



Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro

Dirección de Investigación

Subdirección de Programación y Evaluación



Proyecto de Investigación 2018

Unidad:	SALTILLO	División:	AGRONOMÍA	Departamento:	PARASITOLOGÍA
Tema estratégico (ANA/PEP):	(ANA) MEJORAMIENTO GENÉTICO (Resistencia de plagas a las toxinas Cry del Bt). CULTIVO Algodón, Manejo integrado de plagas.				
Línea de investigación:	RESISTENCIA DE LEPIDOPTEROS A LAS TOXINAS Cry DEL Bt				
Título del proyecto:	EVALUACIÓN DE VARIETADES DE ALGODÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE RESISTENCIA Y/O TOLERANCIA DEL GUSANO COGOLLERO A LAS TOXINAS Cry DEL Bt Y ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD FAUNÍSTICA EN ARTROPODOS NO BLANCO.				
Presupuesto solicitado (Máximo \$75,000)	\$ 20,000	El proyecto es:	Nuevo	<input checked="" type="checkbox"/>	Continuación
Tipo de investigación:	Básica	<input checked="" type="checkbox"/>	Aplicada	<input type="checkbox"/>	Tecnológica
Vinculación:	Si	<input checked="" type="checkbox"/>	No	Fondos concurrentes:	
Cooperante(s):	ING. JAIME CHÁVEZ MÁRQUEZ (TÉCNICO CERTIFICADO EN ALGODÓN)				
Entidad (es):	COAHUILA	Municipio (s):	SAN PEDRO		
Localidades:	RINCÓN DEL BUITRE, RANCHO DE LA UAAAN, LOCALIDAD SAN PEDRO DE LAS COLONIAS				
A realizar durante el(los) año(s):	2018-2019				

Participantes	Adscripción (Clave Depto.)	Expediente No.	Firma
Responsable	PARASITOLOGÍA	100069	
Colaborador:	PARASITOLOGÍA	0899	
Colaborador:	PARASITOLOGÍA	3563	
Colaborador:	PARASITOLOGÍA	3948	
Colaborador:	PARASITOLOGÍA	1920	
Colaborador:	FITOMEJORAMIENTO	2002	
	Grado por obtener	Matrícula	Firma
Tesista:	LICENCIATURA	41144510	
Programa Docente:	INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO		
Tesista:	LICENCIATURA	41144528	
Programa Docente:	INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO		
Tesista:			
Programa Docente:			

Vo. Bo.		Autoriza	
Firma y sello			
Nombre	DR. ERNESTO CERNA CHÁVEZ Jefe de Departamento	Dr. Armando Robledo Olivo Subdirector de Programación y Evaluación	

• Cada Jefe de Departamento deberá dejar copia para su archivo

Protocolo para Proyecto de Investigación 2018

1 - Titulo del proyecto

Presupuesto solicitado:

Evaluación de variedades de algodón GM para la determinación de resistencia y/o tolerancia del gusano cogollero a las toxinas Cry del Bt y estudio de la diversidad faunística en artrópodos no blanco.

\$ 20,000.00

2 - Introducción

Es evidente que cuando se emplea constantemente un insecticida en la lucha contra una plaga, es factible que insectos susceptibles desarrollen resistencia, situación que los cultivos Bt cumplen perfectamente, cuya expresión de la toxina Cry es constante, eliminando no solo la posibilidad de seguir utilizando estas proteínas como medida de control de plagas, sino también predisponiendo a las plagas al uso de productos a base de *B. thuringiensis*. Además, la entrada de nuevos cultivos GM, que comparten plagas blanco de Bt (caso algodón y maíz), podría traer consigo falta de eficacia del nuevo cultivo, mucho antes de su establecimiento.

En un agroecosistema se presenta toda una red trófica que incluye a artrópodos pertenecientes o no a los órdenes bajo control y que están en contacto con los cultivos Bt. La siembra generalizada de estos cultivos y el aumento en su aplicación expone a los organismos no blanco a las toxinas útiles para controlar plagas (Harwood *et al.* 2005, Marvier *et al.* 2007) y aun cuando los efectos documentados en el caso del maíz Bt en campo son prácticamente inexistentes, es posible que variedades transgénicas presenten un riesgo para la comunidad de artrópodos, alterando de esa manera la biodiversidad (Dively y Rose 2002, Dutton *et al.*, 2003, Obrist *et al.*, 2006). La mayoría de ellos entrarían en contacto con la proteína Cry al consumir partes de la planta directa o indirectamente en las cadenas tróficas pudiendo quedar expuestos a la acción tóxica, a pesar de que la proteína expresada posee una alta especificidad respecto a insectos blanco, debido a las condiciones necesarias para solubilizar, activar y unir las proteínas y que se desconoce la presencia del receptor a la toxina Bt en aparatos digestivos no blanco (Groot y Dicke, 2002; Bruck *et al.*, 2006). Se ha manejado la hipótesis de una posible reducción de la biodiversidad por el impacto de la tecnología Bt sobre los organismos no blanco; una de las preocupaciones de los investigadores desde la creación de los transgénicos y su liberación como cultivos comerciales, a corto y largo plazo (O'Callaghan *et al.*, 2005).

Objetivos

General:

Determinar si existe algún grado de resistencia del gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*) a las toxinas Cry del Bt, en diferentes variedades de algodón GM, así como la influencia y/o interacción de dichas toxinas a la diversidad de artrópodos no blanco, en el estado de Coahuila, Región de la Laguna.

Específicos:

- Detectar si existe resistencia y/o tolerancia de *S. frugiperda* cuando esta plaga se encuentra en interacción con las toxinas Cry en diferentes variedades de algodón Bt
- Detectar si existe resistencia y/o tolerancia de *S. frugiperda* cuando esta plaga se encuentra en contacto directo con productos comerciales y/o experimentales de *Bacillus thuringiensis*
- Analizar la influencia e interacción que existe entre el cultivo del algodón Bt y la diversidad faunística de artrópodos no blanco a dicha tecnología, la región productora de La Laguna, Coahuila

Hipótesis

Existe influencia de las toxinas Cry del algodón Bt sobre el gusano cogollero en la adquisición de algún grado de resistencia y/o tolerancia y sobre en la diversidad de artrópodos no blanco que interaccionan en el cultivo, en la región productora de la Laguna.

3.-Revisión de Literatura

Impactos sobre los organismos GM

Conservando la población de plagas a niveles sumamente bajos, los cultivos de Bt pueden hambrear a los enemigos naturales en la medida que estos insectos benéficos necesitan una cantidad pequeña de presa para sobrevivir en el agroecosistema. Los insectos parásitos serían los mayormente afectados porque ellos son más dependientes de hospederos vivos para su desarrollo y supervivencia, mientras que algunos predadores podrían teóricamente

alimentarse de presas muertas o agonizantes. Los enemigos naturales también podrían afectarse directamente a través de las interacciones a niveles intertróficos (Altieri 1998). Evidencias en estudios realizados en Escocia sugieren que los áfidos son capaces de secuestrar la toxina del cultivo Bt y transferirla a sus predadores (coccinélidos), a su vez afectando la reproducción y la longevidad de los coccinélidos benéficos (Birch *et al.* 1997). El secuestro de sustancias químicas secundarias de las plantas por herbívoros, quienes luego afectan el comportamiento de parásitos no es rara (Campbell y Duffey, 1979). La posibilidad de que las toxinas de Bt que se muevan a través de las cadenas alimenticias presentan serias implicaciones para el control biológico natural en agroecosistemas. Las toxinas de Bt pueden incorporarse al suelo a través del material vegetal que se descompone, pudiendo persistir durante 2-3 meses, resistiéndose a la degradación ligándose a las partículas de arcilla mientras mantienen la actividad de la toxina (Palm *et al.*, 1996). Tales toxinas de Bt que terminan en el suelo y el agua proveniente de los desechos de cultivos transgénicos pueden tener impactos negativos en los organismos del suelo y en los invertebrados acuáticos así como en el proceso de reciclaje de nutrientes (James, 1997). Todos estos aspectos merecen una investigación más seria.

Un efecto medioambiental mayor, como resultado del uso masivo de la toxina de Bt en algodón u otro cultivo ocupando una inmensa superficie del paisaje agrícola, es que agricultores vecinos con cultivos diferentes al algodón, pero que comparten complejos similares de plagas, puede terminar con poblaciones de insectos resistentes colonizando sus campos, (Altieri, 1998). Es posible que plagas de Lepidoptera que desarrollan resistencia al Bt en algodón, se mueven a los campos adyacentes donde los agricultores usan Bt como un insecticida microbiano, dejando así a los agricultores indefensos contra tales plagas, en la medida que ellos pierden su herramienta de control biológico (Gould, 1994).

La amplia adopción del algodón Bt, lleva implícita una fuerte presión de selección y la posibilidad de seleccionar individuos resistentes a las toxinas Bt, toda vez que la mencionada tecnología actúa en forma preventiva desde emergencia a madurez del cultivo. Tabashnik *et al.*, 2013 citan 24 casos de plagas resistentes a los OGM Bt en 8 especies de insectos. Las causales de resistencia fueron atribuida a 1.- no utilización del refugio o a su erróneo manejo, 2.- desconocimiento de la frecuencia y tipo de heredabilidad de los genes de resistencia, 3.- no expresión de la alta dosis, 4.- deficiente monitoreo de la susceptibilidad a la toxina Bt.

4 - Procedimiento Experimental

Se establecerá un experimento de bloques completamente al azar con cuatro repeticiones de con ocho tratamientos (variedades de algodón GM resistente a lepidópteros) y dos testigos (una variedad convencional y otra solo con tolerancia a glifosato) en parcelas de 8.0 m de largo con seis surcos, se consideraran los cuatro surcos centrales como unidad experimental.

El manejo del cultivo se realizará conforme al paquete tecnológico de la región, debido a que es un cultivo controlado. La toma de datos en la unidad experimental se realizará cada semana por medio de monitoreos en los que se verificará la presencia de larvas de *S. frugiperda*, o algún otro lepidóptero plaga, se realizará el conteo y se anotara el instar en que observo el individuo, a que especie corresponde si esta es diferente al gusano cogollero; por otro lado se tomaran las recolectas de las larvas vivas, las cuales se purificaran en cámara de crianza para analizar parámetros de parasitoides, muerte por entomopatógenos y adaptación a condiciones de crianza artificial, para su posterior uso en el cumplimiento del segundo objetivo específico, el cual se describe a continuación:

Se realizará una prueba con las larvas presuntamente resistentes a la toxinas Cry encontradas en las 10 variedades de algodón Bt, las cuales serán alimentadas con hojas de maíz asperjadas con productos comerciales de *B. thuringiensis*. Primero se determinará una ventana biológica y posteriormente se definirán las dosis para establecer los bioensayos correspondientes a cada producto. El experimento se albergara en un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones por dosis determinada en la ventana biológica para al menos tres productos comerciales y un testigo; la unidad experimental consistirá en las dos primeras hojas verdaderas de maíz con 30 larvas del segundo instar, por repetición y por dosis.

Es estos dos primeros experimentos se llevará a cabo un análisis de varianza, en el caso de que haya diferencias significativas se realizará una prueba de medias de Tukey ($p \leq 0.05$). La mortalidad se evaluará con un análisis Probit por medio del software SAS (PROC PROBIT) (SAS Institute, 2002) para estimar el valor de la DL50, con la corrección de la fórmula de Abbott (1925), al considerar los valores del testigo. Se realizará de igual forma un análisis de componentes principales con la finalidad de observar la interacción entre las variedades y lepidópteros para definir niveles de resistencia.

En los incrementos de las larvas presuntamente resistentes se realizaran tablas de esperanza de vida, para ver su adaptación a las condiciones artificiales de crianza.

En el caso del tercer objetivo este se realizará dentro del mismo experimento establecido en campo con las mismas condiciones experimentales, sin embargo los muestreos en este caso se realizarán con la finalidad de obtener artrópodos no blanco, para lo cual se colocaran estaciones de trapeo (trampas amarillas y trampas Pitfall) y se

capturaran con red entomológica, para obtener la mayor cantidad de artrópodos en todos los estratos de la planta, además de inspecciones visuales de especies importantes del cultivo, de igual forma se tomaran los datos de las trampas que coloca SENASICA, como plan de manejo del picudo del algodón y del complejo bellotero, solo como referencia. Los muestreos y las trampas se realizaran cada semana desde el inicio de la floración hasta el deshoje del cultivo.

Red Entomológica. Este tipo de muestreo se utilizara para artrópodos muy móviles y consiste en dar 10 pases dobles de red (38 cm de diámetro). Los insectos capturados se colocaran en alcohol al 70%, se etiquetaran y resguardaran.

Trampas Amarillas o pegajosas. Este tipo de muestreo se utilizara para medir el número de artrópodos en el área cercana al tallo, hojas e inflorescencia y consistira de cinco trampas de acrílico de color amarillo de 20 x 20 cm con adhesivo (pegamento) expuesto de un solo lado en cada tratamiento, colocadas en estacas de madera (postes o tablas con punta), al nivel del follaje de la planta, ajustándola al crecimiento de la misma. Las trampas se etiquetaran y transportaran al laboratorio cubiertas con papel encerado, dentro de bolsas. Las trampa serán diluidas en gasolina blanca para realizar la extracción de los insectos, el conteo y la facilidad de manejo.

Trampas Pitfall o de caída. Este tipo de muestreo se utilizara para los artrópodos caminadores y consiste de cinco trampas (envase de plástico de 15 cm de diámetro por 12 cm de profundidad), las cuales se colocaran en orificios en el suelo de manera que quede la parte superior al nivel de la superficie y en el interior se coloca una cantidad aproximada de 200 a 300 cc de substancia con base etilenglicol, para capturar los artrópodos caminadores. Las trampas al ser remplazadas, se etiquetaran y resguardaran. El contenido de la trampa se colocara sobre una tela fina para su tamizado y retirar el excedente de etilenglicol, extraer los artrópodos de gran tamaño y posteriormente lavar el contenido con agua corriente para su filtrado y separación de artrópodos más pequeños, y resguardarlos en alcohol al 70% (Rose y Dively 2007).

Todos los artrópodos recolectados serán trasladados al Laboratorio de Taxonomía de Insectos, donde se contarán e identificarán a nivel de familia y se clasificarán por nivel o estructura trófica, utilizando como apoyo un microscopio estereoscopio binocular Carl Zeiss y un Olympus SZ21 6X, y claves taxonómicas y publicaciones.

Inspecciones visuales. Este tipo de muestreo se dirigirá hacia especies abundantes e importantes en el cultivo. Esta actividad se realizara tomando al azar 10 plantas en cada punto del muestreo tipo cinco oros y examinándolas minuciosamente desde la base de la planta hasta la hoja más joven o espiga. Las especies observadas e identificadas serán contabilizadas y registradas para su análisis y determinar su frecuencia y curva de fluctuación, esto con el objetivo de observar cambios en la densidad poblacional.

Con el conteo e identificación de los tres tipos de trapeo (trampas amarillas, trampas pitfall y red entomológica) se determinaran los atributos de la comunidad; número de familias y abundancia de artrópodos por familia y con ambos atributos se estimaran la diversidad, riqueza y uniformidad de la diversidad. La diversidad se calculara con el índice de Shannon-Wiener.

Cronograma de Actividades para el 2018

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Planeación del establecimiento del experimento en campo	X	X										
Establecimiento del experimento en campo			X	X								
Seguimiento al experimento en campo			X	X	X	X	X	X	X			
Aplicación de tratamientos					X							
Toma de muestras de las unidades experimentales y recolecta de insectos					X	X	X	X	X			
Purificación e incremento de larvas presuntamente resistentes a las toxinas Cry del Bt					X	X	X	X	X	X		
Establecimiento de experimento de laboratorio con productos comerciales de <i>B. thuringiensis</i>											X	X
Análisis estadístico								X	X			
Revisión de literatura y conformación de tesis							X	X	X	X		
Entrega y revisión de borradores de tesis											X	
Asistencia a el congreso de entomología y/o control biológico											X	
Redacción de articulos científicos									X	X	X	X
Examen profesional												X

Cronograma de distribución de presupuesto para el 2018.

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Salidas de campo para planeación, establecimiento y seguimiento del experimento en campo, aplicación de tratamientos, toma de muestras y recolectas de insectos en Rancho del Rincón del Buitre, San Pedro, Coahuila.	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
Adquisición de material para desarrollo de experimento en campo	X	X	X	X								
Asistencia al congreso de entomología y/o control biológico										X	X	
Impresión y empastado de tesis												
Pago de derecho de exámenes profesionales											X	X
												X

Duración total del proyecto

Año de Inicio	2018	Año estimado de conclusión	2020
---------------	------	----------------------------	------

5 -Productos Esperados

- Tres tesis de licenciatura
- tres artículos científicos
- Base de datos sobre la condición de resistencia y/o tolerancia del gusano cogollero a las toxinas Cry del Bt
- Relación de la condición de diversidad faunística de artrópodos en el cultivo del algodón GM
- Tres ponencias en congreso

6 -Literatura Citada

Altieri M. A. 1998. Riesgos Ambientales de los Cultivos Transgénicos: una evaluación Agroecológica. Department of Environmental Science, Policy and Management. Press University of California, Berkeley. 25 p. researchgate.net

Birch, A.N.E. et al. 1997. Interaction Between Plant Resistance Genes, Pest Aphid Populations and Beneficial Aphid Predators. Scottish Crops Research Institute (SCRI) Annual Report 1996-1997, pp 70-72.

Borror D. J. and R. E. White. 1970. A Field Guide to Insects America North of Mexico. The Peterson field guide series Houghton Mifflin Company USA. 404 Pág

Bruck, J. D., M. D. Lopez, L. C. Lewis, J. R. Prasifka and R. D. Gunnarson. 2006. Effects of Transgenic *Bacillus thuringiensis* Corn and Permethrin on Nontarget Arthropods. J. Agric. Urban Entomol. 23(3): 111-124.

Campbell, B.C. y S.C. Duffy 1979. Tomatine and Parasitic Wasps: potential incompatibility of plant antibiosis with biological control. Science 205: 700-702.

Dively, G. P. and R. Rose. 2002. Effects of Bt transgenic and conventional insecticide control on the non-target natural enemy Community in sweet corn. 1st International Symposium on Biological Control of Arthropods. Forest Health Technology Enterprise Team, United States. 265-274 pp.

Dutton, A., J. Romeis and F. Bigler. 2003. Assessing the risks of insect resistant transgenic plants on entomophagous arthropods: Bt-maize expressing Cry1Ab as a case study. BioControl. 48:611-636.

Gould, F. 1994. Potential and Problems with High-Dose Strategies for Pesticidal Engineered Crops. Biocontrol Science and Technology 4: 451-461.

Groot, A. T. and M. Dicke. 2002. Insect-resistant transgenic plants in a multi-trophic context. The Plant Journal. 31(4): 387-406.

Harwood, J. D., W. G. Wallin and J. J. Obrycki. 2005. Uptake of Bt endotoxins by nontarget herbivores and higher order arthropod predators: molecular evidence from a transgenic corn agroecosystem. Mol. Ecol. 14: 2815-2823.

James, R.R. 1997. Utilizing a Social Ethic Toward the Environment in Assessing Genetically Engineered Insect-Resistance in Trees. Agriculture and Human Values 14: 237-249.

Marvier, M., C. McCreedy, J. Regetz and P. Kareiva. 2007. A Meta-Analysis of Effects of Bt Cotton and Maize on Nontarget Invertebrates. Science 316: 1475-1477.

Obrist, L. B., A. Dutton, J. Romeis and F. Bigler. 2006b. Biological Activity of Cry1Ab Toxin Expressed by Bt Maize Following Ingestion by Herbivorous Arthropods and Exposure of the Predator *Chrysoperla carnea*. BioControl 51:31-48.

O'Callaghan, M., T. R. Glare, E. P. J. Burgess and L. A. Malone. 2005. Effects of plants genetically modified for insect resistance on nontarget organisms. Annual Review of Entomology 50: 271-292.

Palm, C.J., D.L. Schaller, K.K. Donegan and R.J. Seidler. 1996. Persistence in Soil of Transgenic Plant Produced *Bacillus thuringiensis* var. Kustaki δ-endotoxin. Canadian Journal of Microbiology.

Rose, R.; Dively, G. P. 2007. Effects of Insecticide-Treated and Lepidopteran-Active Bt Transgenic Sweet Corn on the Abundance and Diversity of Arthropods. Environ. Entomol. 36(5): 1254-1268.

Tabashnik B., T. Brévault & Y. Carrière 2013. Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. Nature biotechnology vol 31