

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



**Posibles cambios en la Enzima 5-Enolpiruvil-Shikimato-3-Fosfato Sintetasa de
Eleusine indica (L.) Gaertn., tratado con glifosato.**

POR:

EFRÉN PÉREZ VILLANUEVA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

**Saltillo, Coahuila, México
Mayo, 2012**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

Posibles cambios en la Enzima 5-Enolpiruvil-Shikimato-3-Fosfato Sintetasa de
Eleusine indica (L.) Gaertn., tratados con glifosato.

Por:

EFRÉN PÉREZ VILLANUEVA

Tesis

Presentado como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Aprobada



M.C. Arturo Coronado Leza
Asesor Principal

PEDRO AARON CERDA G.

Dr. Pedro Aarón Cerda García
Coasesor

Dr. Guadalupe López Nieto
Coasesor

Dr. Leobardo Bañuelos Herrera
Coordinador de la División de Agronomía

Coordinación
División de Agronomía
Saltillo, Coahuila, México
Mayo, 2012



AGRADECIMIENTOS

A mi ALMA TERRA MATER, por abrirme las puertas para seguir adelante, así como obsequiarme las bases de mi formación como Ingeniero Agrónomo Parasitólogo.

Al M.C. Arturo Coronado Lesa, por darme la oportunidad de trabajar con él, brindarme su apoyo para la realización de este trabajo; además de los consejos y amistad que me ofreció.

Al Dr. Pedro Aarón Cerda García, por su apoyo y amistad durante mi estancia en esta universidad, por su confianza y respeto que siempre no hemos tenido, además de sus consejos y por ser un gran amigo. A él y a toda su familia con cariño.

Al Dr. Guadalupe López Nieto, por brindarme la oportunidad de ser su amigo y apoyarme durante esta investigación a demás de ser mi tutor y guiarme durante toda la carrera.

Al Dr. Oswaldo García Martínez, por el apoyo y amistad que fueron de gran utilidad en esta etapa de mi vida, sus consejos siempre los tendré presentes.

A todos los profesores del Departamento de Parasitología, por sus conocimientos brindados en la aulas de clases, gracias.

A todo mis compañeros de clases en especial a todos los de la generación de Ingeniero Agrónomo Parasitólogo, al Adán, Jorge Antonio, Rudy Antonio, Oscar Ángel, Octavio, Gabriel, Jonathan y Jonathan (El Panquee). A mis compañeros de cuarto, Víctor Manuel, Fidencio, Carlotes, Juan Pablo y Juan, Por todo y cada uno de los momento que nos la pasamos como Universitarios, gracias.

DEDICATORIAS

A Dios y a la Virgen de Guadalupe.

Por darme la oportunidad de vivir, y dar un paso más en el escalón de la vida. Así como las fuerzas para salir adelante y terminar esta etapa; además de entregarme valores y principios, a Dios y la Virgen de Guadalupe gracias.

A mis padres.

Vicente Pérez Alvarado.
María Eliazar Villanueva Ortiz.

Por darme la vida y entregarme parte de ellos, llenarme de felicidad; además de brindarme todo su apoyo y guiarme por el camino correcto, es a ellos a quien dedico este trabajo y proyectos futuros. Papá, Mamá a ustedes gracias que siempre estuvimos unidos y que siempre lo será así. Gracias nuevamente por ustedes que supieron llevar a mi familia hasta lo alto muchas felicidades. Que dios me los bendiga.

A mis hermanos.

Omar, con mucho cariño y respeto porque para mí fue un ejemplo a seguir, y por dejarme bien marcado el camino que debo seguir en mi vida de estudiante, como en mi vida profesional. Igualmente a Ana Yance y Braulio por su apoyo y consejo que me motivaban cada día más a seguir a delante. Se lo debo a ellos y a toda mi familia.

A mí cuñada y cuñado.

Laura Aidé y David Alvarado por su cariño y amistad que nos brinda como familia. (Y en especial a cada uno de su familia).

A mis sobrinos

Mariana, Omar Odilón y Brandon; con todo el amor y cariño.

A mis abuelos

Sr. Odilón Pérez Montes †
Sra. María de la Luz Alvarado Díaz
Sr. Amador Villanueva †
Sra. Esperanza Ortiz

A todos mis primos(a) y todos y mis tíos(a).

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
AGRADECIMIENTOS.....	III
DEDICATORIA.....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
RESUMEN.....	VIII
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVO.....	3
HIPÓTESIS.....	3
JUSTIFICACIÓN.....	3
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
Generalidades del maíz (<i>zea maíz</i> , l).....	4
Origen del maíz.....	5
Clasificación taxonómica del maíz.....	6
Biología.....	7
Anatomía de la planta del maíz.....	7
Germinación.....	7
Raíz.....	7
Tallo.....	8
Hoja.....	8
Flores.....	8
Importancia del maíz.....	9
Problemas fitosanitarios.....	10
Malezas.....	10
Las principales malezas en maíz de México.....	11
Clasificación taxonómica de <i>Eleusine indica</i> (L.) Gaertn.....	12
Generalidades de pata de gallina <i>Eleusine indica</i> (L.) Gaertn.....	12
Descripción de <i>Eleusine indica</i> (L.).....	13

Importancia de <i>Eleusine indica</i> (L.).....	13
Control Biológico.....	14
Control Químico.....	15
Enfermedades.....	15
Plagas del maíz.....	16
Uso del glifosato.....	17
Historia.....	17
Modo de acción.....	18
Sitio de Acción.....	19
Molécula del glifosato.....	21
Efectos Fisiológicos.....	21
Resistencia a herbicidas.....	22
Resistencia a Glifosato.....	23
MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
CONCLUSIONES.....	33
LITERATURA CITADA.....	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras		Páginas
1	Estructura molecular del glifosato.....	21
2	Se observar la posición 875 correspondiente al TCA aminoácido 106, en este caso serina.....	28
3	Cantidad y calidad de ADN resultante de la extracción por el método CTAB de los biotipos de <i>E. indica</i> de las localidades Coahuila (lote) y Morelos (aguacate).....	29
4	Observación de las bandas del ADN de <i>Eleusine indica</i> , correspondiente a los pozos del biotipo Coahuila (lote) y Yecapixtla Morelos (aguacate).....	30
5	Comparación de la cadena secuenciada de <i>Eleusine indica</i> . De Yecapixtla Morelos (aguacate) hacia atrás (método BLAST) con AY 157643 de Malasia. UAAAN 2012.....	31
6	Comparación de la cadena secuenciada de <i>Eleusine indica</i> . Coahuila (lote) hacia atrás (método BLAST) con AY 157643 de Malasia. UAAAN 2012.....	32

Resumen

Para conocer los cambios en los nucleótidos en el gen de la enzima EPSPS se utilizó el método de CTAB modificado para aislar el ADN genómico total (Doyle y Doyle, 1990). Para amplificar una región que contiene el sitio de la mutación de prolina a serina en el sitio 106. Al igual se utilizó una técnica de biología molecular PCR siglas en inglés (*Polymerase Chain Reaction*) (Kary Mullis 1986) cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular.

Palabras clave: Resistencia a glifosato, mecanismos de resistencia, glifosato, *Eleusine indica* (L.), herbicidas.

INTRODUCCIÓN

El maíz, es originario de México, siendo el alimento principal de los mexicanos. Los antiguos mexicanos crearon razas de maíz para poder cultivarlas en zonas con lluvias escasas, lluvias medianas y hasta con lluvias muy abundantes. La totalidad de los maíces crece en buenas tierras, pero algunos germinan y producen aun en suelos pedregosos, pobres y poco profundos, demostrando así su nobleza, al igual hay maíces adaptados a tierras bajas, cercanas a nivel del mar y otros a las zonas altas, cercanas a los 3000 m de altitud, también hay precoces medianos y tardíos. Las razas y variedades nativas de maíz, han dado origen a las nuevas variedades e híbridos (Lesur, 2005).

Este cultivo como todos los demás es atacado por diversas plagas. El evitar la presencia de maleza en el cultivo es una preocupación de todo productor ya que esta puede llegar a ejercer una fuerte competencia por los nutrientes del suelo, lo cual origina que el cultivo no tenga un desarrollo adecuado, reduciendo el rendimiento en cantidad y/o calidad, causando graves pérdidas al agricultor (Espinosa y Sarukhán, 1997).

El pasto pata de gallina (*Eleusine indica* (L.) Gaertn) es una planta anual que está ampliamente distribuida en los trópicos, (Holm et al., 1977). Es considerada una de las cinco malezas más problemáticas del mundo y ha sido reportado que causa daños en 46 cultivos en más de 60 países. En México se encuentra en todos los estados y en más 26 cultivos (Villaseñor y Espinosa, 1998). La pata de gallina ha desarrollado resistencia a herbicidas de los grupos inhibidores de la Acetolactato Sintetasa, (Valverde et al., 1993), inhibidores de la Acetil Coenzima A Carboxilasa (Leach *et al.* 1995), inhibidores del fotosistema I, glicinas (Lim y Ngim, 2000), dinitroanilinas (Mudge et al., 1984), inhibidores de la Glutamina Sintetasa (Adam *et al.*, 2010) e inhibidores del fotosistema II (Brosnan *et al.*, 2008).

La resistencia a los herbicidas es la capacidad que han desarrollado las poblaciones de malezas previamente susceptibles a un cierto herbicida para resistir a ese compuesto y completar su ciclo vegetativo cuando el herbicida es aplicado en sus dosis normales; esta capacidad se ha incrementado seriamente en los últimos años (Heap y LeBaron, 2001). Si bien la gran mayoría de los casos de resistencia a los herbicidas han ocurrido en los países desarrollados, también en los países en desarrollo varias malezas importantes han evolucionado a ciertas formas de resistencia con un considerable impacto económico negativo sobre algunos cultivos específicos.

El glifosato, actúa por inhibición competitiva de la enzima 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintetasa, una enzima en la vía del shikimato que conduce a la formación de los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano (Haslam, 1993; Franz *et al.*, 1997). La resistencia al glifosato en *E.indica* en Malasia se destruyó a un gen polimorfo resistente de la 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS) por la sustitución de prolina en la posición 106 por serina o treonina (Baerson *et al.*, 2002; Ng *et al.*, 2003),

OBJETIVO

Conocer las mutaciones puntuales en el gen de la enzima EPSPS, de los biotipos resistentes y susceptibles de *Eleusine indica* (L.) Gaertn.

HIPÓTESIS

Hay mutación puntual en la región secuenciada de la enzima EPSPS del biotipo resistente de *Eleusine indica* (L.) Gaertn. En el sitio 106.

JUSTIFICACIÓN

Un biotipo de *Eleusine indica* (L.) Gaertn es resistente al herbicida glifosato, y debido a que este índice de resistencia fue de alrededor de 1X, se puede inferir que es un cambio en la enzima EPSPS.

REVISIÓN DE LITERATURA

Generalidades del Maíz

El maíz (*Zea mays*), fue el cereal de los indígenas americanos, cultivado principalmente en las regiones más cálidas, tan al norte como el valle del Río San Lorenzo y la región de los grandes lagos y al sur hasta Chile y Argentina. Ahora se cultiva en todas partes del mundo (Cronquist, 2000).

La planta del maíz está unida a la vida del hombre desde hace varios miles de años. Se considera que México, al igual que otros países de América Latina, es una cultura del maíz; esto quiere decir que gran parte de las actividades individuales y sociales de sus habitantes dependen de esta planta. En la península de Yucatán y parte de la América central, se desarrolló la cultura de los pueblos mayas. Se creía y se cree que los dioses crearon a los primeros cuatro hombres con maíz amarillo y maíz blanco, de maíz también crearon a las primeras cuatro mujeres y juntos conocieron el mundo y engendraron las primeras tribus (Beas, 1982).

Aunque es usado sobre todo para alimentación animal (78%), principalmente para el ganado, cerdos y aves, el 13% es usado como alimento para los humanos, donde sus aplicaciones son diversas. Por ejemplo, se come como elote sobre la mazorca, o en formas procesadas como el aceite, almidón, dulcificante y harina. Tal es su versatilidad que sus derivados también pueden encontrarse en medicamentos como la aspirina y antibióticos, en los cosméticos y jabones y en un amplio rango de productos industriales (Taba *et al.*, 2004).

Olivares, (1984) reconoce que la superficie de maíz en México, se divide en áreas debido a su altitud y climatología: a) Área intermedia o región del bajío.- Con alturas que van de 1,100 a 1,800 m.s.n.m comprendiendo parte de los estados de Guanajuato, Jalisco, Michoacán y Querétaro; b) Trópico-seco.- Esta área comprende parte de los estados de Coahuila, Nuevo León, Sinaloa, Sonora y norte de

Tamaulipas y con alturas de 0 a 1,000 m.s.n.m.; c) Trópico-húmedo.- Esta área comprende parte de los estados de Veracruz, Chiapas, Tabasco, Campeche, Yucatán, Colima, Guerrero, Nayarit y Sinaloa con alturas que van de 0 a 800 m.s.n.m.; d) Mesa central norte.- Esta área comprende parte de los estados de Durango, Zacatecas, San Luis Potosí y Nuevo León con alturas de 500 a 2,000 m.s.n.m.

Concluyendo que la región de mayor importancia por su mayor producción de grano, es la región de Trópico Seco, ya que presente un clima caliente pero con baja humedad relativa.

Para el 2020, la demanda de maíz en los países en vías de desarrollo se proyecta que superará la demanda de trigo (*Triticum vulgare*) y arroz (*Oryza sativa*). Esto se refleja en un 50% de aumento en la demanda de maíz global de 558 millones de toneladas en 1995 a una proyectada de 837 millones de toneladas en 2020. En el mundo en vías de desarrollo solo la demanda de maíz aumentará de 282 millones de toneladas en 1995 a la proyectada de 504 millones de toneladas en el 2020. Aproximadamente 140 millones de hectáreas de maíz son globalmente cultivadas. Los productores principales son Estados Unidos, China y Brasil; seguidos por Argentina, Sudáfrica y la Unión Europea. Aproximadamente 96 millones de hectáreas son cultivadas en los países en vías de desarrollo con cuatro países (China, Brasil, México e India) responsabilizados con más de 50% del total (Taba *et al*, 2004).

Origen del maíz

El origen del maíz (*Zea mays*), ha sido objeto de numerosos trabajos, con base en los cuales se han sugerido varios sitios de origen que van desde Paraguay en Sur América hasta Guatemala y México en Mesoamérica (Galinat, 1995; Wilkes, 1989).

El lugar de origen que sugiere la evidencia científica como más razonable identifica a México como el lugar más probable de origen, o a Guatemala como segunda opción (Galinat, 1995; Wilkes, 1989). Otras revisiones coinciden en afirmar que el maíz se originó en una parte restringida de México y los tipos más desarrollados emigraron hacia otros sitios de América. Por otro lado, la evidencia más antigua sobre la domesticación del maíz proviene de sitios arqueológicos de México (Dowswell, et al., 1996).

Clasificación taxonómica de la planta de maíz.

El maíz es una poaceae anual originaria de América. Actualmente, es el cereal con mayor volumen de producción en el mundo, superando al trigo y arroz (FAO, 2008).

Ubicación taxonómica del maíz de acuerdo al USDA-NRCS (2009)

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Cyperales

Familia: Poaceae

Género: Zea

Especie: mays

Nombre científico: *Zea mays* L.

Biología

El maíz (*Zea mays*), es una especie monoica, que se caracteriza por tener la inflorescencia femenina (mazorca) y la masculina (espiga) separadas pero en la misma planta. El maíz es una especie de polinización abierta (alógama), la polinización ocurre con la transferencia del polen, por el viento, desde la espiga a los estigmas (cabellos) de la mazorca. Cerca del 95% de los óvulos son fecundados con polen de otra planta y un 5% con el mismo polen, aunque las plantas son completamente autocompatibles (Poehlman, 1959).

Anatomía de la planta. De acuerdo a (Lesur, 2005).

Germinación

La semilla, al entrar en contacto con la humedad del suelo, empieza la imbibición de agua, comienza a hincharse y produce cambios químicos que activan al embrión, con lo que la primera raíz se alarga y sale en dos o tres días.

Raíz

La planta tiene cuatro clases de raíces: 1) raíces seminales que se originan en el embrión y suministran nutrientes en las primeras dos semanas, para luego dejar de funcionar, 2) raíces definitivas; alcanzan hasta dos o tres metros de profundidad, fijan la planta al suelo y mediante ellas se nutre la planta durante todo el ciclo vegetativo, 3) raíces de soporte se originan en los nudos, sobre la superficie del suelo, sirven para favorecer una mayor estabilidad de la planta, tomar algunos

nutrientes y agua del rocío y fortalecer el arraigo de la planta contra los problemas del acame, 4) raíces aéreas, estas no alcanzan a llegar al suelo.

Tallo

El tallo de la planta del maíz es leñoso y cilíndrico, con una cantidad de nudos que varía entre 8 y 25, con un promedio de 16.

Hojas

Son alternas y sésiles, variando en número dependiendo de la variedad entre 8 a 25, son alargadas y forman un cilindro o vaina alrededor del entrenudo, pero con los extremos desunidos. Su color es verde pero las hay ligeramente rayadas de blanco o de púrpura.

Flores

El maíz tiene flores masculinas y femeninas en partes separadas de la misma planta (monoica). Las flores masculinas constituyen la espiga que produce el polen, en tanto que las femeninas están dentro de la mazorca que surge como una rama lateral modificada, con las flores cubiertas por las hojas tiernas del jolote, del que sobresalen los estigmas o estilos, receptores del polen. Esta disposición en la inflorescencia hace que la polinización sea cruzada.

Importancia del maíz

El maíz es una de las plantas más útiles para el hombre. Su importancia puede analizarse en diversos aspectos como son: el académico, el científico, el social y el económico (Reyes, 1990).

El maíz es el segundo cultivo del mundo por su producción, después del trigo, mientras que el arroz ocupa el tercer lugar. Es el primer cereal en rendimiento de grano por hectárea y es el segundo, después del trigo, en producción total. El maíz es de gran importancia económica a nivel mundial ya sea como alimento del humano, ganado o como fuente de un gran número de productos industriales. La diversidad de los ambientes bajo los cuales es cultivado el maíz es mucho mayor que la de cualquier otro cultivo (Paliwal *et al.*, 2001).

Es la principal fuente de nutrimento de un amplio sector de la población rural y urbana marginada; además constituye el soporte fundamental de la economía campesina, ya que el 85% de la superficie cultivada se ubica en áreas de temporal (Villar *et al.*, 1994). Datos de la confederación nacional campesina indican que 12.5 millones de personas están vinculadas directa o indirectamente a este cultivo lo que representa 55.2% de la población dedicada a la agricultura (Cevallos, 2006).

El maíz es el cultivo más importante de México, forma parte importante en la dieta de los mexicanos; está presente en la elaboración de más de 4 mil productos, ocupa poco más de la mitad de la superficie sembrada del país; representa casi una tercera parte del valor de la producción agrícola; existen poco más de 3 millones de productores de este grano, y es el cuarto productor mundial después de Estados Unidos, China y Brasil (FAO, 2009).

Problemas Fitosanitarios

Maleza

Se indica que el ataque de malezas en maíz ocasiona pérdidas económicas por la competencia en agua, espacio, luz, nutrientes, disminuye la calidad del producto, permite la reproducción de insectos y enfermedades. El control general se realiza mediante el medio aporque, la rotación de cultivos que interrumpe los ciclos vegetativos de las malas hierbas e impide la proliferación de su semilla. El control mecánico es eficaz cuando se realiza oportunamente y con la precisión necesaria (INIAP, 1979).

Las malezas se consideran como uno de los factores más esenciales que merman el rendimiento del cultivo de grano de maíz de un 25 a un 50%. Esto se debe a que el maíz crece muy lentamente en la primera etapa de su desarrollo. En la etapa de tres o cuatro hojas se detiene en su crecimiento aéreo para el desarrollo de sus raíces. De ahí que en su desarrollo juvenil casi no puede competir con las malezas así que quedaría oprimido por ellas. Pero las malezas, bajo ciertas circunstancias, también pueden tener una influencia positiva, obrando como capa protectora contra la erosión. De ahí que en las regiones expuestas al peligro de la erosión, el combate contra las malezas siempre se realizara en combinación con medidas tendientes a conservar el suelo (Glanze, 1973). Los estudios demuestran que cuando la maleza alcanza una altura de 15 a 20 cm al inicio del cultivo, hace un daño total, que reduce sustancialmente el crecimiento del maíz (Lesur, 2005).

Los métodos de control de malezas en maíz son; Control mecánico, el cual se usa en agricultura de pequeña escala. Por ejemplo: la labranza, deshierbe manual y cultivos mecánicos. Control cultural, selección apropiada del cultivo o variedad a sembrar, rotación de cultivo, distancia de siembra, fechas de siembra, riego por

goteo y abonado y Control químico, uso de compuestos químicos para el control selectivo de la maleza (Rodríguez, 2008).

Las principales malezas en maíz de México

El maíz se ve atacado por una serie de insectos, enfermedades y malezas. Entre las malezas tenemos: *Sorghum halepense*, *Cyperus esculentus*, *Cyperus rotundus*, *Chenopodium album*, *Eleusine indica*, *Portulaca oleracea*, *Cynodon dactylon*, *Helianthus annuus* (Conabio, 2011).

Eleusine indica (L.) Gaertn, conocida comúnmente como pata de gallo o gallina, que se encuentra ampliamente distribuida en el mundo dentro de las zonas tropicales y templadas limitándose su dispersión a una altura de no más de 2500 m.s.n.m.; *E. indica* está considerada entre las cinco peores malezas en el mundo, encontrándose en 46 cultivos en más de 60 países (Holm *et al.*, 1977). En nuestro país se encuentra en todos los estados y en 26 cultivos (Villaseñor y Espinosa, 1998).

Por ser muy serio los daños que *E. indica* ocasiona en el buen rendimiento del maíz, y además de ser una especie altamente competitiva por agua, nutrientes, altamente prolífica y adaptable; *E. indica* ha desarrollado resistencia a herbicidas de los grupos inhibidores de la Acetolactato Sintetasa, (Valverde *et al.*, 1993), inhibidores de la Acetil Coenzima A Carboxilasa (Leach *et al.*, 1995), bipiridilos, glicinas (Lim y Ngim, 2000) y dinitroanilinas (Mudge *et al.*, 1984).

Clasificación taxonómica de *Eleusine indica* (L.) Gaertn

REINO: Plantae

CLASE: Liliopsida

ORDEN: Poales

FAMILIA: Poaceae

SUBFAMILIA: Chloridoideae

TRIBU: Eragrostideae

GÉNERO: *Eleusine*

ESPECIE: *indica*

Generalidades de *Eleusine indica*

Eleusine indica es comúnmente conocida como pata de gallina, el cual es originaria de África (Phillips, 1972). Se distribuye ampliamente a lo largo de los trópicos, subtropicos y regiones templadas del mundo, incluyendo África, Asia, el sudeste de Asia, Australia, el Pacífico y América. En nuestro país se encuentra en todos los estados y está presente en 26 cultivos (Villaseñor y Espinosa, 1998).

El género *Eleusine*, contiene nueve plantas anuales o perennes, todos nativos de África a excepción de *E. tristachya* de América del Sur (Hilu y Johnson, 1992; Phillips, 1972). Pertenece a la subfamilia Chloridoideae, que es distante con todos los cultivos de cereal, excepto uno, el mijo (*E. coracana*), que se cree que ha surgido a partir de *Eleusine indica* (Hilu y de Wet, 1976, Hilu y Johnson, 1992, Hiremath y Salimath, 1992) y es un cereal básico importante en la India y algunas regiones de África oriental (Rachie y Peters, 1977).

Descripción de *Eleusine indica*

Es una planta anual, el cual alcanza hasta 80 cm de alto con tallos erectos o ascendentes, las hojas tienen vainas foliares comprimidas y aquilladas, glabras o con algunos pelos marginales en la parte superior, lígula en forma de membrana ciliada de más o menos 1 mm de largo, lámina a menudo plegada, hasta de 30 cm de largo y 9 mm de ancho, por lo general glabra, pero con un mechón de pelos en la garganta y a veces con algunos pelos largos en los márgenes cerca de la base. Las ramas de la inflorescencia pueden ser de 1 a 17, de 3 a 15 cm de largo, dispuestas en forma digitada, pero con frecuencia una o dos se sitúan más abajo. Las espiguillas de 3 a 7 mm de largo, compuestas de 4 a 9 flores, densamente apiñadas sobre un ráquis angostamente alado o sin alas; primera gluma de 1.5 a 1.8 mm de largo, la segunda de 2 a 3 mm de largo; lema de 2.5 a 4 mm de largo, con las nervaduras laterales prominentes cerca del ápice, pálea un poco más corta que la lema (Rzedowski y Rzedowski, 2001).

Los frutos son cariopsis libres o dispersadas dentro del flósculo, la pared del fruto cae fácilmente. Semilla de 1 a 2 mm de largo y de hasta 1 mm de ancho, surcada y rugosa en la superficie, color café oscuro, café rojizo o café negruzco. Las plántulas poseen un coleóptilo oblongo de 2 a 4 mm de largo; en la primera hoja se pueden distinguir dos formas, una en la que la hoja es mayor que las tres subsecuentes y la otra forma tiene un tamaño similar a las subsecuentes, ambas formas de ápice obtuso y sin pelos; en la segunda hoja también hay dos formas, ambas lanceoladas a elíptico-lanceoladas (Espinosa y Sarukhán, 1997).

Importancia de *Eleusine indica*

La pata de gallina es una maleza importante en más de 60 países en al menos 46 cultivos y, en éstos, tiene el carácter de una maleza seria en 30 países y 27 cultivos. Se estima como la quinta peor maleza en el mundo (Holm *et al.*, 1977) y

también clasificado en quinto lugar en una encuesta en el sureste de Asia (Waterhouse, 1994). Fue clasificado en el lugar 15º en 1992 en el Pacífico oceánico (Waterhouse, 1994). Crece bien en lugares soleados o con poca sombra, en pantanos, terrenos baldíos, bordes de caminos, a lo largo de las fronteras de los campos de regadío, canales, prados y pastos, y es particularmente problemático en las tierras de cultivo. Se encuentra desde el nivel del mar hasta 2000 m.s.n.m. y es problema en casi todas las formas de la agricultura entre los trópicos de Capricornio y Cáncer. *E. indica* puede producir más de 50,000 pequeñas semillas por planta, que se mueven con facilidad por el viento, en el barro en los pies de los animales y en la maquinaria agrícola. Las semillas son consumidas por los animales salvajes y domésticos que las dispersan con facilidad (Everest, 1974).

La pata de gallina es una maleza importante en el maíz, como lo demostró Jiménez, 2004 en un estudio de los efectos de la interferencia de *E. indica* en el cultivo, donde se observó disminución en las características agronómicas desde 4 plantas por metro lineal.

Control Biológico

Los enemigos naturales de la pata de gallina se limitan al género *Eleusine* y sus parientes cercanos, así podría ser considerado para el control biológico de *E. indica*, excepto en la India u otras regiones donde el mijo es un cereal importante.

Se reporta que *E. indica* es atacada por más de 50 insectos, nematodos, hongos, bacterias y virus. Además, con pocas excepciones, todos estos organismos son conocidos por tener amplios rangos de hospederos y para atacar a cultivos agrícolas importantes. De hecho, de los agentes de control biológico registrados, sólo un cecidómido, *Orseolia spp.* (Gagne, 1985) y dos hongos podrían ser considerados en el control biológico clásico. Figliola *et al.* (1988) considera que los hongos,

Bipolaris setariae y *Magnaporthe (Pyricularia =) grisea* son prometedores, como micoherbidas para *E. indica*.

Control Químico

El control de la pata de gallina, como un pasto anual, se basa en la utilización de herbicidas de los grupos glicinas, inhibidores de la Glutamina Sintetasa, inhibidores de la fotosíntesis (fotosistema I y II), inhibidores del crecimiento de plántulas (brotes) e inhibidores de la Acetolactato Sintetasa (CIPM-NCSU, 2011). Además de los daños que ocasiona, *E. indica* en el rendimiento del maíz por ser una especie altamente competitiva por agua, nutrientes, altamente prolífica y adaptable; la pata de gallina ha desarrollado resistencia a herbicidas de los grupos inhibidores de la Acetolactato Sintetasa, (Valverde et al., 1993), inhibidores de la Acetil Coenzima A Carboxilasa (Leach et al., 1995), bipiridilos, glicinas (Lim y Ngim, 2000), dinitroanilinas (Mudge et al., 1984), inhibidores de la Glutamina Sintetasa (Adam et al., 2010) e inhibidores del fotosistema II (Brosnan et al., 2008).

Enfermedades del maíz

Según Rodríguez y De León (2008), de acuerdo con varios reportes en diferentes cultivos y localidades las enfermedades llegan a causar de 10 a 12% de pérdida en la producción de un cultivo, pero existen localidades específicas en las que son mayores. Se han reportado aproximadamente 125 enfermedades para el cultivo del maíz. Dentro de las principales enfermedades presentes en las diferentes regiones maiceras, reportan tres tizones foliares reportados en maíz, dos de ellos son importantes en México: el tizón por *Helminthosporium turcicum* y el tizón por *H. maydis*. Como en el caso anterior existen tres royas afectando al maíz, de las cuales sólo dos son importantes en México, la roya común *Puccinia sorghi* Schwein y la roya

Puccinia pylosa Under. El follaje es atacado por un complejo de mildews, ocasionado por los patógenos: *Peronosclerospora* spp., *Sclerospora graminicola* y *Sclerophthora* spp. También es atacado por virus, como es el caso del complejo mosaico de la caña de azúcar, producido por los patógenos: Mosaico del enanismo del maíz (MDMV), mosaico de la caña de azúcar (SCMV), mosaico de pasto Johnson (JGMV) y mosaico del sorgo (SrMV). Entre otros virus tenemos al virus del rayado fino (MRF Marafivirus), también se reporta un fitoplasma y un espiroplasma ocasionados por *Phytoplasma* sp., y *Spiroplasma kunkelii* respectivamente. Existen dos pudriciones importantes de tallo y mazorca causadas por hongos del género *Gibberella* (anamorfo *Fusarium* spp.), entre las cuales las dos especies más conocidas son *G. zeae* y *G. fujikuroi* respectivamente. Estas enfermedades se presentan en la mazorca de la misma manera.

Plagas del maíz

Cisneros (1994), menciona que una limitante para la producción de cultivos alimenticios anuales, la constituyen las plagas, que pueden dañarlos en todos los estados de desarrollo. Muchas de las especies de insectos que se alimentan sobre plantas pueden entrar en competencia directa con el hombre, haciendo medidas necesarias de prevención y control. Los lepidópteros en estado larval generalmente se alimentan del follaje y otras partes de la planta sobre la que viven, tanto externa como internamente, otros se han adaptado a vivir sobre productos de la planta como semillas y frutos. Al igual Garza (1992), señala que muchos de ellos están restringidos a una región geográfica y frecuentemente también a una sola planta hospedera pero otros, probablemente la mayoría, presentan un amplio espectro de plantas hospederas y su distribución geográfica no está localizada; tal es el caso de los géneros *Diatraea* (Lepidoptera: Pyralidae), *Heliothis* y *Spodoptera* (Lepidoptera: Noctuidae).

Se estima que los insectos nocivos del maíz provocan pérdidas promedio de 30% en México, aunque en ciertas condiciones los daños son tan severos que las pérdidas pueden ser totales, las cuales pueden afectar el cultivo en sus diferentes etapas fenológicas (Rodríguez y De León, 2008).

Principales plagas del maíz en México, según Kumul (1983); McGregor y Gutiérrez (1983); Rodríguez y De León (2008). Son: gallina ciega (*Phyllophaga* ssp.), barrenador del tallo (*Diatrea saccharalis*), picudo del maíz (*Nicentrites testaceipes*), picudo del cogollo (*Geraeus senilis*), pulgón del collogo (*Rhopalosiphum maidis*), gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*), gusano soldado (*Spodoptera exigua*), gusano peludo (*Estigmene acraea*), gusano elotero (*Helicoverpa zea*), trips (*Frankliniela* spp.), araña roja (*Tetranychus urticae*).

Uso del glifosato

Historia

El glifosato fue introducido en 1971, amplio espectro con las malas hierbas y es particularmente activo sobre especies perennes. De ahí que se pueda considerar como un herbicida total (García y Quintanilla, 1989).

El glifosato se aplica como herbicida foliar. No es selectivo y por lo tanto no se usa en cultivos, excepto en sitios donde pueda mantenerse retirado del cultivo (Klingman y Ashton, 1980).

Este herbicida no presenta efecto a través del área radical de las malezas, por lo tanto, las aplicaciones realizadas antes de la brotación de los cultivos, no tienen efecto sobre las plantas, no hay efecto residual en el suelo ya que es rápidamente degradado, pero en las plantas superiores parece ser más resistente a la descomposición (Klingman y Ashton, 1980).

Gómez (1993), citó que se inactiva al contacto con el suelo, agua o materia orgánica en suspensión, por lo que en aplicaciones pre-emergente (pre-siembra) se puede sembrar luego de los 10 a los 15 días posteriores a la aplicación.

Este herbicida es el más usados en la actualidad y que además está considerado como relativamente sano debido a su rápida inactivación en el suelo (Quinn, 1988). Sin embargo, el comportamiento de glifosato en suelo puede variar en función de las características del mismo sobre el que se aplique. En lo que muchos autores parecen estar de acuerdo es en el importante papel que ejercen los óxidos de hierro y aluminio, así como el pH del suelo en los procesos de adsorción de glifosato en suelo (de Jonge y de Jonge, 1999; de Jonge *et al.* 2001; Gimsing *et al.* 2004, Calderón *et al.* 2005).

El glifosato es el principio activo del herbicida Roundup, nombre comercial producido por Monsanto (WHO,1997), el principio activo glifosato, está dentro del grupo de activos de improbable riesgo agudo, en su uso normal. Tanto el glifosato como los herbicidas formulados a partir de ese principio activo están clasificados en la Categoría de Menor Riesgo Toxicológico (Clase IV), es decir, productos que normalmente no ofrecen peligro, adoptado por este organismo, en consonancia con organismos internacionales que lo han evaluado (FAO, 2004).

Modo de Acción

El glifosato funciona interfiriendo en el metabolismo de la planta; pocos días después de la aspersión, las plantas se marchitan, se ponen amarillas y se mueren. Los herbicidas a base de glifosato contienen también productos químicos que hacen que el herbicida se adhiera a las hojas, de modo que el glifosato pueda pasar de la superficie a las células de la planta (Lang, 2005).

El glifosato es absorbido por el follaje y se mueve dentro de la maleza hasta el interior de las raíces, donde afecta el crecimiento y provoca la muerte de los tejidos. Actúa en el nivel de varios sistemas enzimáticos e interfiere en la formación de aminoácidos y otras sustancias importantes. Provoca el desecamiento de órganos aéreos (hojas y tallo) y subterráneos (Gómez, 1993).

El glifosato se absorbe rápidamente por las hojas. La lluvia disminuye su absorción si tiene lugar cuatro o seis horas después de aplicarse el herbicida. Se trasloca rápidamente a través del floema, y también en muchas especies en el xilema. Luego se suele redistribuir, siguiendo el flujo de sustancias fotosintetizadas, depositándose en aquellas partes donde hay mayor demanda de éstas, como son los frutos, órganos de reserva o zonas apicales meristemático. A mayor intensidad luminosa la traslocación del glifosato aumenta. Los síntomas típicos producidos por el glifosato son, detención del crecimiento y clorosis en las hojas, seguida luego de necrosis. Dichos síntomas son más acentuados y ocurren primero en el ápice y zonas meristemáticas. Luego se extienden a la parte más vieja de la planta. Con frecuencia los rebrotes en especies perennes muestran hojas malformadas o estriadas (García y Fernández, 1989).

La acción herbicida se inicia a los 3 días en las plantas anuales y a los 8 días en las perennes. La acción básica es la inhibición de aminoácidos aromáticos (Rojas y Vázquez, 1995).

Sitio de Acción

La penetración de los herbicidas en general es a través de la cutícula, puede ocurrir de una o más de las tres formas siguientes: siendo parcialmente adsorbida en la zona cerosa o lipófila de esta. Atravesando totalmente la cutícula y alcanzando las paredes celulares del protoplasma pero sin llegar a penetrar en este (vía simplástica). Y también a través de la cutícula, alcanzando las paredes celulares y

alcanzando el interior de las células protoplasmáticas (vía apoplástica) (García y Quintanilla, 1989).

Los estomas de las hojas es otra vía de entrada de los herbicidas. A su vez pueden penetrar en particular en los herbicidas volátiles y algunas soluciones acuosas. Estas penetran con mayor facilidad si su tensión superficial ha disminuido suficientemente por la acción del surfactante. No obstante lo anterior, debe señalarse que la densidad de estomas suele ser muy baja en el haz o cara superior de las hojas de la mayoría de las especies dicotiledóneas, sobre las cuales se depositan la mayoría de las gotitas pulverizadas (García y Quintanilla, 1989).

El principal mecanismo de acción del glifosato, materia activa del herbicida, es la inhibición competitiva de la enzima 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS). Esta enzima forma parte de la ruta del ácido shikímico implicado en la producción de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano) y otros componentes aromáticos en plantas, esenciales para la síntesis proteica. Al ser las proteínas necesarias para el crecimiento y las funciones vitales, la aplicación del glifosato lleva a la muerte la planta.

La función de la EPSPS es unir el ácido shikímico con ácido fosfoenolpirúvico para formar la EPSPS. Como la estructura de PEP y del glifosato son muy similares, el glifosato actúa como inhibidor competitivo y se une fuertemente al complejo formado por el shikimato y la EPSPS, resultando una acumulación de shikimato en concentraciones tóxicas. El glifosato se transporta simplásticamente hacia los meristemas de la planta en crecimiento y, al actuar como inhibidor competitivo de la EPSPS, resulta en la acumulación de shikimato y el bloqueo de la síntesis de los aminoácidos aromáticos, esta es la forma en que comienza a actuar el glifosato. En consecuencia, la presencia de glifosato determina supresión de crecimiento y muerte (Villalba, 2009).

Molécula del glifosato

El glifosato (N-fosfometilglicina, C₃H₈NO₅P), al ser de amplio espectro (no selectivo) puede causar daño a los cultivos si no se tiene cuidado al aplicarlo (Gómez, 1993).

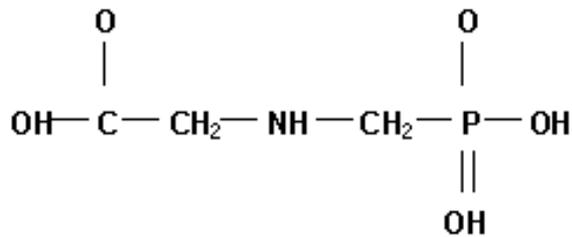


Figura 1. Estructura molecular del glifosato.

Efectos Fisiológicos

La EPSPS es codificada por el núcleo celular y transportada al cloroplasto a través de un péptido de transporte, y es en el cloroplasto donde participa de la ruta metabólica del ácido shikímico. En esta vía se emplea un 20 por ciento del carbono fijado durante la fotosíntesis. Además, este trayecto está relacionado a la síntesis de compuestos aromáticos como ligninas, alcaloides, flavonoides, ácidos benzoicos y hormonas vegetales, puesto que los aminoácidos sintetizados son precursores de estos compuestos secundarios. Ya en el cloroplasto, la EPSPS enlaza primero una molécula de shikimato-3-fosfato (S3P), inmediatamente después una molécula de PEP se enlaza al sitio activo de la enzima. La EPSPS cataliza entonces una reacción de condensación para producir 5-enolpiruvilshikimato-3- fosfato. Queda claro que PEP no presenta afinidad por EPSPS a menos que una molécula de S3P se enlace primero (Villalba, 2009).

Resistencia a herbicidas

En términos generales, el desarrollo de resistencia a cualquier herbicida involucra un proceso de selección ligado a la variabilidad intraespecífica. Se asume que cualquier población de malezas puede tener biotipos resistentes en baja frecuencia, debido a mutaciones que ocurren naturalmente. Los biotipos susceptibles mueren mientras que los resistentes sobreviven produciendo propágulos. Si persiste la aplicación de herbicidas que actúan sobre el mismo sitio de acción, la proporción del biotipo resistente se incrementa en relación al biotipo susceptible (De Prado, 2008). La especie es afectada por el herbicida a las dosis recomendadas; pero gracias a la selección de individuos resistentes completan su ciclo reproductivo a pesar de la aplicación del herbicida. La tolerancia es la capacidad hereditaria natural que tienen todas las poblaciones de una maleza para sobrevivir y reproducirse después del tratamiento con un herbicida (Valverde *et al.*, 2000).

La resistencia cruzada es cuando un biotipo de una maleza es resistente a más de un herbicida, debido a un mecanismo único de resistencia. Frecuentemente la resistencia cruzada involucra a herbicidas que tienen el mismo modo de acción. La resistencia múltiple se presenta en situaciones en que los biotipos resistentes tienen dos o más mecanismos distintos de resistencia. Un biotipo resistente a un herbicida exhibe un aumento en la susceptibilidad a otros herbicidas con distinto modo de acción, condición que se denomina resistencia cruzada negativa (Valverde *et al.*, 2000).

Existen también cultivos tolerantes a herbicidas que pueden ser desarrollados mediante la transformación genética (transgénicos) o por métodos convencionales (no transgénicos). Cuando son compatibles las malezas con el cultivo adquieren resistencia a través del flujo de (trans) genes provenientes del cultivo (Valverde *et al.*, 2000).

A nivel mundial se conocen 370 biotipos de maleza resistentes a herbicidas, comprendiendo 200 especies (115 dicotiledóneas y 85 monocotiledóneas) en más de

570,000 lotes en 60 países. En México se conocen 9 biotipos resistentes de 4 especies; *Avena fatua*, *Phalaris minor* y *Phalaris paradoxa* resistentes a ACCasa sin conocerse el mecanismo involucrado en resistencia y *Sorghum halepense* resistente a ALS del cual el mecanismo de resistencia es la alteración del sitio de acción (Heap, 2011).

Resistencia a glifosato

El Glifosato es el más importante herbicida post-emergente, no selectivo, sistémico y de amplio espectro (Jarowski, 1972). Inhibe la síntesis de aminoácidos aromáticos (Holländer y Amrhein 1980); Steinrücken y Amrhein 1980). El mecanismo de acción del glifosato es la inhibición competitiva del fosfoenolpiruvato que se une con el 3-fosfatoshikimato con la ayuda de la enzima enolpiruvilshikimato fofosato sintetasa (EPSPS) que sintetiza 5 enolpiruvilshikimato-3-fosfato, precursor de los aminoácidos aromáticos (Kishore y Shah, 1988).

Uno de los herbicidas al que se le ha puesto más atención en los últimos años con respecto a la resistencia es glifosato, debido a que es el herbicida más usado en el mundo (Goldman, 2006) y con la misma tendencia en México pues ocupa el primer lugar de ventas (Albert, 2005), además, la reducción del precio del glifosato y el encarecimiento de la mano de obra en el medio rural ha incrementado su uso. También el uso de tecnología de cultivos genéticamente modificados ha aumentado el empleo de glifosato, ya que a estos cultivos se le ha insertado un gen de resistencia a este herbicida y es muy cómodo para cualquier productor solo depender de un producto agroquímico. Se tienen reportadas 15 especies de malezas resistentes a glifosato en todo el mundo, entre ellas *E. indica*, con 3 casos reportados en Malasia, Costa Rica y Colombia (Heap, 2008).

Los mecanismos de desarrollo de resistencia a glifosato incluyen; (1) un afectado o reducido transporte celular a los tejidos meristemáticos fisiológicamente

activos, (2) una EPSPS insensible-alterada y (3) sobre expresión de la EPSPS que ha sido citada pero con expresión en la resistencia muy baja (Baerson *et al.*, 2002; Dinelli *et al.*, 2006).

MATERIALES Y METODOS

Localización

El presente trabajo experimental, se realizó en el departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en Buenavista, Saltillo, Coahuila.

Se colectó semilla de pata de gallina, *E. indica* siguiendo la metodología descrita por Moss (1995). Se colectaron inflorescencias de *E. indica* en Coahuila México de una zona urbana (Lote) y en Yecapixtla, Morelos, México en un lote de maíz bajo labranza de conservación, esta región se conoce como Aguacate, el cual se sospechaba era resistente a glifosato. Las inflorescencias se tomaron de un área delimitada por un rectángulo de 100 x 50 m. Una vez colectadas, se llevaron al Laboratorio de Malezas dentro del Departamento de Parasitología, donde se limpiaron por medio de un soplador de semillas y se almacenaron a temperatura ambiente.

Posteriormente, se colocaron 200 semillas de *E. indica* de las dos poblaciones en charolas rectangulares de plástico negro de 40x60x7 cm, previamente llenas con sustrato (Berger, BM2) más 20 gr de fertilizante de lenta liberación (Osmocote, 14-14-14), y se colocaron en una cámara bioclimática ajustando a un fotoperiodo de 12 h, con una intensidad de luz de $800 \mu\text{mol m}^2\text{s}^{-1}$ y a una temperatura constante de $29 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ y se dieron riegos tantas veces como lo requirieron las plantas. Al momento de la emergencia de la primera hoja verdadera se trasplantó una planta a una maceta de plástico negro de 1 kg de capacidad y fueron colocadas en invernadero. Al alcanzar la tercera hoja verdadera se escogieron 10 plantas por población con altura similar para estandarizar las condiciones de la prueba y se asperjan con glifosato a una dosis de $1.08 \text{ kg ae ha}^{-1}$. La aspersion se realizó con una cantidad de agua

homologada de 200 l ha⁻¹ por medio de un equipo de aspersión manual a una presión de 275 kPa, con una boquilla Teejet 8001E.

Se usó el método de CTAB por las siglas en inglés *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide* (Wikipedia 2011) El CTAB es una sal de amonio cuaternario, uno de cuyos grupos alquilo es de gran magnitud molecular, y tiene propiedades detergentes; se conocen con el nombre de *jabones invertidos*, debido a que su actividad superficial se debe a la presencia de un ion positivo y no a uno negativo, como sucede en los sulfatos de alquilo e hidrógeno, que son los detergentes usuales. Luego se realizó la extracción de los ácidos nucleicos con cloroformo: alcohol isoamílico, y la posterior precipitación del DNA con etanol absoluto primero, y posteriormente con etanol 70%. Modificado para aislar el ADN genómico total (Doyle y Doyle, 1990) de muestras compuestas de 10 hojas frescas de cada localidad (localidades de lote, Coahuila y Yecapixtla, Morelos). Para amplificar una región que contiene el sitio de la mutación de prolina a serina en el sitio 106 (Tran *et al.*, 1999), se utilizaron un par de iniciadores (hacia adelante 5' GCGGTAGTTGTTGGCTGTGGTG, reverso 5' TCAATCCGACAACCAAGTCGC), basado en la secuencia de la 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintetasa del GenBank (AJ417034).

La prueba de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa), es una técnica de biología molecular (Mullis 1986), cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, el procedimiento que se realizó fue: Se suspende el ADN obtenido en 50 µl de H₂O, se realizó utilizando 50 µL de reacciones que contiene 500 ng de DNA genómico, 1x PCR buffer, 200 µM de cada Dntp, 1,5 mM de MgCl₂, 0,5 µM de cada iniciador (10 µM/µl) y 1U de polimerasa (Paq5000®). El programa de amplificación consistía en un paso de desnaturalización a 94 °C durante 5 minutos, seguidos por 35 ciclos de 94°C durante 1 minuto, de alineación a 58 °C por un minuto y la extensión por 1 min a 72 °C, con un paso extensión final de 5 min a 72°C.

Los productos amplificados fueron limpiados utilizando QIA rápida kit de purificación de PCR (QIAGEN) y secuenciados utilizando un secuenciador ABI3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Ambas cadenas fueron secuenciadas. Todas las secuencias se alinearon y se compararon con BLAST (Altschul, S *et al.*, 1997) con la secuencia de EPSPS de *Eleusine indica* de una secuencia de 3079 bp de Malasia obtenidos a partir de la GenBank (AY157643).

RESULTADO Y DISCUSIÓN

Primeramente se realizó la técnica la PCR en silico, que nos permite multiplicar (amplificar) en pequeñas cantidades de ADN, dando muy buenos resultados. Utilizando los iniciadores o (*primers*), que son: el iniciador 1 GCGGTAGTTGTTGGCTGTGGTG, y el iniciador 2 TCAATCCGACAACCAAGTCGC, con la secuencia AY157643 obtenida del GenBank referente a una secuencia del gen EPSPS de 3079 bp. Obteniendo una región amplificada de 301 bp. Comenzando en la posición ´778 del gen EPSPS.

```
GCGGTAGTTGTTGGCTGTGGTGCAAGTTCAGTTGAGAAGGATGCGAA
AGAGGAGGTGCAGCTCTTCTTGGGAATGCTGGAAGTCAATGCGATCAT
TGACAGCAGCCGTAAGTCTGCTGGAGGAAATGCAACGTGAGTTGGTTTT
TCCATCCTCAGAATATGCCCGTGGAACTGAGTAGCGAAATTGTGGTGATA
TTTCGTGACTTATCGTGATCTTTTCTGAATTCCAGTTATGTGCTTGATG
GAGTGCCAAGAATGCGGGAGAGACCCATTGGCGACTTGTTGTCGGATTG
A
```

Figura 2. Se puede observar la posición 875 correspondiente al **TCA** aminoácido 106, en este caso serina.

En la figura 2, se hace notar que los indicadores son los correctos para amplificar la región 106 donde según, Ng *et al.*, 2003, encuentra una mutación puntual.

En la extracción del ADN con el método CTAB, obtuvimos una gran calidad de ADN. El cual con estos resultados obtenidos se llevó a cabo la medición de la cantidad y calidad del ADN con el equipo EPOCH (electrofotometro) mostrando valores de 300_500 ng/µl, siendo estos datos aproximados ya que se utilizaron diferentes reactivos para la secuenciación ADN. Además se corrió una electroforesis

en donde se muestra que el AND es de muy buena calidad.



Figura 3. Cantidad y calidad de ADN resultante de la extracción por el método CTAB de los biotipos de *E. indica* de las localidades Coahuila (lote) y la de Morelos (aguacate).

En la prueba de PCR, se realizó la técnica de amplificación de la región 301bp, comenzando en el sitio 778 de los biotipos de *Eleusine indica*, de Coahuila (lote) y Morelos (aguacate), obteniendo un desplazamiento del ADN amplificado en la electroforesis.

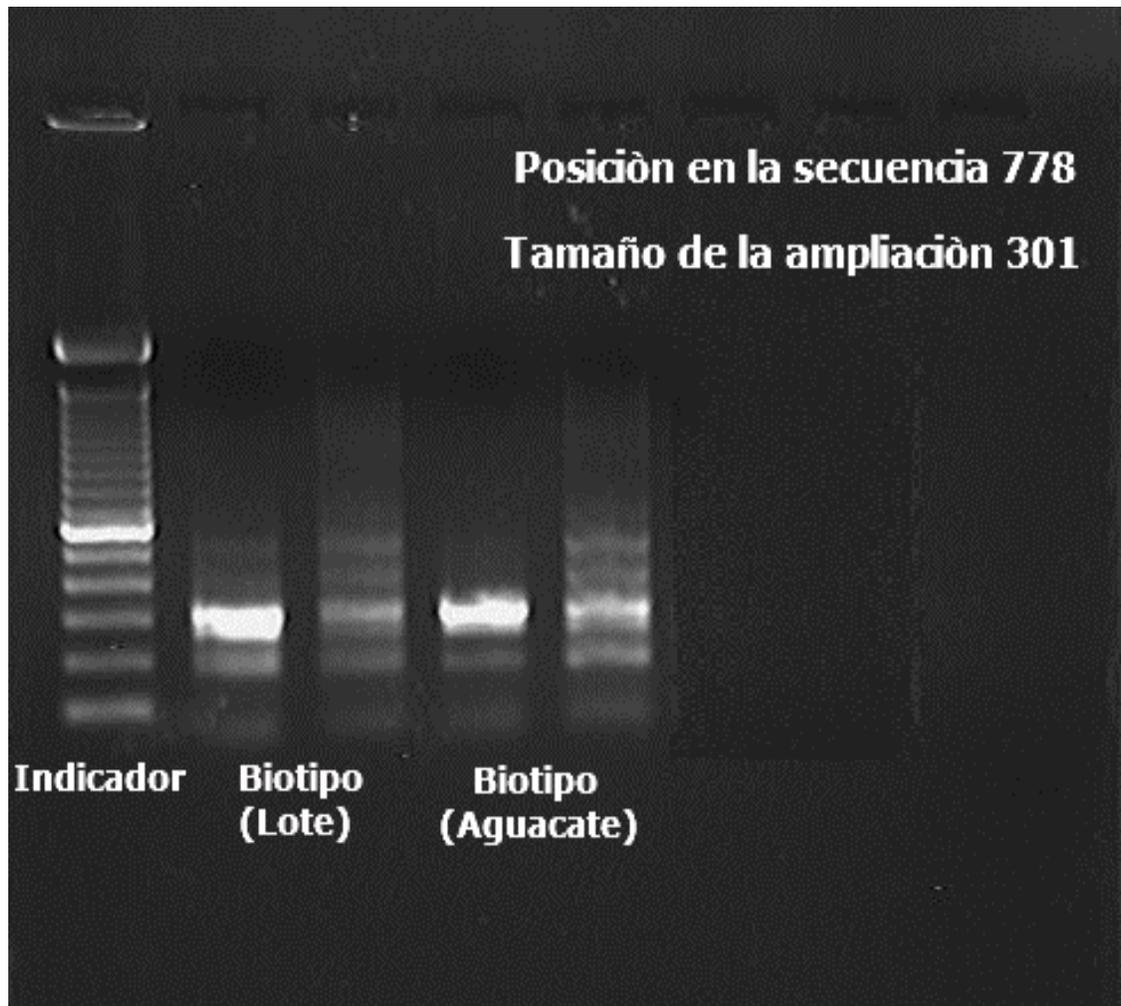


Figura 4. Observación de las bandas del ADN de *Eleusine indica*, correspondiente a los pozos del biotipo Coahuila (lote) y Yecapixtla Morelos (aguacate).

Los productos amplificados de los biotipos de *Eleusine indica*, de Coahuila (lote) y Morelos (aguacate), se mandaron amplificar al laboratorio Vitagenesis de la ciudad de Monterrey Nuevo León, donde se reportan otros puntos de mutación diferentes a prolina 106. El biotipo resistente de pata de gallina del estado de Morelos presento 3 puntos de mutación en la secuenciación del gen de la EPSPS; el primero se encontró en el sitio del aminoácido 104 donde la sustitución fue de metionina a asparragina (Met104Asn) por dos cambios, el primero en la posición del nucleótido 870 por un cambio de timina por adenina y el segundo en la posición del nucleótido 871 donde el cambio fue de guanina por timina. El segundo cambio se

EPSPS del biotipo resistente de pata de gallina de Yecapixtla, Morelos. En el segundo cambio encontrado, fué en el sitio 112 donde el cambio en el nucleótido en la posición 895 de citocina por adenina, sustituyendo el aminoácido lisina por asparragina (Lis112Asn).

Secuencia hacia atrás por medio del (BLAST) de *E. indica* (L.) del biotipo Coahuila (lote).

Gaps = 10/271 (4%) no indica el error, el cual estando menos de 10% es correcto.

```

Query 779 GCGGTAGTTGTTGGCTGTGGTGGCAAGTTCCCAGTTGAGAAGGATGCGAAAGAGGAGGTG 838
          ||||| || | ||||| || || ||||| | || | ||||| ||||| ||||| ||||| |
Sbjct 268 GCGG-AGGKTTGGSTGGGGGGCCAATTTCCCGKTGAGAAGGGCGCGAAAGAGGAGGGG 210

Query 839 CAGCTCTTCTTGGGGAATGCTGGAAGTCAATGCGA TCAATTGAC-AGCAGCCGT AAC TGC 897
          | || | ||||| || ||||| || ||||| || ||||| || ||||| ||||| ||||| ||
Sbjct 209 CCACTTTTTYTGGGAAAGCCGGAACYGCCATGCGA CCCATKACCAGCAGC-GT AAA CGC 151

Query 898 TGCTGGAGGAAATGCAACGTGAGTTGGTTTTTCCATCCTCAGAATATGCCCGTGGAAGT 957
          ||||| | || ||||| || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |
Sbjct 150 YGCTGGAAGGAAAGCAACCGGAGGTGGGTTTTCCATCTCCGAAAACACCC-WGGAAAYG 92

Query 958 AGTAGCGAAATGTGGTGATATTTTCGTGACTT-ATCGTGCATCTTTTCTGAATTCCAGTT 1016
          || | ||||| || || || ||||| || | | ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||
Sbjct 91 AGGACKGAAAATGGGGGGAAATTT-GTKRCYTAATCGTGCATC-TTTCTGAATGCCAGTT 34

Query 1017 ATGTGCTTGATGGAGTGCCAAGAATGCGGGA 1047
          ||| || ||||| || ||||| | |||||
Sbjct 33 ATGYGC-TGATGGAG-ACCAASTA-GCGGGA 6

```

Figura 6. Comparación de la cadena secuenciada de *Eleusine indica*. Coahuila (lote) hacia atrás (método BLAST) con AY 157643 de Malasia. UAAAN 2012.

CONCLUSIONES

Los iniciadores utilizados para realizar la PCR con el ADN de *E. indica* para la región del gen que codifica la EPSPS (forward y reverse) amplificaron in silico y con técnica de PCR in vivo.

Se tuvo extracción de ADN de los biotipos de *E. indica* con el método CTAB, obteniendo una buena calidad y cantidad de ADN.

Se encontraron mutaciones en el biotipo resistente de Yecapixtla (Leu107Met, Ser110Ala y Met104Asn).

El gen que codifica la EPSPS de *E. indica* es polimórfico y puede presentar diferentes mutaciones que pueden cambiar la respuesta hacia el glifosato.

LITERATURA CITADA

- Adam, J., Ngim J., Bakar B. y Z. Alias. 2010. Preliminary findings of potentially resistant goosegrass (*Eleusine indica*) to glufosinate-ammonium in Malaysia. *Weed Biology and Management* 10(4):256-260
- Albert, Lilia. Albert37@gorsa.net.mx. 2005 Panorama de los plaguicidas en México. *Revista de Toxicología en Línea*. 7 de diciembre de 2008. <http://www.sertox.com.ar/retel/default.htm>.
- Baerson, S. R., D. J. Rodriguez, N. A. Biest, M. Tran, J. You, R. W. Kreuger, G. M. Dill, J. E. Pratley, y K. J. Gruys. 2002. Investigating the mechanism of glyphosate resistance in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*). *Weed Sci.* 50:721-730.
- Beas, JC. 1982. *Como lo usamos*. 1ra ed. México, DF. Arbol Editorial. 102 p.
- Bartlett & Stirling. 2003. A Short History of the Polymerase Chain Reaction. In: *Methods Mol Biol.* 226:3-6: http://es.wikipedia.org/wiki/Reacci%C3%B3n_en_cadena_de_la_polimerasa
- Brosnan, J.T., Nishimoto, R.K. y J. DeFrank. 2008. Metribuzin-resistant goosegrass (*Eleusine indica*) in bermudagrass turf. *Weed technology* 22:675- 678.
- Castañeda, Z., Y. 2008. Una visión sobre la importancia de diversidad del maíz en México. *Acción Social de los Jesuitas*. <http://sjsocial.org/crt/articulos/762castaneda.htm>.
- Dinelli, G., I. Marotti, A. Bonetti, M. Minelli, P. Catizone, y J. Barnes. 2006. Physiological and molecular insight on the mechanisms of resistance to glyphosate in *Conyza canadensis* (L.) Cronq. biotypes. *Pestic. Biochem. Physiol.* 86:30-41.
- Calderón, MJ; Celis R; Quintana, MA; Durand, S; Cornejo, J. 2005. Soil components as affecting glyphosate soil retention (unpublished results).

- Cazco, C. 2006. Maíz *Cultivos andinos*. Clase tercer año de ingeniería agropecuaria. Universidad Técnica del Norte. Ibarra – Ecuador
- Centro de Investigaciones Agrarias. 1980. El cultivo de Maíz en México. Edición del 25 Aniversario. México DF. Editorial Mexicana. 148 p.
- Centro de Investigaciones Agrarias. 1980. El cultivo de Maíz en México. Edición del 25 Aniversario. México DF. Editorial Mexicana. 148 p.
- Cevallos D. 2006. Portazo al maíz transgénico. (IPS), México. <http://ipsnoticias.net/nota.asp?idnews=39130>
- CIPM-NCSU. 2011. North Carolina Agricultural Chemical Manual. College of Agriculture and Life Sciences. North Carolina State University. (<http://ipm.ncsu.edu/agchem/agchem.html> consultado 6 de diciembre de 2011).
- Cisneros, H. J. 1994. Reproducción de lepidopteros de cereales *Diatraea* spp. *Heliothis zea* (Boddie) y *Spodoptera frugiperda* (Smith) *En*: Bautista M. N., G. V cota y J. L. C. Sánchez (Eds). Técnicas para cría de insectos. Colegio de posgrado en ciencias agrícolas. Montecillo Edo. de México. p: 49-57.
- Conabio, 2011, Malezas de México: <http://www.conabio.gob.mx/malezas-demexico/2inicio/paginas/lista-plantas.htm>.
- Cronquist, A. 2000. Introducción a la Botánica. Ejemplar.
- De Jonge, H; de Jonge, LW. 1999. Influence of pH and solution composition on the sorption of glyphosate and prochloraz to a sandy loam soil. *Chemosphere*, 39, 753-763
- De Jonge, H; de Jonge, LW; Jacobsen, OH; Yamaguchi, T; Moldrup, P. 2001. Glyphosate sorption in soils of different pH and phosphorus content. *Soil Science* 166, 230-238.

- De Prado, R.; Cruz-Hipolito, H. 2005. Mecanismos de resistencia de las plantas a los herbicidas. www.inia.org.uy/estaciones/la_estanzuela/webseminariomalezas/articulos/depradorafael.pdf [22 de octubre de 2008].
- Dinelli, G., I. Marotti, A. Bonetti, M. Minelli, P. Catizone, y J. Barnes. 2006. Physiological and molecular insight on the mechanisms of resistance to glyphosate in *Conyza canadensis* (L.) Cronq. biotypes. *Pestic. Biochem. Physiol.* 86:30-41.
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-15.
- Espinosa, F. J. y J. Sarukhán, 1997. Manual de Malezas del Valle de México. Claves, descripciones e ilustraciones. Universidad Nacional Autónoma de México. Fondo de Cultura Económica. México, D. F.
- Everest, S.L. 1974. Poisonous plants of Australia. 2nd Ed. Angus and Robertson. 650 p.
- FAO 2004 , Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group on Pesticide Residues. Rome, Italy, 20-29 September 2004. (www.senasa.gov.ar).
- FAO. Consulta de bases de datos de producción mundial y comercio internacional de Maíz. [Documento en línea]. Disponible en: <http://apps.fao.org/faostat>. [Consulta: noviembre 2009].
- FAO: FAOSTAT. Producción mundial del maíz en 2008. Consultado en mayo del 2011. Disponible en: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>.
- Figliola, S. S., N. D. Camper y W. H. Ridings. 1988. Potential Biological Control Agents for Goosegrass (*Eleusine indica*). *Weed Science* 6:830-835
- Fuster, E. 1974. Botánica. Editorial Kapelusz, Primera edición, Buenos Aires argentina Pág.1-7.

- Franz, J. E, M. K. Mao, J A Sikorski, 1997. Glyphosate: A Unique Global Herbicide. American Chemical Society, Washington DC.
- Galinat, W. C. 1995. The origin of corn. *Economic Botany*, 49 (1): 3-12.
- Gagne, R. J. 1985. A taxonomic revision of the Asian Rice Gall Midge, *Orselia oryzae* (Wood-Mason) and its relatives (Diptera: Cecidomyiidae). *Entomography* 3: 127-162
- García, Torres, L. Fernández-Quintanilla, C. 1989. Fundamentos sobre malas hierbas y herbicidas. Coedición. Madrid, España. Ediciones Mundi-Prensa. 348p.
- Garza, G. E. 1992. Control microbiológico de mosquita blanca. Métodos de control de mosquita blanca en hortalizas. S.A.R.H. Dirección General de Sanidad Vegetal. C.N.R.C.B. Universidad Autónoma de California, Mexicali, B.C. p.99-110.
- Gimsing, AL; Borggaard, OK; Jacobsen, OS; Amand, J; Sørensen, J. 2004. Chemical and microbiological soil characteristics controlling glyphosate mineralisation in Danish surface soil. *Appl. Soil Ecol.* (27) 233-242 p.
- Gómez, Brindis, J. G. 1993. Control Químico de la Maleza. 1ra ed. México D.F. Editorial Trillas. 246 p.
- Goldman, Sachs. 2006. Product briefing. 7 de diciembre de 2008. <http://www.nufarm.com/Assets/702/1/2006-03productbriefing.pdf>.
- Gostincar, J. 1998. Técnicas Agrícolas En Cultivos Extensivos Biblioteca de la Agricultura, Segunda edición, Editorial Idea Books S.A. España Pág. 383-394.
- Glanze, P. 1973. El Maíz de Grano. Producción mecanizada de maíz de grano en las regiones tropicales y subtropicales. Edición Leipzig. D.F., México. Ediciones Euroamericanas Klaus Thiele. 198p.
- Haslam, E. 1993. Shikimic Acid: Metabolism and Metabolites. John Wiley Sons, Chichester.

- Heap, I. y LeBaron, H. 2001. Introduction and overview of resistance. pp. 1-22, *En: S. B. Powles & Shaner, D.L., eds. Herbicide resistance in world grains*. CRC Press, Boca Ratón, Florida, Estados Unidos de América.
- Heap, I. 2011. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. (<http://www.weedscience.org/In.asp> consultado 6 de diciembre de 2011)
- Heap, I. 2006. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Online. Internet. Disponible en www.weedscience.com.
- Hilu, K.W. y J.L. Johnson. 1992. Ribosomal DNA variation in finger millet and wild species of *Eleusine* (Poaceae). *TAG Theoretical and Applied Genetics* 83: (6-7): 895 -902.
- Hilu, K.W. y J.M.J. de Wet. 1976. Domestication of *Eleusine coracana*. *Economic Botany* 30(3): 198:208.
- Hiremath, S.C. y S.S. Salimath. 1992. The “A” genome donor of *Eleusine coracana* (L.) Gaertn (Gramineae). *TAG Theoretical and Applied Genetics* 84 (5-6): 747-754.
- Holländer, H., y N. Amrhein. 1980. The site of the inhibition of the shikimate pathway by glyphosate I. Inhibition by glyphosate of phenylpropanoid synthesis in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Plant Physiol.* 66:823-829.
- Holm, L. G., D. L. Plucknett, J. V. Pancho, y J. P. Herberger. 1977. *The World's Worst Weeds—Distribution and Biology*. Honolulu: The University Press of Hawaii. pp. 47–53.
- INIAP. 1979. Control de malezas en maiz de la Sierra. maiz; zea mays; control de malezas; zona fria; sierra. Instituto Nacional Autonomo de Investigaciones Agropecuarias, Quito (Ecuador). Estacion Experimental Santa Catalina.
- Instituto Roche. 2011. PCR (Polymerase chain reaction/ reacción en cadena de la polimerasa): http://www.instituto-roche.es/Recursos_glosario/Vpocr.html

- Jaworski, E. G. 1972. Mode of action of *N*-phosphonomethylglycine. Inhibition of aromatic amino acid biosynthesis. *J. Agric. Food Chem.* 20:1195-1198.
- Jiménez, T.R.D. 2004. Evaluación de los efectos de la interferencia de *Eleusine indica* sobre *Zea mays* L. mediante un método aditivo. Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado. Venezuela. Tesis.
- Kishore, G. M., y D. M. Shah. 1988. Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. *Annu. Rev. Biochem.* 57:627-663.
- Klingman, G; Ashton, F. 1980. Estudio de las plantas nocivas. Principios y prácticas, México. Editorial Limusa. 449 p.
- Kumul, D. E. 1983. Búsqueda de plantas silvestres del Edo. de Veracruz con propiedades tóxicas contra gusano cogollero en maíz *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) y mosquito casero *Culex quinquefasciatus* Say. Tesis profesional, Parasitología Agrícola, UACH. Chapingo, México. 76 p.
- Lesur, Luis. Manual del cultivo del maíz: una guía paso a paso. –México: Trillas, 2005. 80 p).
- Leach, G. E., M. D. Devine, R. C. Kirkwood, y G. Marshall. 1995. Target enzyme-based resistance to acetyl-coenzyme A carboxylase inhibitors in *Eleusine indica*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 51:129–136.
- Lim, J. L. y J. Ngim. 2000. A first report of glyphosate-resistant goosegrass (*Eleusine indica* (L.) Gaertn) in Malaysia. *Pest Manag. Sci.* 56: 336–339.
- McGregor, R. y O. Gutiérrez. 1983. Guía de insectos nocivos para la agricultura en México. Ed. Alhambra, México, D.F. Pp 166.
- Moss, S.R. 1995. Techniques for determining herbicide resistance. *Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference - Weeds*, 547-556.
- Mudge, L. C., B. J. Gossett, y T. R. Murphy. 1984. Resistance of goosegrass (*Eleusine indica*) to dinitroaniline herbicides. *Weed Sci.* 32:591–594.

- Ng, C H, W Ratnam, S Surif, B S Ismail. 2004. Inheritance of glyphosate resistance in goosegrass (*Eleusine indica*). *Weed Science*, 52:564-570.
- Olivares, SG. 1984. Mejoramiento genético del maíz: cosechas abundantes y más nutritivas, ciencia y desarrollo. (55-58): 84-93 p.
- Paliwal, L.P., G. Granados, J.P. Marathée. 2001. El Maíz en los Trópicos: mejoramiento y producción. FAO. Roma, Italia.
- Phillips, S. M . 1972. A Survey of the Genus *Eleusine* Gaertn. (Gramineae) in Africa. *Kew Bulletin*. Vol. 27, No. 2, pp. 251-270.
- Poehlman, J. M. 1959. *Breeding Field Crops*. Holt, New York, USA.
- Quinn, JP; Peden, J. MM; Dick, RE. 1988. Glyphosate tolerance and utilization by the microflora of soils treated with the herbicide. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29,511-516
- Rabí. 2001. Guía Técnica para la producción del cultivo del Maíz (*Zea mays*, L.). Apoyo al programa para el cultivo popular de productos básicos en las provincias orientales del país. 8p.
- Rachie, O.K. y V.L. Peters. 1977. The Eleusines- A review of the world literature. pp 179. Patancheru, A.P. 502 324 India. ICRISAT.
- Ramella, R. 1948. El Maíz en la Argentina, la planta y su cultivo. Editorial Sudamérica. Buenos Aires Argentina.
- Reyes, C. P. 1990. El maíz y su cultivo, primera edición. 460 p.
- Rodríguez, P. 2008. Aspectos fisiológicos y morfológicos de maleza, Universidad de Puerto Rico; http://academic.uprm.edu/rodriguezp/HTMLobj-95/aspectos_fisiologicosymorfologicosde_malezas.pdf
- Rodríguez, M., R. y C. De León. 2008. El cultivo del maíz. Temas selectos. 1ra ed. Editorial Colegio de Posgraduados, Mundi-Prensa México. Pp. 29-45.

- Rojas, Garcidueñas, M; Vázquez González, RJ. 1995. Manual de Herbicidas y Fitorreguladores: Aplicación y Uso de Productos Agrícolas. 3ra ed. México, D.F., Editorial Limusa. 157 p.
- Rzedowski, G. C. de y J. Rzedowski. 2001. Flora fanerogámica del Valle de México. 2a ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México.
- SEP. 1988. Manual para Producción agropecuaria de Maíz, Editorial Trillas 7ma reimpresión.
- Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera SIAP,
- SIACON, SAGARPA. Consulta de Indicadores de Producción Nacional de Maíz. Disponible en www.siap.sagarpa.gob.mx/siacon.
- Steinrücken, H. C., y N. Amrhein. 1980. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl-shikimic acid-3-phosphate synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 94:1207-1212.
- Taba, S; Van Ginkel, M; Hoisington, D; Poland, D. 2004. Wellhausen-Anderson Plant Genetic Resources Center: Operations Manual, 2004. El Batán, México: CIMMYT. 29 p.
- Tadeo, R. 2000. *Híbridos de maíz*. Periodismo de ciencia y tecnología. Universidad Autónoma de México. Disponible en: www.invdes.com.mx.
- Terán, G. 2008. Corrección del anteproyecto de tesis “Comportamiento de tres híbridos de maíz duro (*Zea mays L.*) Con cuatro niveles de fertilización en la parroquia La Concepción cantón Mira”
- Tocagni, H. 1980. El Maíz. 1ra Ed. Buenos Aires, Argentina. Editorial Albatros. 143 p.
- Tran, M., S Baerson, R. Brinker, L. Casagrande, M. Falletti, Y. Feng, M. Nemeth, T. Reynolds, D. Rodriguez, D. Schafer, D. Stalker, N. Taylor, Y. Teng and G. Dill, 1999. Characterization of glyphosate resistant *Eleusine indica* biotypes from

- Malaysia. In: Proceedings of the 17th Asian-Pacific Weed Science Society Conference I (B), pp: 527-536.
- USDA-NRCS. 2009. Department of Agriculture. Natural Resources Conservation Service. Consultado en marzo de 2011. Disponible en: <http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=ZEMA>
- Vavilov N. 1931. Mexico and Central America as a basic center of origin of cultivated plants in the new world, Bull appl. Bot. Genet., Plant Breeding (Leningrad) 26:135- 200. Disponible en: http://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=dD4rAAAAYAAJ&oi=fnd&pg=PR7&ots=uzyqByQ1WI&sig=b1UBXlzwPg6S3-w_EiO-zEWfjiU#v=onepage&q&f=false
- Valverde, B. E., L. Chaves, J. Gonzales, y I. Garita. 1993. Field evolved imazapyr resistance in *Ixophorus unisetus* and *Eleusine indica* in Costa Rica. Brighton Crop Protection Conf.—Weeds. Volume 3. Surrey, U.K. Pp. 1189–1194.
- Valverde, B.E.; Riches, C.R. & Caseley, J. C. 2000. Prevención y manejo de malezas resistentes a herbicidas en arroz: experiencias en América Central con *Echinochloa colona*. San José, CR, Cámara Insumos Agropecuarios.
- Villalba, A. 2009. Efectos de Glifosato y metsulfurón metil en plantas acuáticas y uso posible uso como bioindicadoras. Revista Ciencia Docencia y Tecnología. (29): 169-186 p.
- Villaseñor, J.L. y F.J. Espinosa García. 1998. Catalogo de malezas de México. Ediciones Científicas Universitarias, UNAM, Consejo Consultivo Fitosanitario y Fondo de Cultura Económica, México.
- Villar M. C., A. Delgadillo P. y G. Hernández D. 1994. *Asphodelus fistulosus* L. para el control del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith. Congreso nacional de control biológico- Simposio del IOBC, Mérida, Yucatán, Noviembre del 2007.pag. 1.

Waterhouse, D. F. 1994. Biological control: Pacific prospects. Supplement 2. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra. 138 pp.

World Health Organisation, Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Glyphosate, WHO/FAO Data Sheets on Pesticides No. 91, WHO/PCS/DS/96.91, July 1997 ([http:// www.inchem.org/documents/pds/pds/p est91_e.htm](http://www.inchem.org/documents/pds/pds/p est91_e.htm)).Wikipedia, 2011, http://es.wikipedia.org/wiki/Bromuro_de_hexadeciltrimetilamonio.

Wilkes, G. 1989. Maize: domestication, racial evolution and spread. In: Harris, D. R.; Hillman, C. (eds.). Foraging and Farming. Unwin Hyman. London. pp. 441-455.