

DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA CP4 EPSPS EN PLANTAS ARVENSES EN CULTIVOS DE ALGODÓN (*Gossypium hirsutum*) TRANSGÉNICO EN LA COMARCA LAGUNERA, MÉXICO

DETECTION OF CP4 EPSPS PROTEIN IN WEED FLORA IN TRANSGENIC COTTON (*Gossypium hirsutum*) CROPS IN COMARCA LAGUNERA, MÉXICO

Cándido Márquez-Hernández^{1*}, C. Omar Puente-Valenzuela¹, Gisela Muro-Perez¹, J. Luis García-Hernández²,
E. Omar Rueda-Puente³, A. Noé Moreno-Hernández²

¹Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Juárez del Estado de Durango (UJED). Avenida Universidad s/n. Fraccionamiento Filadelfia. Gómez Palacio, Durango. México. (canomh2@yahoo.com.mx). ²Facultad de Agricultura y Zootecnia. UJED. ³Domicilio Conocido. Venecia, Durango. México. Universidad de Sonora. Boulevard. Luis Encinas y Rosales s/n. Colonia Centro. Hermosillo, Sonora.

RESUMEN

El flujo génico se puede presentar entre especies de plantas silvestres y cultivadas. Las interacciones entre el algodón (*Gossypium hirsutum*), plantas arvenses y la familia Malvaceae no son excepciones. Hay evidencias de flujo génico entre cultivos genéticamente modificados y plantas silvestres. La probabilidad del aumento de flujo de genes en el algodón transgénico ha aumentado porque se ha sembrado en el área durante 18 años. El objetivo de este estudio fue detectar la presencia de la proteína CP4 EPSPS en plantas arvenses en cultivos de algodón transgénico en Coahuila y Durango, México. En Durango y Coahuila se obtuvieron 15 y 20 especies de arvenses de 10 familias botánicas: Amaranthaceae, Asteraceae, Chenopodiaceae, Convolvulaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Malvaceae, Nyctaginaceae, Poaceae y Solanaceae; ocho de ellas se encontraron en ambos estados. *Malvastrum coromandelianu*, *Sphaeralcea angustifolia*, *Anoda cristata* y *Sida hederacea* son especies de la familia Malvaceae y se identificaron en la Comarca Lagunera. La proteína CP4 EPSPS no se detectó en las plantas arvenses presentes en el agroecosistema de algodón transgénico en la Comarca Lagunera.

Palabras claves: Organismos genéticamente modificados, proteínas transgénicas, biodiversidad, listados florísticos, contaminación cruzada, flujo génico.

ABSTRACT

Gene flow can appear among wild and cultivated plant species. The interactions among cotton (*Gossypium hirsutum*), weed flora and the Malvaceae family are not exceptions. There are evidences of gene flow among genetically modified crops and wild plants. The probability of greater gene flow in transgenic cotton has increased, given that it has been sown in the area during 18 years. The objective of the present study was to detect the presence of the CP4 EPSPS protein in weed flora in transgenic cotton crops in Coahuila and Durango, Mexico. In Durango and Coahuila 15 and 20 weed species of 10 botanical families were obtained: Amaranthaceae, Asteraceae, Chenopodiaceae, Convolvulaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Malvaceae, Nyctaginaceae, Poaceae and Solanaceae; eight of these were found in both states. *Malvastrum coromandelianu*, *Sphaeralcea angustifolia*, *Anoda cristata* and *Sida hederacea* are species of the Malvaceae family and were identified in the Comarca Lagunera. The CP4 EPSPS protein was not detected in weed plants present in the agrosystem of transgenic cotton in the Comarca Lagunera.

Key words: Genetically modified organisms, transgenic proteins, biodiversity, floristic lists, cross contamination, gene flow.

INTRODUCTION

Weeds are plants of the complete flora of an agrosystem (Zamorano, 2006), and pest weeds are undesired plants present in the crops which can cause economic damage. Most of the floristic investigations in agrosystems are limited to the analysis of pest weeds (Molina *et al.*,

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: abril, 2015. Aprobado: julio, 2015.

Publicado como ARTÍCULO en Agrociencia 49: 739-747. 2015.

INTRODUCCIÓN

Las arvenses son las plantas de la flora completa de un agroecosistema (Zamorano, 2006) y las malezas son plantas no deseadas presentes en los cultivos, que pueden causar un daño económico. La mayoría de las investigaciones florísticas en agroecosistemas se limitan al análisis de malezas (Molina *et al.* 2008), pero también se han estudiado las plantas arvenses en diversos agroecosistemas (Masalles, 2004; Blanco y Leyva, 2007; Sánchez y Guevara, 2013), como el cultivo de algodón (Bükün, 2005; Economou *et al.*, 2005).

El flujo génico es el cambio en la frecuencia de alelos por el movimiento de gametos de una población a otra (Slatkin, 1987; Snow, 2002), y existe evidencia del flujo génico en ecosistemas naturales (Ellstrand *et al.*, 1999; Belanger *et al.*, 2003; Ellstrand 2003) y en distintos agroecosistemas (Hall *et al.*, 2000; Hegde y Waines, 2004; Downey, 2006).

El flujo de genes de cultivos genéticamente modificados a especies silvestres fue estudiado (Riesberg *et al.*, 2003; Stewart *et al.*, 2003; Warwick *et al.*, 2003), así como la posible persistencia de los transgenes en la naturaleza (Warwick *et al.*, 2008). Bjerknes *et al.* (2007) realizaron estudios de polinización entre plantas cultivadas y plantas nativas; otros autores estudiaron polinización en especies transgénicas (Rieger *et al.*, 2002; Hoyle y Cresswell, 2007) y en México (Quist y Chapela, 2001).

El algodón y las plantas arvenses pueden ser específicas para uno o varios polinizadores (Gómez, 2002); el polen del algodón debe ser transportado por insectos, presentes en el algodón (Márquez *et al.*, 2014; Santana *et al.*, 2015), hacia las plantas arvenses, fomentando la polinización. Según Freire (2002), es posible la cruce de algodón transgénico con el convencional y con los nativos.

La familia de enzimas 5-enolpiruvil shikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) se encuentra en las plantas y los microorganismos. Las proteínas EPSPS (5-enolpiruvil shikimato-3-fosfato sintasa) catalizan la transferencia del grupo enolpiruvil desde el fosfenol piruvato (PEP) al 5-hidroxil de shikimato-3-fosfato (S3P) y producen fosfato inorgánico y 5-enolpiruvil shikimato-3-fosfato. En las plantas sin tolerancia al glifosato, se une la enzima endógena EPSPS con el glifosato y bloquea la biosíntesis de 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato y, por ende, priva a las plantas de

2008), but useful weed plants have also been studied in diverse agrosystems (Masalles, 2004; Blanco and Leyva, 2007; Sánchez and Guevara, 2013), such as the cotton crop (Bükün, 2005; Economou *et al.*, 2005).

Gene flow is the change in frequency of alleles by the movement of gametes of one population to another (Slatkin, 1987; Snow, 2002), and there is evidence of gene flow in natural ecosystems (Ellstrand *et al.*, 1999; Belanger *et al.*, 2003; Ellstrand, 2003) and in different agroecosystems (Hall *et al.*, 2000; Hegde and Waines, 2004; Downey, 2006).

Gene flow of genetically modified crops to wild species was studied (Riesberg *et al.*, 2003; Stewart *et al.*, 2003; Warwick *et al.*, 2003), along with the possible persistence of the transgenes in nature (Warwick *et al.*, 2008). Bjerknes *et al.* (2007) carried out various studies of pollination among cultivated plants and native plants; other authors present studies of pollination in transgenic species (Rieger *et al.*, 2002; Hoyle and Cresswell, 2007) and in Mexico (Quist and Chapela, 2001).

Cotton and useful weed plants can be specific for one or various pollinators (Gómez, 2002); cotton pollen must be transported by insects present in the cotton (Márquez *et al.*, 2014; Santana *et al.*, 2015) to the weed plants, fomenting pollination. According to Freire (2002), transgenic cotton can cross with conventional cotton and with native plants.

The family of enzymes 5-enolpiruvil shikimato-3-phosphate synthase (EPSPS) is found in plants and microorganisms. EPSPS proteins (5-enolpiruvil shikimato-3-phosphate synthase) catalyze the transference of enolpyruvyl group from phosphoenol pyruvate (PEP) to 5-hydroxyl of shikimato-3-phosphate (S3P) and produce inorganic phosphate and 5-enolpiruvil shikimato-3-phosphate. In the plants without tolerance to glyphosate, the endogenous enzyme EPSPS unites with the glyphosate and blocks the biosynthesis of 5-enolpiruvilshikimato-3-phosphate, and thus deprives the plants of essential amino acids and secondary metabolites. The CP4 EPSPS protein expressed in GM plants with tolerance to glyphosate is functionally equivalent to the endogenous EPSPS enzymes, except that CP4 EPSPS presents reduced affinity with glyphosate, preferring PEP, thus the enzyme CP4 EPSPS continues to function in the presence of glyphosate and produces the aromatic amino acids and other

aminoácidos esenciales y de metabolitos secundarios. La proteína CP4 EPSPS expresada en las plantas GM con tolerancia al glifosato es equivalente funcionalmente a las enzimas EPSPS endógenas, con la excepción de que la CP4 EPSPS presenta afinidad reducida con el glifosato, prefiriendo PEP, por lo que la enzima CP4 EPSPS continua funcionando en presencia del glifosato y produce los aminoácidos aromáticos y demás metabolitos necesarios para el crecimiento y el desarrollo normal de la planta (Steinrücken y Amrhein, 1980; Franz *et al.* 1997; Alibhai y Stallings, 2001; Center Environmental Risk Assessment, 2010; Zhang, 2015).

Doce países han aprobado la liberación al ambiente de al menos una de 30 líneas de plantas con la proteína CP4 EPSPS de siete especies de plantas. Los mecanismos principales por los cuales se puede introducir a la CP4 EPSPS en un ambiente no agrícola son: movimiento de semillas o propágulos y establecimiento de la planta GM fuera de las áreas cultivadas así como el flujo de genes desde la planta GM hasta una población naturalizada (o asilvestrada) de la misma especie de cultivo o a otros familiares compatibles sexualmente (Center Environmental Risk Assessment, 2010).

Para el agroecosistema algodón en México, se han registrado 118 especies de malezas (Villaseñor y Espinoza, 1998), mientras que en la Comarca Lagunera hay 20 malezas de nueve familias botánicas (Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, 1970; García y Acosta, 1975; Campo Agrícola Experimental La Laguna, 1984; Castro, 1992). Según Villaseñor y Espinoza (1998), hay una flora de 76 especies asociadas al algodón en Coahuila y 85 en Durango.

Lo anterior se agudiza ya que el algodón transgénico se cultiva en México desde en 1996 y al existir cruzamientos entre cultivos y plantas silvestres, es posible que las plantas arvenses contengan la proteína CP4 EPSPS. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue determinar si las plantas arvenses de la Comarca Lagunera, asociadas al algodón transgénico contienen la proteína CP4 EPSPS.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

Este estudio se realizó en la Comarca Lagunera que incluye partes de los estados de Coahuila y Durango. En el estado de Durango, la parcela experimental se ubicó en el municipio de

metabolites necessary for the growth and normal development of the plant (Steintücken and Amrhein, 1980; Franz *et al.*, 1997; Alibhai and Stallings, 2001; Center for Environmental Risk Assessment, 2010; Zhang, 2015).

Twelve countries have approved the release to the environment of at least one of 30 plant lines with the CP4 EPSPS protein of seven plant species. The principal mechanisms by which CP4 EPSPS can be introduced in a non-agricultural environment are as follows: movement of seeds or propagules and establishment of the GM plant outside of the cultivated areas, as well as the flow of genes from the GM plant to a naturalized or wild population of the same species of the crop or to other sexually compatible families (Center of Environmental Risk Assessment, 2010).

For the cotton agrosystem in Mexico, 118 species of weeds have been registered (Villaseñor and Espinoza, 1998), whereas in the Comarca Lagunera there are 20 weeds of nine botanical families (Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, 1970; García and Acosta, 1975; Campo Agrícola Experimental La Laguna, 1984; Castro, 1992). According to Villaseñor and Esponzoza (1998), there is a flora of 76 and 85 species associated to cotton in Coahuila and Durango, respectively.

This becomes exacerbated given that transgenic cotton has been cultivated in Mexico since 1996, and with the existence of crosses between crops and wild plants, it is possible that the weeds contain the CP4 EPSPS protein. Therefore, the objective of the present study was to determine whether the weed plants of the Comarca Lagunera associated to transgenic cotton contain the CP4 EPSPS protein.

MATERIALS AND METHODS

Study area

The study was carried out in the Comarca Lagunera, which includes part of the states of Coahuila and Durango. In the state of Durango, the experimental plot was located in the municipality of Gómez Palacio, in ejido Gregorio García (25° 45' 51.65" N and 103° 20' 34.68" W); for the state of Coahuila, the experimental plot was established in the ejido La Fe (25° 49' 1.74" N and 103° 12' 36.25" W) (Figure 1).

Two hectares in each ejido were cultivated during the 2011 agricultural cycle, using the transgenic cotton genotype Bollgard II® with resistance to insects and tolerance to herbicides.

Gómez Palacio, el ejido Gregorio García (25° 45' 51.65" N y 103° 20' 34.68" O); para el estado de Coahuila, la parcela experimental se estableció en el ejido La Fe (25° 49' 1.74" N y 103° 12' 36.25" O) (Figura 1).

Dos hectáreas en cada ejido se cultivaron durante el ciclo agrícola 2011 y se utilizó el genotipo de algodón transgénico Bollgard II® con resistencia a insectos y tolerante a herbicidas.

Listado de plantas arvenses

La recolecta consistió en tomar un ejemplar de cada una de las especies de plantas presentes en la parcela experimental de algodón transgénico en cada uno de los ejidos de la Comarca Lagunera. Los ejemplares se trasladaron al Laboratorio de Biología Agrícola de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez del Estado de Durango, donde se realizó la identificación botánica usando claves especializadas (Villareal, 1983; Lot y Chiang, 1986; Villaseñor y Espinosa, 1998; Elpel, 2000).

Prueba inmunológica

En cada especie recolectada en la parcela experimental de cada estado, se realizó la prueba para detectar la proteína CP4 EPSPS, y el genotipo de algodón que sirvió como testigo.

La prueba tuvo tres pasos: obtener la muestra del tejido vegetal; aplicar la técnica DAS-ELISA con tiras de flujo lateral con el QuickStix TM Combo Kit for Bollgard II R / Roundup Ready Rr. Leaff y sedd (EnviroLogix, Portland, ME, USA) usadas por

List of weed plants

The collection consisted of taking a sample of each one of the plant species present in the experimental plot of transgenic cotton in each of the ejidos of the Comarca Lagunera. The samples were taken to the Agricultural Biology Laboratory of the Biological Sciences Department of Juarez University of the State of Durango, where botanical identification was made using specialized codes (Villareal, 1983; Lot and Chiang, 1986; Villaseñor and Espinosa, 1998; Elpel, 2000).

Immunological test

In each species collected in the experimental plot of each state, the test was made for the detection of the protein CP4 EPSPS, as well as to the cotton genotype which served as control.

The test consisted of three phases: obtaining the plant tissue sample; application of the technique DAS-ELISA with three strips of lateral flow with QuickStix TM Combo Kit for Bollgard II R / Roundup Ready R. Leaff and sedd (EnviroLogix, Portland, ME, USA.) used by Huang *et al.* (2007) and Yue *et al.* (2008); and reading of results.

To obtain the plant tissue sample, a tissue section was cut with the Eppendorf tube, the sample was placed between the mouth of the Eppendorf tube and the pressure clip. When the clip was closed, the tissue remained in the Eppendorf tube and was pushed toward the conical lower part with an agitator.

The immunological test consisted of pouring 0.5 mL of buffing solution into an Eppendorf tube containing the sample.



Figura 1. Ubicación de las parcelas experimentales en la Comarca Lagunera en México.

Figure 1. Location of experimental plots in the Comarca Lagunera in México.

Huang *et al.* (2007) y Yue *et al.* (2008); y lectura de los resultados.

Para obtener la muestra de tejido vegetal, se cortó una sección del tejido con el tubo eppendorf, se colocó el tejido entre la boca del tubo eppendorf y el broche de presión. Al cerrarlo el tejido quedó en el tubo eppendorf, y se empujó hacia la parte inferior cónica con un agitador.

La prueba inmunológica consistió en verter 0.5 mL de solución amortiguadora a un tubo eppendorf que contenía la muestra, se insertó el agitador en el tubo eppendorf y se maceró el tejido hasta quedar completamente triturado. Después se aplicó la prueba DAS-ELISA con el QuickStix™ Combo Kit for Bollgard II R / Roundup Ready Rr. Leaff y sedd: introducir la tira que detecta la presencia de la proteína CP4 EPSPS, al tubo eppendorf. La presencia de la proteína CP4 EPSPS en las muestras fue positiva solo si la tira presentara dos franjas reveladas; la primera como testigo de la reacción antígeno – anticuerpo, y la segunda como detección de la proteína CP4 EPSPS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Listado de plantas arvenses

El listado florístico obtenido fue de 22 plantas arvenses pertenecientes a 10 familias botánicas. Las plantas arvenses presentes en el estado de Durango fueron 15 especies, y en el estado de Coahuila fueron 20 especies de plantas arvenses, pertenecientes a ocho y diez familias botánicas, respectivamente (Cuadro 1 y 2). Esta cantidad de plantas arvenses presentes supera al número de malezas mencionadas para la Comarca Lagunera (Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, 1970; García y Acosta, 1975; Campo Agrícola Experimental La Laguna, 1984; Castro, 1992). Pero Villaseñor y Espinoza (1998) señalan un número mayor de especies vegetales asociadas al algodón en los estados de Coahuila y Durango.

Las especies de plantas arvenses similares en ambos estados fueron 14; mientras que una y seis especies, respectivamente, para Durango y Coahuila no se encontraron en el otro estado (Cuadro 1 y 2). Las diferencias se deben a la variabilidad espacial y temporal de las comunidades, así como a la labranza, la rotación de cultivos y otras perturbaciones (Booth y Swanton, 2002; Perdomo *et al.*, 2004). Según Dauber *et al.* (2003), la composición florística está estrechamente correlacionada con las condiciones

The agitator was inserted in the tube and the tissue was macerated until it was completely triturated. Next, the DAS-ELISA test was applied with QuickStix™ Combo Kit for Bollgard II R / Roundup Ready R. Leaff and sedd, which consisted of introducing the strip that detects the presence of the CP4 EPSPS protein to the Eppendorf tube. The presence of the CP4 EPSPS protein in the evaluated samples was positive only when the strip presented two developed bands; the first as control of the antigen – antibody reaction, and the second as detection of the CP4 EPSPS protein.

RESULTS AND DISCUSSION

List of weed plants

The floristic list obtained was of 22 weed plants belonging to 10 botanical families. The weed flora present in the state of Durango were 15 species, and in the state of Coahuila were 20 weed species, belonging to eight and ten botanical families, respectively (Table 1 and 2). This amount of weed plants present surpasses the number of weeds mentioned for the Comarca Lagunera (Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, 1970; García and Acosta, 1975; Campo Agrícola Experimental La Laguna, 1984; Castro, 1982). However, Villaseñor and Espinoza (1998) indicate a higher number of plant species associated with cotton in the states of Coahuila and Durango.

The weed plant species similar in both states were 14; whereas one and six species, respectively, for Durango and Coahuila were not found in the other state (Tables 1 and 2). The differences are due to the spatial and temporal variability of the communities, as well as the cultivation, rotation of crops and other disturbances (Booth and Swanson, 2002; Perdomo *et al.*, 2004). According to Dauber *et al.* (2003), the floristic composition is closely correlated to the environmental conditions, cultivation practices and floristic richness of the surroundings, that is, the characteristics of the habitat are an important factor that determines the presence of species in a site.

Four species of the Malvaceae family were found: *Malvastrum coromandelianu*, *Sphaeralcea angustifolia*, *Anoda cristata* and *Sida hederacea*; and they are potentially more susceptible to presenting gene flow with CERA cotton (2010).

Cuadro 1. Presencia de la proteína CP4 EPSPS en plantas arvenses asociadas al algodón transgénico en el estado de Durango, México.**Table 1. Presence of the CP4 EPSPS protein in weed flora associated to transgenic cotton in the state of Durango, México.**

Núm.	Familia	Especie	Línea Control	CP4 EPSPS
1	Amaranthaceae	<i>Amaranthus hybridus</i>	*	
2	Asteraceae	<i>Helianthus laciniatus</i>	*	
3	Asteraceae	<i>Parthenium hysterophorus</i>	*	
4	Asteraceae	<i>Xanthium strumarium</i>	*	
5	Convolvulaceae	<i>Ipomoea purpurea</i>	*	
6	Euphorbiaceae	<i>Euphorbia hyssopifolia</i>	*	
7	Euphorbiaceae	<i>Euphorbia micromera</i>	*	
8	Fabaceae	<i>Hoffmanseggia glauca</i>	*	
9	Malvaceae	<i>Anoda cristata</i>	*	
10	Malvaceae	<i>Gossypium hirsutum</i>	*	*
11	Malvaceae	<i>Malvastrum coromandelianum</i>	*	
12	Malvaceae	<i>Sida hederacea</i>	*	
13	Poaceae	<i>Cynodon dactylon</i>	*	
14	Poaceae	<i>Echinochloa colona</i>	*	
15	Poaceae	<i>Sorghum halepense</i>	*	
16	Solanaceae	<i>Solanum eleagnifolium</i>	*	

Cuadro 2. Presencia de la proteína CP4 EPSPS en plantas arvenses asociadas al algodón transgénico en el estado de Coahuila, México**Table 2. Presence of the CP4 EPSPS protein in weed flora associated to transgenic cotton in the state of Coahuila, México.**

Núm.	Familia	Especie	Línea Control	CP4 EPSPS
1	Amaranthaceae	<i>Amaranthus hybridus</i>	*	
2	Amaranthaceae	<i>Tidestromia lauginosa</i>	*	
3	Asteraceae	<i>Helianthus laciniatus</i>	*	
4	Asteraceae	<i>Parthenium hysterophorus</i>	*	
5	Asteraceae	<i>Xanthium strumarium</i>	*	
6	Chenopodiaceae	<i>Salsola ibérica</i>	*	
7	Convolvulaceae	<i>Ipomoea purpurea</i>	*	
8	Euphorbiaceae	<i>Euphorbia hyssopifolia</i>	*	
9	Euphorbiaceae	<i>Euphorbia micromera</i>	*	
10	Fabaceae	<i>Hoffmanseggia glauca</i>	*	
11	Malvaceae	<i>Anoda cristata</i>	*	
12	Malvaceae	<i>Gossypium hirsutum</i>	*	*
13	Malvaceae	<i>Malvastrum coromandelianum</i>	*	
14	Malvaceae	<i>Sphaeralcea angustifolia</i>	*	
15	Nyctaginaceae	<i>Allionia incarnata</i>	*	
16	Poaceae	<i>Cenchrus ciliaris</i>	*	
17	Poaceae	<i>Chloris virgata</i>	*	
18	Poaceae	<i>Cynodon dactylon</i>	*	
19	Poaceae	<i>Echinochloa colona</i>	*	
20	Poaceae	<i>Sorghum halepense</i>	*	
21	Solanaceae	<i>Solanum eleagnifolium</i>	*	

ambientales, prácticas de cultivo y riqueza florística del entorno, es decir, las características del hábitat son un factor importante que determina la presencia de especies en un sitio.

Cuatro especies de la familia Malvaceae fueron encontradas: *Malvastrum coromandelianu*, *Sphaeralcea angustifolia*, *Anoda cristata* y *Sida hederacea*; y potencialmente son más susceptibles de presentar flujo génico con algodón CERA (2010).

Detección de la proteína CP4 EPSPS

Las pruebas con las tiras de flujo lateral detectaron la proteína CP4 EPSPS. Ninguna planta arvense fue positiva a la presencia de la proteína CP4 EPSPS, y solo fue positiva a la proteína el algodón transgénico. Esto indicó que aún no se ha presentado flujo de genes entre el algodón y las plantas arvenses, ya que las plantas arvenses no presentan la proteína CP4 EPSPS (Cuadro 1 y 2).

La no detección de la proteína CP4 EPSPS en plantas arvenses de la Comarca Lagunera probablemente se debe a un deficiente transporte de polen por los insectos (Gómez, 2002; Guzmán *et al.*, 2008), o tal vez fue eficiente pero existió incompatibilidad sexual (Center Environmental Risk Assessment, 2010). Otras causas probables son: los dos tipos parentales no son sexualmente compatibles o bien, sus complementos cromosómicos; la no coincidencia entre las especies en cuanto a sus periodos de fertilidad; la descendencia no es fértil o ecológicamente no es apta para las condiciones ambientales en las cuales se encuentran (CERA, 2010; RASM, 2010; Mallory *et al.*, 2015).

No se encontró la introgresión de la tolerancia al glifosato en poblaciones de plantas arvenses (Warwick *et al.*, 2008; Mallory y Zapiola, 2008; CERA, 2010.) en las plantas arvenses asociadas al algodón transgénico en la Comarca lagunera

CONCLUSIONES

El número de especies vegetales asociadas al algodón fue mayor a las antes reportadas para la Comarca Lagunera; además hubo un número mayor de familias botánicas. La proteína CP4 EPSPS no se detectó en las plantas arvenses, a pesar de la presencia de las cuatro especies de la familia Malvaceae en la Comarca Lagunera.

Detection of the CP4 EPSPS protein

The tests with lateral flow strips detected the CP4 EPSPS protein. None of the weed plants was positive for the presence of CP4 EPSPS protein, and only the transgenic cotton was positive protein. This indicated that gene flow between cotton and the weed plants has not yet occurred, given that no CP4 EPSPS protein was detected in the weed plants (Table 1 and 2).

The lack of detection of CP4 EPSPS protein in weed plants of the Comarca Lagunera is probably due to a deficient transport of pollen by the insects (Gómez, 2002; Guzmán *et al.*, 2008), or perhaps it was efficient, but there was sexual incompatibility (Center Environmental Risk Assessment, 2010). Other probable causes are: the two parental types are not sexually compatible, or their chromosomal complements; the lack of coincidence among the species with respect to their fertility periods; their descendents are not fertile or not apt ecologically for the environmental conditions in which they are found (CERA, 2010; RASM, 2010; Mallory *et al.*, 2015).

Introgression of the tolerance to glyphosate was not found in weed plant populations (Warwick *et al.*, 2008; Mallory and Zapiola, 2008; CERA, 2010), in weed plants associated with transgenic cotton in the Comarca Lagunera.

CONCLUSIONS

The number of plant species associated with cotton was higher than what was previously reported for the Comarca Lagunera; there were also a higher number of botanical families. The CP4 EPSPS protein was not detected in the weed plants, despite the presence of the four species of the Malvaceae family in the Comarca Lagunera.

—End of the English version—

---*---

LITERATURA CITADA

Belanger, F., C., R. Meagher T., R. Day P., K. Plumley, and A. Meyer W. 2003. Interspecific hybridization between *Agrostis*

- stolonifera* and related *Agrostis* species under field conditions. Crop Sci. 43: 240–246.
- Alibhai, M., F., and C. Stallings W. 2001. Closing down on glyphosate inhibition – with a new structure for drug discovery. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 2944–2946.
- Bjerknes, A., L., Ø. Totland, J. Hegland S., and A. Nielsen. 2007. Do alien plant invasions really affect pollination success in native plant species? Biol. Conserv. 138: 1–12.
- Blanco, Y. y A. Leyva. 2007. Revisión bibliográfica. Las arvenses en el agroecosistema y sus beneficios agroecológicos como hospedadores de enemigos naturales. Cultivos Trop. 28: 21–28.
- Booth, D., B., and C. J. Swanton. 2002. Assembly theory applied to weed communities. Weed Sci. 50: 2–13.
- Bükün, B. 2005. Weed flora changes in cotton growing areas during the last decade after irrigation of Harran plain in Sanliurfa, Turkey. Pakistan J. Bot. 37: 667–672.
- Campo Agrícola Experimental La Laguna. 1984. Guía para la asistencia técnica agrícola para la Comarca Lagunera. CIAN. Matamoros, Coahuila, México.
- Castro, M. E. 1992. Levantamiento ecológico de malas hierbas en algodónero en la Región Lagunera. In: Avances de investigaciones forestal y agropecuaria. SARH. INIFAP. CRNC. CAELALA. Matamoros, Coahuila, México. pp: 13–14.
- Center Environmental Risk Assessment. 2010. A review of the environmental safety of the CP4 EPSPS protein. Center Environmental Risk Assessment, ILSI Research Foundation. Washington D.C. 16 p.
- Dauber, J., M. Hirsch, D. Simmering, R. Waldhardt, A. Otte, and V. Wolters. 2003. Landscape structure as an indicator of biodiversity: matrix effects on species richness. Agric. Ecosyst. Environ. 98: 321–329.
- Downey, P. O. 2006. The weed impact to native species (WINS) assessment tool—results from a trial for bridal creeper (*Asparagus asparagoides* (L.) Druce) and ground asparagus (*Asparagus aethiopicus* L.) in southern New South Wales. Plant Prot. Q. 21: 109–116.
- Economou, G., D. Bilalis, and C. Avgoulas. 2005. Weed flora distribution in greek cotton fields and its possible influence by herbicides. Weed Sci. 33: 406–419.
- Elpel, T. 2000. Botany in a Day. 5th Edition. HOPS Press. 221p.
- Ellstrand, N. C. 2003. Current knowledge of gene flow in plants: implications for transgene flow. Philos Trans. Royal Soc. Lond. Ser B. 358: 1163–1170.
- Ellstrand, N. C., C. Prentice H., and F. Hancock J. 1999. Gene flow and introgression from domesticated plants into their wild relatives. Annu. Rev. Ecol. Syst. 30: 539–563.
- Freire, E. 2002. Viabilidade de cruzamentos entre algodoeiros transgênicos e comerciais e silvestres do Brasil. Rev. Bras. Ol. Fibras 6: 465–470.
- Franz, J., E., K. Mao M., and A. Sikorski J. 1997. Glyphosate: A Unique Global Herbicide. Monografía ACS 189. American Chemical Society, Washington D.C. pp. 27–64.
- García A., J. L., y S. Acosta N. 1975. Levantamiento ecológico de malezas en el cultivo del algodónero en la Comarca Lagunera. Información de investigaciones agrícolas. CIANE-INIA. SARH. Matamoros, Coahuila, México. 4: 58–88.
- Gómez J., M. 2002. Generalización en las interacciones entre plantas y polinizadores. Revista Chilena Historia Natural 75: 105–116.
- Guzmán M., F. San Vicente, y D. Díaz M. 2008. Flujo de polen entre híbrido tropicales de maíz de diferentes color de endospermo. Bioagro 20: 159–166.
- Hall, L., K. Topinka, J. Huffman, L. Davis, and A. Good. 2000. Pollen flow between herbicide-resistant *Brassica napus* is the cause of multiple resistant *B. napus* volunteers. Weed Sci. 48: 688–694.
- Hegde, S. G., and G. Waines J. 2004. Hybridization and introgression between bread wheat and wild and weedy relatives in North America. Crop Sci. 44: 1145–1155.
- Hoyle, M., and E. Cresswell J. 2007. The effect of wind direction on cross-pollination in wind-pollinated GM crops. Ecol. Appl. 14: 1234–1243.
- Huang, F., R. Leonard B., R. Cook D., R. Lee D., A. Andow D., L. Baldwin J., V. Tindall K., and X. Wu. 2007. Frequency of alleles conferring resistance to *Bacillus thuringiensis* maize in Louisiana populations of the southwestern corn borer. Entomol. Exp. Appl. 122: 53–58.
- Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. 1970. Determinación del periodo crítico de competencia entre las malezas y el algodónero de la Comarca Lagunera. Secretaría de Agricultura y Ganadería. Matamoros, Coahuila, México.
- Lot, A., y F. Chiang. 1986. Manual del Herbario. Consejo Nacional de la Flora de México. México. 142 p.
- Mallory, S. C., A., and M. Zapiola. 2008. Gene flow from glyphosate-resistant crops. Pest Manag. Sci 64: 428–440.
- Mallory, S. C., L. Hall, N. Burgos. 2015. Experimental methods to study gene flow. Weed Sci. 63:12–22
- Márquez, H. C., S. Santana, V. Ávila, J. L. García, P. Preciado, and A. Moreno. Entomofaunistic diversity in a transgenic cotton (*Gossypium hirsutum* L.) agroecosystem in Coahuila, México. Southwest. Entomol. 39:317–326.
- Masalles R., M. 2004. Respuestas de la vegetación arvense a los tratamientos agrícolas. Lazaroa 25: 35–41.
- Molina F., F., F. Espinosa G., y J. Sarukhán K. 2008. Weed population dynamics in a rain-fed maize field from the valley of México. Agrociencia 42: 655–667.
- Risk assessment search mechanism (RASM). 2010. Monsanto MON531xMON1445. http://rasm.icgeb.org/users_home/sql_queries/catalog_query_02/703/rasm_record/?searchterm=None (Consulta: noviembre 2010).
- Perdomo R., F., H. Vibrans L., A. Romero M., A. Domínguez V., y J. L. Medina P. 2004. Análisis de SHE, una herramienta para estudiar la diversidad de malezas. Rev. Fitotec. Mex. 27: 57–61.
- Rieger M., A., M. Lamond, C. Preston, B. Powles S., and T. Roush R. 2002. Pollen-mediated movement of herbicide resistance between commercial canola fields. Science 296: 2386–2388.
- Rieseberg, L. H., O. Raymond, M. Rosenthal D., Z. Lai, K. Livingstone, T. Nakazato, L. Murphy J., E. Schwarzbach A., A. Donovan L., and C. Lexer. 2003. Major ecological transitions in wild sunflowers facilitated by hybridization. Science 301: 1211–1216.
- Quist, D., and Chapela, I. H. 2001. Transgenic DNA introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca, México. Nature 414: 541–543.
- Sánchez B., J., y F. Guevara F. 2013. Plantas arvenses asociadas a cultivos de maíz de temporal en suelos salinos de la ribera del lago de Cuitzeo, Michoacán, México. Acta Bot. Mex. 105: 107–129.

- Santana E., S., R. V. Ávila, G. G. Castañeda, L. E. De la Cruz, C. García De La P., M. U. Romero, y H. C. Márquez. 2015. Entomofauna presente en algodónero (*Gossypium hirsutum*) genéticamente modificado en zonas productoras de México. Southwest. Entomol. 40: 151-160.
- Slatkin, M. 1987. Gene flow at the geographic structure of natural populations. Science 236: 787-792.
- Snow, A. A. 2002 Transgenic crops – why gene flow matters. Nat. Biotechnol. 20: 542.
- Stewart C. N., Jr., D. Halfhill M., and I. Warwick S. 2003. Transgene introgression from genetically modified crops to their wild relatives. Nat. Rev. Genet. 4: 806-817.
- Steinrücken, H. C., and N. Amrhein. 1980. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl-shikimic acid -3-phosphate synthase. Biochem. Biophys. Res. Comm. 94: 1207-1212.
- Villareal Q., J. A. 1983. Malezas de Buenavista Coahuila. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila. 269 p.
- Villaseñor, R., y G. Espinosa. 1998. Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Fondo de Cultura Económica. 448 p.
- Warwick, S. I., A. Legere, J. Simard M., and T. James. 2008. Do escaped transgenes persist in nature? The case of an herbicide resistance transgene in a weedy *Brassica rapa* population. Mol. Ecol. 17: 1387-1395.
- Warwick, S. I., J. Simard M., A. Légère, H. J. Beckie, L. Braun, B. Zhu, P. Mason, G. Séguin-Swartz, and C. N. Stewart. 2003. Hybridization between transgenic *Brassica napus* L. and its wild relatives: *B. rapa* L., *Raphanus raphanistrum* L., *Sinapis arvensis* L. and *Erucastrum gallicum* (Willd.) O.E. Schulz. Theor. Appl. Genet. 107: 528-539.
- Yue, B., F. Huang, R. Leonard B., S. Moore, R. Parker, A. Andow D., D. Cook, K. Emfinger, and R. Lee D. 2008. Verifying an F1 screen for identification and quantification of rare *Bacillus thuringiensis* resistance alleles in field populations of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. Entomol. Exp. Appl. 129: 172-180.
- Zamorano, C. 2006. Alelopatía : un nuevo reto en la ciencia de las arvenses en el trópico. Agronomía (Manizales) 14: 7-15.
- Zhang, J. 2015. Transgenic cotton breeding. In: Zhang, J. (ed). Cotton. Agronomy monograph 57. American Society of Agronomy Inc. Madison WI.