Con herbicida	Grupo	Sin herbicida	Grupo
1	M-5007	HS	8,747	DEF	7,577	HI
2	P-5007	HS	8,540	DEFGH	8,320	EFGH
3	H-5007	HD	10,330	A	9,237	BCDE
4	M-5050	HS	8,767	DEF	8,090	FGH
5	P-5050	LINEA	0,000	N	5,450	J
6	H-5050	HT	10,090	AB	9,743	ABC
7	M-5071	LINEA	2,933	KL	3,160	K
8	P-5071	LINEA	1,977	LM	1,847	M
9	H-5071	HS	9,230	BCDE	9,337	BCD
10	M-62A19	HS	8,417	DEFGH	8,557	DEFG
11	P-62A19	HS	8,310	EFGH	8,160	FGH
12	H-62A19	HD	8,813	CDEF	7,633	GHI
13	M-3005	HS	8,637	DEF	8,943	CDEF
14	P-3005	LINEA	8,383	DEFGH	8,573	DEFG
15	H-3005	HT	8,770	DEF	8,537	DEFGH
16	P-3031	HD	7,077	I	8,207	FGH
T	Promedio		7,935		7,728	

Nota 1: No se incluyó el T5 en el promedio por muerte total de plantas con nicosulfuron

Nota 2: Prueba Rangos Múltiples de Duncan al 5 %. Misma letra = no hay diferencias significativas

Nota 3: HS = Híbrido simple; HT = Híbrido trilineal; HD: Híbrido doble; Linea: Linea endocriada

### **Rendimiento del Grano**

Para la variable Rendimiento de grano, el ANAVAR de cuadrados medios (Cuadro 27), nos muestra que las fuentes de variación Genotipos y la Interacción genotipo x herbicida arrojaron valores altamente significativos. Esto puede explicarse (como ha sido mencionado anteriormente) por el valor arrojado por el T5 al no presentar ninguna planta a cosecha. Las diferencias entre genotipos observadas en este cuadro (27), obedecen principalmente a la naturaleza de los materiales evaluados

más que a la aplicación del nicosulfuron, con excepción de T5 y T16 (más susceptibles).

Del mismo modo que con la variable peso de grano, observamos la conformación de aproximadamente 5 grupos. Los dos últimos o más susceptibles (T5 y el T16) y el mayor de todos (T3), formados por un genotipo cada uno (Cuadro 27). Un cuarto grupo formado por las dos líneas progenitoras del híbrido simple SK-5071 (madre y padre), y un quinto grupo con 12 materiales poco diferenciados entre ellos.

Al estar directamente relacionado con las dos variables anteriores (peso de mazorca y peso de grano), se repite el comportamiento observado con T1, T2, T3 y T4, y T12, con aumentos de rendimiento de grano al aplicar nicosulfuron.

Los resultados anteriores claramente demuestran la incidencia del herbicida nicosulfuron sobre la variable rendimiento de grano, perjudicando a algunos genotipos, y beneficiando aparentemente a otros.

Estos resultados concuerdan en parte con lo señalado por Damião Filho *et al.*, (1996); Môro y Damião Filho (1999); O'Sullivan *et al.*, (2002), en sus estudios sobre la tolerancia del maíz al nicosulfuron. Estos autores señalan que la disminución de los rendimientos en el maíz al aplicar nicosulfuron dependen del momento de la aplicación, las características intrínsecas de cada cultivar, y la capacidad de estos para detoxificar el herbicida, así como las diferentes condiciones ambientales bajo las cuales se lleve a cabo la siembra. Sin embargo, estos autores no reportaron en ningún momento un aumento en los rendimientos de los diferentes materiales por ellos evaluados.

**Cuadro 27. Rendimiento de grano (kg/ha) por genotipo de maíz (*Zea mays* L.) evaluado en campo con y sin nicosulfuron.**

T	Genotipos	Tipo de Material	Rendimiento de Grano (kg/ha)			
			Con herbicida	Grupo	Sin herbicida	Grupo
1	M-5007	HS	9110	DEF	7891	HI
2	P-5007	HS	8896	DEFGH	8667	EFGH
3	H-5007	HD	10760	A	9623	BCDE
4	M-5050	HS	9135	DEF	8425	FGH
5	P-5050	LINEA	0	N	5674	J
6	H-5050	HT	10510	AB	10150	ABC
7	M-5071	LINEA	3056	KL	3295	K
8	P-5071	LINEA	2060	LM	1924	M
9	H-5071	HS	9616	BCDE	9725	BCD
10	M-62A19	HS	8768	DEFGH	8914	DEFG
11	P-62A19	HS	8658	EFGH	8499	FGH
12	H-62A19	HD	9181	CDEF	7950	GHI
13	M-3005	HS	8994	DEF	9312	CDEF
14	P-3005	LINEA	8732	DEFGH	8932	DEFG
15	H-3005	HT	9131	DEF	8894	DEFGH
16	P-3031	HD	7369	I	8546	FGH
T	Promedio		8265		8050	

**Nota 1:** No se incluyó el T5 en el promedio por muerte total de plantas con nicosulfuron

**Nota 2:** Prueba Rangos Múltiples de Duncan al 5 %. Misma letra=no hay diferencias significativas

**Nota 3:** HS = Híbrido simple; HT = Híbrido trilineal; HD: Híbrido doble; Linea: Linea endocriada

Los resultados obtenidos para esta variable, sólo permitieron determinar la susceptibilidad de aquellos cultivares moderada y altamente sensibles al nicosulfuron, mas no permitieron clasificar con facilidad al resto. Esto coincide con lo reportado por Cavalieri *et al.*, (2008), quienes señalaron que sólo un genotipo entre 33 híbridos de maíz se diferenció claramente de los otros, siendo el mas sensible. Asimismo, afirmaron que debido a las diferencias encontradas entre los resultados de invernadero y de campo, la evaluación de este último era absolutamente necesaria para así determinar con más exactitud tanto la

disminución del rendimiento de grano que puede provocar el nicosulfuron, como la susceptibilidad de los diferentes cultivares.

### **Índice de Tolerancia a Stress (ITS)**

En aquellas variables donde observamos anteriormente, interacción Genotipo x Herbicida, se utilizó el índice de tolerancia a stress (ITS) (Fernandez, 1992) con la finalidad de obtener una mejor información al respecto. Aunque originalmente fue diseñado para estrés hídrico, es aplicable a diferentes clases de estrés, como el efecto de agroquímicos.

$$ITS = [Y_p * Y_s] / [Y_p]^2$$

Donde “Ys” es igual al rendimiento bajo condiciones de estrés, “Yp” el rendimiento sin estrés y  $Y_p^2$  el promedio del rendimiento experimental de todos los genotipos creciendo sin estrés. Valores altos de ITS indican que los genotipos tienen alta tolerancia al estrés evaluado.

Este índice permite la comparación de los genotipos entre sí independientemente de su naturaleza (línea endocriada, híbrido simple, trilineal o doble), contrastándose cada cultivar de forma individual comparando su respuesta particular bajo estrés contra el comportamiento en condiciones normales.

### **ITS para variables vegetativas**

Siendo el ITS un indicador de la susceptibilidad de los cultivares bajo estudio en condiciones de stress, podemos observar como para las siguientes variables vegetativas los resultados del ANAVAR reflejan diferencias importantes entre los genotipos ante la aplicación del nicosulfuron. (Cuadro 28).

**Cuadro 28. ANAVAR de los cuadrados medios del ITS para variables vegetativas de genotipos de maíz (*Zea mays* L.) evaluados en campo con y sin nicosulfuron.**

Fuente de variación	gl	Plantas		Altura		Diámetro			
		Cosechadas (N°)		Planta (cm)	Mazorca (cm)	Tallo (cm)			
Repetición	2	0,001		0,038	**	0,05	*	0,063	**
Genotipos (A)	15	0,194	**	0,189	**	0,0195	**	0,193	**
Error	30	0,001		0,004		0,009		0,004	
Total	47	0,196		0,231		0,0785		0,26	
CV (%)		3,41		7,09		10,42		6,81	

**Nota: \* y \*\* = diferencias significativas al 5 y 1 % respectivamente**

De forma específica, observando el Cuadro 29 donde se reflejan las medias del ITS y su respectivo agrupamiento, se puede decir que para las variables altura de planta y mazorca se observa un material altamente susceptible (T5), que resultó estadísticamente inferior a todos, presentando un 100% de mortalidad por lo cual su ITS fue el más bajo de todos.

El mayor valor absoluto para el ITS fue mostrado por el material T15 (grupo 1), quien superó estadísticamente a T6, T8, T9 y T13 (grupo 2) y por supuesto a T5 (el material más susceptible del ensayo, que formó el último grupo), y un cuarto grupo con el resto de los materiales (T1, T2, T3, T4, T7, T10, T11, T12, T14 y T16) con un grado intermedio en susceptibilidad ante la aplicación del nicosulfuron (Cuadro 29).

**Cuadro 29. Índice de tolerancia a estrés (ITS) por genotipo de maíz (*Zea mays* L.) evaluado en campo con y sin nicosulfuron.**

T	Genotipos	Tipo de Material	Altura de planta (cm)		Altura de mazorca (cm)		Diámetro de tallo (cm)		Plantas cosechadas (N°)	
			Media	Grupo	Media	Grupo	Media	Grupo	Media	Grupo
1	M-5007	HS	0,9644	ABC	0,9688	AB	1,015	AB	0,944	AB
2	P-5007	HS	1,015	ABC	0,9857	AB	0,9868	AB	1,036	A
3	H-5007	HD	1,055	AB	1,064	AB	1,074	A	0,9949	AB
4	M-5050	HS	0,9855	ABC	1,015	AB	1,021	AB	1	AB
5	P-5050	LINEA	0	D	0	C	0	C	0	C
6	H-5050	HT	0,9274	C	0,9188	B	0,9101	B	1,001	AB
7	M-5071	LINEA	0,9729	ABC	0,963	AB	0,9042	B	1,007	AB
8	P-5071	LINEA	0,9397	BC	0,9133	B	0,9989	AB	1,055	A
9	H-5071	HS	0,939	BC	0,9045	B	1,057	A	0,9944	AB
10	M-62A19	HS	1,005	ABC	1,018	AB	0,9626	AB	1,03	A
11	P-62A19	HS	1,03	ABC	1,026	AB	0,9109	B	0,9662	B
12	H-62A19	HD	1,011	ABC	1,06	AB	1,011	AB	1,018	AB
13	M-3005	HS	0,9309	BC	0,8813	B	0,9915	AB	1,017	AB
14	P-3005	LINEA	1,035	ABC	1,032	AB	1,047	A	1,031	A
15	H-3005	HT	1,064	A	1,112	A	1,007	AB	1,029	A
16	P-3031	HD	0,956	ABC	0,9684	AB	1,013	AB	1,03	A

**Nota 1: Prueba Rangos Múltiples de Duncan al 5 %. Misma letra= no hay diferencias significativas**

**Nota 2: HS = Híbrido simple; HT = Híbrido trilineal; HD: Híbrido doble; Linea: Linea endocriada**

Con respecto al diámetro del tallo, las diferencias fueron menos claras, formándose grupos con varios materiales. Un primer grupo (más tolerante) conformado por T3, T9 y T14. El último grupo (4) constituido por el T5 (el más susceptible) y dos grupos intermedios en tolerancia: el grupo 2, con T1, T2, T4, T8, T10, T12, T13, T15 y T16, y el 3, con T6, T7 y T11. Con excepción del T5, esta variable es poco clara para analizar la tolerancia a este herbicida.

En relación al número de plantas cosechadas, al igual que con la variable diámetro de tallo, su comportamiento no es reflejo de la tolerancia del genotipo al herbicida,

a menos que una gran susceptibilidad de algunos de ellos provoque la muerte de muchas plantas en el transcurso de su ciclo (T5). Al igual que en las tres anteriores variables se observa que el T5 resultó altamente susceptible mientras que el resto de los materiales son estadísticamente superiores a este pero con menores diferencias de tolerancia entre ellos.

### **ITS para variables de Floración masculina y Floración Femenina**

El ANAVAR de los cuadrados medios del ITS, (Cuadro 30) mostró diferencias significativas entre las repeticiones y los genotipos. Las medias del ITS de la floración masculina (Cuadro 31) mostró dos grandes grupos, uno con Índice cero (0), el cual lo conformaban el T5 (donde todas las plantas murieron antes de floración), junto a T10 y T13 (ambas madres androestériles) y un segundo grupo con el resto de los 13 materiales.

**Cuadro 30. ANAVAR de cuadrados medios para el Índice de Toleranciaa stres (ITS) de variables de floración de genotipos de maíz (*Zea mays*) evaluados**

Fuente de variación	gl	Días a		Días a		
		floración masculina		floración femenina		
Repetición	2	0,006	**	2	0,011	**
Genotipos (A)	15	0,487	**	15	0,187	**
Error	27	0,001		30	0,001	
Total	44	0,494		47	0,199	
CV (%)		3,58			3,04	

**Nota: \* y \*\* = diferencias significativas al 5 y 1 % respectivamente**

En el ITS de la floración femenina (Cuadro 31), también se observaron dos grupos claramente definidos y diferenciados entre sí, uno de ellos conformado únicamente por el T5 donde todas las plantas murieron antes de floración y un segundo grupo

con los otros 15 genotipos agrupados en un orden diferente al observado en el ITS de la floración masculina.

En ambos casos, se puede decir que las floraciones no permiten dilucidar la tolerancia de los materiales al herbicida (nicosulfuron), a menos que sea altamente susceptible (T5), o existan fallas totales de floración por otras razones como por ejemplo la androesterilidad.

**Cuadro 31. Medias y agrupamiento de los índices de tolerancia a stres (ITS) de las variables días a floración masculina y femenina.**

T	Genotipos	Material	Días a floración masculina		Días floración femenina	
			Media	Grupos	Media	Grupos
1	<b>M-5007</b>	HS	0,9963	A	1	A
2	<b>P-5007</b>	HS	1,006	A	1	A
3	<b>H-5007</b>	HD	0,9794	A	0,9692	A
4	<b>M-5050</b>	HS	0,9897	A	0,9851	A
5	<b>P-5050</b>	LINEA	0	B	0	B
6	<b>H-5050</b>	HT	1,022	A	1,022	A
7	<b>M-5071</b>	LINEA	0,9906	A	0,9914	A
8	<b>P-5071</b>	LINEA	1,026	A	1,027	A
9	<b>H-5071</b>	HS	1,016	A	1,017	A
10	<b>M-62A19</b>	HS	0	B	0,9692	A
11	<b>P-62A19</b>	HS	0,9948	A	1,001	A
12	<b>H-62A19</b>	HD	0,9893	A	0,9738	A
13	<b>M-3005</b>	HS	0	B	1,011	A
14	<b>P-3005</b>	LINEA	0,9795	A	0,9747	A
15	<b>H-3005</b>	HT	0,9839	A	0,9787	A
16	<b>Pioneer 3031</b>	HD	1,011	A	1,016	A

**Nota:** Prueba Rangos Múltiples de Duncan al 5 %. Misma letra=no hay diferencias significativas

**Nota 2:** HS = Híbrido simple; HT = Híbrido trilineal; HD: Híbrido doble; Linea: Línea endocriada

Como se mencionó anteriormente en los análisis de índice de afectación, uno de los objetivos principales de este trabajo es el generar recomendaciones para la producción de semilla híbrida, por lo cual resulta de vital importancia el análisis de

cada genotipo en particular y no una simple comparación entre ellos. En ese sentido, dado que en la producción de semilla híbrida (a diferencia de la producción de consumo), cualquier variante entre el momento de la emisión de polen y la salida de los estigmas puede afectar la producción de los híbridos, el orden de tolerancia resulta sumamente importante ya que se pudieron observar diferencias entre las fechas de floración para los progenitores masculinos y femeninos. Por tal motivo, se analizó cada caso de forma particular para determinar en cuales híbridos la variación de la coincidencia de floración originalmente establecida pudiera representar un problema en la fecundación y por ende en la producción de la semilla del híbrido en sí, tal y como puede observarse en las Figuras 14 y 15.

### **ITS para variables de productividad**

Los diferentes valores observados en los Anavar de las variables del ITS del peso de mazorca, peso de grano y rendimiento de grano por hectárea, indican que hubo claras diferencias tanto entre los genotipos, como entre las parcelas con y sin nicosulfuron.

**Cuadro 32. Cuadrados medios del ANAVAR del índice de tolerancia a estrés de las variables de productividad del cultivo al herbicida nicosulfuron de acuerdo al genotipo a cosecha (125 dds).**

Fuente de variación	gl	Peso de Mazorca (kg/parcela)		Peso de Grano (Kg/parcela)		Rendimiento (Kg.h <sup>-1</sup> )	
Repetición	2	0,123	**	0,094	**	0,094	**
Genotipos (A)	15	0,218	**	0,219	**	0,219	**
Error	30	0,014		0,011		0,011	
Total	47	0,355		0,324		0,324	
CV (%)		12,13		10,89		10,89	

Nota: \* y \*\* = diferencias significativas al 5 y 1 % respectivamente

El Índice de Tolerancia a Stress (ITS), utilizado en el presente estudio para comparar las parcelas principales con y sin nicosulfuron, refleja al analizar las medias, una serie de valores que oscilan entre 0 y 1,16. Aquellos genotipos con medias altas serían los que presentaron menor nivel de daño por el herbicida. En ese sentido, se puede observar la conformación de cuatro grupos más o menos definidos.

Un primer grupo conformado por los genotipos T1, T3, T4 y T12 que son los materiales menos afectados por el herbicida. Un último grupo (4), en el otro extremo y formado únicamente por T5, (Totalmente dañado por el herbicida). Un tercer grupo con T8 y T16 (afectados en su rendimiento de manera importante) y un cuarto grupo con niveles intermedios de tolerancia moderada (resto de los genotipos). Estos resultados confirman de manera casi exacta lo observado con el análisis de la variable Índice de Afectación al cultivo. El orden en función al índice de tolerancia a stress sería entonces el siguiente:

- Grupo 1: T1, T3, T4 y T12 (Materiales menos afectados)
- Grupo 2: T2, T6, T7, T9, T10, T11, T13, T14, T15 (Niveles moderados de tolerancia)
- Grupo 3: T8 y T16 (afectados de manera importante en su rendimiento)
- Grupo 4: T5 (Altamente afectado)

**Cuadro 33. Índice de tolerancia del cultivo (ITS) al herbicida nicosulfuron según genotipo para las variables peso de mazorca, y rendimiento de grano por hectárea a cosecha (125 dds).**

T	Genotipos	Tipo de Cruce	Peso de mazorca (kg/parcela)		Rendimiento (kg.h <sup>-1</sup> )	
			Media	Grupo	Media	Grupo
1	<b>M-5007</b>	HS	1,161	A	1,162	A
2	<b>P-5007</b>	HS	1,111	ABC	1,045	ABC
3	<b>H-5007</b>	HD	1,087	ABC	1,131	AB
4	<b>M-5050</b>	HS	1,086	ABC	1,086	AB
5	<b>P-5050</b>	LINEA	0	D	0	E
6	<b>H-5050</b>	HT	1,015	ABC	1,037	ABC
7	<b>M-5071</b>	LINEA	0,9495	ABC	0,9431	BCD
8	<b>P-5071</b>	LINEA	0,9169	BC	0,8309	D
9	<b>H-5071</b>	HS	0,9659	ABC	0,9909	ABCD
10	<b>M-62A19</b>	HS	0,9977	ABC	0,9847	ABCD
11	<b>P-62A19</b>	HS	1,069	ABC	1,022	ABCD
12	<b>H-62A19</b>	HD	1,132	AB	1,157	A
13	<b>M-3005</b>	HS	1,025	ABC	0,9655	ABCD
14	<b>P-3005</b>	LINEA	1,007	ABC	0,978	ABCD
15	<b>H-3005</b>	HT	1,065	ABC	1,031	ABCD
16	<b>P-3031</b>	HD	0,8795	C	0,8624	CD

**Nota1:** No se colocó el peso de grano ya que su comportamiento fue idéntico al de la variable Rendimiento.

**Nota2:** Prueba Rangos Múltiples de Duncan al 5 %. Misma letra= no hay diferencias significativas

**Nota 3:** HS = Híbrido simple; HT = Híbrido trilineal; HD: Híbrido doble; Linea: Linea endocriada

Después de analizar estos dos ITS de las variables de productividad, podemos decir que estas nos permiten hacer inferencias más claras sobre la tolerancia de los genotipos, en relación al resto de las variables. Además, confirman lo observado en los índices de afectación al cultivo (daños a las plantas) analizado previamente.

## **Confirmación tanto de la tolerancia como la susceptibilidad de progenitores de maíz amarillo al herbicida nicosulfuron mediante experimentos de respuesta a dosis**

Otra manera de verificar la susceptibilidad y resistencia a los herbicidas es mediante los ensayos de respuesta a dosis. Estos tienen como objetivo el demostrar dicha reacción y determinar la dosis mínima que ocasiona la disminución del crecimiento de las plantas en un 50% ( $ED_{50}$ ).

Para ello, se seleccionaron los genotipos con el comportamiento en campo más contrastante, el progenitor masculino del híbrido SK-5050 (T5) y el progenitor femenino del híbrido SK-5007 (T1); el primero por su susceptibilidad y el segundo por presentar una alta tolerancia a la aplicación del herbicida.

Siguiendo tal metodología se obtuvieron las curvas de regresión entre la dosis del herbicida aplicado y el desarrollo de las plantas medido como peso fresco. En la Figura 16 se presentan las curvas obtenidas para ambos genotipos y en el Cuadro 32 los parámetros de ambas curvas.

### **Experimento de Respuesta a Dosis:**

Los resultados de invernadero corroboraron lo observado en campo, donde el T1 resultó altamente tolerante al herbicida nicosulfuron a la dosis más alta recomendada por el fabricante, mientras que el T5, resultó altamente susceptible.

El modelo utilizado para explicar el comportamiento de los materiales, a partir de los pesos frescos de los tratamientos cosechados a los 14 días después de la aplicación de nicosulfuron, fue adecuado, lo cual se refleja en los elevados  $R^2$ , que se muestran en los parámetros de regresión en el cuadro 34, los cuales fueron, 0,97 para el cultivar tolerante y 0,94 para el susceptible.

Por cuanto con el material tolerante, T1 (Madre del SK-5007), no se alcanza la mortalidad de la mitad (50 %) de las plantas (Figura 16), aún con el doble (2X) de la dosis máxima recomendada por el fabricante (37,5 g ia h<sup>-1</sup>), no se pudo determinar con exactitud su ED<sub>50</sub>, por lo cual se hace necesario otro ensayo, donde se experimente con dosis más altas del ingrediente activo nicosulfuron. Sin embargo, podemos asegurar, que la ED<sub>50</sub> de dicho tratamiento, supera los 75 g ia h<sup>-1</sup>.

**Cuadro 34. Parámetros de regresión para los genotipos de maíz (*Zea mays*) T1 y T5 evaluados en condiciones de invernadero**

Genotipo	Ecuación	Parámetros de regresión				ED50 (g i.a. ha <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	P	R/S
		a	b	c	d				
Padre SK-5050 (S)	$Y=c+(d-c)/[1+(X/ED_{50})^b]$		-0,8902	3,6838	99,9997	0,1354	0,9399	<0,0001	
Madre SK-5007 (R)	$Y=a + b^x$	100,216	-0,2264			>75	0,9735	<0,0001	No calculable

Donde: Y= peso fresco expresado como porcentaje sobre el control (no tratado),

X= variable independiente,

a=peso fresco sin aplicación del herbicida

c y d=coeficiente inferior y superior respectivamente,

b = pendiente de la línea,

ED<sub>50</sub>=dosis de herbicida que se requiere para reducir el 50% del crecimiento (Streibig *et al.*, 1993).

R<sup>2</sup>=estimación del coeficiente de determinación

P: nivel de significación,

R/S: índice de resistencia (ED<sub>50</sub> R/ ED<sub>50</sub> S).

Con respecto al genotipo susceptible, T5 (Padre del SK-5050), se pudo observar, que su tolerancia al nicosulfuron fue muy baja (ED<sub>50</sub> inferior a 2 g ia h<sup>-1</sup>) lo cual en nuestro estudio, representaba menos de 1/32X de la dosis máxima recomendada por el fabricante (37,5 g ia h<sup>-1</sup>).

En ambos casos, se recomienda variar el número de dosis para poder estructurar la curva adecuadamente. En el caso del T1, hacia valores más altos (4X, 6X, 8X),

mientras que para T5, deberían ser más bajos, pudiendo Iniciar con 1/2X e ir reduciendo dicha dosis inclusive por debajo de 1/64X.

El índice de resistencia no fue posible calcularlo debido a que no logramos determinar la ED<sub>50</sub> del genotipo tolerante, sin embargo, los resultados para el genotipo susceptible fueron tan bajos, que la relación con el tolerante fue superior a 2, por lo cual se puede decir con seguridad, que T1 (igual a T4) y madre del SK-5007, es tolerante.

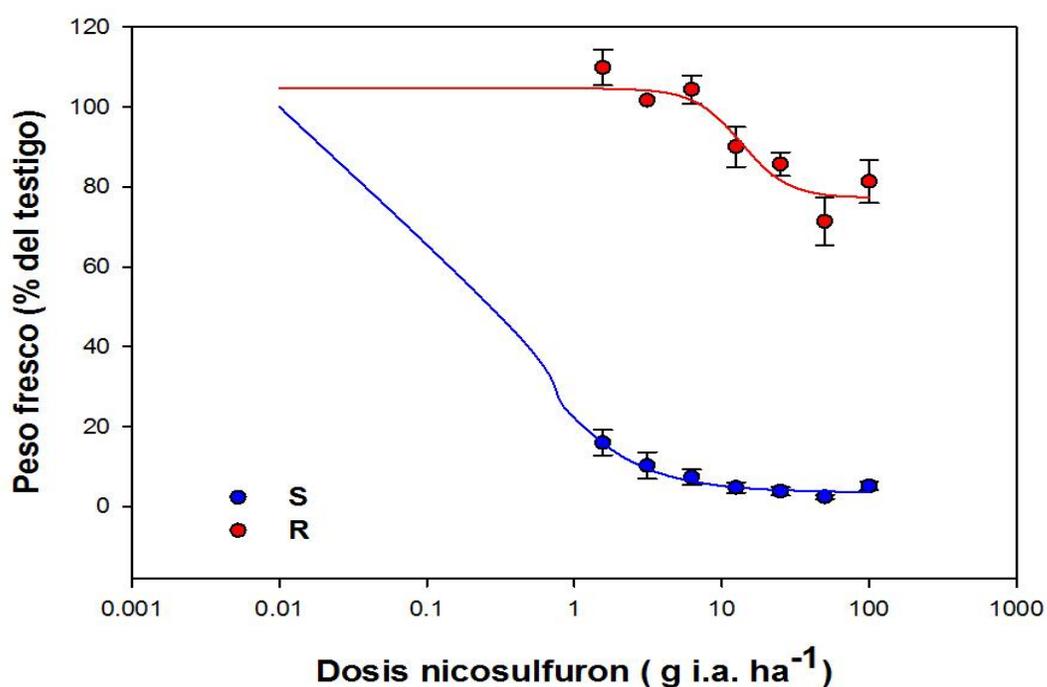


Figura 16. Grafico sobre el efecto de la dosis de nicosulfuron sobre el peso fresco de los genotipos tolerante (T1) y susceptible (T5) desarrollado en invernadero.

**Evaluación del efecto sinérgico o antagónico de la adición de inhibidores del complejo enzimático citocromo P450 monooxigenasa en un genotipo tolerante a nicosulfuron.**

**Experimento de Inhibición de P450**

En el Cuadro 35 se presenta el análisis de la varianza donde puede observarse como tanto para las repeticiones como para el tratamiento las diferencias fueron altamente significativas. En el cuadro 36 se aprecian los valores de peso fresco del cultivar T1 (genotipo tolerante) los cuales indican que los insecticidas malation y metomilo a las dosis evaluadas no parecieron tener un efecto adverso sobre el peso fresco de las plantas, mientras que el clorpirifos, a la dosis utilizada, provocó la disminución del peso fresco (g) del material.

**Cuadro 35. Peso fresco (gr) del genotipo tolerante (T1), según el insecticida utilizado para inducir la inhibición del complejo citocromo P-450.**

Fuente de variación	gl	CM	
Repetición	4	885,02	**
Tratamiento	4	243,49	**
Error	16	40,16	
Total	24		
CV (%)		10,24	

La combinación nicosulfuron + clorpirifos, provocó una reducción del peso fresco de la parte aérea de manera significativa, en comparación con los otros 4 tratamientos. La reacción del genotipo tolerante T1 ante las aplicaciones de los diferentes inhibidores del complejo enzimático P-450, estaría demostrando que la causa de la alta tolerancia observada en este genotipo es de origen metabólico.

**Cuadro 36. Tratamientos y peso promedio de materia fresca del genotipo de maíz T1 tolerante a nicosulfuron al ser tratado con los insecticidas malation, Clorpirifos y Metomilo**

Tratamiento	Peso materia fresca (g)	
Testigo absoluto	69,13	A
Nicosulfuron	59,54	B
Nicosulfuron +Malation	70,88	AB
Nicosulfuron+Clorpirifos	51,00	C
Nicosulfuron+Metomilo	64,08	AB

Estos resultados además de evidenciar el origen metabólico de la tolerancia y susceptibilidad del maíz al nicosulfuron, sugieren al mismo tiempo, la posibilidad de existencia de sinergismo en el caso de clorpirifos y antagonismo para malation y metomilo, por lo cual, se recomienda la conducción de un nuevo experimento utilizando clorpirifos a varias dosis, para determinar con exactitud a qué dosis provoca la máxima inhibición del mencionado mecanismo.

**Asociación de la tolerancia diferencial de progenitores e híbridos de maíz amarillo al herbicida nicosulfurón con marcadores moleculares tipo RAPD's**

**Extracción de ADN**

De las metodologías de extracción de ADN a partir de tejido foliar y tejido de semillas, la metodología descrita por CIMMYT (2006) a partir de tejido foliar de plántulas de 7 días de germinada, fue la que permitió obtener ADN de buena calidad y cantidad para la amplificación de los marcadores RAPDs (Figura 17 A); por el contrario con el procedimiento descrito por Barra *et al.* (2012), la extracción de ADN fue fortuita en cuanto a la cantidad de ADN, observándose además degradación y presencia de ARN (Figura 17B).

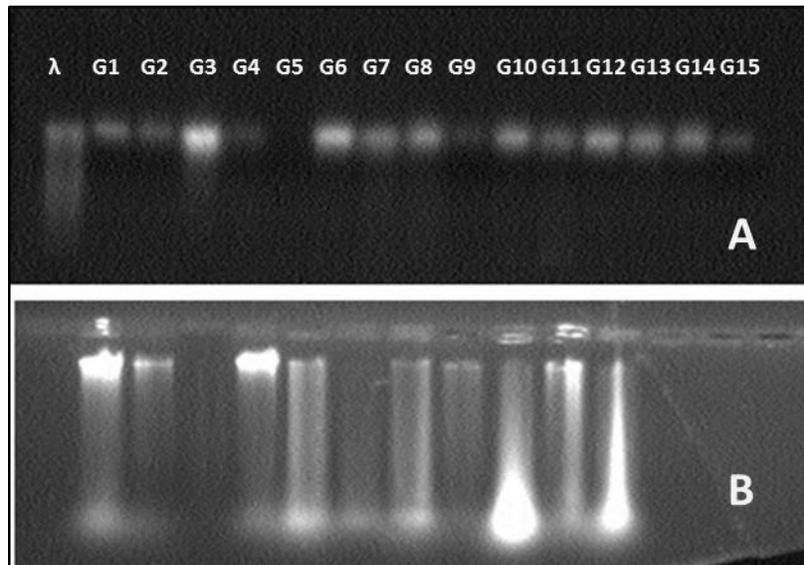


Figura 17. Electroforesis en geles de agarosa 0,8% mostrando resultados de la extracción de ADN a partir de tejido foliar de plántulas de maíz, según el procedimiento descrito por CIMMYT (A) ó (B) Barra *et al.* (2012).

### Amplificación de fragmentos RAPDs

De los siete cebadores utilizados, se encontró buena amplificación y repetibilidad para los cebadores OPA-2 y OPA-9, obteniéndose un total de siete bandas de buena resolución, una de ellas monomórficas por lo que no fue tomada en cuenta en los análisis posteriores.

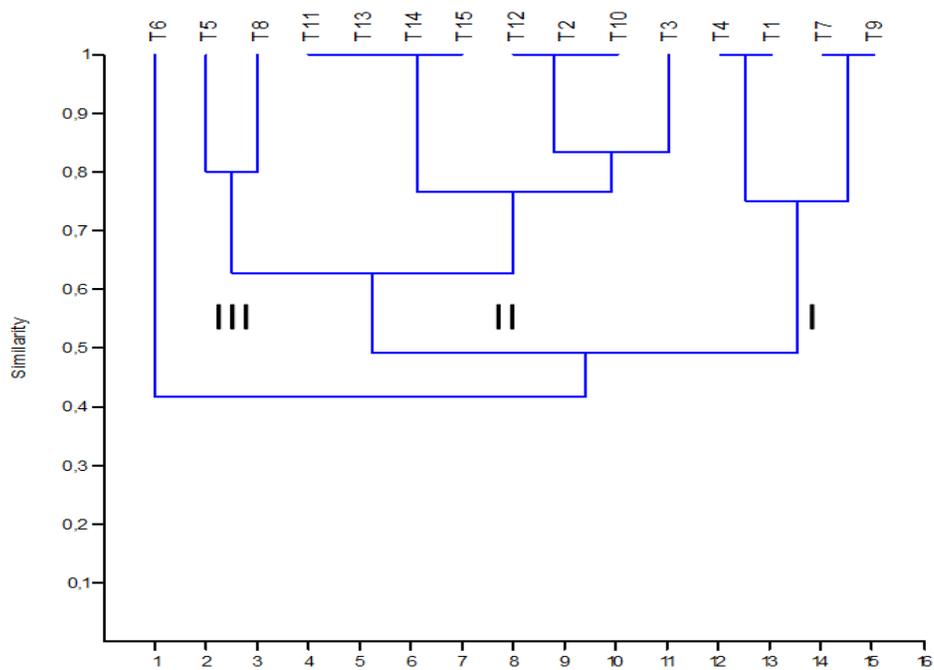
### Estudio de Agrupamiento de progenitores e híbridos de maíz

En vista de que finalmente se consideraron seis bandas polimórficas y de buena resolución y repetibilidad, era necesario verificar su robustez, considerando como criterio, su capacidad o no de evidenciar las relaciones parentales entre los distintos genotipos. Para ello se realizaron los análisis de agrupamiento UPGMA y de correspondencia simple.

El dendrograma de agrupamiento UPGMA basado en la distancia de Jaccard (Figura 18), permite apreciar el parentesco existente entre los diversos genotipos

bajo estudio, pudiéndose observar la formación de tres grupos y un genotipo sin agrupamiento evidente.

- **Genotipo no agrupado:** a una distancia de similitud de 0,41, el Híbrido SK-5050 (T6), se diferencia del resto de los genotipos.
- **Grupo 1:** A una distancia de similitud de 0,5, se diferencia un primer grupo conformado por los genotipos T1, T4, T7 y T9. Los dos primeros (T1 y T4), son materiales genéticamente idénticos y madres de los híbridos SK-5007 y SK-5050. Los genotipos T7 y T9 corresponden a la madre e híbrido SK-5071, respectivamente. El agrupamiento de este conjunto de materiales puede explicarse dado que T7 es la madre de T1, T4 y T9.
- **Grupo 2:** A una distancia de 0,63 se evidencia la conformación de un grupo contentivo de ocho materiales genéticos, que a su vez puede diferenciarse en tres subgrupos: el primero con T13, T14 y T15 (Madre, padre e híbrido H-3005 de Himeca), además del T11 (Padre del H-62A19). El segundo con los cultivares T10 y T12 (Madre e híbrido H-62A19 de Himeca), además del T2 (Padre del SK-5007). Finalmente, separado a una distancia de 0,82 el cultivar T3.
- **Grupo 3:** El tercer grupo se encuentra formado por las líneas endocriadas T5 y T8 (Padre del SK-5050 y Padre del SK-5071, respectivamente)



**Figura 18. Dendrograma UPGMA de agrupamiento de progenitores e híbridos de maíz (*Zea mays* L.)**

El análisis de correspondencia simple (Figura 19), nos permite discernir un poco mejor los parentescos entre los diversos genotipos y vemos como T5 y T6 se encuentran algo alejados del resto de los materiales y con cierta cercanía entre sí, ello se explica debido a que ambos cultivares se encuentran emparentados entre sí, siendo padre e hijo, (padre SK-5050 e híbrido SK-5050 respectivamente), la diferencia entre ambos para este marcador viene dada por la madre del SK-5050 (T4=T1).

Resulta sumamente interesante en este caso que el T5 fuese el genotipo que mostró una alta susceptibilidad al nicosulfuron, mientras que el T1 (T4) fue el cultivar que mostró mayor tolerancia a dicho herbicida, característica que se transmitió a la descendencia T6 (híbrido SK-5050)

Los cultivos T1 y T4, se ubicaron en el mismo sitio, pues (como se ha mencionado previamente) ambos materiales son el mismo híbrido simple con denominaciones diferentes, ya que fueron utilizados como madre de dos híbridos diferentes. El T7 y T9 están juntos pues son madre e hijo respectivamente y la cercanía de ellos con T3 se explica puesto que T7 es madre del T9 y abuela del T3.

En el cuarto grupo se pueden ver con más claridad las cercanías de los subgrupos pues T13, T14 y T15 (madre, padre e híbrido comercial, respectivamente), forman parte del mismo material.

El T10, es la madre de T12, mientras que T11 y T14 son los padres de los híbridos H-62A19 y H-3005 respectivamente, compartiendo una línea endocriada, de allí su agrupamiento. También se pueden explicar las cercanías en la ubicación de los genotipos T13, T15 y T12, pues comparten una línea endocriada materna.

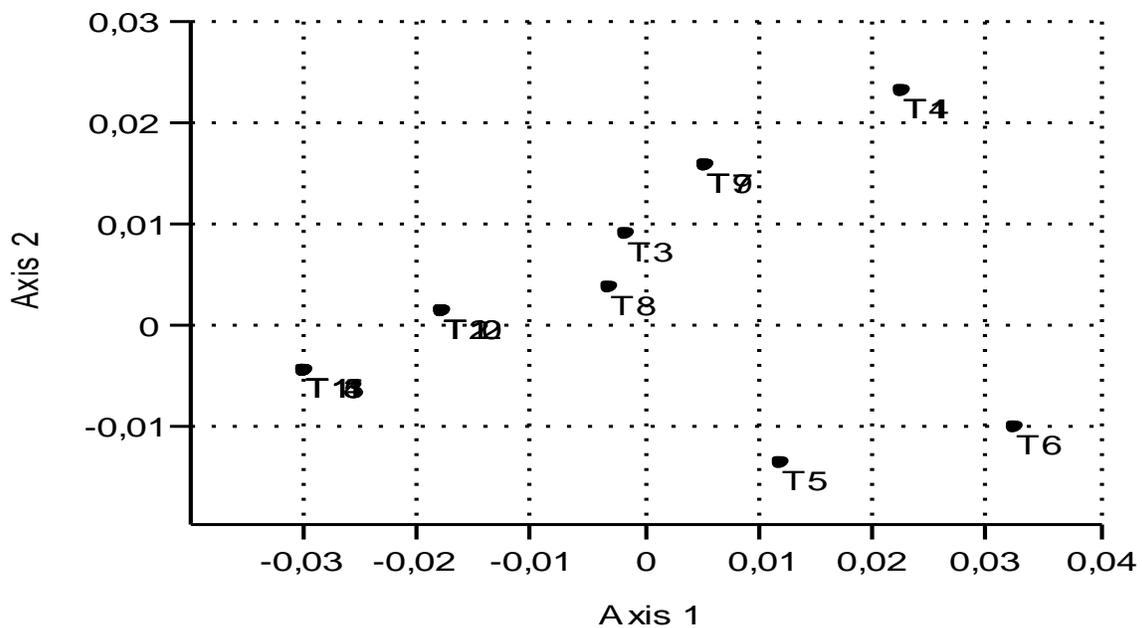


Figura 19. Análisis de correspondencia simple de progenitores e híbridos de maíz (*Zea mays* L.)

## **Asociación de Bandas RAPD con el comportamiento de los genotipos bajo el efecto del herbicida nicosulfuron**

Aquellas variables que mostraron diferencias significativas por el efecto del herbicida fueron consideradas para el siguiente análisis, éstas fueron: Índices de Afectación a los 7 y a los 14 días después de la aplicación del herbicida (7 y 14 dda) y los Índices de Tolerancia al Estrés (ITS) para las variables altura de planta, peso de mazorca y rendimiento.

Considerando la presencia o ausencia de bandas, se realizaron los análisis de la varianza de una sola vía para las variables mencionadas anteriormente. En el Cuadro 37 se presentan los cuadrados medios de cada ANAVAR para cada una de las seis bandas polimórficas.

En dicho cuadro se evidencia que de las seis bandas, la banda 3 fue la que mostró diferencias significativas y altamente significativas para todas las variables consideradas. Ello pudiera ser un indicativo de una posible asociación entre la misma y la susceptibilidad de los genotipos al herbicida nicosulfuron.

En vista de los resultados obtenidos, se procedió a calcular las medias y desviación estándar para los grupos con presencia o ausencia de bandas para cada una de las variables consideradas (Cuadro 38), observándose que para las bandas 1, 2, 4, 5 y 7, la presencia o ausencia de la banda no se relaciona de manera evidente con la media del comportamiento de las variables y al considerar la desviación estándar vemos que los dos grupos se solapan.

**Cuadro 37. Análisis de la varianza (ANAVAR) de presencia o ausencia de bandas RAPD, con respecto a las variables Índices de Afectación a los 7 y a los 14 días después de la aplicación del herbicida nicosulfuron (7 y 14 dda), y los Índices de Tolerancia al Estrés (ITS) para las variables altura de planta, peso de mazorca y rendimiento, de progenitores e híbridos de maíz.**

Variable	Fuente de variación	gl	Cuadrados Medios											
			Banda 1		Banda 2		Banda 3		Banda 4		Banda 5		Banda 7	
Índice de Afectación 7 dda	Entre	1	1.136	ns	12.049	**	<b>12.491</b>	**	1.328	ns	5.242	*	0.008	
	Dentro	43	1.107		0.853		0.843		1.103		1.012		1.133	
	Total	44												
	CV(%)		48,739		40,35		40,1		45,86		43,93		46,5	
Índice de Afectación 14 dda	Entre	1	5.828	ns	4.219	ns	<b>43.710</b>	**	0.784		4.550	ns	2.077	
	Dentro	43	2.201		2.238		1.320		2.318		2.231		2.288	
	Total	44												
	CV(%)		93.02		93,8		72,03		95,46		93,64		94,84	
ITS Altura de planta	Entre	1	0.448	**	0.027		<b>1.474</b>	**	0.000		0.055		0.133	ns
	Dentro	43	0.060		0.070		0.036		0.070		0.069		0.067	
	Total	44												
	CV(%)		26.50		28,58		20,58		28,7		28,44		28,07	
ITS Peso de Mazorca	Entre	1	0.093		0.007		<b>1.815</b>	**	0.000		0.075		0.008	
	Dentro	43	0.198		0.200		0.158		0.200		0.198		0.200	
	Total	44												
	CV(%)		43.65		43,87		38,99		43,89		43,7		43,87	
ITS Rendimiento	Entre	1	0.010		0.007		<b>1.777</b>	*	0.000		0.102		0.011	
	Dentro	43	0.301		0.301		0.259		0.301		0.298		0.301	
	Total	44												
	CV(%)		53.48		53,49		49,69		53,5		53,29		53,48	

Sin embargo, cuando se revisan las medias del comportamiento en campo con respecto a la presencia o ausencia de la banda RAPD 3, las diferencias son importantes y no se solapan; siendo una evidencia estadística de la posible asociación de esta secuencia de ADN.

Los genotipos que presentan la banda 3 expresan una mayor afectación a los 7 y 14 días después de aplicación del herbicida, así como una menor tolerancia reflejada en la variable altura de planta, peso de mazorca y rendimiento. Estos genotipos son los denominados T5 y T6, padre e híbrido SK-5050 respectivamente, lo que coincide con la herencia dominante de este tipo de marcador, ya que al presentar el padre la banda, esta debe aparecer en la descendencia, es decir en el híbrido SK-5050.

Estos resultados coinciden con lo observado por Pataky *et al.*, (2008), quienes encontraron la expresión de un simple alelo de susceptibilidad (correspondiente en nuestro caso al comportamiento del T5), en genotipos de maíz. Sin embargo, es preciso aislar y secuenciar dicha banda RAPD, a fin de desarrollar un marcador tipo SCAR y verificar en otros genotipos susceptibles la presencia o no de la misma.

Resulta sumamente interesante que el híbrido SK-5050, reúna en su genoma tanto a T5 (padre), genotipo que mostró una alta susceptibilidad al nicosulfuron, como a T4 (madre, y genéticamente idéntica a T1), cultivar que mostró mayor tolerancia a dicho herbicida, característica que se transmitió a la descendencia, T6 (Híbrido SK-5050).

Los resultados observados en el comportamiento de ambos padres y el híbrido resultante de este cruzamiento coinciden casi exactamente con lo observado por Pataky *et al.*, (2009), quien cruzó materiales homocigotas recesivos (susceptibles a nicosulfuron y mesotrione), los cuales morían al poco tiempo de asperjados, con cultivares homocigotas dominantes (tolerantes en alto grado al nicosulfuron y mesotrione), dando como resultado híbridos o progenies heterocigotas para el carácter. Estos cultivares heterocigotas si bien fueron afectados en alguna forma por estos herbicidas, mostraron un comportamiento intermedio más parecido al homocigota dominante para la tolerancia y hacia el final del ciclo se recuperaron, obteniéndose buenos rendimientos.

**Cuadro 38. Medias y desviación para las variables Índices de Afectación a los 7 y a los 14 días después de la aplicación del herbicida nicosulfuron (7 y 14 dda), y los Índices de Tolerancia al Estrés (ITS) para las variables altura de planta, peso de mazorca y rendimiento, de progenitores e híbridos de maíz, en relación a la presencia o ausencia de bandas RAPD.**

Banda RAPD		Índice de Afectación 7 dda		Índice de Afectación 14 dda		ITS Altura de planta		ITS Peso de Mazorca		ITS Rendimiento	
		Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar
Banda 1	Ausencia	2,12	1,29	1,98	2,15	0,82	0,35	0,97	0,64	1,01	0,79
	Presencia	2,44	0,79	1,26	0,28	1,02	0,08	1,06	0,12	1,04	0,11
Banda 2	Ausencia	1,43	0,75	1,09	0,16	0,97	0,06	1,04	0,15	1,05	0,13
	Presencia	2,60	0,98	1,78	1,73	0,91	0,30	1,01	0,51	1,02	0,63
Banda 3	Ausencia	2,08	0,90	1,21	0,26	1,00	0,08	1,10	0,37	1,10	0,50
	Presencia	3,63	1,06	4,11	3,29	0,46	0,51	0,51	0,56	0,52	0,57
Banda 4	Ausencia	2,93	0,12	1,10	0,07	0,93	0,08	1,02	0,10	1,04	0,05
	Presencia	2,24	1,08	1,63	1,56	0,93	0,27	1,02	0,46	1,02	0,56
Banda 5	Ausencia	2,50	1,04	1,79	1,73	0,90	0,30	1,00	0,51	1,00	0,63
	Presencia	1,72	0,91	1,07	0,13	0,98	0,07	1,09	0,12	1,10	0,10
Banda 7	Ausencia	2,31	0,82	1,24	0,13	1,02	0,09	1,04	0,09	1,00	0,07
	Presencia	2,28	1,14	1,73	1,75	0,89	0,30	1,01	0,52	1,04	0,63

## **CONCLUSIONES**

1. El genotipo T5 (Padre del SK-5050) fue el único genotipo que resultó altamente susceptible al nicosulfuron, tanto en campo como en invernadero, superando ampliamente al testigo susceptible del presente estudio (Pioneer 3031).
2. El progenitor madre del híbrido SK-5007 (identificado como T1, e idéntico genéticamente a T4) resultó altamente tolerante al herbicida nicosulfuron, tanto en condiciones de campo como invernadero.
3. El resto de los materiales evaluados en este trabajo mostraron tolerancia al herbicida nicosulfuron en campo, presentando solo síntomas leves de daño y recuperándose con el transcurso de las semanas bajo las condiciones del presente estudio.
4. Las variables vegetativas Altura de Planta, Altura de Mazorca, Diámetro de tallo y Número de Plantas cosechadas, lograron diferenciar al genotipo altamente susceptible del resto de los cultivares evaluados. Sin embargo no permitieron diferenciar con claridad el nivel de susceptibilidad y/o tolerancia del resto de genotipos entre si al nicosulfuron.
5. Las variables de productividad (peso de mazorca, peso de grano y rendimiento) y componentes del rendimiento (número de granos por hilera y número de hileras por mazorca), lograron diferenciar al genotipo altamente susceptible del resto de los cultivares evaluados. Sin embargo no permitieron diferenciar con claridad el nivel de susceptibilidad y/o tolerancia del resto de genotipos entre sí al nicosulfuron.
6. Las variables Índice de Afectación de Plantas, y los Índices de Tolerancia a estrés del Peso de Mazorca, Peso de Grano y Rendimiento, fueron las que permitieron diferenciar mejor la selectividad del nicosulfuron a los diferentes materiales evaluados.

7. Las floraciones femenina y masculina en varios genotipos resultó afectada por la aplicación de nicosulfuron, siendo este un factor a tener en cuenta en la producción de semillas.
8. La  $ED_{50}$  del genotipo altamente susceptible (Padre del SK-5050) fue menor a  $2 \text{ g ia h}^{-1}$
9. La  $ED_{50}$  del genotipo más tolerante (Madre del SK-5007 y del SK-5050) fue superior a  $75 \text{ g ia h}^{-1}$  (Mayor al doble de la dosis máxima recomendada por el fabricante del herbicida).
10. La tolerancia al nicosulfuron observada en la madre del SK-5007 (y del SK-5050), es de tipo metabólica.
11. El insecticida que inhibió al complejo citocromo P-450 del genotipo más tolerante fue el Clorpirifos (Fosforado).
12. El análisis molecular mediante RAPD resulto ser suficiente para evidenciar las relaciones entre progenitores e híbridos de maíz.
13. Una banda RAPD, denominada 3, mostró evidencia de asociación con el comportamiento en cuanto a la susceptibilidad de los genotipos al nicosulfuron y permitió discriminar con claridad los genotipos asociados a dicha susceptibilidad.

## **RECOMENDACIONES**

1. No se debe producir el Híbrido SK-5050 (SEHIVECA) con aplicación del herbicida nicosulfuron (Accent, Sanson), pues la muerte del padre, impediría la producción de la semilla del híbrido y debido precisamente a la altísima susceptibilidad del progenitor paterno, no se recomienda siquiera hacer la aplicación dirigida.
2. El resto de los híbridos evaluados (SEHIVECA e HIMECA), se pueden producir bajo aplicación de nicosulfuron (Mientras se respeten las normas del fabricante).
3. Se hace necesario un estudio para confirmar las coincidencias en la floración de los padres en la producción de los híbridos poco susceptibles al nicosulfuron, pues aunque las variaciones en las fechas de floración femenina y masculina fueron pequeñas, pudiera verse afectada la polinización y, por ende, la cantidad de semilla producida.
4. Aunque las variables de productividad no discriminaron claramente todos los genotipos por susceptibilidad al nicosulfuron, se recomienda su evaluación ya que con ellas se logra construir los Índices de Tolerancia a estrés (ITS), los cuales arrojaron información importante sobre los materiales evaluados
5. Se recomienda utilizar las variables Índice de Afectación de Plantas, Índices de Tolerancia a estrés del Peso de Mazorcas, Peso de Grano y Rendimiento para determinar la selectividad del nicosulfuron a cultivares de maíz.
6. Se recomienda hacer un ensayo de respuesta a dosis con nicosulfuron y el genotipo más tolerante (Madre de los híbridos SK-5007 y SK-5050) con el fin de determinar con mayor precisión la  $ED_{50}$  de dicho material.
7. Se recomienda la realización de un nuevo ensayo de inhibición del complejo P-450 utilizando los insecticidas Clorpirifos Malation y Metomilo a diferentes dosis para determinar con mayor precisión las relaciones de sinergismo y antagonismo entre estos insecticidas y el nicosulfuron en los genotipos del presente estudio

8. Se recomienda secuenciar el fragmento del genoma que fue amplificado con la banda 3, para luego diseñar los primers respectivos para un nuevo análisis que permita la asociación directa de esta banda con la susceptibilidad a nicosulfuron en genotipos de maíz.
9. Se recomienda una estrategia de mejoramiento genético cruzando líneas endocriadas sensibles (homocigota recesiva) x líneas tolerantes (homocigota dominante) para generar individuos heterocigotas con una mayor tolerancia al herbicida nicosulfuron, con la finalidad de reducir de forma importante la frecuencia y severidad del grado de afectación de los materiales altamente sensibles a dicho herbicida.
10. Se recomienda el uso de sustancias que funjan como activadoras o potenciadoras del CYT P-450 (como el Isoxadifen-etil), en aquellos materiales poco afectados por el nicosulfuron (heterocigotas para el carácter), de esta forma se estimularía el metabolismo del herbicida en los individuos, disminuyendo el nivel de daño en estos.

## **BIBLIOGRAFIA**

Aagaard, E.; Krutovskii V.; Strauss S. 1998. RAPDs and allozymes exhibit similar levels of diversity and differentiation among populations and races of Douglas-fir. *Heredity* 81:69-78.

Adames, S. 2008. Evaluación del efecto del herbicida nicosulfuron sobre diferentes materiales genéticos de maíz (*Zea mays* L.) en Venezuela. Trabajo de Grado. Universidad Centro Occidental "Lisandro Alvarado". Cabudare, Estado Lara, Venezuela. 60p.

Agudelo, C. (1976), Historial del Mejoramiento Genético en Venezuela. 1er Seminario Interinstitucional del Maíz y Sorgo. 2-10.

Alam, 1974. Resumen del panel sobre métodos de evaluación de control de malezas en Latinoamérica. II Congreso de ALAM, Cali, Colombia. Revista de la Asociación Latinoamericana de Malezas, 1(1): 6-12.

Allen, H., Downes, J., Mees, G.; Springett, R. 1978. Selective herbicides. In: Fifty years of Agricultural Research (1928-1978) (pp. 35-41). Birmingham: The Kynoch Press.

Ashton, F.; Craft, M.; Craft, A. 1981. Mode of action of herbicides. Wiley Interscience. New York, USA. 525 p.

Ascencio, J. (2000). Fisiología de la planta de maíz. . Fundación Polar. El Maíz en Venezuela. Cap 2, pp 33.

Anzalone, A.; Gámez, A.; Meléndez, L. 2006. Evaluación de la interferencia de *Rottboellia cochinchinensis* sobre el maíz (*Zea mays* L.) a través de un método

aditivo. Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia 23: 373-383.

Anzalone, A. 2008. Herbicidas: Modos y mecanismos de acción en plantas. Fondo editorial de la universidad centro occidental Lisandro Alvarado. Barquisimeto, Venezuela 114 p.

Appleby, A. 1998. The practical implications of hormetic effects of herbicides on plants. *Human & Experimental Toxicology*, 17, 270-271.

Baerg, R.; Barrett, M.; Polge, N. 1996. Insecticide and insecticide metabolite interactions with cytochrome P450 mediated activities in maize, *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 55:10

Barra M.; Salazar E.; Beltran M.; Sagredo B. 2012. Simple and robust DNA extraction method for the large-scale analysis of genotypes containing high polyphenolic content, such as landraces of *Solanum tuberosum* and *Zea mays*. *Ciencia e Investigación Agraria*. 39(3):593-601. Chile

Barrett, M.; Polge, N.; Baerg, R.; Bradshaw, R.; Poneleit, C. 1997. Role of cytochrome P450 in herbicide metabolism and selectivity and multiple herbicide metabolizing cytochrome P450 activities in maize, p. 35-50. In: Hatzios, K. (ed.). *Regulation of enzymatic systems detoxifying xenobiotics in plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Baumann, P.; Dotray, P.; Prostko, E. 1998. Herbicide mode of action and injury symptomatology. SCS-1998-07. Texas A&M University Texas Agricultural Extension Service. College Station, TX, USA. 10 p.

Beadle, G. 1932a. Studies of *Euchlaena* and its hybrids with *Zea*. I. Chromosome behavior in *Euchlaena mexicana* and its hybrids with *Zea mays*. Zeitschr. Abstam. Vererbungsl. 62: 291- 304

Beadle, G. 1932b. The relation of crossing over to chromosome association in *Zea-Euchlaena* hybrids. Genetics 17: 481-501.

Beadle, G. 1939. Teosinte and the origin of maize. J. Heredity 30: 245-247.

Beadle, G. 1972. The mystery of maize. Field Mus. Nat.Hist. Bull. 43: 9-11.

Beadle, G. 1980. The Ancestry of Corn. Scientific American 242(1):112-119

Beal, J. 1880. Indian corn. Mich. State Board Agr. Ann. Rpt., 19: 279-289.

Beckie, H.; Heap, I.; Smeda, R. and Hall, L. 2000. Screening for herbicide resistance in weeds. Weed Technology 14: 428-445.

Bejarano A. (2000), Características Botánicas del Maíz. Fundación Polar. El Maíz en Venezuela. Cap 2, pp 27.

Belz, R.; Duke, S. 2014. Herbicides and plant hormesis. Pest Management Science; 70: 698–707

Bernasconi, P.; Woodworth, A.; Rosen, B.; Subramanian M.; Siehl, D. 1995. A naturally occurring point mutation confers broad range tolerance to herbicides that target acetolactate synthase. Journal Biology Chemistry 270: 17381-17385.

Beyer, E., Duffy M., Hay J.; Schlueter D. 1988. Sulfonylurea herbicides, p117-189 in pc Kearney and DD Kauffman eds. Herbicides: Chemistry, degradation, and mode of action. 3 rolde. Marcel Dekker INC. New York.

Black, S; Coon, M. 1986. Cytochrome P450, pp 161-216, P Ortiz de Montellano, ed. Plenum, New York.

Boutsalis, P.; Powles, S. 1995. Inheritance and mechanism of resistance to herbicides inhibiting acetolactate synthase in *Sonchus oleraceus* L. Theoretical Applied Genetics 91: 242-247.

Boutsalis, P.; Karotam, J.; Powles, S. 1999. Molecular basis of resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in *Sisymbrium orientale* and *Brassica tournefortii*. Pesticide Science 55: 507-516.

Calabrese, E.; Baldwin, L. (1998). Hormesis as a biological hypothesis. Environmental Health Perspectives, 106, 357-362.

Calabrese, E.; Baldwin, L. (2002). Defining hormesis. Human & Experimental Toxicology, 21, 91-97.

Calabrese, E. (2008). Hormesis: Why it is important to toxicology and toxicologist. Environmental Toxicology and Chemistry, 27(7), 1451-1427.

Calabrese, E. 2008. Converging concepts: adaptive response, preconditioning, and the Yerkes-Dodson Law are manifestations of hormesis. Ageing Res Rev.;7:8-20.

Carey, J.; Pender, D.; Kells, J. 1997. Physiological Basis for Nicosulfuron and Primsulfuron Selectivity in Five Plant Species. Weed Science. 45: 22-30

Carriquiry, A.; Ríos, A. 2007. Herbicidas sulfonilúreas en cereales de invierno Seminario de actualización técnica manejo de malezas. Young, Rio Negro. Serie actividades de difusión 487

Carrillo, P. 2012. El Maíz en Venezuela. Disponible en: <http://historiademaizvzla.blogspot.com> [Consultado: 19/06/2014]

Cartay, R. 2000. El Consumo de Maíz en Venezuela. Fundación Polar. El Maíz en Venezuela. Caracas, Venezuela 439 p.

Caseley, J. 1996. Herbicidas. *In*: Labrada, R., Caseley J. C. & Parker, C. (eds.) Manejo de malezas para países en desarrollo. Estudio FAO. Producción y Protección Vegetal 120. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/T1147S/t1147s05.htm>. [Consultado el 10 de Noviembre de 2014].

Cavaleri, D.; Oliveira Junior, R.; Constantin, J.; Biffe, D; Rios, F.; Franchini, L. 2008 Tolerância de híbridos de milho ao herbicidas nicosulfuron. *Planta Daninha*, v. 26, n. 1, p. 203-214.

Chaleff, R.; Mauvais, C. 1984. Acetolactate synthase is the site of action of two sulfonylurea herbicides in higher plants. *Science* 224: 1443-1445

Christopher, J.; Preston, C.; Powles, B. 1994. Malathion antagonizes metabolism-based chlorsulfuron resistance in *Lolium rigidum*. *Pesticide Biochemistry Physiology*.49:172-182.

CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo). 2006. Protocolos de laboratorio: Laboratorio de Genética Molecular Aplicada del CIMMYT. 3 ed.El Batán Texcoco, Méx. 62 p.

Cobb, A.; Reade, J. 2010. Herbicides and plant physiology. 2nd ed. Wiley-Blacwell. Singapore. 286 p.

Colby, S. 1967. Calculating Synergistic and Antagonistic Responses of Herbicide Combinations. *Weeds*, V. 15, N. 1, P. 20-22.

Corbett, C.; Tardif, F. 2006. Detection of resistance to acetolactate synthase inhibitors in weeds with emphasis on DNA-based techniques: a review. *Pest Management Science* 62: 584-597

Damião Filho, C.; Môro, F.; Taveira, L. Respostas de híbridos de milho ao nicosulfuron. Aspectos biológicos e da produção. *Planta Daninha*, v. 14, n. 1, p. 3-13, 1996.

De Liñan C. 2004 *Vademécum de productos fitosanitarios y nutricionales*. Ediciones Agrotecnica p. 236

Devine, M.; Preston, C. 2000. *Herbicides and their mechanisms of action*. Cobb, A. and R. Kirkwood. Sheffield Academic Press. 77-79.

Devine, M.; Shukla, A. 2000. Altered target sites as a mechanism of herbicide resistance. *Crop Protection* 19: 881-889.

Díaz, A. 2005. *Marcadores Moleculares*. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, Instituto y Departamento de Genética. Maracay Estado Aragua. 101 p

Doolittle, E.; Mabry, J. 2006. Environmental mosaic, agricultural diversity, and the evolutionary adoption of maize in the American Southwest. En: Staller, J. E.; R. H. Tykot; B. Benz (eds.) *Histories of maize multidisciplinary approaches to the prehistory, linguistics, biogeography, domestication and evolution of maize*. Academic Press. San Diego. pp. 109-121

Doebley, J. 1990. Molecular evidence and the evolution of maize. *Econ. Bot.*44 (3 Suppl.):6–2

Doyle, J.; Doyle, J. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bull* 19:11-15

Duke, S.; Dayan, F. 2001. Classification and mode of action of the herbicides. En: *Uso de Herbicidas en la Agricultura del Siglo XXI*. Servicio de Publicaciones. Universidad de Córdoba, España.

Duke, S., Cedergreen, N., Edivaldo, V.; Belz, R. 2006. Hormesis: Is it an important factor in herbicide use and allelopathy? *Outlooks on Pest Management*, 17(1), 29-33.

Duvick, D. 2002. Crop breeding in the twenty-first century. In Manjit Kang (ed.) *Crop Improvement: Challenges in Twenty-first Century*. The Haworth Press, Inc., Binghampton, NY p.13-14

Emerson, R.; Beadle, G. 1932. Studies of *Euchlaena* and its hybrids with *Zea*. II. Crossing over between the chromosomes of *Euchlaena* and those of *Zea*. *Zeitschr. Abtam. Vererbungsl.* 62: 305-315.

FAO, 2015. FAOSTAT Disponible en [http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/\\*/E](http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/*/E) [Consultado: 25/01/2015]

FEDEAGRO, 2016. Estadísticas Agrícolas. Disponible en <http://www.fedeagro.org/produccion/Rubros.asp> [Consultado: 06/01/2016]

Ferguson, G.; Hamill, A.; Tardif, F. 2001. ALS inhibitor resistance in populations of powell amaranth and redroot pigweed. *Weed Science* 49: 448-453.

Fernandez, J. 1992. Effective selection criteria for assessing plant tolerance. Adaptation of food crops to temperature and water stress. Proceedings of an International Symposium. Taiwan, C. George Kuo, Editor pp. 257-270.

Ferreira, M.; Grattapaglia, D. 1995. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. EMPRAPA. Brasilia. Págs.: 37-39.

Fischer A.; Maurer,R. 1978. Drought resistance in spring wheat cultivars. Grain yield responses. Aust. J. Agric. Res. 29:897-912.

Fischer, A. 2010. Evaluación de Mezclas de Herbicidas. *En*: Curso de actualización en metodologías para la investigación y el desarrollo tecnológico en las ciencias de las malezas y XIII Congreso de la Sociedad Venezolana para el Combate de Malezas (SOVECOM). El Malezologo Edición Especial. Sociedad Venezolana para el Combate de Malezas (SOVECOM). Barquisimeto. Lara. 118-125 p

Fischer, A. 2013. Resistencia a herbicidas: mecanismos y mitigación. Revista Especial de Malezas. Aapresid. 7p. Disponible en:[http://www.aapresid.org.ar/rem/wpcontent/uploads/sites/3/2013/02/REMSD12\\_002.pdf](http://www.aapresid.org.ar/rem/wpcontent/uploads/sites/3/2013/02/REMSD12_002.pdf) [Consulta: 23 de Julio 2014]

Fonne-pfister, R., Gaudin, J., Kreuz, K.. 1990. Hydroxylation of primisulfuron by inducible cytochrome P450 dependent monooxygenase system from maize. Pesticide Biochemistry Physiology, v.37, n.1, p.165-173.

Forthoffer N.; Helvig C.; Dillon N., Benveniste I.; Zimmerlin A.; Tardif F.; Salaún J. 2001. Induction and inactivation of a cytochrome P450 conferring herbicide resistance in wheat seedlings. EJCPA. 26, 9-16.

Frey, M.; Kliem, R.; Saedler, H.; Gierl, A. 1995. Expression of a cytochrome P450 gene family in maize. *Mol. Gen. Genet.* 246:100–109.

Friesen, S.; Ferguson, G.; Hall, C. 2000. Management strategies for attenuating herbicide resistance: untoward consequences of their promotion. *Crop Protection* 19: 891-895

Fuentes, C.; Leroux, G. 2001. Análisis Genético de la Tolerancia al Herbicida Rimsulfuron en el Maíz (*Zea mays* L.). *Agronomía Colombiana*, 2001.18 (1-2): 7-13

Galinat, W. 1971. The origin of maize. *Annual Review of Genetics* 5: 447-478

Gámez, A.; Ramis, C.; Zambrano, C. 2013. Caracterización enzimática y molecular al herbicida nicosulfurón en poblaciones de *Rottboelia colchinchinensis* (Lour) W.Clayton. *Bioagro* 25 (1) 3-10.

Gerwick, B.; Mireles, L.; Eilers, R. 1993. Rapid diagnosis of ALS/AHAS-resistant weeds. *Weed Technology* 7: 519-524

González, R. 2005 Evaluación de la Tolerancia de siete híbridos de maíces tropicales de maíz Amarillo (*Zea mays*) a los herbicidas Thifensulfuron+rimsulfuron en flor amarilla estado Carabobo. Trabajo de Grado pregrado. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela, Maracay, Venezuela. 77 p

Gonzalez-Mendoza, D. 2007. El Complejo Enzimático Citocromo P450 En Las Plantas. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 23 (4) 177-183. Mexico

Grant, U.; Hatheway, W.; Timothy, D.; Cassalett, D.; Roberts, L. 1965. Razas de maíz en Venezuela. Bogotá, Colombia. Instituto Colombiano Agropecuario. Boletín Técnico Num. 1. Editorial ABC. 92 p.

Green, J.; Ulrich, J. 1993. Response of corn inbreds and hybrids to sulfonylurea herbicides. *Weed Science*. 41:508-516

Green, J.; Ulrich, J. 1994. Response of Maize (*Zea mays*) inbreds and hybrids to Rimsulfuron. *Pesticide Science*. 40:187-191

Gressel, J. 1990. Synergizing Herbicides, *Rev. Weed Science*. 5: 49-82

Guengerich, F. 2013. New trends in cytochrome P450 research at the half-century mark. *J Biol Chem.*;288:17063-4.

Gumilla, J. 1791. *El Orinoco Ilustrado y Defendido*. Biblioteca de la Academia Nacional de la Historia. Caracas, Venezuela, 1963. pp. 524. (Serie: Fuentes para la Historia Colonial de Venezuela, N° 68)

Gunsolus, J.; Curran, W. 1996. Herbicide mode of action and injury symptoms. North Central Regional Publication 377. University of Minnesota Extension Service. St Paul, MN, USA. 22 p.

Gutiérrez, G.; García, E.; Arellano, J.; Virgen, J.; Ramírez, G. 2009. Comparación Molecular de la Identidad Genética de Genotipos de Maíz de Diferente Edad. *Agronomía Mesoamericana* 20(1):01-09.

Guttieri, M.; Eberlin, C.; Mallory-Smith, C.; Thill, D.; Hoffman, D. 1992. DNA sequence variation in Domain A of the acetolactate synthase genes of herbicide-resistant and susceptible weed biotypes. *Weed Science* 40: 670-676.

Hall, L.; Stromme, K.; Horsman, G.; Devine, M. 1998. Resistance to acetolactate synthase inhibitors and quinclorac in biotype of false cleavers (*Galiumspurium*). *Weed Science* 46: 390-396..

Hallauer, A.; Carena, M. 2009. Maize breeding. In Carena MJ (ed.) Handbook of plant breeding: cereals. Springer, New York, p. 3-9

Hart, S.; Saunders, J.; Penner, D. 1993. Semidominant Nature of Monogenic Sulfonylurea Herbicides Resistance in Sugar beet (*Beta vulgaris*). Weed Science 41:317-324.

Hatzios, K. 1991. Biotransformations of herbicides in higher plants. 141-185. In: Grover, R. & Cessba, A. J. (eds.). Environmental chemistry of herbicides. CRC Press, London, UK.

Hay, J. 1990. Chemistry of sulfonylurea herbicides. Pesticide Sciences, 29:247-261.

Heap, I. 1994. Identification and documentation of herbicide resistance. Phytprotection vol. 75, (4): 85-90.

Heap, I. 1997. The Occurrence of herbicide-Resistant Weeds Worldwide Pesticide Science. 51: 235-243.

Heap, I. 2005. Criteria for Confirmation of Herbicide-Resistant Weeds with specific emphasis on confirming low level resistance. Disponible en: <http://www.weedscience.org>. [Consulta: 02 de Julio 2014].

Heap, I. 2011. International Survey of Herbicide Resistant Weeds, Disponible en <http://www.weedscience.org/>[Consulta: 28 de Julio 2014].

Hernández, A.; San Vicente, F.; Figueroa R. 2010. Evaluación y Caracterización de Líneas Parentales de Híbridos (*Zea mays* L) de Maíz en tres ambientes de Venezuela. Interciencia 35 (4).

Hernández, M.; Mejías J. 1996, Comparación de la selectividad de nicosulfurón (4% SC) aplicado solo y en mezclas con 6 herbicidas en los híbridos de maíz amarillo (*Zea mays* L) CENIAP PB-8 (Blanco), Himeca-95 (Amarillo). Resumen VII jornadas técnicas biológicas y combate de maleza, Maracay estado Aragua 7p.

Hernández, M.; Mejía, J.; Lazo, J. 2000 b. Selectividad del nicosulfuron (4%SC) en cuatro híbrido dobles de maíz amarillo (*Zea mays* L). Revista Facultad de Agronomía (UCV) 26: 79-89.

Hinz, J.; Owen, M. 1997. Acetolactate synthase resistance in common waterhemp (*Amaranthus rudis*) population. WeedTechnology 11: 13-18.

Hinrichsen, P.; Amigo, C.; Alvarado, R.; Muñoz, C. 1996. Identificación de variedades chilenas de arroz (*Oryza sativa* L.): evaluación del uso de perfiles proteicos y de fragmentos polimórficos amplificados al azar (RAPD). Agricultura Técnica. Chile. 56:1-10.

Hoffmann, G. 2009. A perspective on the scientific, philosophical, and policy dimensions of hormesis. Dose-Response.7: 1-51.

Jasienuk, M.; Brûlé-Babel A.; Morrison, I. 1996. The evolution and genetics of herbicide resistance in weeds. Weed Science 44:176–193.

Jones, D. 1918. The effects of inbreeding and cross-breeding upon development. Conn. Agric. Exp. Sta. Bull., 207: 5-100.

Jugenheimer, R. 1988. Maíz, variedades mejoradas, métodos de cultivo y producción de semillas. Limusa. México.

Kang, M. 1993. Inheritance of susceptibility to nicosulfuron herbicide in maize. *J. Hered.* 84:216-217.

Klein-Lankhorst, R.; Vermut, A.; Weide, R.; Liharska, T.; Zabel, P. 1991. Isolation of molecular markers for tomato (*L. esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Theor. App l. Ge net.* 85:961-968.

Koeppe M.; Hirata C.; Brown H.; Kenyon W.; O'Keefe D.; Lau S.; Zimmerman W.; Green J. (2000). Basis of selectivity of the herbicide rimsulfuron in maize. *Pest Biochem. Physiol.* 66, 170-181.

Kreuz, K.; Fonné-Pfister, R. 1992. Herbicide–insecticide interaction in maize: malathion inhibits cytochrome P450-dependent primisulfuron metabolism. *Pesticide Biochemistry Physiology.*43:232-240

Kreuz, K.; Tommasini, R.; Martinoia, E. 1996. Old enzymes for a new job. *Plant Physiol.* 111: 349-353

Kruse, N.; Vidal, R.; Trezzi, M. 2006a. Curvas De Resposta e Isobograma como forma de Descrever a Associação de Herbicidas Inibidores do Fotossistema li e da Síntese de Carotenóides. *Planta Daninha*, V. 24, N. 3, P. 579-587.

Kruse, N.; Vidal, R.; Trezzi, M. 2006b. Ultrastructural Modifications in Sunflower (*Helianthus Annuus* L.) Chloroplasts Resulting from the Mixture of the Herbicides Metribuzin and Clomazone. *J. Food Agric. Environ.*, V. 4, N. 1, P. 175-179.

Kwon, C.;Penner, D. 1995.Response of a chlorsulfuron-resistant biotype of *Kochiascoparia* to ALS inhibiting herbicides and piperonylbutoxide.*WeedScience* 43: 561-565.

Langham D, (1942a) Venezuela-1, una selección de maíz recomendable. Circular N° 2, Instituto Experimental de Agricultura y Zootecnia, Caracas 8pp. Reproducido por El Agricultor Venezolano, 8. 91-92.

Lasat, M.; Di Tomaso, J.; Hart, J.; Kochian, L. 1997. Evidence for vacuolar sequestration of paraquat in roots of a paraquat-resistant *Hordeum glaucum* biotype. *Physiology Plantarum* 99: 255-262.

Lanza, L.; de Souza, C.; Ottoboni, L.; Vieira, M. 1997. Genetic distance of inbred lines and prediction of maize single-cross performance using RAPD markers. *Theoretical. Applied. Genetics* .94: 1023-1030.

Limpel, L.; Schuldt, P.; Lamont, D. 1962. Weed Control by Dimethyl Tetrachloroterephthalate Alone and in Certain Combinations. *Proc. North. Weed Control Conf.*, V. 16, P. 48-53.

Lonnquist, J.; Gardner, C. 1961. Heterosis in intervarietal crosses in maize and its implications in breeding procedures. *Crop Sci.*, 1: 179-183.

López, A. 2012. Maíz en Venezuela. *Producción Actual Venezolana*. Disponible en <http://historiademaizvznla.blogspot.com> [Consulta: 04 de Mayo 2014]

Mallory-Smith, C.; Thill, D.; Dial, M. 1990. Identification of sulfonylurea herbicide-resistant prickly lettuce (*Lactuca serriola*). *Weed Technology* 4: 163-168.

Mallory-Smith, C.; Thill, D.; Dial, M.; Zemetra, R. 1991. Inheritance of sulfonylurea herbicide resistant prickly lettuce (*Lactuca serriola*) and domestic lettuce (*Lactuca sativa*). *Herbicide Resistance in Weeds and Crops*. 452-453 p.

Mangelsdorf, P.; Reeves, R. 1959a. The origin of corn. I. Pod corn, the ancestral form. *Bot. Mus. Leaflets*, Harvard University, Cambridge, Mass. Pp 329-355.

Mangelsdorf, P. 1961. Introgression in maize. *Euphytica* 10: 157-168.

Mangelsdorf, P.; Sanoja M. 1965. Early archaeological maize from Venezuela. *Botanical Museum Leaflets* 21, Harvard University. 105-112

Matsuoka, Y.; Vigouroux, M.; Goodman, J.; Sánchez, G.; Buckler, E.; Doebley, J. 2002. A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99 (6): 6080-6084.

McClintock, B.; Kato, Y.; Blumenschein, A. 1981. Chromosome Constitution of Races of Maize. It's Significance in the Interpretation of Relationships between Races and Varieties in the Americas. Colegio de Postgraduados, Chapingo, México. 135p

Mcdonald, M.; Elliot, J.; Sweeney, P. 1994. DNA extraction from dry seeds for RAPD analysis in varietal identification studies. *Seed Science and Technology* 22:171-176.

Medina, S.; Segovia, V. 1995. Evaluación de variedades experimentales de maíz en la región Nor-Oriental del estado Guárico-Venezuela. *Agronomía tropical* 46 (2): 171-187.

Mejía. J. 1993, Control de maleza en el cultivo del maíz (*Zea mays* L). Introducción a la fisiología de herbicidas y al control de maleza en Venezuela. Coordinación de extensión agrícola. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, Maracay estado Aragua. 128p

Mejías, L. 2004. Tolerancia de siete híbridos de maíz a Nicosulfurón en la estación experimental Samán Mocho (Edo Carabobo). Trabajo de Grado pregrado. Universidad Central de Venezuela. Maracay. Venezuela. 64p

Moll, R; Salhuana, W.; Robinson, H. 1962. Heterosis and genetic diversity in variety crosses of maize. *Crop Sci.*, 2: 197-198.

Mónaco, T.; Weller, S.; Ashton, F. 2002. *Weed science, Principles and Practices* wiley.(4th ed), John Wiley & Sons, Inc., New York.

Monqueiro, P.; Christoffoleti, P.; Carrer, H. 2003. Biology, Management and Biochemical/Genetic characterization of weed biotypes resistant to acetolactate synthase inhibitor herbicides. *Scientia Agricola* 60:3: 495-503.

Môro, V.; Damião filho, F. 1999. Alterações morfoanatômicas das folhas de milho submetidas à aplicação de nicosulfuron. *Planta Daninha*, v. 17, n. 3, p. 331-337

Morton, C.; Harvey, R, 1992, Sweet Corn (zea mays) hybrid tolerance to nicosulfurón. *Weed Technology* 6 (1): 91-96.

Narváez, R.; Valenzuela, B.; Muñoz, J.; Hinrichsen R. 2000. Comparación de RAPD y AFLP como Métodos de Identificación Genética de Vid Basados en el Estudio de Fragmentos Genómicos Anónimos. *Agricultura Técnica*, 60(4), 320-340

Nordby, J.; Williams, M.; Pataky, J.; Riechers, D. 2008. A common genetic basis in sweet corn inbred Cr1 for cross-sensitivity to multiple cytochrome P450-metabolized herbicides. *Weed Sci.* 56:376–382.

Obregón, P. 2000. Mejoramiento Genético del Maíz en Venezuela. En: *El Maíz en Venezuela*, Capítulo 4, Sección. 9. Fundación Polar. Caracas, Venezuela. 529p

Ordeñana, O. 1994. Herbicidas, Agronomía de Cultivos y control de malezas. Grafimpac S.A Guayaquil, Ecuador. pp 119 - 310

Ortiz, A.; Martinez, L.; Quintana, Y.; Perez, P.; Fischer, A. 2014. Resistencia de la paja johnson [*Sorghum halepense* (L.) Pers.] a los herbicidas nicosulfuron y foramsulfuron+iodosulfuron en Venezuela. *Bioagro*, Barquisimeto, 26: 2.

O'Sullivan, J., Sikkema, P., Thomas, R., 2000. Sweet corn (*Zea mays*) cultivar tolerance to nicosulfuron. *Can. J. Plant Sci.* 80, 419–423.

O'Sullivan, J., Zandstra, J., Sikkema, P., 2002. Sweet corn (*Zea mays*) cultivar sensitivity to mesotrione. *Weed Technol.* 16, 421–425.

Osuna, M.; Vidotto, F.; Fischer, A.; Bayer, D.; De Prado, R.; Ferrero, A. 2002. Cross-Resistance to bispyribac-sodium and bensulfuron-Methyl in *Echinochloa phyllopogon* and *Cyperus difformis*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 73: 9-17.

Oviedos, J. 1824. Historia de la conquista y población de la provincia de Venezuela. Reimpreso en Caracas. Imprenta Navas Spinola. Caracas, Venezuela. 615 p

Papa, J.; Felizia, J.; Esteban, A. 2000. Tolerancia y Resistencia a Herbicidas. Pasturas: Combate de Plagas y Malezas. Disponible en: [www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar) Consulta: [Consulta: 29 de Mayo 2014]

Pataky, J.; Nordby, J.; Williams, M.; Riechers, D. 2006b. Inheritance of cross-sensitivity in sweet corn to herbicides applied post emergence. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 131:744–751.

Pataky, J.; Meyer, M.; Boilman, J.; Boerboom, C.; Williams, M. 2008. Genetic Basis for Varied Levels of Injury to Sweet Corn Hybrids from Three Cytochrome P450-metabolized Herbicides. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 133 (3) : 438-447.

Pataky, J.; Williams, M. 2008. Further Evidence of a Genetic Basis for Varied Levels of Injury to Sweet Corn Hybrids from Cytochrome P450-metabolized Herbicides Applied Post emergence. *Hortscience* 43 (7): 2093–2097.

Pataky, J.; Williams, M.; Riechers, D.; Meyer, M. 2009. A Common Genetic Basis for Cross-sensitivity to Mesotrione and Nicosulfuron in Sweet Corn Hybrid Cultivars and Inbreds Grown throughout North America. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 134(2):252–260.

Paterniani E. (2000). Evolución del Maíz. En: *El Maíz en Venezuela*. Fundación Polar. Caracas, Venezuela. 529p

Penner, G. 1996. RAPD analysis of plant genomes. *Methods of genome analysis in plants* 15:251-264.

Pérez, A.; Kogan, M. 2001. Resistencia de malezas a herbicidas. *Agronomía y Forestal UC* 13, 3-9 Disponible en:[www.puc.cl/agronomia/c\\_extension/Revista/Ediciones/13/informe.pdf-Resultado](http://www.puc.cl/agronomia/c_extension/Revista/Ediciones/13/informe.pdf-Resultado) [Consulta: 18 de Julio 2014]

Pérez, A. Kogan, M. 2003. *Herbicidas. Fundamentos fisiológicos y bioquímicos del modo de acción*. Universidad Católica de Chile. Fac. de Agronomía e Ingeniería Forestal. Ediciones Universidad Católica de Chile. Santiago. 333 p

Perdomo, R. 2012. Estimación del Progreso Genético en Híbridos y Variedades de Maíz (*Zea Mays* L.) Blanco. Obtenidos por Fundación Danac en el Período 1986-

2006. Trabajo de Grado. Post Grado. Universidad Central de Venezuela. Maracay. Venezuela. 142 p

Peterson, D.; Thompson, D.; Regehr, L.; Al-Khatib, K. 2001. Herbicide mode of action. Kansas State University. C-715. 24 p

Picca, A.; Helguera, M.; Salomón, N.; Carrera, A. 2004 Marcadores Moleculares. En Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. II Cap 4. ArgenBio. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina. 447 p

Poehlman, J. 1987. Mejoramiento Genético de las Cosechas. Traducido por Nicolás Sánchez. Vol 1. Mexico. Limusa. 453 p

Powles, S.; Preston, C.; Bryan, I.; Jutsum, A. 1997. Herbicide resistance: impact and management. *Adv Agron*, 58: 57–93.

Rattan, S. 2004. Aging intervention, prevention, and therapy through hormesis. *Journal of Gerontology*, 59 A(7), 705-709.

Ray, T. 1984. Site of action of chlorsulfuron. Inhibition of valine and isoleucine biosynthesis in plants. *Plant Physiology* 75: 827-831.

Reeves, R.; Mangelsdorf, P. 1942. A proposed taxonomic change in the tribe Maydeae (Family Gramineae). *American Journal of Botany*. 29: 815-817.

Reyes, P. 1990. El maíz y su cultivo. AGTEDITOR S.A. México, D.F

Reznick, D.; Cameron K. 2001. The population ecology of contemporary adaptations: what empirical studies reveal about the conditions that promote adaptive evolution. *Genetica* 112-113: 183-198.

Robinson, D., Monks, D., Schultheis, J., Worsham, A., 1993. Sweet corn (*Zea mays*) cultivar tolerance to application timing of nicosulfuron. *Weed Technol.* 7, 840–843.

Rodríguez E. (2000), *Protección y Sanidad Vegetal, Combate y Control de Malezas*. En: *El Maíz en Venezuela* Capítulo 6, sección 1. Fundación Polar. Caracas, Venezuela, 529 p

Ryan, G. 1970. Resistance of common groundsel to simazine and atrazine. *Weed Science* 18:614-616.

Saari, L; Cotterman, J.;Thill, D. 1994. Resistance to acetolactate synthase-inhibitor herbicides. In: *Herbicide Resistance in Plants: Biology and Biochemistry*, Powles, S. and Holtum, J. (eds). Florida. USA.

Saba, J.; Moghaddam, M.; Ghassemi, K. y Nishabouri, M. 2001. Genetic Properties of Drought Resistance Indices. *Journal. Agricola Science. Technology.* 3: 43-49.

Sanyal, D., Bhowmik, P., Anderson, R.; Shrestha, A. 2008. Revisiting the perspective and progress of integrated weed management. *Weed Science.* 56(1):161-167.

Sebastian, S.; Fader, G.; Ulrich, J.; Forney, D.; Chaleff, R. 1989. Semidominant Soybean Mutation for Resistance to Sulfonylurea Herbicides. *Crop Science* 29:1403-1408

Seefeldt, S.; Jensen, J.; Fuerst, P. 1995. Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationships. *Weed Technology* 9: 218-227.

Schulz, H. 1887. Zur lehre von der arzneiwirdung. Virchows Arch. F. Pathol. U. Physiol, 108, 423-445.

Schulz, H. 1888. Uber hefegifte. Pfluegers Arch. Gesamte. Physiol, 42, 517-541.

Shaner, D.; Anderson, P.; Stidham, M. 1984. Imidazolinones, potent inhibitors of acetohydroxyacid synthase. Plant Physiology 76: 545-546.

Shimabukuro, R. 1985. Detoxification of herbicides.. *In*: Duke, S. (ed.). Weed Physiol. 2: 215-240 CRC Press. Boca Raton, Florida, USA.

Shull, G. 1908. The composition of a field of maize. Am. Breed. Assoc. Rep., 4: 296-301.

Shull, G. 1909. A pure-line method of corn breeding. Am. Breed. Assoc. Rep., 5: 51-59.

Sikkema, S.; Soltano, N.; Sikkema, P.; Robinson, D. 2008. Response of sweet maize (*Zea mays* L.) hybrids to halosulfuron. Crop Protection 27, 695–699

Siminszky, B.; Corbin, F.; Sheldon, Y. 1995. Nicosulfurón resistance and metabolism in terbufos and naphthalic anhydride treated corn. Weed Science. 43:163-168.

Simpson, D.; Stoller, E.; Wax, L. 1995. An in vivo acetolactate synthase assay. Weed Technology 9: 17-22.

Southam, C.; Ehrlich, J. 1943. Effects of extracts of western red-cedar heartwood on certain wood-decaying fungi in culture. Phytopathology, 33, 517-524.

Spider, V. Vidal, R. 2001. Seletividade e Dose de Injuria Economica de Nicosulfuron Aplicado Em Diferentes de Desenvolvimento da Cultura Do Milho. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.31, n.6, p.929-934.

Spader, V.; Antoniazzi, N. 2006 Avaliação da injúria causada por herbicidas em híbridos de milho. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 25., 2006, Brasília. Resumos. Brasília: Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas, 2006. p. 289.

Stefanovic, L.; Zaric, L.; Kereaki, B.; Mirkovic, K. 1996. Effects of Sulfonilurea Herbicides on Maize Inbreed Lines. *Selekcija I Semenarsvo* 2:89-93.

Stefanovic, L.; Zaric, L.; Kereaki, B. 1997. Effects of Herbicides and Meteorological Conditions on Maize Inbreed Lines. *Acta Biologica Jugoslavica, Serija G* 6:31-37

Stefanovic, L.; Milena, S.; Dragicevic, V. 2010. Studies on Maize Inbreed Susceptibility to Herbicides. *Genetika*, 42:1 155-168.

Stidham, M. 1991. Herbicides that inhibit Acetohydroxyacid Synthase. *Weed Science* 39: 428-434.

Striebig, J. (1988). Herbicide bioassay. *Weed Research*. 28, 479-84.

Taylor, S.; Wax, L.; Simpson, D.;McGlamery, M. 1996.Using the in vivo acetolactate synthase assay for identifying herbicide-resistance weeds. *Weed Technology* 10: 936-942.

Thompson, C.; Thill, D.; Mallory-Smith, C.; Shafii, B. 1994.Characterisation of chlorsulfuron resistant and susceptible kochia (*Kochiascoparia*).*Weed Technology* 4: 787-790.

Torcat, M. 2010. Evaluación de la fitotoxicidad de nicosulfuron sobre híbridos de maíz (*Zea mays* L.). Trabajo de Grado, Pregrado. Universidad Central de Venezuela, Maracay Estado Aragua.

Tuesca, D.; Nisensohn, L. 2001. Resistencia de *Amaranthus quitensis* imazetapir y clorimurón-etil. Pesquisa Agropecuaria Brasileira. Brasilia. 36 (4): 601-606.

Urbizo, A. 2011. Efecto de Hormesis del Herbicida Paraquat sobre el Aumento del Área Foliar en el Frijol Negro (*Phaseolus vulgaris* L., FABACEAE). Trabajo de grado. Pre Grado. Universidad de San Carlos de Guatemala Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala. 57 p.

Valadez, E.; Kahl, G. 1999. Categorías básicas para el análisis de marcadores genético-moleculares. Depto. de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, México. 182 p.

Valverde, B. 2000. Respuesta de la población de malezas al uso continuo de herbicidas. En: Curso de actualización en biología y combate de malezas. Sociedad Venezolana para el Combate de Malezas. Maracaibo, 06 al 08 de Diciembre de 2000.

Van der Merwe, N.; Curtenis, A.; Vogel, J. 1981. Isotopic evidence for prehistoric subsistence change at Parmana, Venezuela. Nature 292:536-538

Velini, E., Alves, E., Godoy, M., Meschede, D., Souza, R.; e, S. 2008. Glyphosate applied at low doses can stimulate plant growth. Pest Management Science, 64, 489-496. Vencill, W. 2002. Herbicide's Handbook. Weed Science Society of America, 2002<sup>a</sup> edition Illinois, USA.

Vidal, R.; Rainero, H.; Kalsing, A.; Trezzi, M. 2010. Prospección de las Combinaciones de Herbicidas para Prevenir Malezas Tolerantes y Resistentes al Glifosato. *Planta Daninha*, 28(1), 159-165

Wagner, R., Kogan, M.; Parada, M. (2003). Phytotoxic activity of root absorbed glyphosate in corn seedlings (*Zea mays* L.). *Weed Biology and Management*, 3, 228-232.

Waugh, R.; W. Powell. 1992. Using RAPD markers for crop improvement. *Trends in biotechnology*. 10:186-192.

Weed Science Society of America.2011. ¿Qué es la Resistencia a herbicidas? Lección 3. Disponible en <http://wssa.net/wp-content/uploads/Lesson-3-What-is-Herbicide-Resistance.swf>[Consulta: 7 de Mayo 2014]

Weed Resistance Action Group. 2003. Managing and preventing herbicide resistance in weeds. Disponible en: [www.hgca.com](http://www.hgca.com). [Consulta 15 de Mayo 2014]

Weedscience. 2016 International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Disponible en: <http://www.weedscience.org/summary/home.aspx> [Consulta 17 de Febrero de 2016]

Wiedman, S.; Appleby, A. 1972. Plant growth stimulation by sublethal concentrations of herbicides. *Weed Research*, 12, 65-74.

Williams, J.; Kubelik, A.; Livak, K.; Rafalski J.; Tingey, S. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18: 6531-6535.

Williams, M.; Sowinski, S.; Dam, T.; Li, B. 2006. Map-based cloning of the nsJi gene of maize. Prog. Abstr. 48th Maize Genet.Conf. p. 49 (abstr.)

Williams, M.; Pataky, J. 2008. Genetic basis of sensitivity in sweet corn to tembotrione. Weed Sci. 56:364–370.

Westerfeld, W. 1945. A colorimetric determination of blood acetoin. The Journal of Biological Chemistry 116: 495-502.

Xena, E. 2000. Una década de aplicaciones del método RAPD: Alcances y límites en el estudio de relaciones genéticas en plantas. Acta Científica Venezolana. 51:197-206.

Yu, Q; Shane, F.; Zhang, X.; Powles, B. 2004. Tolerance to acetolactate synthase + and acetyl-coenzyme A carboxylase inhibiting herbicides in *Vulpia bromoides* is conferred by two co-existing resistance mechanisms. Pesticide Biochemistry Physiology 78:21-30

Zaric, L.; Stefanovic, L.; Kerecki, B.; Mirkovic, K.; Radosavljevic, M. 1998. Effects of Alachlor, Low Temperature and Drought on Early Growth of Maize Plants. In Procedures Balkan Symposium on Field Crops. Novi Sad 16-20 June. 127-130.

Zhang, J.; McDonald, M.; Sweeney, P. 1996. Random amplified polymorphic DNA (RAPDs) from seeds of differing soybean and maize genotypes. Seed Science and Technology 24:513-522.

Zita, G. 2012 Resistencia de malas hierbas a herbicidas inhibidores de la enzima ACCasa. Tesis doctoral, Universidad de Córdoba, Departamento de Edafología y Química. México. 211 p