

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



Secuenciación Parcial del Gen 5-Enolpiruvil Shikimato 3-Fosfato Sintetasa (EPSPS) en Biotipos de *Eleusine indica* (L.) gaertn., tratados con Glifosato.

POR:

JOSÉ GABRIEL PÉREZ JUÁREZ

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**

Secuenciación Parcial del Gen 5-Enolpiruvil Shikimato 3-Fosfato Sintetasa (EPSPS) en Biotipos de *Eleusine indica* (L.) Gaertn., tratados con Glifosato.

Por:

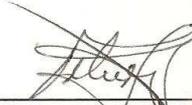
JOSÉ GABRIEL PÉREZ JUÁREZ

TESIS

Presentado como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

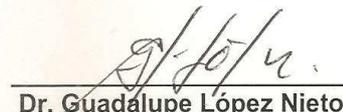
Aprobada



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 la *Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro* por brindarme cobijo durante mi estancia y proporcionar todos los recursos para mi formación profesional... a mí *ALMA MATER MATER* muchas gracias.

A mis asesores *Dr. Pedro Aarón Cerda García*, por permitirme realizar esta investigación y el valioso tiempo, la confianza, disposición y la paciencia en la revisión de este trabajo. De igual manera para el *M.C. Arturo Coronado Leza* al *Dr. Oswaldo García Martínez* y al *Dr. Guadalupe López Nieto* a todos ellos gracias.

A todos los profesores investigadores del Departamento de Parasitología ya que ellos son la parte importante en las enseñanzas y conocimientos de la formación profesional.

A mis todos mis compañeros de la generación de la carrera Ingeniero Agrónomo Parasitólogo, al *Pardo, José Luis, José Eduardo, Raúl, Jonathan Ávila, Nashelí, Sandra, Sorrosa, Adán, Oscar Ángel, Rudi, Vero, Octavio, Mayo, Efrén* por haber vivir innumerables experiencias y acompañarme siempre en estos cuatro años y medio, por proporcionarme su apoyo, a cada uno de ellos muchísimas gracias.

La agricultura es la profesión propia del sabio, la más adecuada al sencillo y la ocupación más digna para todo hombre libre...Cicerón.

A TODOS INFINITAS GRACIAS...

DEDICATORIAS

Dios, por darme la fuerza, la paciencia y la voluntad para seguir adelante y superar todos los obstáculos y momentos difíciles que se fueron presentando en el camino y por acompañarme SIEMPRE.

A mi papá *Andrés Pérez Gómez* y mi mamá *Sebastiana Juárez Gómez*, que me dieron la vida y han estado conmigo en todo momento y porque al finalizar esta etapa de mi vida, todos los sacrificios, penas y alegrías que compartieron conmigo, hoy dieron su recompensa...“Gracias”.

A mis abuelos † *Eduardo Juárez* y † *Juana Gómez*, por todo su cariño y amor con sus consejos tan sabios en una lucha diaria y continúa para lograr todos nuestros sueños aunque en mi etapa como universitario se nos adelantaron para ellos con mucho cariño en donde estén siempre los llevo en mi corazón.

A mis hermanos *Andrés Froilán*, *Eduardo*, *Norberto Sandra Luz*, *Librado* y su esposa *Ángela*, por brindarme todo su apoyo, por ser personas maravillosas y la confianza para seguir adelante.

A todos mis familiares tíos, tías y primos, que de una u otra manera influyeron mucho en mi formación profesional.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	PAGINAS
AGRADECIMIENTOS	III
DEDICATORIAS	IV
INDICE DE FIGURAS	VII
RESUMEN	VIII
INTRODUCCION	1
OBJETIVO	3
HIPOTESIS	3
JUSTIFICACION	3
REVISION DE LITERATURA	4
Generalidades del Maíz (<i>Zea maíz</i> , L)	4
Origen del maíz	5
Clasificación taxonómica del maíz.....	6
Características morfológicas	6
Sistema radicular	6
Raíz principal	6
Raíces adventicias.....	7
Raíces de sostén	7
Tallo	7
Hoja.....	7
Inflorescencia	7
Mazorca	7
Importancia del maíz	8
Producción mundial	8
Producción nacional	9
Problemas fitosanitarios	9
Maleza	9
Las principales malezas de México.....	10
Generalidades de pata de gallina <i>Eleusine indica</i> (L) Gaertn	11
Descripción de <i>Eleusine indica</i>	12

Importancia de <i>Eleusine indica</i>	13
Control biológico	13
Control químico	14
Enfermedades del Maíz	14
Plagas del Maíz	14
USO DEL GLIFOSATO	15
Historia	15
Modo de acción	16
Sitio de acción	17
Molécula	18
Efectos fisiológicos	18
Resistencia a herbicidas	19
Resistencia a Glifosato	20
MATERIALES Y METODOS	22
RESULTADOS Y DISCUSION	25
CONCLUSIONES	30
LITERATURA CITADA	31

INDICE DE FIGURAS

FIGURAS	PAGINA
FIGURA 1. Estructura molecular del glifosato.....	18
FIGURA 2. Secuencia: 778, de la posición T 875 correspondiente al aminoácido 106, en este caso serina, TCA = aminoácido 106 serina de la secuencia AY157643.....	25
FIGURA 3. Calidad y cantidad del ADN resultante de la extracción por el método CTAB de los biotipos de <i>E.indica</i> de las localidades Aguacate Yecapixtla Morelos y lote Saltillo Coahuila.....	26
FIGURA 4. Resultado de la extracción del ADN por el método PCR de los biotipos de <i>Eleusine indica</i>	27
FIGURA 5. Comparación de la cadena del lote de aguacate Yecapixtla Morelos hacia atrás (método BLAST) con AY157643 de <i>E. indica</i> de Malasia.....	28
FIGURA 6. Comparación del biotipo del gen de la EPSPS del biotipo de <i>E. indica</i> de Saltillo Coahuila hacia atrás (método BLAST) con el AY157643 de Malasia.....	29

Resumen

Este estudio presenta los resultados de los análisis en los nucleótidos en el gen de la enzima 5-enolpiruvil shikimato 3-fosfato sintetasa (EPSPS) en biotipos de *Eleusine indica* (L.) Gaertn, resistentes y susceptibles a glifosato, utilizando el método de CTAB modificado para aislar el ADN genómico total, amplificando una región que contiene el sitio de la mutación de prolina a serina y treonina en el sitio 106, El resultado de la secuenciación reveló mutación puntual en la posición de nucleótido 875 en los biotipos de Yecapixtla (Leu107Met, Ser110Ala y Met104Asn) así como en el biotipo de Saltillo (Gln103Pro, Met99Lis, Ser95Fen y Ser94Tre).

Palabras claves: Resistencia a Glifosato, *Eleusine indica*, EPSPS.

INTRODUCCION

El maíz es el cultivo más importante de México y se destinan a la siembra del grano, 8.3 millones de hectáreas (SISPRO, 2008). El Centro de Investigaciones Económicas, Sociales y Tecnológicas de la Agroindustria y la Agricultura Mundial refiere que de los 4 millones de productores agrícolas del país, 3.2 millones, en su mayoría ejidales, se dedican al cultivo del maíz, por lo que de su cultivo dependen directa e indirectamente 12 millones de mexicanos (Hernández, 2008).

Eleusine indica es conocida como pata de gallina, es originaria de África (Phillips, 1972). Es una planta anual, de hasta de 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.

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. 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.

Dentro del contexto de control químico, el tema de la tolerancia y resistencia de malezas constituye una de las líneas de investigación a destacar en relación al glifosato. En términos generales, el desarrollo de resistencia a cualquier herbicida involucra un proceso de selección ligado al de variabilidad intraespecífica (Dinelli, 2006).

El glifosato es el herbicida más usado en el mundo y en nuestro país sigue la misma tendencia, por lo que desarrollar resistencia a este agroquímico es perder una herramienta importante en el control químico de malezas. Debido a la gran importancia del cultivo de maíz para México, el hecho de que *E. indica* tenga tolerancia o en el peor de los casos resistencia al glifosato, es agregar un factor limitante a la producción del cultivo de maíz en México (Albert, 2008).

El glifosato actúa como herbicida post-emergente de amplio espectro, no selectivo y seguro desde el punto de vista ambiental (baja toxicidad para organismos no blanco, bajo movimiento en el agua subterránea y persistencia limitada). Es un herbicida inhibidor de la síntesis de aminoácidos en plantas, bacterias, algas, hongos y parásitos apicomplejos, a través de la inhibición de la enzima EPSPS (5-enolpiruvil shikimato 3- fosfato sintetasa). 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. Se asume que cualquier población de malezas puede tener biotipos resistentes en baja frecuencia, debido a mutaciones que ocurren naturalmente.

A nivel mundial la resistencia a herbicidas es una rama de la ciencia de la maleza que esta incipientemente desarrollada y por desgracia en México, aunque se sospecha de la existencia de muchas malezas resistentes, solo se tienen confirmados tres casos y de estos ninguno se sabe los mecanismos de resistencia involucrados (Castañeda 2008).

OBJETIVO

Conocer los cambios en los nucleótidos en el gen de la enzima EPSPS de *Eleusine indica* (L.) Gaertn, de los biotipos resistente y susceptible.

HIPÓTESIS

Hay mutación puntual en la región 106 de la enzima EPSPS de Prolina a Serina en el biotipo resistente.

JUSTIFICACIÓN

Se busca demostrar que un biotipo de *Eleusine indica* (L.) Gaertn es resistente al herbicida glifosato y el índice de resistencia indica que existe una alteración del sitio activo.

REVISIÓN DE LITERATURA

Generalidades del Maíz.

El maíz (*Zea mays*), fué 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 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, dónde 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 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 maíz ha sido estudiado intensamente y aun no se ha encontrado una explicación satisfactoria de su origen. Darwin determinó que el origen de los vegetales y animales puede estar donde se desarrollan sus antecesores silvestres más cercanos. El origen de las plantas cultivadas están en los centros de diversificación y para el caso del maíz se reconoce que el lugar de origen está en México y América central, esta diversidad tiene un patrón que fue descrito a finales de los años 20 y principios de los 30 del siglo pasado por Vavilov (1992).

Otras teorías afirman que el origen del maíz está ubicado en las zonas de México y Centroamérica, al haberse encontrado parientes como el *Tripsacum* y *Euchlaena*, que crecen especialmente muy cerca del maíz, aunque actualmente se reconoce que el teocintle, es el pariente más cercano (Arford y Horn, 2004).

Clasificación taxonómica de la planta de maíz (Terán, 2008)

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Cyperales

Familia: Poaceae

Género: Zea

Especie: mays

Nombre científico: *Zea mays* L.

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DEL MAÍZ

Sistema radicular

El maíz tiene un sistema de raíces fibrosas, compuestos de raíces seminales o primarias, secundarias o adventicias. Es un sistema funcional de gran interés, pues la planta asegura su estabilidad y resuelve por allí su alimentación (Ramella 1948).

Según la SEP, 1988; el sistema radicular está compuesto por:

Raíz principal

Representada por un grupo de una a cuatro raíces que luego dejan de funcionar, se origina en el embrión y suministra nutrientes a la semilla en los primeros días.

Raíces adventicias

El sistema radicular es totalmente adventicio y puede alcanzar hasta 2 metros de profundidad.

Raíces de sostén

Estas raíces se originan en los nudos cerca del suelo y favorecen la estabilidad. Disminuye el problema de acame y éstas también realizan fotosíntesis.

Tallo

El tallo es de consistencia leñosa, cilíndrico y el número de nudos varia de 8 a 25 con un promedio de 16, (SEP, 1988); la variabilidad del diámetro de la caña va de 26 a 45 mm comúnmente, de 30 a 35 mm (Ramella, 1948).

Hoja

La hoja está compuesta de lámina, lígula y vaina foliar, es de forma elongada y aplanada, curvándose (Ramella, 1948), en la cual la vaina de la hoja forma un cilindro alrededor del entrenudo con extremos desnudos, su color es verde, aunque hay hojas rayadas de blanco y verde o verde purpura y el número de hojas es variable (SEP, 1988).

Inflorescencia

El maíz es monoico, las flores masculinas forman la panoja terminal del tallo; las femeninas están dispuestas en una espiga cilíndrica (mazorca) con raquis grueso y corchoso. El grano se dispone en hileras y es un cariósipide desnudo, variable en tamaño y color (Tocagni, 1980).

Mazorca

Cada planta tiene de una a tres mazorcas, según la variedad y condiciones ambientales (SEP, 1988).

Importancia del maíz

El maíz es una de las plantas más útiles al 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).

El maíz 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).

Producción mundial

El principal país productor de maíz en el mundo es Estados Unidos con el 51% del total, con una producción cercana a los 300 millones de toneladas por año. China y Brasil poseen cada uno el 23% y 7%, respectivamente, de la producción mundial. En el 2004 China produjo casi 131 millones de toneladas en una superficie de 25

millones de hectáreas, lo cual lo coloca como el segundo productor mundial de este grano, mientras que México produjo en el mismo año 21 millones de toneladas, en una superficie 8 millones de hectáreas, lo que lo coloca en el cuarto lugar (FAO, 2009).

Producción nacional

Los principales estados productores de maíz amarillo son: Chihuahua, Jalisco y Tamaulipas, con una producción total nacional de 1,330,127.71 toneladas. Los principales estados productores de maíz blanco son Sinaloa, Jalisco y Michoacán con 17,961,283.54 toneladas. Sinaloa mantiene el 23 % de la producción con más de 4 millones toneladas de maíz, seguido de Jalisco, Michoacán y Chiapas que producen 2,285,009, 1,288,971 y 1,228,506 toneladas del grano, respectivamente (SIAP, SIACON, SAGARPA, 2009).

Problemas Fitosanitarios

Maleza

La infestación de hierbas dentro del cultivo en ocasiones llega a reducir el rendimiento de la producción cuando el control se realiza después de la época oportuna. Por lo anterior, el cultivo debe mantenerse libre de hierbas durante los 60 días posteriores a la emergencia. Con este propósito se debe efectuar una escarda y uno o dos cultivos de acuerdo a la incidencia de la maleza y a las condiciones de humedad del suelo. (Centro de Investigaciones Forestales y Agropecuarias de Chihuahua, 2009).

La formación de malezas se considera generalmente 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).

Existen diferentes tipos de control de maleza que pueden ser agrupados en cuatro métodos generales: 1) Control preventivo: Se refiere a las medidas tomadas para impedir la introducción, establecimiento y desarrollo de maleza en áreas no infestadas. Estas medidas incluyen: el uso de semilla certificada libre de maleza, la eliminación de maleza en canales de riego y caminos, la limpieza del equipo agrícola usado en áreas infestadas. 2) Control cultural: Incluye prácticas de manejo tales como la selección y rotación de cultivos, sistema y fecha de siembra entre otras, las cuales promueven un mejor desarrollo del cultivo para hacerlo más competitivo hacia la maleza. 3) Control mecánico: Se refiere a las prácticas de control de maleza basadas en el uso de la fuerza física. El control mecánico incluye los deshierbes manuales con azadón o machete. En sistemas de labranza convencional el control mecánico de maleza incluye la labranza primaria o preparación del terreno mediante arado, subsuelo y rastra, y la labranza secundaria como la siembra y el paso de escardas y 4) Control químico: Se efectúa por medio del uso de productos químicos comúnmente llamados herbicidas que inhiben el desarrollo o matan a las plantas indeseables (Rosales, 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* y *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).

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; se reporta que, *E. indica* ha desarrollado resistencia a herbicidas de los grupos inhibidores de la Acetolactato Sintetasa, (Valverde *et al.*, 1993), y A. Coenzima A. Carboxilasa (Leach *et al.*, 1995), bipyridilos, glicinas (Lim y Ngim, 2000) y dinitroanilinas (Mudge *et al.*, 1984).

Generalidades de pata de gallina *Eleusine indica* (L.) Gaertn

REINO: Plantae

CLASE: Liliopsida

ORDEN: Poales

FAMILIA: Poaceae

SUBFAMILIA: Chloridoideae

TRIBU: Eragrostideae

GÉNERO: *Eleusine*

ESPECIE: *indica*

Eleusine indica es conocida como pata de gallina, es originaria de África (Phillips, 1972). Se distribuye a lo largo de los trópicos, subtrópicos 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* (L).

Es una planta anual, de 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 sudeste 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), bupiridilos, 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

Lesur (2005), menciona las principales enfermedades producidas por hongos en el maíz son; Carbón (*Sphacelotheca reiliana*, *Ustilago maydis*), Pudriciones del tallo y la mazorca (*Gibberella zea*, *Diplodia zea*), Tizón de la hoja (*Helminthosporium maydis*), Roya (*Puccinia sorghi*) y Marchitez (*Erwinia stewartii*).

Plagas del Maíz

Reyes (1990), menciona que múltiples publicaciones indican cuales son las principales problemas entomológicos en México en el cultivo del maíz destacando: araña roja (*Tetranychus urticae*), gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*), gusano falso medidor (*Trichoplusia ni*), gusano soldado (*Spodoptera exigua*), gusano

trozador (*Agrotis ipsilon*), trips (*Frankliniella* spp.), barrenador del tallo (*Diatrea saccharalis*) y gusano elotero (*Helicoverpa zea*).

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 suelo 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 (Lim, 2000).

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 trasloca 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 meristemático. 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 simplástica) (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 de la planta

La función de la EPSPS es unir el ácido shikímico (S3P), con ácido fosfoenolpirúvico (PEP), para formar la EPSP. 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. Ésta 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

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).

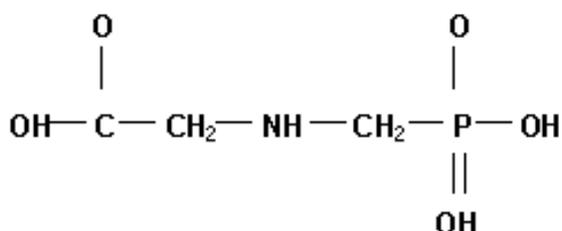


Figura 1. Estructura molecular del glifosato.

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 al de 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, 2006).

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 enolpiruvilshikimatofostato 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 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, 2006).

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. En eleusine indica se reportó un índice de resistencia bajo (1.1X) lo cual indica un mecanismo de resistencia de un EPSPS insensible o alterada, en Malasia unos biotipos resistentes mostraron una sustitución en el aminoácido 106 de Prolina a Serina y Treonina (Baerson *et al.*, 2002; Dinelli *et al.*, 2006).

MATERIALES Y METODOS

Localización

El trabajo experimental se estableció dentro de las instalaciones de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en Saltillo, Coahuila, México.

Se colectó semilla de pata de gallina siguiendo la metodología descrita por Moss (1995). Se colectaron inflorescencias de *E. indica* en Saltillo, Coahuila, México de una zona rural no abierta a cultivo (Saltillo) y en Aguacate municipio de Yecapixtla, Morelos, México, en un lote de maíz bajo labranza de conservación, 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.

Se colocaron 200 semillas de *E. indica* de las tres 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 aspersion manual a una presión de 275 kPa, con una boquilla Teejet 8001E.

Para aislar el ADN genómico total (Doyle y Doyle, 1990), se utilizó muestras compuestas de 10 hojas frescas de cada localidad (Saltillo, Coahuila y Yecapixtla, Morelos) y se utilizó el método CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio) para amplificar una región que contiene el sitio de la mutación de prolina a serina en el sitio 106 (Tran *et al.*, 1999), 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, la técnica consiste en: 1) En un mortero esterilizado y congelado se muele alrededor de 1 g de tejido de *Eleusine indica* con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. 2) Agregar 1 ml de buffer CTAB 2X y seguir moliendo. Recuperar en un tubo eppendorf de 1.5 ml. 3) Centrifugar a 8 000 xg durante 8 min. a 4°C. 4) Eliminar el sobrenadante y resuspender con 600 µl de CTAB 2X. 5) Incubar a 60°C durante 10 min. 6) Agregar 600 µl de cloroformo:octanol 24:1, agitar hasta homogeneizar. 7) Centrifugar a 5 000 xg durante 12 min. a 4°C (o hasta que el sobrenadante quede transparente). 8) Trasladar el sobrenadante a un tubo nuevo, cuidando de no tomar la interfase. 9) Agregar 2/3 del volumen final de isopropanol frío para precipitar el ADN. 10) Dejar reposar durante la noche a -20°C. 11) Centrifugar a 8000 xg durante 5 min a 4°C. Eliminar perfectamente el sobrenadante. 12) Limpiar el ADN agregando 1 ml de etanol 70% frío y centrifugar a 7 000 xg durante 5 min. y 13) Eliminar el sobrenadante y resuspender con 100 µl de buffer. Este protocolo es eficiente para la extracción de ADN de plantas que no producen compuestos secundarios o gran cantidad de polisacáridos, también se empleo el método PCR (hacia adelante 5' GCGGTAGTTGTTGGCTGTGGTG, reverso 5' TCAATCCGACAACCAAGTCGC), basado en la secuencia de la 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintetasa del GenBank (AJ417034).

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 μ l de H₂O, esto se hizo utilizando 50 μ L de reacciones que contiene 500 ng de DNA genómico, 1x PCR buffer, 200 μ M de cada Dntp, 1,5 mM de MgCl₂, 0,5 μ M de cada iniciador (10 μ M/ μ l) 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, *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).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Primeramente se realizó una prueba de PCR in silico con el Indicador 1: GC GGTAGTTGTTGGCTGTGGTG e Indicador 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 pb. Comenzando en la posición 778 del gen EPSPS, en la figura 2., se puede observar la posición 875 correspondiente al aminoácido 106, en este caso serina. Se hace notar que los iniciadores son los correctos para amplificar la región 106 donde Ng et al. (2003) encontraron una mutación puntual.

Secuencia: 778 del gen EPSPS

```
GCGGTAGTTGTTGGCTGTGGTGCAAGTTCCCAGTTGAGAAGGATGCGAA
AGAGGAGGTGCAGCTCTTCTTGGGGAATGCTGGAAGTCAATGCGATTCAT
TGACAGCAGCCGTAAGTCTGCTGGAGGAAATGCAACGTGAGTTGGTTTT
TCCATCCTCAGAATATGCCCGTGGAACTGAGTAGCGAAATTGTGGTGATA
TTTCGTGACTTATCGTGCATCTTTTCTGAATTCCAGTTATGTGCTTGATG
GAGTGCCAAGAATGCGGGAGAGACCCATTGGCGACTTGGTTGTCCGATTG
```

A

FIGURA 2. Ubicación de la secuencia: 778, de la posición T 875 correspondiente al aminoácido 106, en este caso serina, TCA = aminoácido 106 serina de la secuencia AY157643, tomado del ADN de *E. indica*.

En la extracción del ADN con el método CTAB, presentó una buena calidad de ADN. Se midió la cantidad y calidad del ADN con el equipo EPOCH (espectrofotómetro) obteniendo valores de 300-500 ng/μl, siendo estos datos aproximados ya que se utilizaron diferentes reactivos para la suspensión del ADN. Además, se corrió una electroforesis donde se vé que el ADN extraído presentaba buena calidad.

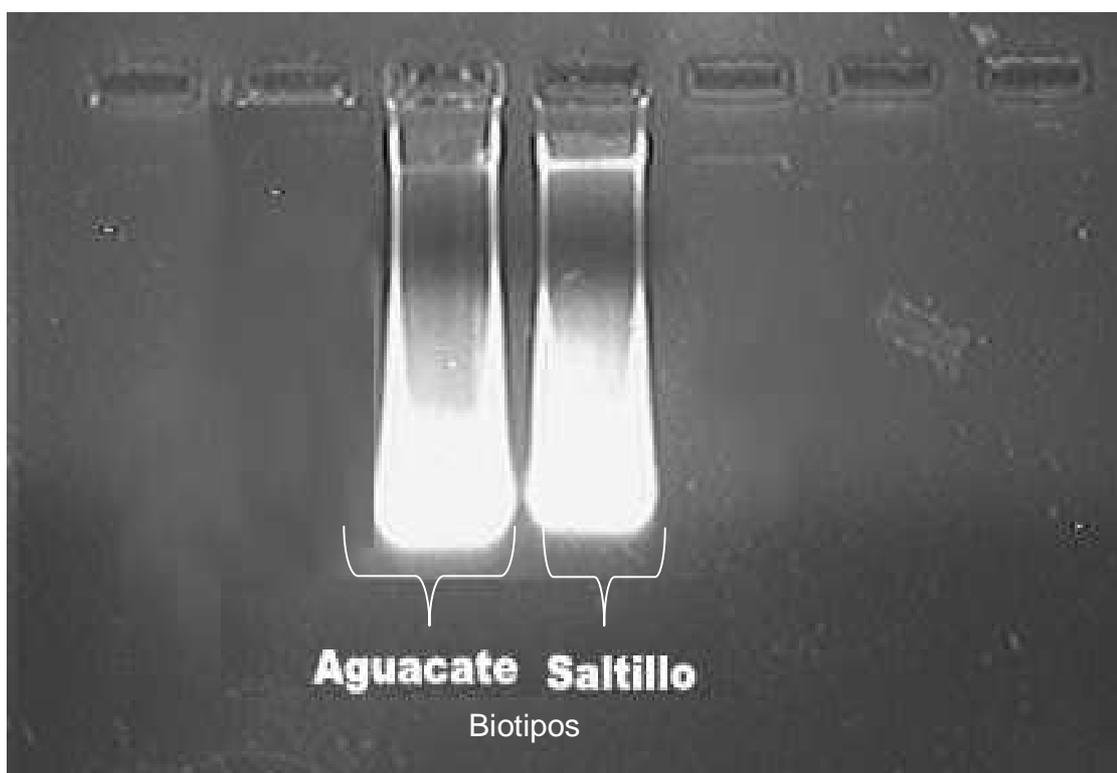


FIGURA 3. Calidad y cantidad del ADN resultante de la extracción por el método CTAB de los biotipos de *E.indica* de las localidades Aguacate Yecapixtla Morelos y lote Saltillo Coahuila.

Se realizó la amplificación de la región de 301 bp. comenzando en el sitio 778 de los biotipos de *Eleusine indica* de los lotes Aguacate y Saltillo, obteniendo un buen desplazamiento de ADN amplificado con la electrolisis, como se observa en la

figura 3, donde se ven claramente las bandas del ADN de *E. indica*, correspondiente a los pozos Saltillo Coahuila y Yecapixtla Morelos en comparación del marcador.

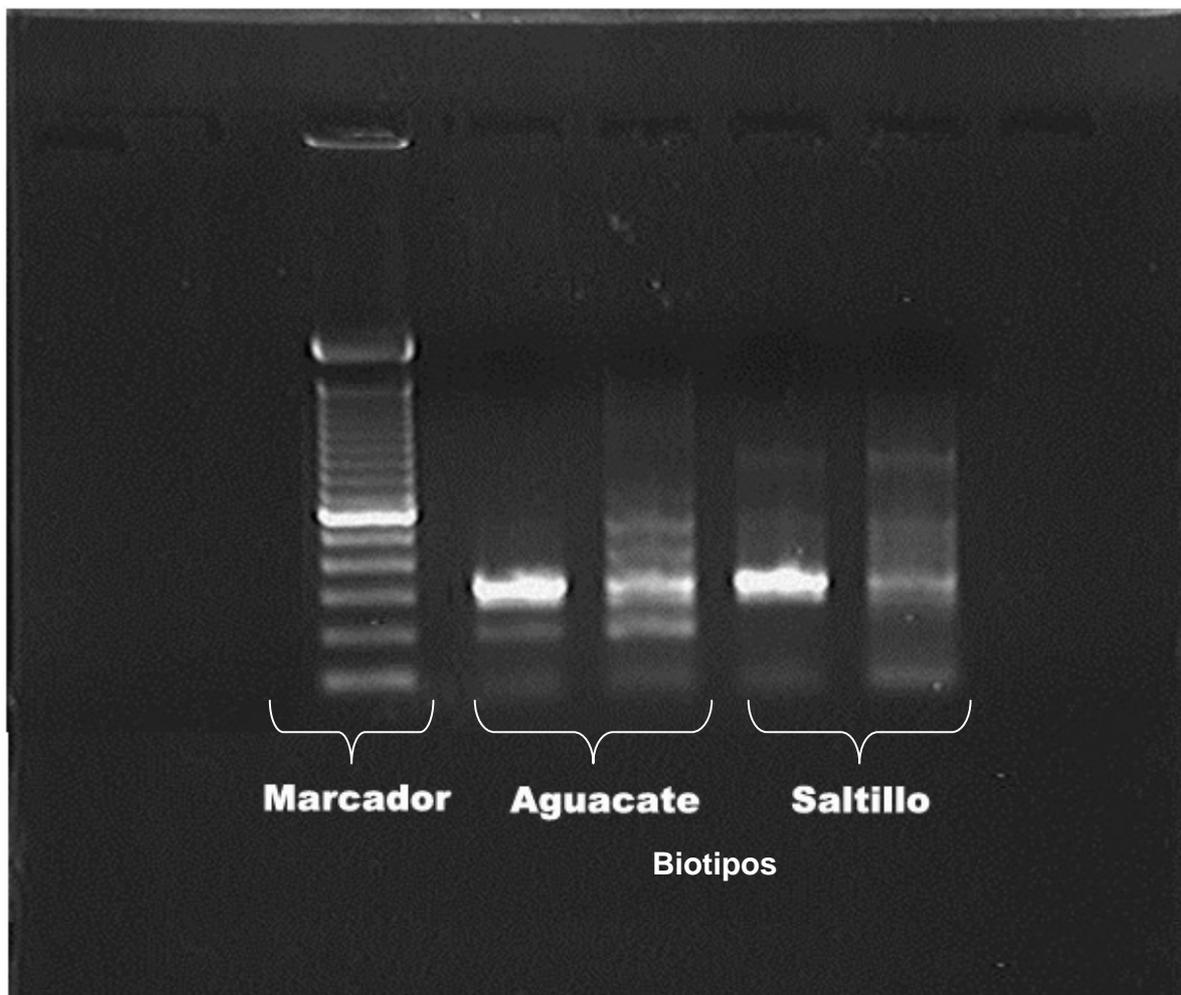


FIGURA 4. Resultado de la extracción del ADN por el método PCR de los biotipos de *Eleusine indica.*, con el marcador.

Los productos amplificados de los biotipos de *Eleusine indica* de los lotes Saltillo y Yecapixtla, se mandaron a amplificar al Lab Vitagénesis de Monterrey N.L. en donde se limpiaron con exonucleasa y fosfatasa alcalina de camaron y se secuenciaron utilizando el equipo Genetic Imlizere. Se obtuvieron 2 secuenciaciones del lote Aguacate y para cada indicador (hacia adelante y hacia atrás). Solo las

En las secuenciaciones del gen de la EPSPS del biotipo susceptible originario de Coahuila, el biotipo Saltillo presentó cuatro puntos de mutación, la primera sustitución ocurrió en el sitio del aminoácido 94 de serina por treonina por un cambio en el nucleótido 840 de guanina a citosina; la segunda sustitución de aminoácidos se presentó en la posición 95 con el cambio de serina a fenilalanina por un cambio en el nucleótido 843 de guanina a citosina; la tercera sustitución de aminoácidos de debió al cambio de timina por adenina en el sitio 855 y lo que provoco el cambio de metionina por lisina y la cuarta sustitución de aminoácidos ocurrió en la posición 103 con el cambio de glicina a prolina por el cambio en el nucleótido 867 de adenina por citosina.

Secuencia hacia atrás comparada por medio del BLAST con la secuencia de EPSPS de *Eleusine indica*. Saltillo Coahuila.

Gaps = 16/213 (8%) donde indica el error menos del 10% es correcto.

```

Query  825  CGAAAGAGGAGGTG-CAGCTCTTCTTGGGGAATGCTGGAAGTCAAATGC-GAATTTGAC  882
      |||
Sbjct  221  CGAAAGAGGAGGTGCCACCTTTTCTTGGGGAAGCCGGAAGTCCAATGCGGCACATTTGAC  162

Query  883  AGCAGCCGTAACATGCTTGCT-GGAGGAAATGCAACGTG-AGTTGGTTTTTCCATCCTCAGA  940
      |||
Sbjct  161  AGCAGCCGTAA-YGGTGCTGGGAGGAAA-GCAACGGGAAGTTGGTTTTTCC-TCTTCAGG  105

Query  941  ATATGCCCCGTGGAAGTACTGAGT-AGCG-AAATTGTGG-TGATATTTTCGTGACTTATCGTGCA  997
      |||
Sbjct  104  ATTGCCCCGGCAACTGAGTAAG-GRAAA-TG-GGTTG-TTTTTCGTGMYTWATCGTGCA  50

Query  998  TCTTTTCTGAATTCCAGTTATGTGCTTGATGGA  1030
      |||
Sbjct  49  TCTTTTCTGAATTCCAGTTATGTGCT-GATGGA  18

```

FIGURA 6. Comparación del biotipo del gen de la EPSPS del biotipo de *E. indica* de Saltillo Coahuila hacia atrás (método BLAST) con el AY157643 de Malasia. UAAAN 2012.

CONCLUSIONES

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

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

Se encontraron mutaciones en el biotipo resistente de Yecapixtla Morelos (Leu107Met, Ser110Ala y Met104Asn) así como en el biotipo de Saltillo Coahuila (Gln103Pro, Met99Lis, Ser95Fen y Ser94Tre).

El gen que codifica la EPSPS de *Eleusine indica* es polimórfico y puede presentar diferentes mutaciones que ocasionan cambios en la respuesta al 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. 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>. Albert37@gorsa.net.mx.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D.J. Lipman 1997, "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
- Arford, Martin R. and Horn, Sally P. 2004. "Pollen evidence of the earliest maize agriculture, in Costa Rica" *Journal of Latin American Geography*. Project MUSE, pp. 199-208.
- 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.
- Brosnan, J.T., Nishimoto, R.K. y J. DeFrank. 2008. Metribuzin-resistant goosegrass (*Eleusine indica*) in bermudagrass turf. *Weed technology* 22:675- 678.
- Calderón, MJ; Celis R; Quintana, MA; Durand, S; Cornejo, J. 2005. Soil components as affecting glyphosate soil retention (unpublished results).

- Castañeda Z., Yolanda. 2008. Una visión sobre la importancia de diversidad del maíz en México. Acción Social de los Jesuitas. <http://sjsocial.org/crt/articulos/762castaneda.htm>.
- 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>).
- Conabio, 2011, Malezas de México: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/2inicio/paginas/lista-plantas.htm>.
- Cronquist, Arthur. Introducción a la Botánica. Ejemplar 17. Año 2000.
- 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.
- 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. www.senasa.gov.ar.
- FAO, 2009. Consulta de bases de datos de producción mundial y comercio internacional de Maíz. Disponible en: <http://apps.fao.org/faostat>.
- Figliola, S. S., N. D. Camper y W. H. Ridings. 1988. Potential Biological Control Agents for Goosegrass (*Eleusine indica*). *Weed Science* 6:830-835.
- 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, T, L; Fernández-Quintanilla, C. 1989. Fundamentos sobre malas hierbas y herbicidas. Coedición. Madrid, España. Ediciones Mundi-Prensa. 348p.
- Gimsing, AL, Borggaard, OK; Jacobsen, OS; Aamand, 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 JG. 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>.

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.

Heap, I. 2006. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Online. Internet. Disponible en www.weedscience.com.

Hernández, G., Ramiro. 2008. Proposición con punto de acuerdo por el que la Cámara de Senadores solicita al Secretario de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación, para que se otorgue un estímulo a la rentabilidad de los productores de maíz. LX Legislatura. Gaceta del Senado. 7 de diciembre de 2008. <http://www.senado.gob.mx/gace.php?sesion=2008/1/13/1&documento=93>

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.

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Lesur, Luis. 2005. Manual del cultivo del maíz: una guía paso a paso. –México: Trillas, 80 p.
- 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.

- 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.
- Mullis, Kary . 1998. *Dancing Naked in the Mind Field*. New York: Pantheon Books. ISBN 0-679-44255-3.
- Ng, C.H., Ratnam, W., Surif, S. e Ismail, B.S. 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.
- 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.

- 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.
- Rosales, R. Enrique. 2008. Conceptos generales sobre manejo de maleza en sistemas de labranza de conservación CIRNE-INIFAP. www.agecon.okstate.edu/isct/labranza/robles/ponenci1.doc
- 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. 2009. Consulta de Indicadores de Producción Nacional de Maíz. Disponible en www.siap.sagarpa.gob.mx/siacon.
- SISPRO, 2008, El Cultivo del Maíz en México, http://www.campomexiquense.gob.mx/sp/SisproMaiz/html/historia/7_El%20cultivo%20del%20maiz%20en%20mexico.htm
- 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.

- 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.
- 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.
- Vavilov, N. 1992. 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=b1UBXlzwPg6S3w_EiOzEWfjiU#v=onepage&q&f=false
- 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.
- Villalba, A. 2009. Efectos de Glifosato y metsulfurón metil en plantas acuáticas y uso posible uso como bioindicadoras. Revista Ciencia Docencia y Tecnologia. (29): 169-186 p.
- 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 1997 Data Sheets on Pesticides No. 91,
WHO/PCS/DS/96.91, July ([http:// www.inchem.org/documents/pds/pds /pest
91_e.htm](http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest91_e.htm)).