

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE
MALEZAS TOLERANTES A GLIFOSATO
EN LA ZONA ORIENTE DEL ESTADO DE
MORELOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
INGENIERA EN FITOSANITARIA

PRESENTA
CARMEN YAZMIN ROJAS CARDONA

DIRECTOR: DR. DAVID ANTONIO MORENO MEDINA
CODIRECTORA: DRA. YESSICA FLOR CERVANTES ADAME

AYALA, MORELOS

OCTUBRE 2023

AGRADECIMIENTOS

A Dios por su presencia y la oportunidad de tener a mi familia y a todos los que me apoyaron para poder culminar el periodo académico y este trabajo.

A mis papas por siempre impulsarme en salir adelante académicamente y darme esta valiosa herencia para resto de mi vida.

A mis tíos por haberme apoyado y recibirme en su casa y hacer que sea menos pesado económicamente todo este trayecto.

A los maestros del área, por cada enseñanza. Y específicamente a mi director y codirectora que me apoyaron a culminar este trabajo.

A cada maestro que me ayudó en el trayecto de la investigación.

A la Escuela de Estudios Superiores - UAEM por el esfuerzo constante por la educación.

A mis amigos y familiares por animarme y ayudarme. Y a mí ahora esposo por cerrar juntos este ciclo.

DEDICATORIA

Alberto Rojas Cedillo

Socorro Cardona Portugal

Para mis papas por el esfuerzo que han hecho para educarme y darme las herramientas para culminar este período académico y poder seguir adelante. Que gracias a Dios y por su ejemplo puedo culminar este período.

INDICE

Indice de cuadros	3
Indice de figuras.....	3
RESUMEN.....	5
I. INTRODUCCIÓN	7
II. OBJETIVOS E HIPOTESIS	9
2.1. Objetivo general	9
2.2. Objetivos específicos.....	9
2.3. Hipótesis.....	9
III. REVISIÓN DE LITERATURA	10
3.1. Importancia de las malezas en la agricultura	10
3.2. Efectos ambientales de los plaguicidas químicos	12
3.3. Efectos del glifosato al ambiente y a la salud.....	13
3.4. Resistencia a herbicidas.....	14
3.5. Mecanismo de resistencia de plantas a glifosato	16
3.6. Plantas resistentes a glifosato.....	17
3.7. Plantas modificadas genéticamente con tolerancia al glifosato.....	18
3.8. Regulación de OGM con resistencia a glifosato en México.....	19
IV. METODOLOGÍA.....	20
4.1. Muestreo	20
4.2. Extracción de ADN	21
4.3. Visualización y cuantificación del ADN.....	22
4.3.1. Visualización.....	22
4.3.2. Cuantificación del ADN.....	22
4.4. Amplificación de fragmentos por PCR (reacción en cadena de la polimerasa).....	23
4.4.1. Amplificación del gen <i>trn</i>	23
4.4.2. Amplificación del gen <i>epsps</i>	24
4.5. Purificación de productos de PCR de genes amplificados	25
4.6. Restricción enzimática.....	25
4.7. Secuenciación y análisis de secuencias para la identificación de las malezas.....	26

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
5.1. Colecta en campo	27
5.2. Integridad del ADN	30
5.3. Cuantificación del ADN extraído.....	30
5.4. Amplificación del gen trn	31
5.5. Cuantificación de la amplificación del gen trn.....	32
5.6. Amplificación del gen epsps	32
5.7. Análisis de restricción enzimática.....	33
5.8. Análisis <i>in Silico</i>	35
5.9. Análisis filogenético	37
VI. CONCLUSIONES	43
VII. RECOMENDACIONES	44
VIII. BIBLIOGRAFÍA	45

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Malezas colectadas en los campos agrícolas de la zona oriente del estado de Morelos (A y B repeticiones de cada muestra).	27
Cuadro 2. Cuantificación del ADN extraído.	31
Cuadro 3. Cuantificación de la amplificación del gen trn.	32

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 . Rendimiento del maíz (t ha ⁻¹) en diferentes períodos. C: con malezas y S: sin malezas, TC: tiempo de cosecha (Blanco y Leyva., 2014).....	11
FIGURA 2 Mecanismos de resistencia de plantas a herbicidas (Cruz-Hipólito et al., 2009).	14
FIGURA 3 Número de especies resistentes a herbicidas por su sitio de acción (Heap, 2019).	15
FIGURA 4 Mecanismo de acción y resistencia de glifosato (Duke y Powles, 2008).	17
FIGURA 5 <i>Leptochloa virgata</i> (Heap 2019).....	18
FIGURA 6 <i>Bidens pilosa</i> (Heap 2019).....	18
FIGURA 7 Permisos de liberación al ambiente de OGMs emitidos en México de 2005 a 2017, por cultivo, conforme a la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (LBOGM) (CIBIOGEM, 2019)	19
FIGURA 8 Sitios de colecta (municipios muestreados).....	20
FIGURA 9 Lecturas de absorbancia en Nanodrop. A: espectro de absorción, B: datos de rangos de absorbancia de las muestras.	22
FIGURA 10 Protocolo de amplificación por PCR para gen trn	23
FIGURA 11 Reacción de PCR realizado en el laboratorio de Genética del Tecnológico de Monterrey Campus Puebla. A: Termociclador, B: muestras para PCR, C: Mix para PCR.....	23
FIGURA 12 Electroforesis. A: cámara de electroforesis B: fuente de poder.	24
FIGURA 13 Protocolo de amplificación por PCR para gen epsps.....	24
FIGURA 14 Kit AxyPrep PCR cleanup 250-prep para purificación de muestras.	25
FIGURA 15 Visualización de la integridad del ADN extraído de las malezas colectadas.	30
FIGURA 16 Amplificación del gen trn en las malezas colectadas (MP: marcador de peso molecular 100pb).	31
FIGURA 17 Amplificación del gen epsps.	33
FIGURA 18 Producto de restricción enzimática con enzima Alu I con marcador de 100 pb.	34

FIGURA 19 . Sitios de corte con Alu I en las secuencias obtenidas. A: MMor1, B: ZMor8, C: QMor9, D: OMor10 y E: CMor12	35
FIGURA 20 Análisis in silico del perfil de restricción obtenido con Alu I. Gel agarosa 1.5%. 1: MMor1, 2: ZMor8,.....	36
FIGURA 21 Ejemplos de sitios de corte para A: Alu I en MMor1, B: Hind III en QMor9, para XbaI y EcoRV no hay sitios de corte en las cinco muestras.....	36
Figura 22. Análisis filogenético MMor1	37
FIGURA 23 Análisis de máxima verosimilitud de ZMor8.....	38
FIGURA 24 Análisis de máxima parsimonia de QMor9.....	39
FIGURA 25 Análisis filogenético molecular por el método de máxima verosimilitud de OMor10.	40
FIGURA 26 Análisis de máxima parsimonia de Jmor12.....	41
FIGURA 27 Análisis filogenético molecular mediante el método de máxima verosimilitud de las 5 muestras trabajadas.	42

RESUMEN

El glifosato es un herbicida organofosforado utilizado mundialmente en la agricultura. El incremento en las dosis de aplicación genera problemas ambientales y selecciona plantas más resistentes. Es necesario conocer el tipo de resistencia para generar estrategias de control de malezas. Así, el objetivo de este trabajo fue identificar molecularmente especies que resistan a este herbicida, sobre todo analizar su mecanismo molecular de resistencia. En este estudio se colectaron 12 muestras en diferentes localidades de la zona oriente del Estado de Morelos con tolerancia aparente a glifosato. Al menos 4 especies fueron constantes en los sitios de muestreo. Para la identificación de cada espécimen se extrajo el ADN, se amplificó por PCR, se obtuvieron y analizaron las secuencias del gen *trn*. Para demostrar el mecanismo de resistencia de los biotipos se realizó una amplificación de *epsps*, no obstante, no se logró amplificar posiblemente por una incorrecta realización de las técnicas usadas o el diseño de oligonucleótidos. Posteriormente se realizó un perfil de restricción con *AluI*, el análisis *in silico* concordó con estos resultados. Finalmente se generaron árboles filogenéticos para identificar a los biotipos que mostraron resistencia, resultando *Spermacoce* sp., *Helianthus* sp., *Ipomoea* sp., *Commelina* sp. *Echinochloa* sp. como géneros principales. Concluimos que son cinco especies que presentan resistencia a glifosato, hacen falta ensayos que permitan estudiar las secuencias de *epsps* para demostrar el mecanismo de resistencia de estos biotipos, sin embargo, podría deberse a una resistencia en sitio *target* o también por modificación fisiológica.

Palabras clave: Herbicida, mecanismo, resistencia, vegetal, gen

Summary and key words

Glyphosate is an organophosphorus herbicide used worldwide in agriculture. In addition, the increase in application doses generates environmental problems and selects more resistant plants. It is necessary to know the type of resistance to generate weed control strategies. Thus, the objective of this work was to molecularly identify species that resist this herbicide, especially to analyze its molecular resistance mechanism. In this study, 12 samples were collected in different locations in the eastern part of the State of Morelos with apparent tolerance to glyphosate. At least 4 species were constant at the sampling sites. For the identification of each specimen the DNA was extracted, amplified by PCR, the sequences of the *trn* gene were obtained and analyzed. To demonstrate the mechanism of resistance of the biotypes, an amplification of *epsps* was performed, however, it was not possible to amplify possibly due to an incorrect performance of the techniques used or the design and oligonucleotides. Subsequently, a restriction profile was performed with *AluI*, the *in silico* analysis agreed with these results.

Finally, phylogenetic trees were generated to identify the biotypes that showed resistance resulting in *Spermacoce sp.*, *Helianthus sp.*, *Ipomoea sp.*, *Commelina sp.* *Echinochloa sp.* as main genres. We conclude that there are five species that have resistance to glyphosate, tests are needed to study the *epsps* sequences to demonstrate the resistance mechanism of these biotypes, however, it could be due to resistance at the target site, where the objective of the process cannot be achieved at the site of action, since mutations occur in the DNA sequence, or also an expression of the gene that is inhibited by glyphosate.

Key words: Herbicide, Mechanism, Resistance, Vegetable, Gene

I. INTRODUCCIÓN

Las malezas son un factor de importancia económica en los sistemas de producción agrícola. Compiten con los cultivos por factores energéticos y afectan el crecimiento y desarrollo de los cultivos (Ronchi *et al.*, 2008). Por tal motivo es determinante su control. Existen diferentes alternativas de manejo químico de malezas. El glifosato [n- (fosfometil) glicina] es el principal herbicida utilizado en la agricultura para el control de malezas en pre y post emergencia en cultivos tolerantes (Araújo *et al.*, 2003).

El glifosato es un herbicida sistémico, no selectivo, inhibe la enzima 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintasa (*EPSPS*), la cual se involucra en la ruta de síntesis del shikimato (Duke y Powles, 2008). La síntesis de la fenilalanina, tirosina, y triptófano (aminoácidos esenciales) está asociada a la *epsps* (Duke y Dayan, 2001). Así mismo a la síntesis de compuestos aromáticos como ligninas, alcaloides, flavonoides, ácidos benzoicos y hormonas vegetales. Como resultado de la inhibición de la *epsps* se altera el metabolismo del shikimato y reduce la síntesis de aminoácidos aromáticos, los cuales son necesarios para la supervivencia de las plantas (Ahrens, 1994).

El uso de herbicidas es la principal herramienta en el manejo de malezas asociadas a los cultivos, por disponibilidad, ahorro y eficiencia. El uso inadecuado promueve consecuencias como la resistencia-tolerancia a estos compuestos propiciando que el ingrediente activo no sea apto para el control, ocasionando un incremento en los costos de producción, al sustituir el herbicida por otro de mayor eficacia en el control de las malezas (Preston *et al.* 2006).

A nivel mundial la aplicación de herbicidas representa un promedio del 49% del total de agroquímicos usados en la agricultura (Grube *et al.*, 2011). En el 2014 se registra que 747 millones de toneladas de glifosato fueron aplicadas a los campos agrícolas (Benbrook, 2016). En México se comercializan productos con glifosato como:

Faena®, Cacique 480®, Nobel 62%®, Lafam®, Eurosato® y Agroma® entre otros. (Arellano-Aguilar y Montero-Montoya, 2017). En una investigación realizada se afirma que mientras el glifosato se utiliza para otros fines de erradicación, se pueden estar presentando problemas graves en otros cultivos, ya que este herbicida es utilizado frecuentemente no permitiendo su degradación (Cuervo, 2007).

Pérez-López *et al.* (2014) menciona que en México se aplican hasta 4 veces al año este herbicida en terrenos con cítricos. Hoy en día existen diversos cultivos resistentes al glifosato, esto a partir de 1996 (Duke y Powles, 2008), lo cual ha aumentado drásticamente su consumo, siendo el herbicida más importante del mundo (Powles, 2008). Por casi 40 años ha sido utilizado el glifosato mundialmente, reportándose 43 especies de malezas resistentes al glifosato, siendo superado por la atrazina con 66 especies e igualado por el imazetapir y el tribenuron-metil. (Heap, 2016).

Los cultivos que reportan el mayor número de especies resistentes a diferentes grupos de herbicidas son el trigo, maíz, arroz y soya con 77, 61, 51 y 48 especies. Las familias, *Poaceae*, *Asteraceae*, *Brassicaceae*, *Cyperaceae* y *Amaranthaceae*, cuentan con el mayor número de casos de resistencia, con 82, 42, 22, 12 y 11, respectivamente (International Survey of Herbicides Resistance Weeds, 2020). Son diversos los géneros reportados que ameritan atención para su control en los cultivos y promover así una mayor producción y rendimiento. Los géneros más frecuentes son *Amaranthus sp.*, *Ambrosia sp.*, *Conyza sp.* y *Lolium sp.* Siendo este último, el primer biotipo registrado como resistente al glifosato (Heap, 2019).

De esta manera, el objetivo de este trabajo consistió en buscar e identificar malezas resistentes-tolerantes a glifosato en la zona oriente del estado de Morelos.

II. OBJETIVOS E HIPOTESIS

2.1 Objetivo general

Identificar malezas en la zona oriente del estado de Morelos resistente-tolerantes a glifosato y determinar su estrategia de resistencia.

2.2 Objetivos específicos

- Identificación molecular de las plantas con el gen *trn* considerado altamente conservado.
- Análisis de la estrategia de resistencia de los biotipos colectados mediante la presencia de genes *epsps*.

2.3 Hipótesis

Existen malezas resistentes a glifosato en la región oriente del estado de Morelos, es necesario reportar estos biotipos con resistencia; para ello, se debe realizar la identificación molecular mediante amplificación del gen *trn*, el cual mostrará la biodiversidad de plantas muestreadas. Además, es posible que esta resistencia se deba a la transferencia horizontal de una *epsps* mutante. Mediante técnicas de PCR se buscará la presencia o ausencia de estos genes.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Importancia de las malezas en la agricultura

Una planta es considerada maleza cuando está presente en un área no deseada para el productor agrícola, alterando al cultivo, al ejercer una competencia por nutrientes, espacio y agua, principalmente. La presencia de las malezas en los cultivos disminuye la producción, provocando un problema económico. Así mismo las malezas pueden servir como hospederos de insectos o microorganismos dañinos para el cultivo. Por esta razón, es importante el estudio y la implementación de diversos métodos de control de malezas (Blanco *et al.*, 2007).

La CONABIO (2019) clasifica a las malezas en más de 100 familias, de las cuales la *Asteraceae* y *Poaceae* sobresalen con 238 y 134 géneros respectivamente. Soltani *et al.* (2013) mencionan que en el cultivo del maíz puede perder rendimiento a causa de las malezas hasta de un 30%, sin contar pérdida por riesgos ambientales, clasificando a la competencia maleza-cultivo como el factor más preocupante entre la producción de cultivos (Cerrudo *et al.*, 2012).

En la **Figura 1** observamos el rendimiento de maíz en presencia y ausencia de malezas durante el periodo de producción, mostrando claramente que en presencia de malezas el rendimiento va decayendo, a diferencia de un cultivo sin competencia, el rendimiento es mayor. Blanco y Leyva (2011) hacen mención que el periodo crítico de competencia oscila entre los días 24 y 40, por lo cual en la **Figura 1** observamos que, en el cultivo sin maleza, en esa parte del periodo presenta un incremento en el rendimiento.

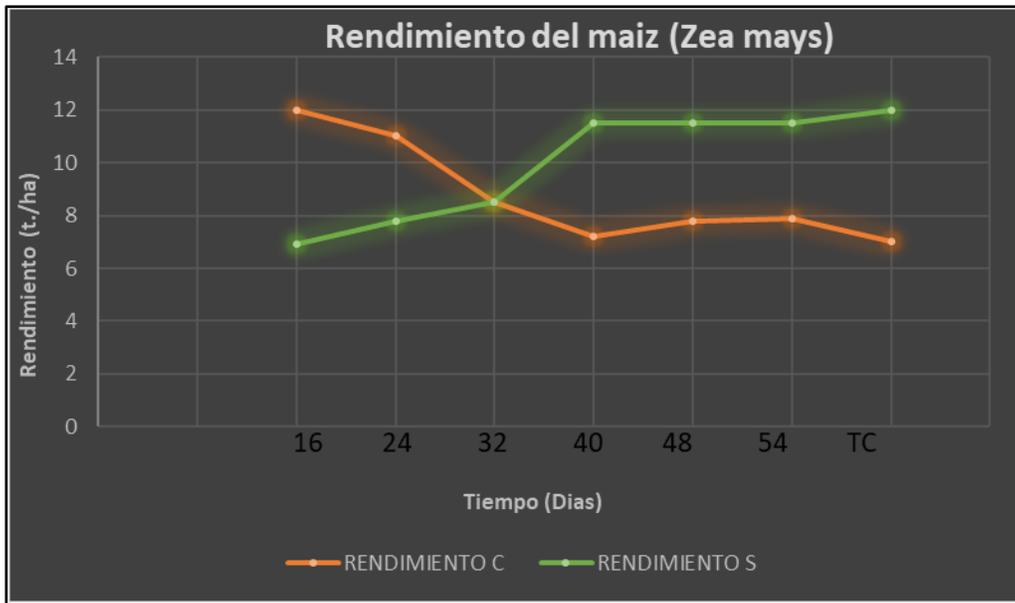


FIGURA 1 . Rendimiento del maíz (t ha-1) en diferentes períodos. C: con malezas y S: sin malezas, TC: tiempo de cosecha (Blanco y Leyva., 2014)

La competencia cultivo-maleza reduce el rendimiento de la producción de un cultivo, por ello, se han implementado distintos métodos de control. El control químico mediante el uso de herbicidas es el más utilizado en la agricultura (Ross y Lembi, 2009), sin embargo, propicia una resistencia en las malezas por el uso descuidado y exagerado de estos (Powles y Yu, 2010).

3.2 Efectos ambientales de los plaguicidas químicos

La función de los plaguicidas es atacar a plagas y enfermedades, muchos organismos comparten ciertas características o similitudes entre sus funciones químicas, físicas o metabólicas, de tal manera que un plaguicida puede ser perjudicial para el ambiente y afectar la salud pública (Pimentel, 2009). Las partículas de los plaguicidas que son transportadas por el viento tienen un efecto a cultivos cercanos que son susceptibles al producto, y así mismo a la comunidad cercana (Del puerto Rodríguez *et al.*, 2014).

En los ecosistemas acuáticos, las algas y fitopláctones son importantes dado a que otras especies del mismo hábitat necesitan de ellos para su sobrevivencia. Estos proporcionan oxígeno disuelto para las demás especies. Sin embargo, son afectados por los herbicidas. El uso de herbicidas en los campos agrícolas junto a su ciclo de persistencia causa un efecto negativo a estos organismos (Knauer *et al.*, 2012).

La contaminación acuática afecta en general a los organismos. Se ha estudiado que los plaguicidas ocasionan daños severos a las especies que son expuestas a ellos (Hamlin *et al.*, 2010). El daño a la salud humana evoluciona dependiendo del tiempo de exposición ya sea directa o indirecta. En este juego entran las personas que crean y trabajan directamente con los plaguicidas, como los agricultores que los aplican. Así mismo de una manera indirecta las personas afectadas son los consumidores.

La exposición ante estos plaguicidas produce distintos efectos negativos. La OMS señala que más de 3 millones de intoxicaciones han sido resultado de todas estas prácticas (Bird *et al.*, 2008) derivándose daños como tumores y lesiones degenerativas en el hígado y riñón (Olea y Fernández, 2001).

3.3 Efectos del glifosato al ambiente y a la salud

El glifosato, está catalogado como un producto de baja toxicidad, de poca persistencia y una movilidad baja sobre el agua subterránea, pero esto, solo basado a estudios al ingrediente activo, sin tomar en cuenta las formulaciones que son lanzadas al mercado (Antoniou *et al.*, 2012). Jones *et al.* (2011) mencionan que el glifosato influye en la disminución de la diversidad de insectos. El glifosato también puede moverse en la rizosfera y afectar a las plantas vecinas no objetivo (Tesfamariam *et al.*, 2009) perjudicando indirectamente a insectos que viven de esas plantas, como las abejas, entre otros polinizadores (Nicholls y Altieri, 2012).

Saunders *et al.*, (2017) mencionan el daño por el glifosato a las mariposas monarcas en relación con sus larvas y su alimento que es *Euphorbia heterophylla*. El periodo que tarda para que el glifosato se metabolice es de 2 a 215 días. La persistencia del glifosato en el agua es de 2 a 91 días (Giesy *et al.*, 2000), afectando a anfibios y a organismos acuáticos (Antoniou *et al.*, 2012). El glifosato está asociado al cáncer, alteraciones endocrinas en humanos y toxicidad aguda y crónica en especies acuáticas como consecuencias de su uso (Guyton *et al.*, 2015).

Así mismo, estudios han mostrado que, en aguas embotelladas, aguas subterráneas, ríos, lagos, entre otros, que se encuentran cerca de campos agrícolas contienen residuos de glifosato y su metabolito secundario AMPA (ácido aminometilfosfónico) (Rendón Von Osten y Dzul Caamal, 2017). Bøhn *et al.*, (2014) mencionan que a diferencia de otros plaguicidas la concentración más alta presente en los alimentos corresponde al glifosato. Ruiz-Toledo *et al.* (2014) mencionan que en áreas protegidas se han encontrado residuos del herbicida. Primost *et al.* (2017) consideran que el glifosato es un contaminante 'pseudo-persistente'.

3.4 Resistencia a herbicidas

Un herbicida al ser expuesto a una planta es absorbido y se transporta a su sitio de acción y en ese transcurso es metabolizado, cuando este llega a su destino inhibe algún proceso esencial para la planta (Catizone y Zanin, 2001). Al usar un herbicida reiteradamente, se ejerce una presión de selección en la población de malezas donde da como resultado a una resistencia (Villalba, 2009). Se conocen dos tipos de mecanismos que hacen resistentes ante los herbicidas (Figura 2).

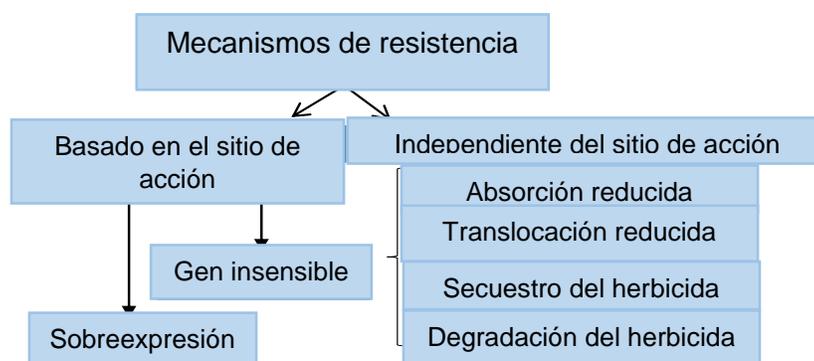


FIGURA 2 Mecanismos de resistencia de plantas a herbicidas (Cruz-Hipólito et al., 2009).

Uno de ellos es la alteración en el lugar de sitio de acción (*target site*) donde afectan a procesos y dan resultados secundarios donde dañan a la planta y la conducen a su muerte. La resistencia “*non target site*”, donde la planta degrada al herbicida y así impide que llegue a su objetivo (Villalba, 2009). En la resistencia “*target site*” se puede presentar mutaciones que, a partir de esa modificación en la secuencia de ADN, el herbicida no puede realizar su función. Así mismo puede presentarse una sobreexpresión de la enzima que inhibe (Heap, 2014).

En el mecanismo “*non target site*” o independiente del sitio de acción, se produce por tres posibles formas. Mediante una absorción, translocación (Barroso *et al.*, 2015) y metabolización del herbicida (Shaner *et al.*, 2012), donde las plantas son

capaces de evitar que el herbicida llegue al sitio de acción correspondiente y alcanzar su objetivo mediante una inmovilidad y así lograr que el herbicida no llegue con la concentración necesaria al sitio de acción (Cruz-Hipólito *et al.*, 2009). Ge *et al.*, (2010) mencionan que las vacuolas son un medio por el cual la concentración del herbicida disminuye.

De igual manera, al utilizar una dosis alta o menor se puede presentar una selección en la planta, la cual le conferirá a una resistencia (Manalil *et al.*, 2011). Por estos mecanismos posibles en una planta, resultan las mutaciones en la información genética del organismo (Baerson *et al.*, 2000). Una planta resistente a más de un herbicida con el mismo modo de acción, se le conoce como resistencia cruzada (Chueca *et al.*, 2005). Esta resistencia se presenta con mayor frecuencia en el sitio de acción (Heap, 2014). Así mismo se puede presentar una resistencia múltiple en la cual la planta resiste mediante diferentes mecanismos con diferente sitio de acción (Heap y LeBarron, 2001).

En la **Figura 3**, se muestra el número de malezas que son resistentes a herbicidas, se aprecia que desde 1995 está la presencia de malezas resistentes a los inhibidores de la EPSPS (Heap, 2019).

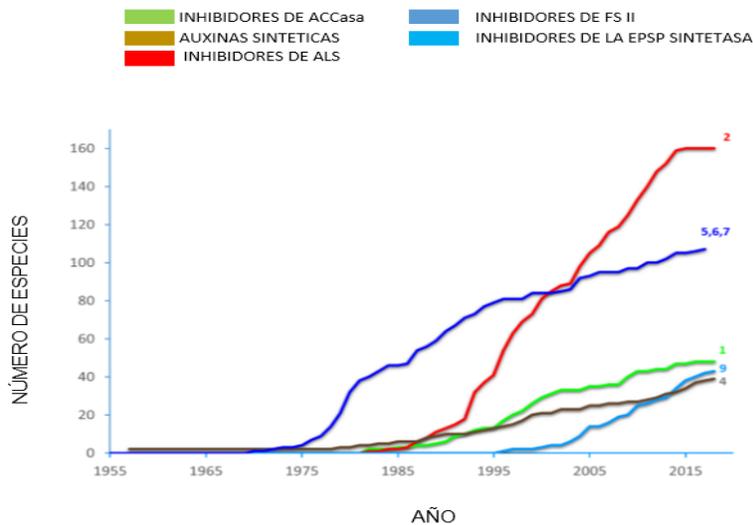


FIGURA 3 Número de especies resistentes a herbicidas por su sitio de acción (Heap, 2019).

3.5 Mecanismo de resistencia de plantas a glifosato

Uno de los mecanismos de la resistencia a glifosato que se ha encontrado, es la resistencia en el sitio activo (**Figura 4**). Un claro ejemplo es lo que ocurre en *Eleusine indica* en Malasia, la cual es reportada como resistente al glifosato por su sitio activo. El glifosato altera la ruta metabólica del shikimato, donde participa la enzima *EPSPS*, la cual, es inhibida por el glifosato y la resistencia está dada por mutaciones que presenta la *EPSPS* en su cadena de aminoácidos. Esta mutación altera la cadena en la posición de la Prolina106 que es sustituida por una Serina (Pro106-Ser) o por Treonina (Pro106-Thre) (Baerson *et al.*, 2002).

Así mismo en *Echinochloa* presenta la mutación Pro106 por Serina o Treonina (Alarcon *et al.*, 2011). En Australia, Chile y California se encuentra reportada *Lolium* spp. La cual presenta la misma mutación en Pro 106-Ser (Simarmata y Penner 2008). Otra mutación dada es Pro106-Ala (Jasieniuk *et al.*, 2008) presente en un biotipo de California. En Sudafrica (Kaundun *et al.*, 2011) se ha identificado una mutación diferente, Pro 106- Leu. Otra de las causas de una resistencia en el sitio activo es la sobre expresión de la enzima *EPSPS*.

Lotus spp., *Amarantus palmeri* y *Conyza canadensis* son ejemplos que presentan una sobre expresión de esta enzima (*EPSPS*) derivada por el uso indiscriminado de glifosato. En Georgia y USA se encuentra un ejemplar de *A. palmerii* que presenta un caso de sobreexpresión de la *EPSPS*. La enzima en esta planta resistente, presentaba de 5 a 160 copias más que en plantas que son susceptibles a glifosato (Gaines *et al.*, 2011).

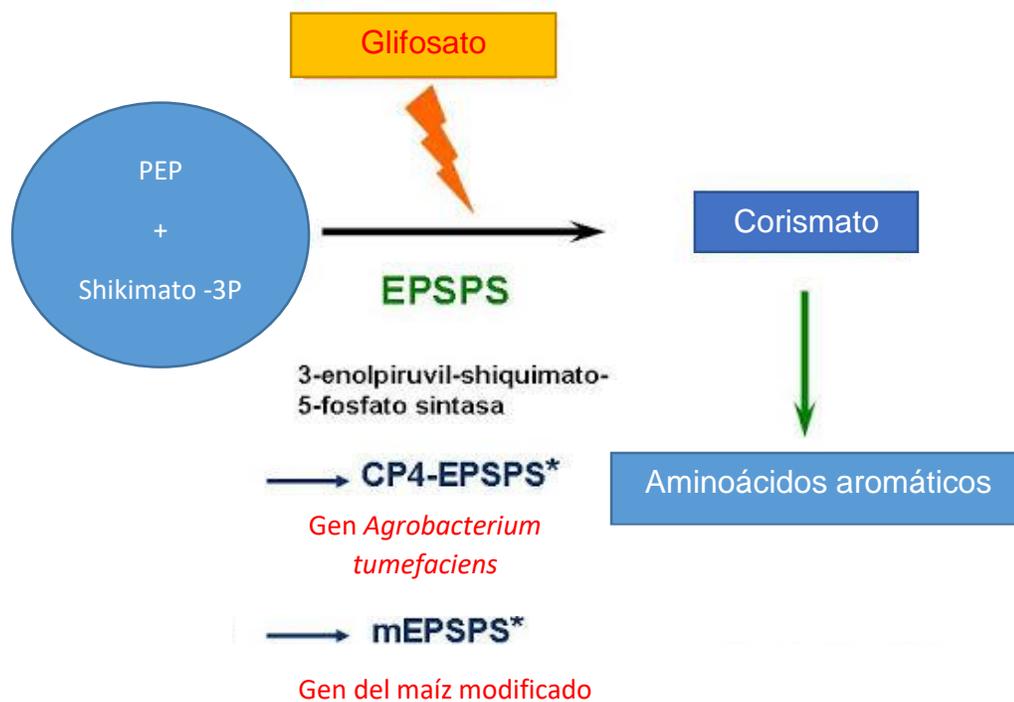


FIGURA 4 Mecanismo de acción y resistencia de glifosato (Duke y Powles, 2008).

3.6 Plantas resistentes a glifosato

En México se han registrado tres especies de malezas resistentes al glifosato. En el 2010 *Leptochloa virgata*, y en el 2014 *Bidens pilosa* (Heap 2019). *Leptochloa virgata* localizada en Veracruz, México, en huertos de cítricos. El estudio demostró una resistencia al glifosato mediante la absorción y translocación reducidas de glifosato, también se presentó una mutación y una actividad basal de la *EPSPS* mejorada a nivel del sitio de acción (Alcántara *et al.*, 2016). Otro caso es, *Bidens pilosa* localizada en el Golfo de México en huertos de cítricos. La *EPSPS* presentó mutaciones simples (Pro-106-Ser) y dobles (Thr-102-Ile seguidas de Pro-106-Ser). Así mismo se pudo observar una translocación reducida (Alcántara *et al.*, 2016b).



FIGURA 6 *Leptochloa virgata* (Heap 2019)



FIGURA 5 *Bidens pilosa* (Heap 2019).

3.7 Plantas modificadas genéticamente con tolerancia al glifosato

El uso de plantas modificadas genéticamente ha incrementado, contando con 175.2 millones de hectáreas mundialmente utilizadas para este tipo de plantas hasta el año 2013 (James, 2013). En México se establecen cultivos como *Medicago sativa* L., *Gossypium hirsutum* L., *Brassica napus*, *Zea mays*, *Glycine max* y *Beta vulgaris* L. modificados genéticamente con genes como *gat4621*, *mepsps*, *2mepsps*, *CP4 epsps 1214p* y *CP4 epsps* (CIBIOGEM, 2019). El gen *gat4621* se obtiene de *B. Licheniformis* que inhibe al glifosato (ISAAA, 2019) por N-acetilación ya que codifica una enzima glifosato acetiltransferasa (CFIA, 2012).

El gen *mepsps* es derivado de *Zea mays* que confiere tolerancia a glifosato (ISAAA, 2019) modificado por mutagénesis y *2mepsps* que una doble versión de la misma. El gen *CP4* de *Agrobacterium*, codifica a la *EPSPS*. Este gen *CP4-EPSPS* tolera a glifosato (Rojas *et al.*, 2017) ya que no daña al gen bacteriano a diferencia del gen en las plantas (Service, 2007). La *CP4 EPSPS* puede ser introducida mediante las semillas, propágulos, así mismo el flujo de los genes a plantas silvestres de la misma familia que son compatibles sexualmente (Center Environmental Risk Assessment, 2010) provocando una alteración a plantas no objetivo, modificando sus características ya que ese gen posteriormente estaría expresado en esa especie (Mc Lean, 2011).

3.8 Regulación de OGM con resistencia a glifosato en México

México ha permitido liberaciones de OGMs de acuerdo a la LEY DE BIOSEGURIDAD DE ORGANISMOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS (LBOGM). Desde el año 2005 al 2017, se han otorgado más de 600 permisos distribuidos en diferentes cultivos conforme a la LBOGM, se resumen en la **Figura 7** (CIBIOGEM, 2019).

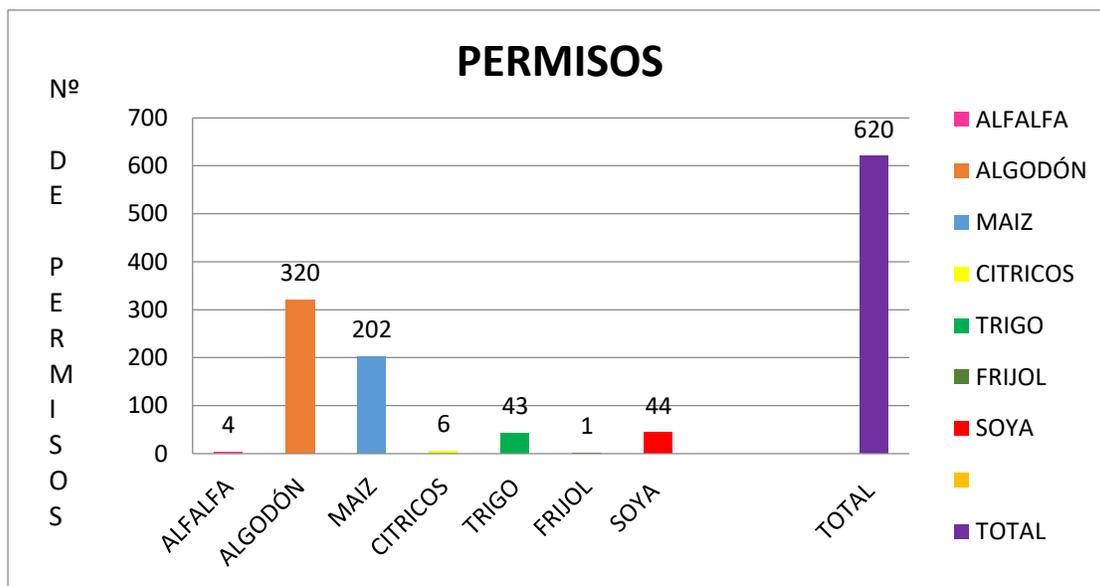


FIGURA 7 Permisos de liberación al ambiente de OGMs emitidos en México de 2005 a 2017, por cultivo, conforme a la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (LBOGM) (CIBIOGEM, 2019)

IV. METODOLOGÍA

4.1 Muestreo

La colecta se realizó en la zona oriente de estado de Morelos. Se recolectaron plantas (malezas) presentes en cultivos con previas aplicaciones de glifosato (Figura 8). La colecta se enfocó en plantas de maleza sobrevivientes a aplicaciones de glifosato con resistencia aparente al herbicida. Se realizaron entrevistas con los productores dueños de las parcelas y así explorar el historial de aplicaciones con este herbicida. Las muestras, se conservaron a 5 °C hasta su posterior análisis. Los especímenes se llevaron al Laboratorio de Biotecnología de la Escuela de Estudios Superiores de Xalostoc para la extracción de ADN. Los análisis del ADN fueron realizados en el Laboratorio de Genética del Tecnológico de Monterrey, Campus Puebla.

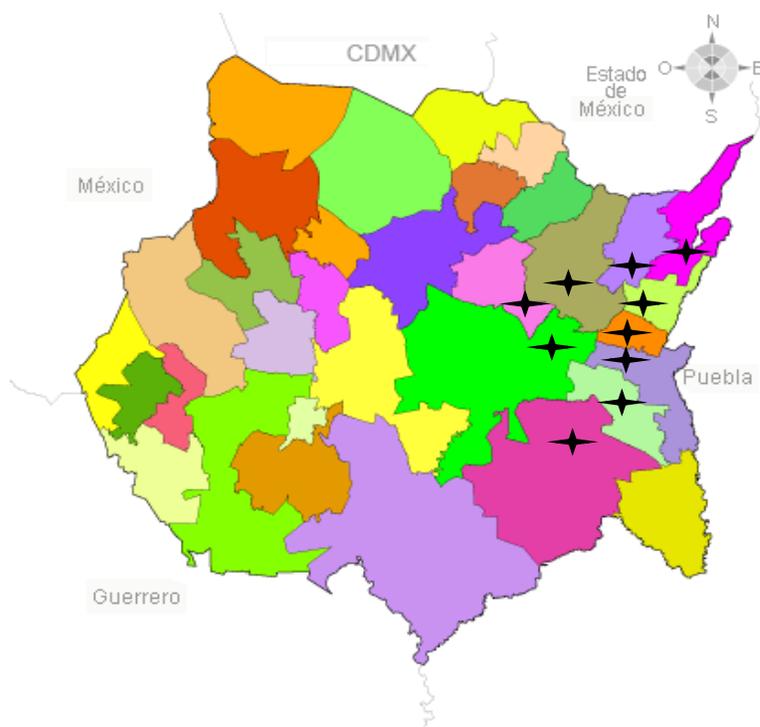


FIGURA 8 Sitios de colecta (municipios muestreados)

4.2 Extracción de ADN

A partir de las muestras colectadas, se hizo la extracción de ADN de acuerdo a la metodología utilizada en el Laboratorio de Biotecnología de la Escuela de Estudios Superiores de Xalostoc. Se hizo un lavado con hipoclorito de sodio y agua destilada. En un mortero se colocó cada muestra vegetal (joven) por separado, posteriormente se agregó 1 ml de la solución amortiguadora (buffer de extracción) y se maceró. Del resultado, se tomó 1 ml del material y se colocó en tubos eppendorf de 2.0 ml, los cuales se coloraron en baño María a 65 °C por 30-60 min, cada 5 min fueron mezclados. Transcurrido el tiempo los tubos fueron centrifugados a temperatura ambiente a 8000 rpm durante 1 min. La fase superior fue trasladada a otro tubo limpio, se agregó una solución preparada de cloroformo y alcohol isoamilico (24:1) hasta la marca de 2.0 ml del tubo, mezclándolos suavemente.

Se centrifugaron a 8000 rpm por 15 min. Nuevamente se trasladó la parte superior líquida en un tubo nuevo. Se adicionaron 2 volúmenes de alcohol absoluto frío (-20°C) y se mezcló para obtener el *pellet* de ADN. Los tubos se dejaron reposar por 20 min a temperatura ambiente. Después del reposo, se hizo un lavado con etanol a 70%, se incubó por 20 min y se vació el etanol para que si era necesario se repitiera el lavado. En la última lavada se vació el etanol, y se dejó a temperatura ambiente para que el alcohol se evaporara. Transcurrido el tiempo, las muestras se hidrataron con 1 ml de buffer TE y 3 µl de ARNasa. Finalmente, los tubos se dejaron en baño María por 40-60 min.

4.3 Visualización y cuantificación del ADN

4.3.1 Visualización

Se preparó una solución con colorante, el colorante de carga más solución TE 1:3 (Tris- EDTA). Se agregaron 2 μl de la solución en un tubo nuevo con 4 μl de ADN de cada muestra. Se preparó un gel de agarosa al 0.8% con 4 μl de Bromuro de etidio. Al gel solidificado se colocó dentro de la cámara de electroforesis, se cubrió con buffer TAE 1X hasta que quedara sumergido a 4 mm de profundidad respecto a la superficie del TAE. Para colocar la muestra de ADN en el gel se realizó lo siguiente: de las muestras ya preparadas con el colorante de carga en un tubo, con una pipeta se mezcló con cuidado. Se colocaron las muestras en cada cavidad del gel. Se tapó la cámara de electroforesis y se corrió a 74 volts por 45 min.

4.3.2 Cuantificación del ADN

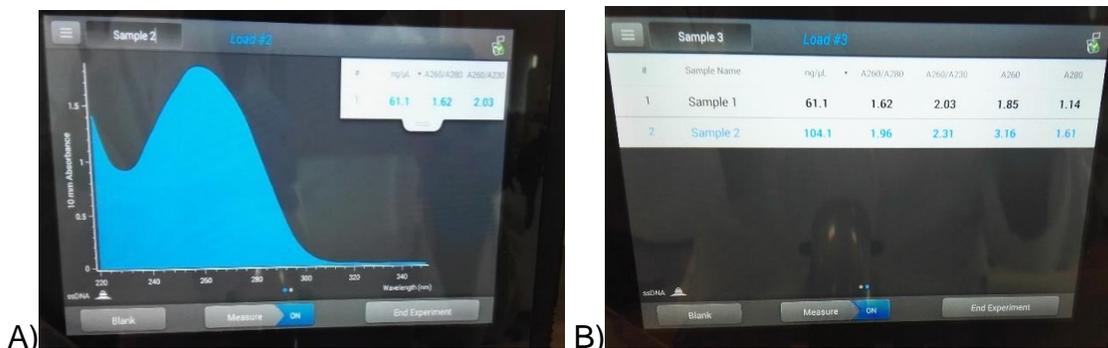


FIGURA 9 Lecturas de absorbancia en Nanodrop. A: espectro de absorción, B: datos de rangos de absorbancia de las muestras.

4.4 Amplificación de fragmentos por PCR (reacción en cadena de la polimerasa)

4.4.1 Amplificación del gen *trn*

La técnica de amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) consiste en la amplificación *in vitro* de un fragmento de ADN específico. En un tubo se añadió 31 µl de agua esterilizada libre de nucleasas, 10 µl de buffer para PCR 5x Green GoTaq de Promega, 5 µl de MgCl₂, 1 µl de desoxirribonucleótidos trifosfatos (dATP, dGTP, dTTP y dCTP), 1 µl del par de oligonucleótidos (directo 5'-ATTTGAACTGGTGACACGAG-3', reverso 3'-CGAAATCGGTAGACGCTACG-5') reportados por Taberlet *et al.* (1991), 0.25 µl de taq DNA polimerasa de Thermo Scientific y 1 µl de la muestra de ADN. Utilizando un termociclador LABNET de MultiGene. El protocolo para la PCR fue como se muestra en la Figura 10. Los equipos y materiales que se utilizaron en esta técnica se muestran en la (Figura 11).

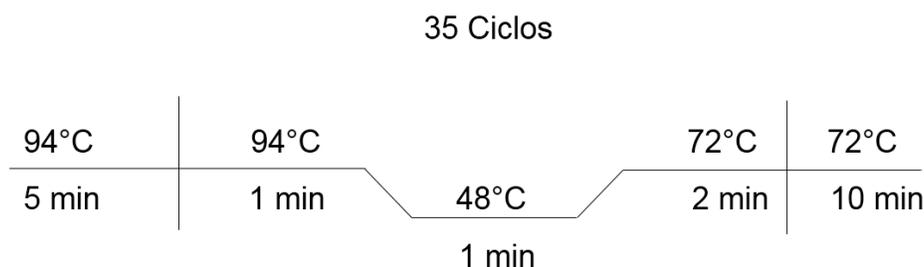


FIGURA 10 Protocolo de amplificación por PCR para gen *trn*

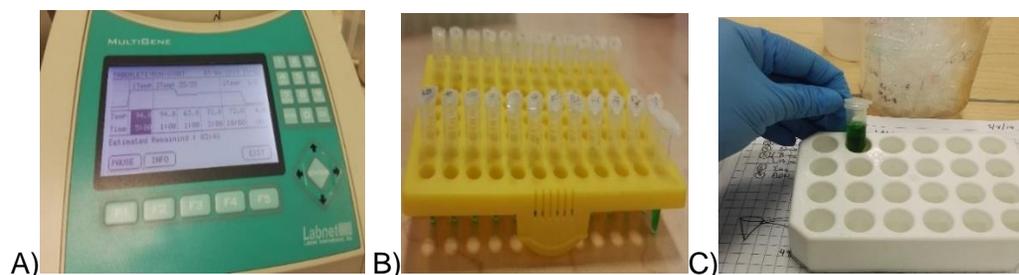


FIGURA 11 Reacción de PCR realizado en el laboratorio de Genética del Tecnológico de Monterrey Campus Puebla. A: Termociclador, B: muestras para PCR, C: Mix para PCR

Después de la PCR, se preparó un gel de agarosa al 1% con solución TAE 1X de Ultra Pure™ y fueron teñidos con 1 µl de colorante EZ-VISION. Se corrió a 90 volts por 45 min con ayuda de una fuente de poder como se observa en la Figura 12.

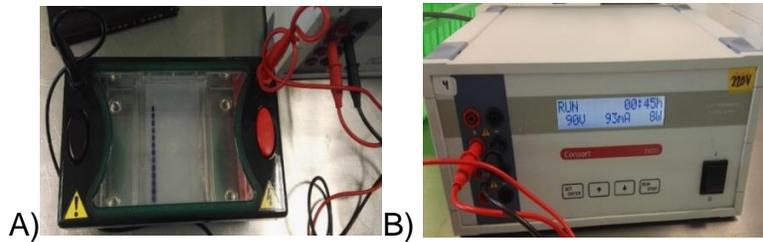


FIGURA 12 Electroforesis. A: cámara de electroforesis B: fuente de poder.

4.4.2 Amplificación del gen *epsps*

En un tubo se añadió 22 μ l de agua esterilizada libre de nucleasas, 25 μ l de buffer Dream Taq PCR Master Mix (2x), 1 μ l de oligonucleótidos (forward: 5'-TGGCGCCCAAAGCTTGCATGGC -3' y reverse: 3'-CCCAAGTTCCTAAATCTTCAAGT -5') de acuerdo con Nesvold *et al.* (2005) y 1 μ l de la muestra de ADN. El protocolo de PCR para este fragmento, *epsps*, se muestra en la Figura 13.

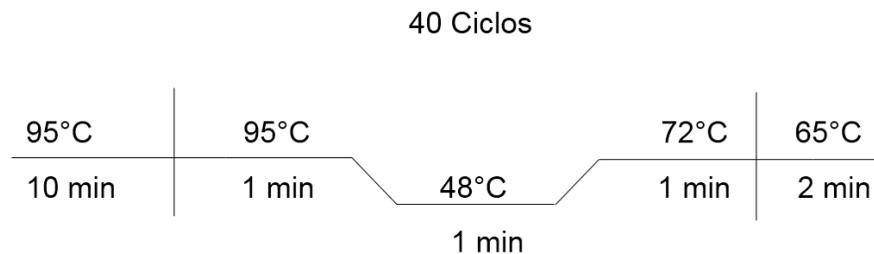


FIGURA 13 Protocolo de amplificación por PCR para gen *epsps*

Después de la PCR, se preparó un gel de agarosa al 1 % y fueron teñidos con 1 μ l de colorante EZ-VISION. Se corrió a 90 volts por 40 minutos.

4.5 Purificación de productos de PCR de genes amplificados

Las muestras fueron purificadas con el kit AxyPrep PCR cleanup 250-prep (Figura 15). Se colocó una columna de PCR en un micro-tubo de 1.5 ml. En el centro de la columna se colocó de 35 a 40 µl de muestra, se añadió 3 veces el volumen de la muestra de buffer de PCR-A, se centrifugo a 13 mil g por 1 min. Se retiró el líquido del micro-tubo. Nuevamente en la columna se colocó 700 µl de Buffer W2, se centrifugo a 16 mil g por 1 min volviendo a retirar el líquido del tubo. Por segunda vez, se agregó el Buffer W2 con un volumen de 400 µl centrifugándose a 16 mil g por 1 min. La columna se cambió a un tubo limpio y cuidadosamente se colocó en el centro de la membrana 30 µl de Eluent. Se dejó reposar a temperatura ambiente por 1 min, se centrifugo a 16 mil g por 1 min y se retiró la columna del tubo.



FIGURA 14 Kit AxyPrep PCR cleanup 250-prep para purificación de muestras

4.6 Restricción enzimática

Del producto purificado se realizó un análisis de restricción enzimática *in vitro* con cuatro diferentes enzimas. Para lo cual se preparó una mezcla de digestión con 2 µl de H₂O libre de nucleasas, 1.2 µl de buffer, 0.2 µl de BSA, 0.6 µl de endoenzima (*AluI*, *HindIII*, *XbaI*, *EcoRV* por separado), 8 µl de muestra de ADN con una concentración de 11 a 33 ng/µl. Se incubaron a 37 °C por 3 h, posteriormente se observaron en gel de agarosa al 1.5 % a 80 volts por 80 min.

Además, se realizaron los análisis de restricción *in silico*, para ello se utilizó el software SnapGene versión 4.3.8 con las mismas condiciones planteadas y con las secuencias ya obtenidas. Para finalmente comparar los resultados obtenidos con los perfiles de restricción *in vitro*.

4.7 Secuenciación y análisis de secuencias para la identificación de las malezas

Las muestras fueron secuenciadas en la Unidad de Secuenciación y Síntesis del IBT-UNAM, siguiendo el protocolo que se describe a continuación emitido por la Unidad de Secuenciación y Síntesis del IBT-UNAM. En un tubo eppendorf de tapa plana de 0.2 ml para PCR se entregaron 16 µl de mezcla. Esta mezcla contuvo 1 µl del primer, ADN acorde a la concentración y agua destilada. Para el análisis de las muestras se usaron los programas Bioedit, Molecular Evolutionary Genetics Analysis versión 6.06. Los árboles filogenéticos se generaron considerando diez secuencias obtenidas en un alineamiento BLASTn con Máxima verosimilitud y Máxima Parsimonia.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Colecta en campo

Se realizó una colecta en diferentes municipios de la zona oriente del estado de Morelos, en total se obtuvieron 12 muestras, de las cuales 4 malezas fueron consistentes, se les extrajo el ADN y a cada muestra se les asignó una clave para diferenciarlas, A y B son las repeticiones de cada muestra (Cuadro 1).

Cuadro 1. Malezas colectadas en los campos agrícolas de la zona oriente del estado de Morelos (A y B repeticiones de cada muestra).

Nombre común	N° de muestra	Ejemplar	Sitio de muestreo	Clave asignada	Coordenadas geograficas
Hierba caliente	1A, 1B		Huitchila	MMor1	N 18°38' 37.5" E98° 55'25.4" 1148msnm
Ojo de gallo	2A, 2B		Yecapixtla	SMor2	N18° 52'16.0" E0.98 51' 57.5" 1581msnm
Zacamantilla	3A, 3B		Huitzililla	RMor3	N 18°41' 22.1" E98° 54'08.6" 1196msnm

Nombre común	N° de muestra	Ejemplar	Sitio de muestreo	Clave asignada	Coordenadas geograficas
-	4A, 4B		Ixtlilco el grande	AMor4	N 18° 32' 03.9" E: 098°40' 30.6" 1079 msnm
Quiebra platos	5A, 5B		Zacualpan	PMor5	N 18° 50' 00.1" E 098° 44' 10.1" 18679 msnm
Alache	6A, 6B		Atotonilco	HMor6	N 18°39'01.1" E 098° 49' 19.2" 1264msnm
Alache	7A, 7B		Axochiapan	KMor7	N 18° 34' 15.4" E 098°49' 12.6" 1110msnm
Zacamantilla	8A, 8B		Amayuca	ZMor8	N 18° 44' 27.6" E 098° 47' 07.7" 1495 msnm

Nombre común	N° de muestra	Ejemplar	Sitio de muestreo	Clave asignada	Coordenadas geograficas
Quiebra plantas	9A, 9B		Ocuituco	QMor9	18° 52' 16" 098° 49' 04.3" 1740 msnm
Ojo de gallo	10A, 10B		Xalostoc	OMor10	N 18° 44' 15.2" E 98°54'39.1" 1281msnm
Zacamantilla	11A, 11B		Hueyapan	DMor11	N18° 51'51.6" E098° 42'03.4" 2147 msnm
Jegüite de agua	12A, 12B		Tétela	CMor12	N 18° 52' 53.2" E 98° 42' 46.6" 2139msnm

5.2 Integridad del ADN

Para visualizar la calidad del ADN extraído, se corrieron las 12 muestras por duplicado (A y B) en gel de agarosa (Figura 15).

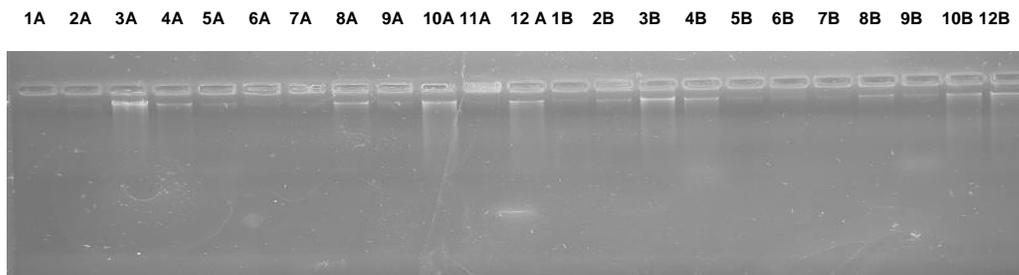


FIGURA 15 Visualización de la integridad del ADN extraído de las malezas colectadas.

En las muestras 1A, 2A, 4A, 5A, 6A, 7A, 9A, 11A, 1B, 2B, 5B, 6B, 7B, 9B no se aprecian bandas que muestren la presencia del ADN o al menos no con calidad requerida para su análisis.

A partir de todas las muestras, fueron seleccionadas 9, las cuales son: MMor1, RMor3, HMor6, KMor7, ZMor8, QMor9, OMor10, DMor11 e IMor12. A estas muestras seleccionadas se les realizaron los análisis posteriores.

5.3 Cuantificación del ADN extraído

Las columnas A260/A280 y A260/230 del Cuadro 11 indican la relación de absorbancia, definiendo la calidad de ADN con la que se cuenta. Está considerado que la relación de A260/A280 adecuada es de 1.8-2.0 (Del Valle *et al.*, 2004) en esta relación podemos definir la presencia de proteínas, por lo cual, si la concentración es baja, muestra la posible presencia de estas. De Jesús *et al.* (2005) considera que los resultados mayores de 2.0 reflejan que las muestras están contaminadas por ARN. En la columna de A260/A230 con los valores menores de 2.0 se encuentran contaminada posiblemente con algunas sales, carbohidratos, proteínas, entre otros.

Cuadro 1. Cuantificación del ADN extraído.

Muestra	ng/μl	A260/A280	A260/230	A260	A280
MMor1	80.8	1.56	0.48	1.62	1.04
RMor3	145.6	1.45	0.98	2.91	1.50
HMor6	256.7	1.72	0.69	5.13	2.99
KMor7	105.9	1.49	0.56	2.12	1.42
ZMor8	249.4	1.70	0.73	4.99	2.94
QMor9	78.9	1.53	0.48	1.58	1.05
OMor10	234.3	1.80	1.00	4.69	2.60
DMor11	88.0	1.66	0.60	1.76	1.06
IMor12	210.1	1.86	1.07	4.20	2.26

5.4 Amplificación del gen *trn*

El gen *trn* es un gen altamente conservado que se utiliza para identificar plantas, de acuerdo con Taberlet *et al.* (2007) contiene las características para poder utilizarse como un gen del *barcoding* para identificación. Para la amplificación del gen *trn* se el gen reportado por de los Ángeles *et al.* (2013), el gen amplificó con un peso de 1087 pb, obteniendo en esta amplificación aproximadamente 1000 pb. Como se observa en la Figura 16.

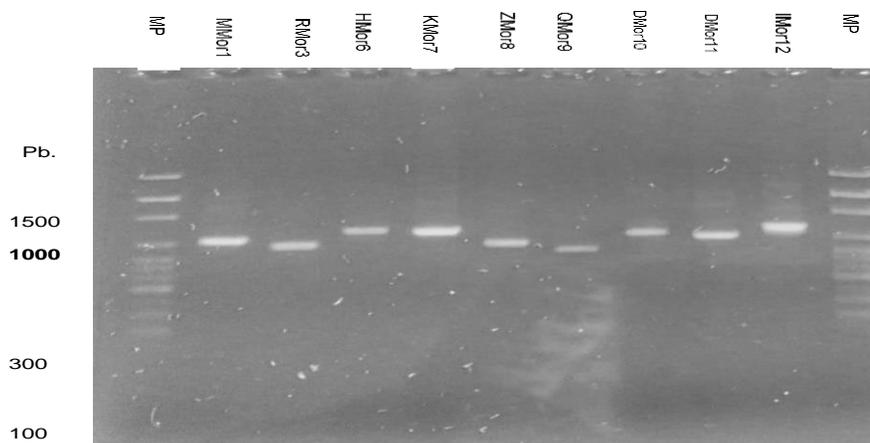


FIGURA 16 Amplificación del gen *trn* en las malezas colectadas (MP: marcador de peso molecular 100pb).

5.5 Cuantificación de la amplificación del gen trn

Cuadro 2. Cuantificación de la amplificación del gen trn.

Muestra	ng/ μ l	A260/A280	A260/230	A260	A280
MMor1	24.50	1.83	1.15	0.49	0.27
RMor3	18.14	1.76	1.82	0.37	0.21
HMor6	14.3	1.78	0.70	0.29	0.16
KMor7	31.7	1.86	0.06	0.63	0.34
ZMor8	22.50	1.76	1.52	0.47	0.27
QMor9	11.10	1.77	0.33	0.22	0.17
OMor10	21.3	1.82	0.70	0.43	0.23
DMor11	23.8	1.79	1.31	0.48	0.27
IMor12	32.9	1.93	0.08	0.66	0.34

5.6 Amplificación del gen epsps

La *epsps* es una enzima importante para la ruta del ácido shikimico en el cual da lugar a los aminoácidos aromáticos fenilalanina, triptófano y tirosina entre otros metabolitos. Estos aminoácidos son esenciales para las plantas, por lo cual su inhibición es letal. El glifosato inhibe a la *epsps*. En la figura 17 no se muestra la amplificación del gen *epsps*. Los mecanismos de resistencia mencionados anteriormente descartan la sobreexpresión del gen, ya que, si resistiera mediante este mecanismo, el gen *epsps* o alguno de sus mutantes se debió haber amplificado.

Posiblemente, el par de cebadores utilizados fue para el gen de la *epsps* endógena, por lo cual no amplificaría para ver si en las muestras se encuentra el CP4 *epsps*, generando una posibilidad que las plantas resisten por este gen ya que lo mencionado por (Center Environmental Risk Assessment, 2010) el gen puede transferirse a plantas silvestres de la misma familia de quien lo porta, así como su compatibilidad sexual. Sin embargo, Cantú-Iris *et al.* (2012) utilizaron los mismos oligonucleótidos para amplificar el gen modificado genéticamente *c4 epsps*, no obstante, con la técnica de PCR que utilizamos no amplifico. Unas posibles causas pueden considerarse a partir de cómo se realizaron las técnicas. Posiblemente el

protocolo o las condiciones de PCR, o el proceso de electroforesis no fueron los adecuados. Nair *et al.* (2002) detectaron el gen por Western Blot, posiblemente si los oligonucleótidos eran diseñados para la *c4 epsps*, se debió implementar la técnica mencionada anteriormente para poder amplificar el gen.

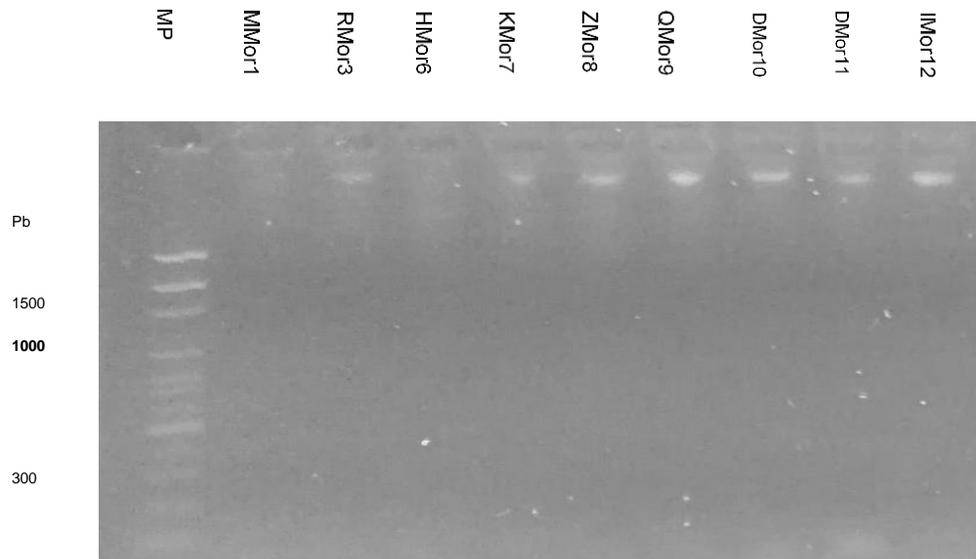


FIGURA 17 Amplificación del gen epsps.

5.7 Análisis de restricción enzimática

Las enzimas de restricción fueron descubiertas por Werner Arber, Daniel Nathans y Hamilton Smith en 1978 (Watson *et al.*, 2004). Siendo una herramienta básica de la biología molecular utilizados para mostrar mapas de ADN. En este trabajo se hizo un análisis con las enzimas *Alu I*, *Hind III*, *XbaI* y *EcoRV*, donde se apreció una mejor digestión utilizando la enzima *Alu I*, por lo cual se realizó el análisis con las demás muestras. La Figura 18, muestra la amplificación de las 9 muestras con un marcador de 100 pb en las cuales en la mayoría se logra apreciar dos fragmentos de ADN utilizando *Alu I* como enzima de restricción.

Esta enzima reconoce secuencias repetidas, reconoce las uniones de citosina-guanina (5'---AG CT---3' 3'---TC GA---5') (Rojas-Atencio *et al.*, 2012), su corte muestra áreas no metiladas (Xiang *et al.*, 2010). El uso de las restricciones enzimáticas, nos ayudan a predecir indirectamente la identificación de la amplificación por medio de sitios específicos del gen (Bruce *et al.*, 2008).

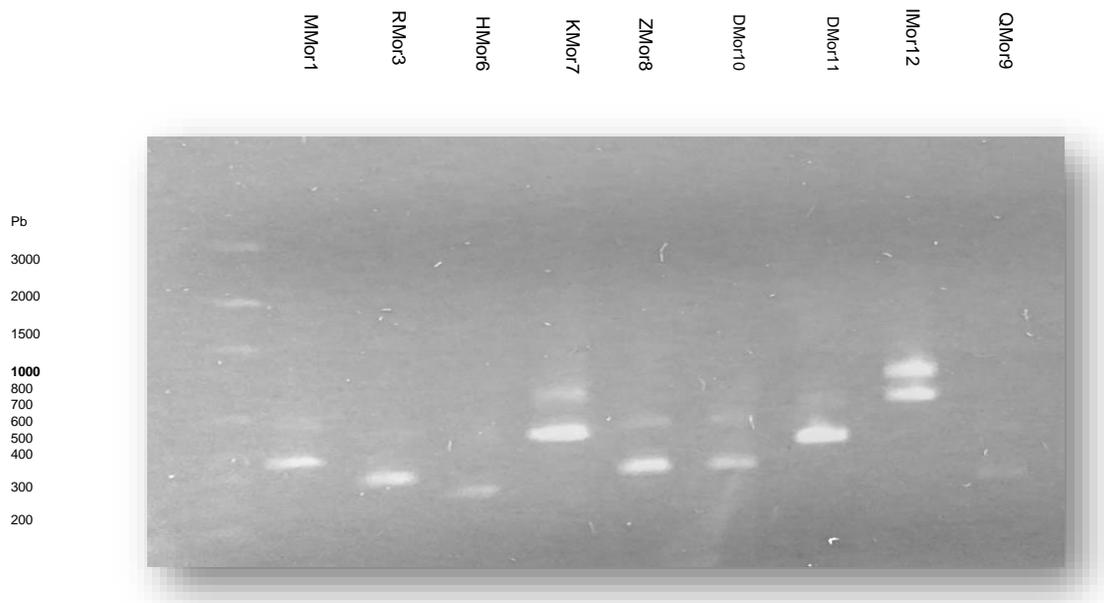


FIGURA 18 Producto de restricción enzimática con enzima Alu I con marcador de 100 pb.

En este gel de agarosa al 1.5% observamos 10 carriles, el primer carril es el marcador molecular, y las otras 9 son las muestras trabajadas. Observamos que en general las muestras fueron fragmentadas en dos partes, al menos 4 muestras tienen el fragmento con el mismo peso o al menos muy cercano. En MMor1 la primera banda mide ~500 pb. y la segunda banda de ~350 pb. Para la muestra RMor3 se observa una banda de ~400 pb y la segunda de 300 pb. En HMor6 se aprecia con mayor presencia solo una banda de ~250 pb, en KMor7 se aprecia un fragmento de 600 pb y la segunda de 400 pb, ZMor8 la primera con 500 pb y la segunda con ~350 pb, DMor10 muestra las mismas medidas. Para DMor11 la primera banda mide ~600, y la segunda ~400 pb, en la muestra IMor12, una banda mide ~800 y la segunda ~700. Por último, la muestra QMor9 muestra una banda de 300 pb. Por ello a partir de este resultado del perfil de restricción visto en gel se

seleccionaron 5 muestras: Mmor1, Zmor8, Qmor9, Omor10 y Cmor12 debido a la variabilidad de corte por esta endoenzima y así realizar un árbol filogenético.

5.8 Análisis *in Silico*

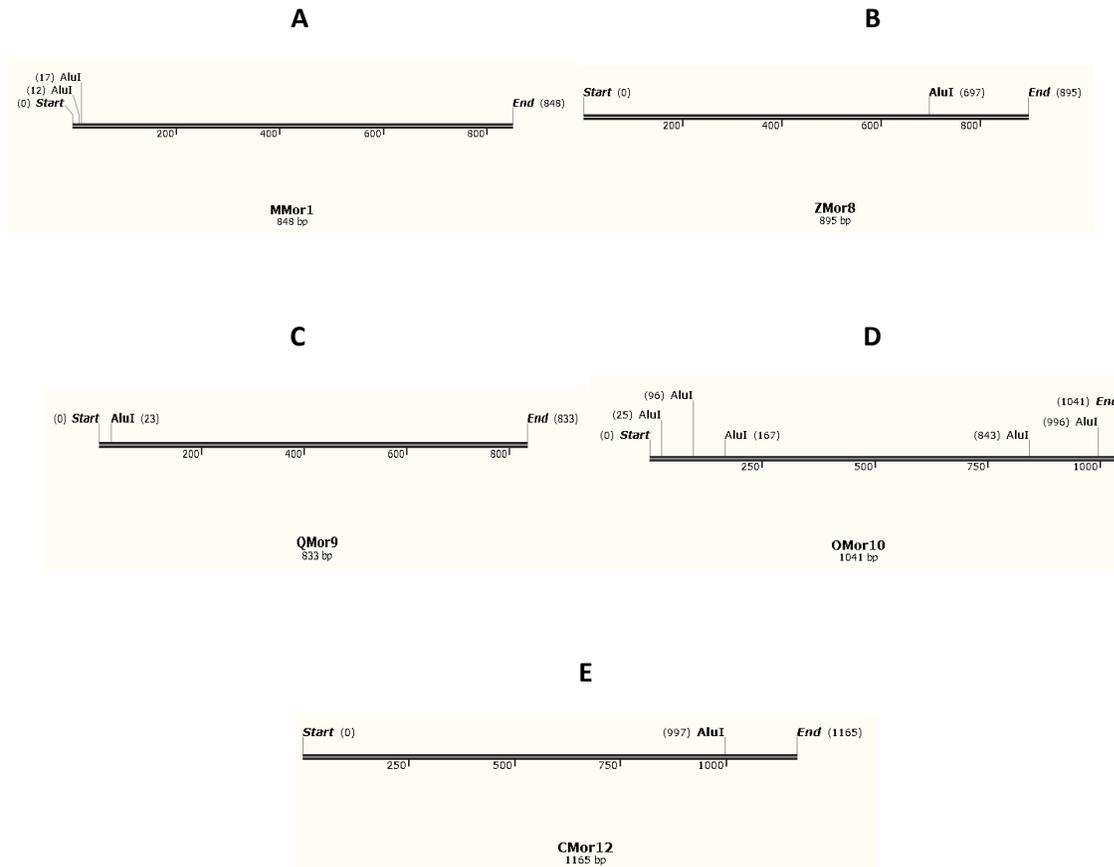


FIGURA 19 . Sitios de corte con Alu I en las secuencias obtenidas. A: MMor1, B: ZMor8, C: QMor9, D: OMor10 y E: CMor12

En la Figura 19 podemos ver el corte y el peso de cada fragmento de las muestras. En comparación con la Figura 18, corroboramos el tamaño exacto de los fragmentos de cada muestra. Podemos observar que en la muestra OMor10 de la Figura 18 no se aprecian todos los cortes a comparación de la Figura 19, Así mismo los pesos en general son diferentes o varían un poco, esto posiblemente por una mala corrida en el gel de agarosa, así mismo por que el análisis solo fue con el uso de un solo oligonucleótido, el forward.

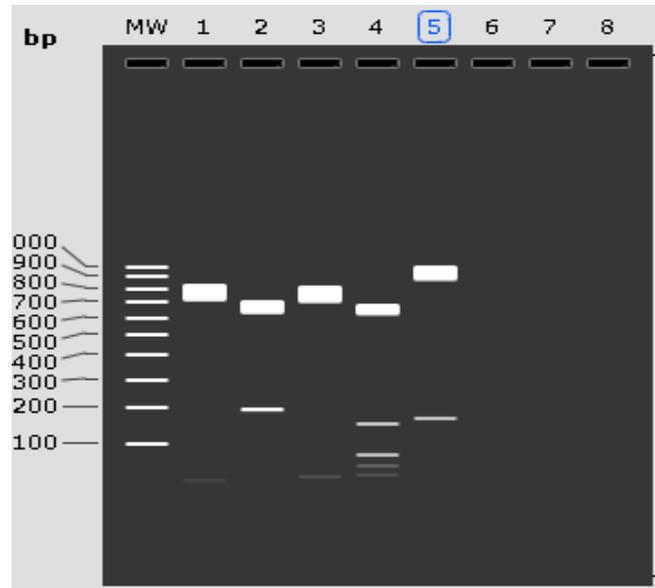
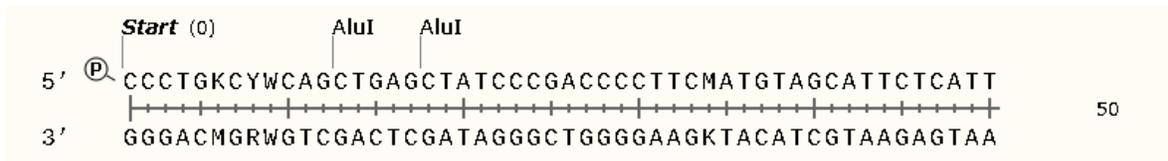


FIGURA 20 Análisis in silico del perfil de restricción obtenido con Alu I. Gel agarosa 1.5%. 1: MMor1, 2: ZMor8,

A



B

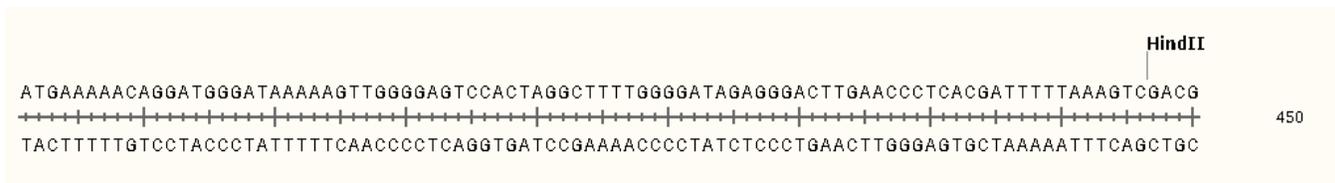


FIGURA 21 Ejemplos de sitios de corte para A: Alu I en MMor1, B: Hind III en QMor9, para XbaI y EcoRV no hay sitios de corte en las cinco muestras.

5.9 Análisis filogenético

Algunos reportes de especies resistentes a glifosato son *Borreria latifolia* (Aubl.) K. Schum. O *Spermacoce latifolia* (Stevens et al., 2001) son géneros de la familia de las Rubiáceas, la cual esta reportada como tolerantes al glifosato. Estudios mencionan a especies de *Borreria* con gran tolerancia a glifosato (Nisensohn et al., 2007). Gómez Robin (2005) estudió al glifosato y al paraquat en parcelas, donde tiene difícil control de *Spermacoce laevis*, *S. latifolia* y *S. laevis* con el glifosato, ya que menciona a la familia de las Rubiáceas como tolerantes al herbicida. Takano et al. (2013) también mencionan a *Spermacoce latifolia* como resistente al herbicida. En la Figura 22 se observa que la muestra MMor1 presenta cercanía filogenética al *Spermacoce próstata*.

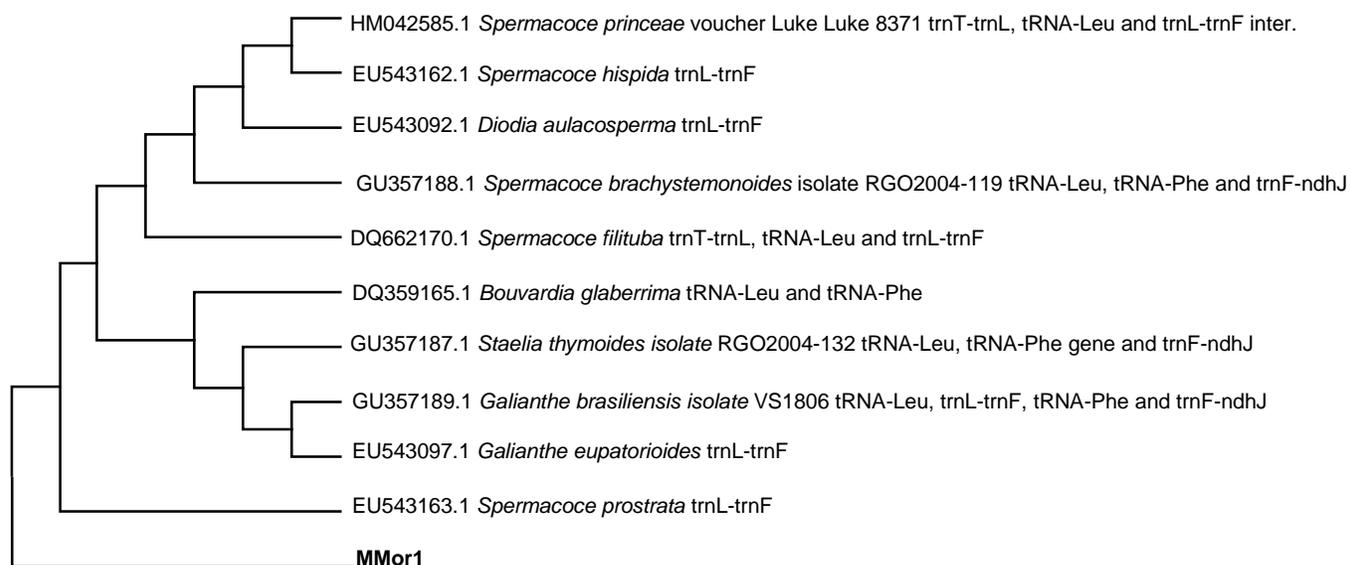


Figura 22. Análisis filogenético MMor1

La historia evolutiva se infirió mediante máxima verosimilitud basado en el modelo de GTR. Se muestra el árbol con la mayor probabilidad de registro (-988.5055). El análisis incluyó 11 secuencias de nucleótidos obtenidas del NCBI realizando un previo alineamiento BLASTN. Se eliminaron todas las posiciones que contienen gaps y datos faltantes.

En la Figura 23 aparece la colecta ZMor8 el cual presenta mayor cercanía al género *Aldama* cabe señalar que este género no presenta reportes de resistencia.

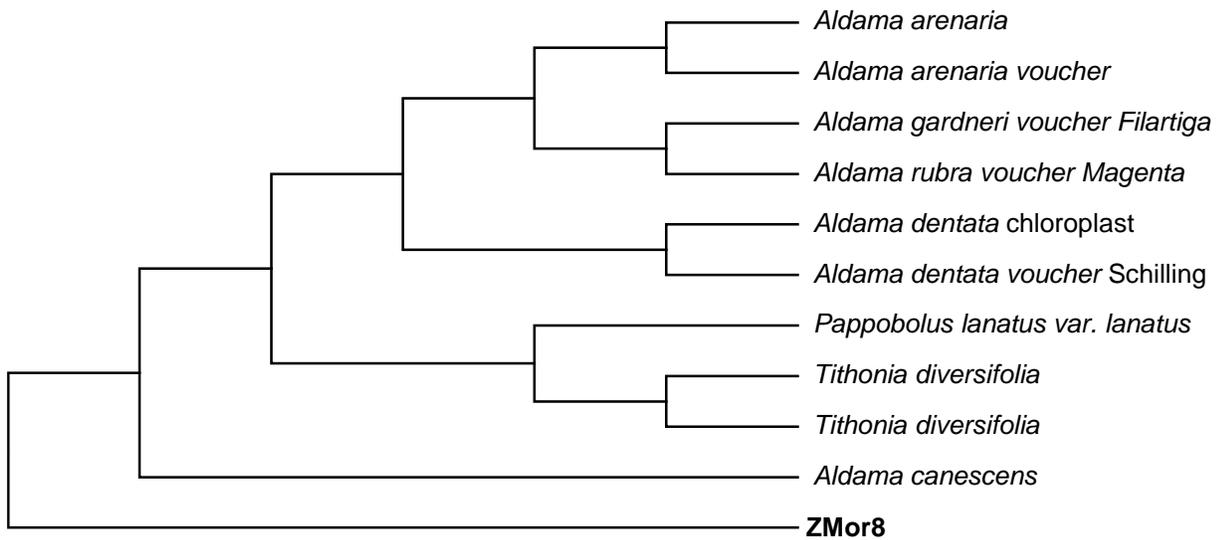


FIGURA 23 Análisis de máxima verosimilitud de ZMor8

Se muestra el árbol con la probabilidad logarítmica más alta (-2087,0648). Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron automáticamente mediante la aplicación de los algoritmos Neighbor-Join y BioNJ a una matriz de distancias por pares estimadas utilizando el enfoque de Máxima Verosimilitud Compuesta (MCL), y luego seleccionando la topología con un valor de verosimilitud superior. El análisis involucró 11 secuencias de nucleótidos.

Vidal *et al.* (2010) mencionan a una especie de *Ipomoea* en un estudio realizado para el control de diversas malezas donde *Ipomoea nil* resulta con un porcentaje mínimo de control con glifosato. Monquero *et al.* (2003) por su parte, mencionan a *Ipomoea triloba* tolerante al glifosato con un mecanismo de acción referido a su poca translocación. Takano *et al.*, (2013) hacen mención a géneros resistentes al glifosato entre ellas *Ipomoea spp.* En nuestras muestras encontramos a *Ipomoea triloba* Qmor9 (Figura 24) la cual concuerda con los autores antes mencionados, por lo menos en el género. Cabe señalar que esta especie fue consistente en casi todos los sitios de muestreo.

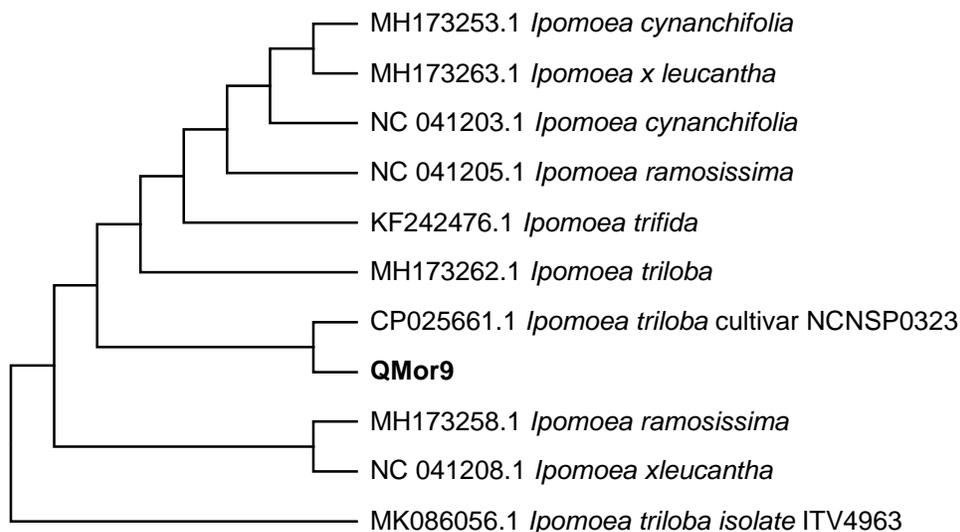


FIGURA 24 Análisis de máxima parsimonia de QMor9

La historia evolutiva se infirió usando el método de Máxima Parsimonia. Se muestra un árbol de los 10 más parsimoniosos (longitud = 387). El árbol de MP se obtuvo utilizando el algoritmo de Reinjerto de bisección de árbol (TBR). El análisis incluyó 11 secuencias de nucleótidos obtenidas del NCBI realizando un previo alineamiento BLASTN. Se eliminaron todas las posiciones que contienen gaps y datos faltantes.

En la Figura 25, observamos a la muestra más cercana a *Echinacea paradoxa*. En base de datos que registran a malezas resistentes al glifosato, no se encontró mencionada a *Echinacea paradoxa* o al menos su género. Sin embargo, Mobin *et al.*, (2015) menciona que en *Echinacea purpurea* el glifosato tiene efecto en el crecimiento tisular y produce una reducción en los metabolitos secundarios en la vía fenólica. En la vía indólica el glifosato es contrarrestado presentando una acumulación de los metabolitos secundarios.

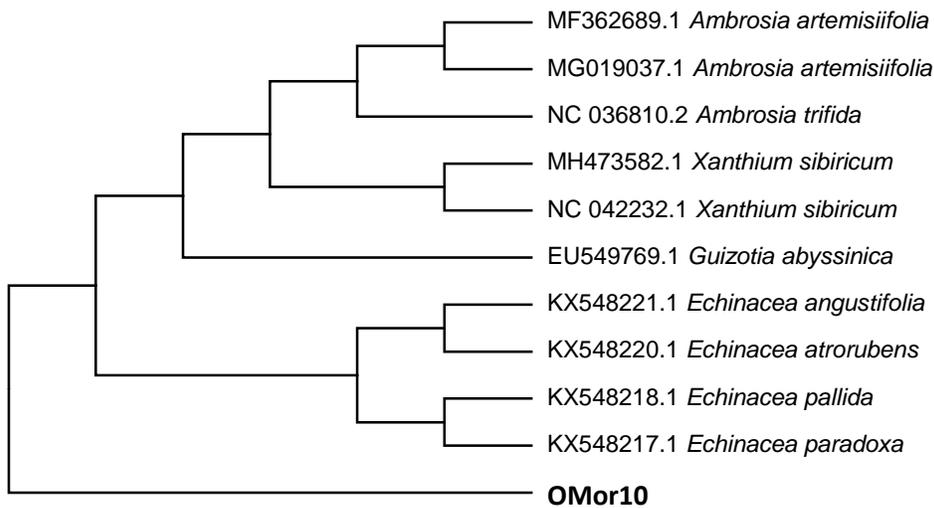


FIGURA 25 Análisis filogenético molecular por el método de máxima verosimilitud de OMor10.

La historia evolutiva se infirió mediante el método de máxima verosimilitud basado en el modelo de TGR. Se muestra el árbol con la mayor probabilidad de registro (-2489.3704). El análisis incluyó 11 secuencias de nucleótidos obtenidas del NCBI realizando un previo alineamiento BLASTN. Se eliminaron todas las posiciones que contienen gaps y datos faltantes.

Commelina erecta es mencionada con gran tolerancia al organofosforado glifosato. Nisensohn y Tuesca (2001) reportan el uso de una dosis 6 l.p.f./ha de glifosato (L.S. 360 g.e.a./l), en plantas jóvenes de 6 a 9 cm mostrando un control relativo, sin embargo, para el control de ejemplares mayores fue insatisfactorio. Takano *et al.* (2013) menciona a otra especie de *Commelina* resistente al glifosato. En la Figura 26 observamos la cercanía de nuestra planta a *Commelina reptans*.

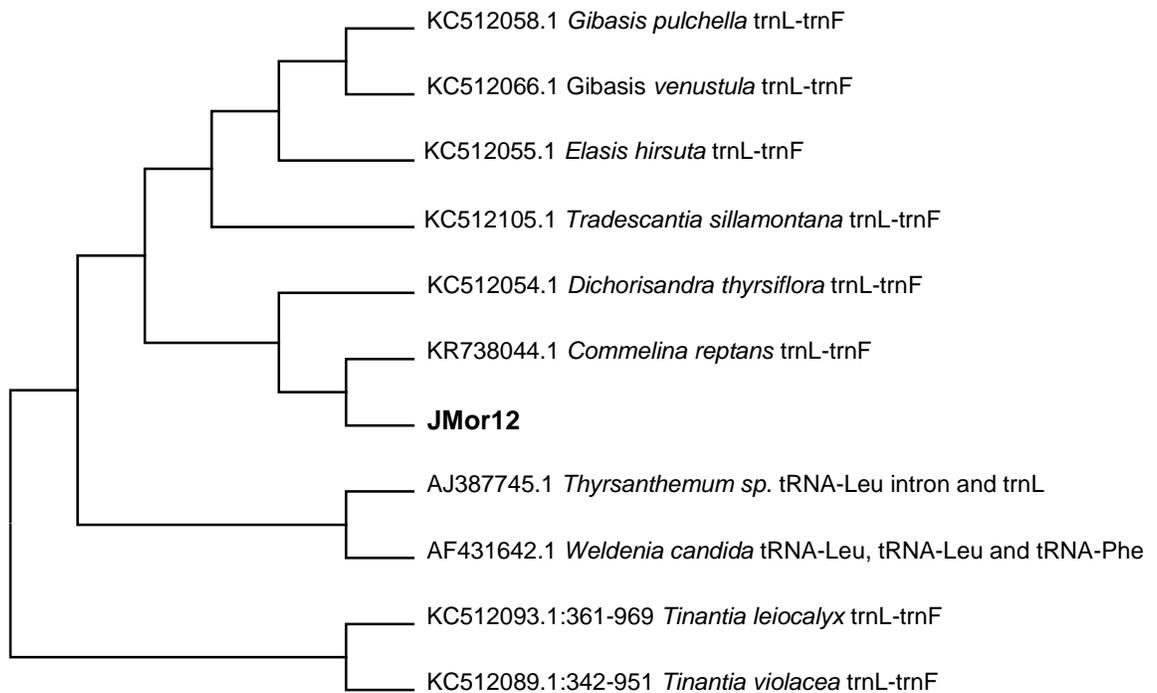


FIGURA 26 Análisis de máxima parsimonia de Jmor12.

La historia evolutiva fue inferida usando el método de Máxima Parsimonia. El análisis incluyó 11 secuencias de nucleótidos obtenidas de NCBI realizando previamente un alineamiento BLASTN. Se eliminaron todas las posiciones que contienen gaps y datos faltantes.

En la Figura 27 se muestran las secuencias de las especies estudiadas, en este árbol se recopilan todas las muestras usando a *Amborella trichopoda* para enraizar el árbol. Cabe señalar que *Echinacea* sp. y *Aldama* sp. son las especies que aparecieron más recientemente, desde un punto de vista evolutivo. Este árbol concuerda con lo obtenido en el perfil de restricción de la Figura 20 en donde se ve claramente el perfil similar.

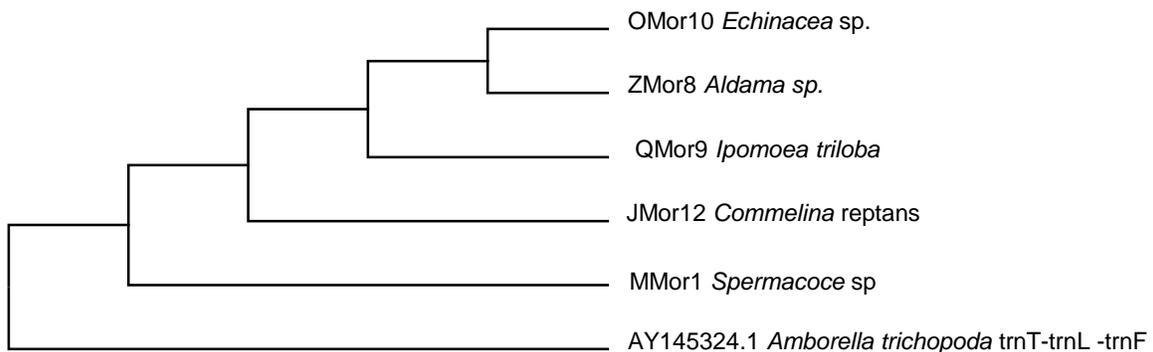


FIGURA 27 Análisis filogenético molecular mediante el método de máxima verosimilitud de las 5 muestras trabajadas.

El historial evolutivo se infiere utilizando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo de tiempo general. Se muestra el árbol con la mayor probabilidad logarítmica (-2272.5480). Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron automáticamente aplicando los algoritmos de unión de vecinos y BioNJ a una matriz de distancias por pares estimadas utilizando el enfoque de máxima verosimilitud compuesta (MCL) y luego seleccionando la topología con un valor de probabilidad de registro superior. El análisis incluyó 5 secuencias de nucleótidos de las muestras y 1 obtenida de NCBI. Se eliminaron las posiciones que tenían gaps y datos faltantes. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA.

VI. CONCLUSIONES

Se lograron identificar 5 especies: *Spermacoce* sp. (Mmor1), *Aldama* sp.(Zmor8), *Ipomoea* sp. (Qmor9), *Commelina* sp. (Jmor12), *Echinacea* sp. (Omor10) Ninguno de los géneros identificados está reportados como resistentes a glifosato en México. Consideramos que se requieren otros ensayos que permitan estudiar las secuencias de *epsps* y así poder detectar el mecanismo de resistencia de estos biotipos. Con lo estudiado podría deberse a una resistencia en sitio target o también por modificación fisiológica que evite la traslocación del herbicida. Estos estudios más específicos nos ayudaran a observar las posibles mutaciones en los aminoácidos, o sobreexpresión del gen para poder definir con exactitud el mecanismo de resistencia que ejercen estas malezas. Finalmente es importante identificar plantas con resistencia a herbicidas para poder desarrollar un control efectivo de estas y evitar que estos compuestos impacten al ambiente negativamente, así mismo prevenir la resistencia a otros herbicidas. específicamente al herbicida glifosato, es importante el control de su uso, ya que el uso descontrolado ha causado daños en seres vivos.

VII. RECOMENDACIONES

Continuar con evaluaciones enfocadas a identificar malezas resistentes y/o tolerantes a glifosato a nivel morfológico y de molecular y así determinar su estrategia de resistencia.

Es necesario que en las investigaciones en la ampliación del gen *epsps* utilizar un indicador.

Es necesario continuar con ensayos sobre la purificación del ADN con la finalidad de obtener una mejor amplificación.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Ahrens W.H. 1994. Herbicide Handbook. 7 ed. Weed Science Society of America, Champaign, Illinois (USA): WSSA, 1994. 352 p.
- Alarcón-Reverte R., García A., Jasieniuk M., Lanini T., Hanson B., Fischer A. 2011. Abstracts 2011 Meeting of the Weed Science Society of America, February 7-10, Portland, OR, Abstract No. 114, <http://wssaabstracts.com/public/4/abstract-114.html>
- Alcántara-de la Cruz R., Rojano-Delgado A. M., Giménez M. J., Cruz-Hipolito H. E., Domínguez-Valenzuela J.A., Barro F. y De Prado, R. 2016a. Caracterización de los primeros mecanismos de resistencia en *Leptochloa virgata* resistente al glifosato. *Frontiers in Plant Science* 7: 1742, 1-11pp.
- Alcántara-de la Cruz R., Rojano-Delgado A. M., Giménez M. J., Cruz-Hipolito H. E., Domínguez-Valenzuela J.A., Barro F. y De Prado, R. 2016b. Mecanismos de sitio target y no objetivo desarrollados por poblaciones de mendigos peludos resistentes a glifosato (*Bidens pilosa* L.) de México. *Frontiers in Plant Science* 7: 1492.
- Antoniou M., Habib M. E. M., Howard C. V., Jennings R. C., C. Leifert. RO Nodari, CJ Robinson and J. Fagan. 2012. Teratogenic effects of glyphosate-based herbicides: Divergence of Regulatory Decisions from Scientific Evidence. *Environmental & Analytical Toxicology* S4:006. doi: 10.4172/2161-0525.S4-006 1-13 pp.
- Araújo A. D., Monteiro R. and Abarkeli R. 2003. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. *Chemosphere* 52 (5): 799-804.

- Arellano-Aguilar O. y J. Rendón V.O. 2016. La huella de los plaguicidas en México. Greenpeace. Cd. de México, México. 39 pp.
- Baerson S. R., Tran M. and Brinker R. (2000). Characterization of a glyphosate-resistant *Eleusine indica* biotype from Malaysia. In: International Weed Control Congress. International Weed Science Society, Bangkok, 150.
- Baerson S., Rodriguez D., Biest N., Tran M., You J., Kreuger R., Dill G. M, Pratley E. J., Gruys, K. (2002). Investigating the mechanism of glyphosate resistance in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*). *Weed Science*, 50(6), 721-730. doi:10.1614/0043-1745(2002)050[0721: ITMOGR]2.0.CO;2.
- Barroso A.A.M., Galeano E., Albrecht A. J. P., dos Reis F.C, Filho R. V., (2015). Does sourgrass leaf anatomy influence glyphosate resistance *Comunicata Scientiae*. 6: 445-453. <http://dx.doi.org/10.14295/cs.v6i4.1124>
- Benbrook C. 2016. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environ Sci Eur*. 28(3): 1-15.
- Bird S.B., Sutherland T.D., Gresham C., Oakeshott J., Scott C., Eddleston M. (2008). OpdA, a bacterial organophosphorus hydrolase, prevents lethality in rats after poisoning with highly toxic organophosphorus pesticides, *Toxicology*. 247(2-3):88-92. doi: 10.1016/j.tox.2008.02.005. Epub 2008 Mar 10.
- Blanco Y. y Leyva A. Las arvences en el agroecosistema y sus beneficios agroecologicos como hospederas de enemigos naturales. *Cultivos tropicales* (en línea) 2007,28(2) ,21-28(20 de septiembre del 2019). Disponible en: [https:// www.redalyc.org](https://www.redalyc.org).

Blanco, Y. y Leyva, A. Determinación del período crítico de competencia de las arvenses con el cultivo del frijol (*Phaseolus vulgaris*, L.). Cultivos Tropicales, 2011, vol. 32, no. 2, pp. 11-16.

Catizone P., Zanin G. 2001. Manejo de poblaciones de malezas resistentes a herbicidas 100 preguntas sobre resistencias. Malerbologia. Patron Editore. Bologna (Italia). 925 p.

Cerrudo D., Page E. R., Tollenaar M., Stewart G. y Swanton C. J. Mechanisms of yield loss in maize caused by weed competition. Weed Science, 2012, vol. 60, pp. 225-232.

Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. (CONABIO). [noviembre 2019]. Disponible en web: <http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/biosecuridad/doctos/biosecuridad.html>

Chueca C., Cirujeda A., De Prado R., Diaz E., Ortas L., Taberner A. y Zaragoza. 2005. Colección de folletos sobre manejo de poblaciones resistentes en *Papaver*, *Lolium*, *Avena* y *Echinochloa*. SEMh Grupo de Trabajo CPRH.

CIBIOGEM, 2019. Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados, octubre 2019 en línea: <https://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/index.php> (CFIA) Canadian Food Inspection Agency. 2012. <https://www.inspection.gc.ca/food/eng/1299092387033/1299093490225> (Consulta: junio 2018).

Cruz-Hipolito H., Osuna M.D, Herdia A., Ruiz-Santaella J.P., De Prado R. (2009). Nontarget mechanisms involved in glyphosate tolerance found in *Canavalia ensiformis* plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57:4844-4848.

- Cantu-Iris, M., C. Macías-de-la-cerda, JM Chavez, R. Rodríguez-Herrera, CN Aguilar y H. Reyes-Valdes, 2012. Detección simultánea de tres eventos transgénicos en cultivos utilizando la reacción en cadena de polimerasa multiplex (PCR). *Afr. J. Agric. Res.*, 7: 1276-1281.
- Cuervo J. 2007. "Interacción del glifosato (Roundup®) con la biota microbiana del suelo y comportamiento de este herbicida en tres suelos del Tolima-Colombia, bajo condiciones controladas" (Maestría en Agronomía), Bogotá, Universidad Nacional de Colombia. Tesis.
- De Jesús R., Moreno N. y Martínez J. A. 2005. Ensayo de dos métodos de extracción de ADN de ratón para ser usado en el control genético de ratones consanguíneos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *Revista Científica* 15 (2): 134-140.
- Del Valle C., Rodríguez A. y Espinoza M. 2004. Comparación de tres métodos de extracción de ADN a partir de restos óseos. Complejo de Ciencias Forenses del Organismo de Investigación Judicial, Heredia, Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 52 (3): 717-725.
- Duke S.O y Powles S.B. 2008. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Manag. Sci.* 64, (4) 319-325 pp.
- Duke S. O. and Dayan F. E. 2001. Classification and mode of action of the herbicides. Pp: 31-44. *In: Uso de Herbicidas en la Agricultura del Siglo XXI.*
- Giesy J.P., Dobson S., and Solomon K.R., 2000. Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup Herbicide. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 167:35-120.

Gómez G., R. ,2005, Efecto del control de malezas con paraquat y glifosato sobre la erosión y pérdida de nutrientes del suelo en cafeto Agronomía Mesoamericana, vol. 16, núm. 1pp. 77-87 Universidad de Costa Rica Alajuela, Costa Rica.

Grube A., Donaldson D., Kiely T., Wu L., 2011. Pesticides Industry Sales and Usage. US EPA, Washington, DC. 1-33 pp.

Guyton K.Z., Loomis D., Grosse Y., El Ghissassi F., Benbrahim-Tallaa L., Guha N., Scoccianti C, Mattock H, Straif K.,2015 .Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate.

Hamlin H.J y Guillette L.J. Birth Defects in Wildlife: The Role of Environmental Contaminants as Inducers of Reproductive and Developmental Dysfunction. Syst Biol Reprod Med, 2010; 56(2):113–21. <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/19396360903244598>

Heap I. y LeBaron H. 2001 Introduction and overview of resistance. In Herbicide Resistance and World Grains: Powles S.B., Shaner D.L., Eds, CRC Press, Boca Raton, FL, pp 1–22.

Heap I. 2014.Global perspective of herbicide-resistant weeds. Pest Management Vol.70, Issue 9,Special Issue: Global Herbicide Resistance Challenge, 2014, p. 1306-1315.

Heap I. 2016. International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Online: www.weedscience.org

Heap I. 2019. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Online. Internet. Tuesday, october 8, 2019. Available www.weedscience.org

ISAAA, 2019 Servicio Internacional para la Adquisición de Aplicaciones Agrobiotecnológicas (ISAAA) en línea: <http://www.isaaa.org/> James C., 2013, Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2013. ISAAA Brief No.46. International.

Service for the Acquisition of Agribiotech Applications, Ithaca, NY. Stevens, W. D., C. Ulloa U., A. Pool y O. M. Montiel (eds.), 2001.

Jasieniuk M., Ahmad R., Sherwood A., Firestone J., Perez-Jones A., Lanini W. T., Mallory-Smith C., Stednick Z. 2008. Glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) in California: distribution, response to glyphosate, and molecular evidence for an altered target enzyme. *Weed Sci.* 56:496–502.

Jones D. K., Hammond J. I. y Relyea R. A. 2011. Competitive stress can make the herbicide Roundup, *Environ Toxicol Chem.* Febrero de 2011, 30 (2): 446-454. doi: 10.1002 / etc.384.

Kaundun S.S., Dale R.P., Zelaya I.A., Dinelli G., Marotti I., McIndoe E., and Cairns A. 2011. A Novel P106L Mutation in EPSPS and an Unknown Mechanism Act Additively to Confer Resistance to Glyphosate in a South African *Lolium rigidum* Population. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59:3227-3233.

Knauer K, Hommen U. Sensitivity, variability, and recovery of functional and structural endpoints of an aquatic community exposed to herbicides. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2012; 78:178–83. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22153306>.

- Krga I., Pavlovic D., Anđelkovic A., Đurovic S., Marisavljevic D. 2013. La resistencia de las poblaciones de malezas de huerta al glifosato. *Zaštita Bilja* 64: 125-133.
- Manalil S., Busi R., Renton M. and Powles S.B., 2011. Rapid evolution of herbicide resistance by low herbicide dosages. *Weed Sci.* 59: 210-217. <http://dx.doi.org/10.1614/WS-D-10-00111.1>
- Mc Lean M., 2011. A review of the environmental safety of the CP4 EPSPS protein. *Environmental Biosafety Research* 10, 5–25 pp
- Mobin M., Wu C.-H., Tewari R.K., Paek K.-Y., 2015. Studies on the glyphosate-induced amino acid starvation and addition of precursors on caffeic acid accumulation and profiles in adventitious roots of *Echinacea purpurea* (L.) Moench. *Plant Cell Tissue Organ Cult. PCTOC* 120, 291–301.
- Monquero P.A.; Christoffoleti P.J. Dinâmica do banco de sementes em áreas com aplicação freqüente do herbicida glyphosate. *Planta Daninha*, v. 21, n.1, p.63-69, 2003.
- Nicholls C. L. & Altieri, M. A. 2012. Plant biodiversity enhances bees and other insect pollinators in agroecosystems. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 33: 257–274.
- Nisensohn L. y Tiesca D., 2001. Especies de Malezas asociadas al nuevo modelo productivo de la región: *Commelina erecta*. *Revista Agromensajes. Fac Cs. Agrarias, UNR*, 5: 10-11.
- Nair RS, Fuchs RL, Schuette SA (2002). Roundup Ready 1 Soybeans Current Methods for Assessing Safety of Genetically Modified Crops as Exemplified by Data on. *Toxicol. Pathol.*, 30 (117).

- Olea N., y Fernández M.F. 2001. Plaguicidas persistentes. Laboratorio de Investigaciones Médicas, Hospital Clínico Universidad de Granada. Madrid, España. pp 1-18.
- Pérez-López M., González-Torralva F., Cruz-Hipólito H.E., Santos F., Domínguez-Valenzuela J.A., De Prado R. 2014. Characterization of glyphosate- resistance tropical sprangletop (*Leptochloa virgata*) and its alternative chemical control in Persian lime. *Weed Science* 62, 441–450. 10.1614/WS-D-13-00177.1.
- Pimentel D. 2009. Environmental and economic costs of the application of pesticides primarily in the United States. In: *Integrated Pest Management: Innovation-Development Process* (Vol. 1) (P Rajinder and A Dhawan eds). Springer, 88-111.
- Powles S. B. 2008. Evolved glyphosate-resistant weeds around the world: Lessons to belearnt. *Pest Management Science*, 64, 360–365 pp.
- Powles SB, Yu Q. 2010. Evolution in action: plant resistance to herbicides. *Annual Review of Plant Biology* 61, 317-347pp.
- Preston C., Stewart V., Storrie A. & Walter, S. 2006. Integrated weed management in Australian cropping systems CRC for Australian Weed Management, 248 pp.
- Primost J. E., Marino D. J. G., Aparicio V. C., Costa J. L. & Carriquiriborde P. 2017. Glyphosate and AMPA, “Pseudo-persistent” Pollutants under Real-world Agricultural Management Practices in the Mesopotamic 17 Pampas Agroecosystem, Argentina. *Environ Pollut.* 229: 771-779

- Rendon-von Osten J. y Dzul-Caamal R. 2017. Residuos de glifosato en aguas subterráneas, agua potable y orina de agricultores de subsistencia de localidades de agricultura intensiva: una encuesta en Hopelchén, Campeche, México. *Revista internacional de investigación ambiental y salud pública*, 14 (6), 595. doi: 10.3390 / ijerph14060595.
- Ronchi C. P., Silva A. A.; Serrano I., A. I.; Cattaneo I. F., Santana E. N., Ferregueti G. A. 2008. Manejo de plantas daninhas na cultura do mamoeiro. *Planta Daninha* 26(4): 937-94.
- Ross M.A., Lembi C.A. 2009. *Applied weed science: including the ecology and management of invasive plants*. Pearson Prentice Hall: USA. 561 p.
- Ruiz-Toledo, J., Castro R., Rivero-Pérez N., Bello-Mendoza R. & Sánchez D. 2014. Occurrence of Glyphosate in Water Bodies Derived from Intensive agriculture in a tropical region of southern Mexico. *Bull Environ Contam Toxicol*. Septiembre de 2014; 93 (3): 289-93. doi: 10.1007 / s00128-014-1328-0.
- Saunders S. P., Ries L., Oberhauser K. S., Thogmartin W. E & Zipkin E. F. 2017. Local and Cross-seasonal Associations of Climate and Land Use with Abundance of Monarch Butterflies *Danaus plexippus*. *Ecography*. 41(2): 278-290.
- Shaner D.L, Lindenmeyer R.B. and Ostlie M.H. 2012. What have the mechanisms of resistance to glyphosate taught us? *Pest Manag. Sci.* 68: 3-9. <http://dx.doi.org/10.1002/ps.2261>
- Simarmata M., and Penner D. 2008. The basis for glyphosate resistance in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) from California. *Weed Science* 56:181-188. p.

- Stevens W. D., C. Ulloa U., Pool A. y Montiel O. M. (eds.), 2001. Flora de Nicaragua. Vol. 85, tomos I, II y III. Missouri Botanical Garden Press. St. Louis, Missouri.
- Villaseñor R., J. L. y F. J. Espinosa G., 1998. Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario. Fondo de Cultura Económica. México, D.F.
- Taberlet P., Coissac E., Pompanon F., Gielly L., Miquel L. C., Valentini A., Vermet T., Corthier C. Brochmann and Willerslev E. E. 2007. Power and limitations of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant DNA barcoding. *Nuc. Acids Res* 35:14.
- Takano H. K., Oliveira J., R. S. de, Constantin J., Biffe D. F., Franchini L. H. M., Braz G. B. P.; Rios F. A., Gheno E. A., Gemelli A. Efeito da adição do 2,4-D ao glyphosate para o controle de espécies de plantas daninhas de difícil controle. *Revista Brasileira de Herbicidas*, v.12, p.1-13, 2013. <https://doi.org/10.7824/rbh.v12i1.207>.
- Tesfamariam T., Bott S., Cakmak I., Römheld V., Neumann G. 2009. Glyphosate in the rhizosphere—Role of waiting times and different glyphosate binding forms in soils for phytotoxicity to non-target plants. *European Journal of Agronomy* 31, 126–132.
- Vidal R.A., Rainero H.P., Kalsing A., Trezzi M.M. 2010. Prospección de las combinaciones de herbicidas para prevenir malezas tolerantes y resistentes al glifosato. *Planta daninha* 28: 159-165.
- Villalba A. Resistencia a herbicidas. Glifosato Ciencia, Docencia y Tecnología, vol. XX, núm. 39, noviembre, 2009, pp. 169-186 Universidad Nacional de Entre Ríos Concepción del Uruguay, Argentina.

Watson J., Baker T., Bell S., Gann A., Levine M. & Losick R. 2004 *Molecular biology of the gene*. San Francisco: Pearson-Benjamin Cumings and Cold Spring Harbor Laboratory Press. 5ta ediciónroja.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



Ayala, Morelos a 19 de septiembre del 2023

DR. GREGORIO BAHENA DELGADO
DIRECTOR DE LA EESX – UAEM
P R E S E N T E

Por medio del presente, los revisores de la tesis que lleva por título: IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE MALEZAS TOLERANTES A GLIFOSATO EN LA ZONA ORIENTE DEL ESTADO DE MORELOS que ha realizado la pasante de la Licenciatura en **Ingeniería Fitosanitaria, Carmen Yazmin Rojas Cardona**, otorgamos nuestro voto de aprobación para su impresión por haberse realizado las correcciones consideradas pertinentes de nuestra parte.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

Dr. David Antonio Moreno Medina

Dra. Yessica Flor Cervantes Adame

Dr. Antonio Castillo Gutiérrez

Dra. Teresa de Jesús Rodríguez Rojas

Dra. Alma Cuellar Sánchez



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

DAVID ANTONIO MORENO MEDINA | Fecha:2023-09-19 21:47:12 | Firmante

wWjZIJOSmYu813EIWnzSA2UDENJh7I9QX0ErP7sq71WFmXG2PK9LEP3TdPNiKzUgD8JSuj9zjFMSfb2tGnPXUuaPcAvNO8OZG+zvslwMUTj0dcz8MvCszKAZ7SmOGagKShYR33vUU0uHgNYd4rT1F6WsY1n6wPeEge34o3ETTreBn66W73ewp1ltHjI4TJ0PvUK38HOqS5gL1WGtbxM/+u7DXt4HrEYvEMwbyITWBYPHwsGuiKQzJAU2t3N3NbvDbB4RLyrfU9Bq0Fu+ihP+8TXyQEsDmd8sKzv9goMrwBYANflugOaAZdee6sv0+QrH4GPcOmV4JmZ243c4PDhEg==

YESSICA FLOR CERVANTES ADAME | Fecha:2023-09-19 21:53:54 | Firmante

Q2AKi6eYtyYONU/+5kzGqx1tcyTAFUe//Vu+ZJxu4zOch35qU39DCdlMd2knw5J5posNI6FB9yeeEfzk6KPKgkkUinSTj8Qyi8HC/uU9uBHfqIPF70hDyymMy9f5Gmz4e13fCP85ELc2pl+46R5GyVZ2vGY+OmpjIAUsc4vQpEsBNTpPmiCkSD4hN2FoWzVvKcWw/pQWD/DUM5XaQns4tcKjjaCQVcUqORc1472u9t1IsOzCoeRLyx1Q08i3o9vN5UBt9/niLt0F9JChCF04GM7ZIMxJzNu9nLDGleKOW5LzjzjmvLB/9LRHQJALpliiWMMFshPzyRDPj7QfXECmLg==

ANTONIO CASTILLO GUTIERREZ | Fecha:2023-09-20 01:11:35 | Firmante

dzcimxAsGpNiXnRY3pDRORuqnCyKf2dqgdfy5IWBbmsurXBxQg3IAkxLVG6hJbfeIliFT/AJ5J2/DhjsvVOdf3VMfDciE1HjZp5Wl0y53AlioS27+7UhtJQqe0PQHqJxjggFa2ZRSJNT4nupBQEK5CJ1FzQiA2MhotLQxSjRmTLFYsJfFUbX/+v9hmV/T+SyTUUhOKzgb/fB4gz5cYR6u5hprKQixTuEesURi5MMiDhdlnlw7YjYDHwjC6HXIH0e6TO9KERahwiKbDS/MFDBBonCM3cgaO4G+atAPvcDaje7b146fEhNpvQwZTl9jKYa8e4z4JS1H8vtSUCJm1w==

TERESA DE JESUS RODRIGUEZ ROJAS | Fecha:2023-09-20 10:12:31 | Firmante

AV7li1azVpYj5H93/5S9yWJ4D3sAA2D83fV/pEPJVkoljuf2ywKQMoessUJNkzNbAj3s1exllPhHHSXAs0Uip03cPYEfcxPiiSr66Q/1LuGeYas/QEcbJ2ZyL4WbT/TpQPxohm3nrOajhd/pezeh9ObVPvnijhTQiRmVKmt9XlrcAk2fRPhKM05qahWK4IX2rVT9CLEWUlwfkVxgXC0noUX80oQy4Zs7/ir4H7QL6OR6p9fK85bjGo7ixIN9T60C89pwwZp43PXGD3gyTVU1VETJPd9wqUTqcdzXAtsXZ/TE2FHU9TYTuLh7VML3SEP0p5ZP73b6gTXkEjjMzCA==

ALMA CUELLAR SÁNCHEZ | Fecha:2023-09-21 16:29:59 | Firmante

F6Owla/E3A/B59eWc5yTsqxekLokMcoBvQkcYg5p73KiDRU+ bqQozG2+0fPRf3Mev3eKcGvFIPjFhf/zhmLHKj4PcBXDccci081WKUghrArst2xAwk4EC5mh0Ji1B2YzdpLn+2T0Ae4nIPUZFmIr3M7GewDV5NrzFQ1q4w3n1SpJetttnKmSS4CVxJdFD9243tAMNSWt5759DeEdBid8ZZNRSE5Jg48NUpUvt0xwMo4DqeU6XlipaHqGFiqf+eOvAxb0UvVQ9j1y6NCrTc9r3kDkqp9zu4LcKeQESexc2F2FctjyWKRtl/yoxRiHui0QuBOJRikVB9e0R/4zmqa==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



EXluMknKh

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/ARqLBZQuXk2mGZv7Upu9MiyAhdhojyVq>

