

**FACTORES QUE DETERMINAN EL GRADO DE RESISTENCIA  
DE *Eleusine indica* (L.) GAERTN A GLIFOSATO EN ZONAS  
PRODUCTORAS DE MAÍZ**

**PEDRO AARON CERDA GARCIA**

**TESIS**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL**

**PARA OBTENER EL GRADO DE**

**DOCTOR EN CIENCIAS EN**

**PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA**

**“ANTONIO NARRO”**



**Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.**

**Diciembre de 2011.**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO

SUBDIRECCION DE POSTGRADO

FACTORES QUE DETERMINAN EL GRADO DE RESISTENCIA DE *Eleusine indica* (L.) GAERTN A GLIFOSATO EN ZONAS PRODUCTORAS DE MAÍZ

TESIS


PRESENTADA POR:

PEDRO AARON CERDA GARCIA

Elaborada bajo la supervisión del comité particular de asesoría y aprobada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

CÓMITE PARTICULAR

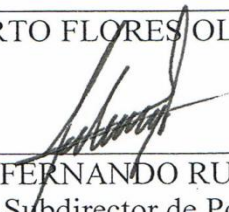
Asesor principal   
DR. LUIS ALBERTO AGUIRRE URIBE

Asesor   
DR. ENRIQUE ROSALES ROBLES

Asesor   
DR. JERONIMO LANDEROS FLORES

Asesor   
DR. ERNESTO CERNA CHAVEZ

Asesor   
DR. ALBERTO FLORES OLIVAS

  
DR. FERNANDO RUÍZ ZARATE  
Subdirector de Postgrado

Buenavista, Saltillo, Coahuila; México, Diciembre de 2011

## AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro**, por ser el pilar de mi vida académica.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por aportar el apoyo económico para la realización de mis estudios doctorales.

Al **Departamento de Parasitología Agrícola**, y a todos y cada uno de sus integrantes, por brindar las condiciones adecuadas para la culminación de mis estudios y proyecto de investigación.

Al **Dr. Luis Alberto Aguirre Uribe**, por su acertada guía para la realización de mis estudios doctorales y trabajo de investigación; y del que tomo como ejemplo su tenacidad para realizar hasta la tarea más simple.

Al **Dr. Enrique Rosales Robles**, por compartir su experiencia como el mejor profesional de la ciencia de la maleza y con esto llevar a buen término la presente tesis.

Al **Dr. Jerónimo Landeros Flores**, por ser mi mentor desde hace mucho tiempo y por su por su gran disponibilidad e interés hacia este trabajo de investigación.

Al **Dr. Ernesto Cerna Chávez**, por su amistad y apoyo para empezar y terminar esta etapa de mi vida; y por sus importantes observaciones para la realización de este trabajo de tesis.

Al **Dr. Alberto Flores Olivas**, por brindarme siempre tiempo y atinada asesoría para la culminación de esta investigación.

Al **M.C. Arturo Coronado Leza**, al que le agradezco que sin ser parte del comité de asesores, me brido todo el apoyo necesario para la realización del trabajo de tesis.

## **DEDICATORIA**

### **A MIS PADRES:**

Francisco Javier y María del Rosario

Por darme la vida y enseñarme a aprovecharla.

### **A MI ESPOSA:**

Liliana

Por su amor y apoyo a todos mis proyectos.

### **A MIS HIJOS:**

Aarón y Ángel

Por ser mi mayor motivo para ser un poco mejor cada día.

### **A MIS FAMILIARES Y AMIGOS:**

Tengo la dicha de tener una familia muy grande y también los mejores amigos; así que a todos ustedes les comparto la culminación de esta etapa de mi vida y el principio de la siguiente.

## COMPENDIO

**FACTORES QUE DETERMINAN EL GRADO DE RESISTENCIA DE *Eleusine indica* (L.) GAERTN A GLIFOSATO EN ZONAS PRODUCTORAS DE MAÍZ**

**POR:**

**PEDRO AARON CERDA GARCIA**

**DOCTORADO EN CIENCIAS**

**PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

**BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA. DICIEMBRE 2011.**

**Dr. Luis Alberto Aguirre Uribe -Asesor-**

**Palabras clave:** Malezas, herbicidas, glifosato, resistencia, EPSPS, mecanismos de resistencia.

Entre las malezas presentes en el cultivo de maíz, que representan importantes pérdidas por interferencia al cultivo tenemos a *Eleusine indica* (L.) Gaertn, conocida

comúnmente como pata de gallo o gallina, que es 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). 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), bipyridilos, 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). El fenómeno de la resistencia de malezas a herbicidas en México es poco documentado; además que se ha observado en diferentes regiones maiceras de México, bajos porcentajes en el control de *Eleusine indica* (L.) Gaertn con el herbicida glifosato; por lo que la presente investigación tiene como objetivo general conocer el nivel de resistencia de *E. indica* con respecto al glifosato en diferentes zonas productoras de maíz en el México y los mecanismos de resistencia involucrados, así también se establecieron tres objetivos específicos: 1) Identificar biotipos resistentes y susceptibles de *Eleusine indica* (L.) Gaertn a glifosato, 2) establecer las curvas de dosis – respuesta de los biotipos seleccionados y 3) secuenciar el gen que codifica la enzima EPSPS de los biotipos resistentes y susceptibles de *Eleusine indica* (L.) Gaertn e identificar mutaciones puntuales.

Se colectó semillas de *Eleusine indica* (L.) Gaertn en 69 lotes de maíz con antecedentes de uso de glifosato de Puebla, Jalisco, Guanajuato y Morelos para seleccionar los biotipos resistentes y de Coahuila se seleccionaron biotipos susceptibles de áreas no cultivadas sin uso de glifosato. La metodología de selección de biotipos fue una prueba rápida con papel filtro con una solución de glifosato en caja Petri, de donde se eligió un biotipo del estado de Morelos, del municipio de Yecapixtla con antecedente de producción

de maíz bajo labranza de conservación por más de 15 años con muy bajos o nulos porcentajes de control de *Eleusine indica* con glifosato.

Los ensayos de dosis-respuesta en maceta con una población sospechosa resistente y dos poblaciones sin exposición al herbicida determinaron que la población de Yecapixtla, Morelos tiene índices de resistencia de 1.08X y 1.01X con respecto a las poblaciones susceptibles. Se presentó hormesis manifestándose por rebrotes y controles bajos de pata de gallina con glifosato.

Las secuenciaciones de ADN del gen de la 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintetasa de los biotipos susceptibles y biotipo resistente de la maleza pata de gallina. Se encontró una triple sustitución (Leu107Met, Ser110Ala y Met104Asn) en la enzima EPSPS del biotipo resistente de *Eleusine indica* (L.) de Yecapixtla, Morelos. Estas sustituciones modifican el efecto del glifosato sobre la maleza en campo. Se determinó una cuádruple y doble sustitución de aminoácidos en la enzima EPSPS de los biotipos susceptibles de Coahuila (Gln103Pro, Met99Lis, Ser95Fen y Ser94Tre) y (Leu107Met o Leu107Ile y Lis112Asn) que no modifican la susceptibilidad de *Eleusine indica* al glifosato.



**ABSTRACT**

**FACTORS DETERMINING THE DEGREE OF RESISTANCE TO GLYPHOSATE  
IN *Eleusine indica* (L.) Gaertn IN MAIZE PRODUCING AREAS**

**BY:**

**PEDRO AARON CERDA GARCIA**

**DOCTOR IN SCIENCE**

**AGRICULTURAL PARASITOLOGY**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

**BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA. DECEMBER 2011.**

**Dr. Luis Alberto Aguirre Uribe -Advisor-**

**Key words:** Weeds, herbicides, glyphosate, resistance, EPSPS, mechanisms of resistance.

*Eleusine indica* (L.) Gaertn, commonly known as goosegrass, is among the most common weed species in maize that cause significant yield losses due to interference. This weed is considered among the five worst weeds in the world, and it is found in 46 crops in

over 60 countries (Holm et al., 1977). In México, *E. indica* is in all states and in 26 crops (Villaseñor and Espinosa, 1998). Goosegrass has developed resistance to herbicides of groups of acetolactate synthase inhibitors (Valverde et al., 1993), inhibitors of acetyl coenzyme A carboxylase (Leach et al., 1995), bipyridyl, glycine (Lim and Ngim, 2000), dinitroanilines (Mudge et al., 1984), inhibitors of glutamine synthetase (Adam et al., 2010) and inhibitors of photosystem II (Brosnan et al., 2008). The phenomenon of weed resistance to herbicides in Mexico is poorly documented, but it has been observed in different maize producing regions of Mexico poor control of *Eleusine indica* (L.) Gaertn with glyphosate, so that this research aims to understand the level of general resistance of *E. indica* respect to glyphosate in different corn producing areas in Mexico and the mechanisms of resistance involved, and also identified three specific objectives: 1) Identify glyphosate resistant and susceptible biotypes of *Eleusine indica* (L.) Gaertn, 2) establish the curves of dose - response of selected biotypes and 3) sequencing the gene encoding EPSPS enzyme in resistant and susceptible biotypes of *Eleusine indica* (L.) Gaertn and identify mutations.

*Eleusine indica* (L.) Gaertn seeds were collected in 69 sites of corn with glyphosate use antecedent in Puebla, Jalisco, Guanajuato and Morelos to identify resistant biotypes and in Coahuila, susceptible biotypes were selected in uncultivated areas without previous glyphosate use. The methodology to select biotypes was a quick test with filter paper with a solution of glyphosate in Petri dishes. A biotype from the state of Morelos was selected as putative resistant in Yecapixtla, in a site with a antecedent of maize production under no-till for more than 15 years with very low of glyphosate goosegrass control.

The dose-response tests in pots with a putative resistant population and two populations without previous exposure to the herbicide determined that the population of

Yecapixtla, Morelos has a resistance index of 1.01X and 1.08X compared to susceptible populations. Hormesis is present and manifested by low controls and sprouts in goosegrass with glyphosate.

A triple substitution (Leu107Met, Ser110Ala and Met104Asn) in EPSPS enzyme resistant biotype of *Eleusine indica* (L.) from Yecapixtla, Morelos was detected in the DNA sequence of the gene for 5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase of glyphosate resistant biotypes of goosegrass. These substitutions modify the effect of glyphosate on this weed in the field. Also, a quadruple and double amino acid substitutions in the EPSPS enzyme of susceptible biotypes of Coahuila was determined (Gln103Pro, Met99Lis, Ser95Fen and Ser94Tre) and (Leu107Met or Leu107Ile and Lis112Asn) that did not alter the susceptibility of this goosegrass biotype to glyphosate.

## ÍNDICE GENERAL

	Página
<b>ÍNDICE GENERAL</b> .....	x
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	xiii
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	3
Generalidades de <i>Eleusine indica</i> .....	3
Descripción de <i>Eleusine indica</i> .....	4
Importancia de <i>Eleusine indica</i> .....	5
Control de <i>Eleusine indica</i> .....	6
Control biológico.....	6
Control químico.....	6
Resistencia a herbicidas.....	7
Resistencia a glifosato.....	10
<b>ARTICULO CIENTIFICO I</b>	
<b>RESPUESTA DIFERENCIAL A GLIFOSATO EN PASTO PATA DE</b>	
<b>GALLINA (<i>Eleusine indica</i> (L.) Gaertn)</b> .....	16
<b>ARTICULO CIENTIFICO II</b>	
<b>ENZIMA 5-ENOLPIRUVIL-SHIKIMATO-3-FOSFATO SINTETASA</b>	
<b>MUTADA DEL PASTO PATA DE GALLINA (<i>Eleusine indica</i> (L.)</b>	29
<b>Gaertn)</b> .....	
<b>CONCLUSIONES GENERALES</b> .....	42
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	43

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura química del herbicida glifosato [N-(fosfonometil) glicina].....	11
2	Herbicida glifosato [N-(fosfonometil) glicina] en su forma iónica.....	12
3	La reacción catalizada por la 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS) para convertir shikimato-3-fosfato (S3P) con fosfoenolpiruvato (PEP) a 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato (EPSP).....	14

## INTRODUCCIÓN

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).

El maíz se ve atacado por una serie de insectos, enfermedades y malezas. Entre las malezas tenemos a *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 2000 m.s.n.m.; *E. indica* es 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).

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).

El fenómeno de la resistencia de malezas a herbicidas en México es poco documentado; además que se ha observado en diferentes regiones maiceras de México, bajos porcentajes en el control de *Eleusine indica* (L.) Gaertn con el herbicida glifosato; por lo que la presente investigación tiene como:

#### OBJETIVO GENERAL

Conocer el nivel de resistencia que ha desarrollado *E. indica* con respecto al glifosato en diferentes zonas productoras de maíz en el México y los mecanismos de resistencia involucrados.

#### OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Identificar biotipos resistentes y susceptibles de *Eleusine indica* (L.) Gaertn a glifosato.
2. Establecer las curvas de dosis – respuesta de los biotipos seleccionados.
3. Secuenciar el gen que codifica la enzima EPSPS de los biotipos resistentes y susceptibles de *Eleusine indica* (L.) Gaertn e identificar mutaciones puntuales.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### Generalidades de *Eleusine indica*

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 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). Sin embargo, *E. coracana* es considerada como una maleza secundaria en Tailandia y Vietnam (Waterhouse, 1994).

*Eleusine indica* es conocida como pata de gallina, es originaria de África (Phillips, 1972), en sustitución de una visión alternativa que era de la India (Holm *et al.*, 1977; Waterhouse, 1994). 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).



### Descripción de *Eleusine indica*

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. Las ramas de la inflorescencia pueden ser de 1 a 17, de 3 a 10 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 cariósides libres o dispersos 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 15° en 1992 en el Pacífico oceánico (Waterhouse, 1994). Crece bien en lugares soleados o con poca sombra, en pantanos, terrenos baldíos, bordes de caminos, en las orillas 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 de *Eleusine indica*

### 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 microherbicidas 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).

### **Resistencia a herbicidas**

La resistencia se define como la capacidad hereditaria natural de algunos biotipos de malezas dentro de una población para sobrevivir y reproducirse después del tratamiento con un herbicida que, bajo condiciones normales de empleo, controla efectivamente esa población de maleza. 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. Se ha confirmado que 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). Con la siembra de cultivos tolerantes a herbicidas también se abre la posibilidad de que malezas sexualmente compatibles con el cultivo adquieran 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. Los grupos más afectados por la resistencia son los inhibidores de la Acetolactato Sintetasa (ALS), inhibidores de la fotosíntesis (fotosistemas I y II), inhibidores de la Acetil Coenzima A Carboxilasa (ACCase) y glicinas (Heap, 2011).

En México se conocen 9 biotipos resistentes de 4 especies; *Avena fatua*, *Phalaris minor* y *Phalaris paradoxa* resistentes a ACCase 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).

Los mecanismos que pueden conferir resistencia a los herbicidas se pueden agrupar en dos categorías: 1) resistencia basada en el sitio objetivo, y 2) la resistencia basada en el sitio no-objetivo. La resistencia basada en el sitio objetivo consiste en una

modificación del sitio de acción de tal manera que el herbicida tiene reducida afinidad y ya no se une a la enzima alterada. Esto se debe a un único cambio de nucleótido del gen que codifica la enzima a la que el herbicida se une (Devine y Shukla, 2000; Preston y Mallory-Smith, 2001). La resistencia basada en el sitio objetivo es el más común y se ha documentado para los herbicidas con los sitios de acción más conocidos, incluyendo aquellos que inhiben la transferencia de electrones en el fotosistema II (PS-II) (Gronwald, 1994), la Acetil-CoA Carboxilasa (ACCase) (Délye *et al.*, 2005), Acetolactato Sintetasa (ALS) (Tranel y Wright, 2002), y la polimerización de tubulina (Yamamoto *et al.*, 1998). La resistencia basada en el sitio no-objetivo implica la exclusión de la molécula del herbicida del sitio de destino debido a la absorción o desplazamiento diferencial, el secuestro o el aumento del metabolismo de desintoxicación.

Varias especies de malezas, incluyendo *Alopecurus myosuroides* Huds. (De Prado y Franco, 2004), ryegrass (*Lolium rigidum* L.) (Preston, 2004), y *Bromus tectorum* L.) (Park *et al.*, 2004), han desarrollado resistencia a varios herbicidas debido al aumento de las tasas de detoxificación de herbicidas. Varios sistemas de enzimas se sabe que están implicados en la desintoxicación del metabolismo de los herbicidas, como glutatión transferasas, arilo acilo amidasas, y monooxigenasas citocromo P-450. Por otro lado, la disminución de la translocación y penetración del herbicida al sitio activo, así como el aumento del secuestro de herbicida en la vacuola, se han sugerido que son los mecanismos de resistencia de la hierba de cebada (*Hordeum glaucum* Steud.) al paraquat (Preston y Devine, 2000; Preston y Mallory-Smith, 2001).

## Resistencia a glifosato

Cuando se examinó a principios de los años noventa, que no había evolucionado la resistencia a glifosato en especies de malezas en condiciones de campo, a pesar de su uso generalizado y por un periodo de 20 años desde su comercialización en 1974 (Holt *et al.*, 1993; Dyer, 1994), Bradshaw *et al.* (1997) sugiere que la ausencia de malezas resistentes al glifosato podría atribuirse a las propiedades únicas de glifosato, tales como su modo de acción, estructura química, la falta de metabolismo detoxificador en las plantas y la falta de actividad residual en el suelo. Jasieniuk (1995) también sugiere que existen limitaciones de recursos genéticos y bioquímicos en las plantas superiores para la evolución de un mecanismo de resistencia al glifosato. Otros factores que pueden ser igual de importantes para el retraso en la aparición de la resistencia son el alto costo de glifosato hasta que se liberó su patente, que no podía ser utilizado en los cultivos y que fue utilizado a menudo en combinación con otros herbicidas.

Por lo tanto, el glifosato se utilizó en todo el mundo durante más de 20 años sin casos de resistencia, manifestándose hasta 1996, *Lolium rigidum* en Australia (Pratley *et al.*, 1996). Hoy en día, la resistencia al glifosato evolucionado ha sido reportado en 21 especies de malezas en 17 países diferentes, incluyendo *Lolium rigidum* en Australia (Powles *et al.*, 1998; Pratley *et al.*, 1999) y en Estados Unidos (Simarmata *et al.*, 2003), pata de gallina (*Eleusine indica* L. Gaertn) en Malasia, Colombia, Bolivia y Costa Rica (Tran *et al.*, 1999; Lee y Ngim, 2000), cola de caballo (*Conyza canadensis* L. Cronq) en Estados Unidos (VanGessel, 2001; Koger *et al.*, 2004; Main *et al.*, 2004) ; raygrass italiano (*L. multiflorum* Lam.) en Chile (Pérez y Kogan, 2003) y Brasil (Heap, 2011),

cola de caballo (*C. bonariensis* L. Cronq.) en el sur de África (Heap, 2011) y España (Urbano *et al.*, 2005), Llantén (*Plantago lanceolata* L.) en el sur de África (Heap, 2011); hierba lechosa (*Euphorbia heterophylla* L.) en Brasil (Heap, 2011), zacate Johnson (*Sorghum halepense* L.) en la Argentina (Valverde *et al.*, 2007), *Ambrosia artemisiifolia* L. (Sellers *et al.*, 2005); *Amaranthus rudis* Sauer (Zelaya y Owen 2005), *A. palmeri* S. Wats (Culpepper *et al.*, 2006) en los EE.UU, *Digitaria insularis* (Heap, 2011) en Paraguay y Brasil, *Echinochloa colona* (Heap, 2011) en Australia, *Lolium perenne* (Heap, 2011) en Argentina, *Urochloa panicoides* (Heap, 2011) en Australia, *A. trifida* (Heap, 2011) en Estados Unidos, *C. sumatrensis* (Heap, 2011) en España, *Kochia scoparia* (Heap, 2011) en Estados Unidos, *Parthenium hysterophorus* (Heap, 2011) en Colombia, *Chloris truncata* (Heap, 2011) en Australia y *Poa annua* (Heap, 2011) en Estados Unidos.

Las propiedades del herbicida glifosato [N-(fosfonometil) glicina] fueron descubiertas por Monsanto en 1970 (Fig.1). El glifosato se introdujo por primera vez como un herbicida comercial en 1974 bajo el nombre comercial de Roundup, y ahora es considerado el herbicida más importante y más usado en el mundo (Franz *et al.*, 1997; Baylis, 2000; Powles y Preston, 2006).

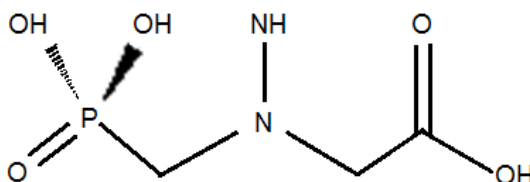


Figura 1. Estructura química del herbicida glifosato [N-(fosfonometil) glicina].



El glifosato es un herbicida post-emergente, sistémico, no selectivo, de amplio espectro que controla malezas anuales, perennes y cultivos voluntarios, en una amplia gama de situaciones. A pesar de que fue utilizado inicialmente como un herbicida dirigido a lugares sin cultivo y cultivos de plantación (huertos y viñedos), ahora es ampliamente utilizado en la producción de cultivos de labranza de conservación y para el control de malezas en los cultivos transgénicos tolerantes al glifosato, como la soya (*Glycine max* (L.) Merr), algodón (*Gossypium hirsutum* L.), canola (*Brassica napus* L.) y maíz (*Zea mays* L.) (Baylis, 2000; Shaner, 2000, Woodburn, 2000).

El glifosato es un amino ácido zwitterión que puede ser formulado a partir de diferentes sales (isopropilamina y potasio) (Fig. 2). Se aplica como aspersión foliar, ya que se une firmemente a los componentes del suelo y tiene poca o ninguna actividad en el suelo. Además, el glifosato es degradado por los microbios del suelo (Duke *et al.*, 2003).

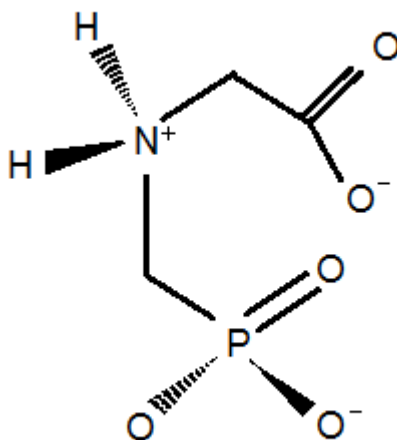


Figura 2. Herbicida glifosato [N-(fosfonometil) glicina] en su forma iónica.

Las sales de glifosato son altamente polares, son moléculas solubles en agua con bajo carácter lipofílico que probablemente penetran la cutícula lipofílica por difusión a través de una vía hidrofílica (cutina hidratada e hilos de pectina) en el apoplasto (Caseley y Coupland, 1985; Hess, 1985; Franz *et al.*, 1997). En general, hay una fase inicial rápida de la absorción, seguido por un largo período de lenta absorción. Cuanto mayor sea la concentración de glifosato en la superficie foliar, más rápido es absorbido (Duke *et al.*, 2003). La absorción del glifosato por las células de la planta a través de la membrana plasmática en el simplasto es un proceso lento e implica un mecanismo de difusión pasiva, y también un mecanismo de transporte activo (portador de fosfato) (Caseley y Coupland, 1985; Sterling, 1994; Franz *et al.*, 1997). El glifosato es rápidamente traslocado en la mayoría de las plantas, entra rápidamente en el simplasto, y es traslocado extensamente a lo largo de todas las partes de la planta a través del floema, siguiendo el mismo patrón de distribución de los fotosintatos. Aunque la mayor parte del transporte del glifosato parece ser vía simplástica, se producen suficientes movimientos apoplásticos para considerar al herbicida como un compuesto aposimplástico (Franz *et al.*, 1997).

El glifosato tiene un modo de acción único, inhibe la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS) (EC 2.5.1.19) (Steinrücken y Amrhein, 1980). La enzima EPSPS interviene en la ruta del ácido shikímico, que es esencial para la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano, y también para la producción de numerosos metabolitos secundarios aromáticos (auxinas, fitoalexinas, antocianinas, y lignina) (Kishore y Shah, 1998). La enzima EPSPS cataliza

la conversión de shikimato-3-fosfato (S3P) y fosfoenol piruvato (PEP) para producir fosfato inorgánico y 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato (EPSP) (Fig. 3) (Geiger y Fuchs, 2002). La mayoría de la evidencia indica que el glifosato es un análogo de PEP en estado de transición intermedio en el complejo ternario enzima-sustratos actuando como un inhibidor competitivo del PEP (Schönbrunn *et al.*, 2001). Está determinado que el glifosato ejerce su acción herbicida a través de la inhibición de la EPSPS, lo que impide la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos que se requieren para la síntesis de proteínas (Siehl, 1997). Sin embargo, un efecto más rápido y dramático que la reducción en las reservas de aminoácidos aromáticos, es el aumento en el ácido shikímico y en menor medida a derivados del ácido benzoico-shikimato. Este aumento en el ácido shikímico se ha relacionado con una disminución de los intermediarios la fijación de carbono (ribulosa bifosfato) y una reducción de la fotosíntesis (Duke *et al.*, 2003).

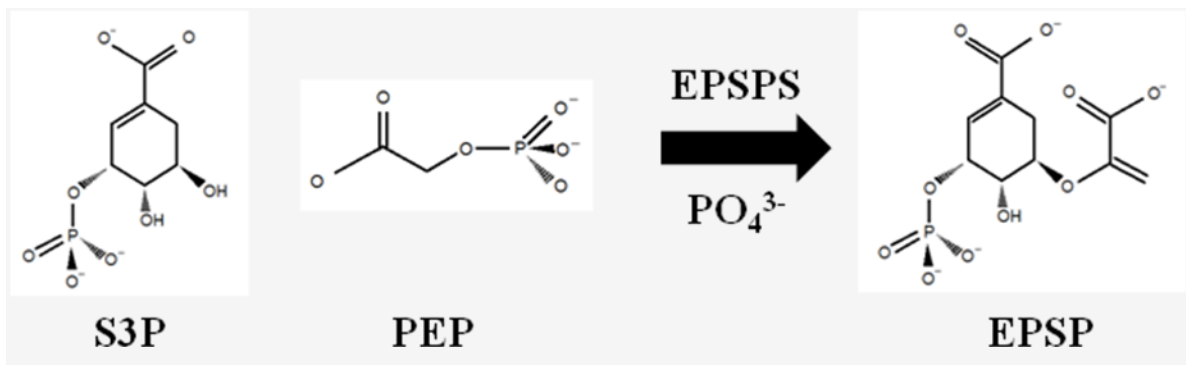


Figura 3. La reacción catalizada por la 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS) para convertir shikimato-3-fosfato (S3P) con fosfoenolpiruvato (PEP) a 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato (EPSP).

Se ha demostrado que dos mecanismos diferentes le confieren resistencia al glifosato a la maleza, la traslocación limitada del herbicida (sitio no-objetivo) y la mutación del gen de la EPSPS (sitio objetivo). Por el contrario, no se ha encontrado evidencias que el metabolismo del glifosato pueda ser un mecanismo de resistencia (Feng *et al.*, 1999, 2004, Tran *et al.*, 1999; Lorraine-Colwill *et al.*, 2003). En varias poblaciones de *L. rigidum* de Australia, la resistencia al glifosato se correlacionó directamente con desplazamiento limitado de los herbicidas a los tejidos meristemáticos (Lorraine- Colwill *et al.*, 2003; Wakelin *et al.*, 2004). Del mismo modo, el deterioro de la translocación de glifosato a otras hojas y las raíces que parecía ser el único mecanismo de resistencia en varias poblaciones de *C. canadensis* de los Estados Unidos (Feng *et al.*, 2004; Koger y Reddy, 2005; Dinelli *et al.*, 2006). En *E. indica*, dos mutaciones diferentes del gen que codifica la EPSPS, la sustitución de la prolina en el aminoácido 106 a serina y treonina, fueron encontrados en las poblaciones resistentes al glifosato procedentes de Malasia (Baerson *et al.*, 2002a, Ng *et al.*, 2003). En *L. rigidum*, ocurrieron dos mutaciones diferentes, sustitución en el aminoácido 106 de prolina a treonina y alanina, fueron encontrados en las poblaciones resistentes al glifosato en Australia y Sudáfrica, respectivamente (Baerson *et al.*, 2002b, Wakelin y Preston, 2006; Yu *et al.*, 2007).

## ARTICULO I

### RESPUESTA DIFERENCIAL A GLIFOSATO EN PASTO PATA DE GALLINA (*Eleusine indica* (L.) Gaertn)

### DIFFERENTIAL RESPONSE TO GLYPHOSATE IN GOOSEGRASS (*Eleusine indica* (L.) Gaertn)

Luis A. Aguirre Uribe<sup>1\*</sup>, Enrique Rosales Robles<sup>2</sup>, Pedro A. Cerda García<sup>1</sup>,  
Jerónimo Landeros Flores<sup>1</sup>, Ernesto Cerna Chávez<sup>1</sup> y Alberto Flores  
Olivas<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. 25315, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. <sup>2</sup>Campo Experimental Río Bravo, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Forestales y Pecuarias (INIFAP). Carretera Matamoros-Reynosa Km. 61. 88900. Río Bravo, Tamaulipas, México.

\*Autor para correspondencia (luisaguirreu@yahoo.com.mx)

**RESPUESTA DIFERENCIAL A GLIFOSATO EN PASTO PATA DE GALLINA  
(*Eleusine indica* (L.) Gaertn)**

**DIFFERENTIAL RESPONSE TO GLYPHOSATE IN GOOSEGRASS (*Eleusine  
indica* (L.) Gaertn)**

**RESUMEN**

Productores de maíz de Yecapixtla, Morelos, México han reportado controles muy bajos del pasto pata de gallina (*Eleusine indica* (L.) Gaertn) con el herbicida glifosato, por lo que este trabajo reporta los ensayos dosis-respuesta en una población sospechosa de ser resistente y dos poblaciones sin exposición al herbicida. La población de Yecapixtla, Morelos tiene índices de resistencia de 1.08X y 1.01X con respecto a las poblaciones susceptibles. Se presento hormesis manifestándose por rebrotes y controles bajos de pata de gallina con glifosato.

**Palabras clave:** Labranza de conservación, resistencia, tolerancia, herbicidas, malezas.

**SUMMARY**

Yecapixtla, Morelos, corn farmers, have reported low goosegrass (*Eleusine indica* (L.) Gaertn) control in with glyphosate herbicide, this research reports the dose-response assays in a population suspected of being resistant and two populations have not been exposed to the herbicide. The population of

Yecapixtla, Morelos had resistance rates 1.01X and 1.08X as compared to the susceptible populations. Hormesis is present, manifested by sprouting and lower control of goosegrass with glyphosate.

**Index words:** No-till farming, resistance, tolerance, herbicides, weeds.

## INTRODUCCIÓN

El pasto pata de gallina (*Eleusine indica* (L.) Gaertn) es una planta anual que está ampliamente distribuida en los trópicos, particularmente en Asia, África, Sudamérica y al sur de los Estados Unidos (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). A causa del uso repetido de herbicidas con el mismo mecanismo de acción, esta especie ha desarrollado biotipos resistentes a herbicidas inhibidores de la acetolactato sintasa (Valverde et al. 1993), inhibidores de acetil CoA carboxilasa (Leach et al. 1995), bipiridilos, glicinas (Lim y Ngim 2000) y dinitroanilinas (Mudge et al. 1984). Por lo anterior, es necesario detectar biotipos de *E. indica* resistentes a herbicidas para planear adecuadamente su manejo. Se estima que un área aproximada de 93,880 has en 4062 sitios está infestada con pata de gallina resistente a herbicidas en todo el mundo (Heap 2011). En Yecapixtla, Morelos, México la pata de gallina se encuentra presente en lotes de maíz producido por alrededor de 15 años bajo el sistema de labranza de conservación con porcentajes de control muy bajos con glifosato aplicado a dosis muy altas (6.48

kg de a.e. ha<sup>-1</sup>); por lo que se sospecha que ha desarrollado resistencia a este herbicida; por lo que el objetivo de este trabajo fue el de determinar la respuesta de diferentes poblaciones de pata de gallina al herbicida glifosato.

## MATERIALES Y MÉTODOS

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 urbana (Lote) y de una zona rural no abierta a cultivo (Saltillo) y en Yecapixtla, Morelos, México en un lote de maíz bajo labranza de conservación (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 de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”, donde se limpiaron por medio de un soplador de semillas y se almacenaron a temperatura ambiente.

Para determinar la respuesta al herbicida glifosato en las diferentes poblaciones de pata de gallina se realizó un ensayo de dosis-respuesta. Se colocaron 200 semillas de *E. indica* de las tres poblaciones en charolas de plástico negro rectangulares 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  $29 \pm 2$  °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 diferentes dosis de glifosato (0, 0.27, 0.54, 1.08, 2.16, 4.32, 8.64, 17.28 y 34.56 kg ae ha<sup>-1</sup>). La dosis comercial (1X) comúnmente utilizada es 1.08 kg ae ha<sup>-1</sup>. La aspersión se realizó con una cantidad de agua homologada de 200 l ha<sup>-1</sup> por medio de un equipo de aspersión manual a una presión de 275 kPa, con una boquilla Teejet 8001E; el ensayo se realizó dos veces. Después de 21 días del tratamiento con el glifosato las plantas se cortaron desde su base y se obtuvo su peso fresco. Los datos del peso fresco en las diferentes dosis del herbicida se analizaron por medio de regresión no lineal (Streibig et al., 1993, Seefeldt et al., 1995) utilizando el programa estadístico R, usando el paquete dcr (Ritz y Streibig, 2005), con el modelo log-logistic con cuatro parámetros.

$$F(\text{dosis}, (b, c, d, e)) = c + \frac{d - c}{1 + \exp(b(\log(\text{dosis}) - \log(e)))}$$

Los parámetros  $c$  y  $d$  se refieren a las asíntotas inferior y superior de la curva. El parámetro  $e$  es el punto de inflexión y el parámetro  $b$  es la pendiente a la dosis donde intercepta  $e$ . Se realizaron pruebas de ajuste al modelo comparándolo con un modelo lineal ANVA con una prueba de falta de ajuste a la vez con una prueba F y una prueba de razón de verosimilitud. El nivel de

resistencia relativa se expresa como la relación de la  $I_{50}$  de la población que se cree es resistente sobre la  $I_{50}$  de la población susceptible (Beckie et al., 2000).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron los parámetros del modelo log-logistic por medio del software estadístico R, pudiéndose observar que los valores de los parámetros  $b$ ,  $c$ ,  $d$  y  $e$  son muy similares para las poblaciones de Lote y Aguacate (Cuadro 1); no así para la localidad Saltillo. Para la prueba de falta de ajuste se realizaron dos pruebas, la prueba F y la prueba de razón de verosimilitud, teniendo que para las localidades de Lote y Aguacate ambas pruebas mostraron ajuste. La localidad de Saltillo, no ajustó con la prueba de F pero mostró el mismo valor que para la prueba de razón de verosimilitud de las otras localidades, por lo que se aceptó el ajuste del modelo (Cuadro 1). Se calcularon las dosis efectivas donde la inhibición en el crecimiento se producía ( $I_{10}$ ,  $I_{50}$  e  $I_{90}$ ), las  $I_{10}$  e  $I_{50}$  de la localidad Aguacate fueron ligeramente superiores a las de Lote y Saltillo, sin embargo fueron suficientes para no ser efectivos en el control de *E. indica* en maíz en labranza de conservación en el estado de Morelos. Los índices de resistencia encontrados en biotipos resistentes de *Eleusine indica* se reportan desde 1.33 a 4.75X (Baerson, 2002; Ng, 2004, Kaundum, 2008; Yuan, 2005) que son similares a los encontrados de la localidad Aguacate con respecto al Lote (1.08X) y con Saltillo (1.01X). Normalmente glifosato controla la pata de gallina en la dosis comercial (1.08 kg a.e. ha<sup>-1</sup>) del 65 al 90 % (Culpepper et al., 2000, Clewis et al., 2008). Se compararon las  $I_{90}$ , donde las poblaciones de Lote y Aguacate tuvieron valores de 0.5449 y 0.6085 respectivamente; siendo

estos bajos con respecto a la población de Saltillo cuya fue  $I_{90}$  de 1.4202, viéndose reflejado en las dosis necesaria para controlar completamente *E. indica* en condiciones de invernadero que fue de 34.56 kg a.e. ha<sup>-1</sup>.

Se presento el fenómeno de hormesis en dos poblaciones; en Lote y Aguacate en la dosis de 0.27 kg de a.e. ha<sup>-1</sup> de glifosato tuvieron mayor peso fresco que su testigo después de 21 días de aplicación y se volvió a presentar en Lote con la dosis de 1.08 kg de a.e. ha<sup>-1</sup> que presento mayor peso que la dosis anterior (Figura 1). La hormesis es una relación en la dosis respuesta caracterizada por una estimulación a bajas dosis y una inhibición a altas dosis (Calabrese et al., 2003). El glifosato es hormetico en una variedad de plantas (Warger et al., 2003; Schabenberger et al., 1999), pues se ha reportado que promueve el crecimiento en la cebada a dosis menores a 60 g a.e. ha<sup>-1</sup> (Cedergreen, 2008).

Otro fenómeno observado en plantas de *Eleusine indica* aplicadas con glifosato fue el rebrote; para la población de Lote la dosis de 1.08 kg a.e. ha<sup>-1</sup>, tuvo 16.7% de plantas con rebrote a 1.08 kg a.e. ha<sup>-1</sup>; el mismo porcentaje de rebrote lo tuvo la población Aguacate pero en la dosis de 0.27 kg a.e. ha<sup>-1</sup>. El mayor porcentaje de rebrote lo tuvo la población de Saltillo a una dosis de 0.54 kg a.e. ha<sup>-1</sup> con 83.3% de plantas con rebrotes y en la dosis de 1.08 kg a.e. ha<sup>-1</sup> con 16.7% (Figura 2). La evidencia de rebrotes hace pensar que las dosis reducidas del herbicida estimularon la producción de nuevos brotes en las plantas. La hormesis también inhibe el efecto del herbicida a dosis altas, lo que le permitió a la población de Saltillo rebrotar y soportar mayor cantidad de

glifosato que las poblaciones de Lote y Aguacate, sin embargo, la determinación de la resistencia está dada por los valores de la  $I_{50}$ .

La mortalidad fue diferente en las plantas aplicadas con glifosato, ya que para las poblaciones de Lote y Aguacate se tuvo una mortalidad de 100 % a 2.16 kg a.e.  $ha^{-1}$ . Mientras que para la localidad Saltillo, la mortalidad al 100% se presentó en la dosis de 34.56 kg a.e.  $ha^{-1}$  (Figura 3). Se volvió a presentar hormesis, ya que para las dosis de 8.64 y 17.28 kg a.e.  $ha^{-1}$  los porcentajes de mortalidad bajaron de 83 al 16%, presentándose así inhibición a dosis altas de glifosato en la población de Saltillo.

### **CONCLUSIONES**

Los índices de resistencia encontrados para la localidad de Aguacate de Yecapixtla, Morelos aunque bajos (1.08 y 1.01X) demuestran la resistencia que ha desarrollado *E. indica* a glifosato y explican la falta de control del herbicida. Se presentó el fenómeno de hormesis manifestado por el aumento de la biomasa en dosis bajas y en la inhibición de la acción del glifosato ya que se produjeron rebrotes en todas las localidades y porcentajes de mortalidad reducidos en dosis altas del herbicida.

### **AGRADECIMIENTOS**

Los autores agradecen al M.C. Fidel Maximiano Peña Ramos por su apoyo en el análisis de datos de la investigación.

## BIBLIOGRAFÍA

- Baerson S R, D J Rodriguez, N A Biest, M Tran, J You, R W Kreuger, G M Dill, J E Pratley, K J Gruys (2002)** Investigating the mechanism of glyphosate resistance in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*). *Weed Sci.* 50:721-730.
- Beckie H J, I M Heap, R J Smedad, L M. Hall (2000)** Screening for herbicide resistance in weeds. *Weed Tech.* 14 (2):428 - 445.
- Calabrese E J, L A Balwin (2003)** Hormesis: the dose – response revolution. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.* 43: 175 – 197.
- Cedergreen, N (2008)** Is the growth stimulation by low doses of Glyphosate sustained over time?. *Environmental Pollution* 156 (3): 1099-1104.
- Clewis S B, D K Miller, C H Koger, T A Baughman, A J Price, D. Porterfield, J W Wilcut (2008)** Weed management and crop response with Glyphosate, S- metolachlor, Trifloxysulfuron, Prometryn and MSMA in Glyphosate – resistant cotton. *Weed Technology* 22:160-167.
- Culpepper A S, A C York, R B Batts, K M Jennings (2000)** Weed Management in Glufosinate and Glyphosate – Resistant Soybean (*Glycine max*). *Weed Technology* 14(1):77 – 88.
- Heap I (2011)** International Survey of herbicide Resistant Weeds. Disponible en: <http://www.weedscience.org/In.asp> (agosto 2011).
- Holm L G, D L Plucknett, J V Pancho, J P Herberger (1977)** The World's Worst Weeds—Distribution and Biology. Honolulu: The University Press of Hawaii. pp. 47–53.
- Kaundun S S, I A Zelaya, P D Richard, A J Lycett, P Carter, K R Sharples, E McIndoe (2008)** Importance of the P106S Target-Site Mutation in Conferring Resistance to Glyphosate in a Goosegrass (*Eleusine indica*) Population from the Philippines. *Weed Science.* 56(5): 637-646.
- Leach G E, M D Devine, R C Kirkwood, 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, J Ngim (2000)** A first report of glyphosate-resistant goosegrass [*Eleusine indica* (L.) Gaertn] in Malaysia. *Pest Manag. Sci.* 56: 336–339.
- Mudge L C, B J Gossett, T R Murphy (1984)** Resistance of goosegrass (*Eleusine indica*) to dinitroaniline herbicides. *Weed Sci.* 32:591–594.
- Moss S R (1995)** Techniques for determining herbicide resistance. *Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference - Weeds*, 547-556.
- Ng, C H, W Ratnam, S Surif, B S Ismail (2004)** Inheritance of glyphosate resistance in goosegrass (*Eleusine indica*). *Weed Science*, 52:564-570.
- Owen M D K, I A Zelaya (2005)** Herbicide-resistant crops and weed resistance to herbicides. *Pest Manag. Sci.* 61:301-311.
- Ritz C, J C Streibig (2005).** Bioassay analysis using R. *Journal of Statistical Software* 12(5):1-22.
- Schabenberger O, B E Tharp, J J Kells, D Penner (1999).** Statistical tests for hormesis and effective dosages in herbicide dose response. *Agron. J.* 91: 713-721.
- Seefeldt S S , J E Jensen, E P Fuerst (1995)** Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationships. *Weed Technol* 9:218–227.
- Streibig J C, M Rudemo, J E Jensen (1993)** Dose-response curves and statistical models. p. 355 in J. C. Streibig and P. Kudsk, eds. *Herbicide Bioassays*. CRC Press. Boca Raton, FL,
- Valverde B E, L Chaves, J Gonzales, 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.
- Villaseñor J L, F J Espinosa García (1998)** *Catalogo de malezas de México*. Ediciones Científicas Universitarias, UNAM, Consejo Consultivo Fitosanitario y Fondo de Cultura Económica, México.
- Wagner R, M Kogan, A M Parada (2003).** Phytotoxic activity of root absorbed glyphosate in corn seedlings (*Zea mays* L.). *Weed Biol. Manag.* 3: 228-232.

**Yuan C I, Y C Hsieh, M Y Chiang (2005)** Glyphosate-resistant goosegrass in Taiwan: cloning of target enzyme (EPSPS) and molecular assay of field populations. *Plant Prot. Bull.* 47:251-261.

## CUADROS

Cuadro 1. Parámetros del modelo log-logistic de las curvas de dosis-respuesta de *E. indica* a glifosato, pruebas de falta de ajuste, dosis efectivas e índices de resistencia para las poblaciones de Lote, Aguacate y Saltillo.

Localidad	Parámetros del modelo log-logistic		Prueba de falta de ajuste			Dosis efectivas		Índice de resistencia	
			Prueba F		Razón de verosimilitud				
			Valor de F	Pr(>F)					
Lote	b	21.8267	0.1396	0.9664	0.9553	$I_{10}$	0.4420		
	c	0.0339				$I_{50}$	0.4843		
	d	2.3182				$I_{90}$	0.5449		
	e	2.9407							
Aguacate	b	21.8201	0.1398	0.9664	0.9553	$I_{10}$	0.4516	1.02 Lote	2.1 Saltillo
	c	0.0339				$I_{50}$	0.5242	1.08 Lote	1.01 Saltillo
	d	2.3182				$I_{90}$	0.6085		
	e	2.9407							
Saltillo	b	5.0924	0.6972	0.6284	0.9553	$I_{10}$	0.2148	2.6 Lote	2.33 Aguacate
	c	0.1153				$I_{50}$	0.5164		
	d	3.4627				$I_{90}$	1.4202		
	e	2.8413							

## FIGURAS

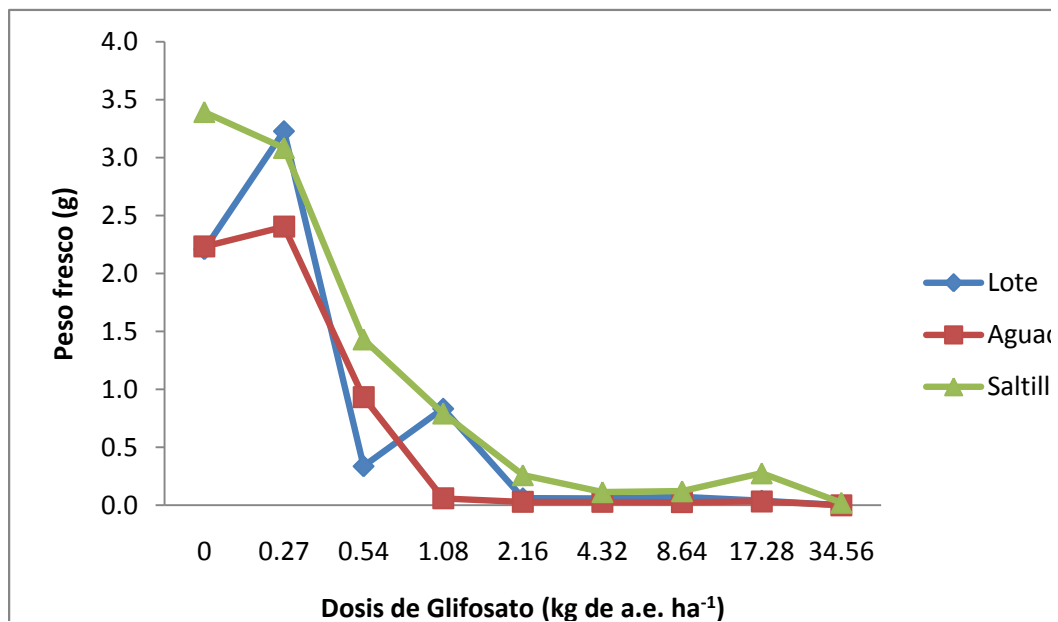


Figura 1. Peso fresco (g) de *Eleusine indica* de las localidades Lote, Aguacate y Saltillo a 21 días después de tratamiento con diferentes dosis de glifosato.



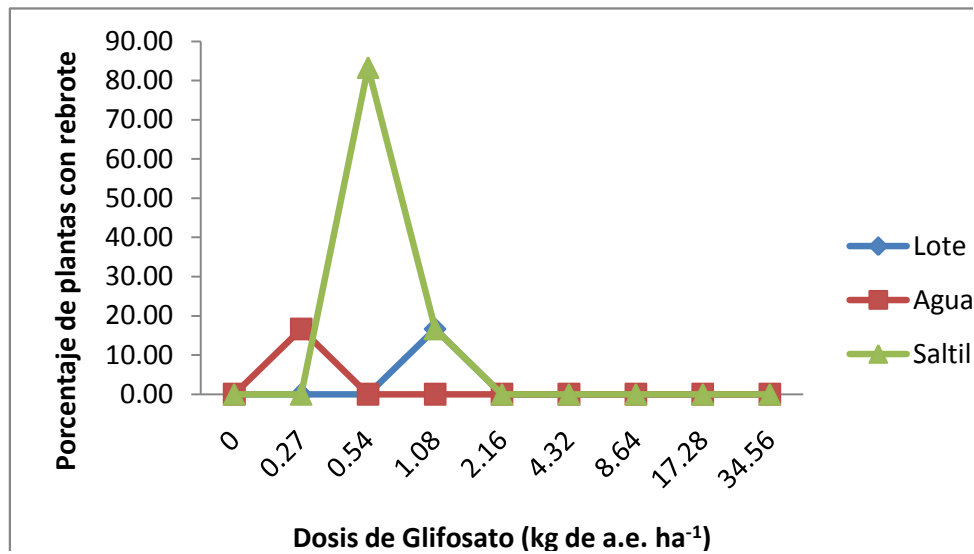


Figura 2. Porcentaje de plantas de *Eleusine indica* con presencia de rebrotes después de 21 días de aplicación de diferentes dosis de Glifosato.

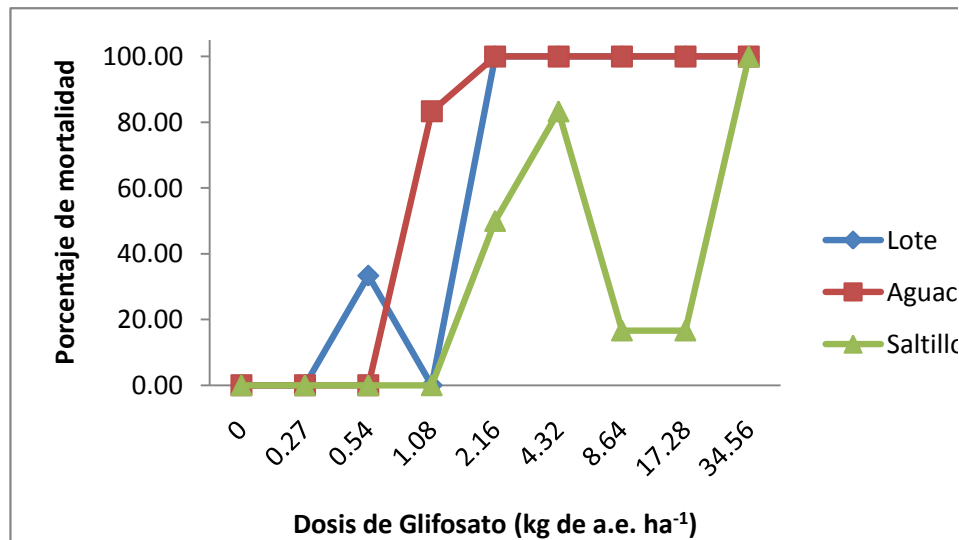


Figura 3. Porcentaje de mortalidad de *Eleusine indica* después de 21 días de aplicación de diferentes dosis de Glifosato.

## ARTICULO II

**ENZIMA 5-ENOLPIRUVIL-SHIKIMATO-3-FOSFATO SINTETASA MUTADA  
DEL PASTO PATA DE GALLINA (*Eleusine indica* (L.) Gaertn)**

**ENZYME 5-ENOLPIRUVIL-SHIKIMATO-3-FOSFATO SINTETASA MUTATED  
FROM GOOSEGRASS (*Eleusine indica* (L.) Gaertn)**

**Luis A. Aguirre Uribe<sup>1\*</sup>, Enrique Rosales Robles<sup>2</sup>, Pedro A. Cerda García<sup>1</sup>,  
Jerónimo Landeros Flores<sup>1</sup>, Ernesto Cerna Chávez<sup>1</sup> y Alberto Flores  
Olivas<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. 25315, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. <sup>2</sup>Campo Experimental Río Bravo, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Forestales y Pecuarias (INIFAP). Carretera Matamoros-Reynosa Km. 61. 88900. Río Bravo, Tamaulipas, México.

\*Autor para correspondencia (luisaguirreu@yahoo.com.mx)

**ENZIMA 5-ENOLPIRUVIL-SHIKIMATO-3-FOSFATO SINTETASA MUTADA  
DEL PASTO PATA DE GALLINA (*Eleusine indica* (L.) Gaertn)**

**ENZYME 5-ENOLPIRUVIL-SHIKIMATO-3-FOSFATO SINTETASA MUTATED  
FROM GOOSEGRASS (*Eleusine indica* (L.) Gaertn)**

**RESUMEN**

Se ha encontrado que las aplicaciones de glifosato por más de 15 años sobre el pasto *Eleusine indica* en Yecapixtla, Morelos desarrollado resistencia al herbicida. Se compararon los resultados de las secuenciaciones de ADN del gen de la 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintetasa de los biotipos susceptibles y biotipo resistente de la maleza pata de gallina. Se encontró una triple sustitución (Leu107Met, Ser110Ala y Met104Asn) en la enzima EPSPS del biotipo resistente de *Eleusine indica* (L.) de Yecapixtla, Morelos. Estas sustituciones modifican el efecto del glifosato sobre la maleza en campo. Se determinó una cuádruple y doble sustitución de aminoácidos en la enzima EPSPS de los biotipos susceptibles de Coahuila, Saltillo (Gln103Pro, Met99Lis, Ser95Fen y Ser94Tre) y Lote (Leu107Met o Leu107Ile y Lis112Asn) que no modifican la susceptibilidad de *Eleusine indica* al glifosato.

**Palabras clave:** Resistencia a glifosato, mecanismos de resistencia, glifosato, pata de gallina, herbicidas.

## SUMMARY

It was found that glyphosate applications for over 15 years on goosegrass in Yecapixtla, Morelos developed resistance to the herbicide. It was compared the results of DNA sequencing of the gene for 5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase biotypes susceptible and resistant biotype of goosegrass. It was a triple substitution (Leu107Met, Ser110Ala and Met104Asn) in EPSPS enzyme resistant biotype of *Eleusine indica* (L.) Yecapixtla, Morelos. These substitutions modify the effect of glyphosate on the weeds in the field. It determined a quadruple and double amino acid substitution in EPSPS enzyme susceptible biotypes of Coahuila, Saltillo (Gln103Pro, Met99Lis, Ser95Fen and Ser94Tre) and Lote (Leu107Met or Leu107Ile and Lis112Asn) that do not alter the susceptibility of goosegrass to glyphosate.

**Index words:** Resistance to glyphosate, resistance mechanisms, glyphosate, goosegrass, herbicides.

## INTRODUCCIÓN

El pasto pata de gallina (*Eleusine indica* (L.) Gaertn) es una planta anual que está ampliamente distribuida en los trópicos, particularmente en Asia, África, Sudamérica y al sur de los Estados Unidos (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). En Yecapixtla, Morelos, México la pata de gallina se encuentra presente en lotes de maíz producido por alrededor de 15 años bajo el sistema de labranza de conservación con porcentajes de control muy bajos con glifosato aplicado a dosis muy altas (6.48 kg de a.e. ha<sup>-1</sup>). Los índices de resistencia encontrados para la localidad de Aguacate de Yecapixtla, Morelos aunque bajos (1.08X y 1.01X) demuestran la resistencia que ha desarrollado *E. indica* a glifosato y explican la falta de control del herbicida. 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 atribuyó a un gene 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), por lo que el objetivo de este trabajo fue el de determinar cambios en el gen que codifica la EPSPS de pata de gallina.

## MATERIALES Y MÉTODOS

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 urbana (Lote) y de una zona rural no abierta a cultivo

(Saltillo) y en Yecapixtla, Morelos, México en un lote de maíz bajo labranza de conservación (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 de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”, 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 de plástico negro rectangulares 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 kg ae  $\text{ha}^{-1}$ . La aspersion se realizó con una cantidad de agua homologada de 200 l  $\text{ha}^{-1}$  por medio de un equipo de aspersion manual a una presión de 275 kPa, con una boquilla Teejet 8001E.

Se uso el método de CTAB modificado para aislar el ADN genómico total (Doyle y Doyle, 1990) de muestras compuestas de 10 hojas frescas de cada localidad (2 localidades de Saltillo, Coahuila y Yecapixtla, Morelos). Para amplificar una región que contiene el sitio de la mutación de prolina a serina o treonina 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-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintetasa del GenBank (AJ417034).

La PCR 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 MgCl<sub>2</sub>, 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, seguido 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 de extensión final de 5 min a 72 °C.

Los productos amplificados fueron limpiados utilizando las enzimas exonucleasa y fosfatasa alcalina de camarón y se secuenciaron utilizando el equipo Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems). Solo las cadenas reversas fueron secuenciadas. Todas las secuencias se alinearon y se compararon con BLAST (Altschul et al., 2000) 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

Las secuencias de ADN del gen de la EPSPS de *Eleusine indica*, obtenidas de las localidades de Coahuila (Lote y Saltillo) y la de Morelos (Aguacate) fueron comparadas con las obtenidas por Ng et al. (2003) de un biotipo resistente de pata de gallina en Malasia. Heap (2011) reporta 4 biotipos resistentes de *E. indica* a glifosato (1 en Malasia, 1 en Colombia y 2 en Estados Unidos) de los cuales el biotipo de Malasia es el más documentado en cuanto al papel que juega la mutación en la enzima EPSPS en la posición del aminoácido 106, donde el cambio de prolina por serina o treonina le confiere resistencia al herbicida (Tran et al., 1999; Ng et al., 2003, Perez-Jones et al., 2007, Kaundum et al., 2008, Yuan et al., 2005), sin embargo, no se encontró mutaciones en esta posición.

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 encontró en la posición del nucleótido 878 donde cambio timina por adenina y la sustitución en el aminoácido fue de leucina por metionina (Leu107Met). La última sustitución de aminoácidos en la enzima EPSPS fue en el sitio 110



donde cambio de serina por alanina (Ser110Ala) por los cambios en los nucleótidos 887 donde se cambio adenina por guanina, en el 888 por un cambio de guanina por citosina y en el 889 donde se cambio citosina por guanina.

En las secuenciaciones del gen de la EPSPS de los biotipos susceptibles originarios de Coahuila, el biotipo Saltillo presento 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 presento 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 po citosina.

En la secuenciación del gen de la EPSPS del biotipo Lote, se presentaron dos puntos de mutación, en la posición del nucleótido 878 se presento un cambio de timina por adenina y en la posición 880 la secuenciación marco K del lenguaje FASTA lo que indica un cambio por guanina o timina, lo que muestra una posible sustitución en el sitio 107 donde el cambio fue de leucina por metionina o isoleucina (Leu107Met o Leu107Ile), que en el primer caso coincide con una de la mutaciones presentadas en la secuenciación del gen de la EPSPS del biotipo resistente de pata de gallina de Yecapixtla, Morelos. En el segundo cambio encontrado fue 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).

El glifosato tiene numerosos sitios de enlaces con la EPSPS, como lo demostró Schönbrunn et al. (2001), quien identificó enlaces de tipo iónico y de hidrogeno entre aminoácidos y glifosato en la EPSPS de *Escherichia coli* incluyendo Lis22, Gli96, Arg121, Gln171, Arg344, Arg386 y Lis411; así, una sustitución en Gli96 en *E. coli* se ha demostrado que confiere resistencia al glifosato (Padgett et al., 1991; Eschenberg et al., 2002). Se han identificado mutaciones adicionales Thr42Met, Thr97Ile y Ala183Thr que producen una EPSPS resistente al glifosato (He et al., 2003; Pline-Srnic, 2005;. Kahrizi et al., 2007).

Las dobles sustituciones en Lis22 y Lis411 inactivaron totalmente la EPSPS de *E. coli* (Shuttleworth et al., 1999), como la que Padgett et al. (1991) construyó Gly96Ala y Pro101Ser en *E. coli*, la enzima resultante fue altamente resistente al glifosato. Otra doble sustitución en maíz transgénico, Thr102Ile y Pro106Ser, produjo una enzima 100 veces resistente al glifosato (CaJacob et al., 2007), esta enzima se utilizó en un principio en algunas líneas de maíz transgénico.

Las mutaciones en la enzima EPSPS por sustitución de aminoácidos que le confieren resistencia a glifosato, también tienen diferentes respuestas con sus sustratos. La sustitución Gly96Ala creada en *E. coli* produce una EPSPS con resistencia al glifosato a más de 500 veces. Sin embargo, esta sustitución resulta en treinta veces la reducción en la afinidad por el fosfoenolpiruvato

(PEP) (Padgett et al., 1991; Eschenberg et al., 2002). La sustitución Thr42Met en la enzima EPSPS en *E. coli* es resistente al glifosato a más de veinte veces, pero al igual que la sustitución Gly96Ala, esto la reducción en la afinidad por el PEP (He et al., 2003). La afinidad reducida al PEP asociados con estas sustituciones de aminoácidos sugiere que son mucho menos propensos a ser seleccionados en las poblaciones naturales que las sustituciones en Pro106.

Los bajos niveles de resistencia del biotipo resistente a glifosato de *Eleusine indica*, de Yecapixtla, Morelos (1.08 y 1.01X); como los encontrados por Kaundum et al. (2008) en Filipinas (1.33X) y Baerson et al. (2002) en Malasia (2 – 4 X), en los que el mecanismo de resistencia involucrado es el del sitio objetivo alterado, lo que hace inferir que las mutaciones puntuales encontradas en el ADN del gen de la EPSPS son las responsables de la respuesta de la pata de gallina al glifosato. Además, se confirma que el gen de la EPSPS es polimórfico y se pueden dar diferentes mutaciones en este, pero que no necesariamente provocan resistencia a glifosato.

## CONCLUSIONES

Se encontró una triple sustitución de aminoácidos (Leu107Met, Ser110Ala y Met104Asn) en la enzima EPSPS del biotipo resistente de *Eleusine indica* (L.) de Yecapixtla, Morelos por el uso continuo de más de 15 años del herbicida glifosato en maíz de labranza de conservación, que le confiere resistencia a glifosato.

Se determinó una cuádruple y doble sustitución de aminoácidos en la enzima EPSPS de los biotipos susceptibles de Coahuila, Saltillo (Gln103Pro, Met99Lis, Ser95Fen y Ser94Tre) y Lote (Leu107Met o Leu107Ile y Lis112Asn) que no modifican la susceptibilidad de *Eleusine indica* al glifosato.

### AGRADECIMIENTOS

Se le agradece al Dr. Raúl Rodríguez Herrera por su generosa ayuda en la realización técnica del presente trabajo de investigación.

### BIBLIOGRAFÍA

- Adam J, J Ngim, B Bakar, Z Alias (2010)** Preliminary findings of potentially resistant goosegrass (*Eleusine indica*) to glufosinate-ammonium in Malaysia. *Weed Biology and Management* 10(4):256-260
- 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.
- Brosnan J T, R K Nishimoto, J DeFrank (2008)** Metribuzin-resistant goosegrass (*Eleusine indica*) in bermudagrass turf. *Weed technology* 22:675- 678.
- Baerson S R, D J Rodriguez, M Tran, Y Feng, N A Biest, G M Dill (2002)** Glyphosate-resistant goosegrass. Identification of a mutation in the target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *Plant Physiol.*, 129: 1265-1275.
- CaJacob C A, P.C.C. Feng, S E Reiser, S R Padgett (2007)** Genetically modified herbicide resistant crops. In: *Modern Crop Protection Compound*, Krämer W., Schimer V., eds. Weinheim, Wiley – UCH pp 283 -302.

- Doyle J J, J L Doyle (1990)** Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-15.
- Eschenburg S, M L Healy, M A Priestman, G H Lushington, E Schönbrunn (2002)** How the mutation glycine96 to alanine confers glyphosate insensitivity to 5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase from *Escherichia coli*. *Planta* 216:129-135.
- Franz J E, M K Mao, J A Sikorski (1997)** Glyphosate: A Unique Global Herbicide. American Chemical Society, Washington DC.
- Haslam E (1993)** Shikimic Acid: Metabolism and Metabolites. John Wiley Sons, Chichester.
- He, M, Y. Fang, P. Xu (2003)** A T42M substitution in bacterial 5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) generates enzymes with increased resistance to glyphosate. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67(6): 1405-1409.
- Heap I (2011)** International Survey of herbicide Resistant Weeds. Disponible en: <http://www.weedscience.org/In.asp> (agosto 2011).
- Holm L G, D L Plucknett, J V Pancho, J P Herberger (1977)** The World's Worst Weeds—Distribution and Biology. Honolulu: The University Press of Hawaii. pp. 47–53.
- Kahrizi D, A Salmanian, A Afshari, A Moieni, A Mousavi (2007)** Simultaneous substitution of Gly96 to Ala and Ala183 to Thr in 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene of *E. coli* (k12) and transformation of rapeseed (*Brassica napus* L.) in order to make tolerance to glyphosate. *Plant Cell Rep* (2007) 26: 95–104
- Kaundun S S, I A Zelaya, P D Richard, A J Lycett, P Carter, K R Sharples, E McIndoe (2008)** Importance of the P106S Target-Site Mutation in Conferring Resistance to Glyphosate in a Goosegrass (*Eleusine indica*) Population from the Philippines. *Weed Science.* 56(5): 637-646.
- Leach G E, M D Devine, R C Kirkwood, 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, J Ngim (2000)** A first report of glyphosate-resistant goosegrass [*Eleusine indica* (L.) Gaertn] in Malaysia. *Pest Manag. Sci.* 56: 336–339.
- Mudge L C, B J Gossett, T R Murphy (1984)** Resistance of goosegrass (*Eleusine indica*) to dinitroaniline herbicides. *Weed Sci.* 32:591–594.
- Moss S R (1995)** Techniques for determining herbicide resistance. *Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference - Weeds*, 547-556.
- Ng C H, W Ratnam, S Surif, B S Ismail (2004)** Inheritance of glyphosate resistance in goosegrass (*Eleusine indica*). *Weed Science*, 52:564-570.
- Padgett S R, D B Re, C S Gasser, D A Eichholtz, R B Fraizer, C M Hironaka, E B Levine, D M Shah, R T Fraley, G M Kishore (1991)** Site-directed mutagenesis of a conserved region of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase active site. *J. Biol. Chem.* 266: 22364-22369.
- Perez-Jones, A, K W Park, J Colquhoun, C A Mallory-Smith, D Shaner (2005)** Glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) from Oregon. *Weed Sci.* 53: 775-779.
- Pline-Srnic W.(2005)** Technical performance of some commercial glyphosate-resistant crops. *Pest Management Science*, 61: 225–234.
- Schönbrunn E, Eschenburg S, Shuttleworth WA, Schloss JV, Amrhein N, Evans JNS, Kabsch W (2001)** Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 1376–1380
- Shuttleworth WA, Pohl ME, Helms GL, Jakeman DL, Evans JNS (1999)** Site-directed mutagenesis of putative active site residues of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *Biochemistry* 38: 296–302
- Villaseñor J L, F J Espinosa (1998)** *Catalogo de malezas de México.* Ediciones Científicas Universitarias, UNAM, Consejo Consultivo Fitosanitario y Fondo de Cultura Económica, México.

**Yuan C I, Y C Hsieh, M Y Chiang (2005)** Glyphosate-resistant goosegrass in Taiwan: cloning of target enzyme (EPSPS) and molecular assay of field populations. *Plant Prot. Bull.* 47:251-261.

## CONCLUSIONES GENERALES

Esta investigación demostró que la resistencia de la maleza pata de gallina a glifosato, se desarrolló en la producción de maíz bajo el sistema de labranza de conservación en un biotipo del estado de Morelos, por la falta de rotación de herbicidas con diferente modo de acción. Los índices de resistencia a glifosato del biotipo resistente fueron muy bajos con respecto a los biotipos susceptibles (1.01X y 1.08X), pero son suficientes para una marcada falta de control en campo.

Los estudios en la secuenciación del gen que codifica la enzima EPSPS del biotipo resistente y los biotipos susceptibles, mostraron mutaciones puntuales cerca de la mutación reportada para *Eleusine indica* (L.) Gaertn de un biotipo resistente a glifosato de Malasia.

Las diferencias en la eficiencia del glifosato podrían estar relacionadas con las mutaciones en la enzima EPSPS de los diferentes biotipos de pata de gallina.



## 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
- Baerson, S. R., D. Rodriguez, M. Tran, Y. Feng, N. A. Biest, G. M. Dill. 2002a. Glyphosate-resistant goosegrass. Identification of a mutation in the target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *Plant. Physiol.* 129:1265-1275.
- Baerson, S. R., D. J. Rodriguez, N. A. Biest, M. Tran, J. You, R. W. Kreuger, G. M. Dill, J. E. Pratley, K. J. Gruys. 2002b. Investigating the mechanism of glyphosate resistance in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*). *Weed Sci.* 50:721-730.
- Baylis, A. 2000. Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weaknesses and prospects. *Pest Manag. Sci.* 56:299-308.
- Bradshaw, L. D., S. R. Padgett, S. L. Kimball, B. H. Wells. 1997. Perspectives on glyphosate resistance. *Weed Technol.* 11:189-198.
- Brosnan, J.T., Nishimoto, R.K. y J. DeFrank. 2008. Metribuzin-resistant goosegrass (*Eleusine indica*) in bermudagrass turf. *Weed technology* 22:675- 678.
- Caseley, J. C. and D. Coupland. 1985. Environmental and plant factors affecting glyphosate uptake, movement and activity. Pages 92-123 in E. Grossbard and D. Atkinson, eds. *The herbicide glyphosate*. London, England: Butterworths.
- 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).
- Culpepper, A. S., T. L. Grey, W. K. Vencill, J. M. Kichler, T. M. Webster, S. M. Brown, A. C. York, J. W. Davis, and W. W. Hanna. 2006. Glyphosate resistant palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) confirmed in Georgia. *Weed Sci.* 54:620-626.

- Délye, C., X. Q. Zhang, S. Michel, A. Matějček, and S. Powles. 2005. Molecular bases for sensitivity to Acetyl-Coenzyme A carboxylase inhibitors in black grass. *Plant physiol.* 137:794-806.
- De Prado, R. A. and A. R. Franco. 2004. Cross-resistance and herbicide metabolism in grass weeds in Europe: biochemical and physiological aspects. *Weed Sci.* 52:441-447.
- Devine, M. D. and C. Preston. 2000. The molecular basis of herbicide resistance. Pages 72-104 in A. H. Cobb and R. C. Kirkwood, eds. *Herbicides and their mechanisms of action*. Boca Raton, FL: CRC Press, Inc.
- Devine, M. and A. Shukla. 2000. Altered target sites as a mechanism of herbicide resistance. *Crop Prot.* 19:881-889.
- Dinelli, G., I. Marotti, A. Bonetti, M. Minelli, P. Catizone, and J. Barnes. 2006. Physiological and molecular insight on the mechanisms of resistance to glyphosate in *Conyza canadensis* (L.) Cronq. biotypes. *Pest Biochem. Physiol.* 86:30-41.
- Duke, S. O., S. R. Baerson, and A. M. Rimando. 2003. Glyphosate. *Encyclopedia of agrochemicals*. John Wiley & Sons, Inc. (<http://www.interscience.wiley.com> consultado 16 de marzo de 2009).
- Dyer, W. E. 1994. Resistance to glyphosate. Pages 229-242 in S. B. Powles and J. A. M. Holtum, eds. *Herbicide resistance in plants: biology and biochemistry*. Boca Raton, FL: CRC Press, Inc.
- 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.
- Feng, P. C. C., J. E. Pratley, J. A. Bohn. 1999. Resistance to glyphosate in *Lolium rigidum*. II. Uptake, translocation, and metabolism. *Weed Sci.* 47:412-415.

- Feng, P. C. C., M. Tran, T. Chiu, R. D. Sammons, G. R. Heck, and C. A. Cajacob. 2004. Investigations into glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*): retention, uptake, translocation, and metabolism. *Weed Sci* 52:498-505.
- Figliola, S. S., N. D. Camper y W. H. Ridings. 1988. Potential Biological Control Agents for Goosegrass (*Eleusine indica*). *Weed Science* 6:830-835
- Franz, J. E., M. K. Mao, J. A. Sikorski. 1997. Glyphosate: a unique global herbicide. ACS Monograph 189, American Chemical Society, Washington, DC USA.
- Gagne, R. J. 1985. A taxonomic revision of the Asian Rice Gall Midge, *Orselia oryzae* (Wood-Mason) and its relatives (Diptera: Cecidomiidae). *Entomography* 3: 127-162
- Geiger, D. R. and M. A. Fuchs. 2002. Inhibitors of aromatic amino acid biosynthesis (glyphosate). Pages 59-85 in P. Böger, K. Wakabayashi, and K. Hirai, eds. *Herbicide Classes in Development*. Berlin: Springer-Verlag.
- Gronwald, J. W. 1994. Resistance to photosystem II inhibiting herbicides. Pages 27-60 in S. B. Powles and J. A. M. Holtum, eds. *Herbicide resistance in plants: biology and biochemistry*. Boca Raton, FL: CRC Press, Inc.
- Heap, I. 2011. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. (<http://www.weedscience.org/In.asp> consultado 6 de diciembre de 2011)
- 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>
- Hess, F. D. 1985. Herbicide absorption and translocation and their relationship to plant tolerances and susceptibility. Pages 191-214 in S. O. Duke, ed. *Weed physiology*. Vol II. *Herbicide physiology*. Boca Raton, FL: CRC Press, Inc.
- 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.
- 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.
- Holt, J. S., S. B. Powles, and J. A. M. Holtum. 1993. Mechanisms and agronomic aspects of herbicide resistance. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 44:203-229.
- Jasieniuk, M. 1995. Constraints on the evolution of glyphosate resistance in weeds. *Resist. Pest. Manag. News* 7:31-32.
- 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. and D. M. Shah. 1988. Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. *Annu. Rev. Biochem.* 57:627-663.
- Koger, C. H., D. H. Poston, R. M. Hayes, and R. F. Montgomery. 2004. Glyphosate-resistant horseweed in Mississippi. *Weed Technol.* 18:820-825.
- Koger, C. H. and K. N. Reddy. 2005. Role of absorption and translocation in the mechanism of glyphosate resistance in horseweed (*Conyza canadensis*). *Weed Sci.* 53:84-89.
- 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.
- Lee, L. J. and J. Ngim. 2000. A first report of glyphosate-resistant goosegrass (*Eleusine indica* (L) Gaertn) in Malaysia. *Pest Manag. Sci.* 56:336-339.

- 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.
- Lorraine-Colwill, D. F., S. B. Powles, T. R. Hawkes, P. H. Hollinshead, S. A. J. Warner, and C. Preston. 2003. Investigations into the mechanism of glyphosate resistance in *Lolium rigidum*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 74:62- 72.
- Main, C. L., T. C. Mueller, R. M. Hayes, and J. B. Wilkerson. 2004. Response of selected horseweed (*Conyza canadensis* (L.) Cronq.) populations to glyphosate. *J. Agric. Food Chem.* 52:879-883.
- 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., R. Wickneswari, S. Salmijah, Y. T. Teng, and B. S. Ismail. 2003. Gene polymorphisms in glyphosate-resistant and -susceptible biotypes of *Eleusine indica* from Malaysia. *Weed Res.* 43:108-115.
- Park, K. W., L. Fandrich, and C. A. Mallory-Smith. 2004. Absorption, translocation, and metabolism of propoxycarbazone-sodium in ALS inhibitor resistant *Bromus tectorum* biotypes. *Pestic. Biochem. Physiol.* 79:18-24.
- Perez, A. and M. Kogan. 2003. Glyphosate-resistant *Lolium multiflorum* in Chilean orchards. *Weed Res.* 43:12-19.
- Phillips, S. M . 1972. A Survey of the Genus *Eleusine* Gaertn. (Gramineae) in Africa. *Kew Bulletin.* Vol. 27, No. 2, pp. 251-270.
- Powles, S. B. and C. Preston. 2006. Evolved glyphosate resistance in plants: biochemical and genetic basis of resistance. *Weed Technol.* 20:282-289.
- Powles, S. B., D. F. Lorraine-Colwill, J. J. Dellow, and C. Preston. 1998. Evolved resistance to glyphosate in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) in Australia. *Weed Sci.* 46:604-607.

- Pratley, J., P. Baines, P. Eberbach, M. Incerti, and J. Broster. 1996. Glyphosate resistance in annual ryegrass. Page 126 in J. Virgona and D. Michalk, eds. Proceedings of the 11th Annual Conference of the Grassland Society of New South Wales. The Grassland Society of New South Wales, Wagga Wagga, Australia.
- Pratley, J., N. Urwin, R. Stanton, P. Baines, J. Broster, K. Cullis, D. Schafer, J. Bohn, and R. Krueger. 1999. Resistance to glyphosate in *Lolium rigidum*. I. Bioevaluation. *Weed Sci.* 47:405-411.
- Preston, C. 2004. Herbicide resistance in weeds endowed by enhanced detoxification: complications for management. *Weed Sci.* 52:448-453.
- Preston, C. and C. A. Mallory-Smith. 2001. Biochemical mechanisms, inheritance, and molecular genetics of herbicide resistance in weeds. Pages 23-60 in S. Powles and D. Shaner, eds. Herbicide resistance and world grains. Boca Raton, FL: CRC Press, Inc.
- 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.
- 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.
- Schönbrunn, E., S. Eschenburg, W. A. Shuttleworth, J. V. Schloss, N. Amrhein, J. N. S. Evans, and W. Kabsch. 2001. Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. *PNAS.* 98:1376-1380.
- Sellers, B. A., J. M. Pollard, and R. J. Smeda. 2005. Two common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) biotypes differ in biology and response to glyphosate. *Proc. Weed Sci. Soc.* 45:156.
- Shaner, D. L. 2000. The impact of glyphosate-tolerant crops on the use of other herbicides and on resistance management. *Pest Manag. Sci.* 56:320-326.

- Siehl, D. L. 1997. Inhibitors of EPSPS synthase, glutamine synthetase and histidine synthesis. Pages 37-67 in R. M. Roe, J. D. Burton, and R. J. Kuhr, eds. *Herbicide Activity: Toxicology, Biochemistry and Molecular Biology*. Amsterdam: IOS Press.
- Simarmata, M., J. E. Kaufmann, and D. Penner. 2003. Potential basis of glyphosate resistance in California rigid ryegrass (*Lolium rigidum*). *Weed Sci.* 51:678- 682.
- Sispro. 2008. Situación actual y perspectivas del Maíz en México 1996 – 2012. 7 de diciembre de 2008. <http://www.maiz.gob.mx/index.php?portal=maiz>.
- Steinrücken, H. and N. Amrhein. 1980. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 94:1207-1212.
- Sterling, T. M. 1994. Mechanisms of herbicide absorption across plant membranes and accumulation in plant cells. *Weed Sci.* 42:263-276.
- Tran, M., S. Baerson, R. Brinker, L. Casagrande, M. Faletti, Y. Feng, M. Nemeth, T. Reynolds, D. Rodriguez, D. Shaffer, D. Stalker, N. Taylor, Y. Teng, and G. Dill. 1999. Characterization of glyphosate resistant *Eleusine indica* biotypes from Malaysia. Pages 527-536 in Proceedings 1 (B) of the 17th Asian-Pacific Weed Science Society Conference. The Asian-Pacific Weed Science Society, Bangkok, Thailand.
- Tranel, P. J. and T. R. Wright. 2002. Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned? *Weed Sci.* 50:700-712.
- Urbano, J. M., A. Borrego, V. Torres, C. Jimenez, J. M. Leon, and J. Barnes. 2005. Glyphosate-resistant hairy fleabane (*Conyza bonariensis*) in Spain. *Proc. Weed Sci. Soc. Amer.* 45:394.
- 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., J. Gressel, S. Passalacqua, and J. C. Rodriguez. 2007. The emerging problem of glyphosate-resistant Johnsongrass (*Sorghum halepense*) in Argentina: an account of detection, initial spread and collaborative action for its prevention and management. *Proc. Weed Sci. Soc. Amer.* 47:183.
- 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.
- VanGessel, M. J. 2001. Glyphosate-resistant horseweed from Delaware. *Weed Sci.* 49:703-705.
- 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.
- Wakelin, A. M., D. F. Lorraine-Colwill and C. Preston. 2004. Glyphosate resistance in four different population of *Lolium rigidum* is associated with reduced translocation of glyphosate to meristematic zones. *Weed Res.* 44:453-459.
- Wakelin, A.M. and C. Preston. 2006. A target-site mutation is present in a glyphosate-resistant *Lolium rigidum* population. *Weed Res.* 46:432-440.
- Woodburn, A. T. 2000. Glyphosate: production, pricing and use worldwide. *Pest Manag. Sci.* 56:309-312.
- Waterhouse, D. F. 1993. Biological control: Pacific prospects. Supplement 2. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra. 138 pp.
- Yamamoto, E., L. Zeng, and W. V. Baird. 1998.  $\alpha$ -tubulin missense mutation correlate with antimicrotubule drug resistance in *Eleusine indica*. *Plant Cell* 10:297-308.
- Yu, Q., A. Cairns, and S. Powles. 2007. Glyphosate, paraquat and ACCase multiple herbicide resistance evolved in a *Lolium rigidum* biotype. *Planta* 225:499- 513
- Zelaya, I. A. and M. D. K. Owen. 2005. Differential response of *Amaranthus tuberculatus* (Moq ex DC) JD Sauer to glyphosate. *Pest Manag. Sci.* 61:936- 950.