

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias e Ingenierías

**Evaluación del crecimiento y la susceptibilidad a patógenos después de la
aplicación de dosis mínimas de glifosato en *Arabidopsis thaliana*.**

Proyecto de Investigación

Jonathan Cárdenas Gallegos

Ingeniería en Agroempresas

**Trabajo de titulación presentado como requisito para la obtención del título de Ingeniero
en Agroempresas**

Quito, 22 de julio de 2019

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias e Ingenierías

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

**Evaluación del crecimiento y la susceptibilidad a patógenos después de la
aplicación de dosis mínimas de glifosato en *Arabidopsis thaliana*.**

Jonathan Cárdenas Gallegos

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

Antonio León Reyes, Ph.D.

Firma del profesor _____

Quito, 22 de julio de 2019

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído la Política de Propiedad Intelectual de la Universidad San Francisco de Quito y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo de investigación quedan sujetos a lo dispuesto en la Política.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo de investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del Estudiante: _____

Nombre: Jonathan Cárdenas Gallegos

Código de Estudiante: 00121097

C.I.: 1717346876

Lugar, Fecha: Quito, 22 de julio de 2019

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a todas las personas que contribuyeron con su conocimiento para el desarrollo del trabajo de investigación, en especial al equipo del Laboratorio de biotecnología agrícola y de alimentos por haberme facilitado las instalaciones y materiales necesarias para llevar a cabo mi trabajo de investigación; a mi director de tesis Antonio Leon quien supo dirigir con profesionalismo cada etapa del desarrollo, a Dario Ramirez por su apoyo y su instrucción en los protocolos de laboratorio. De igual manera, quisiera agradecer al director de Ingeniera en Agroempresas, Mario Caviedes por el soporte y el conocimiento estadístico brindado lo largo de mi vida universitaria y a cada uno de los profesores que forman parte de esta carrera. Por último, quisiera agradecer a mis padres y hermanos por siempre mantener en mi la convicción de mi capacidad de realizar grandes cosas.

RESUMEN

La utilización de herbicidas a base de glifosato ha tenido un incremento considerable durante los últimos años debido a su económico uso y a la introducción de los cultivos genéticamente modificados. Se ha estudiado ampliamente el efecto de dosis elevadas y recomendadas del herbicida, pero se ha dejado de lado la implicación de las dosis subletales, las cuales pueden presentar efectos considerables tanto en malezas como en cultivos comerciales. El presente estudio evaluó el crecimiento de las plantas de *Arabidopsis thaliana* después de la aplicación de glifosato a bajas dosis frente a dos condiciones diferentes de luz para determinar el crecimiento foliar y radicular. Se comprobó que las condiciones de luz modulan la ocurrencia del efecto hormético, considerando que la aplicación de bajas dosis de glifosato a condiciones de baja luz promueve una estimulación en la biomasa foliar y disminuye el peso seco radicular. Mientras que la aplicación de dosis mínimas de glifosato a condiciones de luz alta promueve la estimulación del peso seco radicular y disminuye el peso seco foliar. Asimismo, se analizó que ocurre con la susceptibilidad de plantas de *Arabidopsis thaliana* desarrolladas con la aplicación de bajas dosis de glifosato a condiciones de luz alta frente a un patógeno biotrófico y uno necrotrofico. Los resultados indican que a la dosis de 3.6×10^{-9} g AE/L las plantas bajo condiciones de luz alta son más susceptibles al hongo necrotrofico *Botrytis cinerea*. Por otra parte, la susceptibilidad frente al patógeno biotrófico *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* no presento diferencias significativas entre ninguno de las dosis evaluadas bajo condiciones de luz alta. Como conclusión general, la intensidad de luz es el principal componente que modula la respuesta de crecimiento y resistencia a patógenos en plantas expuestas a bajas dosis de glifosato.

Palabras clave: *Arabidopsis thaliana*, glifosato, hormesis, susceptibilidad, intensidad de luz.

ABSTRACT

The use of herbicides in a glyphosate base has had a considerable increase during the last years due to its economic use and the introduction of genetically modified crops. The effect of high and recommended doses of the herbicide has been studied extensively, but the implication of sublethal doses has also been left out, which can have considerable effects both in commercial relationships and in commercial results. The present study evaluated the growth of *Arabidopsis thaliana* plants after the application of glyphosate at low doses against light conditions to determine leaf and root growth. It was found that light conditions modulate the incidence of the hormone effect, that the application of low doses is applied, the conditions of light, light promotes an estimate in leaf biomass and dry root weight. While the application of minimum doses of glyphosate to high light conditions promotes the estimation of dry weight and dry leaf weight. Also, what happens to the susceptibility of *Arabidopsis* plants developed with the application of low doses of glyphosate at high light conditions against a biotrophic and a necrotrophic pathogen is analyzed. The results indicate a dose of 3.6×10^{-9} g AE / L plants under high light conditions are more susceptible to the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. On the other hand, susceptibility to the biotrophic pathogen *Pseudomonas syringae pv.* There are no differences between the state of light. As a general conclusion, the intensity of light is the main component that the response of growth and resistance to pathogens in plants exposed to low doses of glyphosate.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, glyphosate, hormesis, susceptibility, light conditions.

Tabla de contenido

I.	Introducción	10
	1.1. Uso de glifosato en la agricultura	10
	1.2. Composición química y mecanismo de acción del glifosato	11
	1.3. Efecto hormético del glifosato	13
	1.4. Impacto del glifosato en la susceptibilidad de los cultivos.....	15
	1.5. Mecanismos de defensa vegetal.....	16
	1.6. Hormonas vegetales en el establecimiento de la inmunidad	18
	1.7. Patógenos según su estilo de vida.....	19
	1.7.1. Patógeno Necrotrófico: Ejemplo modelo <i>Botrytis cinerea</i>	19
	1.7.2. Patógeno Hemi-biotrófico: Ejemplo modelo <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	20
	1.8. <i>Arabidopsis thaliana</i> : Planta modelo.....	21
II.	Justificación	23
III.	Objetivos.....	25
	3.1. Objetivo General.....	25
	3.2. Objetivos Específicos	25
IV.	Hipótesis.....	25
V.	Metodología.....	26
	5.1. Material Vegetal	26

5.2.	Localización del ensayo.....	26
5.3.	Cultivo de <i>Arabidopsis thaliana</i>	26
5.4.	Condiciones de crecimiento para cada ensayo	28
5.5.	Riego y nutrición de las plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	30
5.6.	Aplicación de glifosato marca <i>Ranger</i>	30
5.7.	Evaluación de peso seco foliar y radicular	31
5.8.	Bioensayos con el hongo <i>Botrytis cinerea</i>	32
5.8.1.	Determinación de la susceptibilidad frente a <i>Botrytis cinerea</i>	33
5.9.	Bioensayos con la bacteria <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato DC3000</i>	34
5.9.1.	Determinación de la susceptibilidad frente a <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato DC3000</i>	35
5.10.	Diseño Experimental.....	36
VI.	Resultados.....	37
6.1.	Comparación de crecimiento (peso seco foliar y radicular) bajo diferentes condiciones de luminosidad (luz baja y luz elevada).	37
6.2.	Evaluación de susceptibilidad: bioensayos.....	41
6.2.1.	Bioensayo 1: <i>A. thaliana</i> frente a <i>B. cinerea</i>	41
6.2.2.	Bioensayo 2: <i>A. thaliana</i> frente a <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato DC3000</i>	44
VII.	Discusión	46

7.1. Evaluación de crecimiento bajo diferentes condiciones de luminosidad: Peso Seco Foliar y Radicular	46
7.2. Evaluación de la susceptibilidad en <i>Arabidopsis thaliana</i>	50
VIII. Conclusiones	54
IX. Recomendaciones	55
X. Referencias	56
XI. Anexos	60

I. Introducción

1.1. Uso de glifosato en la agricultura

La necesidad de maximizar los rendimientos de producción y la escasez de mano de obra en el campo ha intensificado la utilización de métodos químicos de control de malezas que presentan mayor eficiencia que labores manuales. Tradicionalmente, se ha catalogado como positiva la implementación de herbicidas como una estrategia de control de malezas en reemplazo de la labranza tradicional puesto que se reducen las consecuencias negativas que la labranza intensiva provoca como la erosión del suelo o el escurrimiento de nutrientes por el desgaste del suelo (Gianessi, 2013).

Uno de los productos agroquímicos más utilizados son los herbicidas a base de glifosato, representando el 11% de las ventas de pesticidas alrededor del mundo en el año 2011 (Benbrook, 2016). En el caso de Ecuador, se estima que el consumo de glifosato está alrededor de 4 millones de litros anualmente, usado principalmente en los cultivos de cacao, banano y palma africana (Peñaherrera, 2013). El uso en la agricultura a nivel mundial de este producto se ha incrementado de manera exponencial a partir de 1996, año en que comienzan a cultivarse las plantas genéticamente modificadas con resistencia al glifosato, pasando de 67 millones de kilogramos en 1995 a 826 millones de kilogramos de glifosato en el 2014 (incremento de 12 veces más) (Benbrook, 2016).

No obstante, este incremento abrupto en su uso a nivel mundial ha generado dudas respecto a los efectos secundarios o la incidencia que podría tener en la residualidad en el suelo y al sistema productivo, principalmente surge la duda de cuál sería el efecto sobre la resistencia frente a plagas y patógenos o con respecto a la absorción de macro y micronutrientes. Además,

es necesario considerar el posible efecto del glifosato sobre macro y microorganismos que contribuyen al sistema agrícola, de tal manera que su utilización no genere desbalances ecológicos que terminen afectando con la productividad y sostenibilidad en el largo plazo.

1.2. Composición química y mecanismo de acción del glifosato

El glifosato es un herbicida de amplio espectro, no selectivo y post-emergente que controla un amplio rango de especies vegetales que incluyen malezas anuales y perennes de hoja ancha. Químicamente, se compone por una parte de glicina y un radical aminofosfato unido como sustituyente de uno de los hidrógenos del grupo amino. De forma comercial, este herbicida se presenta en forma de concentrados solubles de la sal isopropanolamina y otras sales, a las cuales se le integran el ácido glifosato y ciertos ingredientes necesarios en cada formulación comercial. Con respecto a la vida media del glifosato, Martínez et al. (2018) menciona que la empresa Monsanto, el fabricante del herbicida RoundUp a base de glifosato recomienda comenzar con la siembra 24 -72 horas después de la aplicación del herbicida. Sin embargo, se ha demostrado que la proporción de residuos de glifosato inmovilizados o degradados varía significativamente de acuerdo con la composición y propiedades locales del suelo, así como también influye las condiciones climáticas y las prácticas agrícolas (Borggaard et al., 2008).

El mecanismo de acción por el que el glifosato actúa en plantas y en microorganismos es mediante quelación del manganeso (Mn), compuesto que participa como cofactor para la enzima EPSPS, la cual forma parte de la ruta metabólica del ácido shikímico (Figura 1) localizada en el cloroplasto, inhibiendo así esta ruta metabólica. La importancia de esta ruta metabólica radica en su capacidad de sintetizar los ácidos aromáticos L-Fenilalanina, L-Tirosina y L-Triptofano, que funcionan como precursores para una gran variedad de metabolitos

secundarios cruciales para el crecimiento de la planta comúnmente denominados compuestos fenólicos (Santos et al., 2019), como indica la Figura 1. Esto deriva en una falta de producción de ciertos compuestos como ligninas, alcaloides y flavonoides que van a provocar una disminución en la fijación del CO₂ y disminución en la producción de biomasa, llevando finalmente a la muerte de la planta. De acuerdo con Brito et. al. (2017), esta ruta metabólica es responsable del 35% de la producción de materia seca en la planta y el 20% del carbono fijado por la fotosíntesis se deriva de esta vía. En la mayoría de las plantas, los síntomas visibles del efecto de este herbicida se desarrollan lentamente empezando con una inhibición en el crecimiento, seguido por un amarillamiento y clorosis, finalizando con una notable necrosis y la muerte de la planta. Este mecanismo sistemático hace que el control de malezas sea tan efectivo.

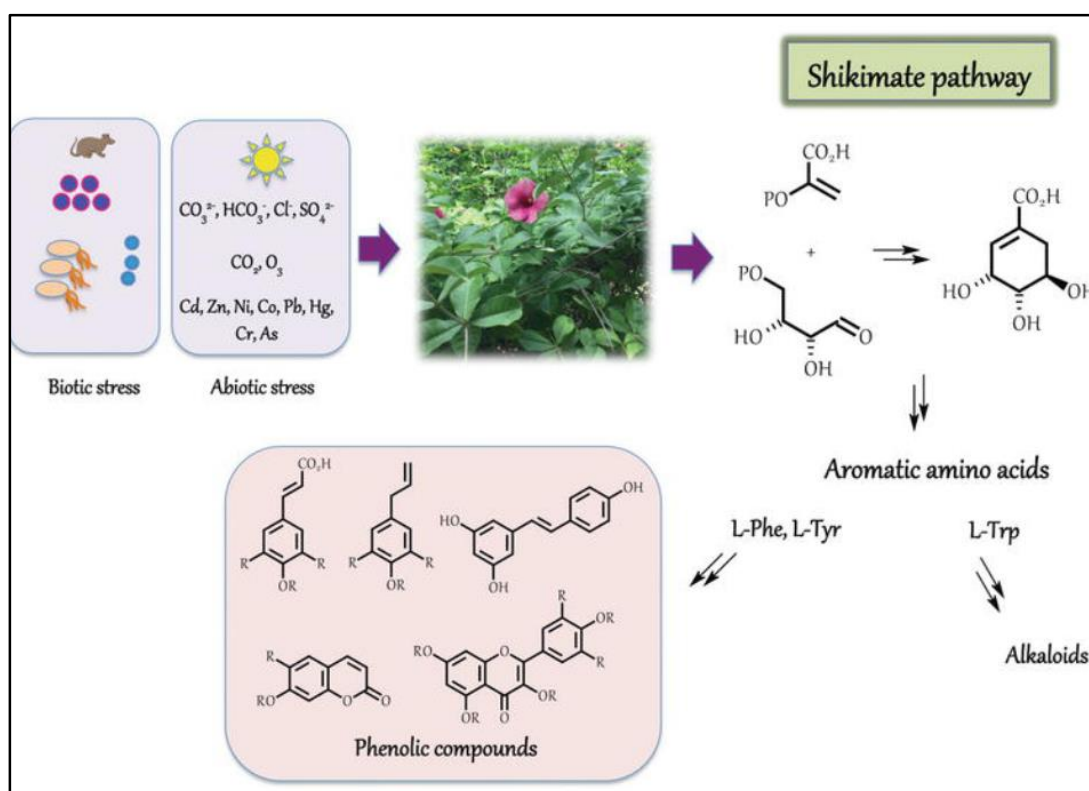


Figura 1: Ruta del ácido shikímico y formación de compuestos fenólicos provocados por factores de estrés Tomado de: (Santos, Salas, Hernández y Villanueva, 2019).

1.3. Efecto hormético del glifosato

En general, un efecto hormético ocurre cuando una curva dosis – respuesta toma la forma de una curva bifásica. Esto quiere decir que, van a existir dos tipos de respuestas biológicas al momento en el que se expone un organismo a diferentes dosis de un agente de estrés, una respuesta estimuladora y otra respuesta inhibitoria. La hipótesis mas aceptada de las causas para la ocurrencia de este fenómeno es que la estimulación se presenta con un proceso evolucionario de compensación en respuesta a la exposición a dosis reducidas de un agente de estrés.

El glifosato debajo de cierta dosis mínima presenta un efecto estimulador en el crecimiento de las plantas, que de acuerdo con Brito et.al. (2017) empieza a ser considerable en dosis mínimo 100 veces menores que las que normalmente se utilizan en campo. La estimulación de crecimiento de ciertas características morfológicas ha sido reportada en una gran cantidad de especies vegetales, que incluyen cultivos de interés comercial y malezas. Es importante mencionar que las dosis a las que ocurre este fenómeno difieren de acuerdo con la especie evaluada. En el caso de la soja y el maíz, Velini et.al. (2008) comprobó incrementos máximos en el peso seco foliar de 27.8 y 25.5 % para dosis de 14.2 y 22.6 g AE / ha respectivamente. Por otro lado, la caña de azúcar presenta un incremento en el peso seco de la planta a partir de dosis de glifosato de 7.2 hasta 36 g AE /ha. Además de la especie vegetal evaluada, la etapa de desarrollo dentro de una misma especie de plantas también afecta a la respuesta. Al respecto, se estudió la respuesta hormética del glifosato en dos etapas de crecimiento en la maleza *Commelina benghalensis* llegando a la conclusión de que el efecto de estimulación no es el mismo en las dos etapas a pesar de haber sido evaluados bajo la misma dosis (Vellini et al., 2008). De acuerdo con Silva et.al (2015), otro factor que podría influenciar la respuesta es una consecutiva exposición de una planta a bajas dosis de este herbicida, lo cual

puede intensificar una respuesta hormética a largo plazo. Las condiciones ambientales bajo las cuales se lleva a cabo el crecimiento de las plantas pueden modular la respuesta hormética de un herbicida, por ejemplo, se ha comprobado que las condiciones de irradiación tienen la capacidad de afectar la amplitud de la ocurrencia del efecto hormético inducido por el glifosato (Cedergreen y Olesen, 2010).

Desde el punto de vista agrícola, la estimulación de ciertos rasgos de interés comercial puede tener un potencial para mejorar la producción y calidad de cultivos. Sin embargo, es importante tomar en cuenta que la principal característica para el establecimiento de una práctica agrícola es su facilidad de reproducibilidad en campo, el efecto hormético del glifosato es un fenómeno muy complejo que se ve influenciado por gran cantidad de elementos, lo que dificulta su reproducibilidad bajo condiciones ambientales contrastantes que puedan dar como resultado una respuesta en rasgos no deseados (Belz y Cedergreen, 2010).

El mecanismo mediante el cual el glifosato causa un efecto estimulador a bajas dosis no se conoce con precisión, sin embargo, según Vellini et al. (2008) la ocurrencia puede estar estrechamente relacionada al funcionamiento molecular del glifosato dentro de la planta, es decir, a la inhibición de la enzima EPSPS dentro de la ruta del ácido shikímico debido a que los efectos de hormesis no son los mismos en plantas genéticamente modificadas resistentes al herbicida que en plantas susceptibles al herbicida. Desafortunadamente, al desestabilizar la ruta del shikímato es posible que se observen efectos colaterales en la vulnerabilidad de la planta a enfermedades causadas por patógenos debido a los componentes de defensa esenciales que derivan de esta ruta metabólica (Johal y Huber, 2009).

1.4. Impacto del glifosato en la susceptibilidad de los cultivos.

La intensificación del uso de este herbicida en el campo ha demostrado que existen efectos colaterales en la severidad de ciertas enfermedades patogénicas que podrían amenazar la sostenibilidad de un sistema agrícola. El incremento de la susceptibilidad de las plantas está relacionado con un debilitamiento del sistema defensivo de las mismas a causa de las aplicaciones continuas del glifosato que generan un aumento en la cantidad residual del herbicida en el suelo (Johal y Huber, 2009).

Uno de los mecanismos por los que la planta se vuelve más susceptible es la inmovilización de ciertos micronutrientes que participan en el establecimiento de un sistema de resistencia frente a enfermedades. De acuerdo con Hornby et al (1998), niveles bajos de glifosato residual en el suelo reducen la absorción radicular y la translocación del hierro, manganeso y el cobre, lo que podría comprometer el crecimiento de las plantas que puede generar un aumento de la susceptibilidad. Además, la disponibilidad de macro y microelementos se ve comprometida debido a que el glifosato es tóxico para microorganismos que fijan el nitrógeno y para microorganismos que reducen el manganeso (Huber et al., 2004).

Es importante considerar que en la rizosfera existe una gran cantidad de bacterias benéficas que cumplen funciones de mantenimiento de la productividad del suelo, sostenibilidad y resiliencia a perturbaciones, que pueden ser susceptibles a trastornos metabólicos provocados por el glifosato debido a que cuenta con la enzima EPSPS (Martinez et al., 2018). Al verse afectada toda esta comunidad bacteriana, se pone en riesgo toda una dinámica existente en el suelo que pone en riesgo la salud y productividad de los cultivos y además puede ocurrir la

estimulación de ciertos microorganismos fitopatogénicos que presentan resistencia al herbicida, aumentando la incidencia de ciertas enfermedades (Kremer et al., 2005).

La predisposición a enfermedad se genera a través de diferentes mecanismos en los que influye el glifosato como en la inhibición de la enzima EPSPS. Esencialmente, una gran parte de componentes de la resistencia activa de la planta se derivan de la ruta del ácido shikímico como las fitoalexinas microbianas, la hormona ácido salicílico, la lignina necesaria para el fortalecimiento de las paredes celulares y las proteínas PR. Es decir, el sistema defensivo de la planta al momento del ataque de un patógeno va a verse comprometido facilitando la entrada e infección por parte del patógeno (Johal y Huber, 2009). Para aclarar cual podría ser el efecto del glifosato sobre la inmunidad de la planta, es necesario conocer el funcionamiento de los mecanismos de defensa de las plantas y cual es el papel de ciertos compuestos derivados del ácido shikímico en una respuesta defensiva.

1.5. Mecanismos de defensa vegetal.

Las plantas se ven constantemente amenazadas por insectos herbívoros y organismos patógenos como hongos, oomycetos, bacterias, virus y nemátodos que llegan a afectar considerablemente el rendimiento productivo de los cultivos. Afortunadamente, las plantas cuentan con sistemas defensivos constitutivos e inducibles. La primera barrera defensiva son las defensas generalistas o constitutivas, grupo al que pertenecen las barreras físicas como cutículas cerosas, espinas y tricomas, además sustancias químicas producidas por la planta en su metabolismo secundario como terpenos, fenoles y alcaloides. Este sistema físico se caracteriza por ser de amplio espectro dado que no es necesario activarlas mediante la infección de un

herbívora o un patógeno, además, es necesario considerar que se produce a lo largo del desarrollo normal del vegetal (Gamboa, 2016).

Además, las plantas cuentan con un sistema inmune más específico y bien desarrollado, que puede ser representado como un modelo en zig-zag el cual permite reconocer moléculas exógenas a través de sus células heridas y es capaz de generar una respuesta inmune efectiva al parásito al que se enfrenta. Para que un proceso de infección ocurra el patógeno debe tener acceso al interior de la planta, el cual puede penetrar directamente en hojas o superficies radiculares del hospedante o bien a través de heridas o aperturas fisiológicas naturales como los estomas. Una vez dentro, la planta activa su sistema inmune innato el cual puede actuar de dos formas fundamentales de acuerdo con el avance del patógeno dentro del hospedante. La primera línea de defensa se denomina PTI (del inglés: *PAMP triggered immunity*) está basada en el reconocimiento de las PAMP (del inglés: *pathogen-associated molecular pattern*) que se definen como epítomos o determinantes antigénicos que son indispensables para los patógenos y que se encuentran ausentes en las plantas pero que pueden ser reconocidos por receptores con los que cuenta la planta en su superficie celular, estos receptores se denomina PRR (del inglés: *pattern recognition receptors*). El momento en el que los receptores reconocen el patrón molecular correspondiente se activa la defensa PTI, provocando ciertos cambios tanto moleculares como fisiológicos como el incremento del flujo de iones a través de la membrana plasmática, junto con un aumento considerable de los iones de Ca^{2+} , varias proteínas son fosforiladas, se da la activación de las proteínas MAPK, hay producción de especies reactivas al oxígeno, entre otros cambios (Ojito y Portal, 2010).

Sin embargo, ciertos patógenos cuentan con efectores que hacen que la virulencia de este sea más eficaz y posibilita la supresión de la señalización de la PTI (primera línea de defensa inmunitaria), lo que va a resultar en una susceptibilidad en la planta desencadenada por efectores o ETS (del inglés: Effector Triggered Susceptibility). En este punto toma importancia la función de las proteínas de resistencia (R) producida por los genes de resistencia (R) en la planta los cuales reconocen a los efectores previamente mencionados, que al ser reconocidos por las proteínas R, toman el nombre de proteínas de avirulencia, resultando en el establecimiento de la segunda línea de defensa conocida como ETI (del inglés: effector-triggered immunity). De acuerdo con Ojito y portal (2010), la ETI se presenta como una de las formas de mayor alcance cuando una planta intenta defenderse debido a la especificidad gen a gen que este mecanismo establece, además, una vez que las proteínas o los genes R reconocen los efectores y activan el ETI, esta defensa resulta más rápida y fuerte, que por lo general termina en una respuesta hipersensible (HR) que es un fenómeno que genera la muerte celular localizada en el sitio de infección.

1.6. Hormonas vegetales en el establecimiento de la inmunidad

En el momento en que cualquiera de las respuestas inmunitarias presentes en las plantas es activada (PTI o ETI), las hormonas vegetales actúan como participantes esenciales en el desencadenamiento de la red de señalización de inmunidad de las plantas. Comúnmente, se ha considerado al ácido salicílico (SA) y al ácido jasmonico (JA) como las hormonas que mayor influencia tienen en la activación del sistema defensivo de las plantas. Cuando se produce una interacción planta-patógeno, se desencadenan ciertos cambios en la concentración y sensibilidad hormonal que provocan respuestas adaptativas por parte de las plantas, que por lo general provocan un costo asociado con el crecimiento o con el desarrollo de la planta, es por esto que,

la composición y la sincronización hormonal que se da en la planta van a determinar si es que los tejidos de la planta se vuelven más susceptibles o más resistentes dependiendo del organismo con el que interactúa (Pieterse et al., 2012).

Por ejemplo, las defensas reguladas por la hormona ácido jasmonico (JA) son desencadenadas por las heridas que provocan insectos herbívoros u hongos con estilo de vida necrotrófico, los cuales primero matan a la célula vegetal para posteriormente alimentarse de su contenido. Por otro lado, los patógenos que presentan un estilo de vida biotrófico, los cuales mantienen viva a la célula que infectan mientras se alimentan de su contenido a través de estructuras especializadas conocidas como haustorios, van a desencadenar una reacción defensiva que esta mediada por la hormona ácido salicílico (SA) (Goossens y Pauwels, 2013).

1.7. Patógenos según su estilo de vida

1.7.1. Patógeno Necrotrófico: Ejemplo modelo *Botrytis cinerea*

Este es un hongo necrotrófico, esto quiere decir que mata a las células de su hospedero a través de la segregación de compuestos con el propósito de obtener los nutrientes necesarios para su desarrollo. En cuanto a su taxonomía, pertenece al Filo Ascomycota, a la clase Leotiomycetes, al orden Helotiales, a la familia Sclerotiniaceae y al género *Botryotinia*. En más de 200 especies vegetales se presenta como el agente causal del moho gris, que infecta a través de diferentes mecanismos de infección. La patogenicidad del hongo consiste en la producción de enzimas y toxinas que degradan las células de la pared celular. Además, el patógeno desencadena la inducción de la muerte celular programada en la planta a la que infecta como una estrategia de ataque. En la mayoría de las plantas, los síntomas se presentan como una podredumbre blanda en la parte aérea de la planta (ver Figura 2A), y la pudrición de flores y

frutos que terminan produciendo conidióforos de una tonalidad grisácea y conidios que caracterizan a la enfermedad (Williamson et. al., 2007).

1.7.2. Patógeno Hemi-biotrófico: Ejemplo modelo *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

Este patógeno gran negativo y aeróbico, pertenece a la subdivisión gamma, al grupo *Pseudomonadaceae*, a la familia *Pseudomonaceae*, al género *Pseudomonas*. Su importancia agronómica se atribuye a que esta bacteria es el agente causal de enfermedades foliares en el tomate, como la peca bacteriana, que además afecta a ciertas crucíferas. Además, esta bacteria ha adquirido importancia científica debido a su utilidad para los estudios de patogenicidad en la planta modelo *A. thaliana*, lo que ha permitido desarrollar análisis genómicos para entender de forma más clara las respuestas de las plantas a una infección bacteriana. La sintomatología de la enfermedad provocada por esta bacteria en *A.thaliana* se caracteriza por la aparición de lesiones de marca de agua (del inglés: “water soaked lesions”) que comúnmente las rodea un margen clorótico. (Preston, 2000). La figura 2B presenta la lesión de esta bacteria sobre una planta de *A.thaliana*.

1.8. *Arabidopsis thaliana*: Planta modelo

Arabidopsis thaliana es una planta herbácea, de ciclo anual, de tamaño pequeño que taxonómicamente pertenece a la clase Magnoliopsida, al orden Brassicales, a la familia Brassicaceae (Cruciferae) y al género *Arabidopsis*.

Las condiciones ambientales ideales para un crecimiento vigoroso de las plantas de *Arabidopsis thaliana* son 22- 23°C de temperatura óptima, aunque el rango de temperaturas que soporta las plantas va de 16 – 25°C. El requerimiento hídrico esta principalmente influenciado por la humedad relativa, cuyo valor óptimo se encuentra entre 50 -60%. En cuanto a los requerimientos de luz, la intensidad de luz óptima se encuentra 120 y 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ (Sánchez y Salinas, 2014).

Pese a no poseer un valor agronómico considerable, *A.thaliana* se ha establecido como una herramienta útil en la biología molecular, la fisiología y la genética vegetal considerando que posee ciertas ventajas que facilitan su uso como planta modelo en la investigación básica. Un aspecto favorable es su ciclo de vida relativamente corto (aproximadamente 6 semanas desde la germinación hasta la producción de semillas maduras) y no estacional, que permite producir varias generaciones en un mismo año para facilitar análisis genéticos y fisiológicos que tomarían más tiempo si se utilizara otra planta modelo. Además, es muy sencillo la producción y propagación de semillas, adecuadas condiciones de laboratorio permiten acelerar un poco más su ciclo y hay la disponibilidad de una gran variedad de líneas mutantes (Cuesta & Cires, 2012).

Mas allá de estas ventajas inherentes a la naturaleza de la planta, actualmente se encuentra disponible la secuenciación completa de su genoma que ha contribuido al desarrollo de un gran número de líneas de investigación como análisis de expresión, genómica, proteómica,

entre otros. Es esencial tomar en cuenta que, en comparación con otras plantas angiospermas, el genoma de *A.thaliana* es relativamente pequeño (125 Mb) debido a contener un porcentaje muy pequeño de ADN repetitivo, esto se presenta como una ventaja en la identificación y clonación de genes de interés (Wilson, 2000). Como un organismo modelo esencial en la biotecnología agrícola, *A.thaliana* tiene el potencial de generar ideas claves en que el funcionamiento de los genes podría afectar la producción comercial de diferentes cultivos.

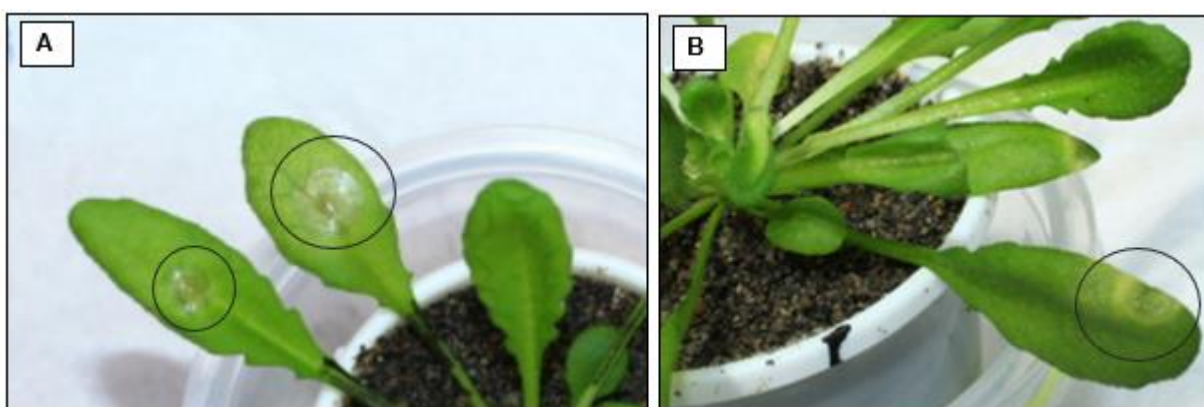


Figura 2: Lesión provocada por (A) *Botrytis cinerea* y (B) *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* en hojas de *Arabidopsis thaliana*

II. Justificación

La falta de métodos alternativos de control de malezas ha generado una dependencia en el control químico, en especial el uso del glifosato, producto que ha demostrado alta efectividad en la erradicación de plantas que compiten con los cultivos. La utilización continua de este herbicida puede generar aumento en los niveles residuales de glifosato en el suelo que ocasionan ciertos fenómenos en el crecimiento de las plantas después de una aplicación. La hormesis está relacionada con un efecto estimulador de crecimiento en ciertos cultivos y malezas objetivo a dosis subletales de un herbicida, y bajo condiciones muy variables de acuerdo con el tipo de cultivo en estudio. Desde un punto de vista productivo, los efectos de estimulación del glifosato en tejidos de valor comercial pueden tener un potencial para mejorar la producción y calidad de ciertos cultivos, sin embargo, este potencial estimulador del crecimiento puede que conlleve ciertos efectos colaterales asociados con la inmunidad del cultivo (Brito et al., 2017).

Lo ideal para un productor, más allá de un aspecto vigoroso de sus plantas, radica en que su cultivo puede tener altos niveles de defensa que eviten el aumento de la tasa de pérdidas asociados con plagas y enfermedades, y que, además, una respuesta de defensa efectiva genere una disminución de medidas de control, que van a representar mayores ventajas económicas al final del ciclo. Es por esto por lo que, más allá del efecto de inducción de crecimiento provocado, resulta significativo evaluar que sucede con la susceptibilidad de la planta bajo el efecto de estas pequeñas dosis de herbicida. Esto quiere decir que podría existir un incremento en la severidad de ciertas enfermedades que este correlacionado con el efecto de residuos de glifosato después de una aplicación. Además, hay que considerar la influencia de variables ambientales y de manejo que influenciarían la reproducibilidad del efecto estimulador del herbicida en campo. El

potencial productivo del efecto hormético existe, sin embargo, no se comprenden muy bien las variables involucradas en la ocurrencia de este fenómeno que puedan generar ventajas productivas o implicaciones perjudiciales en la inmunidad vegetal.

Por otro lado, la falta de uniformidad de las dosis aplicadas a nivel de campo provoca que las malezas que se intentan controlar también pueden presentar efectos horméticos no solamente de estimulación de crecimiento, sino también un incremento en su capacidad reproductiva (Brito et al., 2017). Esto haría que las estrategias de control químico sean ineficaces, y se requieren de un mayor número de aplicaciones para generar un control óptimo.

Por lo tanto, es necesario conocer en qué condiciones se presenta un efecto hormético inducido por el glifosato y qué consecuencias puede presentar en la vulnerabilidad de las plantas frente a enfermedades. En esta investigación se evaluó si dos dosis subletales del herbicida afectan en el crecimiento de plantas de *A.thaliana* bajo dos condiciones de iluminación diferentes. Además, se establecieron bioensayos para conocer si existen cambios en el nivel de susceptibilidad de las plantas frente a un patógeno necrotrófico y un patógeno biotrófico, provocado por las dosis mínimas de glifosato analizadas.

III. Objetivos

3.1. Objetivo General

Evaluar el efecto de crecimiento y resistencia a patógenos en plantas tratadas con dosis mínimas de glifosato en dos ambientes contrastantes de luz (bajo y alto).

3.2. Objetivos Específicos

Determinar la existencia de la relación entre las condiciones de luminosidad en las que se desarrollan las plantas de *A.thaliana* y la ocurrencia de un fenómeno hormético de crecimiento provocado por dos dosis mínimas de glifosato.

Cuantificar el nivel de incidencia del patógeno necrotrófico *Botrytis cinerea* a través de la medición del radio de la herida provocado por el hongo en hojas de *A.thaliana*, desarrolladas bajo condiciones de alta luz.

Cuantificar el nivel de incidencia del patógeno biotrófico *Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000* a través del porcentaje de hojas infectadas en plantas de *A.thaliana*, desarrolladas bajo condiciones de alta luz.

IV. Hipótesis

Las dosis mínimas de glifosato evaluadas (3.6×10^{-6} g AE/L y 3.6×10^{-9} g AE/L), dependiendo de las condiciones de iluminación en las que se desarrollan, provocan una estimulación de crecimiento de las plantas de *Arabidopsis thaliana* pero generan un aumento en la susceptibilidad de las plantas frente a patógenos necrotróficos y biotróficos.

V. Metodología

5.1. Material Vegetal

Para la propagación de plantas de *Arabidopsis thaliana* se utilizaron semillas de la línea silvestre Columbia 0 (Col-0) provistas por el Laboratorio de Biotecnología Agrícola y de Alimentos de la Universidad San Francisco de Quito.

5.2. Localización del ensayo

La fase de crecimiento de plantas y elaboración de bioensayos fue realizada en el invernadero de la Universidad San Francisco de Quito. Por otro lado, la preparación de soluciones nutritivas, esterilización de arena, medición de concentración de hongos y bacterias fue realizado el Laboratorio de Biotecnología Agrícola y de Alimentos de la misma universidad, la cual está ubicada en la parroquia de Cumbayá, perteneciente al cantón de Quito, en la provincia de Pichincha, Ecuador. Se encuentra ubicado a 2400 msnm presentando un clima cálido, que tiene una variación de temperatura de 2-5°C con una temperatura promedio de 25 °C.

5.3. Cultivo de *Arabidopsis thaliana*

El primer paso para la obtención de las plantas de *A.thaliana* fue la preparación del sustrato, que consistió en la recolección de arena de río que tengan una textura uniforme, posteriormente se lavó la arena usando agua destilada hasta obtener una conductividad eléctrica de 5-10 μ S en el agua de desecho. Finalmente fue autoclavada a 121°C durante 1 hora. Se llenaron dos vasos plásticos de 20 ml con arena y se esparcen las semillas de *A.thaliana* Col- 0 en cada vaso. Una vez esparcidas las semillas, se cubrió el vaso con plástico transparente y se almacenó a una temperatura de 4°C durante tres días para romper la dormancia. Después de

aproximadamente 2 semanas, cuando las plantas presentan dos hojas verdaderas, se trasplantó cada planta individualmente a vasos de 20 ml llenos de arena de río lavada y autoclavada. Los vasos se mantienen dentro de un contenedor plástico individual, como se observa en la Figura 3, para cada uno en donde se realizó el riego con agua y solución nutritiva.

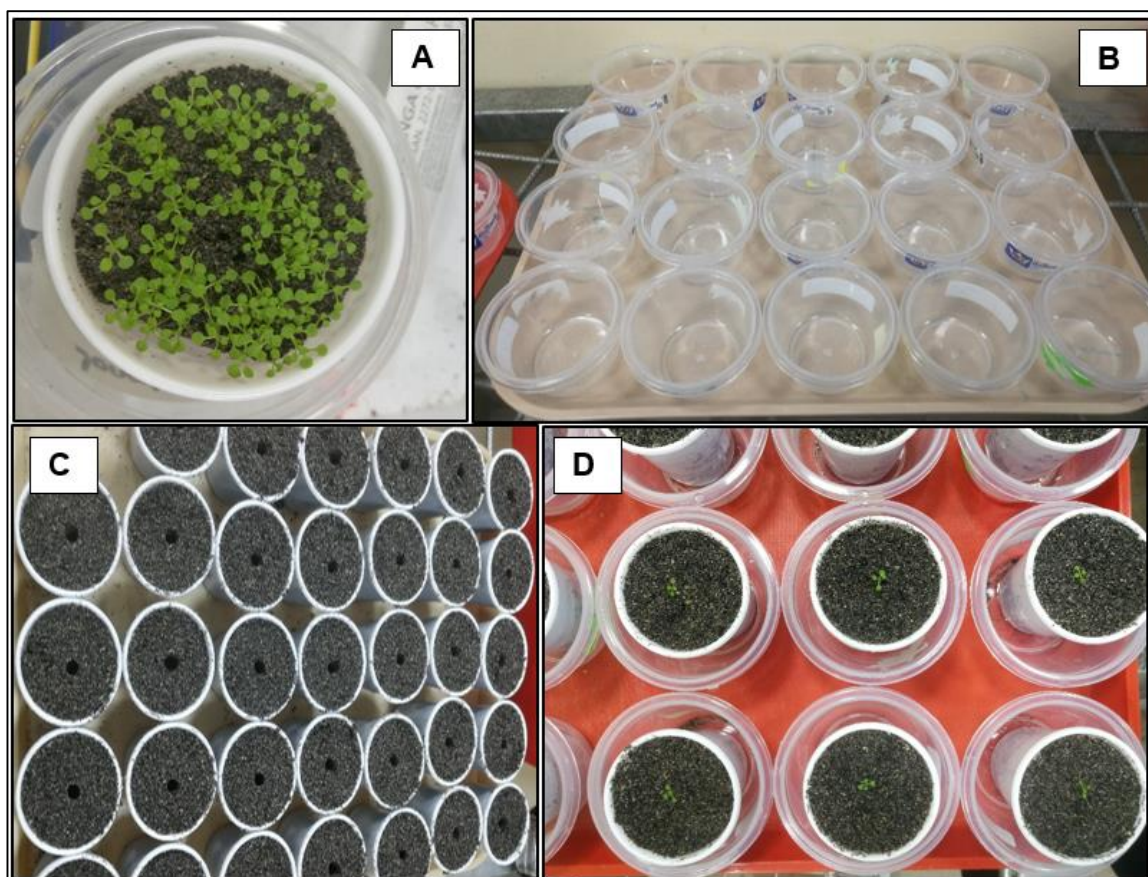


Figura 3: Trasplante de plantas de *Arabidopsis thaliana* después de 2 semanas de germinadas las semillas. (A) Plántulas con dos hojas verdaderas, (B) contenedores plásticos individuales, (C) vasos plásticos con arena y (D) plantas trasplantadas y ubicadas en su contenedor plástico.

5.4. Condiciones de crecimiento para cada ensayo

Durante la primera fase de crecimiento, las plantas a partir del trasplante fueron mantenidas durante 4 semanas bajo condiciones de luz baja natural, con un monitoreo constante de temperatura y humedad por medio del Datalogger *Elitech RC-6*.

Temperatura promedio: 23.4 °C

Humedad promedio: 51.6%

Posteriormente, se realizó una segunda fase de crecimiento de las plantas a partir del trasplante durante 4 semanas, pero esta vez bajo condiciones de luz elevada, por medio de una fuente de luz artificial LED de incidencia directa ubicada a 70 cm de las plantas en un ciclo día/noche de 12 / 12 H comenzando a las 6 AM y un periodo de luz de 12 horas. De igual manera, se realizó un monitoreo constante de humedad y temperatura por medio del Datalogger *Elitech RC-6*.

Temperatura promedio: 19.9 °C

Humedad promedio: 60 %

En la Figura 4, se presenta una curva generada por el datalogger resumiendo los cambios periódicos de temperatura y humedad en los dos cuartos en los que se realizó la etapa de crecimiento de las plantas.

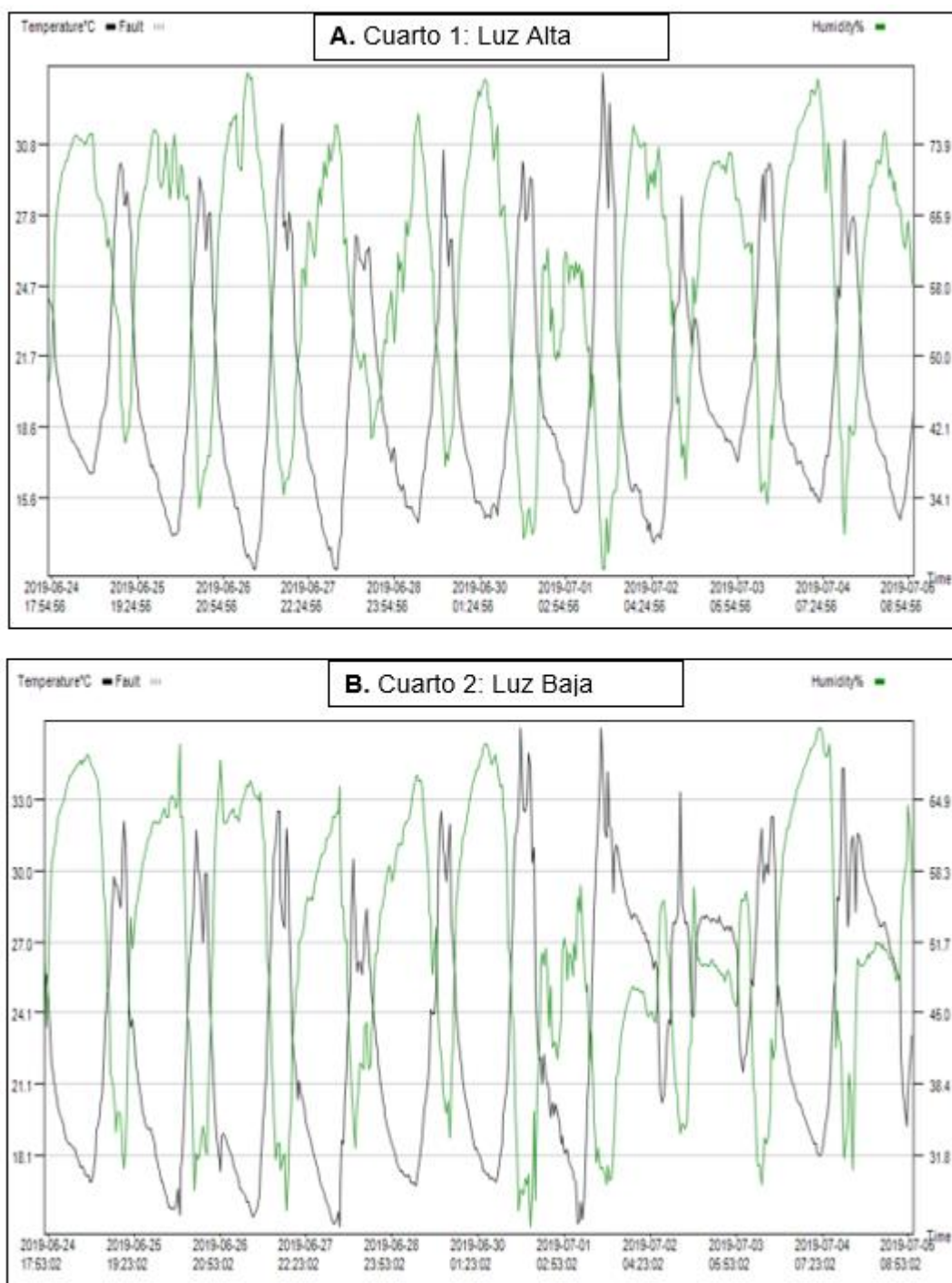


Figura 4: Comparativa de las condiciones de temperatura de humedad de los dos cuartos A. Cuarto con condiciones de luz alta B. Cuarto 2 con condiciones de luz baja

5.5. Riego y nutrición de las plantas de *Arabidopsis thaliana*

Este ensayo consistió en la evaluación del crecimiento y susceptibilidad hasta antes de la etapa de floración (aproximadamente 4 semanas). A lo largo de todo del ciclo de crecimiento de las plantas, se utilizó como fuente de nutrientes la solución nutritiva Hoagland (Anexo 3). Semanalmente, se suministró 10 ml de solución nutritiva por planta (el primer día de riego de la semana), seguido de 20 ml de agua destilada (distribuido en 2 días a la semana 10 ml/día). A medida que las plantas avanzaban en el crecimiento, se incrementó el riego semanal a 25 ml de agua destilada (distribuido en 2 días: 10 ml y 15ml el segundo día).

5.6. Aplicación de glifosato marca *Ranger*

Para la aplicación del herbicida se utilizó el producto comercial Glifosato “*Ranger 480*” (480 g/L) fabricado por BAYER el cual se encuentra en forma de sal isopropilamina que de acuerdo con la ficha técnica del producto es equivalente a 3.56 g AE/L de ácido glifosato (equivalente ácido AE) (Edifarm, 2016). Se utilizaron diluciones seriadas, empezando con una dilución inicial de 1 ml de Glifosato *Ranger 480* (480 g/L) en 100 ml de agua, hasta llegar a las concentraciones evaluadas: 3.6×10^{-9} g AE/L y 3.6×10^{-6} g AE/L, tomadas a partir de la investigación de Pazmiño (2018). Una vez transcurridas 2 semanas a partir del trasplante definitivo de las plantas a los vasos individuales, se agregaron 10 ml de las diferentes dosis de glifosato en lugar de los 10 ml de agua destilada, correspondiente al riego para ese día.

5.7. Evaluación de peso seco foliar y radicular

Tanto para la fase de crecimiento en condiciones de luz alta como para la fase de crecimiento en condiciones de luz baja se elaboraron 2 repeticiones biológicas para cada una de las condiciones para confirmar los resultados obtenidos. Esta evaluación fue realizada con plantas que tenían aproximadamente 30 días a partir del trasplante definitivo y 15 a partir de la aplicación del glifosato. Para obtener los valores de peso seco foliar se realizó un corte de toda la roseta de la planta (corte justo en la parte del tallo que une la raíz con la roseta) y se la ubicó en papel aluminio previamente pesado y marcado con su respectiva identificación para cada tratamiento. Para el caso del peso seco radicular, una vez cortada la roseta, se realizó un lavado cuidadoso de la raíz para deshacerse de los restos de arena que quedan al extraerla de los vasos plásticos, se dejó secar las muestras de raíz encima de papel toalla y finalmente se ubicaron las muestras en papel aluminio con su respectiva identificación. Una vez cosechadas todas las muestras en el papel aluminio, se procedió con el secado de las muestras dentro de un horno a 105°C durante 6 horas, tanto para muestras foliares como radiculares. Transcurrido el tiempo necesario, se sacaron las muestras del horno y se pesó cada muestra en una balanza científica, de tal manera que por diferencia de peso entre el peso inicial del aluminio y el peso final del aluminio que contenía muestra seca se obtengan los valores correspondientes al peso seco de cada tejido. La figura 5 ilustra de forma resumida como se realizó la evaluación del peso seco de las plantas de *A. thaliana*



Figura 5: Cosecha plantas *Arabidopsis thaliana* (A) muestras de raíz cosechadas, (B) corte parte foliar de la planta (C) horno con las muestras mantenidas a 105°C por 6 H y (D) obtención de peso seco de las muestras.

5.8. Bioensayos con el hongo *Botrytis cinerea*

Es importante mencionar que la implementación de bioensayos para la evaluación de susceptibilidad fue realizada exclusivamente en las plantas que crecieron en condiciones de luz alta, que son las condiciones más favorables para el desarrollo de las plantas de *A.thaliana*. Para la siembra del hongo *Botrytis cinerea* se utilizaron cajas Petri con PDA (*Potato Dextrose Agar*), en las que se sembró el hongo aislado a partir de infecciones anteriores en plantas de *Arabidopsis thaliana*. Una vez sembrados en las cajas con PDA, se incubaron las cajas a 25°C durante 2

semanas hasta que se observó una cantidad considerable de esporulación en las cajas. Se tomó una caja bien esporulada, se lavó superficialmente con PDB (*Potato Dextrose Broth*) para desprender la mayor cantidad de esporas posible y se filtró a través de algodón y papel filtro previamente autoclavados. Se tomaron 10 µL de solución previamente filtrada y se ubicó la gota en el hemocitometro para realizar el conteo de esporas que permitió calcular la concentración de conidias a partir de la siguiente formula (Bustillo, 2010):

$$\frac{\# \text{ de conidias}}{80} \times 4 \times 10^6 \times \text{Dilución}$$

Fue necesario obtener una concentración final de conidias de 1×10^6 conidias/ml, para lo cual se diluyó poco a poco la suspensión con PDB hasta llegar a la concentración deseada. Una vez obtenida la suspensión con la concentración deseada, se inoculó con la ayuda de una pipeta, una gota de 5 µL de suspensión, en 5 hojas completamente desarrolladas de cada planta de *Arabidopsis thaliana*. Al haber inoculado todos los tratamientos, se separó aleatoriamente por columnas los tres tratamientos a evaluar dentro de un contenedor plástico que contiene toallas de cocina humedecidas para crear un ambiente al 100% de humedad relativa para promover la infección del patógeno (Goosens y Pauwels, 2013).

5.8.1. Determinación de la susceptibilidad frente a *Botrytis cinerea*

Para evaluar que tan susceptibles fueron las plantas de cada tratamiento, después de 3 días de la inoculación, se sacaron las plantas de la bandeja plástica, se recortaron las 5 hojas previamente marcadas y se revisaron los síntomas que presentaban cada una de las hojas inoculadas (Goosens y Pauwels, 2013). Con una regla, se midió el radio de la herida que presentaban las hojas, como se observa en la Figura 5A.

5.9. Bioensayos con la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000

El nivel de resistencia frente a *Pseudomonas syringae* pv *tomato* puede ser determinada por dos métodos de inoculación diferentes: el método de infiltración por presión o el método de inmersión. En este estudio se utilizó el método por inmersión recomendado por Goossens y Pauwels (2013), para lo cual se realizó la siembra de la bacteria en medio *Pseudomonas* Agar F, a partir de una solución stock de glicerol de la bacteria. Posteriormente, se inoculó la bacteria dentro matraz Erlenmeyer que contenía medio KB líquido autoclavado y se incubó durante toda noche a 28°C en un agitador orbital. Al día siguiente, se lavaron las células bacterianas girándolas en tubos Eppendorf a 1500 rpm durante 5 minutos en una centrifuga y se resuspendió en 10 mM de MgSO₄. A continuación, se midió la densidad de la suspensión bacteriana con un espectrofotómetro a una densidad óptica (OD) a 600 nm, considerando que una lectura de 1 en el espectrofotómetro equivale a 10⁹ células/mililitro (1=10⁹ cel./ml). Para el método de inmersión, se diluyó la suspensión bacteria en MgSO₄ hasta una concentración de 2.5 x10⁷ cfu/ml y se añadió dispersante (Tween-80) para facilitar la entrada de las bacterias en las hojas. De igual manera, posterior a la inmersión de todas las plantas en la suspensión bacteriana, se separa aleatoriamente por columnas los tres tratamientos a evaluar dentro de un contenedor plástico que contiene toallas de cocina humedecidas para crear un ambiente al 100% de humedad relativa para promover la infección del patógeno (Goosens y Pauwels, 2013).

5.9.1. Determinación de la susceptibilidad frente a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000.

En lo que respecta a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, la evaluación de la susceptibilidad fue realizada a los 4 días después de la inmersión en la suspensión bacteriana. En este caso, como se sumergió todas las hojas de la planta dentro de la suspensión, se cuantificó el total de hojas de la planta para posteriormente cuantificar la cantidad de hojas infectadas, es decir, hojas que presentan una lesión de marca de agua, para finalmente obtener el porcentaje de infección para cada planta (Goosens y Pauwels, 2013). En la Figura 6B es posible observar las heridas de las hojas infectadas con la bacteria.

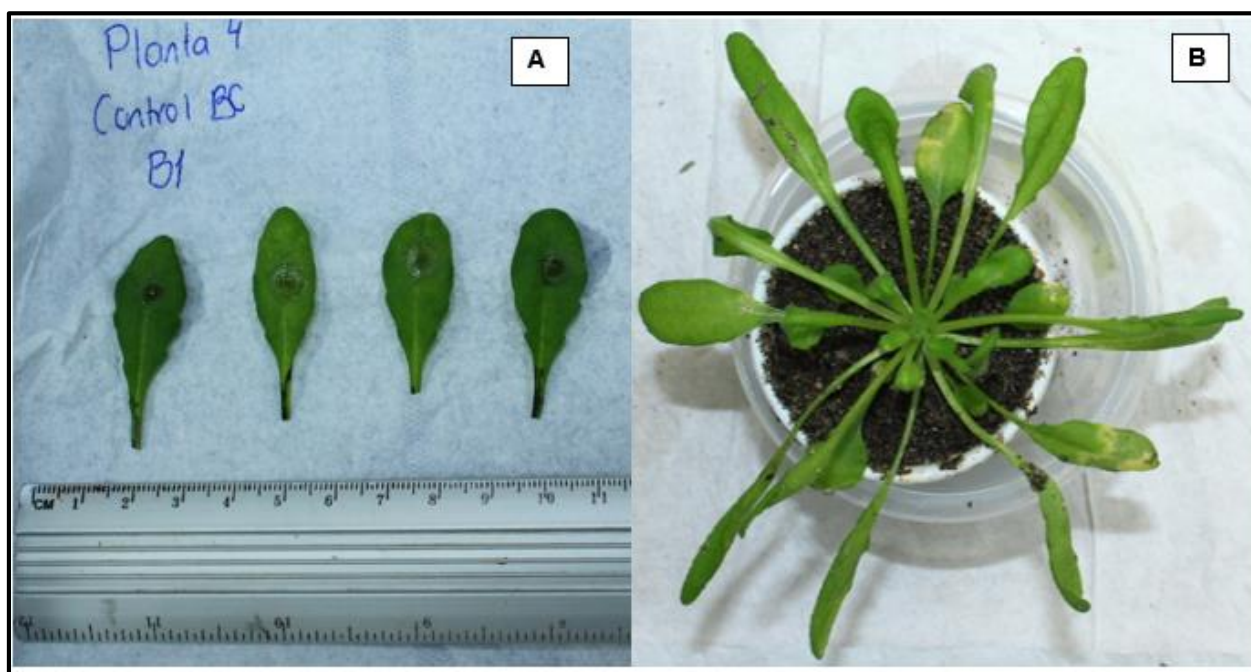


Figura 6. Evaluación de susceptibilidad en plantas de *Arabidopsis thaliana* (A) Medición del radio de heridas provocadas por *Botrytis cinerea* (B) Cuantificación de hojas infectadas por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

5.10. Diseño Experimental

Debido a que tanto el material experimental como las condiciones de ambiente en las que se llevó a cabo la investigación fueron homogéneas se utilizó un diseño completamente aleatorizado de un factor (DCA) (Sanchez, 2005). Bajo este diseño, se obtuvieron grupos elaborados de forma aleatoria sobre los cuales se aplicaron las diferentes dosis de glifosato. Una vez concluida la etapa de crecimiento, las pruebas de susceptibilidad en los bioensayos fueron clasificados de acuerdo con el mismo diseño DCA. La tabla 1 detalla el número de plantas utilizadas en cada replica. Los datos obtenidos de crecimiento diferencial como de susceptibilidad frente a ambos patógenos fueron analizados por medio de una prueba t de Student a través de comparación de medias ($P \leq 0.05$), utilizando el programa IBM SPSS Statistics 25.

Tabla 1: Número de plantas utilizadas en cada replica para evaluación de bioensayos y evaluación de crecimiento

Dosis Glifosato (g AE/L)	Inoculación Pseudomonas	Inoculación Botrytis	Crecimiento
0	8	8	10
3.6×10^{-6}	8	8	10
3.6×10^{-9}	8	8	10
	24	24	30

VI. Resultados

6.1. Comparación de crecimiento (peso seco foliar y radicular) bajo diferentes condiciones de luminosidad (luz baja y luz elevada).

Para determinar si existe alguna influencia de dosis mínimas de glifosato en el crecimiento de las plantas se consideró el peso seco tanto foliar como radicular. A continuación, la Figura 7 presenta una comparativa del efecto que tuvieron las diferentes dosis de glifosato evaluadas sobre el peso seco tanto foliar como radicular de las plantas de *Arabidopsis thaliana* tratadas bajo dos condiciones de luz. Cabe mencionar que los datos presentados siguieron una tendencia similar en 2 repeticiones realizadas bajo las mismas condiciones. Las plantas fueron cosechadas después de 4 semanas de haber realizado el trasplante definitivo, y después de 2 semanas de haber suministrado los tratamientos de glifosato. El primer grafico de barras (7a) de la figura compara las diferencias entre tratamientos del peso seco foliar, en el que es posible evidenciar que existió un efecto de inducción de crecimiento provocado por ambas dosis del herbicida en comparación con las plantas control. En lo que respecta al tratamiento B (3.6×10^{-9} g AE/L) y tratamiento C (3.6×10^{-6} g AE/L) el peso fresco foliar obtenido fue de 0.202 gramos y 0.199 gramos respectivamente lo que evidencia un diferencial de crecimiento considerable con el tratamiento A (control), bajo el cual se obtuvo un peso fresco foliar promedio de 0.145 gramos. Para el análisis estadístico se utilizó una prueba t de comparación de medias, el cual demostró que existió diferencia significativa en los valores medios de crecimiento foliar obtenidos en el tratamiento B (3.6×10^{-9} g AE/L) y tratamiento C (3.6×10^{-6} g AE/L), ambos comparados individualmente con el valor medio del tratamiento A control. Al comparar las

medias de los tratamientos B y C entre sí, se concluyó que no existieron diferencias significativas entre ambas dosis.

En el grafico 7b, se compara el efecto que tuvo la aplicación de diferentes dosis de glifosato en el peso seco radicular. El tratamiento A control (0 g AE/L) presenta un peso radicular promedio de 0.104 gramos mientras que los tratamientos B y C, presentan pesos promedio más bajos, 0.064 y 0.077 gramos respectivamente. Claramente se observa que hay un efecto opuesto a lo sucedido con el peso seco foliar. Al analizar los valores por medio de la prueba t de comparación de medias, se obtiene que hay diferencias significativas solamente en la comparación de las medias del tratamiento B comparada con la media del control. Esto sugeriría que, la dosis de glifosato más baja disminuyó considerablemente el peso radicular de las plantas que habían promovido el crecimiento foliar. Es importante mencionar además que, a estas dosis tan pequeñas no se aprecia ningún tipo de daño (amarillamiento o deshidratación) en el tejido de las plantas.

Posteriormente, se evaluó si el efecto estimulador que tuvieron las dosis mínimas de glifosato en el crecimiento de las plantas de *A. thaliana* es persistente bajo diferentes condiciones de luminosidad tomando en cuenta nuevamente la diferencia en peso seco foliar y radicular existente entre los distintos tratamientos. Esta vez, se manejaron condiciones de luz y temperatura distintas. Los resultados contrastan con lo evaluado en las condiciones anteriores. En el caso del peso seco foliar, representado por la gráfica de barras 7c en la parte superior de la Figura 7, ambas dosis de glifosato consideradas disminuyen el peso foliar en gramos de las plantas evaluadas con respecto a las plantas control. Los valores obtenidos en esta replica para el tratamiento B (3.6×10^{-9} g AE/L) y el tratamiento C (3.6×10^{-6} g AE/L), fueron de 0.1421

gramos y 0.1327 gramos respectivamente. Por otro lado, el valor correspondiente al tratamiento A (control) es de 0.355 gramos. El análisis estadístico de comparación de medias con la Prueba t demostró que existió diferencia significativa entre medias del peso seco foliar al comparar el valor medio del tratamiento A control tanto con la media del tratamiento B como con la media del tratamiento C. Sin embargo, no hubo diferencias estadísticas entre las medias de los tratamientos A y B comparados entre sí. Esto indicaría que ambas dosis evaluadas tienen un efecto de inhibición de crecimiento foliar bajo las condiciones ambientales proporcionadas.

Con respecto al peso fresco radicular bajo las condiciones de luminosidad elevada, el gráfico de barras 7d en la parte inferior de la Figura 7, indica que el glifosato incrementó el peso de raíz, al contrario de lo que sucedía con la evaluación del primer ensayo. Para el tratamiento A (0 g AE/L) control se obtuvo un peso seco radicular promedio de 0.0499 gramos, tanto el tratamiento B como el tratamiento C (3.6×10^{-6} g AE/L) obtuvieron pesos secos radiculares superiores de 0.1418 y 0.0612 respectivamente. De acuerdo con la prueba de t de Student ($P \leq 0.05$) realizada, solo existe diferencia significativa entre la media del tratamiento A y la media del tratamiento B, esto sugiere que la estimulación de crecimiento a causa del glifosato bajo estas condiciones sucede a nivel radicular y no a nivel foliar.

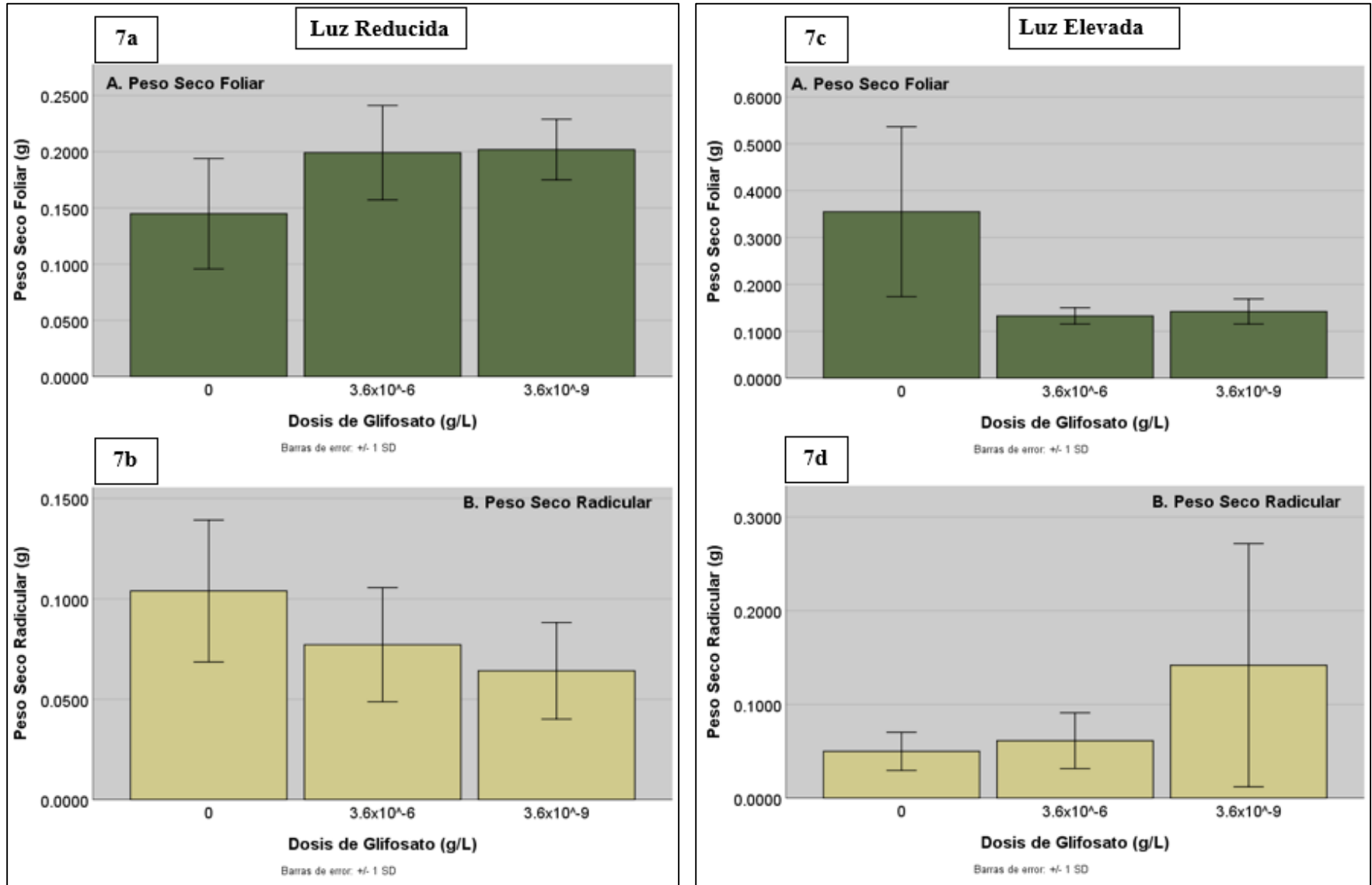


Figura 7. Comparativa del efecto de las dosis de glifosato en el peso seco foliar y peso seco radicular de plantas de *A. thaliana* desarrolladas bajo dos condiciones de luminosidad diferentes. El asterisco señala los tratamientos que presentaron diferencias estadísticas respecto al control, de acuerdo con la prueba de t de Student ($P \leq 0.05$),

6.2. Evaluación de susceptibilidad: bioensayos

6.2.1. Bioensayo 1: *A. thaliana* frente a *B. cinerea*

Para evaluar el nivel de incidencia del patógeno necrotrófico *B. cinerea* se midió el radio de las lesiones provocadas por el hongo 3 días después de la inoculación en 5 hojas de cada planta. Las heridas se caracterizan por presentar un centro necrótico y expansión del tejido muerto rodeado por un círculo clorótico. De forma visual, las diferencias entre tratamientos y control no fueron tan evidentes, sin embargo, al comparar los valores del radio obtenidos se evidencia diferencias entre tratamientos. Las plantas utilizadas para los bioensayos fueron plantadas al mismo tiempo y en las mismas condiciones que las plantas utilizadas para la evaluación de peso seco en condiciones de luz artificial y mayor temperatura. La figura 8 presenta un diagrama de caja y bigote (box plot) en el que se evalúa el efecto que tuvieron las diferentes dosis de glifosato en el radio promedio medido en milímetros de las lesiones provocadas por el hongo en las plantas de *Arabidopsis thaliana*. El tratamiento B (3.6×10^{-9} g AE/L) presenta el valor más alto del radio promedio de heridas provocado por *B.cinerea*, con un promedio de 7.87 mm de radio. Evidentemente, tiene un valor mayor que el tratamiento A control (0 g AE/L) y el tratamiento C (3.6×10^{-6} g AE/L) los cuales obtuvieron un radio promedio de 6.55 mm y 6.95 mm respectivamente.

De acuerdo con el análisis de datos de la prueba t de Student (Figura 8) de comparación de medias ($P \leq 0.05$), existieron diferencias significativas entre el tratamiento B (3.6×10^{-9} g AE/L) comparada con el control y también hubo diferencia con respecto a la media del tratamiento C (3.6×10^{-6} g AE/L). Sin embargo, la diferencia de medias no es significativa al

comparar el tratamiento C con el tratamiento A control. Esto sugiere que las plantas que fueron tratadas con la dosis de glifosato de 3.6×10^{-9} g AE/L presentan un mayor nivel de susceptibilidad que el control y que la dosis restante.

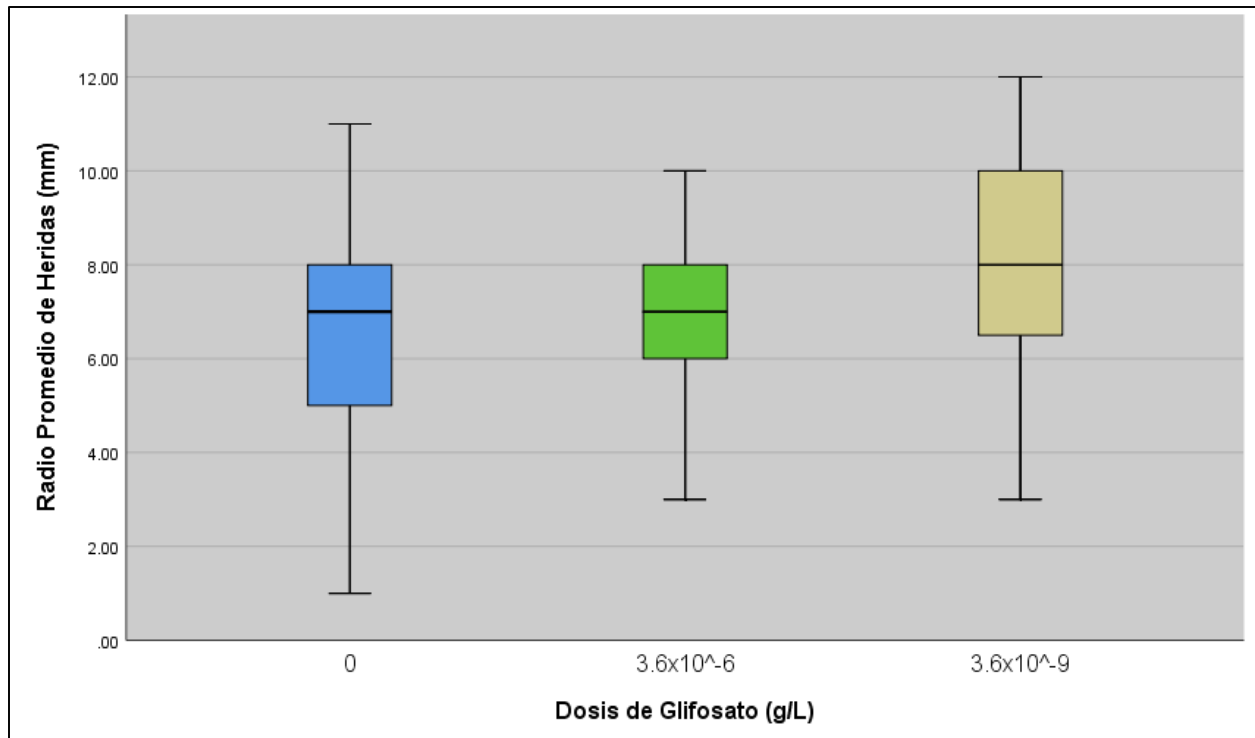


Figura 8. Efecto de dosis mínimas de glifosato sobre el radio promedio de las heridas provocadas por el hongo *B. cinerea* en plantas de *A. thaliana*. El asterisco señala los tratamientos que presentaron diferencias estadísticas respecto al control, de acuerdo con la prueba de t de Student ($P \leq 0.05$)



Figura 9. Plantas de *A. thaliana* por tratamiento (A: control, B: 3.6×10^{-9} y C: 3.6×10^{-6}) después de 3 días de la inoculación del hongo *B. cinerea* en 5 hojas de cada planta

6.2.2. Bioensayo 2: *A. thaliana* frente a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000

La evaluación de los bioensayos de la bacteria se realizó después de 4 días de haber realizado la inmersión de las plantas en la solución bacteriana. Como se mencionó anteriormente, la evaluación consistió en la cuantificación de las hojas que presentan lesiones de marca de agua provocadas por la bacteria, del total de hojas de la planta. La Figura 10 compara el efecto que tuvieron las diferentes dosis de glifosato sobre la susceptibilidad de las plantas de *Arabidopsis thaliana* en términos del porcentaje de hojas infectadas. A simple vista resulta difícil determinar si existieron diferencias significativas en cuanto al porcentaje de infección entre tratamientos, sin embargo, tomando en cuenta los valores promedios para cada tratamiento se observa que el tratamiento C (3.6×10^{-6} g AE/L) que tiene la dosis más elevada del herbicida, presenta el mayor porcentaje de infección con un promedio de 39.30 % de hojas infectadas. Por otro lado, el tratamiento B (3.6×10^{-9} g AE/L) que presenta una dosis más reducida de glifosato presenta un promedio de 37.54 % de hojas infectadas. Es importante destacar que ambas dosis de glifosato evaluadas tienen un porcentaje de infección mayor que el promedio que presenta el tratamiento A (0 g/L) control que es de 35.03 % hojas infectadas.

No obstante, el análisis estadístico de la Prueba t de Student ($P \leq 0.05$) para muestras independientes (Figura 11), indica que no existieron diferencias significativas entre las medias de ninguno de los tratamientos. Esto podría sugerir que, las dosis de glifosato evaluadas en este estudio no tuvieron ningún efecto sobre el nivel de susceptibilidad de las plantas frente a la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000.

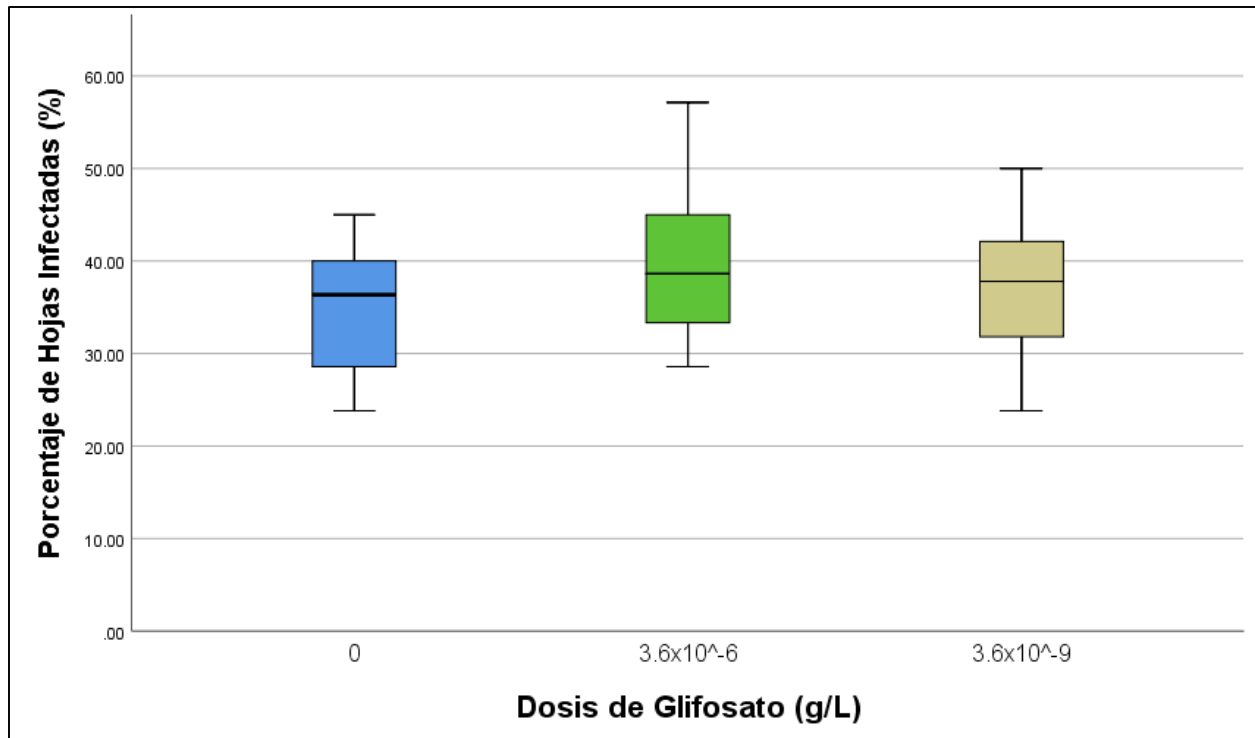


Figura 11: Efecto de dosis mínimas de glifosato sobre el porcentaje promedio de hojas infectadas por la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* en plantas de *A. thaliana*

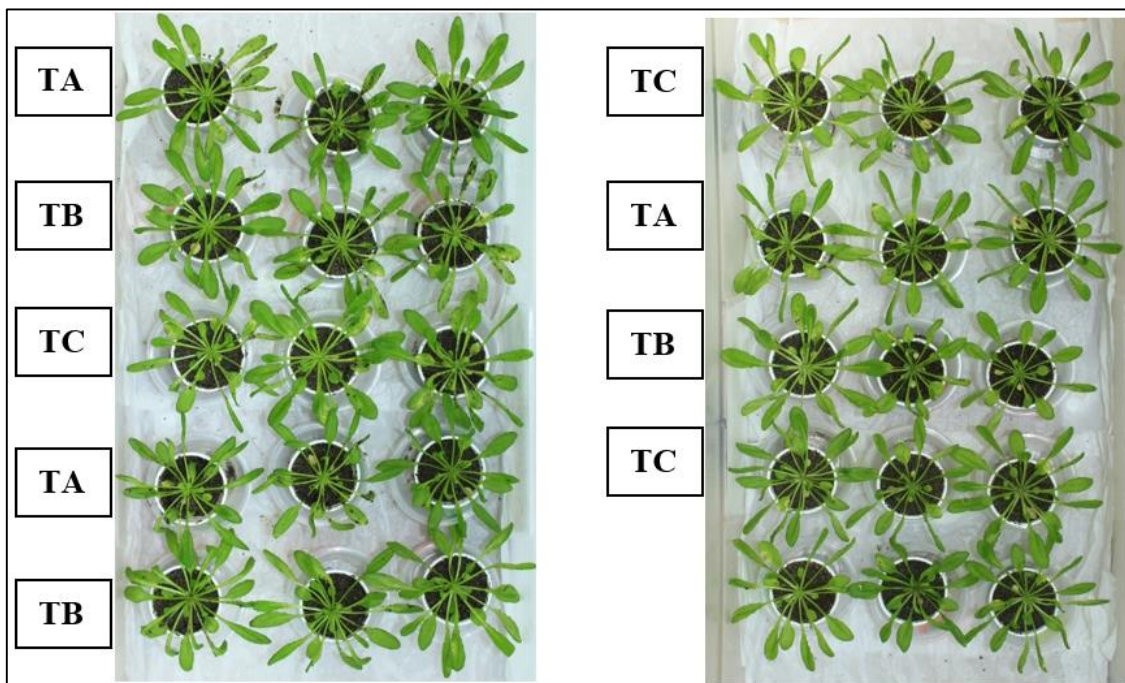


Figura 10. Plantas de *A. thaliana* por tratamiento (A: control, B: 3.6×10^{-9} y C: 3.6×10^{-6}) después de 3 días de la inmersión en una solución bacteria de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

VII. Discusión

7.1. Evaluación de crecimiento bajo diferentes condiciones de luminosidad: Peso

Seco Foliar y Radicular

Durante las pruebas en condiciones normales de luz del invernadero fue posible evidenciar una respuesta de inducción del crecimiento foliar (hormesis) por efecto de ambas dosis bajas evaluadas de glifosato en las plantas de *A. thaliana*. De acuerdo con Cedergreen y Olesen (2010), para que las plantas logren un incremento significativo en su biomasa, es necesario que las plantas incrementen su tasa fotosintética o bien que disminuya su tasa respiratoria en respuesta a estas dosis reducidas de glifosato. Resulta teóricamente más lógico suponer que las plantas en el ensayo optaron por un incremento en su tasa fotosintética, a través de un mejor aprovechamiento de la luz o una eficiencia en la fijación de carbono, que explique el porqué de la estimulación del crecimiento. No obstante, sería necesario comprobar esta hipótesis midiendo la actividad fotosintética de las plantas a diferentes condiciones y dosis del herbicida.

Por otro lado, se demostró que el crecimiento radicular tuvo un efecto de inhibición de crecimiento cuando se evidenciaba inducción en el crecimiento foliar. En la investigación elaborada por Velini et al. (2008), se evidenció que en soya y maíz el sistema radicular no se ve afectado por las bajas dosis de glifosato que, si provocaron una respuesta hormética a nivel foliar, sin embargo, en otras dos especies estudiadas *Pinus caribea* y *Eucalyptus grandis*, se observa un efecto opuesto a lo que se encontró en maíz y soya, es decir, hay inducción tanto a nivel foliar como radicular. Es importante considerar que *P.caribea* y *E. grandis* fueron

mantenidas en crecimiento por 40 días más, por lo que se supondrían que los efectos a nivel radicular necesita más tiempo para que ocurran.

Varios autores sostienen la hipótesis de la ocurrencia de la hormesis como un proceso evolutivo de respuesta compensatoria frente a la exposición de algún tipo de estrés en el que se asignan recursos de reserva para el crecimiento de la planta. Respecto a esta reasignación de recursos Belz y Cedergreen (2010), en su estudio sobre las causas de variabilidad del efecto hormético en *Lactuca sativa*, mencionan la posibilidad de que esta translocación o reparto de recursos de reserva provoquen un “*trade off*” o un intercambio en cierto rasgo morfológico, pudiendo comprometer su desarrollo radicular a costa de su desarrollo foliar, tal como sucedió con las plantas de *A. thaliana* al modificar sus condiciones de crecimiento en esta investigación. Además, este “*trade off*” observado en las plantas de *A. thaliana* es consistente con la hipótesis de que el efecto hormético se presenta como una respuesta a un estrés químico. Sin embargo, bajo condiciones subóptimas de desarrollo esta respuesta podría ser inhibida por la acción de más de un tipo de estrés en la planta que provocara la desaparición de la estimulación del crecimiento o que la estimulación tome lugar en otro rasgo de la planta.

Un elemento fundamental que puede determinar que la estimulación de crecimiento se de en la parte foliar o en la parte radicular de la planta, más allá de las condiciones de crecimiento, es la capacidad de la absorción de nutrientes y la translocación de estos que podría estar condicionada por la acción de glifosato a bajas dosis. Una de las particularidades de la molécula de glifosato es su capacidad de enlazarse con iones metálicos (quelación), que de acuerdo con Martínez et.al (2018) esta habilidad puede provocar la formación de quelatos (glifosato-ion metálico) de baja solubilidad dentro de tejidos de la planta, que puedan dificultar

la traslocación de nutrientes dentro de la planta o dentro de la rizosfera que restrinjan la disponibilidad de nutrientes metálicos para el transporte dentro de la planta. Debido a que tanto la solución nutritiva como el glifosato “*Ranger 480*” fueron aplicados en los contenedores plásticos y subieron a la planta por capilaridad, es posible que la formación de estos quelatos haya dificultado la toma de nutrientes por las raíces y la traslocación de ciertos nutrientes a la parte foliar, provocando una inducción de crecimiento exclusivamente en la zona radicular.

Como se mencionó anteriormente, es posible observar que el fenómeno hormético en crecimiento foliar de *A. thaliana* ocurrió bajo ciertas condiciones específicas de luz. Una vez que se alteraron las condiciones iniciales que consistían en baja luz, a condiciones de luz elevadas, más propicias para el crecimiento uniforme de las plantas se observó en más de una ocasión que las mismas dosis que tuvieron un efecto de inducción de crecimiento foliar esta vez tuvo un efecto inhibitorio. Es importante tomar en cuenta que la aplicación del glifosato y la cosecha de las plantas fue realizada al mismo tiempo en ambas condiciones. Sin embargo, fue evidente que el cambio a condiciones de luz más directa provocó un aceleramiento en el crecimiento de las plantas de *A. thaliana*, acortando de esta forma el ciclo de la planta. Velini et.al. (2008), en su investigación sobre el efecto estimulante del glifosato en diferentes especies vegetales, comprobó en la maleza *Commelina benghalensis* que el rango de dosis que provoca un efecto hormético y la amplitud de la respuesta es diferente no solamente entre distintas especies de plantas sino también que hay diferencias entre etapas de crecimiento dentro de una misma especie. Es por esto por lo que la reducción en el ciclo de crecimiento de *A. thaliana* provocado por el establecimiento de condiciones de luz más óptimas, podría explicar porque no existió un efecto de hormesis bajo estas condiciones, sino que por el contrario se inhibió en cierto grado el crecimiento.

En relación con las condiciones de crecimiento como causante de la variabilidad del efecto hormético, Belz (2008), realizó una investigación en la que se demostró que la hormesis en el área foliar de *Sinapsis arvensis* bajo diferentes dosis de la toxina partenina es influenciada por las condiciones de crecimiento a la que se somete el experimento. Una primera prueba experimental, bajo condiciones cálidas, que no eran óptimas para el crecimiento de las plantas demostró que hay ausencia de inducción de crecimiento, sin embargo, en la segunda prueba experimental bajo condiciones frescas, óptimas para el crecimiento de las plantas fue evidente una estimulación en el área foliar de las plantas tratadas. Esto sugiere que, las condiciones experimentales no solo afectan el rango de concentración a la que ocurre la hormesis, sino también modifica la amplitud de la respuesta estimuladora. En el caso de las plantas de *Arabidopsis thaliana* usadas en este estudio, las condiciones óptimas de crecimiento establecidas tuvieron un efecto de inhibición de crecimiento foliar bajo las dosis de glifosato evaluadas, y un efecto de estimulación en condiciones que no eran óptimas para el desarrollo, es decir, un resultado contrario a lo que sucedió con la planta *Sinapsis arvensis*.

Visualmente, el cambio de condiciones de luminosidad provocó una diferencia de uniformidad y ritmo de crecimiento de las plantas de *Arabidopsis thaliana*, bajo condiciones de baja luminosidad se obtuvieron plantas de crecimiento más lento, mientras que con condiciones de alta luminosidad se obtuvieron plantas de crecimiento más acelerado. Belz y Sinkkonen (2016), investigaron si es que la respuesta hormética en términos de elongación radicular y foliar, es heterogénea dentro de una población en la que existen individuos de crecimiento rápido e individuos de crecimiento lento, y observaron que los organismos de crecimiento lento contribuyen de forma más significativa a la respuesta hormética dentro de la población que los organismos que crecen con mayor rapidez. Esto quiere decir, que la tasa de crecimiento a nivel

de una subpoblación puede llegar a enmascarar el efecto hormético en toda una población. En este estudio, las condiciones de luminosidad modificaron el ritmo de crecimiento provocando una diferencia notable en la estimulación de crecimiento a nivel foliar o a nivel radicular, para las plantas de crecimiento lento el efecto hormético se observó a nivel foliar mientras que para las de crecimiento más acelerado a nivel radicular.

Mas allá de que estas pequeñas dosis puedan generar incrementos útiles para el aprovechamiento productivo, existe un riesgo asociado con la aplicación de glifosato en campo si es que el efecto de hormesis se evidencia en las malezas que se pretende controlar. Las condiciones de campo provocan una distribución del herbicida muy heterogénea por lo que plantas objetivo reciben dosis mucho más pequeñas que las que se planifican para su control inicialmente, esto generaría una respuesta estimuladora y no una inhibición de su crecimiento por lo que se reducirá la eficiencia del glifosato para controlar ciertas malezas.

7.2. Evaluación de la susceptibilidad en *Arabidopsis thaliana*

Como fue demostrado estadísticamente en los resultados, la dosis más reducida de glifosato fue la que presento mayor susceptibilidad frente al hongo necrotrófico *Botrytis cinerea*. De acuerdo con Johan y Huber (2009), también se ha comprobado un aumento de la susceptibilidad en otros hongos necrotróficos como en *Fusarium spp.* en el cultivo de trigo o en *Sclerotia sclerotium*, en el cultivo de manzana. Existen varios mecanismos por los que el glifosato predispone a las plantas a una enfermedad patogénica. El mecanismo más común está relacionado a la incidencia de la molécula del glifosato en la ruta del ácido shickimico, ruta que se encarga de producir los precursores necesarios para la producción de componentes de resistencia activa en la ruta del fenilpropanoide. Bramhall y Higgins (1988) comprobaron que

el glifosato hace susceptibles a las plantas de tomate, a la podredumbre de corona y raíz provocada por el hongo *Fusarium* a través de la inhibición de barreras estructurales y defensivas. Uno de esos componentes es la lignina que fortifica las paredes celulares frente al ataque de un patógeno, aislándolo en el sitio de infección para evitar que continúe invadiendo la planta, por lo que la dosis de glifosato que más afectó a la susceptibilidad de las plantas pudo tener un efecto de acumulación de ácido shickimico por inactivación de la enzima EPSPS que no permitió la lignificación en las células de las hojas, tornándose más propensas a una infección.

De acuerdo con Evans et.al (2007), otro mecanismo por el que las plantas son más propensas a las enfermedades por efecto del glifosato es la falta de disponibilidad de micronutrientes en el suelo previamente tratado con este herbicida. Los micronutrientes tienen un rol fundamental como activadores o inhibidores de muchos procesos fisiológicos, como el establecimiento de la defensa frente a patógenos, por lo que una deficiencia en un microelemento en particular podría afectar la resistencia frente a enfermedades. La participación del microbioma del suelo es primordial para facilitar la disponibilidad inmediata en formas químicas aprovechables para la planta tanto de micro como de macronutrientes. Al respecto, Huber et al. (2004) menciona que el glifosato es tóxico para organismos que reducen el Mn y para organismos que fijadores de N por lo que la disponibilidad de ambos nutrientes quedaría comprometida considerablemente. Es decir, parece ser que el glifosato más allá de prevenir el aprovechamiento de nutrientes esenciales para fortificar la defensa vegetal, causa serias alteraciones en la dinámica de la comunidad bacteriana que impactan de forma negativa tanto la salud como la productividad de ciertos cultivos.

Aunque resulta inconsistente el resultado que indica que la dosis menor haya afectado la susceptibilidad frente a *Botrytis cinerea* y no la dosis mayor, se podría suponer que el glifosato actuó como un elicitador de respuesta defensiva a la dosis mas elevada de tal forma que su susceptibilidad se redujo en cierto porcentaje. Respecto a esta suposición, Nelson et.al (2002) comprobó que las aplicaciones de ciertos herbicidas inhiben la enzima protoporfirinógeno oxidasa en el cultivo de soya funcionan como un elicitador de la defensa de las plantas mejorando la resistencia frente al hongo *Sclerotinia sclerotium*, a través del incremento de la producción de fitoalexinas.

Mantener un balance nutricional por debajo de niveles óptimos es uno de los factores abióticos que predisponen a la planta a ser susceptibles frente a enfermedades patogénicas. Martinez et.al (2018), menciona que existen pruebas de que el glifosato interviene en la toma de nutrientes, la translocación de estos dentro de la planta y la utilización de elementos esenciales, especialmente los metales. Por otra parte, Eker et.al (2006) en plantas de *Helianthus annuus* demostró que dosis subletales de glifosato reducían en un 25 y 75 % la captación radicular de manganeso y hierro respectivamente. En el presente estudio, es posible que la dosis mínima de glifosato pudo haber interferido en la toma de macro y microelementos a nivel radicular lo que generó una deficiencia de elementos clave en el establecimiento de una respuesta defensiva frente al patógeno necrotrófico haciendo a la planta de *Arabidopsis thaliana* más susceptible a la infección.

A pesar de que las diferencias de susceptibilidad frente a *Pseudomonas syringae pv tomato* entre los tratamientos no fueron estadísticamente significativas entre sí, se observó que el tratamiento A control tuvo el menor porcentaje de infección de hojas en comparación con el

resto de los tratamientos. Esto podría significar que las plantas sin glifosato presentan un mejor establecimiento de respuestas defensivas frente a un patógeno biotrófico. Según Johal y Huber (2009), los precursores directos e indirectos del ácido salicílico SA (corismato y fenilalanina) son dependientes la ruta del ácido shikimico, por lo que la síntesis de esta hormona puede estar comprometida al estar presente el glifosato dentro de la planta. Pese a que el SA no es un antimicrobiano en sí, es útil para señalar y coordinar una respuesta defensiva frente a patógenos que cumplen una parte de su ciclo de forma biotrofica como la bacteria *Pseudomonas syringae*. Esto explicaría la falta de respuesta defensiva en los tratamientos que tuvieron la influencia de pequeñas dosis de glifosato.

Afortunadamente, de acuerdo con Johal y Huber (2000), a nivel de campo es posible generar estrategias para reducir el efecto que el glifosato presenta sobre predisposición de plantas de interés productivo a enfermedades. Por ejemplo, resulta útil mejorar la suficiencia de micronutrientes móviles a través de aplicaciones foliares que mantengan un nivel de resistencia y funcionamiento fisiológico óptimo para las plantas de interés. Además, sería necesario conocer puntualmente las bacterias útiles del microbioma del suelo que contribuyen a nivel radicular, con el propósito de restaurar la presencia de organismos sinérgicos través de la inoculación de los mismos después de aplicaciones prolongadas del herbicida.

VIII. Conclusiones

- 1) Las plantas expuestas a dosis mínimas de glifosato en condiciones de baja luz presentan mayor crecimiento foliar y menor crecimiento radicular
- 2) Las plantas expuestas a dosis mínimas de glifosato en condiciones de alta luz presentan menor crecimiento foliar y mayor crecimiento radicular,
- 3) En comparación con el control, las plantas que fueron tratados con una dosis de glifosato de 3.6×10^{-9} y 3.6×10^{-6} g AE/L presentan un mayor radio de herida provocada por el hongo *Botrytis cinerea*. Esto indica que *Arabidopsis thaliana* es más susceptible a enfermedades provocadas por patógenos necrotróficos cuando es tratada con bajas dosis de glifosato
- 4) Con una dosis de glifosato de 3.6×10^{-9} y 3.6×10^{-6} g AE/L se obtuvo un porcentaje más alto de hojas infectadas por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* que se obtuvo con el control. Por lo tanto, los bioensayos demuestran que *Arabidopsis thaliana* resulta más susceptible a lesiones provocadas por patógenos biotróficos cuando son tratadas con bajas dosis de glifosato.

IX. Recomendaciones

- 1) Para conocer concretamente el efecto de la luminosidad en la respuesta hormética, es necesario considerar la medición de las diferencias de luz entre uno y otro ambiente a través de la implementación de un luxómetro.
- 2) Evaluar cual puede ser la respuesta de la inmunidad bajo condiciones no favorables para el crecimiento de las plantas de *Arabidopsis thaliana*.
- 3) Es necesario considerar un análisis de más parámetros fisiológicos como tasa de transpiración, tasa fotosintética, conductancia estomática, entre otros que confirmen la ocurrencia de la hormesis y permitan conocer el mecanismo exacto por el cual sucede la estimulación del crecimiento a causa de dosis mínimas de glifosato.
- 4) Se recomienda analizar el microbioma de las plantas con tratamientos de glifosato debido a que existen ciertas bacterias que pueden estar implicadas en la respuesta fisiológica de las plantas.
- 5) Se sugiere la elaboración de un análisis de la concentración de las trazas glifosato que permanece en el suelo después de repetidas aplicaciones para saber si presentan riesgo para la susceptibilidad de los cultivos a establecerse.

X. Referencias

- Benbrook, C. (2016). Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environmental Sciences Europe*.
- Brito, I., Tropaldi, L., Carbonari, C., & Velini, E. (2017). Hormetic effects of glyphosate on plants. *Pest Management Science*, 1064-1070.
- Bustillo, A. (2010). *MÉTODO PARA CUANTIFICAR SUSPENSIONES DE ESPORAS DE HONGOS Y OTROS ORGANISMOS*. Obtenido de ResearchGate: https://www.researchgate.net/publication/277870402_METODO_PARA_CUANTIFICAR_SUSPENSIONES_DE_ESPORAS_DE_HONGOS_Y_OTROS_ORGANISMOS
- Cuesta, C., & Cires, E. (2012). *Arabidopsis Thaliana como organismo modelo de biología*. Obtenido de ResearchGate: https://www.researchgate.net/publication/260076781_Arabidopsis_thaliana_como_organismo_modelo_en_Biologia
- Eker, S., Ozturk, Z., Yazici, A., Erenoglu, B., Romheld, V., & Cakmak, I. (2006). Foliar-Applied Glyphosate Substantially Reduced Uptake and Transport of Iron and Manganese in Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 10019-10025. Obtenido de <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf0625196>
- Gamboa. (2016). *Botánica general: Introducción al estudio de las plantas*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Gianessi, L. (2013). The Increasing Importance of Herbicides in Worldwide Crop Production. *Pest Management Science*, 1099- 1105.

- Goosens, A., & Pauwels, L. (2013). *Jasmonate Signaling: Methods and Protocols*. Gent: Humana Press.
- Huber, D., & Johal, G. (2009). Glyphosate effects on diseases of plants. *European Journal of Agronomy*, 144-152.
- Kremer, R., Means, N., & Kim, S. (2005). Glyphosate effects soybean root exudation and rhizosphere micro-organisms. *Int J Environ Anal Chem*, 1165-1174.
- Martinez, D., Loening, U., & Graham, M. (2018). Impacts of glyphosate-based herbicides on disease resistance and health of crops: a review. *Environmental Science Europe*.
Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29387519>
- Nelson, K., Renner, K., & Hammerschmidt, R. (2002). Effects of Protoporphyrinogen Oxidase Inhibitors on Soybean (*Glycine max* L.) Response, *Sclerotinia sclerotiorum* Disease Development, and Phytoalexin Production by Soybean. *Weed Technology*, 353-359.
Obtenido de https://www.jstor.org/stable/3989559?seq=1#page_scan_tab_contents
- Ojito, K., & Portal, O. (2010). Introducción al sistema inmune en plantas. *Bioteología Vegetal*, 3-19.
- Pazmiño, M. (2018). *Evaluación de crecimiento y expresión de genes relacionados a las rutas metabólicas del ácido jasmónico y ácido salicílico después de la aplicación de glifosato en Arabidopsis thaliana*. Obtenido de Repositorio USFQ: <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/7533/1/139472.pdf>
- Peñaherrera, L. (2013). *Situación actual sobre el uso del glifosato en Ecuador*. Obtenido de ResearchGate:

https://www.researchgate.net/publication/304149389_Situacion_actual_sobre_el_uso_del_glifosato_en_Ecuador

Pieterse, C., Van der Does, D., Zamioudis, C., León, A., & Van Wees, S. (2012). Hormonal Modulation of Plant Immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 489-521. Obtenido de <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-cellbio-092910-154055>

Preston, G. (2000). *Pseudomonas syringae* pv. tomato: the right pathogen, of the right plant, at the right time. *MOLECULAR PLANT PATHOLOGY*, 263-275. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20572973>

Sanchez, J. (2005). *Introduccion al Diseño Experimental*. Quito: Quality Print.

Santos Sánchez, N. F., Salas Coronado, R., Hernández Carlos, B., & Villanueva Cañongo, C. (2019). *Shikimic Acid Pathway in Biosynthesis of Phenolic Compounds*. Obtenido de IntechOpen: <https://www.intechopen.com/online-first/shikimic-acid-pathway-in-biosynthesis-of-phenolic-compounds>

Velini, E., Alves, E., Godoy, M., Meschede, D., Souza, R., & Duke, S. (2008). Glyphosate applied at low doses can stimulate plant growth. *Pest Management Science*, 489-496. Obtenido de <https://pubag.nal.usda.gov/pubag/downloadPDF.xhtml?id=17919&content=PDF>

Wilkerson, D. (2015). *Solución de Nutrientes por Agricultura de Ambiente Controlado*. Obtenido de FOUNDATION FOR THE DEVELOPMENT OF CONTROLLED

ENVIRONMENT AGRICULTURE: http://www.fdcea.com/wp-content/uploads/2015/06/Thurs_2_wilkinson_nutrientsolutions_es.pdf

Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., & Van Kan, J. (s.f.). Botrytis cinerea: the cause of grey mould disease. *MOLECULAR PLANT PATHOLOGY*, 561-580. Obtenido de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x>

Wilson, Z. (2000). *Arabidopsis: A practical approach*. Oxford: Oxford University Press.

XI. Anexos

Anexo 1: Analisis Estadístico Crecimiento

Parte 1: Peso Seco Foliar (Bajo condiciones de luz baja)

Control VS Tratamiento C (3.6×10^{-6})

Estadísticas de grupo											
		Dosis de Glifosato (g/L)	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error promedio					
Peso Seco Foliar (g)		0	10	.144830	.0490769	.0155195					
		3.6×10^{-6}	10	.199060	.0420018	.0132821					
Prueba de muestras independientes											
		Prueba de Levene de igualdad de varianzas				prueba t para la igualdad de medias				95% de intervalo de confianza de la diferencia	
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	Inferior	Superior	
Peso Seco Foliar (g)	Se asumen varianzas iguales	.025	.877	-2.655	18	.016	-.0542300	.0204272	-.0971459	-.0113141	
	No se asumen varianzas iguales			-2.655	17.581	.016	-.0542300	.0204272	-.0972194	-.0112406	

Control VS Tratamiento B (3.6×10^{-9})

Estadísticas de grupo											
		Dosis de Glifosato (g/L)	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error promedio					
Peso Seco Foliar (g)		0	10	.144830	.0490769	.0155195					
		3.6×10^{-9}	10	.201840	.0269860	.0085337					
		Prueba de Levene de igualdad de varianzas				prueba t para la igualdad de medias				95% de intervalo de confianza de la diferencia	
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	Inferior	Superior	
Peso Seco Foliar (g)	Se asumen varianzas iguales	2.031	.171	-3.219	18	.005	-.0570100	.0177110	-.0942193	-.0198007	
	No se asumen varianzas iguales			-3.219	13.987	.006	-.0570100	.0177110	-.0949996	-.0190204	

Tratamiento C (3.6×10^{-6}) VS Tratamiento B (3.6×10^{-9})

Estadísticas de grupo											
		Dosis de Glifosato (g/L)	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error promedio					
Peso Seco Foliar (g)		3.6×10^{-6}	10	.199060	.0420018	.0132821					
		3.6×10^{-9}	10	.201840	.0269860	.0085337					
		Prueba de Levene de igualdad de varianzas				prueba t para la igualdad de medias				95% de intervalo de confianza de la diferencia	
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	Inferior	Superior	
Peso Seco Foliar (g)	Se asumen varianzas iguales	2.841	.109	-.176	18	.862	-.0027800	.0157873	-.0359479	.0303879	
	No se asumen varianzas iguales			-.176	15.349	.863	-.0027800	.0157873	-.0363634	.0308034	

Parte 2: Peso Seco Radicular (Bajo condiciones de luz baja)

Control VS Tratamiento C (3.6×10^{-6})

Estadísticas de grupo											
		Dosis de Glifosato (g/L)	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error promedio					
Peso Seco Radicular (g)		0	10	.103920	.0353465	.0111776					
		3.6×10^{-6}	10	.077140	.0284154	.0089857					
Prueba de muestras independientes											
		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						95% de intervalo de confianza de la diferencia	
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	Inferior	Superior	
Peso Seco Radicular (g)	Se asumen varianzas iguales	.068	.798	1.867	18	.078	.0267800	.0143416	-.0033506	.0569106	
	No se asumen varianzas iguales			1.867	17.206	.079	.0267800	.0143416	-.0034506	.0570106	

Control VS Tratamiento B (3.6×10^{-9})

Estadísticas de grupo											
		Dosis de Glifosato (g/L)	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error promedio					
Peso Seco Radicular (g)		0	10	.103920	.0353465	.0111776					
		3.6×10^{-9}	10	.064160	.0240597	.0076083					
Prueba de muestras independientes											
		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						95% de intervalo de confianza de la diferencia	
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	Inferior	Superior	
Peso Seco Radicular (g)	Se asumen varianzas iguales	.936	.346	2.941	18	.009	.0397600	.0135213	.0113529	.0681671	
	No se asumen varianzas iguales			2.941	15.866	.010	.0397600	.0135213	.0110765	.0684435	

Tratamiento C (3.6×10^{-6}) VS Tratamiento B (3.6×10^{-9})

Estadísticas de grupo											
		Dosis de Glifosato (g/L)	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error promedio					
Peso Seco Radicular (g)		3.6×10^{-6}	10	.077140	.0284154	.0089857					
		3.6×10^{-9}	10	.064160	.0240597	.0076083					
Prueba de muestras independientes											
		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						95% de intervalo de confianza de la diferencia	
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	Inferior	Superior	
Peso Seco Radicular (g)	Se asumen varianzas iguales	1.258	.277	1.102	18	.285	.0129800	.0117741	-.0117565	.0377165	
	No se asumen varianzas iguales			1.102	17.524	.285	.0129800	.0117741	-.0118048	.0377648	

Parte 3: Peso Seco Foliar (Bajo condiciones de luz directa)

Control VS Tratamiento C (3.6×10^{-6})

Estadísticas de grupo										
		Dosis de Glifosato (g/L)	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error promedio				
Peso Seco Foliar (g)		0	12	.354958	.1812441	.0523207				
		3.6×10^{-6}	12	.132700	.0173529	.0050093				
Prueba de muestras independientes										
		Prueba de Levene de igualdad de varianzas			prueba t para la igualdad de medias				95% de intervalo de confianza de la diferencia	
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	Inferior	Superior
Peso Seco Foliar (g)	Se asumen varianzas iguales	37.511	.000	4.229	22	.000	.2222583	.0525599	.1132558	.3312609
	No se asumen varianzas iguales			4.229	11.202	.001	.2222583	.0525599	.1068283	.3376883

Control VS Tratamiento B (3.6×10^{-9})

Estadísticas de grupo										
		Dosis de Glifosato (g/L)	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error promedio				
Peso Seco Foliar (g)		0	12	.354958	.1812441	.0523207				
		3.6×10^{-9}	12	.142117	.0267915	.0077340				
Prueba de muestras independientes										
		Prueba de Levene de igualdad de varianzas			prueba t para la igualdad de medias				95% de intervalo de confianza de la diferencia	
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	Inferior	Superior
Peso Seco Foliar (g)	Se asumen varianzas iguales	32.831	.000	4.024	22	.001	.2128417	.0528892	.1031562	.3225271
	No se asumen varianzas iguales			4.024	11.480	.002	.2128417	.0528892	.0970250	.3286583

Tratamiento C (3.6×10^{-6}) VS Tratamiento B (3.6×10^{-9})

Estadísticas de grupo										
		Dosis de Glifosato (g/L)	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error promedio				
Peso Seco Foliar (g)		3.6×10^{-6}	12	.132700	.0173529	.0050093				
		3.6×10^{-9}	12	.142117	.0267915	.0077340				
Prueba de muestras independientes										
		Prueba de Levene de igualdad de varianzas			prueba t para la igualdad de medias				95% de intervalo de confianza de la diferencia	
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	Inferior	Superior
Peso Seco Foliar (g)	Se asumen varianzas iguales	2.399	.136	-1.022	22	.318	-.0094167	.0092146	-.0285266	.0096932
	No se asumen varianzas iguales			-1.022	18.848	.320	-.0094167	.0092146	-.0287136	.0098802

Parte 4: Peso Seco Radicular (Bajo condiciones de luz directa)

Control VS Tratamiento C (3.6×10^{-6})

Estadísticas de grupo										
		Dosis de Glifosato (g/L)	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error promedio				
Peso Seco Radicular (g)		0	12	.049900	.0203609	.0058777				
		3.6×10^{-6}	12	.061283	.0296971	.0085728				
Prueba de muestras independientes										
		Prueba de Levene de igualdad de varianzas			prueba t para la igualdad de medias				95% de intervalo de confianza de la diferencia	
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	Inferior	Superior
Peso Seco Radicular (g)	Se asumen varianzas iguales	1.636	.214	-1.095	22	.285	-.0113833	.0103942	-.0329397	.0101730
	No se asumen varianzas iguales			-1.095	19.470	.287	-.0113833	.0103942	-.0331032	.0103366

Control VS Tratamiento B (3.6×10^{-9})

Estadísticas de grupo										
		Dosis de Glifosato (g/L)	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error promedio				
Peso Seco Radicular (g)		0	12	.049900	.0203609	.0058777				
		3.6×10^{-9}	12	.141800	.1297649	.0374599				
Prueba de muestras independientes										
		Prueba de Levene de igualdad de varianzas			prueba t para la igualdad de medias				95% de intervalo de confianza de la diferencia	
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	Inferior	Superior
Peso Seco Radicular (g)	Se asumen varianzas iguales	15.296	.001	-2.424	22	.024	-.0919000	.0379182	-.1705376	-.0132624
	No se asumen varianzas iguales			-2.424	11.541	.033	-.0919000	.0379182	-.1748823	-.0089177

Tratamiento C (3.6×10^{-6}) VS Tratamiento B (3.6×10^{-9})

Estadísticas de grupo										
		Dosis de Glifosato (g/L)	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error promedio				
Peso Seco Radicular (g)		3.6×10^{-6}	12	.061283	.0296971	.0085728				
		3.6×10^{-9}	12	.141800	.1297649	.0374599				
Prueba de muestras independientes										
		Prueba de Levene de igualdad de varianzas			prueba t para la igualdad de medias				95% de intervalo de confianza de la diferencia	
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	Inferior	Superior
Peso Seco Radicular (g)	Se asumen varianzas iguales	12.258	.002	-2.095	22	.048	-.0805167	.0384283	-.1602122	-.0008212
	No se asumen varianzas iguales			-2.095	12.149	.058	-.0805167	.0384283	-.1641310	.0030977

Anexo 2: Analisis Estadístico Susceptibilidad

Parte 1: Susceptibilidad Frente a Botrytis cinerea

Control VS Tratamiento C (3.6×10^{-6})

Estadísticas de grupo										
		Dosis de Glifosato (g/L)	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error promedio				
Radio Promedio de Heridas (mm)		0	40	6.5500	2.06249	.32611				
		3.6×10^{-6}	40	6.9500	1.75339	.27723				
Prueba de muestras independientes										
		Prueba de Levene de igualdad de varianzas			prueba t para la igualdad de medias				95% de intervalo de confianza de la diferencia	
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	Inferior	Superior
Radio Promedio de Heridas (mm)	Se asumen varianzas iguales	.539	.465	-.935	78	.353	-.40000	.42802	-1.25213	.45213
	No se asumen varianzas iguales			-.935	76.030	.353	-.40000	.42802	-1.25248	.45248

Control VS Tratamiento B (3.6×10^{-9})

Estadísticas de grupo										
		Dosis de Glifosato (g/L)	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error promedio				
Radio Promedio de Heridas (mm)		0	40	6.5500	2.06249	.32611				
		3.6×10^{-9}	40	7.8750	2.24394	.35480				
Prueba de muestras independientes										
		Prueba de Levene de igualdad de varianzas			prueba t para la igualdad de medias				95% de intervalo de confianza de la diferencia	
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	Inferior	Superior
Radio Promedio de Heridas (mm)	Se asumen varianzas iguales	.210	.648	-2.750	78	.007	-1.32500	.48190	-2.28439	-.36561
	No se asumen varianzas iguales			-2.750	77.452	.007	-1.32500	.48190	-2.28450	-.36550

Tratamiento C (3.6×10^{-6}) VS Tratamiento B (3.6×10^{-9})

Estadísticas de grupo										
		Dosis de Glifosato (g/L)	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error promedio				
Radio Promedio de Heridas (mm)		3.6×10^{-6}	40	6.9500	1.75339	.27723				
		3.6×10^{-9}	40	7.8750	2.24394	.35480				
Prueba de muestras independientes										
		Prueba de Levene de igualdad de varianzas			prueba t para la igualdad de medias				95% de intervalo de confianza de la diferencia	
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	Inferior	Superior
Radio Promedio de Heridas (mm)	Se asumen varianzas iguales	1.433	.235	-2.054	78	.043	-.92500	.45027	-1.82141	-.02859
	No se asumen varianzas iguales			-2.054	73.691	.043	-.92500	.45027	-1.82224	-.02776

Parte 2: Susceptibilidad Frente a *Pseudomonas syringae pv tomato*

Control VS Tratamiento C (3.6×10^{-6})

Estadísticas de grupo										
		Dosis de Glifosato (g/L)	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error promedio				
Porcentaje de Hojas Infectadas (%)		0	10	35.0270	7.46873	2.36182				
		3.6×10^{-6}	10	39.2970	8.81176	2.78652				
Prueba de muestras independientes										
		Prueba de Levene de igualdad de varianzas			prueba t para la igualdad de medias				95% de intervalo de confianza de la diferencia	
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	Inferior	Superior
Porcentaje de Hojas Infectadas (%)	Se asumen varianzas iguales	.316	.581	-1.169	18	.258	-4.27000	3.65280	-11.94424	3.40424
	No se asumen varianzas iguales			-1.169	17.529	.258	-4.27000	3.65280	-11.95904	3.41904

Control VS Tratamiento B (3.6×10^{-9})

Estadísticas de grupo										
		Dosis de Glifosato (g/L)	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error promedio				
Porcentaje de Hojas Infectadas (%)		0	10	35.0270	7.46873	2.36182				
		3.6×10^{-9}	10	37.5450	8.88007	2.80812				
Prueba de muestras independientes										
		Prueba de Levene de igualdad de varianzas			prueba t para la igualdad de medias				95% de intervalo de confianza de la diferencia	
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	Inferior	Superior
Porcentaje de Hojas Infectadas (%)	Se asumen varianzas iguales	.273	.608	-.686	18	.501	-2.51800	3.66930	-10.22691	5.19091
	No se asumen varianzas iguales			-.686	17.486	.502	-2.51800	3.66930	-10.24317	5.20717

Tratamiento C (3.6×10^{-6}) VS Tratamiento B (3.6×10^{-9})

Estadísticas de grupo										
		Dosis de Glifosato (g/L)	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error promedio				
Porcentaje de Hojas Infectadas (%)		3.6×10^{-6}	10	39.2970	8.81176	2.78652				
		3.6×10^{-9}	10	37.5450	8.88007	2.80812				
Prueba de muestras independientes										
		Prueba de Levene de igualdad de varianzas			prueba t para la igualdad de medias				95% de intervalo de confianza de la diferencia	
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	Inferior	Superior
Porcentaje de Hojas Infectadas (%)	Se asumen varianzas iguales	.001	.980	.443	18	.663	1.75200	3.95604	-6.55934	10.06334
	No se asumen varianzas iguales			.443	17.999	.663	1.75200	3.95604	-6.55937	10.06337

Anexo 3: Contenido de nutrientes en Solución Hoagland

Componente	Solución De Reserva	mL Solucion de reserva/1L
Macronutrientes		
2M KNO ₃	202 g/L	2.5
1M Ca(NO ₃) ₂ •4H ₂ O	236 g/0.5L	2.5
Hierro (Sprint 138 quelato de hierro)	15 g/L	1.5
2M MgSO ₄ •7H ₂ O	493 g/L	1
1M NH ₄ NO ₃	80 g/L	1
Micronutrientes		
H ₃ BO ₃	2.86 g/L	1
MnCl ₂ •4H ₂ O	1.81 g/L	1
ZnSO ₄ •7H ₂ O	0.22 g/L	1
CuSO ₄ •5H ₂ O	0.051 g/L	1
H ₃ MoO ₄ •H ₂ O or	0.09 g/L	1
Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	0.12 g/L	1
fosfato		
1M KH ₂ PO ₄ (pH to 6.0)	136 g/L	0.5

Tomado de: (Wilkerson, 2015)