



COMISIÓN INTERSECRETARIAL
DE BIOSEGURIDAD DE LOS ORGANISMOS
GENÉTICAMENTE MODIFICADOS

CIBIOGEM



FONDO PARA EL FOMENTO Y APOYO A LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA EN BIOSEGURIDAD Y BIOTECNOLOGÍA

CONVOCATORIA PARA LA EXPOSICIÓN DE PROPUESTAS A LAS DEMANDAS DE BIOSEGURIDAD CIBIOGEM 2011

Manejo de la resistencia asociada al cultivo de organismos genéticamente modificados en México: el caso del algodón

La Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (CIBIOGEM), en coordinación con el Consejo Consultivo Científico, convoca a instituciones de investigación, personas físicas y morales a presentar su mejor propuesta para contribuir a llevar a cabo actividades relativas al **Manejo de la resistencia asociada al cultivo de organismos genéticamente modificados en México**, de acuerdo a los requisitos de esta Convocatoria.

DEMANDA ESPECÍFICA:

Manejo de la resistencia en insectos a las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* asociada al cultivo de organismos genéticamente modificados en México

Antecedentes

Los altos costos de producción asociados con el control de plagas en el sector algodonero ha propiciado la reducción a nivel nacional de la superficie sembrada con este cultivo. Los insectos plaga como *Pectinophora gossypiella*, *Helicoverpa zea*, *Heliothis virescens* y *Spodoptera exigua* son las principales plagas del algodón que afecta su producción y que causa cuantiosas pérdidas año con año, al utilizar en su combate un gran volumen de insecticidas. Ante esta situación, el uso de variedades transgénicas de algodonero Bollgard® y Bollgard II® con genes *cry* provenientes de la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt) pretende controlar efectivamente a estos insectos plaga y al mismo tiempo reducir el uso de insecticidas, sin causar daños colaterales al medio ambiente por agroquímicos. Los genes *cry* presentes en estas variedades transgénicas de algodonero son específicos para estos insectos plaga. Bollgard® es una variedad de algodonero patentada por la compañía Monsanto que produce la toxina Cry1Ac. Esta tecnología hace a la planta resistente contra el ataque del complejo bellotero *Helicoverpa zea* (Boddie) y *Heliothis virescens* (F.) así como el gusano rosado *Pectinophora gossypiella* (Saunders), reduciendo significativamente el número de aplicaciones de insecticidas para el control de estas plagas. Bollgard II® también producida por Monsanto expresa además de proteína Cry1Ac a la proteína Cry2Ab la cual podría ampliar su espectro de acción y evitar el problema de resistencia.

Las toxinas Cry1Ac y Cry2Ab de *Bt* afectan el sistema digestivo de las larvas dañando las células epiteliales del intestino larvario, por lo que éstas detienen su alimentación y mueren a los pocos días después de haberlas ingerido.



Aún cuando Bollgard® está posicionado en el mercado específicamente al control del complejo bellotero y gusano rosado, se ha observado que ejerce supresión sobre otros lepidópteros tales como el gusano perforador de la hoja *Bucculatrix thurberiella* (Busck), falsos medidores *Trichoplusia ni* (Hübner) y *Pseudoplusia includens* (Walker), el gusano peludo *Estrigmena acraea* (Drury). Sin embargo, estas variedades transgénicas no tienen ningún efecto sobre otras plagas como: coleópteros como picudo, o contra trips, o la mosquita blanca, chinches y áfidos, ni contra la fauna benéfica. Las variedades de algodón Bollgard® ofrecen las mismas características agronómicas y calidad de fibra que sus progenitores recurrentes. Nada cambia en términos de fertilidad, prácticas de cultivo, irrigación, etc.

La resistencia de los insectos a las endotoxinas Cry1Ac y Cry2Ab de *Bacillus thuringiensis* que produce el material transgénico Bollgard y Bollgard II®, se puede presentar en los campos que contienen estos cultivos transgénicos por lo que es necesario monitorear el desarrollo de resistencia que podrían fin a esta tecnología. Las plagas están sometidas a presión de selección constante por la expresión de la toxina Bt durante todo el ciclo de estas variedades. Para reducir el riesgo de desarrollo de resistencia, se requiere que el productor de algodón transgénico establezca una zona de refugio de algodón convencional adenaño al cultivo transgénico, en la proporción 96% transgénico y 4% convencional (sin aplicación de insecticida químico en el cultivo convencional) u 80% transgénico y 20% convencional (cuando se aplica insecticida químico en el cultivo convencional).

Cuando los cultivos transgénicos resistentes a insectos son cultivados extensamente, la presión de selección es impuesta por aquellos hospedantes en su población, y ésta es capaz de responder con genotipos que tienen resistencia a las proteínas insecticidas presentes en el cultivo vegetal. Con el paso del tiempo los genotipos resistentes se podrían incrementar sustituyendo los genotipos susceptibles.

Objetivo General.

Incrementar el conocimiento sobre la resistencia en plagas de insectos a toxinas Cry presentes en los cultivos transgénicos de algodón de nuestro país.

Objetivos particulares.

Analizar la susceptibilidad de insectos presentes en zona aldononera hacia toxinas nativas Cry1Ac y Cry2Ab así como a otras toxinas Cry diferentes o con variantes de las toxinas Cry1Ac y Cry2Ab.

Lograr generar una resistencia inducida en laboratorio hacia toxinas Cry1Ac o Cry2Ab en insectos colectados de la zona aldononera, para poder conocer la velocidad con que la resistencia es adquirida por las diferentes especies de insectos y predecir el lapso de tiempo que tardará en generarse la resistencia en forma natural en campo.

Generar planes de manejo mediante los que se pueda disminuir en campo la velocidad con que se desarrolle la resistencia así como la manera identificarla y prevenirla antes de que se presente en campo.

Identificar, si los resultados así lo permiten, medidas de seguridad para actuar en caso de que se generen resistencias en campo, dando seguridad al productor agrícola y al país. Considerar incluir elementos evaluación y protección al medio ambiente, diversidad biológica y sanidades.



Meta

Generar información, herramientas y estrategias para contrarrestar la resistencia que seguramente se generará por el uso continuo de OGM, para utilizarla en el momento en que la resistencia se presente en el campo y constituya un problema real.

Justificación

El algodón Bollgard que expresa la δ -endotoxina Cry1Ac se ha utilizado en México desde 1996 para el control del gusano rosado, gusano tabacalero y gusano bellotero. Recientemente se ha introducido al mercado mexicano un cultivar de algodón que expresa dos δ -endotoxinas en la misma planta (Cry1Ac y Cry2Ab). En México, a partir de 1997 se han estado realizando bioensayos con poblaciones de campo seleccionadas con Cry1Ac, y recientemente con Cry2Ab, para detectar cambios en la respuesta que pudieran poner en peligro la utilidad del algodón genéticamente modificado. Sin embargo, a la fecha se desconoce el estado actual de la susceptibilidad de plagas secundarias del Orden Lepidoptera que están sujetas a presión de selección, que podrían desarrollar resistencia y que podrían convertirse en plagas primarias. Actualmente ya se han detectado signos de resistencia en otras partes del mundo donde se cultivan OGMs por ejemplo en *H. zea* en USA (Tabashnik 2008), en *Helicoverpa armigera* en India (Gujar *et al.* 2000; Tabashnik and Carriere 2010), *H. punctigera* (Wallengren) en Australia (Downes *et al.* 2009) y *Busseola fusca* (Fuller) en Sudáfrica (Van Rensburg 2007) por lo que es importante generar información sobre el potencial de resistencia en la zona algodoneira de México.

Actividades Solicitadas

ACTIVIDAD 1.

Estimación de la frecuencia de alelos de resistencia a las δ -endotoxinas Cry1Ac y Cry2Ab de *Bacillus thuringiensis* y susceptibilidad a otras toxinas Cry en insectos del Orden Lepidoptera en la zona de cultivo de algodón transgénico.

POBLACIONES:

Baja California, Chihuahua, Sonora, Tamaulipas y Coahuila. Se requiere en el desarrollo del proyecto por lo menos efectuar el análisis estadísticamente significativo de cuatro zonas donde se ha liberado el algodón GM.

ESPECIES DE INSECTOS:

En este estudio se incluirán todo tipo de insecto del Orden Lepidoptera que pueda ser encontrado en cultivos de algodón transgénico que expresan las Cry1Ac y/o Cry2Ab así como en cultivos aledaños a la zona algodoneira. Se realizarán recolectas de plagas del orden Lepidoptera: *Trichoplusia ni* (Hübner), *Spodoptera frugiperda* (Smith), *Estigmene acrea* (Drury), *Alabama argillacea* (Hübner) y *Bucculatrix thurberiella* (Busk). Es posible que en las recolectas que se hagan en cada lugar, la cantidad de especies diferentes varíe. Las larvas colectadas serán llevadas al laboratorio para cultivarlas en dieta sin toxina y así generar una población que viene de campo. Se requiere tener una colonia susceptible que nunca haya estado en contacto con las toxinas Cry como línea control susceptible (de preferencia una línea de laboratorio). En el caso de no contar con una línea de laboratorio se deberán recolectar



insectos de campos de algodón que no tengan cultivos transgénicos cercanos o que estén en otras áreas geográficas completamente diferentes de las que actualmente se cultiva el algodón transgénico.

TOXINAS: δ -endotoxinas Cry1Ac y Cry2Ab: Utilizando clones de *B. thuringiensis* que solo expresen una de estas toxinas como la cepa HD73 que solo expresa Cry1Ac o la cepa acristalifera conteniendo el gene *cry2Ab*. Se utilizaran también otras toxinas como la Cry1Ba, Cry1Ca, Cry1Da, Cry1Ea y Cry1Fa así como cualquier otra toxina Cry o toxinas Cry mutantes que se tengan disponibles.

BIOENSAYO: Se utilizará la metodología propuesta por Tabashnik *et al* 2000 y la de Blanco *et al* 2009. El método directo es el medir la susceptibilidad de los insectos colectados de campo a las toxinas Cry1Ac y Cry2Aa en pruebas de bioensayo en condiciones de laboratorio. Se requiere coleccionar (de 300 a 2000) botones de algodón así como hojas de esta planta de diversos campos transgénicos, así como de campos adyacentes a los cultivos transgénicos. Las larvas que se obtienen de estos botones u hojas se utilizan entonces para generar una población que viene de campo. Estas larvas se cultivan en dieta sin toxina. Posteriormente para determinar la susceptibilidad a las toxinas Cry se utilizan larvas neonatas de la siguiente generación F1 en bioensayos llevados a cabo sobre dieta artificial conteniendo diferentes dosis de toxina Cry (mínimo una baja 3.2 μ g/ml dieta y otra alta 10 μ g/ml dieta), y un control sin toxina. En el caso que las larvas colectadas de campo sean muy pocas para que generen una línea proveniente de campo se puede agregar algunas larvas de sus insectos susceptibles para que se crucen con los del campo y así lograr incrementar los números de larvas en la primera generación. Posteriormente se usaran larvas neonatas de la segunda generación para hacer los bioensayos. Se requiere tener una colonia susceptible que nunca haya estado en contacto con las toxinas Cry como línea control susceptible y los bioensayos se llevaran a cabo también con esta línea sensible para poder hacer la comparación entre las poblaciones de campo con la de laboratorio sensible.

La dieta se pone en pozos individuales y la toxina se coloca en estos pozos. Realizar el bioensayo con una larva por pozo, con un total de 10 a 25 larvas por dosis. Se realizan por lo menos tres replicas del bioensayo completo para cada línea de insectos. Después de 7 a 20 días se cuantifican las larvas sobrevivientes y número de pupas. Los datos se analizan calculando el porcentaje de sobrevivientes en pozos con toxina divididos entre el porcentaje de sobrevivientes en pozos con dieta sin toxina para cada línea de insectos.

ACTIVIDAD 2.

Potencial para el desarrollo de resistencia en plagas de algodón a la toxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis kurstaki* Berliner

LUGAR DE ESTUDIO:

González (Tamaulipas), Mexicali (Baja California), Sonoyta y Caborca (Sonora), La laguna. Se requiere por lo menos el análisis de dos zonas

ESPECIES DE INSECTOS:

El presente estudio se realizará con larvas de los insectos colectadas de estas regiones. Se utilizara únicamente el insecto plaga del algodón que sea el más abundante en cada región. Esta colecta no se restringe a cultivos transgenicos sino más bien se busca obtener insectos de cultivos nativos de algodón.



TOXINA: δ -endotoxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis kurstaki* Berliner

BIOENSAYO:

Se colectarán individuos de las poblaciones de campo y se llevarán al laboratorio donde se caracterizará su respuesta a la δ -endotoxina Cry1Ac en la generación F1. Posteriormente se someterá a presión de selección y se evaluará su respuesta a dicha toxina. Inicialmente, en la generación F2, se les aplicará, la concentración que mate al 60% de las larvas, se recuperará la población tolerante y en la generación F4 se volverá a determinar la susceptibilidad a la toxina Cry1Ac. En la siguiente generación, la concentración de toxina se incrementará para volver a matar al 60% a la población y se determinará la tasa del desarrollo de resistencia una vez recuperada la población de insectos (determinado mediante bioensayos). Este ejercicio se continúa durante varias generaciones para obtener poblaciones altamente resistentes a las toxinas Cry. Estos datos servirán para estimar el potencial que tiene cada población para lograr el desarrollo de resistencia. En aquellas poblaciones que logren desarrollar resistencia se determinará la susceptibilidad a otras toxinas Cry como Cry1B, Cry1C, Cry1D, Cry1E y Cry1F así como cualquier otra toxina Cry silvestre o mutante que se tenga disponible, lo que permitirá plantear estrategias de control en caso de que este fenómeno se presente en campo

Productos Entregables Esperados:

Presentación e informe final sobre los resultados del manejo de la resistencia en organismos genéticamente modificados. Los cuales deberán incluir:

1. **Estimación de la frecuencia de alelos de resistencia a las δ -endotoxinas Cry1Ac y Cry2Ab de *Bacillus thuringiensis kurstaki* Berliner en plagas más abundantes presentes en cultivos transgénicos. (Actividad 1)**
2. **Análisis de susceptibilidad a otras toxinas Cry en plagas de insectos lepidópteros sujetas a presión de selección por Organismos Genéticamente Modificados. Planteamiento de posibles estrategias para su control. (Actividad 1)**
3. **Potencial para el desarrollo de resistencia en plagas de insectos a las Cry1Ac y Cry2Ab de *Bacillus thuringiensis kurstaki* Berliner y análisis de susceptibilidad a otras toxinas Cry en las líneas resistentes generadas. Planteamiento de posibles estrategias para su control (Actividad 2)**

CALENDARIO DE ACTIVIDADES:

En función del desarrollo en paralelo de las actividades propuestas, se propone que el proyecto tenga una duración máxima de 2 años.



REFERENCIAS:

- Tabashnik, B. E.**, A. J. Gassmann, D. W. Crowder, and Y. Carriere. 2008. Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory. *Nature Biotechnol.* 26: 199-202.
- Gujar, G. T.**, V. Kalia, A. Kumari, B. P. Singh, A. Mittal, R. Nair, and M. Mohan. 2007. *Helicoverpa armigera* baseline susceptibility to *Bacillus thuringiensis* Cry toxins and resistance management for Bt cotton in India. *J. Invertebr. Pathol.* 95: 214-219.
- Bruce E. Tabashnik** and Yves Carriere. 2010 Field-Evolved Resistance to Bt Cotton: Bollworm in the U.S. and Pink Bollworm in India. *Southwestern Entomologist* 35, 417-424
- Downes, S.**, T. L. Parker, and R. J. Mahon. 2009. Frequency of alleles conferring resistance to the *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Ac and Cry2Ab in Australian populations of *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from 2002 to 2006. *J. Econ. Entomol.* 102: 733-742.
- Van Rensburg, J.B.J.** 2007. First report of field resistance by stem borer, *Busseola fusca* (Fuller) to Bt-transgenic maize. *S. African J. Plant Soil* 24: 147-151
- Tabashnik, B. E.**, A. L. Patin, T. J. Dennehy, Y. Liu, Y. Carriere, M. A. Sims, and L. Antilla. 2000. Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* in field populations of pink bollworm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 12980-12984.
- Blanco, C. A.**, D. A. Andow, C. A. Abel, D. V. Sumerford, G. Hernandez, J. D. Lopez, L. Adams, A. Groot, R. Leonard, R. Parker, G. Payne, O. P. Perera, A. P. Teran-Vargas, and A. Azuara-Dominguez. 2009. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac resistance frequency in tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 102: 381-387.