



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO
FACULTAD DE CIENCIAS**

**CONSECUENCIAS DE LA EXPRESIÓN DE
PROTEÍNAS CRY EN ALGODÓN SILVESTRE DE
OAXACA SOBRE LA COMUNIDAD DE
LEPIDÓPTEROS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A

MARINA BENÍTEZ KÁNTER

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. ANA LAURA WEGIER BRIUOLO



2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno

Benítez
Kánter
Marina
56665543
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
30550282-1

2. Datos del asesor

Dra. Ana Laura
Wegier
Briuolo

3. Datos del sinodal 1

Dra. Alicia
Callejas
Chavero

4. Datos del sinodal 2

Dra. Alicia
Gamboa
de Buen

5. Datos del sinodal 3

Dra. Patricia
Koleff
Osorio

6. Datos del sinodal 4

Dr. Alejandro
Ponce
Mendoza

7. Datos del trabajo escrito

Consecuencias de la expresión de proteínas recombinantes Cry en algodón silvestre de Oaxaca sobre la comunidad de lepidópteros. 2014.

La ignorancia es la noche de la mente, pero una noche sin luna y sin estrellas.

Confucio

ÍNDICE

RESUMEN	7
I. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1 <i>Contexto de los transgénicos.....</i>	8
1.1.1. En el mundo.....	8
1.1.2. Algodón genéticamente modificado.....	9
1.1.3. Contexto en México.....	13
1.2. <i>La problemática.....</i>	14
1.2.1 Problema 1: Efectos de proteínas Cry en Organismos no Blanco	15
1.2.2. Problema 2: Análisis de Riesgo.	16
1.2.2.1. Definición de análisis de riesgo.....	16
1.2.2.2. Importancia del análisis de riesgo.	18
1.2.2.3 Riesgo de los organismos genéticamente modificados.....	18
1.2.2.4. Métodos para el análisis de riesgo por OGM.	18
1.4. <i>Bioseguridad.....</i>	20
1.5. <i>Organismos genéticamente modificados.....</i>	20
1.5.1. Proteínas Cry.	21
1.5.2. Mecanismo de acción.	22
1.6. <i>Gossypium hirsutum L.....</i>	23
1.7. <i>Ecología y biodiversidad.....</i>	25
1.8. <i>Lepidópteros.....</i>	27
1.8.1. Lepidópteros como especies indicadoras del impacto y daño ambiental.....	27
1.8.2. Características generales.	28
1.8.3. Diversidad de lepidópteros en México.	29
1.8.4. Interacción entre lepidópteros y algodón.	29
II. JUSTIFICACIÓN.....	32
III. OBJETIVOS.....	33
3.1. <i>Objetivos.....</i>	33

3.1.1. Objetivo general.....	33
3.1.2. Objetivos particulares.....	33
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
4.1. <i>Detección de proteínas recombinantes y elección del área de estudio</i>	34
4.2. <i>Sitio de estudio</i>	35
4.3. <i>Sistema de estudio</i>	36
4.4. <i>Método</i>	37
4.4.1. Establecimiento de parcelas.	37
4.4.2. Colecta de ejemplares.	39
4.4.2.1 Búsqueda dirigida con Van Someren-Rydon (Rydon, 1964).	39
4.4.2.2. Búsqueda dirigida con red entomológica estándar (Howe, 1975).....	40
4.5. <i>Identificación de ejemplares</i>	41
4.6. <i>Análisis estadísticos</i>	42
4.7. <i>Ruta al daño</i>	44
V. RESULTADOS.....	46
5.1. <i>Riqueza</i>	46
5.2. <i>Abundancia</i>	50
5.3. <i>Diversidad de Shannon-Wiener y equidad</i>	52
5.4. <i>Equidad</i>	54
5.5. <i>Composición de especies</i>	55
5.6. <i>Índice de Jaccard</i>	59
5.7. <i>Diversidad de Renyi</i>	60
VI. DISCUSIÓN	63
6.1. <i>Análisis de los parámetros de la comunidad</i>	64
6.1.1. Diversidad Alpha. Riqueza y abundancia.	65
6.1.2. Índice de Shannon y equidad.....	65
6.1.3. Composición de especies.....	67
6.1.4. Diversidad beta.	68

6.2. Ruta al daño.....	69
6.3. Análisis general.....	74
VII. CONCLUSIONES.....	79
VIII. PERSPECTIVAS.....	82
IX. REFERENCIAS.....	83
X. APÉNDICES.....	94
10.1. Composición de especies en total.....	94
10.2. Especies con un individuo de la muestra total.....	97
10.3. Especies con un individuo de los tratamientos con <i>G. hirsutum</i>	98
10.4. Especies con un individuo de abundancia en los tratamientos control.....	99
10.5. Curva de frecuencias de los tratamientos con <i>G. hirsutum</i>	100
10.6. Curva de frecuencias de los tratamientos control.....	101
XI. GLOSARIO.....	102

RESUMEN¹

A partir de la introducción de proteínas Cry en el ambiente, y en específico, en las plantas silvestres de la metapoblación Pacífico Sur de algodón, *Gossypium hirsutum* L., se decidió plantear este trabajo donde se pretende plantear y llevar a cabo una propuesta para el análisis de los posibles efectos que pudiera tener la introducción de proteínas Cry en el ambiente, utilizando las propiedades emergentes de las comunidades.

En este sentido, el presente trabajo es un análisis de los posibles efectos indirectos que se pudieran presentar la presencia de proteínas Cry en las comunidades de lepidópteros aledañas a las plantas de *G. hirsutum* a corto plazo a causa de su introducción en el ambiente. Asimismo, con esta metodología se pretende estudiar a los lepidópteros que se encuentran asociados a las plantas de algodón silvestre en su metapoblación Pacífico Sur. Para esto se compararon dos comunidades de lepidópteros circundantes a las plantas silvestres de *G. hirsutum* en dos localidades cercanas al Istmo de Tehuantepec, en Oaxaca; una con presencia de proteínas Cry y otra sin presencia de las mismas. Posteriormente se realizaron cuatro colectas de lepidópteros durante el año y se analizaron las diferencias entre las localidades con una Aova de medidas repetidas para la riqueza y la abundancia; el índice de Shannon y una prueba de *t* para la diversidad; el inverso del índice de Shannon para la equidad; una prueba de χ^2 para la composición y el índice de Jaccard para la diversidad beta. Además del estudio entre tratamientos (con y sin proteínas recombinantes), se presenta cómo es que estos parámetros variaron a lo largo del año.

La diversidad y la equidad de especies se vieron negativamente afectadas; mientras que los parámetros de riqueza, abundancia y composición de especies no mostraron diferencias significativas entre tratamientos.

¹ Las figuras y cuadros presentados en este trabajo son de elaboración propia, a menos que se indique lo contrario.

I. INTRODUCCIÓN

En este capítulo se revisarán los conceptos relacionados con el contexto de los transgénicos, la problemática que se está dando a partir de la introducción de éstos al medio, el concepto de bioseguridad, los organismos genéticamente modificados y el algodón, y después se presentará una revisión de los conceptos generales sobre ecología y diversidad. Posteriormente se describen las características de los lepidópteros en México y su interacción con las plantas de algodón. Al final de este capítulo se pretende sentar las bases para poder desarrollar una metodología que permita responder cómo es que las plantas genéticamente modificadas de esta especie pueden tener un impacto sobre la comunidad.

1.1 Contexto de los transgénicos

1.1.1. En el mundo

Actualmente, la ingeniería genética es una rama de la biología que está teniendo muchos alcances. Esta ciencia comenzó con el desarrollo de bacterias capaces de producir insulina. Hoy en día los organismos transgénicos se utilizan para producir vacunas, insecticidas, herbicidas, medicinas, biodiesel, etc. (Hilbeck *et al.* 2011; Wegier, 2013). El maíz y el algodón *Bt* comenzaron a producirse a finales de la década de los ochenta aunque las primeras liberaciones de éstos cultivos se dieron hasta 1996 (Sanchis y Bourguet, 2008).

Desde las primeras comercializaciones en el año de 1996 y hasta el año 2013, se han sembrado más de 175 millones de hectáreas con cultivos genéticamente modificados (GM) en aproximadamente 27 países del mundo (James, 2013). Tan sólo en los últimos años, el área sembrada con transgénicos ha sustituido a los cultivos convencionales de Argentina, Brasil, China, Estados Unidos y Canadá (James, 2011). A nivel mundial los cultivos genéticamente modificados (GM) que se siembran en mayor cantidad son el maíz, el algodón y la canola (James, 2013).

Los principales países de siembra de cultivos transgénicos son Estados Unidos (70.1 millones de ha), Brasil (40.3 millones de ha), Argentina (24.4 millones de ha), India (11 millones de ha) y Canadá (10.8 millones de ha). México se encuentra en el 17° lugar en el mundo con 0.1 millones de hectáreas sembradas. Los principales cultivos GM que se siembran en México son algodón y soya (James, 2013).

En vista del potencial y de las aplicaciones de la biotecnología moderna, en la Cumbre de Río de 1992, se estableció el Protocolo de Cartagena. En el documento de la Cumbre de Río, en el artículo 15, se dice que todas las actividades que se realicen posteriores a esta reunión deberán de cumplir con ciertos principios, entre los cuáles se encuentra el principio precautorio. Este último dice que de no saber cuáles son las consecuencias, cualquier práctica debe de ser implementada con la máxima precaución (Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica, 2000).

1.1.2. Algodón genéticamente modificado.

El algodón genéticamente modificado (GM) se empezó a comercializar en 1996 en Estados Unidos y en Australia. Entre los caracteres más comunes que se le proporciona a estas plantas se encuentran las proteínas Cry para el control de plagas y la tolerancia a herbicidas (Purcell *et al.* 2010). Algunas variedades del algodón GM expresan las dos proteínas juntas. Por expresar más de un gen en una liberación, este transgénico se considera de segunda generación (Purcell *et al.* 2010).

El algodón GM que expresa proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis*, es el tercer cultivo más sembrado dentro de los cultivos GM que proporcionan resistencia a insectos. Hasta el año 2012 se sembraron 17.9 millones de hectáreas. Los países que han sembrado algodón *Bt* son India, China, Paquistán, Myanmar, Burkina Faso, Brasil, Estados Unidos, Argentina, Australia, Colombia, Costa Rica y México (James, 2011). El algodón GM que expresa genes insecticidas (*Bt*) y genes tolerantes a herbicidas (*CP4-epsps*) ocupa 4.9 millones de hectáreas de manera global. Éste se ha sembrado en Estados Unidos, Argentina, Brasil, México, Colombia y Sudáfrica (James, 2011).

Para el control de plagas, en los últimos años se ha hecho uso de la biotecnología; como la siembra de OGM, algodón *Bacillus thuringiensis* Berliner (*Bt*); y de métodos para tratar a las plagas de manera integral IPM (Integral Pest Management) (Luo *et al.* 2014). En un principio, las proteínas Cry comenzaron a insertarse y expresarse en el algodón *Bt* para el control del gusano de la polilla *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) (Wu *et al.* 2009). Con anterioridad, esta plaga se ha intentado controlar con pesticidas que han implicado el desarrollo de resistencia de insectos plagas y un alto grado de deterioro ecológico. Otra plaga del algodón que en los últimos años ha tomado mucha relevancia es *Helicoverpa armigera* (Parimi *et al.* 2010).

Entre las proteínas que se han utilizado para controlar las plagas del algodón se encuentran las

endoproteínas Cry 1Ab, Cry 1Ac, Cry 2Ab y Cry 1F y la proteína vegetativa Vip3. En algunos casos se ha utilizado la combinación de dos de estas proteínas (Cry y Vip) para que el pesticida sea más efectivo (Purcell *et al.* 2010; CERA, 2012).

En los siguientes años se piensa implementar la siembra del algodón GM con caracteres nuevos como la resistencia a la sequía y resistencia a otro tipo de plagas como las chinches del género *Lygus* (Myridae) que actualmente provoca que se caigan los botones florales, disminuye la calidad de la fibra y afecta la viabilidad de las semillas (Purcell *et al.* 2010). Entre los algodones con tolerancia a herbicidas, existen los tolerantes a glifosato, glufosinato, bromoxilina e imidazolinona (Wilkins *et al.* 2000).

A continuación el Cuadro 1.1 muestra los 21 eventos de liberación de algodón GM en el mundo. Los primeros 17 corresponden con las liberaciones hechas en México. Las principales características conferidas a las plantas son la resistencia a insectos y la tolerancia a herbicidas.

Cuadro 1.1. Eventos de liberación de algodón genéticamente modificado en el mundo.

Evento	Compañía	Genes insertos	Característica Conferida	Liberación en México
MON531/757/10/76	Monsanto Company	Gen <i>cry1Ac</i> ¹ . Gen <i>nptII</i> que le confiere resistencia a kanamicina y gen <i>aad</i> como agente de selección.	Resistencia a <i>Heliothis virescens</i> , <i>Pectinophora gossypiella</i> y <i>Helicoverpa zea</i> .	1997
MON15985	Monsanto Company	Genes <i>cry1Ac</i> y <i>cry2Ab2</i> . Genes <i>add</i> , <i>nptII</i> y <i>uidA</i> ² como marcadores de selección.	Resistencia a <i>Heliothis virescens</i> , <i>Pectinophora gossypiella</i> , <i>Helicoverpa zea</i> y <i>Spodoptera exigua</i> .	2003
281-24-236	DOW AgroSciences LLC	Gen <i>cry1F</i> . Gen <i>PAT</i> como marcador de selección.	Resistencia a <i>Heliothis virescens</i> , <i>Spodoptera exigua</i> , <i>Pseudoplusia includes</i> y <i>Helicoverpa zea</i> .	2004

3006-210-23	DOW AgroSciences LLC	Gen <i>cry1Ac</i> . Gen <i>PAT</i> como marcador de selección.	Resistencia a <i>Heliothis virescens</i> , <i>Pectinophora gossypiella</i> , <i>Helicoverpa zea</i> , <i>Spodoptera exigua</i> y <i>Pseudoplusia includens</i> .	2004
DAS-21023-5 x DAS-24236-5	DOW AgroSciences LLC	Genes <i>cry1F</i> y <i>cry1Ac</i> . Gen <i>PAT</i> como marcador de selección.	Resistencia a <i>Heliothis virescens</i> <i>Spodoptera exigua</i> , <i>Pseudoplusia includens</i> , <i>Helicoverpa zea</i> y <i>Pectinophora gossypiella</i> .	2004
COT102	Syngenta Seeds, Inc.	Gen <i>vip3A(a)</i> . Gen <i>APH4</i> , que le confiere resistencia a hygromicina, como marcador de selección.	Resistencia a <i>Helicoverpa zea</i> , <i>Heliothis virescens</i> , <i>Pectinophora gossypiella</i> , <i>Spodoptera frugiperda</i> , <i>Spodoptera exigua</i> , <i>Pseudoplusia includens</i> , <i>Trichoplusia ni</i> y <i>Bucculatrix thurberiella</i> .	2010
MON-00531-6 x MON-01445-2	Monsanto Company	<i>CP4-EPSPS</i> y <i>cry1Ac</i> .	Resistencia a <i>Heliothis virescens</i> , <i>Pectinophora gossypiella</i> , <i>Helicoverpa zea</i> y <i>Spodoptera exigua</i> .	2002
			Tolerancia a glifosato.	
DAS-21023-5 x DAS-24236-5 x MON-011445-2	DOW AgroSciences LLC	Genes <i>cry1F</i> , <i>cry1Ac</i> y <i>CP4-EPSPS</i> . Genes <i>PAT</i> , <i>add</i> y <i>nptII</i> como marcadores de selección.	Resistencia a <i>Heliothis virescens</i> , <i>Pectinophora gossypiella</i> y <i>Helicoverpa zea</i> .	2005
			Tolerancia a glifosato.	
DAS-21023-5 x DAS-24236-5 x MON88913	DOW AgroSciences LLC y Pioneer Hi-Bred International Inc.	Genes <i>cry 1F</i> , <i>cry 1Ac</i> y <i>CP4-EPSPS</i> . Gen <i>PAT</i> como marcador de selección.	Resistencia a <i>Heliothis virescens</i> , <i>Pectinophora gossypiella</i> y <i>Helicoverpa zea</i> .	2006
			Tolerancia a glifosato.	
MON15985 x MON88913	Monsanto Company	<i>CP4-EPSPS</i> , <i>cry1Ac</i> y <i>cry2Ab</i> . Genes <i>add</i> , <i>nptII</i> y <i>uidA</i> como marcadores de selección.	Resistencia a <i>Heliothis virescens</i> , <i>Pectinophora gossypiella</i> , <i>Helicoverpa zea</i> y <i>Spodoptera exigua</i> .	2006

			Tolerancia a glifosato.	
MON15985 x MON01445-2	Monsanto Company	CP4-EPSPS, <i>cry1Ac</i> y <i>cry2Ab</i> . Genes <i>add</i> , <i>nptII</i> y <i>uidA</i> como marcadores de selección.	Resistencia a <i>Heliothis virescens</i> , <i>Pectinophora gossypiella</i> , <i>Helicoverpa zea</i> y <i>Spodoptera exigua</i> .	2006
			Tolerancia a glifosato.	
LLCotton25 x MON15985	Bayer CropScience (Aventis CropScience(AgrEvo))	Genes <i>cry1Ac</i> y <i>cry2Ab</i> . Gen <i>bar</i> y gen <i>PAT</i> como marcadores de selección.	Resistencia a <i>Heliothis virescens</i> , <i>Pectinophora gossypiella</i> y <i>Helicoverpa zea</i> .	2008
			Resistencia a glufosinato.	
BXN	Calgene Inc.	Gen <i>bxn</i> para codificar nitrilasa proveniente de <i>Klebsiella pneumoniae</i> . Gen <i>nptII</i> y gen terminador nopalina sintasa (<i>nos</i>).	Es tolerante a herbicidas bromoxinil, que atacan plantas dicotiledóneas.	1996
MON1445/1698	Monsanto Company	Gen CP4 <i>epsps</i> , <i>add</i> y <i>nptII</i> .	Tolerancia al herbicida glifosato.	2000
LLCotton25	Bayer CropScience (Aventis CropScience(AgrEvo))	Gen <i>bar</i> (phosphinothricin N- acetyltransferase), proveniente de <i>S. hygroscopicus</i> .	Resistencia a herbicidas compuestos con el amonio glufosinato.	2006
MON88913	Monsanto Company	Dos genes CP4 <i>epsps</i> provenientes de la bacteria <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ; terminador T-9 <i>Pisum sativum</i> .	Tolerancia al herbicida glifosato.	2006
GHB614	Bayer CropScience USA LP	Gen <i>epsps</i> (5-enolpiruvyl shikimato-3-fosfato sintasa).	Tolerancia al herbicida glifosato.	2008
19-15A	DuPont Canada Agricultural Products	Gen <i>als</i> , acetolactato syntasa. Este es un químero de 2 genes resistentes AHAS (S4 y Hr4)).	Resistencia y tolerancia a los herbicidas sulfonilureas.	no
31807/31808	Calgene Inc.	Gen <i>cry1Ac</i> de la cepa <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> (Btk); gen <i>bxn</i> para codificar	Resistencia a insectos y tolerancia a herbicidas bromixinil.	no

		nitralasa; y gen <i>nptII</i> .		
COT67B	Syngenta Seeds, Inc.	Gen <i>cry1Ab</i> de <i>B. thuringiensis</i> y el gen <i>aph4</i> como marcador de selección.	Resistencia a insectos.	no
Event- 1	JK Agri Genetics Ltd (India)	Gen <i>cry1Ac</i> proveniente de <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> HD-73; gen <i>nptII</i> como agente de selección; y gen terminador <i>nos</i> .	Resistencia a insectos <i>Helicoverpa armigera</i> , <i>Pectinophora gossypiella</i> (gusano rosa) y <i>Earias vittella</i> .	no

Nota: La mayor parte de la información se obtuvo de (CERA, 2013). Gen *cry 1F* se saca de cepas de *Bacillus thuringiensis* var. *Aizawai*. El gen *PAT* se obtiene de la bacteria *Streptomyces viridochromogenes*. Gen *vip3A* se obtiene de cepas *Bacillus thuringiensis*.AB88. Gen *cry2Ab2* se extrae de cepas de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*. ¹ Gen *cry1Ac* de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 (B.t.k.). El gen *uidA* es un marcador de selección colorimétrico.

1.1.3. Contexto en México.

Los cultivos genéticamente modificados (GM) comenzaron a sembrarse en México en 1988 con el tomate *Bt*. Este cultivo se sembró en el estado de Sinaloa. Posteriormente, con la publicación de la norma NOM-056-FITO-1995 en el *Diario Oficial de la Federación*, en 1996 se comenzaron a sembrar de manera experimental algodón y maíz GM (Serratos, 2008, SENASICA, 2013).

En esta época, la siembra de algodón GM comenzó con siembras experimentales en los estados de Sonora, Coahuila, Sinaloa y Chihuahua. En la *Fig. 1.1* se muestra que del 2009 al 2011 la siembra de algodón GM en México aumentó de manera considerable.

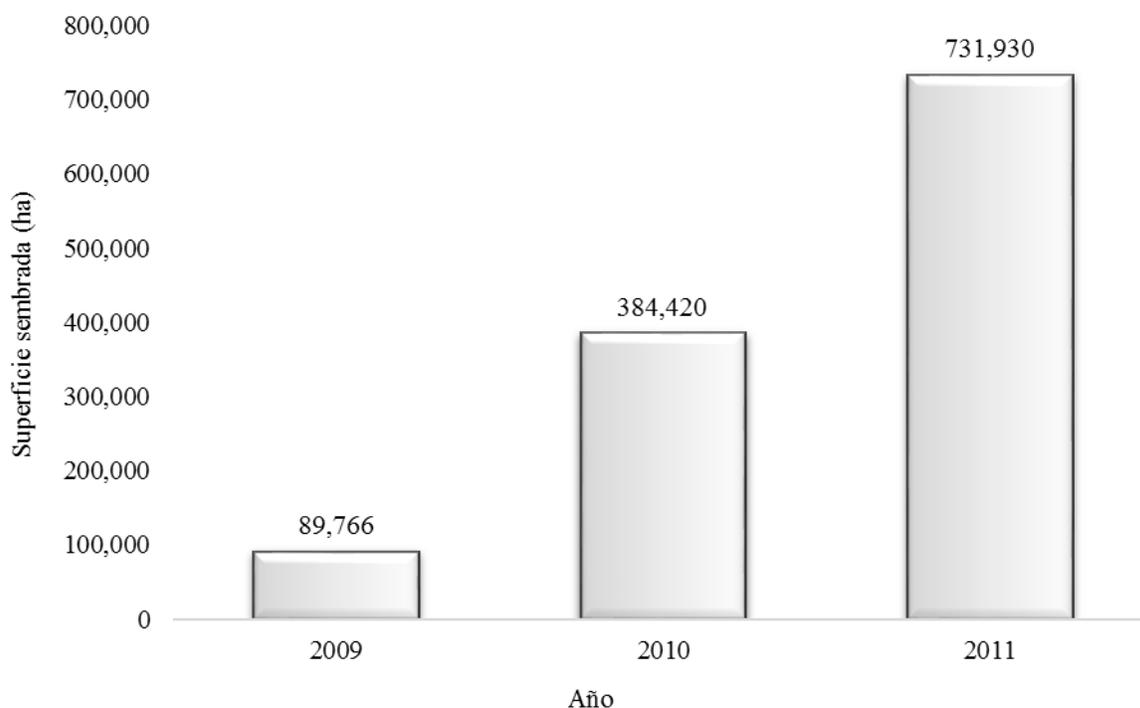


Figura 1.1. Liberación de algodón GM en México (SENASICA, 2014). Se aprecia el incremento de la siembra de algodón *Bt* en del año 2009 al año 2011.

Desde ese entonces, en México, para el cultivo de algodón se han registrado 17 eventos de liberación, entre los cuales seis proporcionan a las plantas resistencia a las larvas de lepidópteros (Cry), cinco son sólo para la tolerancia a herbicidas y otros seis están compuestos por los dos tipos de resistencia (Cuadro 1.1).

1.2. La problemática

Como vimos en el apartado anterior en las últimas dos décadas se ha incrementado en gran medida la siembra de cultivos GM, de los cuáles el algodón es uno de los más importantes. Sin embargo, aún no se han analizado a profundidad las consecuencias ecológicas y evolutivas que podrían conllevar su uso y liberación al ambiente a la par del acceso que se tiene a estas nuevas tecnologías, En consecuencia, no se tiene un panorama claro que pueda ayudar a la toma de decisiones de gobiernos y empresas acerca de cuáles serán las consecuencias en materia de salud, alimentación y economía, así como

tampoco se conocen las medidas necesarias para monitorear y mitigar efectos adversos. De esta manera a continuación se sintetizan dos de los problemas más recurrentes que se han encontrado en la literatura en relación con los OGM.

1.2.1 Problema 1: Efectos de proteínas Cry en Organismos no Blanco

Entre algunos de los problemas que se presentan a partir de la introducción de los organismos genéticamente modificados (OGM) al ambiente, se encuentran los efectos que las proteínas recombinantes tienen sobre los organismos que no son objeto directo del efecto (organismos no blanco), pero que de una u otra manera se encuentran presentes y tienen probabilidad de interactuar con estas proteínas.

El deterioro ambiental y el desarrollo de resistencia a *Bt* por parte de las plagas son dos de los grandes problemas relacionados con los OGM hoy en día. Entre otras problemáticas relacionadas con estos organismos se encuentran la pérdida de diversidad de especies y la disminución en la abundancia relativa de cada una de ellas (Lang y Bühler, 2012). En los últimos años, se han realizado diversos experimentos que prueban los efectos de la introducción de OGM al ambiente a distintos niveles ecológicos. Algunos de estos estudios son mencionados a continuación.

Cuando hablamos de organismos no blanco, uno de los principales factores de riesgo a considerar es la dispersión del polen de plantas transgénicas en el medio (Dively *et al.* 2004; Sundaramurthy, 2010). Este polen puede tener uno o varios vectores de dispersión, dependiendo de la planta de la que hablemos; cuando éste se deposita en las plantas aledañas al cultivo transgénico de referencia, organismos como las larvas de las mariposas han sido afectadas por el consumo de éste. Tal es el caso de la mariposa monarca *Danaus plexippus*, en donde a través de experimentos de laboratorio se pudo observar que la sobrevivencia de las larvas que consumieron polen de maíz *Bt* comieron menos, crecieron más lentamente y tuvieron una mortalidad mayor que aquellas larvas que se alimentaron con polen de maíz convencional (Losey *et al.* 1999). Posteriormente se hicieron las estimaciones para analizar qué tan expuesta está esta mariposa ante el polen de maíz *Bt* en estados Unidos y Canadá, donde se estimó que solo el 6% de las mariposas podrían verse afectadas (Sears *et al.* 2001). De esta manera, se puede decir que si el polen de las especies transgénicas es consumido por larvas de especies distintas a los organismos blanco (especies para las que están hechos los transgénicos), podría presentarse un efecto adverso a distintos niveles de diversidad biológica, difícil de

esperar, observar y medir en el campo.

En este sentido, algunos otros estudios de laboratorio han encontrado daños significativos en las larvas de distintos lepidópteros. Tal es el caso de un experimento realizado por Wu *et al.* (2009) donde se demostró las larvas de *Spodoptera exigua* aumentaron de peso y tamaño al alimentarse de Cry1Ac. En otro estudio de laboratorio realizado por Dutton *et al.* (2005), la mortalidad y el desarrollo de las larvas de *Spodoptera littoralis* se afectaron negativamente cuando éstas consumieron maíz *Bt*.

1.2.2. Problema 2: Análisis de Riesgo.

El segundo problema que se debe de enfrentar ante la introducción de OGM al ambiente, es que debido a que los análisis de riesgo deben de analizarse caso por caso, aún no existen protocolos generales para analizar si éstos representan riesgos para la salud o para el medio ambiente. A continuación se detalla a mayor profundidad este problema.

1.2.2.1. Definición de análisis de riesgo.

El análisis de riesgo es una herramienta que se utiliza para saber cuál es el impacto de alguna actividad humana o fenómeno natural sobre el ambiente o la salud humana (Hilbeck *et al.* 2011). En este contexto y de acuerdo con La Convención de la Biodiversidad Biológica (Convenio sobre la Diversidad Biológica, 2000), se puede definir al “*ambiente*” como la suma de sus factores bióticos y abióticos. La Biología de la Conservación define que para que exista un “*ambiente*”, se requiere que su conservación dé en todos sus componentes (composición, estructura y función) y a distintos niveles de diversidad biológica (genes, especies, poblaciones, comunidades y ecosistemas) (Bartz *et al.* 2009).

Hoy en día existen muchas dificultades para establecer un protocolo para estandarizar los métodos para evaluar el riesgo y el impacto ambiental (Environmental Risk Assessment, ERA). Esto se debe a que no hay un significado concreto de “riesgo ambiental”, y a que no está clarificado cuál es el valor de la biodiversidad ni para el contexto nacional ni para el internacional (Sarewitz, 2004; Sanvido *et al.* 2011).

En la literatura existen diversas definiciones de impacto ambiental (Sanvido *et al.* 2011). Algunos autores concuerdan que para que exista impacto en la naturaleza, se debe de generar un

“daño” en ella (Sarewitz, 2004; Sanvido *et al.* 2011). De esta manera, el “daño ambiental” se define como un efecto adverso a cualquiera de los recursos bióticos y abióticos de un ecosistema antes de que ocurriera el impacto causado por los seres humanos o por fenómenos naturales. Para que haya un impacto ambiental y que éste tenga un efecto adverso, tiene que existir la reducción de algún atributo valorado para la conservación del recurso en sí (Bartz *et al.* 2009). Dicho de otra manera, sólo aquellos efectos que tengan una disminución sobre la valoración de la conservación del recurso pueden ser considerados como daños.

Una evaluación de riesgo ambiental debe de cumplir con las siguientes etapas (LBOGM, 2005; Convenio sobre la Diversidad Biológica, 2012):

- a) Se deben de identificar las características tanto genotípicas como fenotípicas que pudieran tener algún efecto adverso sobre la diversidad biológica, en el medio receptor o en la salud humana que se expresan en el organismo vivo modificado.
- b) Considerando el nivel y el tipo de exposición del probable medio receptor del organismo vivo modificado, se debe de evaluar la probabilidad de que estos efectos ocurran.
- c) Hay que realizar una evaluación de las consecuencias de los efectos adversos.
- d) Se debe de realizar la estimación del posible riesgo global que represente el OGM, basada en la evaluación de la probabilidad de que los posibles riesgos y las consecuencias identificadas ocurran.
- e) Se deben de realizar recomendaciones de los posibles riesgos para analizar si estos son o no aceptables o manejables. En esta etapa también se deben de determinar las estrategias para el manejo de esos posibles riesgos.

El daño ambiental puede ser definido de tres maneras diferentes; la primera involucra la afectación causada a un servicio ambiental; la segunda corresponde al impacto generado en los distintos niveles de diversidad; y la tercera se refiere al efecto adverso que puede ser cuantificado y predecible (Sanvido *et al.* 2011). De estas tres definiciones surgen las siguientes preguntas: ¿qué es lo que se debe de proteger? y ¿qué es lo que se debe de medir para poder predecir los daños ambientales provocados por un organismo genéticamente modificado?

1.2.2.2. Importancia del análisis de riesgo.

México al ser uno de los más mega diversos del mundo y siendo centro de origen y diversidad de muchas especies, debe de contar con mecanismos específicos de monitoreo de los efectos adversos que representan los OGM para la salud, el medio ambiente y la diversidad biológica, previos a su liberación (LBOGM, 2005). A nueve años de la publicación de esta ley, y a 18 años de la introducción del algodón *Bt* en el territorio nacional, aún no se cuenta con herramientas y procedimientos establecidos para llevar a cabo el monitoreo de las adversidades de manera sistematizada (Wegier, 2013). Sin embargo, a la par del acceso a nuevas tecnologías, aún no se cuentan con métodos específicos para su monitoreo en el ambiente y la salud humana. En consecuencia, a la fecha no se cuenta con un panorama claro que pueda ayudar al gobierno para la toma de decisiones sobre cuáles serán las consecuencias de la introducción de OGM en materia de salud, alimentación y economía. Por ello, se debe de monitorear cuál es la situación de manera previa a la liberación de los mismos.

1.2.2.3 Riesgo de los organismos genéticamente modificados.

Identificar los riesgos que implica la introducción de OGM al ambiente podría resultar complicado debido a que aún no se han caracterizado todas las relaciones ecológicas y filogenéticas que tienen estos organismos con otros que se encuentran dentro del ambiente donde se van a liberar. De esta manera se han establecido las siguientes categorías de riesgo (Breckling *et al.* 2011):

- Flujo horizontal de genes recombinantes, entre organismos de especies diferentes.
- Flujo vertical de los genes recombinantes, entre individuos de la misma especie a través de la descendencia.
- Evolución de la resistencia por parte de organismos blanco.
- Afectación a los organismos no blanco.

1.2.2.4. Métodos para el análisis de riesgo por OGM.

En el contexto de los OGM, las evaluaciones de impacto ambiental podrían ser útiles no sólo para medir el impacto sino también para medir los efectos acumulativos que se desencadenan a partir de la

presencia de éstos en el campo (García y Altieri, 2005).

Hay distintas propuestas para evaluar el daño ambiental causado por OGM. En 2011 Sanvido y colaboradores propusieron que para la definición de daño, es importante para analizar los datos científicos obtenidos durante la aplicación de éstas o de cualquier otro método de evaluación de efectos adversos al medio. Por otro lado, se resalta la importancia de la estandarización de la metodología para analizar los efectos que tienen los OGM en su entorno.

Otro enfoque consiste en evaluar los efectos de las proteínas recombinantes a distintos niveles, a través de la medición de daños en la transferencia horizontal (por el DNA libre), la transferencia vertical (a los hijos), la persistencia (introgresión y transferencia del gene en la población), la hibridación (combinación con el material genético de otras especies), los efectos a órdenes superiores de organismos (efectos en las cadenas tróficas) y a través de los efectos indirectos (Breckling *et al.* 2011).

También se puede evaluar el daño causado por los OGM siguiendo cuatro pasos: la identificación del riesgo; las pruebas de exposición al riesgo; la caracterización de riqueza; y las opciones de mitigación (Meyer, 2011). Este procedimiento se puede realizar mediante la identificación y el monitoreo de las especies clave para el ecosistema en donde el OGM va a ser liberado o ha sido introducido mediante hibridación con otros taxa (Wegier *et al.* 2011).

Para poder hacer una evaluación de impacto ambiental causada por OGM, es necesario clarificar las diferencias entre los efectos económicos y ecológicos, entre efectos adversos y daños (Bartz *et al.* 2009), sin perder de vista los daños que pudieran generar en la salud. Para esto, proponen una metodología para identificar y diferenciar la tecnología, los desencadenadores, los procesos y los efectos, ya sea de un OGM o de especies exóticas. Algunos de los posibles efectos que pudieran estar causando los OGM en el ambiente son la hibridación con otros taxa, la acumulación de sustancias tóxicas en la cadena alimentaria; y los cambios ambientales a nivel genético, de comunidades o de ecosistemas. Cada uno de estos cambios corresponde respectivamente con cada una de las categorías de diversidad en el ecosistema propuestas con anterioridad.

A los efectos primarios que tienen los OGM sobre la salud y el medio ambiente se han considerado como directos, mientras que a los efectos indirectos se les considera como aquellos que se dan como consecuencia de una cadena de eventos como la interacción con otros organismos, el flujo génico y la dispersión de polen. De igual manera, las consecuencias de la introducción de OGM,

dependiendo del tiempo que le lleve expresarse podría ser de efecto inmediato o a largo plazo (Hilbeck *et al.* 2011).

1.4. Bioseguridad.

A partir de la generación de estas nuevas tecnologías y de la elaboración de los protocolos de Cartagena, y Nagoya se establece el concepto de bioseguridad, el cual se refiere a *“todas aquellas acciones y medidas de evaluación, monitoreo, control y prevención que se deben asumir en la realización de actividades con organismos genéticamente modificados, con el objeto de prevenir, evitar o reducir los posibles riesgos que dichas actividades pudieran ocasionar a la salud humana o al medio ambiente y la diversidad biológica, incluyendo los aspectos de inocuidad de dichos organismos que se destinen para uso o consumo humano”* (Protocolo de Nagoya, 2011).

En el año 2005 en México se creó la *Ley de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados* (LBOGM, 2005), con el objetivo de regular las actividades relacionadas con OGM, de manera que se puedan minimizar los posibles riesgos que éstos pudieran causar para la salud y el medio ambiente (SAGARPA, 2014).

1.5. Organismos genéticamente modificados

Los OGM son identidades a las que por medio de la manipulación genética, se les agrega secuencias de ácido nucleico con funciones específicas, que antes no podrían expresar con su secuencia inicial de ADN (Ácido desoxirribonucleico) (Secretaría del Convenio Sobre la Diversidad Biológica, 2000; Sundaramurthy, 2010).

Estas inserciones se realizan con el objetivo de conferir a distintos organismos características nuevas como la tolerancia a herbicidas; la resistencia a plagas, virus u hongos; la tolerancia a condiciones de estrés biótico y abiótico (Vaeck *et al.* 1987); e incluso para la captura de carbono (Jansson *et al.* 2010). En los cultivos estas técnicas se utilizaron por primera vez en 1983 (Herrera-Estrella *et al.* 1983) con el objetivo principal de atacar a las plagas de distintos cultivos (Sundaramurthy, 2010).

Los transgénicos se pueden clasificar en 3 generaciones dependiendo de cuáles son los objetivos para los cuáles están hechos. Con los organismos de primera generación se hace referencia a aquellos que sólo benefician al productor (Ej. Insecticidas y herbicidas). Los de segunda generación hacen referencia a los OGM que proporcionan un beneficio tanto al productor y como al consumidor (Ej. Vacunas, alimentos con mayor valor nutricional). Los de tercera generación son todos aquellos productos que no son modificados para obtener un beneficio alimenticio o de la salud (Ejemplo: biocombustibles y fibras textiles) (James, 2011; Wegier, 2013).

1.5.1. Proteínas Cry.

En el mercado existen OGM que expresan diversos tipos de proteínas recombinantes. Entre las más comunes se encuentran las proteínas llamadas Cry, que les proporcionan a las plantas resistencia a distintos tipos de plagas y las proteínas CP4-EPSPS que les confiere resistencia a herbicidas como el glifosato.

Las proteínas Cry se conocen desde principios del siglo XX, mientras que sus efectos como insecticida desde la década de 1920. Desde la época de los setenta se han utilizado para atacar a las plagas de diferentes cultivos (Sanchis y Bourguet, 2008; Heckel, 2012). Hoy en día las secuencias que codifican a estas proteínas se extraen de distintas cepas de la bacteria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) y se insertan en el genoma de plantas de interés comercial para atacar a las plagas de estos cultivos (Höfte y Whiteley, 1989). *Bacillus thuringiensis* es una bacteria Gram positiva (+) que se encuentra en el suelo asociada principalmente a los cultivos de tabaco. Esta bacteria secreta proteínas Cry cuando se reproduce por medio de la esporulación (Höfte y Whiteley, 1989; Sanchis y Bourguet, 2008).

En los últimos 20 años la ingeniería genética ha encontrado la forma de aislar los genes que producen estos cristales. Estos genes se denominan *Cry*, mientras que a las proteínas que se expresan teniendo como base estas secuencias genéticas se les conocen como endoproteínas. Cuando éstas generan un daño adverso a los organismos que las consumen, se llaman δ -endotoxinas (Höfte y Whiteley, 1989; Sanchis y Bourguet, 2008). En la literatura hay una gran variedad de genes *Cry* que se clasifican en 14 grupos según su estructura y mecanismo de acción (Höfte y Whiteley, 1989). Dentro de estos 14 tipos, existen 4 superfamilias que se dividen según los organismos en los que es activa la proteína recombinante: las proteínas que actúan en el orden Lepidoptera (mariposas) se denominan *I*;

en Lepidoptera y Diptera (moscas) *II*; Coleoptera (escarabajos) *III*; y sólo Diptera *IV* (Höfte y Whiteley, 1989).

Las proteínas recombinantes Cry, provenientes de la cepas de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (*B.t.k.*), han sido evaluadas para atacar a 55 plagas de lepidópteros que se encuentran presentes en 200 cultivos (Wilcox *et al.* 1986). De esta cepa se obtienen las proteínas Cry1Aa y Cry1Ac. Las proteínas Cry1Ab y Cry1Ac son producidas de manera natural por la cepa *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* (Höfte y Whiteley, 1989).

En este trabajo se realizó una revisión bibliográfica sobre cuáles son las especies blanco de las proteínas Cry. Se encontró que éstas son poco específicas y que tienen efecto sobre una gran gama de especies de lepidópteros (Höfte y Whiteley, 1989; Sanchis y Bourguet, 2008; Aronson y Shai, 2001).

1.5.2. Mecanismo de acción.

Muchas de las proteínas cristalinas que se generan por *B. thuringiensis*, son prototoxinas. Estas últimas se llaman así debido a que al estar en el intestino de las larvas de lepidópteros, dípteros y coleópteros, se rompen en pedazos de menor tamaño, generando péptidos que son capaces de actuar en más de un sitio activo (Höfte y Whiteley, 1989; Sanchis y Bourguet, 2008). Estos péptidos se unen con proteínas de membrana presentes en el epitelio del intestino. Posterior a la unión con las membranas celulares, las proteínas producen cristales, los cuales forman poros en las membranas de las células de manera consecutiva. Cuando se rompen las células del intestino, el organismo muere (Höfte y Whiteley, 1989).

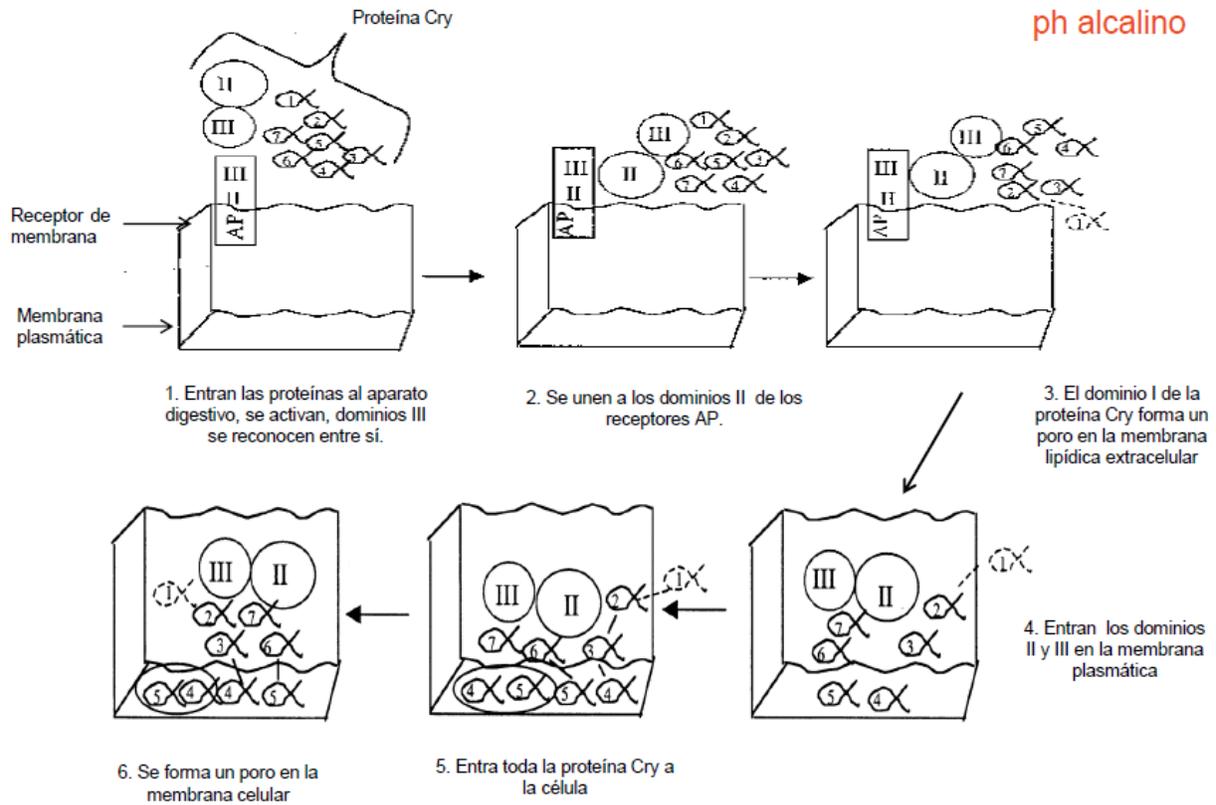


Figura 1.2. Mecanismo de acción de las proteínas Cry. Modificado de Aronson y Shai, 2001.

Las proteínas Cry1Aa son proteínas que tienen tres dominios funcionales; los dominios II y III están relacionados con la unión a los receptores del epitelio intestinal de distintos organismos, mientras que el dominio I forma poros selectivos de cationes en las membranas lipídicas de los hospederos (Heckel, 2012). Cabe mencionar que una vez que se introduce la proteína recombinante en el genoma de la planta de interés, ésta se expresa en todos los tejidos (Sanchis y Bourguet, 2008).

1.6. *Gossypium hirsutum* L.

El algodón, *Gossypium hirsutum* L., es una planta de la familia Malvaceae, tetraploide, económicamente importante y que tiene su centro de origen y diversidad genética en México (Fryxell, 1992; Brubaker y Wendel, 1994; Wegier *et al.* 2011; Wegier, 2013).

De manera histórica, la fibra del algodón se ha obtenido principalmente de 4 especies del género *Gossypium*; *G. hirsutum*, *G. barbadense*, *G. arboreum* y *G. herbaceum*. *G. barbadense* se es

originario de América del Sur, *G. arboreum* de India y *G. herbaceum* de África. Actualmente *G. hirsutum* es la especie económicamente más importante, ya que de ella se obtiene aproximadamente el 95% de la fibra que se utiliza en la industria para la fabricación de distintos productos (Wegier, 2013).

Al ser una planta de interés económico, una gran parte los estudios de ecología y evolución del algodón se han realizado utilizando plantas domesticadas (Wegier, 2013). Sin embargo, la diversidad genética de la especie se ha encontrado en sus parientes silvestres, los cuáles no han pasado por un proceso de domesticación (Wegier, 2013). A diferencia de las plantas cultivadas, las plantas silvestres de algodón tienen menor proporción de fibra en el fruto, son de formas variadas y tienen ciclos de vida mayores a un año (Wegier, 2013).

A la fecha, utilizando la estructura, geográfica, ecológica y genética se han determinado ocho metapoblaciones de algodón silvestre en México (Wegier *et al.* 2011, Fig. 1.3.). Debido a que se sabe la fecha exacta de introducción de organismos genéticamente modificados al país, se pueden utilizar las proteínas recombinantes como marcadores moleculares que indican un flujo reciente, en el estudio de Wegier y colaboradores (2011) se analizaron las proteínas recombinantes más abundantes en las liberaciones de algodón: Cry1Ab/Ac, Cry2A CP4-ESPSS y Pat/bar, localizando en cuatro de las ocho metapoblaciones presencia de por lo menos alguna de ellas. En la metapoblación Pacífico Sur que corresponde a los estados de Oaxaca, Guerrero y Chiapas, se encontró la proteína Cry1Ab/Ac en algunas de las comunidades estudiadas (Wegier *et al.* 2011, Fig. 1.4.).

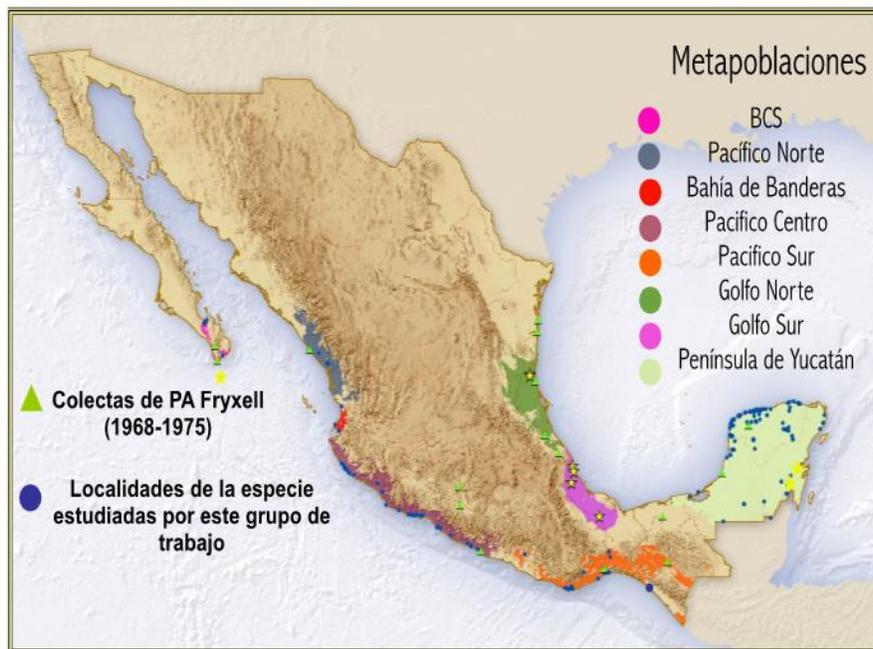


Figura 1.3. Distribución geográfica de las metapoblaciones de *G. hirsutum* en México (Wegier *et al.* 2011).

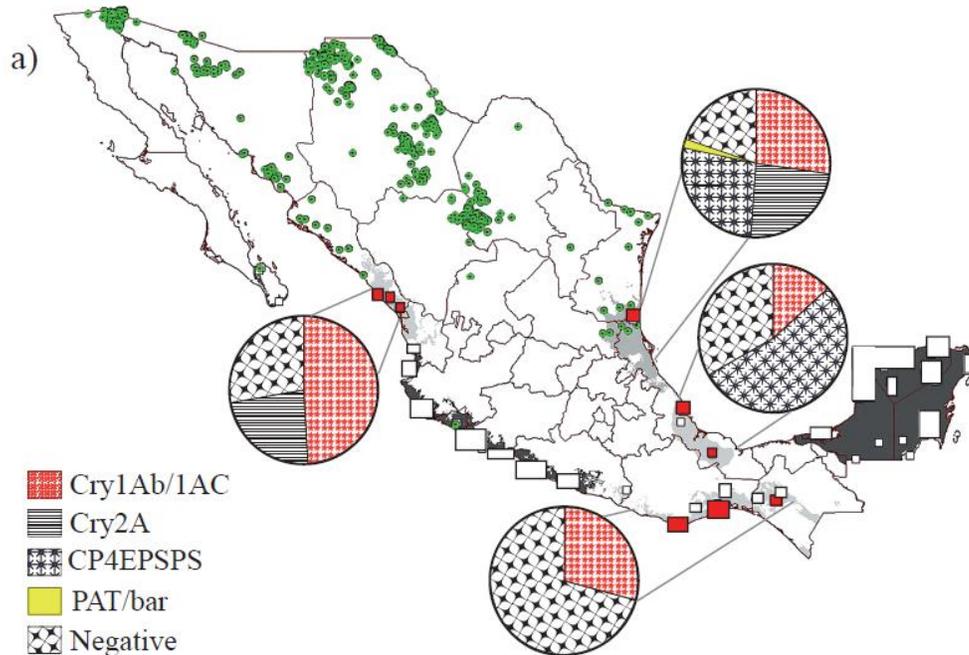


Figura 1.4. Presencia de proteínas recombinantes en las metapoblaciones de *G. hirsutum* (Wegier *et al.* 2011).

1.7. Ecología y biodiversidad

Históricamente, ha sido difícil definir hasta dónde llegan los límites de las comunidades bióticas y los mecanismos mediante los cuales éstas se generan y se transforman. Hasta hoy día, existe el dilema de si las comunidades actúan como un ente autónomo o como la suma del componente de cada una de las poblaciones y especies que las conforman. Estas son ideas que han intentado dilucidar los ecólogos desde principios del siglo XX, siendo Gleason y Clements los máximos exponentes (Gurevitch *et al.* 2006).

Para analizar si las proteínas recombinantes tienen algún efecto sobre los ecosistemas y los seres vivos se han llevado a cabo distintos experimentos tanto en laboratorio (Wu *et al.* 2009; Li *et al.* 2010), como en campo (Dively *et al.* 2005, Whitehouse *et al.* 2005; Bartz *et al.* 2009). En este estudio se

propone una metodología a partir del estudio de las comunidades bióticas, para corroborar si las proteínas recombinantes tienen un efecto adverso sobre el ambiente.

El término de diversidad biológica o biodiversidad tiene diversos significados dependiendo del nivel al que nos estemos refiriendo. Entre éstos los principales niveles de diversidad en la naturaleza son el de diversidad genética, de especies, de hábitats y de ecosistemas (Tilman *et al.* 1997).

Para distintas disciplinas biológicas como la biogeografía y la ecología, es importante la comprensión de cómo y del porqué se distribuye la biodiversidad en los ecosistemas terrestres. A distintos niveles, este parámetro funciona como indicador del funcionamiento de un ecosistema (Tilman *et al.* 1997). Así, la comunidad es un nivel de clasificación ecológica y se caracteriza por estar compuesta de distintas poblaciones de especies que interactúan entre sí en un espacio y tiempo determinados. Esto quiere decir que los organismos de una población afectan de alguna manera a los de otra (Gurevitch *et al.* 2006).

Actualmente hay un consenso sobre el análisis de los ecosistemas, pues éstos poseen propiedades emergentes particulares que pueden ser medidas y modificadas en el tiempo. Los estudios relacionados con este tema se están enfocando más en definir los procesos que conllevan al establecimiento de las comunidades bióticas, que al estudio *per se* de las propiedades emergentes de éstas (Gurevitch *et al.* 2006). De esta manera las propiedades emergentes, que nos ayudan a medir y analizar la diversidad y los procesos que se llevan a cabo en este nivel biológico, son la abundancia, riqueza, composición de especies, conectividad, biomasa, equidad o equitatividad, entre otras (Odum y Garret, 2005; Gurevitch *et al.* 2006).

En este nivel ecológico, la diversidad se puede medir dependiendo del sitio y de las comparaciones que se realizan entre éste y otro. Existen tres formas diferentes de medir la diversidad dependiendo de la escala a la que queramos trabajar: alpha (α), beta (β) y gamma (γ) (Whittaker, 1972). La diversidad alpha hace referencia a las especies que se encuentran en un área, región o ecosistema determinado; la diversidad gamma hace referencia al total de especies que se encuentran en una región; y la diversidad beta hace referencia a la diferencia en la composición de especies entre dos o más localidades o ecosistemas de una región particular (Gurevitch *et al.* 2006).

En la literatura, para referirse a la diversidad alpha (α) se hace mención tanto a la riqueza como a la abundancia de las especies que hay en un sitio específico. La riqueza y la abundancia son dos propiedades emergentes que permiten definir cómo es la composición de una comunidad en un espacio

y tiempo determinados (Odum y Garret, 2005). Para este trabajo ambos parámetros son importantes; el término de *riqueza* hará referencia al número de especies que se encuentran presentes en cada uno de los sitios de estudio, mientras que el de *abundancia* connotará al número de individuos de una especie dada que existen en el lugar definido. A partir de la abundancia relativa de cada una de las especies de una comunidad, se puede definir a la *equidad* como el parámetro que ayuda a describir qué tan homogénea es la distribución de los individuos en cada una de las especies que la conforman (Gurevitch *et al.* 2006) Actualmente, es importante conocer estos parámetros la toma de decisiones sobre el uso y manejo sustentable de los recursos naturales (Pozo *et al.* 2005).

Conocer la composición de especies de la muestra es útil para conocer cuáles son las identidades taxonómicas y en qué proporción se encuentran en cada uno de los parches que se van a estudiar (Gurevitch *et al.* 2006).

1.8. Lepidópteros

1.8.1. Lepidópteros como especies indicadoras del impacto y daño ambiental.

Para conocer el impacto que las distintas actividades humanas han llevado a cabo en los ecosistemas, los artrópodos de la clase Insecta se han propuesto como buenos indicadores de la salud ecosistémica (Pozo *et al.* 2005). Por lo general, estos organismos se han utilizado para conocer los efectos que tienen los fenómenos como el cambio climático global, agricultura intensiva y la fragmentación de zonas con altos niveles de biodiversidad (Foley *et al.* 2005).

En los últimos años, los artrópodos de la clase: Insecta se han propuesto como indicadores para medir los efectos que la introducción de OGM podrían estar causando en distintos ambientes. Entre los principales órdenes propuestos se encuentran los himenópteros (hormigas), los isópteros (termitas), algunos coleópteros (escarabajos) y los lepidópteros (mariposas) (Pozo *et al.* 2005; Ooistermeijer y van Swaan, 1998). Estos órdenes han sido utilizados debido a que son sencillos de monitorear y a que en la actualidad existe mucha información sobre su taxonomía. Asimismo, éstos son fáciles de comparar entre localidades y épocas del año debido a que presentan sensibilidad ante las fluctuaciones de las condiciones ambientales. Por esto todos estos grupos presentan en la naturaleza relaciones bien definidas con otros organismos, lo que conlleva a que se puedan prevenir las consecuencias de los

disturbios (Brown, 1997). En estudios previos se ha observado que la diversidad *alpha* y, en consecuencia, la diversidad *beta* y la diversidad *gamma*, disminuyen como efecto del daño causado por los humanos (Whitehouse *et al.* 2005; Sundaramurthy, 2010).

Los lepidópteros son un grupo idóneo para los bio-monitoreos. Esto se debe a que son muy sensibles a los cambios ambientales, tienen altas preferencias por las plantas en las que hospedan a sus larvas, se encuentran en diversos ecosistemas y tienen un ciclo corto de reproducción (Tyler *et al.* 1994; Ooistermeijer y van Swaay, 1998). Además, dentro del *filum* de los artrópodos, Lepidoptera es de los órdenes mejor descritos taxonómicamente, ya que es muy sensible a los cambios de hábitat y a la eutrofización de los suelos. Por todo esto algunos autores proponen que la diversidad y la abundancia de lepidópteros en una comunidad son dos parámetros fundamentales para el análisis de las consecuencias que pueden presentar plantas que expresan proteínas recombinantes y son liberadas al ambiente (Lang y Bühler, 2012).

Previamente se han llevado a cabo algunos estudios que relacionan las prácticas agrícolas con la diversidad de especies y la abundancia de lepidópteros (Stéphanie *et al.* 2007). Este protocolo de monitoreo ha sido aceptado como un método para medir el daño ambiental causado por OGM en países como Australia y Alemania (Lang, 2004).

1.8.2. Características generales.

El orden Lepidoptera se caracteriza porque los individuos presentan alas cubiertas de escamas y un aparato bucal modificado en una espirotrompa que usan para succionar néctar de las flores cuando los individuos alcanzan la edad adulta (Luis-Martínez *et al.* 2004). Este orden contiene un suborden Rhopalocera, que de manera común hace referencia a las mariposas diurnas. Éste, se divide en las superfamilias Papilionoidea y Hesperioidea. (Luis-Martínez *et al.* 2004). A su vez, la superfamilia Papilionoidea se divide en 5 familias: Papilionidae, Pieridae, Nymphalidae, Riodinidae y Lycaenidae (Luis-Martínez *et al.* 2004). Hesperioidea sólo se compone de la familia Hesperioidea y los géneros que la componen se caracterizan por ser de colores poco llamativos (café, blanco o negro) y por presentar un tórax fuerte que les permite volar a gran velocidad (Luis-Martínez *et al.* 2004).

1.8.3. Diversidad de lepidópteros en México.

Se estima que en México existen 23 750 especies de Lepidoptera, de las cuáles sólo se han descrito 14 500. Esta cifra equivale a aproximadamente 10% de la diversidad a nivel mundial (Llorente-Bousquets *et al.* 2014). Las subfamilias que tienen un mayor número de especies son Hesperidae (800 spp), Nymphalidae (440 spp) y Lycaenidae (430 spp). Las familias Pieridae y Papilionidae se encuentra en menor proporción con 90 y 56 especies respectivamente (Luis-Martínez *et al.* 2000). Además se han descrito 1209 especies de la superfamilia Rophalocera, que corresponden entre el 90 el 96% de la riqueza total de las especies de esta familia que se distribuyen en el territorio nacional.

Los estados con mayor riqueza de especies son Chiapas, Oaxaca y Veracruz (Luis-Martínez *et al.* 2000). Oaxaca es el estado que cuenta con un mayor número de especies de la subfamilia Papilionoidea (Luis-Martínez *et al.* 2004) y un mayor número de endemismos (Llorente-Bousquets *et al.* 2014). Los registros de los ejemplares que se tienen en las distintas colecciones para los ejemplares recolectados en el estado de Oaxaca, provienen principalmente de las colectas realizadas en la Sierra de Juárez y de Candelaria Loxicha-San José del Pacífico (Luis-Martínez *et al.* 2004). Hasta 2004 se reconoce la falta de esfuerzo de colecta que existe para conocer la diversidad total de especies de lepidópteros que se distribuyen en el estado de Oaxaca (Luis-Martínez *et al.* 2004) y en específico, de las especies que se distribuyen en la selva baja caducifolia.

1.8.4. Interacción entre lepidópteros y algodón.

En los ecosistemas, los lepidópteros funcionan como herbívoros, depredadores y polinizadores (Howe, 1975; Lang *et al.* 2013) dependiendo de su estadio de vida y del ecosistema en donde se localicen (Noss, 1990). Esta es la primera investigación que describe la comunidad de lepidópteros asociados al algodón silvestre, por lo que la información que es utilizada aquí como antecedente se ha obtenido en estudios sobre plantas cultivadas y generalmente fuera del centro de origen de la especie. Es importante mencionar que cuando se trata de cultivos, a los organismos que perjudican a la producción se les conoce como plaga, mientras que en los ecosistemas naturales estos mismos organismos podrían estar teniendo un papel crucial para la ecología y la evolución de distintas especies (Cerritos *et al.* 2012).

Al ser el algodón una especie de interés económico, en la literatura hay muchas especies que interactúan con la planta perjudicándole alguna parte como los frutos, las semillas o las hojas. En los

sistemas naturales a este tipo de interacciones se le conoce como herbivoría. Éstas son del tipo (+/-), y se caracterizan porque uno de los organismos que participa en la interacción se ve beneficiado, mientras que el otro se daña de manera parcial o total (Gurevitch *et al.* 2006).

En la actualidad las plagas que se tienen registradas para *G. hirsutum* pertenecen a distintos órdenes y especies. Solo en India y en China se han descrito más de 150 especies de artrópodos relacionados con las plantas de algodón (Parimi *et al.* 2010; Luo *et al.* 2014). Los principales tipos de plagas del algodón son de los órdenes Lepidoptera y Coleoptera. Los artrópodos que corresponden a estas dos clasificaciones se alimentan de los frutos y de las hojas principalmente, siendo en su mayoría frugívoros y defoliadores (Gurevitch *et al.* 2006).

La mayor parte de las plagas del orden Lepidoptera, son de la familia Noctuidae (Luo *et al.* 2014). Entre las plagas de esta familia que provienen del continente americano se encuentran *Heliothis virescens* (gusano tabacalero) y *Helicoverpa zea* (Hagenbucher *et al.* 2013). Entre las especies que provienen de Asia y Australia están *Helicoverpa armigera* y *Helicoverpa punctigera*. De la misma manera, el gusano rosa *Pectinophora gossypiella* se distribuye en todo el mundo y es la especie de plaga de algodón más problemática para las plantaciones de *G. hirsutum* (Naranjo, 2005; Hagenbucher *et al.* 2013). *Spodoptera exigua*, *Heliothis virescens*, *Crociosema plebejana* y *Alabama argillacea* son algunas otras especies de lepidópteros que se encuentran distribuidas en distinta proporción en diferentes partes del mundo (Whitehouse *et al.* 2005; Wu *et al.* 2009; Hagenbucher *et al.* 2013).

Al igual que *Alabama argillacea*, las larvas del género *Spodoptera* se alimentan del follaje de la planta (Sadras y Felton, 2010). Otra plaga que es de gran relevancia para los cultivos es *Helicoverpa armigera*. Esta última no es específica de *G. hirsutum*, ya que también se alimenta de otros cultivos como el del tomate y las leguminosas (Parimi *et al.* 2010).

Algunas otras plagas del algodón que no pertenecen al orden Lepidoptera son *Anthonomus grandis*, la más importante en México (SENASICA, 2012), los áfidos *Acyrtosiphon gossypii* y *Aphis gossypii*; las moscas *Bermisia tabaco* y *Trialeurodes abutilonea*; las arañas *Tetranychus urticae* y *Tetranychus pacificus*; los saltamontes *Bucculatrix thurberiella* y *Trichoplusia ni* (Hagenbucher *et al.* 2013).

En México, las plagas reglamentadas del algodón cultivado, que conforman el complejo bellotero, son *Heliothis virescens*, el gusano bellotero; *Heliothis zea*; y el gusano rosa, *Pectinophora gossypiella* del orden Lepidoptera; y el picudo del algodouero, *Anthonomus grandis*, del orden

Coleoptera. Este último es nativo de México y puede llegar a dañar hasta el 100% de un cultivo (SENASICA, 2012). Todas estas plagas se alimentan de la fibra y de las semillas que se encuentran dentro de los frutos. Debido a que las especies antes mencionadas son las principales para erradicar por el gobierno, desde el 2007 se ha implementado una campaña para controlarlas en todos los estados del norte donde se encuentran los principales cultivos de *G. hirsutum* con interés comercial. Por el momento el gusano rosa se encuentra erradicado tanto en México como en los Estados Unidos y se intenta que los agricultores lleven un control muy estricto para no generar mayores pérdidas económicas. *Helicoverpa zea* es otra de las plagas que actualmente dañan a una gran cantidad de cultivos en la región de la Comarca Lagunera y en el estado de Chihuahua (Aguilar-Menedel *et al.* 2007).

En este trabajo se toman en cuenta los parámetros de diversidad alpha (riqueza y abundancia), diversidad (índice de Shannon y equidad de especies); la diversidad beta (Índice de Jaccard) y la composición de especies para compararlos con o sin proteínas recombinantes que se expresan en una metapoblación de *G. hirsutum*. Estos parámetros otorgan información ecológica que en una primera instancia ayudan a determinar qué organismos se encuentran en el área y su proporción, lo cual permite generar una línea base para su conservación.

Otros tipos de aproximaciones al mismo tema, son los estudios evolutivos que no llevaremos a cabo en este trabajo, como la genética de poblaciones, de coevolución y de genética de comunidades que podrían ser implementadas en etapas subsecuentes. En este sentido, coevolución se define como el cambio evolutivo que en un carácter de los individuos de una población afecta al cambio evolutivo de un carácter en los individuos de una segunda población (Ehrlich y Raven, 1964; Janzen, 1980); y la genética de comunidades estudia cómo es que un gen establecido en una población, influye en la respuesta de los caracteres de las poblaciones que establecen interacciones con los organismos de la primera población.

II. JUSTIFICACIÓN

El algodón, *G. hirsutum*, es una de las especies que se ha modificado genéticamente y actualmente es uno de los cultivos biotecnológicos más utilizados del mundo (James, 2012). En 1996 el algodón GM se comenzó a sembrar en México (SENASICA, 2012). Desde entonces se han dado 17 eventos de liberación (CERA, 2012).

Los genes que codifican para las proteínas recombinantes que provienen de distintas cepas de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), se insertan en el genoma de distintas plantas con interés comercial para el control de plagas (Höfte y Whiteley, 1989). Algunos estudios reportan que estas proteínas sólo actúan en los organismos para los cuáles han sido seleccionadas, sin embargo, análisis previos han detectado que estas proteínas también pueden afectar a otros organismos los cuáles son difíciles de detectar si no se conoce el entorno donde se va a liberar el cultivo transgénico (Dively *et al.* 2004; Sundaramurthy, 2010; Schuppener *et al.* 2012). Ante esta problemática, diversos organismos tanto nacionales como internacionales han hecho énfasis en que es importante implementar diversas técnicas de monitoreo del daño ambiental causado por OGM en el ambiente (Bartz *et al.* 2009), las cuales aún no se encuentran definidas.

México es el centro de origen y diversidad genética de la especie de planta de *G. hirsutum* (Brubaker y Wendel, 1994). Utilizando las proteínas recombinantes como marcadores moleculares, en 2011 se encontró que las plantas silvestres de *G. hirsutum* tienen flujo génico con sus parientes cultivados (Wegier *et al.* 2011).

Dado que los lepidópteros son buenos indicadores de cambios en el ambiente (Noss, 1990) y a que en México aún no existen métodos específicos para el monitoreo del daño de OGM en el ambiente, este estudio pretende proponer y llevar a cabo una metodología para la medición de daño causada por los éstos (LBOGM, 2005). Esto se pretende llevar a cabo a través del estudio de los parámetros de la comunidad de lepidópteros circundante una metapoblación de *G. hirsutum* donde las plantas de una subpoblación expresan proteínas recombinantes Cry.

Cabe mencionar, que este es el primer estudio donde se realiza un análisis de riesgo para determinar los efectos de las proteínas recombinantes, posterior al flujo génico entre plantas cultivadas y silvestres, por lo cual se obtendrá información importante para la toma de decisiones orientadas a la conservación de las comunidades bióticas.

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivos

3.1.1. Objetivo general.

Generar una metodología que ayude a determinar si existe daño causado por las proteínas Cry expresado en las plantas silvestres de *G. hirsutum* de la metapoblación Pacífico Sur, sobre en la comunidad de lepidópteros.

3.1.2. Objetivos particulares.

- Detectar la presencia de proteínas recombinantes en la metapoblación Pacífico Sur de *G. hirsutum*.
- Generar información de línea base para determinar las especies que se encuentran circundantes a las plantas silvestres de *G. hirsutum* en su centro de origen.
- Comparar la diversidad alpha (riqueza, abundancia índice de Shannon y equidad); diversidad beta (índice de Jaccard) de las comunidades de lepidópteros circundantes a las plantas de *G. hirsutum* con y sin proteínas recombinantes.
- Analizar si los parámetros de diversidad alpha, la diversidad beta y composición de especies de lepidópteros en cada una de las localidades, son distintos entre tratamientos de plantas de *G. hirsutum* con y sin Cry.
- Examinar si los parámetros de diversidad alpha, la diversidad beta y composición de especies de lepidópteros muestran variación entre épocas del año (lluvias y secas).
- Realizar el análisis de riesgo para analizar si existe daño ambiental sobre la comunidad de lepidópteros circundantes a las plantas de *G. hirsutum* de la metapoblación Pacífico Sur y; en caso de existir daño, determinar cuál es el grado de este.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Detección de proteínas recombinantes y elección del área de estudio

Con base en los resultados obtenidos por Wegier y colaboradores en 2011, se eligió la metapoblación de Pacífico Sur para realizar el análisis comparativo de especies de lepidópteros. A continuación se menciona la metodología que se siguió para la elección de las áreas de estudio.

En julio de 2012 se realizó un muestreo a la metapoblación Pacífico Sur para detectar la presencia de proteínas recombinantes. En esta salida se colectaron hojas de todas las localidades donde se encontraron plantas silvestres de *G. hirsutum*. Después de la salida, se realizaron ensayos ELISA *direct antibody sampling* (DAS) para la detección de proteínas recombinantes (Cry1Ab/Ac, Cry2A, Cry1F y CP4-ESPS) de todo el material colectado.

Las localidades que fueron seleccionadas para realizar este estudio fue una donde se encontró que casi todas las plantas de *G. hirsutum* expresan proteínas recombinantes (localidad A²); y otra donde esta prueba fue negativa para todas las plantas estudiadas (localidad B³). De esta manera los criterios para seleccionar las localidades en donde se llevó a cabo este trabajo fueron la historia evolutiva que presentan en común las plantas de *G. hirsutum* de la región (Wegier *et al.* 2011), el número de plantas de *G. hirsutum* que presentó cada una de las localidades, procurando que éste fuera similar; y la presencia/ausencia de proteínas recombinantes (Cry1Ab/Ac y Cry2A).

Cabe mencionar que los ensayos ELISA que se llevaron a cabo fueron de la marca AGDIA y que se llevaron a cabo entre la segunda y tercera semana de julio de 2012. En estos análisis se detectó la presencia de proteínas recombinantes en algunas otras plantas de la región. Sin embargo, la densidad de individuos de las localidades no fueron lo suficientemente amplias como para realizar un estudio comparativo entre la “localidad A” con presencia de proteínas recombinantes y la “localidad B” con ausencia de las mismas. Ambas se encuentran en el estado de Oaxaca.

^{2,3}Se describen en la siguiente página.

En este trabajo se realizaron cuatro colectas durante el año, dos en época de secas y dos en época de lluvias. Cada muestreo consistió de dos días en cada una de las localidades estudiadas. Las fechas de las salidas fueron en julio y octubre del 2012; y febrero y mayo del 2013.

4.2. Sitio de estudio

La “localidad A” se ubica en el municipio de Asunción Ixtaltepec, a 210 m s.n.m. y cuenta con 697 habitantes. Sus coordenadas son $16^{\circ} 42' 46.0'' N$, $94^{\circ} 59' 43.0'' W$ (Fig. 4.1). En esta localidad se registraron las plantas con presencia de transgenes. La mayoría de las plantas de esta localidad se encuentra en una parcela de uso común. No se sabe cómo es que las plantas llegaron a establecerse en este lugar y desde el 2005 se ha detectado la presencia de proteínas recombinantes en la zona (Wegier *et al.* 2011).

La “localidad B”, que no presenta proteínas recombinantes, está situada en el municipio de San Pedro Huamelula en el Estado de Oaxaca. Sus coordenadas son $15^{\circ} 54' 42.9984'' N$, $95^{\circ} 52' 25.0'' W$ (Fig. 4.1). Ésta se encuentra a 40 m s.n.m. y tiene una población de 321 habitantes. Para cada salida, el número de plantas de algodón varió de manera considerable, por lo cual el proyecto de demografía que se encuentra en preparación por parte del Laboratorio de Biotecnología Forestal del INIFAP, viene a formar una parte importante del proyecto de daño. En esta localidad no se encontró presencia de proteínas recombinantes.



Figura 4.1. Localidades de estudio. En rojo se representa la “localidad A” y en amarillo la “localidad B”. En naranja se representa la distribución potencial de la metapoblación Pacífico Sur de *G. hirsutum*.

La vegetación característica de la zona es selva baja caducifolia, en el estado de Oaxaca. Esto quiere decir que la zona presenta una temporada de secas (noviembre-mayo) y una temporada de lluvias (junio-octubre) bien definidas. El tipo de clima predominante, según la clasificación de Koppen es *Aw*, que se refiere al clima cálido con lluvias en verano. El tipo de vegetación que predomina en la zona son especies arborescentes que pierden sus hojas durante la época de secas. La temperatura media anual registrada en la literatura va de los 20° C a los 29° C. La precipitación media anual varía entre 300 y 1800 mm. El tipo de suelo predominante es arenoso y en algunos casos arcilloso (Rzedowski, 2006).

Cabe mencionar que debido a que presentan suelos poco aptos para la agricultura, este tipo de bosques han sido menos explotados que los bosques tropicales perennifolios. Algunos de los problemas que presenta la zona en cuanto a la conservación de la vegetación son la introducción del ganado, la sobrepoblación, los incendios, el saqueo de especies y la tala selectiva (Rzedowski, 2006).

Algunas de las especies características de este tipo de vegetación en las zonas aledañas al Istmo de Tehuantepec son especies del género *Bursera* (*B. aff. schlechtendalii*, *B. morelensis*, *B. excelsa*, *B. heteresthes*), *Lysiloma divaricata*, *Ceiba parvifolia*, *Amphipterygium adstringens*, *Plumeria rubra*, *Cercidium praecox* y diversas cactáceas columnares (Rzedowski, 2006).

4.3. Sistema de estudio

En la actualidad existen muchos estudios de ecología, evolución y diversidad asociada a las plantas de *G. hirsutum* (Butler *et al.* 2001; Naranjo *et al.* 2005; Parimi *et al.* 2010; Purcel *et al.* 2010; Fernandes *et al.* 2012; Luo *et al.* 2014). Sin embargo, este tipo de estudios han estado enfocados a la variedad cultivada (Wegier, 2013). Las plantas silvestres de *G. hirsutum* tienen su origen en México (Brubaker y Wendel, 1994) y por lo general, de manera silvestre se encuentran distribuidas en sitios perturbados de los asentamientos antropogénicos o naturales.

En cuanto a su distribución se puede decir que éstas plantas siguen una dinámica

metapoblacional (Wegier *et al.* 2011). Cabe mencionar que las metapoblaciones se caracterizan porque de manera generacional, tienen una dinámica de colonización y extinción a partir de la migración en parches de una misma área geográfica (Hanski, 1994). A partir de la definición de metapoblación, el término “metacomunidad” se refiere al conjunto de poblaciones que interactúan y están interconectados por la dispersión (Gurevich *et al.* 2006).

El sistema de estudio de este trabajo se basa en las relaciones filogenéticas entre las plantas de una misma especie que se han determinado en trabajo previos (Fryxel, 1992; Brubaker y Wendel, 1994; Wegier *et al.* 2011). Si se considera que este modelo se realiza bajo la distribución de las metapoblaciones de algodón, y que los lepidópteros se comportan bajo una dinámica metapoblacional (Hanski, 1994), se puede decir que éste es un sistema de estudio de metacomunidades (Hanski, 1994; Wegier *et al.* 2011). Para responder a los objetivos planteados con anterioridad, en este estudio se trabajará a nivel de comunidad en donde se analizan cómo cambian las propiedades emergentes ante la introducción de una proteína recombinante en el ecosistema.

4.4. Método

4.4.1. Establecimiento de parcelas.

Se establecieron tres parcelas en cada una de las localidades. Cada una de las parcelas tuvo un tamaño aproximado de 20 m de radio. Dos parcelas presentaron plantas de *G. hirsutum* y una fungió como parcela control (Fig. 4.2).

De esta manera se presentan dos tipos de tratamientos para comparar las localidades: con plantas de algodón y sin plantas de algodón (control). Los controles se establecieron para poder determinar si las plantas de algodón influyen de alguna manera sobre diversidad de mariposas que se colectaron. Asimismo, este tratamiento es importante para identificar si existen otros factores en la localidad que determinan la distribución de las mariposas.

Para que los datos a analizar fueran totalmente independientes entre sí, se procuró que la parcela control estuviera a por lo menos 300 metros de distancia de las parcelas con presencia de plantas de algodón. Cabe mencionar que a medida de lo posible se intentó que las 6 parcelas utilizadas contaran con una vegetación similar entre ellas y que el número de plantas de *G. hirsutum* fuera similar (Cuadro

4.1).

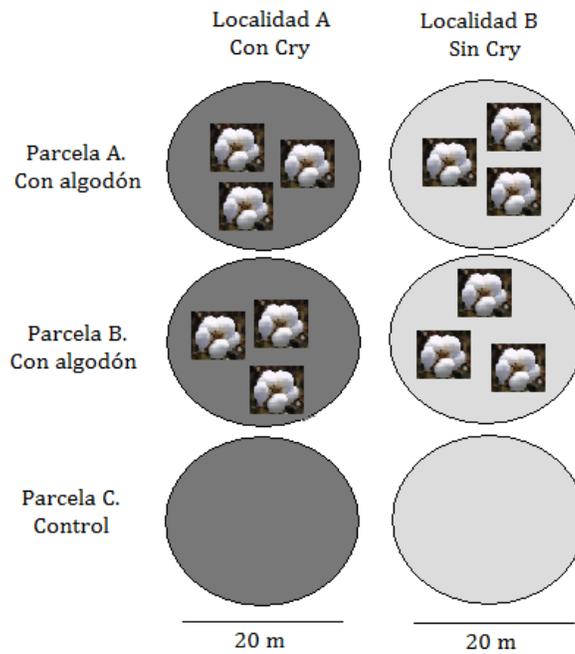


Figura 4.2. Diseño experimental. En cada una de las localidades hay tres parcelas, dos tienen plantas de algodón y una funge como control.

Cuadro 4.1. Número de plantas que se encontraron en las parcelas con *G. hirsutum* en cada una de las localidades por época del año.

Tratamientos con <i>G. hirsutum</i>	No. de plantas. Localidad A (Con Cry)	No. de plantas. Localidad B (Sin Cry)
Julio. T.A	7	6
Julio. T.B	1	5
Octubre. T.A	5	6
Octubre. T.B	1	5
Febrero. T.A	0	6
Febrero. T.B	1	5
Mayo. T. A	4	8
Mayo. T.B	1	5

En cada parcela se puso una trampa *Van Someren-Rydon*, además de que se colectaron ejemplares con ayuda de redes entomológicas. Estos dos métodos fueron seleccionados debido a que en estudios previos se ha visto que cuando éstos se utilizan en conjunto, es posible capturar hasta 80% de

la diversidad de organismos del orden Lepidoptera que se encuentran en un área determinada (Pozo *et al.* 2005). Aunque previamente se ha registrado que la identidad de especies recolectadas es mayor en horas hombre (con ayuda de redes entomológicas) que en horas trampa (Van Someren-Rydon), se ha registrado que el número de individuos es mayor con las trampas que con la colecta con red entomológica. La red es importante para capturar la diversidad del área de muestreo (Pozo *et al.* 2005).

Es importante mencionar que la composición de la comunidad de lepidópteros podría fluctuar mucho entre un sistema natural y otro (Ríos-Casanova *et al.* 2010). De esta manera, al hacer un estudio de correlación entre las plantas y los lepidópteros de un ecosistema, se deben tomar en cuenta distintos factores que podrían estar alterando nuestros resultados y, por lo tanto, nuestra hipótesis. Entre los elementos que se consideraron se encuentran la composición de los estratos de vegetación circundantes (muchas/pocas plantas herbáceas alrededor) y si los sitios de muestreo se encuentran predominantemente bajo el sol o en la sombra (Ríos-Casanova *et al.* 2010).

Debido a la distribución limitada de plantas de *G. hirsutum* en el área (Cuadro 4.1), las parcelas utilizadas para realizar los muestreos fueron las mismas durante las distintas épocas del año.

4.4.2. Colecta de ejemplares.

4.4.2.1 Búsqueda dirigida con Van Someren-Rydon (Rydon, 1964).

Las trampas Van Someren-Rydon (Fig. 4.3) se colocaron de manera aleatoria en cada una de las parcelas a estudiar (Fig. 4.4). En cada uno de los muestreos las trampas se colocaron por un periodo de 48 horas consecutivas. El cebo se conformó de fermento de piña y plátano macho, con cerveza (Pozo *et al.* 2005). Los ejemplares fueron recolectados por las mañanas y por las tardes, con el objetivo de diferenciar el periodo del día donde fueron capturados. Los ejemplares colectados fueron sacrificados en una cámara letal con acetato de etilo, y posteriormente se guardaron en sobres de papel *glassine* (Domínguez, 2009). Con este método se pretendió cubrir un total de 576 horas de muestreo por cada una de las áreas de estudio. Con este método en total se obtuvieron 1,152 horas de colecta.

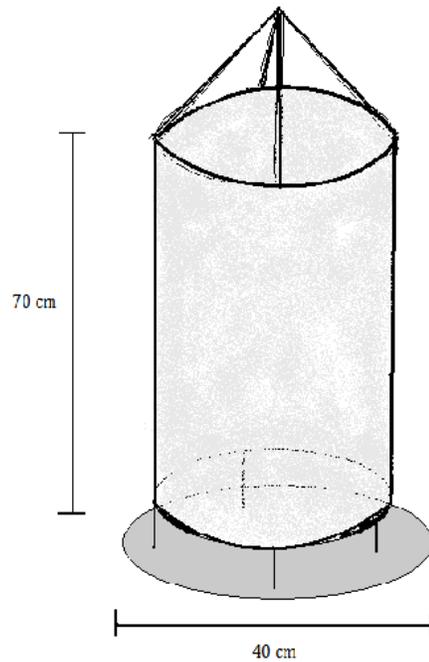


Figura 4.3. Trampa Van Someren-Rydon (Rydon, 1964).



Figura 4.4. Trampa Van Someren-Rydon en el campo.

4.4.2.2. Búsqueda dirigida con red entomológica estándar (Howe, 1975).

La red entomológica estándar (Howe, 1975) se utilizó durante un total de tres horas por día en cada una de las parcelas a muestrear. Cada uno de los muestreos fue realizado por tres personas, por media hora en cada una de las parcelas; las colectas fueron realizadas durante la mañana (entre las nueve de la mañana y el medio día) y por la tarde (entre cuatro y seis), procurando evitar las horas de mayor insolación (de mediodía a tres de la tarde). El total de tiempo muestreado por día fue de nueve horas,

tres por cada una de las personas que ayudaron con la colecta. Debido a la distancia entre las parcelas, no fue posible realizar la colecta de manera simultánea; sin embargo, se procuró que las diferencias en tiempo entre el muestreo de una parcela y otra no fueran significativas. Cabe mencionar que el tiempo neto de muestreo con red fue proporcional a los resultados que se obtuvieron (Domínguez, 2009). Con estos datos este estudio se cubrió un total de 144 horas de muestreo con este método, 72 horas por localidad (Fig. 4.5). Al igual que con las trampas Van Someren- Rydon, los ejemplares capturados fueron sacrificados con acetato de etilo y guardados en una bolsa de papel *glassine* (Domínguez, 2009).



Figura 4.5. Colecta de ejemplares con red entomológica estándar.

4.5. Identificación de ejemplares

La identificación de los ejemplares de la familia Rhopalocera fue llevada a cabo por el señor Adolfo Ibarra Vázquez, encargado de la colección Nacional de Insectos del Instituto de Biología, UNAM (Fig. 4.6).

La corroboración de las familias y subfamilias de los ejemplares, se realizó con la base de datos en Internet <http://www.butterfliesandmoths.org/>. La identificación de los ejemplares de la familia Noctuidae se está llevando a cabo por métodos moleculares. A la fecha solo se tiene registro de una especie de la familia Erebeidae. En el presente trabajo, todos los análisis se realizaron a nivel de morfoespecies.



Figura 4.6. Ejemplares identificados a morfoespecie y especie en bolsas de papel *glassine*.

4.6. Análisis estadísticos

En este estudio, la riqueza y la abundancia de especies fueron estimadas como el total de morfoespecies y como el número de individuos de cada taxón respectivamente, por cada subpoblación y por época del año (Ríos-Casanova *et al.* 2010).

Para conocer la riqueza de morfoespecies colectadas en total, se realizó una curva de rarefacción. Esta curva se realiza dividiendo el total de morfoespecies entre el número de colectas, para comparar la riqueza obtenida con la riqueza esperada (Colwell *et al.* 2004). Ésta se realizó con el paquete *vegan* (<http://vegan.r-forge.r-project.org/>) del programa *R* (R Core Team, 2012).

Para conocer la diversidad de las morfoespecies para cada una de las localidades, se realizó una gráfica donde se muestra una curva de rarefacción de especies de Coleman para la “localidad A”, con proteínas Cry, y otra para la “localidad B”. Se eligió este método de rarefacción debido a que el número de especies es muy dispar entre colectas. Esta curva se calcula distribuyendo todas las morfoespecies de manera aleatoria entre cada uno de los muestreos manteniendo los tamaños originales (Colwell y Coddington, 1994). Esto se realizó con el programa *EstimateS 9.0.1*.

Para conocer si la diferencia en los datos de riqueza y abundancia (diversidad alfa) entre las dos localidades (localidades A y B) y entre tratamientos (con plantas de *G. hirsutum* y control) fue significativa entre sí, se utilizó la versión 21 del programa SPSS. El análisis estadístico utilizado para

los análisis de la riqueza y abundancia entre tratamientos, fue ANOVA de medidas repetidas. Esta prueba fue seleccionada debido a que para todos los muestreos se utilizaron las mismas parcelas, de manera que los datos obtenidos no fueron independientes entre sí. Para corroborar si los datos de esta colecta son robustos, se realizó la prueba de esfericidad de Mauchly para cada uno de los casos estudiados (Zar, 2010).

Posteriormente se calculó el índice de Shannon Wiener (Shannon, 1948). Esto se realizó para cada una de las parcelas estudiadas; en presencia y ausencia de algodón por localidad; y para comparar las épocas del año de manera general y por localidad. Este índice fue utilizado debido cuenta con una prueba estadística que es muy útil para comparar la diversidad de dos lugares diferentes (Zar, 2010). Esta última es una prueba de *t* que se realizó para corroborar si existen diferencias significativas entre: parcelas de algodón con y sin presencia de Cry; “Localidad A” y “Localidad B”; épocas del año; y para lluvias/secas de cada uno de los casos antes mencionados (Hutcheson, 1970; Zar, 2010).

La fórmula utilizada para calcular el índice de Shannon fue la siguiente:

$$H' = -\sum_{i=1}^k pi \log pi$$

Donde,

i corresponde al número de especies,

k al número de categorías

y *pi* al número de observaciones encontradas en la especie *i*.

A partir del índice de Shannon calculado para cada uno de los casos mencionados con anterioridad, se calculó la equidad utilizando la fórmula presentada a continuación (Gurevitch *et al.* 2006):

$$J' = \frac{H'}{H'_{\max}}$$

Donde,

$$H'_{\max} = \log k$$

Donde,

k = número de casos.

Con el paquete *vegan* (<http://vegan.r-forge.r-project.org/>) del programa *R* (R Core Team, 2012), se utilizó la gráfica de Renyi para comparar la diversidad alfa (α) entre sitios con algodón, las parcelas control y entre épocas del año (Thótmérés, 1995).

Para la composición de especies se midió la diversidad beta (β) entre localidades, entre parcelas y entre épocas del año utilizando el índice de Jaccard (I_j) (Whittaker, 1972):

$$I_j = \frac{c}{a+b+c}$$

Donde,

a = Número de especies que contiene la “Localidad 1”.

b =Número de especies que contiene la “Localidad 2”.

c = Especies compartidas en ambos sitios.

Para analizar si las diferencia en la composición de especies está relacionada con la presencia de proteínas Cry, se realizó una χ^2 para comparar la composición de especies entre parcelas con *G. hirsutum* (con y sin proteínas Cry) y entre parcelas control (localidades A y B).

4.7. Ruta al daño

Ante esta problemática, en el 2011, ante el Instituto Nacional de Investigación Forestal Agrícola y Pecuaria (INIFAP-CENID-COMEF), se propuso una metodología para medir la adversidad y la significancia del daño causado por los OGM en distintos cultivos con el objetivo de proponer estrategias que ayudaran a determinar si hay daño causado por los OGM en el ambiente. En caso de existir el daño, se pretende analizar el nivel ecológico que se está afectando (individuo, población, comunidad, ecosistema) y el tiempo en el que este daño podría ser revertido (Wegier y Alavez, 2012).

Con esta metodología, el propósito es caracterizar la magnitud, la espacialidad, la temporalidad y la reversibilidad de cada uno de los casos que se considere que pudieran estar en riesgo para cada una de las liberaciones de proteínas recombinantes.

En la ruta al daño realizada para este trabajo se formuló una hipótesis, ésta se puso a prueba en campo y con los datos obtenidos se realizaron modelos con el índice de diversidad de Shannon para evaluar cuál es el nivel de significancia del daño asociado para este caso en relación a presencia de proteínas recombinantes Cry en la metapoblación Pacífico Sur de *G. hirsutum*, sobre la comunidad de lepidópteros. Para efectos de este trabajo la ruta al daño completa no se encuentra anexa; sin embargo, sí se presentan los elementos principales para poder llegar a una conclusión sobre si esta metodología es útil para evaluar en campo los efectos adversos ocasionados por OGM y para la caracterización del daño.

V. RESULTADOS

5.1. Riqueza

En este estudio se encontraron 122 morfoespecies. Las curvas de acumulación de especies muestran la tasa a la que nuevos individuos son incorporados a la muestra. En la *Fig. 5.1* se observa que la riqueza total esperada tuvo un comportamiento similar a la observada. La forma de la curva indica que el aumento en el número de especies por cada una de las colectas fue constante.

La curva no llega a la asíntota, lo cual muestra que el total de especies en el área no fue colectado en este trabajo (Gurevitch *et al.* 2006). Sin embargo, hay que tomar en cuenta que la curva de rarefacción es un método de estandarización que se enfoca en estimar la cantidad de especies raras que pudieran no ser muestreadas durante las colectas (Gurevitch *et al.* 2006).

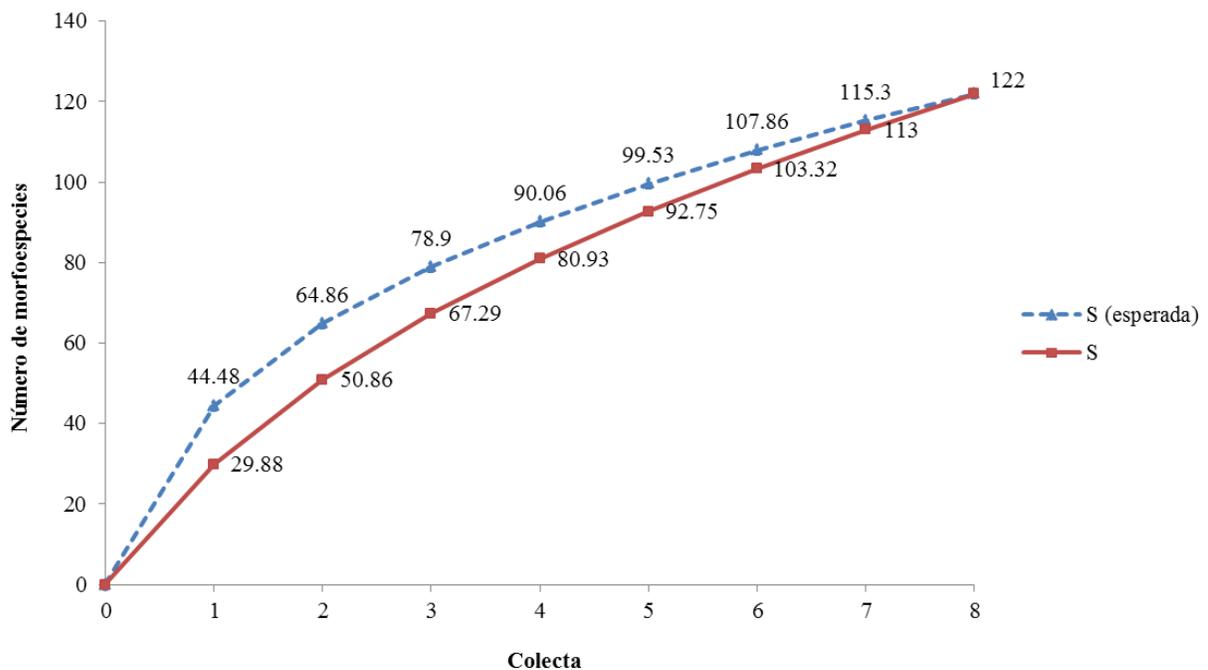


Figura 5.1. Curva de rarefacción de morfoespecies de lepidópteros en general. En el eje de la variable independiente se muestra cada una de las colectas, mientras que en el eje de la variable dependiente corresponde a la riqueza de especies.

La riqueza para cada una de las localidades fue de 72 y 95 especies, en las localidades A y B, con y sin presencia de proteínas recombinantes respectivamente. De éstas, 45 especies fueron compartidas. La Fig. 5.2 muestra que la “localidad A” con proteínas recombinantes, presentó un menor número de morfoespecies en comparación con la “localidad B”. Ninguna de las curvas alcanzó la asíntota, lo cual podría indicar que hacen falta más colectas para alcanzar a representar en la muestra el número total de especies en el área.

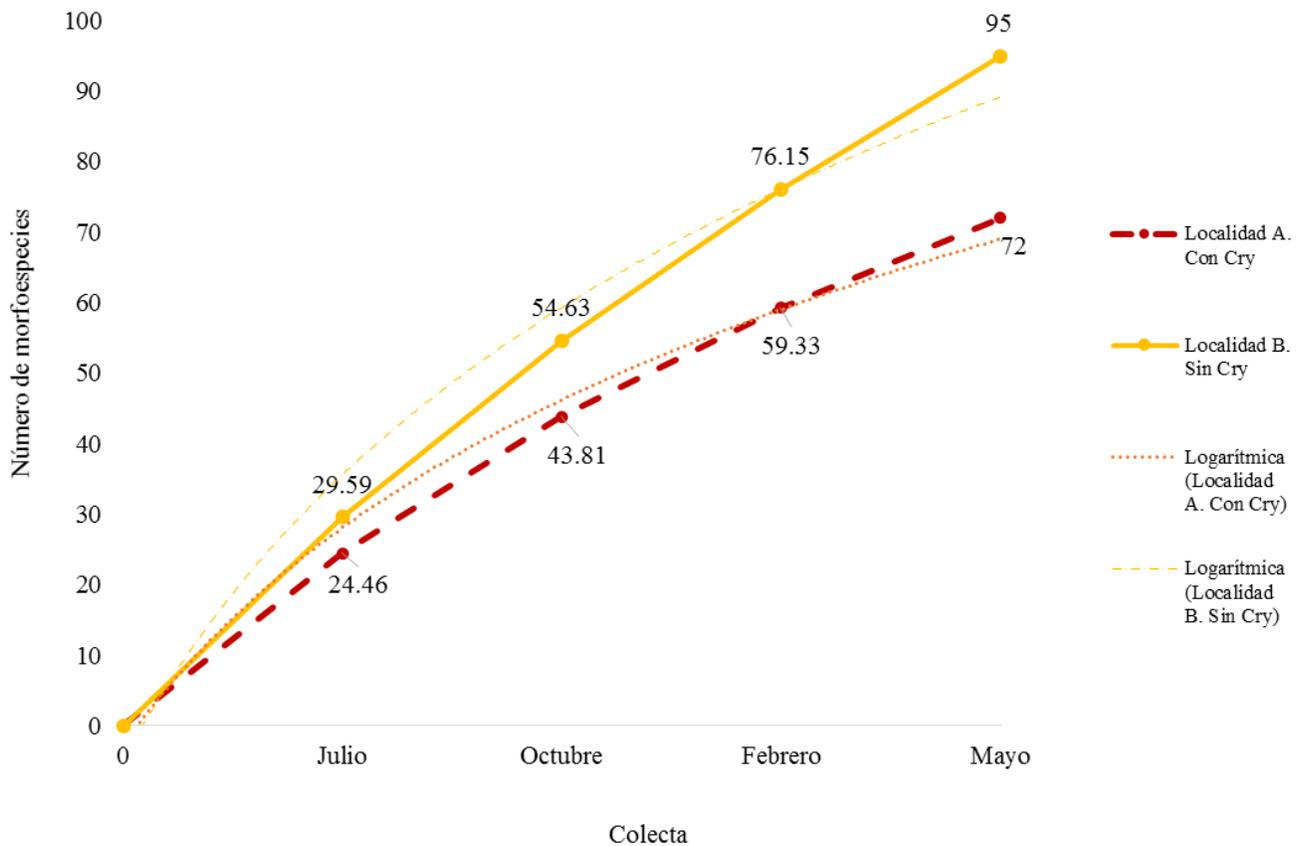


Figura 5.2. Curva de acumulación de morfoespecies de Coleman en las localidades A y B. Se señala la tasa a la riqueza de especies aumentó con cada una de las colectas.

Al comparar entre las localidades las parcelas que presentan plantas de algodón (*G. hirsutum*) (Fig. 5.3), se aprecia que aunque la media de especies es similar para las dos localidades, las parcelas de la localidad B, sin proteínas Cry, tienen un mayor número de especies que las parcelas de la Localidad A, con Cry. No obstante este resultado es distinto para las parcelas control, donde la media

fue menor en la Localidad B, y donde no se muestran diferencias apreciables entre localidades para el número de especies y el cúmulo de las mismas.

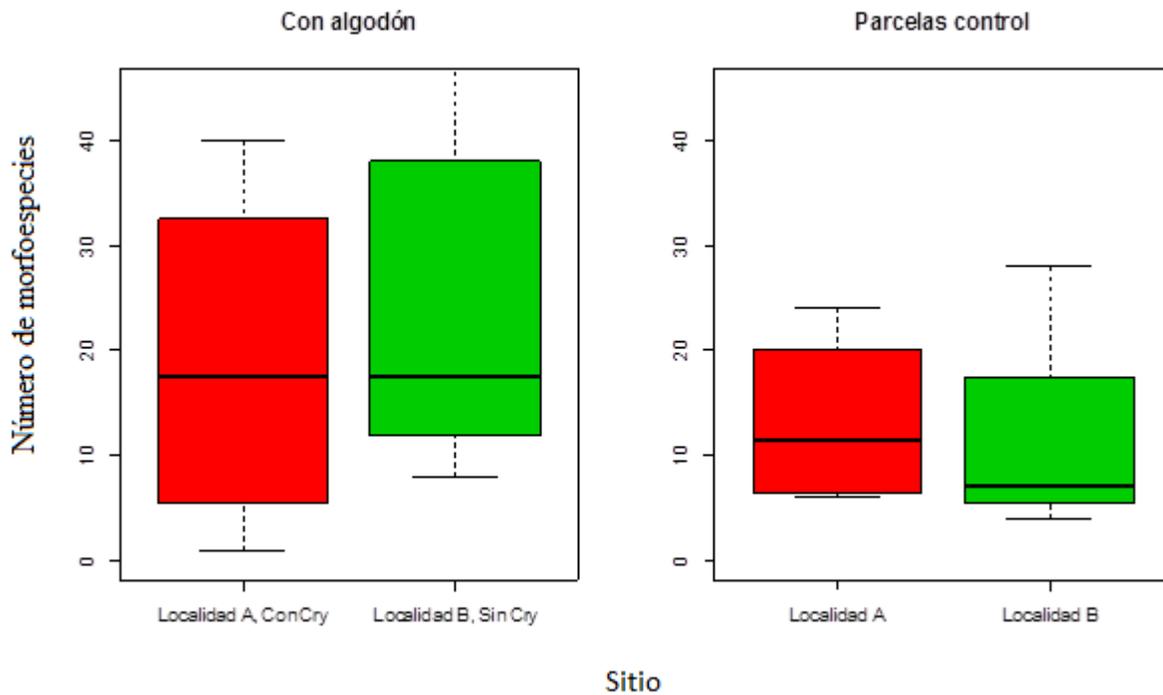


Figura 5.3. Riqueza de especies total (S) por localidad y por parcela. Las líneas horizontales representan la mediana de los datos, la caja donde se acumula el 50% de los valores obtenidos y los corchetes los valores máximos y mínimos para cada caso.

Al realizar la prueba de ANOVA de medidas repetidas, se aprecia que no hay diferencias significativas ni entre las parcelas con *G. hirsutum*, ni entre las parcelas control ($P \geq 0.05$). Para todos los casos en la prueba de Esfericidad Mauchly se obtuvo un valor de 1 una ($P \geq 0.05$), lo cual nos indica que esta prueba es robusta para todos los casos analizados.

Cuadro 5.1. ANOVA de medidas repetidas para riqueza de especies por presencia/ausencia de proteínas recombinantes y por estacionalidad.

Parcelas con <i>G. hirsutum</i>					
Factor	g.l.	F	P	Esfericidad de Mauchly	P (Esfericidad)

(Niveles)					<i>de Mauchly</i>
Tipo de algodón (Con y sin Cry)	1	0.90	0.41	1	0.00
Estacionalidad (Lluvias y secas)	1	5.81	0.09	1	0.00
Tipo de algodón ^ Estacionalidad	1	0.96	0.39	1	0.00

Parcelas control					
Factor (Niveles)	g.l.	<i>F</i>	<i>P</i>	Esfericidad de Mauchly	<i>P (Esfericidad de Mauchly)</i>
Localidad (A y B)	1	0.07	0.84	1	0.00
Estacionalidad (Lluvias y secas)	1	9	0.20	1	0.00
Localidad^ Estacionalidad	1	0.01	0.94	1	0.00

Que las parcelas control no sean significativamente diferentes, nos dice que las localidades A y B sí son comparables entre sí, mientras que el hecho de que las parcelas con y sin proteínas Cry no sean distintas entre sí nos dice que no hay un efecto de las proteínas sobre la comunidad de lepidópteros. De la misma manera, la estación (lluvias y secas), no tuvo efecto sobre la riqueza de lepidópteros.

Sin embargo, dado que la riqueza fue mayor en la localidad que no presenta proteínas Cry, sí podría existir una tendencia de disminución de la riqueza de especies asociada a la presencia de proteínas Cry en el área.

5.2. Abundancia

En este estudio fueron colectados 720 ejemplares del orden: Lepidoptera. De éstos, 330 son provenientes de la “localidad A” con transgenes, y 390 corresponden a la “localidad B”, sin proteínas recombinantes. La abundancia de individuos fue apreciablemente mayor durante la época de lluvias (meses de julio y octubre en la Fig.5.4). La “localidad B” presentó una abundancia mayor que la “localidad A” en casi todas las épocas del año.

Las líneas de la Fig. 5.4 muestran un comportamiento logarítmico, donde tanto para la “localidad A” como para la “localidad B”, éstas parecen tener una tendencia a la asíntota, sin embargo, como la pendiente es positiva a lo largo de la curva de acumulación, se puede decir que con este muestreo no se llegó a capturar el número de individuos adecuado para tener una muestra representativa de la abundancia de lepidópteros para cada localidad.

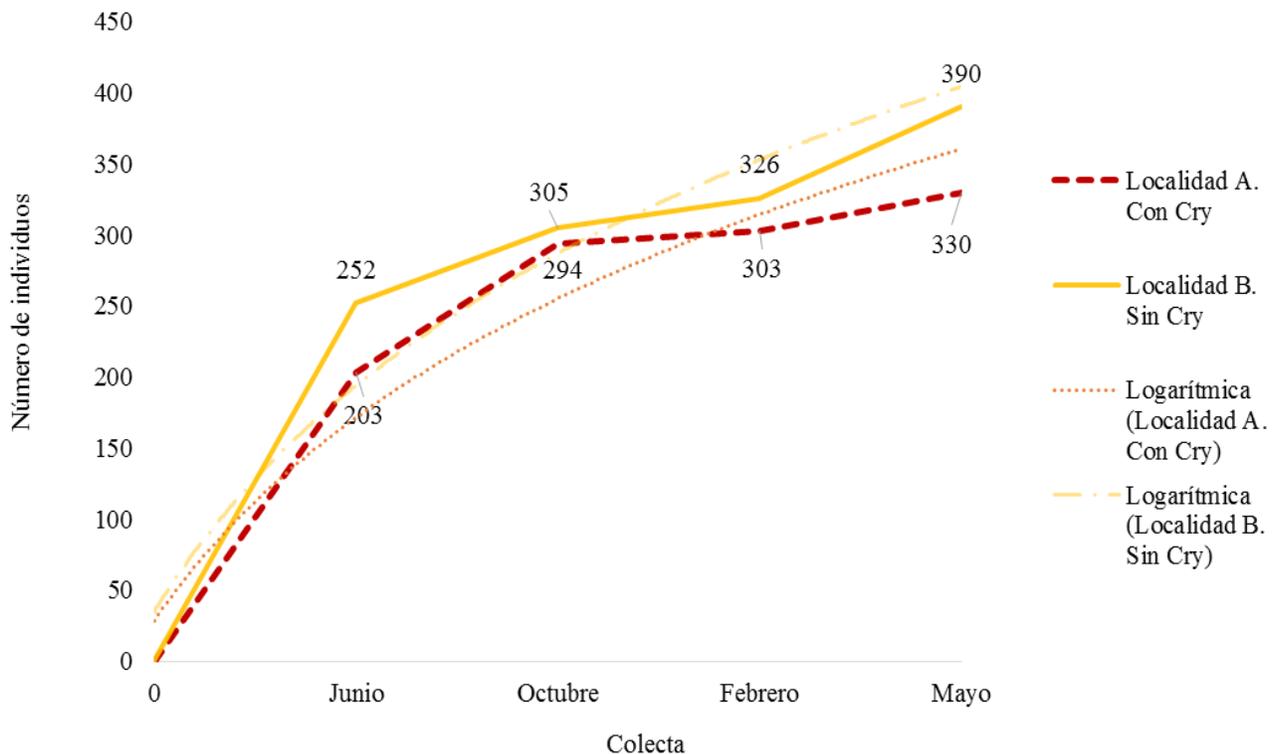


Figura 5.4. Abundancia de individuos por localidades. Las columnas de rayas rojas presentan el número de individuos colectados en la “localidad A”, mientras que la línea de puntos amarillos muestra los de la “localidad B”.

Por otro lado, en las parcelas con *G. hirsutum* la abundancia de lepidópteros fue mayor en la localidad con proteínas recombinantes que en la localidad sin proteínas Cry, mientras que en las parcelas control la abundancia de individuos colectados fue mayor en la localidad B. La media tanto para las parcelas con *G. hirsutum* como para las parcelas control, fue mayor en la localidad con presencia de proteínas Cry que en la localidad sin proteínas Cry (Cuadro 5.5).

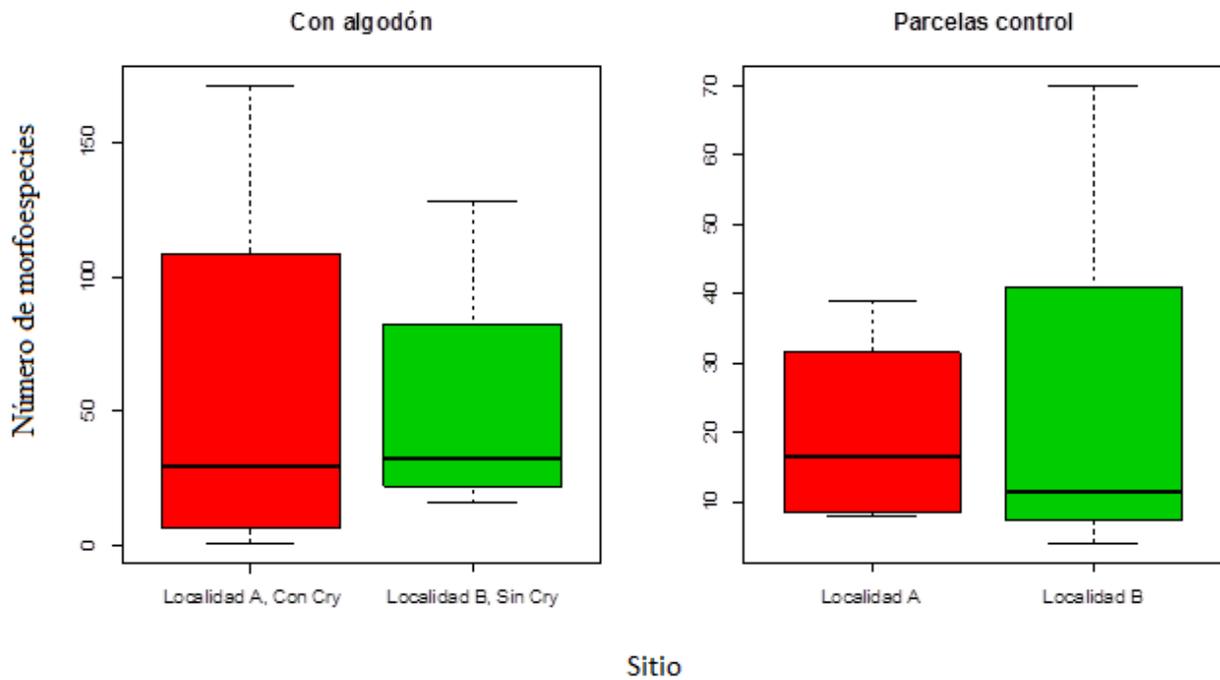


Figura 5.5. Abundancia de individuos por localidad y por presencia ausencia de *G. hirsutum*. La línea horizontal representa la media, la caja los valores entre los que se encuentra 50% de los datos y los corchetes los valores máximos y mínimos para cada caso.

Al realizar la prueba ANOVA de medidas repetidas para la abundancia se observa que todas las pruebas realizadas fueron no significativas para una $\alpha=0.05$ ($P \geq 0.05$) (Cuadro 5.2). En este mismo cuadro se aprecia que en todos los casos, la esfericidad es igual a uno ($P \leq 0.05$), lo cual indica que la prueba es robusta.

Cuadro 5.2. ANOVA de medidas repetidas para la abundancia de especies por presencia/ausencia de proteínas recombinantes y por estacionalidad.

Tratamientos con <i>G. hirsutum</i>					
Factor (Niveles)	g.l.	<i>F</i>	<i>P</i>	Esfericidad de Mauchly	<i>P</i> (Esfericidad de Mauchly)
Tipo de algodón (Con y sin Cry)	3	0.30	0.62	1	0.00
Estacionalidad (Lluvias y secas)	3	4.99	0.11	1	0.00
Tipo de algodón^ Estacionalidad	3	10.12	0.05	1	0.00
Tratamientos Control					
Factor (Niveles)	g.l.	<i>F</i>	<i>P</i>	Esfericidad de Mauchly	<i>P</i> (Esfericidad de Mauchly)
Localidad (A y B)	1	0.06	0.84	1	0.00**
Estacionalidad (Lluvias y secas)	1	9	0.20	1	0.00**
Localidad^ Estacionalidad	1	0.01	0.94	1	0.00**

Para el caso de la ANOVA de medidas repetidas para parcelas con *G. hirsutum*, donde la comparación fue realizada considerando la suma de los factores de estacionalidad y tipos de algodón, donde $P=0.05$, la literatura muestra que este resultado podría estar asociado a otro factor que no se está considerando en el estudio (Zar, 2010).

5.3. Diversidad de Shannon-Wiener y equidad

El índice de diversidad de Shannon-Wiener mostrado a continuación fue calculado para cada uno de los casos a presentar, a partir del método y las fórmulas presentadas (Gurevitch *et al.* 2006). Asimismo, se presenta el resultado de la prueba de *t* para analizar si existen diferencias significativas en cada uno de

los casos subsecuentes. La prueba de t , como ya se mencionó de manera previa, es realizada de acuerdo al método de Hutcheson en 1970 (Zar, 2010).

La prueba de t realizada para ver si existen diferencias significativas entre los índices de Shannon para cada uno de los tratamientos estudiados; entre parcelas con algodón en las localidades con y sin proteínas recombinantes, entre parcelas control y entre lluvias/secas. La prueba fue significativa para los casos de las parcelas con *G. hirsutum* y para la estacionalidad; mientras que para las parcelas control no se mostraron diferencias (Cuadro 5.3). Esto se puede apreciar a partir del valor crítico de tablas, que marca el valor absoluto sobre el cual se puede rechazar la hipótesis nula y la prueba de t resulta significativa ($|t| \geq t_{\alpha(2),v}$), cuando $(t_{\alpha(2),v})$ se refiere a la probabilidad de la prueba de dos colas de t . (Zar, 2010).

Cuadro 5.3. Índice de Shannon-Wiener y prueba de t .

Factor	Nivel	H'	t	g.l.	P
Parcelas con <i>G. hirsutum</i>					
Localidad A	Con Cry	1.34	4.37	369.87	< 0.001**
Localidad B	Sin Cry	1.59			
Parcelas control					
Localidad A		1.44	1.28	176.57	≥ 0.001
Localidad B		1.37			
Estacionalidad					
	Lluvias	2.67	34.74	135.21	< 0.001**
	Secas	1.47			

Nota al pie: En el cuadro anterior H' = Índice de diversidad de Shannon-Wiener (Zar, 2010), y g.l.= Grados de libertad. Los valores de P que muestran un valor significativo se indican con dos asteriscos (**).

Debido a que las diferencias fueron significativas entre lluvias y secas se hizo un segundo análisis y una segunda prueba de t para evaluar si la estacionalidad influía en nuestros resultados. En este análisis se pudo corroborar que la diferencia entre los tratamientos es significativa en ausencia/presencia de proteínas Cry, tanto en época de lluvias como de secas; mientras que los tratamientos control no mostraron diferencias significativas entre ellos (Cuadro 5.4).

Cuadro 5.4. Índice de Shannon-Wiener y prueba de t entre estacionalidades.

Factor	H'	t	g.l	P
Nivel				
Lluvias tratamientos con <i>G. hirsutum</i>				
Localidad A Con Cry	1.29	6.9	349.97	$< 0.001^{**}$
Localidad B Sin Cry	1.66			
Lluvias tratamientos control				
Localidad A	1.42	1.91	144.94	≥ 0.001
Localidad B	1.31			
Secas tratamientos con <i>G. hirsutum</i>				
Localidad A Con Cry	0.93	5.07	43.89	$< 0.001^{**}$
Localidad B Sin Cry	1.26			
Secas tratamientos control				
Localidad A	1.00	0.68	31.04	≥ 0.001
Localidad B	0.96			

Nota al pie: En el cuadro anterior H' = Índice de diversidad de Shannon-Wiener (Zar, 2010), y g.l. = Grados de libertad. Los valores de P que muestran un valor significativo se indican con dos asteriscos (**).

5.4. Equidad

En el *Cuadro 5.5* se presentan los resultados del índice de equidad de Shannon de homogeneidad o relatividad (J') y el índice de equidad de Shannon de heterogeneidad o dominancia ($1/J'$) (Zar, 2010). Se observa que tanto J' como $1/J'$ son similares para los análisis que están relacionados con la presencia /ausencia de proteínas recombinantes, mientras que para la estacionalidad son relativamente diferentes.

Se aprecia que los valores de J' y $1/J'$ de los tratamientos control son más cercanos a uno que los de *G. hirsutum* para todos los casos.

Cuadro 5.5. Índice de Equidad de Shannon.

Con <i>G. hirsutum</i>	H'	k	H'_{\max}	J'
Localidad A con Cry	1.34	59	1.77	0.76
Localidad B sin Cry	1.59	81	1.91	0.83
Tratamientos control	H'	k	H'_{\max}	J'
Localidad A con Cry	1.44	35	1.54	0.93
Localidad B sin Cry	1.37	36	1.55	0.88
Estacionalidad	H'	k	H'_{\max}	J'
Lluvias	2.67	108	2.03	1.31
Secas	1.47	42	1.62	0.90

Notaal pie. En este cuadro H' = Índice de diversidad de Shannon-Wiener (Zar, 2010), J' = Índice de equidad de Shannon de homogeneidad (Zar, 2010), $1/J'$ = Índice de equidad de Shannon de heterogeneidad (Zar, 2010) y k = número de casos.

5.5. Composición de especies

En este estudio se obtuvieron 122 morfoespecies de lepidópteros de las cuales sólo 54 pudieron ser identificados en este estudio. Esto se debe a que no existen suficientes especialistas en el país que se dediquen a la identificación de organismos de la superfamilia Noctuideae. De esta clasificación sólo se pudo identificar una especie. Hoy en día el resto de los ejemplares están siendo identificados por técnicas de Biología Molecular (PCR de CO₁).

El *Apéndice 10.1* muestra una lista con los resultados obtenidos con las especies identificadas en total. De las 54 especies identificadas 27 son compartidas, 39 fueron registradas exclusivamente en la “localidad A” y 43 en la “localidad B”.

En la Fig. 5.6 se muestran las especies más abundantes colectadas entre las dos localidades (A y B). Se muestra que una especie (*S. blomfieldia datis*) fue dominante sobre las demás y que en la “localidad B”, la composición es más homogénea que en la “localidad A”.

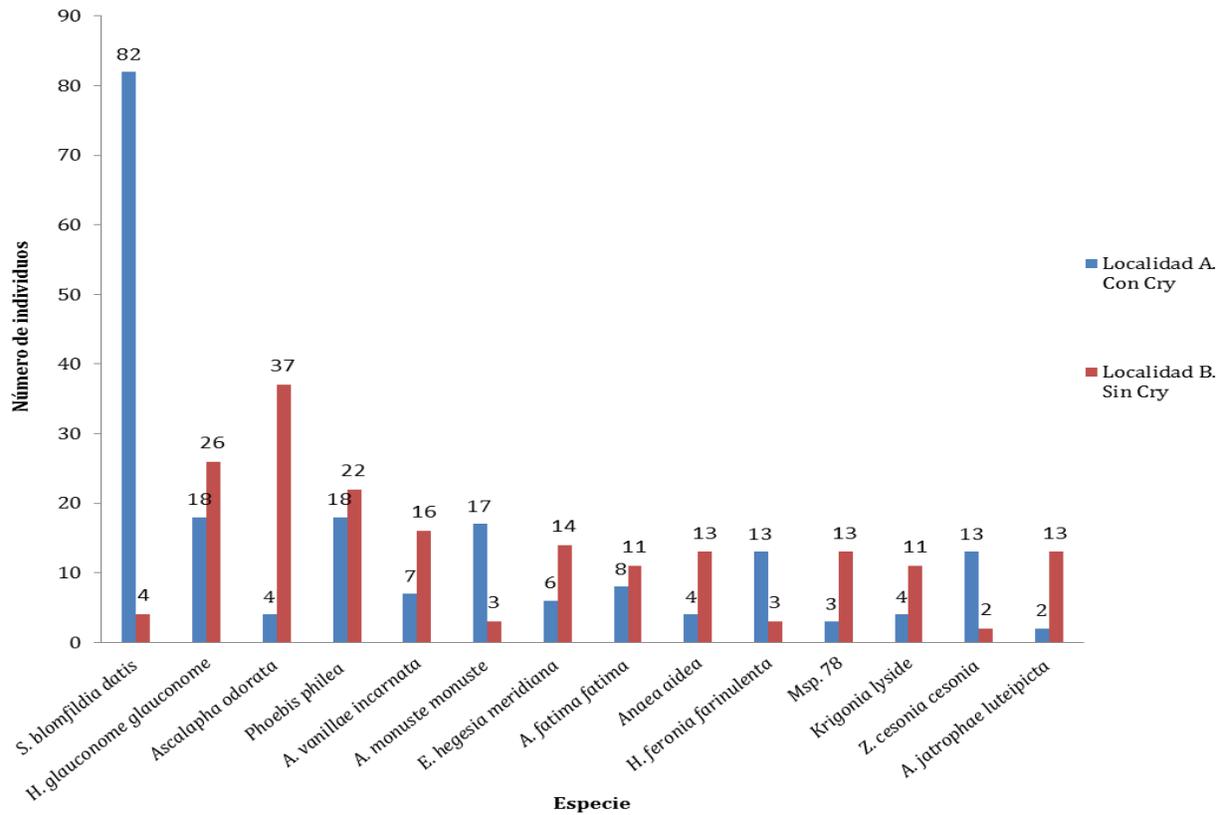


Figura 5.6. Especies más abundantes de las localidades A y B. Se muestran especies con una abundancia relativa mayor a 2% con respecto al total de especies colectadas entre las dos localidades.

En la Fig. 5.7 se muestran las especies más abundantes en los tratamientos con *G. hirsutum*. La especie (*S. blomfieldia datis*) fue dominante sobre las demás en la “localidad A”; y que la “localidad B” presenta mayor homogeneidad entre sus especies. La segunda, tercera y cuarta especies más abundantes presentaron mayor frecuencia en la “localidad B” que en la “A”.

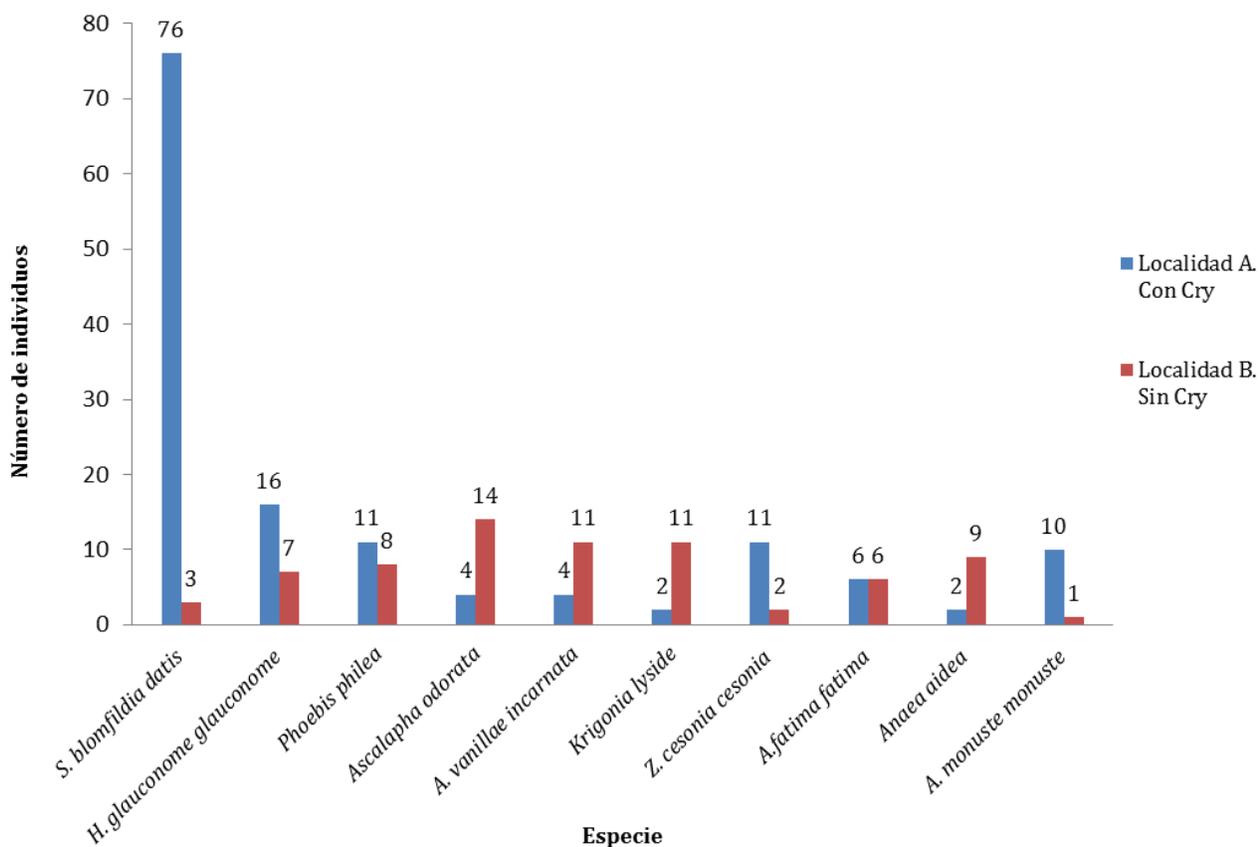


Figura 5.7. Especies comunes con *G. hirsutum*. Se muestran las especies con una abundancia relativa mayor a 2%, con respecto al total de especies colectadas de los tratamientos con algodón, tanto de la localidad A como de la B.

Para el caso los controles (Fig. 5.8), no se muestra dominancia de ninguna especie sobre las demás. Asimismo, se aprecia que las especies principales *Phoebis philea*, *E. hegesia meridiana* y *Microtia elva*; fueron relativamente más abundantes en la “localidad B” que en la “localidad A”.

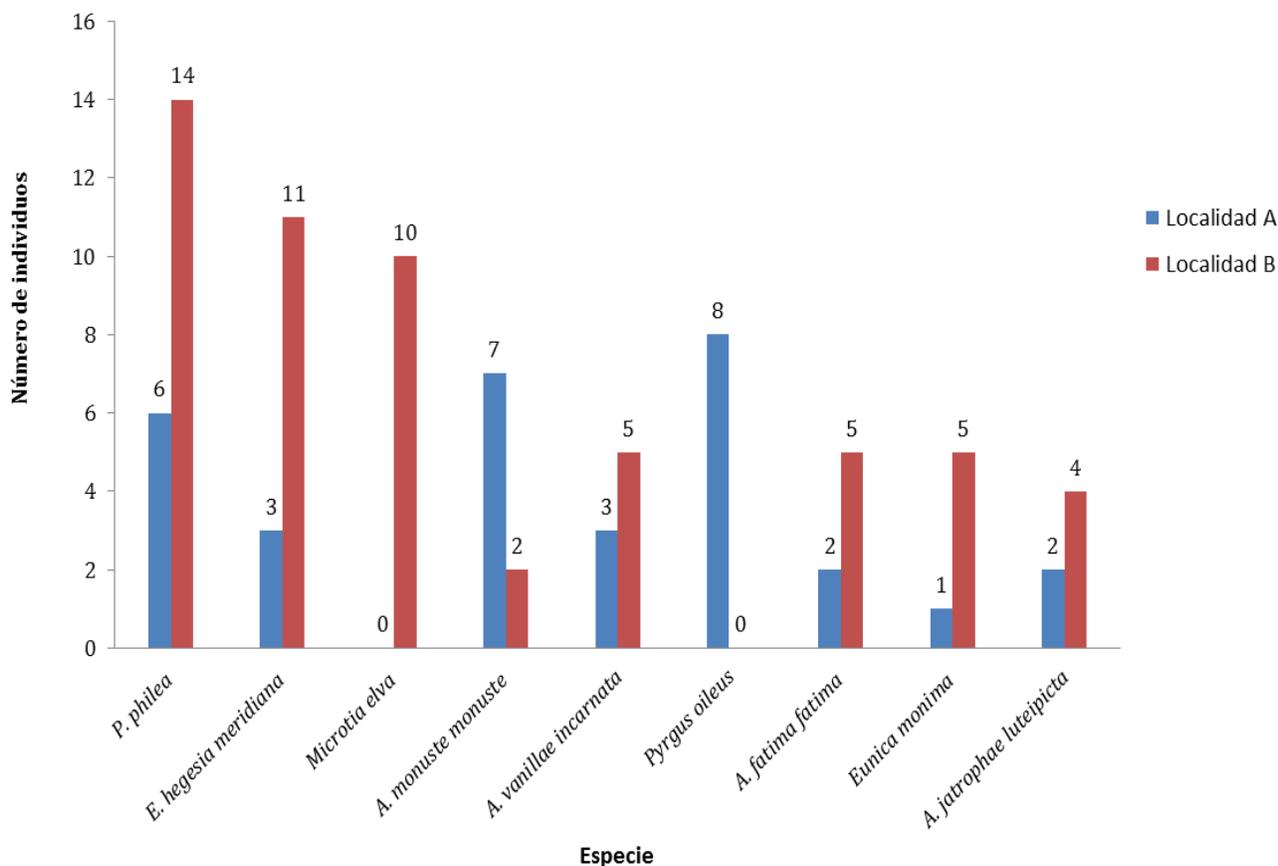


Figura 5.8. Especies más abundantes en los tratamientos control. Se muestran todas las especies que tienen una abundancia mayor al 2% con respecto al total de especies colectadas en las localidades “A” y “B”.

En el *Cuadro 5.6* se muestra que el valor obtenido por la χ^2 , realizado para las 4 familias más abundantes; Nymphalidae, Pieridae, Hesperidae y Erebididae, entre tratamientos con plantas de *G. hirsutum* y tratamientos control. En ambos casos el valor obtenido por la prueba fue mayor que el valor obtenido por las tablas de χ^2 para 3 grados de libertad (11.34); por lo cual se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alternativa. Esto quiere decir que sí existe una diferencia significativa entre los tratamientos con plantas de algodón (presencia y ausencia de proteínas recombinantes). Las diferencias significativas entre los controles, podrían indicar que las localidades son distintas debido a factores que no se están tomando en cuenta en este trabajo, como lo son el clima, el cambio de uso de suelo y la humedad (Noss, 1990).

Cuadro 5.6. Resultados de la prueba de χ^2 entre tratamientos (con y sin *G. hirsutum*). La prueba analiza qué tan distinta es la composición de especies entre localidades (A y B).

	χ^2	<i>g.l.</i>	Valor crítico de tablas	Residuos estandarizados
Parcelas con <i>G. hirsutum</i>	19.19	3	11.34	0
Parcelas control	35.19	3	11.34	0

Nota al pie: La prueba se realizó a nivel de familia y sólo se utilizaron las familias Nymphalidae, Pieridae, Hesperidae y Erebidae.

En los *Apéndices 10.2, 10.3 y 10.4*, se muestran los resultados de las especies con un individuo de abundancia en total, para los tratamientos con *G. hirsutum* y los tratamientos control, respectivamente. Para todos los casos el número de especies fue mayor en la “localidad B” que en la “localidad A”.

En los tratamientos con *G. hirsutum* se obtuvieron 26 Msp. con un individuo para la “localidad A” y 39 Msp. para la “localidad B”, de las cuales sólo se compartieron 6; *Adelpha basiloides*, la Msp. 65, Msp. 70, Msp. 82 y Msp. 116. Con respecto a las parcelas control, en la “localidad A” se colectaron 14 Msp. y en la “localidad B”, 32. En ambas localidades se encontraron 4 Msp. similares: *Prestonia clarki*, *Hamadryas atlantis atlantis*, Msp. 68 y Msp. 90.

El número de especies poco abundantes es muy elevado tanto en los tratamientos con plantas de *G. hirsutum* (con y sin proteínas Cry), como en los control (*Apéndices 10.5 y 10.6*).

5.6. Índice de Jaccard

El índice de Jaccard es una medida de diversidad beta que nos permite analizar qué tan distintos son dos sitios entre sí (Koleff *et al.* 2003; Gurevitch, 2006). Hay que recordar que este índice se mide en una escala de 0 a 1 en donde 0 representa un índice bajo en similitud y donde 1 representa un índice alto. Los índices calculados en este trabajo fueron muy bajos (menores de 30%). Esto muestra que la

composición de especies es distinta entre los tratamientos con *G. hirsutum*, entre tratamientos control y entre estacionalidades (Cuadro 5.10); lo que a su vez quiere decir que la tasa de recambio de especies es muy alta entre un sitio y otro.

Cuadro 5.10. Índice de Jaccard de diversidad beta. Se muestran los valores para las comparaciones entre tratamientos con *G. hirsutum* (con y sin Cry) y entre controles. También se presenta el índice para la estacionalidad (lluvias y secas).

	<i>G. hirsutum</i> con Cry	<i>G. hirsutum</i> sin Cry	Control con Cry	Control sin Cry
<i>G. hirsutum</i> con Cry	1	0.2118	0.1351	
<i>G. hirsutum</i> sin Cry		1		0.1971
Control con Cry			1	0.1744
Control sin Cry				1

Lluvias y Secas	0.1302
-----------------	--------

5.7. Diversidad de Renyi

El análisis de diversidad de Renyi es un método para relacionar de manera gráfica el índice de diversidad de Shannon, la riqueza y el índice de Simpson. Cabe mencionar que este último es un índice de diversidad beta que sirve para comparar qué tan semejante es la composición de especies entre dos o más localidades (Thótmérés, 1995).

Al comparar los tratamientos con *G. hirsutum* (con y sin Cry) (Fig. 5.9), éstos muestran una diferencia marcada entre las curvas para todos los indicadores de diversidad ($\alpha=1$ Shannon y $\alpha=2$ exp (InvSimp)). De la misma manera se observa que en la “localidad B”, sin proteínas recombinantes, todos los indicadores son mayores que los de la “localidad A”. Asimismo, la equidad, que se puede apreciar con la inclinación de las curvas, es mayor en ausencia de proteínas recombinantes (Thótmérés, 1995). Estos resultados difieren de lo que se observa al comparar los

tratamientos control, donde las curvas tienen un comportamiento similar y los valores de diversidad, riqueza y abundancia de especies son mayores en la localidad “A” que en la “B”.

De esta manera, si los resultados entre los controles son similares y si la diversidad en los tratamientos con *G. hirsutum* es mayor en la “localidad B” que en la “A”, sí se pudiera decir que la presencia de proteínas recombinantes pudieran estar teniendo un efecto sobre la comunidad de lepidópteros.

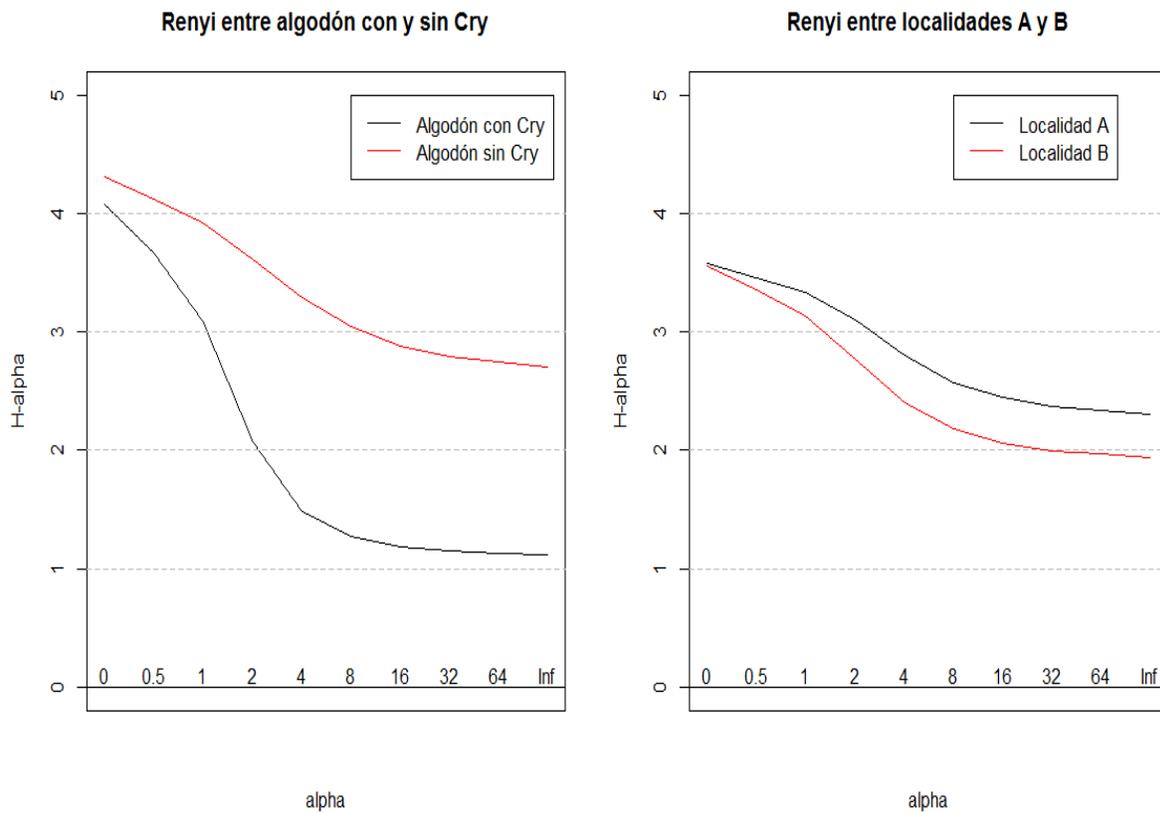


Figura 5.9. Diversidad de Renyi entre tratamientos con *G. hirsutum* y controles. El eje de la variable independiente corresponde a los valores de los distintos índices de diversidad (α), mientras que el eje de la variable dependiente muestra el valor del índice correspondiente⁴. A la izquierda se muestra el gráfico de los tratamientos con plantas de algodón (con y sin Cry) y a la derecha el de los control. $\alpha=1$ representa el índice de Shannon; $\alpha=2$ el exponente del inverso del índice de Simpson

⁴ La ecuación que relaciona el valor de α con el de H_α en la gráfica es $H_\alpha = 1/(1-\alpha) \log \sum (p^a)$. Para mayor detalle se puede consultar el artículo de Thótmérész (1995).

(InvSimp); y $\alpha = 0$, el inverso de la riqueza. La inclinación de la curva representa a una medida de equidad (Thótmérés, 1995).

En lluvias los estimadores de diversidad fueron mayores que en la época de secas (Fig. 5.7). Sin embargo, como las líneas se cruzan entre ellas, las estacionalidades no pueden ser comparadas entre sí, lo que indica que la diversidad de especies es muy distinta entre una época y otra (Thótmérés, 1995).

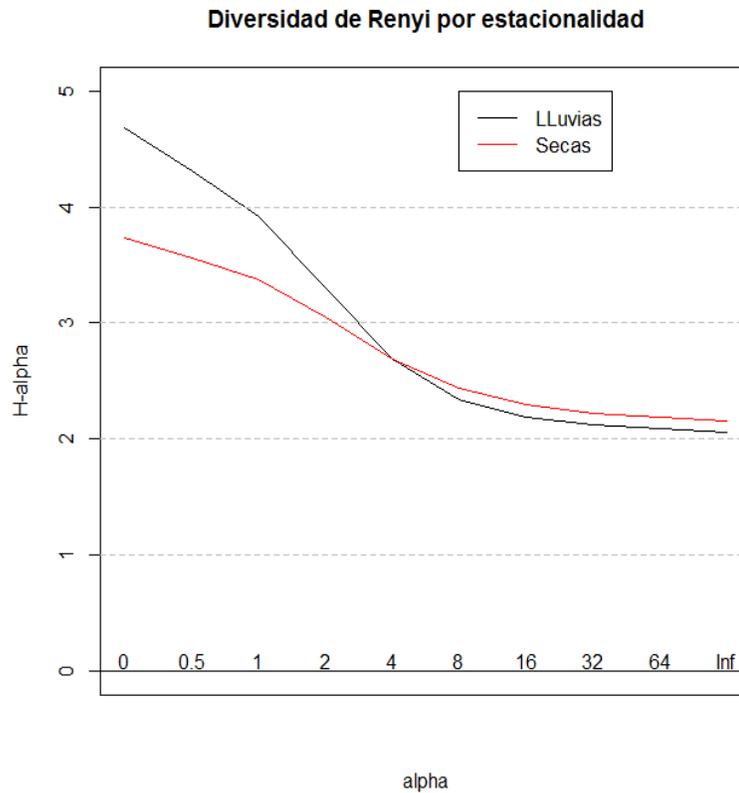


Figura 5.10. Diversidad de Renyi entre estacionalidades. Muestra la comparación de la diversidad entre las muestras colectadas en la época de lluvias y la época de secas. La variable independiente corresponde a cada uno de los indicadores, mientras que *H-alpha* se refiere al valor obtenido en cada uno de los casos. $\alpha=1$ índice de Shannon; $\alpha=2$ (InvSimp); y $\alpha = 0$ corresponde al inverso de la riqueza. La equidad se encuentra representada por la inclinación de la curva (Thótmérés, 1995).

VI. DISCUSIÓN

En este trabajo se generó e implementó una metodología para el análisis de los efectos indirectos sobre la comunidad de lepidópteros, que se encuentran en el área circundante a dos subpoblaciones de plantas silvestres de *G. hirsutum*, a partir de la introducción por flujo génico de proteínas Cry (Wegier, 2013). Cabe mencionar que esta necesidad surgió a partir de la revisión bibliográfica, donde se encontró que las proteínas Cry tienen efectos diversos sobre distintos organismos no blanco; o dicho de otra manera tienen baja especificidad. Las proteínas Cry han estado presentes como insecticidas desde mediados de siglo XX, sin embargo que se inserte y exprese esta proteína de manera continua podría conllevar a consecuencias no planeadas que podrían poner en riesgo a distintas especies, así como la salud humana y ecosistémica. En este sentido el principio precautorio del protocolo de Cartagena exige que si no se conocen las consecuencias de la introducción de una nueva tecnología, ésta no debería de implementarse. Sin embargo, a 18 años de la introducción de algodón GM en nuestro país (SAGARPA, 2012), aún no se cuenta con los mecanismos estandarizados para que las empresas puedan realizar los análisis de riesgo que indiquen las consecuencias reales de la introducción de estas tecnologías en el ambiente. Pero ¿qué sucede cuando esta proteína se encuentra dentro del acervo genético de una especie? ¿Cuáles son las consecuencias y las medidas de mitigación de los efectos adversos que pudieran tener la expresión de estas proteínas a corto, mediano y largo plazo? ¿Quiénes son los responsables del daño ocasionado?

México fue el primer país en el que se liberó una especie GM en su centro de origen, y el primero donde se detectó flujo génico de una especie GM con sus parientes silvestres (Wegier, 2013). De esta manera, este estudio tiene especial importancia para los análisis de riesgo y la formulación de políticas y métodos de protección de las especies nativas y la diversidad que se encuentra asociada a los cultivos.

Como la introducción de OGM al ambiente ha sido muy reciente, aún se están generando las líneas metodológicas sobre las cuáles se deben evaluar las implicaciones en las poblaciones silvestres (Breckling *et al.* 2011; Sanvido *et al.* 2011). Hoy en día existen dos aproximaciones que han permitido detectar efectos adversos de las proteínas Cry sobre los organismos no blanco; la primera se refiere a los análisis de laboratorio (Li *et al.* 2010) y la segunda al estudio de las comunidades bióticas (Pilcher *et al.* 2005; Whitehouse *et al.* 2005; Sisterson *et al.* 2007; Jensen *et al.* 2010; Fernades *et al.* 2012).

En cuanto al estudio de las comunidades bióticas, cuando en un ecosistema los parámetros de la comunidad difieren de manera significativa, podemos hablar de disturbio (Gurevitch *et al.* 2006). En este trabajo se analizó si la introducción de proteínas recombinantes Cry en el ambiente pudiera estar alterando los parámetros de la comunidad de lepidópteros de la zona del Istmo de Tehuantepec de Oaxaca, y si existe daño en las comunidades de lepidópteros en relación a la expresión de estas proteínas.

En los resultados, los parámetros que se vieron significativamente afectados debido a la presencia de estas proteínas fueron la diversidad de especies (Índice de diversidad de Shannon-Wiener), la equidad y la composición de especies (Chi^2). La abundancia y la riqueza de especies no se vieron afectadas. De manera general se puede decir que la introducción de proteínas Cry al ambiente, sí podría estar

Para el caso de la estacionalidad, en estudios anteriores se ha reportado que en ambientes como el de la selva baja caducifolia, donde a lo largo del año se presenta una temporada de lluvias y una de secas bien establecidas; la abundancia y la riqueza de artrópodos se ven modificada de manera significativa por los cambios de temperatura y humedad. Para este estudio, la estacionalidad fue significativamente diferente para el caso de la diversidad, la equidad y la composición de especies (Cuadros 5.3, 5.4, 5.5 y 5.6). Estos resultados también se obtuvieron a través de la gráfica de diversidad de Renyi (Fig. 5.9).

Los resultados en el índice de Jaccard obtenido indican que la diversidad de especies cambió por tipo de tratamiento (con y sin proteínas recombinantes), por localidad y por época del año; lo que a su vez quiere decir que la tasa de recambio en la zona es muy elevada.

6.1. Análisis de los parámetros de la comunidad.

Algunos estudios realizados con las comunidades bióticas han reportado efectos adversos de las proteínas Cry sobre las comunidades de lepidópteros, dípteros, himenópteros, e incluso coleópteros y hemípteros (Li *et al.* 2010; Sundaramurthy, 2010; Axelsson *et al.* 2011). De la misma manera hoy en día se ha reportado que las comunidades acuáticas se pueden ver afectadas debido a la presencia de proteínas Cry que se expresan en los árboles GM; donde las proteínas activadas llegan a este ambiente a través de los flujos de agua (Axelsson *et al.* 2011).

6.1.1. Diversidad Alpha. Riqueza y abundancia.

En esta investigación no se reportaron diferencias significativas a corto plazo en relación a la presencia de proteínas Cry en plantas silvestres de *G. hirsutum*, ni para la riqueza ni la abundancia de lepidópteros (Cuadros 5.1 y 5.2); así como tampoco fue significativa la diferencia entre estacionalidades. Estos resultados no son congruentes con lo encontrado en la literatura, donde se ha visto que estos dos factores influyen en los cambios en la composición de artrópodos en las comunidades de artrópodos (Figuroa-Castro *et al.* 2004; Li *et al.* 2010; Fernandes *et al.* 2012; Lang y Bühler, 2012); aunque no hay que perder de vista que en algunos estudios donde sólo se ha evaluado el efecto de las proteínas Cry sobre la riqueza y la abundancia de las comunidades de artrópodos, no se han encontrado diferencias significativas (Naranjo *et al.* 2005; Pilcher *et al.* 2005).

Este resultado obtenido podría ser explicado debido al gran número de especies de lepidópteros que se encuentran en el lugar de estudio (Martínez-Luis *et al.* 2004, Llorente-Bousquets *et al.* 2014), aunque es importante hacer énfasis en que los organismos del orden Lepidoptera presentan una dinámica metapoblacional de colonización y extinción de parches, por lo cual es difícil llegar a coleccionar el total de especies que se distribuyen en la zona (Hanski, 1994).

Aunque la prueba de Mauchly indique que el número de especies colectadas es el indicado para que la prueba de ANOVA de medidas repetidas sea robusta (Cuadros 5.1 y 5.2), es importante mencionar que ninguna de las curvas de rarefacción de especies alcanzó la asíntota (Figs. 5.1 y 5.2). Así, que las diferencias en la riqueza no sean significativas ni para la presencia/ausencia de proteínas recombinantes ni para la estacionalidad, podría estar relacionado con falta de colectas que ayuden a detallar más a profundidad cómo es la dinámica de la comunidad de lepidópteros en la zona.

6.1.2. Índice de Shannon y equidad.

El índice de Shannon es un estimador de diversidad alpha que muestra la relación entre la riqueza y la abundancia de individuos de distintas especies en una zona determinada. De esta manera, al comparar los índices de Shannon obtenidos en cada una de las localidades (A y B), mediante la prueba de *t* (Hutcheson, 1970); se obtuvo un valor significativo en tanto para las parcelas con *G. hirsutum* (con y sin proteínas Cry) (Cuadro 5.3) como para la estacionalidad (lluvias y secas) (Cuadro 5.4). En análisis previos, ya se ha visto que la estacionalidad, lluvias y secas, juega un papel crucial para la diversidad

de artrópodos en un mismo sitio (Figueroa-Castro y Cano-Santana, 2004), por lo cual, los resultados obtenidos en este estudio son congruentes con estos análisis.

En cuanto al efecto de la presencia de las proteínas Cry en el ambiente, se puede observar que el índice es significativo cuando se compararon los tratamientos con plantas de *G. hirsutum*, y no fue significativo cuando se compararon las parcelas control.

El resultado de la comparación entre los tratamientos con *G. hirsutum* podría explicarse debido a la dominancia de una especie en la “localidad A”, *Smyrna blomfieldia datis* (Figs. 5.6 y 5.7), lo que podría hacer que el índice obtenido para la localidad “A” fuera menor que el obtenido en los tratamientos con *G. hirsutum* de la “localidad B”, donde no se detectó presencia de proteínas recombinantes en las plantas silvestres de *G. hirsutum* y donde la composición de especies fue más homogénea (Figs. 5.6 y 5.7). Este resultado se sostiene cuando se analiza la composición de los tratamientos control, donde al igual que en el tratamiento de *G. hirsutum* sin proteínas Cry, ésta fue más homogénea (Fig. 5.8).

Hay que tomar en cuenta que el índice de Shannon-Wiener asume que los individuos han sido tomados de una muestra muy abundante, que todas las especies de la zona se encuentran representadas, y que éste es muy sensible al número de especies raras que se encuentran presentes en la muestra (Gurevitch *et al.* 2006). Todos estos factores hacen que la prueba de *t* para comparar dos índices de Shannon de dos sitios diferentes, también sea muy sensible a la composición de especies.

En cuanto a la equidad de especies, en algunos estudios se ha visto que cuando hay mayor equidad entre las especies que conforman a las comunidades, existe mayor estabilidad dentro de las mismas (Odum y Barret, 2005). En este caso, cuando se comparó la equidad de especies para las parcelas con presencia de *G. hirsutum*, se observó que la equidad es menor en la localidad que tiene presencia de proteínas Cry (localidad A) que en la que no presenta proteínas recombinantes (localidad B) (Cuadro 5.5). De esta manera, en la “localidad B” la proporción de especies fue más homogénea, lo que a su vez significa que un menor número de especies son predominantes en la zona (Odum y Barret, 2005).

Con los resultados significativamente diferentes en el índice de diversidad de Shannon (Cuadros 5.3 y 5.4) y con las diferencias observadas en el índice de equidad de Shannon para las parcelas con *G. hirsutum* (Cuadro 5.5), se puede sostener que e el tratamiento con presencia de proteínas recombinantes en la plantas de *G. hirsutum* sí se redujo la diversidad de lepidópteros.

6.1.3. Composición de especies.

En cuanto a la composición de especies, las más comunes y que tienen mayor abundancia, varían entre tratamientos control y con *G. hirsutum*. Los tratamientos control muestran una composición homogénea entre sí y no se aprecian diferencias entre localidades, mientras que los tratamientos con *G. hirsutum* muestran diferencias entre sí: los de la “localidad A” presentan dominancia de una especie, mientras que los de la “localidad B” muestran mayor homogeneidad (Figs. 5.6 y 5.7; Gurevitch *et al.* 2006). En los apéndices 10.5 y 10.6 se muestra que en este estudio más de la mitad de las especies capturadas son especies que tienen una abundancia baja (uno o dos individuos). Sin embargo, aunque la zona de estudio ha sido caracterizada como la mayor en número de especies endémicas en el país; a la fecha no se ha reportado que ninguna de las especies identificadas en este estudio cumpla con esta condición (Llorente-Bousquets *et al.* 1993; Luis-Martínez *et al.* 2004).

De esta manera, en este estudio se presentó un gran número de endemismos locales, los cuales se explican a partir de la gran diversidad de lepidópteros que hay en la zona, a la composición de la vegetación circundante (Randlkofer *et al.* 2010) y a la falta de muestreos (Figs. 5.1 y 5.2). Éstos últimos son importantes para que se analice más detalladamente cuál es la dinámica de la comunidad de lepidópteros en el área. También las especies que son poco comunes podrían tener un rango más limitado de distribución que las especies más abundantes.

Las especies endémicas son importantes para los estudios de conocimiento y conservación de la diversidad y podrían fungir como indicadoras de algún tipo de ecosistema específico (Noss, 1990). De la misma manera, se ha reportado que la exclusividad de las especies tiene que ver con la generalidad y la especialización de cada una de éstas; ya que mientras más específico es el organismo durante las distintas etapas de su forma de vida, menor es su rango de distribución (Gurevitch *et al.* 2006).

Para analizar si las especies dominantes y las especies raras se mantienen en la misma proporción a lo largo del espacio y tiempo, este estudio se tendría que repetir en distintos parches de colonización de *G. hirsutum* de manera sistematizada.

En la prueba de χ^2 realizada para comparar las diferencias entre la composición de especies, tanto la comparación de las parcelas control como la de los tratamientos con plantas de *G. hirsutum* fueron significativas (Cuadro 5.6). Este hecho podría indicar que sí existe una diferencia entre los tratamientos con y sin proteínas recombinantes; pero también podría indicar que entre las localidades

hay otros factores como el cambio de uso de suelo, las diferencias en el número de habitantes y la proporción de vegetación secundaria circundante; que podrían estar influyendo en los resultados obtenidos.

6.1.4. Diversidad beta.

En este trabajo el índice de Jaccard obtenido en todas las comparaciones fue muy bajo, lo cual indica una alta tasa de recambio de especies. Este hecho se explica a partir de que el número de especies poco abundantes es mayor al 50% (Apéndices 10.5 y 10.6; Llorente- Bousquets *et al.* 2014), y a que en el área existe una gran diversidad de especies de lepidópteros (Llorente- Bousquets *et al.* 1993).

De la misma manera, este índice muestra que las parcelas comparadas en los tratamientos con *G. hirsutum* fue relativamente mayor que el índice obtenido para los tratamientos control (Cuadro 5.10). Este hecho podría deberse a que tanto las condiciones microambientales como la composición de plantas que se encuentran circundantes a las plantas de *G. hirsutum*, podrían ser más similares que en otras áreas donde no hay presencia de la planta; se ha visto que la composición de especies de plantas determina las especies de artrópodos circundantes en el área (Randlkofer *et al.* 2010) y que las condiciones microclimáticas donde se distribuyen los parientes silvestres de *G. hirsutum*, son únicas de esta especie (Rudgers y Strauss, 2004; Rudgers *et al.* 2010; Wegier, 2013). No obstante, hacen falta estudios más detallados sobre el tema, para corroborar la veracidad de esta hipótesis.

De manera general, que la riqueza y la abundancia de especies no hayan mostrado diferencias significativas, y que la diversidad, la equidad y la composición de especies sí, se pudiera deber a que los índices de diversidad son más sensibles que la riqueza y la abundancia *per se* (Magurran, 2004). Asimismo, estas diferencias pudieran relacionarse a que en análisis previos, el Istmo de Tehuantepec, circundante a nuestra área de estudio, ha sido catalogado como la zona de mayor número de endemismos de Lepidoptera del país (Llorente-Bousquets *et al.* 2014). Es importante mencionar que aunque la riqueza y la abundancia no se hayan modificado de manera significativa por la presencia de OGM, estos parámetros deben de ser evaluados en conjunto con los índices de diversidad para cada uno de los casos de introducción de OGM al ambiente.

Las diferencias detectadas en esta investigación, en cuanto a la diversidad y equidad entre las comunidades de las localidades A y B se pueden apreciar también con la diversidad de Renyi, donde se

observa que en los tratamientos con *G. hirsutum*, la diversidad alpha (Shannon= 1, 2) es mayor en la “localidad B”, sin proteínas recombinantes, que en la “localidad A”. Para el caso de la parcela control, la diversidad es mayor en la “localidad A” (Fig. 5.9).

Con la diversidad de Renyi también se aprecia que la composición de especies de lepidópteros fue diferente entre las épocas de lluvias y secas (Fig. 5.10). Esto se explica debido a que en otros estudios se ha visto que la abundancia y la riqueza de lepidópteros dependen directamente de la humedad relativa en el ambiente, donde las distintas especies generan estrategias diversas de supervivencia ante la sequía como la diapausa reproductiva, la migración, cambios morfológicos (como el patrón de las alas) o la disminución de la producción de huevecillos, por unos de mayor tamaño (Jones y Rienks, 1987; Brakefield y Reitsma, 1991). Sin embargo, como las curvas de diversidad de Renyi se cruzan entre sí, las comunidades no son comparables por este método ya que deben de existir uno o varios índices de diversidad que ordenan a las comunidades de manera distinta (Thótmérés 1995).

6.2. Ruta al daño

Con el desarrollo de la biotecnología y las implicaciones sociales, económicas y culturales que conlleva, los análisis de riesgo ambiental son una herramienta necesaria para unir los intereses políticos y la investigación científica (Bartz *et al.* 2009).

La ruta al daño es un instrumento de evaluación que permite caracterizar si con las diferencias que se observan en los análisis de campo se produce un daño en el ambiente (Bartz *et al.* 2009; Sanvido *et al.* 2011; Hilbeck *et al.* 2011).

El proceso de evaluación del riesgo puede dar origen, por una parte, a la necesidad de obtener más información acerca de aspectos concretos que podrán determinarse y solicitarse durante el proceso de evaluación y, por otra parte, a que la información sobre otros aspectos pueda carecer de interés en algunos casos.

Debido a que en este trabajo se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con y sin proteínas Cry, se procedió a realizar la ruta al daño para este caso específico. Para poder discutir los resultados obtenidos, a continuación se muestran 4 tablas donde se evalúan la magnitud, la

temporalidad, la espacialidad y la reversibilidad del daño obtenido consecuencia de la introducción de proteínas Cry en la metapoblación Pacífico Sur de *G. hirsutum*:

Cabe mencionar que ésta simplemente es una propuesta para caracterizar el daño de los resultados. La ruta de evaluación del daño ambiental completa sí fue realizada pero no se presenta en este escrito por cuestiones de privacidad.

Cuadro 6.1. Magnitud. Se refiere a la severidad del daño ocasionado.

Magnitud	alpha (α)	Proporción de morfoespecies que se quitan, con respecto a 117 Msp.	Porcentaje de individuos que se agregan a una especie (Msp. 3), con respecto a 215.	Proporción de morfoespecies que se agregan, con respecto a 117 Msp.	Caracterización del trabajo realizado
1	0.01	0.077 (9/117)	0.126 (27/215)	0.077 (9/117)	
2	0.05	0.103 (12/117)	0.149 (32/215)	0.111 (13/117)	
3	0.001	0.137 (16/117)	0.191 (41/215)	0.162 (19/117)	
4	0.0001	0.179 (21/117)	0.249 (53/215)	0.222 (26/117)X	X

Cuadro 6.2. Temporalidad. Se refiere al lapso de tiempo en el cual se presentando el daño. Cuando realiza el análisis con un nivel de incertidumbre alto se deben de diseñar mecanismos para disminuirla.

Categoría	Descripción de la categoría	Caracterización del trabajo realizado
1	Solo un ciclo de vida.	X (Con gran incertidumbre)
2	El efecto se expresa en la siguiente generación (F1).	
3	El efecto se da en las siguientes 5	

	generaciones.	
4	El efecto se da en las siguientes 10 generaciones.	

Cuadro 6.3. Espacialidad. Es la extensión territorial donde se presenta el mismo daño.

Categoría	Descripción de la categoría	Caracterización del trabajo realizado
1	El efecto se encuentra en sólo una localidad.	X
2	El efecto se da en dos localidades.	
3	El efecto se da en toda la metapoblación.	
4	El efecto se da en más de una metapoblación.	

Cuadro 6.4. Reversibilidad. Hace mención al grado de intervención que se necesita por parte del ser humano para resarcir los daños ambientales.

Categoría	Descripción de la categoría	Etapas del trabajo realizado
1. Sin intervención	1) Podría aumentar la abundancia de las especies afectadas.	No se sabe con seguridad*. Se debe de realizar una revisión y un diseño experimental adecuado para remediar la falta de información.
2. Con poca intervención	1) Aumentar el número de plantas hospederas. 2) Introducir nuevos individuos de las especies afectadas para incrementar la variabilidad y el número de individuos. 3) Introducir especies para controlar de manera biológica aquellas especies que estén mostrando resistencia hacia las proteínas Cry.	Es probable que al retirar las presiones selectivas se vuelva al estado inicial, sin embargo, eso sucede cuando no se ha fijado el estado de carácter en el

<p>3. Con mucha intervención.</p>	<p>1) Realizando selección de la descendencia de las plantas de algodón que no expresan proteínas recombinantes e introducir las de nueva cuenta a la metapoblación.</p> <p>2) Realizando un mariposario en la zona, donde se puedan criar individuos adultos de las especies afectadas para luego introducir las en la zona.</p>	<p>genoma de la planta en las siguientes generaciones.</p>
<p>4. Irreversible</p>	<p>1) Cuando se da la extinción local de una especie en la zona.</p> <p>2) Cuando todas las plantas de la localidad expresan la proteína recombinante.</p> <p>3) Cuando no se le da seguimiento al daño causado en las poblaciones de lepidópteros.</p> <p>4) Cuando las especies afectadas migran a otro lugar.</p>	

* Al no tener información suficiente, el *Protocolo de Cartagena* con el principio precautorio se remite a considerar el máximo riesgo posible (UICN, 2004).

Los datos obtenidos a partir de este trabajo son congruentes con evaluaciones previas sobre el efecto de los monocultivos y el uso de pesticidas y fertilizantes; que indican que a partir de la implementación de estos sistemas se da la reducción de la fertilidad de los suelos (Sundaramurthy, 2010).

Cabe mencionar, que la evaluación del riesgo deberá realizarse caso por caso (Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica, 2000), ya que la naturaleza y el nivel de detalle de la información requerida podrían variar de un caso a otro, dependiendo del organismo vivo modificado de que se trate, su uso previsto y el probable medio receptor.

Es fundamental que esta ruta al daño se aplique también para distintos organismos no blanco y cultivos diversos, para que se generen otras hipótesis y rutas de exposición, antes, durante y después de que se introduzcan OGM en el campo.

Análisis previos han mostrado que los lepidópteros tienen distintos nichos en el ecosistema y que éstos pueden variar dependiendo del estadio de vida en el que se encuentren, además de que su alimentación es diversa (Noss, 1990). En este estudio se presenta una ruta al daño en donde los

lepidópteros que se encuentran en la comunidad se ven afectados al ingerir las proteínas por alguna de las vías de dispersión de estas proteínas. La meta de protección propuesta con esta ruta al daño es conservar la diversidad de especies y sus funciones.

Para construir la ruta al daño de este trabajo se tomaron en cuenta dos supuestos:

- 1) Las proteínas recombinantes se expresan en todas las partes de las plantas de *G. hirsutum*.
- 2) Algunos de los visitantes de las plantas de *G. hirsutum* son generalistas, es decir, además de interactuar con las plantas de algodón, interactúan con más plantas presentes dentro de la comunidad.

Bajo estos dos supuestos, se puede decir que existe el riesgo de que este polen, el néctar y los exudados se pudieran estar dispersando por distintos vectores a otras plantas de la comunidad, aumentando así, el riesgo de que otras especies de lepidópteros consuman estas proteínas. En consecuencia puede disminuir la abundancia de individuos y reducirse la riqueza de especies en la zona, con el riesgo de poder darse hasta la extinción local. Si estos parámetros se ven afectados de manera negativa bajo la presencia de proteínas recombinantes, a largo plazo estos cambios se verían reflejados en los índices de diversidad.

En el caso de este estudio, se presenta el análisis de los efectos indirectos que tiene la introducción de plantas GM en un ecosistema, a partir del flujo génico y la expresión de proteínas recombinantes en parientes los silvestres del cultivo (Hilbeck *et al.* 2011).

Hay que hacer énfasis en que para realizar cualquier evaluación de impacto ambiental, el último punto de ésta se da cuando se extingue una especie de manera local; pues si esto llega a ocurrir es difícil decir cuando se puede volver a restablecer la población en el área. Este hecho se puede interpretar como pérdida de diversidad y su gravedad se vería reflejada en el cambio en el valor del índice de Shannon, cuando se reduce el número de especies en una de las comunidades.

Los análisis de riesgo pueden servir tanto para obtener información de asuntos concretos, como para obtener información de interés general (Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica, 2000). Para la realización de éstos, se debe saber cuál es la probabilidad de que la consecuencia se presente. En este caso la ruta al daño fue caracterizada. Es importante que se sigan monitoreando en campo los efectos de las proteínas Cry, para que se pueda establecer la probabilidad de que se presenten los daños en el ecosistema de manera directa o indirecta.

6.3. Análisis general

Se ha comprobado que distintos genotipos dentro de una comunidad de plantas podrían soportar a una comunidad de artrópodos (Bailey *et al.* 2006, Randlkofer *et al.* 2010); y que ésta diversidad pudiera verse afectada ante la introducción de OGM que interactúen con estos organismos (Whitham *et al.* 2006; Hilbeck *et al.* 2011; Sanvido *et al.* 2011). En investigaciones previas se ha visto que la presencia de transgenes en el ecosistema afecta de manera negativa distintas especies que se encuentran presentes y que no se comportan como plagas de los cultivos en los que se insertan y aplican (Dively *et al.* 2005, Whitehouse *et al.* 2005; Bartz *et al.* 2009; Sundaramurthy, 2010). Así, si el uso de estas proteínas tienen efectos adversos sobre los organismos no blanco (ONB), la magnitud o severidad del daño pudiera ser alto si es que se consideran todas las interacciones que pudieran modificarse, como las interacciones tróficas y las redes de polinización (dado que los lepidópteros son polinizadores); sin mencionar los daños que podrían llegar a causar a la salud humana y de los organismos que sirven como alimento (que no se encuentran considerados en este trabajo).

Algunos autores que han trabajado en el tema, hacen énfasis en que aún no ha pasado el tiempo suficiente desde las primeras introducciones de OGM en el ambiente como para que los efectos adversos causados por éstos se reflejen en los estudios de diversidad (Whitehouse *et al.* 2005); el hecho de no localizar los efectos en el corto plazo, no quiere decir que éstos no se den a un lapso de tiempo mayor. Por ello, se debería considerar extender este estudio en espacio y en tiempo, para que se pueda asegurar que en los cambios en la diversidad y equidad de especies en las comunidades bióticas que aquí se presentan, sí se deben a la presencia de proteínas Cry en el ambiente.

En este estudio no se consideró la relación directa entre los lepidópteros colectados y las plantas de algodón; sin embargo sí se toma como supuesto que estos organismos interactúan entre sí de manera indirecta, existen distintas rutas mediante las cuáles las proteínas Cry pudieran haber sido consumidas por las larvas o los individuos adultos de distintas especies (Hofmann *et al.* 2011). Así las proteínas pudieron haberse dispersado en los parches por medio de vectores como los polinizadores, los herbívoros, el néctar extrafloral, los exudados de las raíces, el material que se descompone en el suelo y los flujos del agua (Sundaramurthy, 2010; Axelsson *et al.* 2011; Hofmann *et al.* 2011). Ninguna de estas rutas fue corroborada en este trabajo, pero es importante que se tomen en cuenta para futuras investigaciones.

Cabe mencionar que debido a la dinámica del ciclo de vida que tienen los lepidópteros, es complicado llegar a realizar un estudio que ayude a comprender las comunidades y su comportamiento por completo. Con anterioridad la dispersión de las mariposas se ha explicado a través de 6 tipos de nichos que pudieran estar influyendo en los resultados que aquí se obtuvieron: los recursos para las larvas por taxa; los recursos de las larvas por partes de las plantas; los recursos de los individuos adultos por micro hábitats; el tiempo; y la evasión a los depredadores (Gilbert, 1984). En cuanto los recursos de las larvas, las se ha propuesto que los individuos de este orden se encuentran muy especializadas en los taxones de las plantas que utilizan para hospedarse y alimentarse. Esta especialización incluye al reconocimiento de las plantas por las mariposas adultas, las respuestas gustativas y la tolerancia digestiva de las larvas (Gilbert, 1984). En cuanto a la distribución de los individuos adultos, algunas teorías proponen que cuando todas las flores están ocupadas por algunas mariposas para de ellas obtener néctar y polen, el resto de las mariposas emergentes tienen que emigrar (Gilbert, 1984).

Los análisis a nivel de metacomunidades pueden ser complejos y difíciles de realizar, aún más cuando se trata de países megadiversos como México. Este último factor se debería de considerar de manera previa a la liberación de OGM, ya que como se ve en este trabajo, la complejidad de realizar los monitores adecuados para la estimación de los posibles efectos adversos, no elimina la posibilidad de que éstos se presenten.

La introducción de proteínas Cry al ambiente para el control de plagas, es una medida que no toma en cuenta la gran cantidad de interacciones en un ecosistemas (Price *et al.* 2011), ante lo cual se han desarrollado otras propuestas como el manejo integral de plagas (MIP) (Cerritos *et al.* 2012). En el MIP se pretenden considerar los ciclos de vida, la historia evolutiva y las distintas interacciones que tienen unos organismos con otros. Los transgénicos no toman en cuenta estas interacciones, lo que provoca que se desarrollen aún más plagas que las que se manejan por este método; lo que conlleva a un desequilibrio ecosistémico ante el cuál es necesaria la implementación de aún más pesticidas para que la producción sea rentable en los campos de cultivo (Luo *et al.* 2014). Cuando en una comunidad de artrópodos las relaciones bióticas se alteran de manera radical, en un lapso de tiempo mayor la red evolutiva también podría verse alterada (Whitham *et al.* 2006).

Para el caso específico de las plantas de *G. hirsutum*, se sabe que éstas tienen distintos mecanismos de defensa (Hagenbucher *et al.* 2013), los cuáles podrían estar sirviendo afectados tanto

por el proceso de domesticación, como por la introducción de transgenes al genoma. Además se han realizado distintos estudios que muestran como son las interacciones entre los distintos gremios de artrópodos los cuáles se podrían tomar como base para la implementación de un MIP en nuestro país (Luo *et al.* 2014).

Otra manera en la que podrían estarse alterando los ciclos evolutivos y ecológicos; es a partir del desarrollo de resistencia a proteínas Cry, por parte de los organismos blanco. Esto podría estar afectando de manera negativa a la adecuación de las plantas, siendo necesaria la introducción de nuevas proteínas recombinantes al sistema de producción (Price *et al.* 2011).

A partir de los resultados obtenidos (Cuadros 5.3, 5.4, 5.5, 5.6; Figs. 5.6, 5.7 y 5.9), con la definición de daño ambiental (Bartz *et al.* 2009) y bajo la ruta al daño realizada para este caso específico; en este trabajo se propone que la introducción de OGM a las plantas de la metapoblación Pacífico Sur sí pudiera estar afectando a la comunidad de lepidópteros circundante. También se muestra que al verse afectados éstos organismos también podría estarse alterando toda una red de interacciones que es importante considerar en análisis futuros. Hay que recordar que las plantas proporcionan una gran cantidad de nichos ecológicos para los insectos; entre los que se encuentran protección y comida principalmente (Price *et al.* 2011). En el caso de los lepidópteros, las plantas funcionan como una parte esencial para todo su ciclo de vida, ya que de ellas depende el desarrollo de las larvas, y la alimentación de las orugas y de los individuos adultos (que consumen néctar, frutos y polen).

No hay que perder de vista que estos resultados podrían deberse a otros factores que se han visto relacionados con la diversidad de lepidópteros. Algunos de éstos son la deforestación, el cambio de uso de suelo, el cambio climático global, la acidez y los nutrientes del suelo, la disponibilidad de agua en el ambiente circundante, la calidad del agua y la introducción de sistemas agrícolas en zonas de conservación (Lawton *et al.* 1998; Oostermeijer y Van Swaay, 1998; Thomas, 2005).

En especial la fragilidad del sistema de estudio se hace presente cuando en la revisión bibliográfica se encontraron sólo dos especies de lepidópteros protegidas por la ley nacional (NOM059) (<http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/ise/fichas/doctos/invertebrados.html>) y cuando ninguna de las especies colectadas se encuentra dentro de la red list (<http://www.iucnredlist.org/>).

Por otro lado, a lo largo de su historia evolutiva, las plantas de algodón han desarrollado mecanismos directos e indirectos para la defensa contra distintos herbívoros. Algunos de éstos son las glándulas de gossypol, los nectarios extraflorales, la producción de taninos y el desarrollo de hojas tipo

okra (Uscanga, 2013). Otro tipo de mecanismo indirecto de defensa es el desarrollo de tricomas en las hojas que le proporciona a la planta resistencia contra herbívoros como los saltamontes (Butler *et al.* 1991). De esta manera las proteínas recombinantes *Bt* podrían no ser la única alternativa del uso de la biotecnología moderna para el manejo de plagas. En este sentido se podrían desarrollar estudios para analizar la variabilidad genética y fenotípica de los distintos caracteres antes mencionados, para desarrollar líneas isogénicas con las que se pueda integrar un manejo integral de plagas sin tener que insertar nuevos genes en estas plantas (Cerritos *et al.* 2012). Otro método de control de plagas es el control biológico, ante el cual distintos autores han hecho énfasis (Naranjo, 2005; Liu *et al.* 2014).

En cuanto a la legislación internacional relacionada a la liberación de OGM, aún no tiene definidos los protocolos y/o métodos que se deberían de seguir para el análisis de riesgo, lo que conlleva a que cada país establezca cuáles son éstos métodos, sin importar que éstos se hayan probado de manera previa en los campos de liberación de los cultivos.

Para este trabajo es importante mencionar que México ya firmó la ratificación del *Protocolo de Cartagena*, el *Protocolo de Nagoya-Kuala Lumpur*, aunque éste aún no esté en vigor. Esto quiere decir que el Estado Mexicano asumirá la responsabilidad y la compensación por los daños causados por el uso de la biotecnología moderna (Protocolo de Nagoya, 2011). El artículo 121 de la *Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados* también asume el daño que pudiera ser causado por OGM tanto para la diversidad como para el ambiente (LBOGM, 2005). De esta manera para el caso específico de México, sí existe un análisis de riesgo que se debe de llevar a cabo de manera previa a la liberación de éstos en el ambiente, por cada una de las empresas que desea liberar OGM. Sin embargo, al no existir una metodología a seguir, no se puede asegurar que estos protocolos realmente estén protegiendo la biodiversidad que se encuentra aledaña a las áreas de liberación de los cultivos.

En este estudio se propone una metodología concreta que se puede llevar a cabo en los análisis de riesgo llevados a cabo por las empresas. Asimismo, al detectar un posible daño asociado al flujo de proteínas recombinantes entre los parientes silvestres y cultivados, se recomienda que este análisis se lleve no solo por parte de las empresas, sino también por parte de las instituciones académicas y del gobierno.

El principio precautorio del *Protocolo de Cartagena* dice que si no estamos seguros sobre cuáles son los efectos adversos que podría estar teniendo la introducción de una tecnología a un ambiente determinado, ésta no se debería de introducir sin un análisis de riesgo previo a su liberación

(Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica, 2000). Al ser significativa la diferencia entre la diversidad de lepidópteros entre algodón GM y algodón silvestre, se puede decir que esta metodología debería de ser implementada antes, durante y después de la introducción de OGM al ambiente (Lang y Bühler, 2012). Asimismo, ésta se debería de llevar a cabo para otras comunidades de artrópodos, sitios y cultivos en distintos años.

VII. CONCLUSIONES

Con este trabajo se formuló y llevó a cabo una propuesta metodológica para evaluar algunos de los posibles efectos adversos que se pudieran dar a partir de la introducción de las proteínas Cry al ambiente, cuando no se tenía ni información de línea base ni un monitoreo sistematizado de los organismos no blanco que se encuentran expuestos a las proteínas recombinantes.

También se generó información de línea base que permitirá la realización de estudios evolutivos y ecológicos relacionados con la introducción de OGM en el ambiente. Este conocimiento es importante ya que casi todos los estudios relacionados con las plantas de *G. hirsutum* se han realizado con las plantas cultivadas, por lo cual este trabajo es el primero que da a conocer la diversidad circundante a las plantas silvestres que pudieran relacionarse directa o indirectamente con las plantas silvestres de la especie en cuestión. En un futuro esto podría contribuir a las estrategias de conservación que se puedan generar para las comunidades donde habitan las plantas silvestres de *G. hirsutum*.

Por otro lado en este estudio se detectó que las proteínas Cry introducidas en la metapoblación Pacífico Sur de *G. hirsutum*, sí podrían estar teniendo un efectos adverso sobre la comunidad de lepidópteros circundantes. Sin embargo, para generar una ruta al daño más exacta se deben de realizar experimentos que analicen si el daño encontrado en este trabajo se está dando en otros niveles ecológicos (individuos, poblaciones y ecosistema) y evolutivos (sobre la diversidad genética de las poblaciones); es recomendable que se generen y evalúen otras rutas de exposición a OGM, antes, durante y después de que éstos se introduzcan en el campo.

Este estudio es relevante tanto para los análisis de riesgo que actualmente se están estableciendo para la protección de la diversidad de las áreas donde se introducen los cultivos transgénicos como para la conservación de las especies que en ellas se presentan, ya que en la literatura no existen estudios previos que hayan reportado modificaciones al índice de Shannon a causa de la liberación de OGM.

Con este estudio se puede ver que es importante que el uso responsable de la biotecnología moderna respete los centros de origen y diversidad de las especies cultivadas, ya que aún no se cuenta con los instrumentos legales, económicos y científicos que, en base al principio precautorio, nos den las herramientas necesarias para proteger tanto al ambiente como a la salud humana. Cabe mencionar que la toma de decisiones debe de basarse en datos científicos que den los conocimientos necesarios para una mejor toma de decisiones. Asimismo, en la legislación internacional el análisis de riesgo para cada

una de las liberaciones es responsabilidad de cada uno de los solicitantes y debe de ser realizada por ellos.

Esta investigación podría estar detectando efectos que no se tenían considerados de manera previa la liberación de OGM, por lo cual proporciona elementos para la generación de nuevas líneas de conservación y análisis de especies. No hay que perder de vista que los efectos adversos causados por proteínas recombinantes pueden variar; por lo cual este experimento debe de ser repetido en espacio-tiempo considerando todas las variables posibles para cada evento de liberación de transgénicos.

Este es el primer estudio donde se realiza un análisis de riesgo para determinar los efectos de las proteínas recombinantes posterior al flujo génico entre plantas cultivadas y silvestres. Al encontrar un probable efecto adverso causado por la presencia de las proteínas Cry en la comunidad de lepidópteros del Istmo de Tehuantepec en Oaxaca, se muestra que a partir de esta metodología, es posible monitorear algunos de las consecuencias que tiene la introducción de proteínas Cry en las comunidades bióticas.

Aunque los OGM y en específico las proteínas Cry puedan estar jugando un papel importante en la alteración de las comunidades de lepidópteros de la metapoblación Pacífico Sur de *G. hirsutum*, no hay que perder de vista que éstas no podrían ser el único factor por el cual se está dando el proceso de deterioro ambiental en la zona. Actualmente la diversidad de lepidópteros y de otros seres vivos se está viendo afectada por el crecimiento poblacional y la expansión del ser humano en una gran cantidad de ecosistemas. En las últimas décadas, este proceso ha conllevado a la sobre explotación de recursos naturales y a los procesos de cambio de uso de suelo y formas de vida. A su vez los ecosistemas han sufrido muchas alteraciones, algunas de las causas de este deterioro son la contaminación, el cambio climático, la introducción de especies exóticas, la destrucción mecánica de los sistemas nativos; y el cambio de uso de suelo para la introducción de mecanismos de producción agrícola y pecuaria a gran escala (Jackson *et al.* 2001; Foley *et al.* 2005). Así, quedan abiertas las preguntas de si los OGM podrían ser un factor más de deterioro ambiental y si aún estamos a tiempo de remediar o reducir el impacto que éstos pudieran estar causando sobre la fragilidad ya presente de los ecosistemas

Este experimento se debe convertir en un esfuerzo de monitoreo que permita mediar los efectos de las proteínas Cry en el ambiente de manera directa a mediano y largo plazo. Esto permitiría realizar mejores modelos sobre cómo son estos cambios de las comunidades bióticas en relación a la

introducción de estas proteínas, que como se vio con anterioridad, cada vez son más utilizadas para la producción de alimentos y de vestimenta.

Para estudios posteriores se recomienda que en análisis posteriores se incluyan monitoreos de larvas de lepidópteros (Lang *et al.* 2013) y los perfiles de vegetación correspondientes. Asimismo, por falta de especialistas, en este estudio no se obtuvo la identidad del total de los ejemplares colectados, para lo cual se recomienda que se utilicen como complemento las nuevas técnicas de identificación por medio del uso de técnicas de biología molecular. Dado los resultados obtenidos sería pertinente que para ahorrar recursos y esfuerzo este estudio se repitiera sólo en la época de lluvias, asegurando que se alcance el esfuerzo de muestreo pertinente.

Este trabajo pretende ser útil para la toma de decisiones por parte de los actores involucrados el tema, tanto gubernamentales como grandes empresas, así como agricultores locales que pudieran verse afectados o beneficiados con la liberación de OGM.

Con este estudio también se generó información importante para la toma de decisiones orientadas a la conservación del ecosistema, en donde una de las posibilidades es la generación de instrumentos legales (por ejemplo las Normas Oficiales Mexicanas y los manuales de procedimientos), para regular adecuadamente el análisis de los riesgos de la introducción de OGM en los campos de cultivo o con fines de bioremediación.

VIII. PERSPECTIVAS

- Entre algunas de las líneas de investigación que se abren a partir de este estudio se encuentran el conocimiento de la diversidad de lepidópteros asociados con las plantas silvestres de *G. hirsutum*. Para este tipo de análisis se proponen estudios de genética de comunidades a partir de la utilización de herramientas de biología molecular, además de estudios ecológicos que permitan llegar a conclusiones sobre los efectos a corto plazo.
- En la actualidad se está desarrollando una nueva rama de la genética que analiza cómo afecta la introducción de nuevos genes en los ecosistemas (Bailey *et al.* 2006; Whitham *et al.* 2006). Las proteínas recombinantes podrían ser utilizadas como modelo para el análisis de estas nuevas metodologías y el desarrollo de esta nueva rama de la ciencia, para el bio-monitoreo de OGM.
- Hay que mencionar que este estudio podría ser repetido para distintas especies y cultivos, tanto en espacio como en tiempo para la caracterización del daño ambiental debido a la introducción de OGM, siempre considerando el caso por caso, adquiriendo mayor complejidad en países centro de origen y diversidad de los cultivos o ambientes megadiversos.
- Este trabajo da pie a la generación de programas de conservación de especies. Éstos deberían de ser generados tanto por las Organizaciones de la Sociedad Civil, como por parte de las distintas instancias de gobierno que se encuentran relacionadas con el tema.
- Este estudio podría ayudar a futuras investigaciones que quisieran analizar el comportamiento de las especies circundantes ante la introducción de OGM en el ambiente, su adecuación, evolución y los patrones biogeográficos que se pudieran estar modificando a causa de la introducción de nuevas prácticas agrícolas.
- Es importante que en el futuro se considere la formación de expertos para la identificación e larvas y polillas; además de que se generen colecciones taxonómicas donde se pueda cotejar la identidad de los ejemplares colectados en los estudios de campo.

IX. REFERENCIAS

- 1) Aguilar-Menedel, S., Rodríguez-Maciel, J.C., Martínez-Carrillo, J.L., López-Collado, J., Blanco, C. y Lagunes-Tajeda, A. 2007. Susceptibilidad de *Helicoverpa zea* (Boddie) a la δ -endotoxina Cry2Ab de *Bacillus thuringiensis* BERLINER. *Agrociencia* **41**(6): 653-662.
- 2) Aronson, A. y Shai, Y. 2001. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. *FEMS, Microbiology letters*: **195**: 1-8.
- 3) Axelsson, E.P., Hjaltén, J., LeRoy, C.J., Whitman, T.G., Julkunen-Tiitto, R. y Wennstrom, A. 2011. Leaf litter from insect-resistant transgenic trees causes changes in aquatic insect community Composition. *Journal of applied Ecology*, **48**: 1472-1479.
- 4) Bailey, J., Wooley, S., Lindroth, R. y Whitham, T. 2006. Importance of species interactions to community heritability: a genetic basis to trophic-level interactions. *Ecology letters*, **9**: 78-85.
- 5) Bartz, R., Heink, U. y Kowarik, I. 2009. Proposed Definition of Environmental Damage Illustrated by the Cases of Genetically Modified Crops and Invasive Species. *Conservation Biology*, **24**(3): 675–681.
- 6) Brakefield, P.M. y Reitsma, F., 1991. Phenotypic plasticity, seasonal climate and population biology of *Bicyclus* butterflies. *Ecological Entomology*, **16**: 291–303.
- 7) Breckling, B., Reuter, H., Middelhoff, U., Glemnitz, M., Wurbs, A., Schmidt, G., Schroder, W. y Windhorst, W. 2011. Risk indication of genetically modified organisms (GMO): Modelling environmental exposure and dispersal across different scales Oilseed rape in Northern Germany as an integrated case study. *Ecological Indicators*, **11**(4): 936-941.
- 8) Brown, K. Jr. 1997. Diversity, disturbance, and sustainable use of Neotropical forests: insects as indicators for conservation monitoring. *Journal of Insect Conservation*, **1**: 25-42.
- 9) Brubaker, C.L. y Wendel, J.F. 1994. Reevaluating the origin of domesticated cotton (*Gossypium hirsutum*; Malvaceae) using Nuclear Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs). *American Journal of Botany*, **81** (10): 1309-1326.
- 10) Butler, G.D., Wilson, F.D. Jr. y Fishier, T. 1991. Cotton leaf trichomes and populations of *Empoasca lybica* and *Bemisia tabaci*. *Crop protection*, **10**(6): 461-464.

- 11) Center for Environmental Risk Assessment (CERA). 2012. Consultado en internet el 15 de abril de 2013, en: <http://cera-gmc.org>.
- 12) Cerritos, R., Wegier, A. y Alavez, V. 2012. Toward the Development of Novel Long-Term Pest Control Strategies based on Insect Ecological and Evolutionary Dynamics. En: Marceto, Z. y Soloneski, S. Agricultural and Biological Sciences “Integrated Pest Management and Pest Control- Current and Future Tactics”. *INTECH*.
- 13) Colwell, R.K. y Coddington, J.A. 1994. Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. *Philosophical Transactions of the Royal Society (Series B)*, **345**:101-118.
- 14) Colwell, R.K, Xuan, M.C y Chang J. 2004. Interpolating, extrapolating, and comparing incidence-based species accumulation curves. *Ecology*, **85**(10): 2717-2727.
- 15) Conferencia de las Partes en el Convenio sobre la Diversidad Biológica que actúa como Reunión de las Partes en el Protocolo de Cartagena sobre la Seguridad en Biotecnología. Sexta Reunión. Hyderabad, India, del 1° al 5 de octubre de 2012.
- 16) Dively, G.P., Rose, R., Sears, M.K., Hellmich, R. y Stanley-Horn, D.E. 2004. Effects on monarch butterfly larvae (Lepidoptera: Danaidae) after continuous exposure to Cry1Ab-expressing corn during anthesis. *Environmental Entomology*, **33**(4): 1116-1125.
- 17) Domínguez, A. 2009. *Fenología de las abejas de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel y su relación con la fenología floral*. Tesis para la obtención de grado de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México. México, Distrito Federal. 93 pp.
- 18) Dutton, A., Romeis, J. y Bigler, F. 2005. Effects of *Bt* maize expressing Cry1Ab and *Bt* spray on *Spodoptera littoralis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **114**: 161–169.
- 19) Ehrlich, P. y Raven, P. 1964. Butterflies and plants: A study in coevolution. *Evolution*, **18**(4): 586-608.
- 20) Fernandes, F.S., Ramalho, F.S, Nascimento, J.L, Malaquias, J.B., Nascimento, A.R.B., Silva, C.A.D. y Zununcio, J.C. 2012. Within-plant distribution of cotton aphids, *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae), in *Bt* and non-*Bt* cotton fields. *Bulletin of Entomological Research*, **102**: 79–87.

- 21) Figueroa-Castro, D.M. y Cano-Santana, Z. 2004. Floral Visitor Guilds of Five Allochronic Flowering Asteraceous Species in a Xeric Community in Central Mexico. *Environmental Entomology*, **33**(2): 297-309.
- 22) Foley, J.A, DeFries, R., Asner, G.P., Barford, C., Bonan, G., Carpenter, S.R., Chapin, F.S., Coe, M.T., Daily, G.C., Gibbs, H.K., Helkowski, J.H., Holloway, T., Howard, E.A., Kucharik, C.J., Monfreda, C., Patz, J.A., Prentice, C., Ramankutty, N. y Snyder, P.K. 2005. Global Consequences of Land Use. *Science*, **309**: 570-574.
- 23) Fryxell, P.A. 1992. A revised taxonomic interpretation of *Gossypium* L. (Malvaceae). *Rheedea*. **2**: 108-165.
- 24) García, M. y Altieri, M. 2005. Transgenic Crops: Implications for Biodiversity and Sustainable Agriculture. *Bulletin of Science, Technology & Society*, **25**(4): 335-353.
- 25) Gilbert, L.E. 1984. The biology of butterfly communities. En: Vane- Wright, R.I. y Ackery P.R. En *The Biology of butterflies*, Academic Press, Londres.
- 26) Gregorius, H.R. y Guillet, E. 2008. Generalized Simpson-diversity. *Ecological Modelling*, **211**: 90-96.
- 27) Gurevitch, J., Scheiner, S.M. y Fox, G.A. 2006. *The ecology of plants*. Second edition, Sinauer Associates INC. Massachusetts, USA. 518 pp.
- 28) Hagenbucher, S., Olson, D.M., Ruberson, J.R. y Wäckers, F.L. 2013. Resistance Mechanisms Against Arthropod Herbivores in Cotton and Their Interactions with Natural Enemies. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **32**:458–482.
- 29) Hanski, I. 1994. A practical model of metapopulations dynamics. *Journal of Animal Ecology*, **64**:151-162.
- 30) Heckel, D. 2012. Learning the ABCs of *Bt*: ABC transporters and insect resistance to *Bacillus thuringiensis* provide clues to a crucial step in toxin mode of action. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **104**: 103-110.
- 31) Herrera-Estrella, L., Depicker, A., Montagu, M.V. y Schell, J. 1983. Expression of chimaeric gene transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature*, **303**: 209-213.

- 32) Hilbeck, A., Meier, M., Rombke, J., Jansh, S., Teichmann, H. y Tappeser, B. 2011. Environmental risk assessment of genetically modified plants, concepts and controversies. *Environmental Sciences Europe*, **23**(1): 13.
- 33) Hofmann, F., Otto, M., Kuhn, U., Ober, S., Schlechtriemen, U. y Vogel, R. 2011. A New Method for *in situ* Measurement of Bt-Maize Pollen Deposition on Host Leaves. *Insects*, **2**:12-21.
- 34) Höfte, H. y Whiteley, H.R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiology Review*, **53**(2): 242–25.
- 35) Hutcheson, K. 1970. A test for comparing diversities based on the Shannon formula. *Journal of Theoretical Biology*, **29**: 151-154.
- 36) Howe, W.H. 1975. *The butterflies in North America*. Doubledat & Company, INC. Garden City, Nueva York.
- 37) Jackson, J.B.C., Kirby, M.X., Berger, W. H., Bjorndal, K.A., Botsford, L.W., Bourque, B.J., Bradbury, R.H.,Cooke, R., Erlandson, J., Estes J.A., Hughes, T.P., Kdwell, S., Lange, C.B., Lenihan, H.S., Pandol, J.M., Peterson, C.H., Steneck, R.S., Tegner, M.J. y Warner, R.R. 2001. Historical Overfishing and the Recent Collapse of Coastal Ecosystems. *Science*, **293**: 629-638.
- 38) James, C. 2011. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2011. *ISAAA Brief* No. 43. ISAAA: Ithaca, New York. Consultado en internet el 23 de agosto de 2013, en: http://www.isaaa.org/resources/publications/biotech_crop_annual_update/download/03%20Cotton%202012.pdf.
- 39) James, C. 2012. Preview, global status of commercialized transgenic crops, ISAAA Briefs No. 35. Consultado en internet el 23 de agosto de 2013, en: <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/44/executivesummary/default.asp>.
- 40) James, C. 2013. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2013. *ISAAA Brief* No. 46. ISAAA: Ithaca, NY. Consultado en internet el 5 de enero de 2014, en: <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/46/executivesummary/default.asp>.
- 41) Jansson, C., Wullschleger, S.D., Kalluri, U.C., Tuskan, G.A. 2010. Phytosequestration: Carbon biosequestration by plants and the prospects of genetic engineering. *BioScience*, **60**: 685-696.

- 42) Janzen, D. 1980. When it is coevolution? *Evolution*, **34**(3):611-612.
- 43) Jensen, P.D., Dively, G.P., Swan, C.M. y Lamp, W.O. 2010. Exposure and Nontarget Effects of Transgenic *Bt* Corn Debris in Streams. *Environmental Entomology*, **39** (2): 707-714.
- 44) Jones, R.E. y Rienks, J., 1987. Reproductive seasonality in the tropical genus *Eurema* (Lepidoptera, Pieridae). *Biotropica*, **19**: 7–16.
- 45) Koleff, P., Gaston, K. y Lennon, J. 2003. Measuring beta diversity for presence–absence data. *Journal of Animal Ecology*, **72**: 367–382.
- 46) Lang, A. 2004. Monitoring the impacts of BT maize on butterflies on the field: Estimation of required sample sizes. *Environmental Biosafety Research*, **3**: 55-66.
- 47) Lang, A. y Bühler, C. 2012. Estimation of required sampling effort for monitoring the possible effects of transgenic crops on butterflies: Lessons from long-term monitoring schemes in Switzerland. *Ecological Indicators*, **13**(1): 29-36.
- 48) Lang, A., Tießen, B. y Dolek, M. 2013. Standardized methods for the GMO monitoring of butterflies and moths: the whys and hows. *BioRisk*, **8**: 15–38.
- 49) Lawton, J.H., Bignell, D.E., Bolton, B., Bloemers, G.F., Eggleton, P., Hammond, P.M., Hodda, M., Holt, R.D., Larsen, T.B., Mawdesley, N.A., Stork, N. E., Srivastava, D.S. y Watt, A.D. 1998. Biodiversity inventories, indicator taxa and effects of habitat modification in tropical forest. *Nature*, **391**: 72-96.
- 50) *Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (LBOGM)*. 2005. Cámara de Diputados y Senadores del H. Congreso de la Unión, México. Consultado en internet el 20 de septiembre de 2012, en: <http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/LBOGM.pdf>.
- 51) Li, G., Feng, H., Gao, Y., Kris, A., Wyckhuys, G. y Wu, K. 2010. Frequency of *Bt* Resistance Alleles in *Helicoverpa armigera* in the Xinjiang Cotton-Planting Region of China. *Environmental Entomology*, **39** (5):1698-1704.
- 52) Llorente-Bousquets, J., Luis- Martínez, A. y Vargas-Fernández, I. 1993. Biodiversidad de las mariposas su conocimiento y conservación en México. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*, **54**: 313-324.

- 53) Llorente-Bousquets, J., Vargas-Fernández, I., Luis-Martínez, A., Trujano-Ortega, Marisol, Hernández-Mejía, B. y Warren, A.D. 2014. Biodiversidad de Lepidoptera en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, **85**: 353-371.
- 54) Losey, J.E., Rayor, L.S. y Carter, M.E. 1999. Transgenic pollen harms monarch larvae. *Nature*, **399**: 214.
- 55) Luis-Martínez, A., Vargas-Fernández, I. y Llorente-Bousquets, J. 1991. Lepidoptero fauna de Oaxaca. I. Distribución y Fenología de los Papilionoidea de la Sierra de Juárez. *Publicaciones Especiales del Museo de Zoología, Facultad de Ciencias. UNAM*, **3**: 1-121.
- 56) Luis-Martínez, A., Llorente-Bousquets, J., Vargas-Fernández, I. y Gutiérrez, A.L. 2000. Síntesis preliminar del conocimiento de los Papilionoidea (Lepidoptera: Insecta) de México. En: Martín-Pierra, F. y Morrone, J.J. *Hacia un proyecto CYTED para el Inventario y Estimación de la Diversidad Entomológica en Iberoamérica*. PrIBES: Proyecto para Iberoamérica de Entomología Sistemática. Zaragoza, México, pp. 275-285.
- 57) Luis-Martínez, A., Llorente-Bousquets, J., Warren, A. y Vargas-Fernández, I. 2004. Lepidópteros: papilionoideos y hesperioideos. En: García A., Ordóñez M.J. y Briones M. *Biodiversidad de Oaxaca*. Instituto de Biología, UNAM-Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza-World Wildlife Found, México, pp. 335-335.
- 58) Luo, S., Naranjo, S.E. y Wu, K. 2014. Biological control of cotton pests in China. *Biological Control*, **68**: 6-14.
- 59) Magurran, A.E. 2004. *Measuring biological diversity*. Blackwell Science Ltd. United Kingdom. 70 pp.
- 60) Naranjo, S.E. 2005. Long-term assessment of the effects of transgenic *Bt* cotton on the abundance of non-target arthropod natural enemies. *Environmental Entomology*, **34**(5): 1193-1210.
- 61) Noss, R.F. 1990. Indicators for monitoring biodiversity: A hierarchical approach. *Conservation Biology*, **4** (4): 355-364.
- 62) Odum, E. y Barret, G. 2005. *Fundamentals of Ecology*. Thomson Brooks/Cole. USA. 598 pp.

- 63) Parimi, S., Char, B.R., Goravale, R.K. y Chaporkar, C.B. 2010. Insect Tolerant Cotton in India. En: Zehr U. B. *Cotton, Biotechnology in Agriculture and Forestry*, **65**, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Págs. 95-111.
- 64) Pilcher, C.D., Rice, M.E. y Obrycki, J.J. 2005. Impact of Transgenic *Bacillus thuringiensis* Corn and Crop Phenology on Five Nontarget Arthropods. *Environmental Entomology*, **34**: 1302-1316.
- 65) Pozo, C., Llorente-Bousquets, J., Martínez, L.A., Vargas-Fernández, I. y Salas, N. 2005. Reflexiones acerca de los métodos de muestreo para mariposas en las comparaciones biogeográficas. En: Llorente-Bousquets, J. y Morrone, J. J. *Regionalización geográfica en Iberoamérica y trópicos afines: Primeras Jornadas Biogeográficas de la Red Iberoamericana de Biogeografía y Entomología Sistemática*. Universidad Autónoma de México, México. 203-215.
- 66) Price, P.W., Denno, R.F., Eubanks, M.D., Finke, D.L. y Kaplan, I. 2011. *Insect Ecology: Behavior, Populations and Communities*. Cambridge University Press. U.K. 801 pp.
- 67) Protocolo de Nagoya sobre Acceso a los Recursos Genéticos y Participación Justa y Equitativa en los Beneficios que se Deriven de su Utilización al Convenio sobre la Diversidad Biológica: texto y anexo. 2011. Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica. Consultado el 14 de septiembre de 2013, en: <http://www.cbd.int/abs/doc/protocol/nagoya-protocol-es.pdf>.
- 68) Purcell, J.P., Greenplate, R.G., Cantrell, R.G., Hugie, W.V., Perlak, F.J. y Fraley, R.T. 2010. New Tools and Traits for Cotton Improvement. En: Zehr, U. B. *Cotton, Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. **65**: 79-94.
- 69) Randlkofer, B., Obermaier, E., Hilker, M. y Meiners, T. 2010. Vegetation complexity- The influence of plant species diversity and plant structures on plant chemical complexity and arthropods. *Basic and Applied Ecology*, **11**: 383-395.
- 70) R Core Team. 2012. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL (<http://www.R-project.org/>).
- 71) Rzedowski, J., 2006. Vegetación de México. 1ra. Edición digital, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). México, Distrito Federal. Capítulo 12.

Consultado el 12 de noviembre de 2012 en:
http://www.biodiversidad.gob.mx/publicaciones/librosDig/pdf/VegetacionMx_Cont.pdf

- 72) Ríos-Casanova, L., Cano-Santana, Z. y Godínez-Álvarez, H. 2010. Patterns of Arthropod Diversity in Contrasting Habitats of El Pedregal de San Ángel a Preserve in Mexico City. *Southwestern Entomologist*, **35**(2): 165-175.
- 73) Rydon, A. 1964. Notes on the use of butterfly traps in East Africa. *Journal of the lepidopterists Society*, **18**: 51-58.
- 74) Rudgers, J. y Strauss, S. 2004. A selection mosaic in the facultative mutualism between ants and wild cotton. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **271**:2481–2488
- 75) Rudgers, J., Savage, A. y Rúa, M. 2010. Geographic variation in a facultative mutualism: consequences for local arthropod composition and diversity. *Oecologia*, **163**:985–996.
- 76) Sadras, V. O. y Felton, G. W. 2010. Mechanisms of cotton resistance to arthropod herbivory. En: Stewart, J. M., Oosterhuis, D., Heitholt, J. J., y Mauney, J. R., Eds. *Physiology of Cotton* Springer Science & Business Media B.V. Págs: 213–228.
- 77) Sanchis, V. y Bourguet, D. 2008. *Bacillus thuringiensis*: applications in agriculture and insect resistance management. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, **28**: 11–20.
- 78) Sanchis, V. 2011. From microbial sprays to insect-resistant transgenic plants: history of the biopesticide *Bacillus thuringiensis*. *Agronomy for Sustainable Development*, **31**: 217-231.
- 79) Sanvido, O., Romeis, J., Gathmann, A., Gielkens, M., Raybould, A. y Bigler, F. 2012. Evaluating environmental risks of genetically modified crops: ecological harm criteria for regulatory decision-making. *Environmental Science & Policy*, **15**: 82-91.
- 80) Schuppener, M., Mulhause, J., Muller, A.K. y Rauschen, S. 2012. Environmental risk assessment for the small tortoiseshell *Aglais urticae* and a stacked Bt-maize with combined resistances against Lepidoptera and Chrysomelidae in central European agrarian landscapes. *Molecular Ecology*, **21**: 4646–4662.
- 81) Sears, M.K., Hellmich, R.L., Stanley-Horn, D.E., Oberhouser, K.S., Pleasants, J.M., Mattila, H.R., Siegfried, B.D. y Dively, G.P. 2001. Impact of *Bt* corn pollen on monarch butterfly

- populations: a risk assessment. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **98**: 11937-11942.
- 82) Secretaría de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), 2014. *Bioseguridad*. México. Consultada en internet el 19 de marzo de 2014, en: <http://www.sagarpa.gob.mx>.
- 83) Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica. 2000. la Diversidad Biológica. Protocolo de Cartagena sobre seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica: texto y anexos. Montreal. Consultado en internet el 27 de agosto de 2013 en: <http://www.cbd.int/doc/legal/cartagena-protocol-es.pdf>.
- 84) Serratos, J.A. Bioseguridad y dispersión del maíz transgénico en México. *Ciencias*, **92-93**: 130-141.
- 85) Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). 2012. Plagas reglamentadas del algodonero. México. Consultado en internet el 4 de septiembre de 2012, en: <http://www.senasica.gob.mx/?id=4520>.
- 86) Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). 2013. Historia de la Bioseguridad de OGM. México. Consultado en internet el 20 de mayo de 2013, en: <http://www.senasica.gob.mx/?id=2403>
- 87) Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). 2014. Estatus de solicitudes de permisos de liberación al ambiente de OGM. México. Consultado en internet el 5 de 2014, en: <http://www.senasica.gob.mx/?id=5586>.
- 88) Shannon, C.E. 1948 A mathematical theory of communication. *Bell System Tech. J.*, **27**: 379-423, 623-656.
- 89) Sisterson, M., Carriere, Y., Dennehy, T.J. y Tabashnik, B.E. 2007. Nontarget Effects of Transgenic Insecticidal Crops: Implications of Source-Sink Population Dynamics. *Environmental Entomology*, **36** (1):121-127.
- 90) Stéphanie, A., Jeanneret, P., Schupbach, B. y Herzog, F. 2007. Effects of agri-environmental measures, site, landscape conditions on butterfly diversity of Swiss grassland. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **122**: 295-304.

- 91) Sundaramurthy, V.T. 2010. The impacts of the transgenes on the modified crops. Non-target soil and terrestrial organisms. *African Journal of Biotechnology*, **9**(54): 9163-9176.
- 92) Tilman, D., Knops, J., Wedin, D., Reich, P., Ritchie, M. y Sieman, E. 1997. The Influence of Functional Diversity and Composition on Ecosystem Processes. *Science*, **277**(5330): 1300-1302.
- 93) Tóthmérész, B. 1995. Comparison of different methods for diversity ordering. *Journal of Vegetation Science*, **6**: 283-290.
- 94) Thomas, J. 2005. Monitoring change in the abundance and distribution of insects using butterflies and other indicator groups. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **360**: 339-357.
- 95) Tyler, H., Brown, K.S. y Wilson, K. 1994. *Swallowtail butterflies of the Americas: A study in Biological Dynamics, Ecological Diversity, Biosystematics and Conservation*. Gainesville. Scientific Publishers. 376 pp.
- 96) Unión Mundial para la Naturaleza (UICN). 2004. Guía Explicativa del Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología. Consultado el 27 de marzo de 2014, en: [file:///C:/Users/MARINA/Downloads/iucn%20explanatory%20guide%20to%20the%20cartagena%20protocol%20-%20spanish%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/MARINA/Downloads/iucn%20explanatory%20guide%20to%20the%20cartagena%20protocol%20-%20spanish%20(1).pdf).
- 97) Uscanga, A. 2013. Variación foliar del algodón (*Gossypium hirsutum*) Silvestre y Cultivado en México. Tesis para obtener el grado de Bióloga. UNAM. 62 pp.
- 98) Vaeck, M., Reynaerts, A., Höfte, H., Jansens, S., De Beuckeleer, M., Dean, C., Marc, ZM. Montagu, V. y Leemans, J. 1987. Transgenic plants protected from insect attack. *Nature*, **328**: 33-37.
- 99) Wegier, A. 2013. Diversidad, genética y conservación de *Gossypium hirsutum* silvestre y cultivado en México. Tesis para optar el grado de Doctor en Ciencias. UNAM. México, D.F. 114 pp.
- 100) Wegier, A. y Alavez, V. 2012. Proyecto “Metodología para la evaluación del Daño Ambiental ocasionado por los Organismos Genéticamente Modificados (OGM)” (2012-2014, financiamiento fondos fiscales INIFAP).

- 101) Wegier, A., Piñeyro-Nelson, A., Alarcón, J., Gálvez-Mariscal, A., Álvarez-Buylla, E.R. y Piñero, D. 2011. Recent long-distance transgene flow conforms to historical patterns of gene flow in wild cotton (*Gossypium hirsutum*) at its center of origin. *Molecular Ecology*, **20**: 4182–4194.
- 102) Wilcox, D.R., Shivakumar, A.G., Melin, B.E., Miller, M.F., Benson, T.A., Schopp, C.W., Casuto, D., Gundling, G.J., Bolling, T.J., Spear, B.B. y Fox, L. 1986. Genetic Engineering of Bioinsecticides. En: Inouye, M. y Raghupathy, S. *Protein Engineering: Applications in Science, Medicine, And Industry*. Academic Press, INC. Florida, EUA, pp. 395-409.
- 103) Wilkins, T., Rajasekaran, K. y Anderson, D. 2000. Cotton Biotechnology. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **19**(6):511–550.
- 104) Whitehouse, A.M.E.A., Wilson, L.J. y Fitt, G.P. 2005. A Comparison of Arthropod Communities in Transgenic *Bt* and Conventional Cotton in Australia. *Entomological Society of America*, **34**(5): 1224-1241.
- 105) Whitham, T., Bailey, J., Schweitzer, J., Shuster, S., Bangert, R., LeRoy, C., Lonsdorf, E., Allan, G., DiFazio, S.P., Potts, B., Fischer, D.G., Gehring, C., Lindroth, R., Marks, J., Hart, S. Wimp, G. y Wooley, S. 2006. A framework for community and ecosystem genetics: from genes to ecosystems. *Nature Reviews Genetics*, **7**: 510-523.
- 106) Whittaker, R.H. 1972. Evolution and measurement of species diversity. *Taxon*, **21**(2/3): 213-251.
- 107) Wu, G., Harris, M.K., Guo, J.Y. y Wan, F.H. 2009. Response of multiple generations of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner) feeding on transgenic *Bt* cotton. *Journal of Applied Entomology*, **133** (2): 90-100.
- 108) Zar, J. H. 2010. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, Upper Saddle River. 944 pp.

X. APÉNDICES

10.1. Composición de especies en total

Familia	Subfamilia	Especie	Localidad 1	Localidad 2
Erebidae	Erebinae	<i>Ascalapha odorata</i> (Linneo, 1958)	√	√
Hesperiidae	Pyrginae	<i>Chioides albofasciatus</i> (Hewitson, 1867)	-	√
Hesperiidae	Pyrginae	<i>Heliopetes laviana laviana</i> (Hewitson, 19868)	-	√
Hesperiidae	Pyrginae	<i>Heliopetes marcaira marcaira</i> (Reakirt, 1867)	√	√
Hesperiidae	Pyrginae	<i>Pyrgus adepta</i> (Plotz, 1884)	√	-
Hesperiidae	Pyrginae	<i>Pyrgus oileus</i> (Linneo, 1767)	√	√
Lycaenidae	Theclinae	<i>Panthiades bathildis</i> (C. Felder y R. Felder, 1865)	-	√
Lycaenidae	Theclinae	<i>Pseudolycaena damo</i> (H. Druce, 1875)	√	-
Nymphalidae	Biblidinae	<i>Eunica monima</i> (Stoll, 1782)	√	√
Nymphalidae	Biblidinae	<i>Myscelia ethusa cyanecula</i> (C. Felder y R. Felder, 1867)	√	-
Nymphalidae	Bilblinidae	<i>Hamadryas februa februa</i> (Hübner, 1806).	√	-
Nymphalidae	Bilblinidae	<i>Hamadryas atlantis atlantis</i> (Bates, 1864)	√	√
Nymphalidae	Bilblinidae	<i>Hamadryas februa ferentina</i> (Godart, 1824)	√	√
Nymphalidae	Bilblinidae	<i>Hamadryas feronia farinulenta</i> (Fruhstorfer, 1916)	-	√
Nymphalidae	Bilblinidae	<i>Hamadryas glauconome glauconome</i> (Bates, 1864)	√	√
Nymphalidae	Charaxinae	<i>Anaea aidea</i> (Guérin-Méneville, 1844)	√	√
Nymphalidae	Charaxinae	<i>Hymna clytemestra mexica</i> (A. Hall, 1917)	√	-
Nymphalidae	Danainae	<i>Danaus eresimus montezuma</i> (Talbot, 1943)	√	√
Nymphalidae	Heliconiinae	<i>Agraulis vanillae incarnata</i> (Riley, 1920)	√	√

Nymphalidae	Heliconiinae	<i>Biblis hyperia aganisa</i> (Boisduval, 1836)	√	-
Nymphalidae	Heliconiinae	<i>Dryas iulia moderata</i> (Riley, 1920)	√	-
Nymphalidae	Heliconiinae	<i>Heliconius charitonia vazquezae</i> (Comstock y Brown, 1950)	√	√
Nymphalidae	Libytheinae	<i>Adelpha basiloides</i> (Hübner, 1865)	√	√
Nymphalidae	Limenitidinae	<i>Marpesia petreus</i> (Cramer, 1776)	-	√
Nymphalidae	Limenitidinae	<i>Smyrna blomfieldia datis</i> (Fruhstorfer, 1908)	-	√
Nymphalidae	Nymphalinae	<i>Anartia fatima fatima</i> (Fabricius, 1793)	√	√
Nymphalidae	Nymphalinae	<i>Anartia jatrophae luteipicta</i> (Fruhstorfer, 1907)	√	√
Nymphalidae	Nymphalinae	<i>Chlosyne rosita riobalsensis</i> (Bauer, 1961)	-	√
Nymphalidae	Nymphalinae	<i>Euptoieta hegesia meridiana</i> (Stichel, 1938)	√	√
Nymphalidae	Nymphalinae	<i>Mircrotia elva</i> (Bates, 1864)	-	√
Nymphalidae	Nymphalinae	<i>Siproeta stelenes biplagiata</i> (Fruhstorfer, 1907)	√	√
Nymphalidae	Nymphalinae	<i>Zaretis ellops</i> (Ménétriés, 1855)	-	√
Nymphalidae	Satyrinae	<i>Cissia themis</i> (Butler, 1867)	√	√
Nymphalidae	Satyrinae	<i>Hermeuptychia hermes</i> (Fabricius, 1775)	-	√
Papilionidae	Papilioninae	<i>Parides montezuma</i> (Westwood, 1842)	-	√
Papilionidae	Papilioninae	<i>Battus philenor philenor</i> (Linnaeus, 1771)	-	√
Papilionidae	Papilioninae	<i>Battus polydamas polydamas</i> (Linnaeus, 1758)	√	-
Pieridae	Coliadinae	<i>Anteos maerula</i> (Fabricius, 1775)	-	√
Pieridae	Coliadinae	<i>Eurema daira</i> (Hübner, 1819).	√	-
Pieridae	Coliadinae	<i>Eurema daira sidonia</i> (Felder, 1869)	-	√
Pieridae	Coliadinae	<i>Nathalis iole iole</i> (Boisduval, 1836)	√	√
Pieridae	Coliadinae	<i>Phoebis agarithe agarithe</i> (Boisduval, 1836)	-	√
Pieridae	Coliadinae	<i>Phoebis philea</i> (Linnaeus, 1763)	√	√

Pieridae	Coliadinae	<i>Phoebis sennae marcellina</i> (Cramer, 1775)	√	√
Pieridae	Coliadinae	<i>Prestonia clarki</i> (Schaus, 1920)	√	√
Pieridae	Coliadinae	<i>Prysitia nise nelphe</i> (Felder, 1869)	√	√
Pieridae	Coliadinae	<i>Pyrisitia dina westwoodi</i> (Boisduval, 1836)	√	√
Pieridae	Coliadinae	<i>Pyrisitia proterpia</i> (Fabricius, 1793)	√	√
Pieridae	Coliadinae	<i>Krighonia lyside</i> (Godart, 1819)	√	√
Pieridae	Coliadinae	<i>Zerene cesonia cesonia</i> (Stoll, 1790)	√	√
Pieridae	Pierinae	<i>Ascia monuste monuste</i> (Linneo, 1764)	√	√
Pieridae	Pierinae	<i>Ganyra josephina josepha</i> (Salvin y Godman, 1868)	√	-
Riodinidae	Riodininae	<i>Calephis sp.</i>	√	-
Riodinidae	Riodininae	<i>Melanis acroleuca acroleuca</i> (Felder, 1869)	√	-

10.2. Especies con un individuo de la muestra total

Localidad A. Con Cry

Msp.	Especie
13	<i>Pyrisitia dina westwoodi</i> (Boisduval, 1836)
18	<i>Eunica monima</i> (Stoll, 1782)
19	<i>Phoebis sennae marcellina</i> (Cramer, 1775)
28	<i>Pseudolycaena damo</i> (Druce, 1875)
46	<i>Biblis hyperia aganisa</i> (Boisduval, 1836)
48	<i>Adelpha basiloides</i> (Hübner, 1865)
49	<i>Melanis acroleuca acroleuca</i> (Felder, 1869)
50	<i>Eurema daira</i>
51	<i>Hymna clytemestra mexicana</i> (Hall, 1917)
52	<i>Battus polydamas polydamas</i> (Linneo, 1758)
58	<i>Hamadryas februa februa</i>
64	Msp. 64
68	Msp. 68
70	Msp. 70
73	Msp. 73
82	Msp. 82
83	Msp. 83
86	Msp. 86
87	Msp. 87
93	Msp. 93
95	Msp. 95
96	Msp. 96
97	Msp. 97
98	Msp. 98
99	Msp. 99
100	Msp. 100
101	Msp. 101
112	Msp. 112
116	Msp. 116
119	Msp. 119

Localidad B. Sin Cry

Msp.	Especie
3	<i>Siproeta stelenes biplagiata</i> (Fruhstorfer, 1907)
4	<i>Panthiades bathildis</i> (Felder y Felder, 1865)
6	<i>Battus p. philenor</i> , (Linnaeus, 1771)
7	<i>Parides montezuma</i> (Westwood, 1842)
10	<i>Marpesia petreus</i> (Cramer, 1776)
12	Msp. 12
25	<i>Hermeuptychia hermes</i> (Fabricius, 1775)
29	<i>Chlosyne rosita riobalsensis</i> (Bauer, 1961)
30	<i>Heliconius charitonia vazquezae</i> (Comstock y Brown, 1950)
37	<i>Eurema daira sidonia</i> (Felder, 1869)
39	<i>Phoebis agarithe agarithe</i> (Boisduval, 1836)
40	<i>Prestonia clarki</i> (Schaus, 1920)
41	<i>Zaretis ellops</i> (Ménétriés, 1855)
42	<i>Anteos maerula</i> (Fabricius, 1975)
55	<i>Pyrgus oileus</i> (Linneo, 1767)
59	Msp. 59
60	Msp. 60
67	Msp. 67
70	Msp. 70
71	Msp. 71
82	Msp. 82
87	Msp. 87
91	Msp. 91
92	Msp. 92
103	Msp. 103
104	Msp. 104
105	Msp. 105
106	Msp. 106
107	Msp. 107
110	Msp. 110
111	Msp. 111
113	Msp. 113
114	Msp. 114
115	Msp. 115
116	Msp. 116
117	Msp. 117
118	Msp. 118
120	Msp. 120
121	Msp. 121
122	Msp. 122
123	Msp. 123
125	Msp. 125
126	Msp. 126

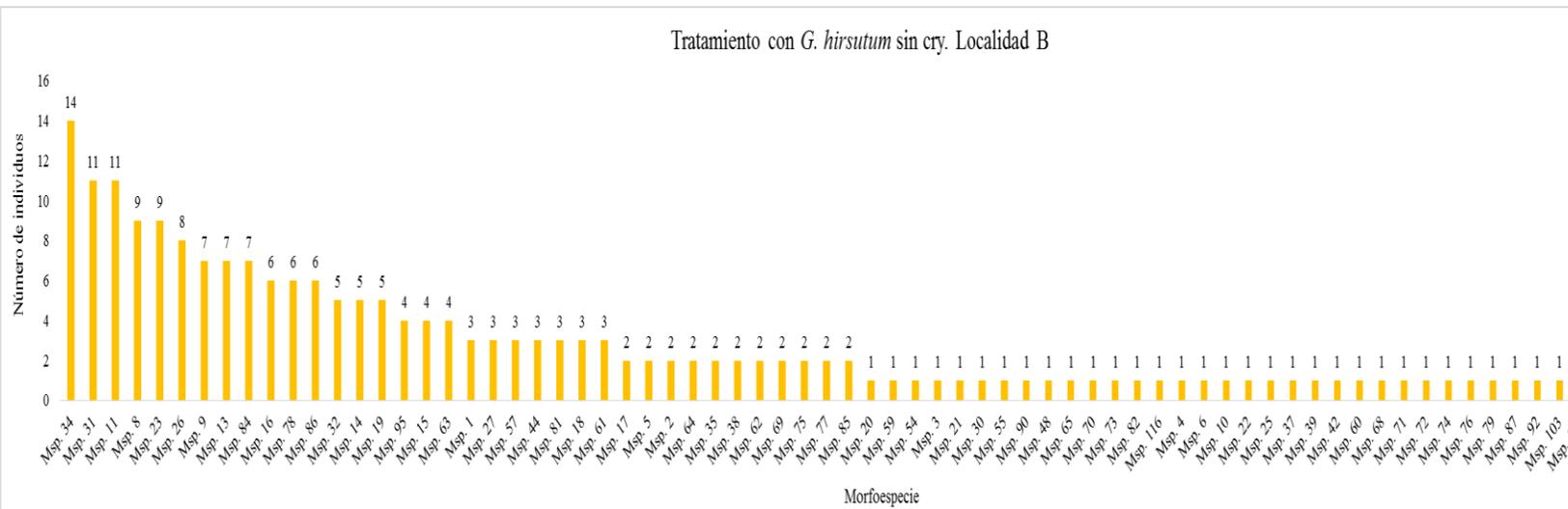
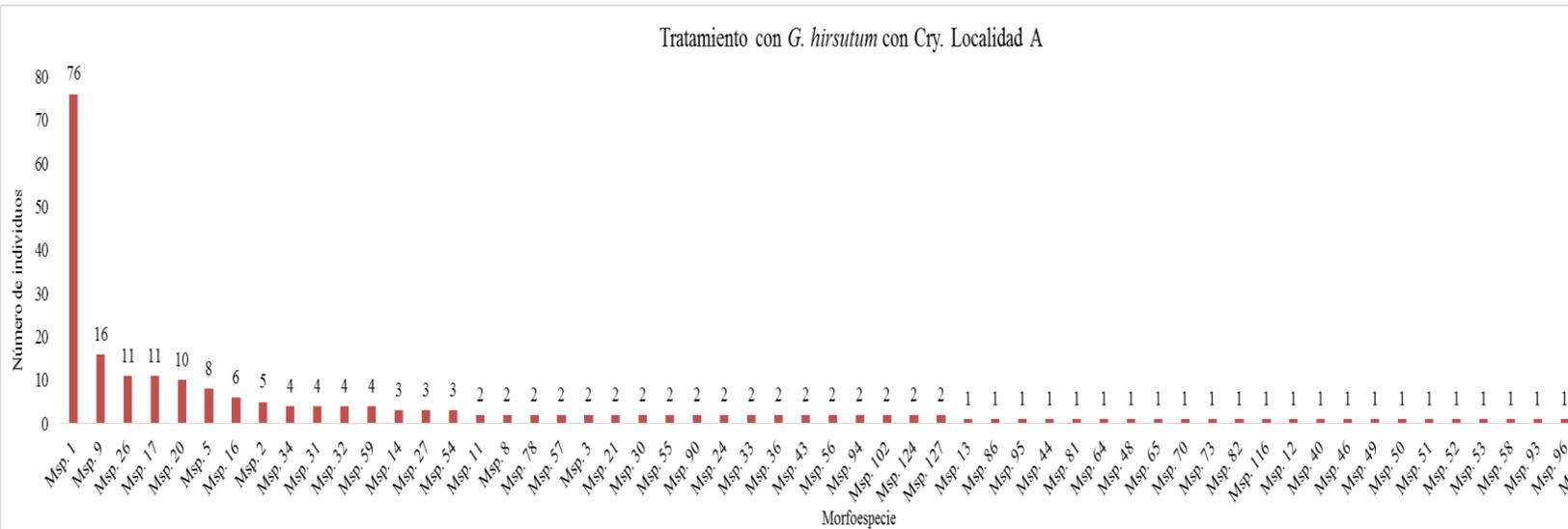
10.3. Especies con un individuo de los tratamientos con *G. hirsutum*

Localidad A. Con Cry		Localidad B. Sin Cry	
Msp.	Especie	Msp.	Especie
13	<i>Pyrisitia dina westwoodi</i> (Boisduval, 1836)	3	<i>Siproeta stelenes biplagiata</i> (Fruhstorfer, 1907)
40	<i>Prestonia clarki</i> (Schaus, 1920)	4	<i>Panthiades bathildis</i> (Felder y Felder, 1865)
44	<i>Prysitia nise nelphe</i> (Felder, 1869)	6	<i>Battus p. philenor</i> (Linnaeus, 1771)
46	<i>Biblis hyperia aganisa</i> (Boisduval, 1836)	10	<i>Marpesia petreus</i> (Cramer, 1776)
48	<i>Adelpha basiloides</i> (Hübner, 1865)	12	Msp. 12
49	<i>Melanis acroleuca acroleuca</i> (Felder, 1869)	20	<i>Ascia monuste monuste</i> (Linneo, 1764)
50	<i>Eurema daira</i>	21	<i>Heliopetes marcaira marcaira</i> (Reakirt, 1867)
51	<i>Hymna clytemestra mexica</i> (Hall, 1917)	22	<i>Heliopetes laviana laviana</i> (Hewitson, 19868)
52	<i>Battus polydamas polydamas</i> (Linneo, 1758)	25	<i>Hermeuptychia hermes</i> (Fabricius, 1775)
53	<i>Calephis</i> sp.	30	<i>Heliconius charitonia vazquezae</i> (Comstock y Brown, 1950)
58	<i>Hamadryas februa februa</i>	37	<i>Eurema daira sidonia</i> (Felder, 1869)
64	Msp. 64	39	<i>Phoebis agarithe agarithe</i> (Boisduval, 1836)
65	Msp. 65	42	<i>Anteos maerula</i> (Fabricius, 1975)
70	Msp. 70	48	<i>Adelpha basiloides</i> (Hübner, 1865)
73	Msp. 73	54	<i>Myscelia ethusa cyanecula</i> (Felder y Felder, 1867)
81	Msp. 81	55	<i>Pyrgus oileus</i> (Linneo, 1767)
82	Msp. 82	59	Msp. 59
86	Msp. 86	60	Msp. 60
93	Msp. 93	65	Msp. 65
95	Msp. 95	68	Msp. 68
96	Msp. 96	70	Msp. 70
97	Msp. 97	71	Msp. 71
100	Msp. 100	72	Msp. 72
101	Msp. 101	73	Msp. 73
116	Msp. 116	74	Msp. 74
119	Msp. 119	76	Msp. 76
		79	Msp. 79
		82	Msp. 82
		87	Msp. 87
		90	Msp. 90
		92	Msp. 92
		103	Msp. 103
		105	Msp. 105
		106	Msp. 106
		108	Msp. 108
		111	Msp. 111
		114	Msp. 114
		116	Msp. 116
		117	Msp. 117

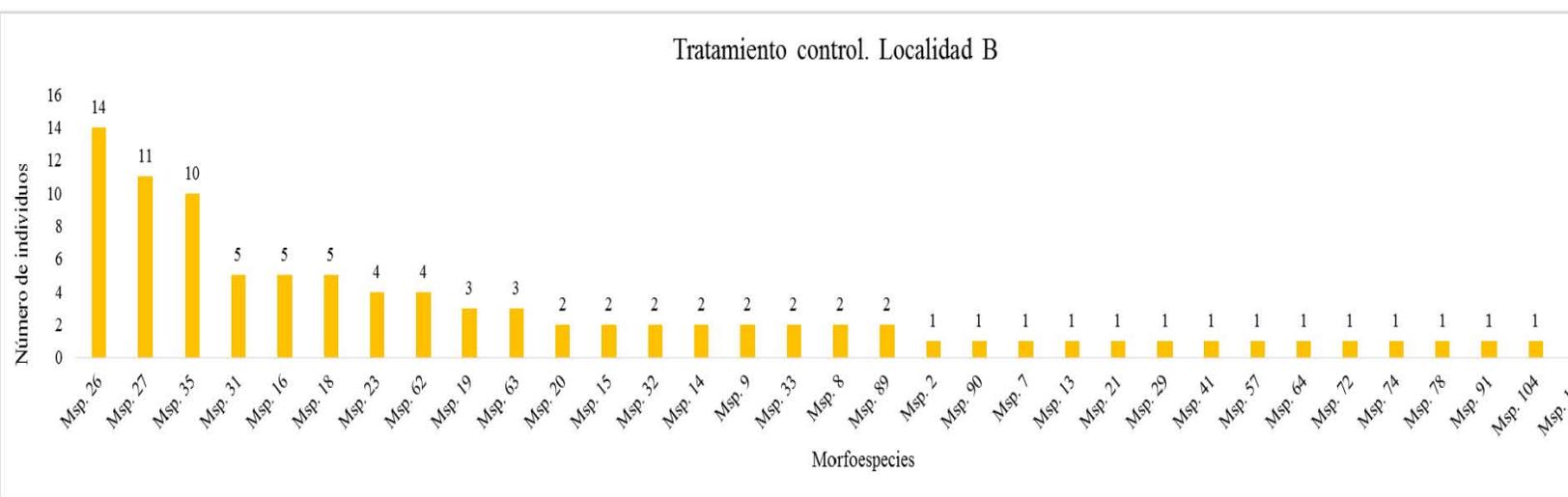
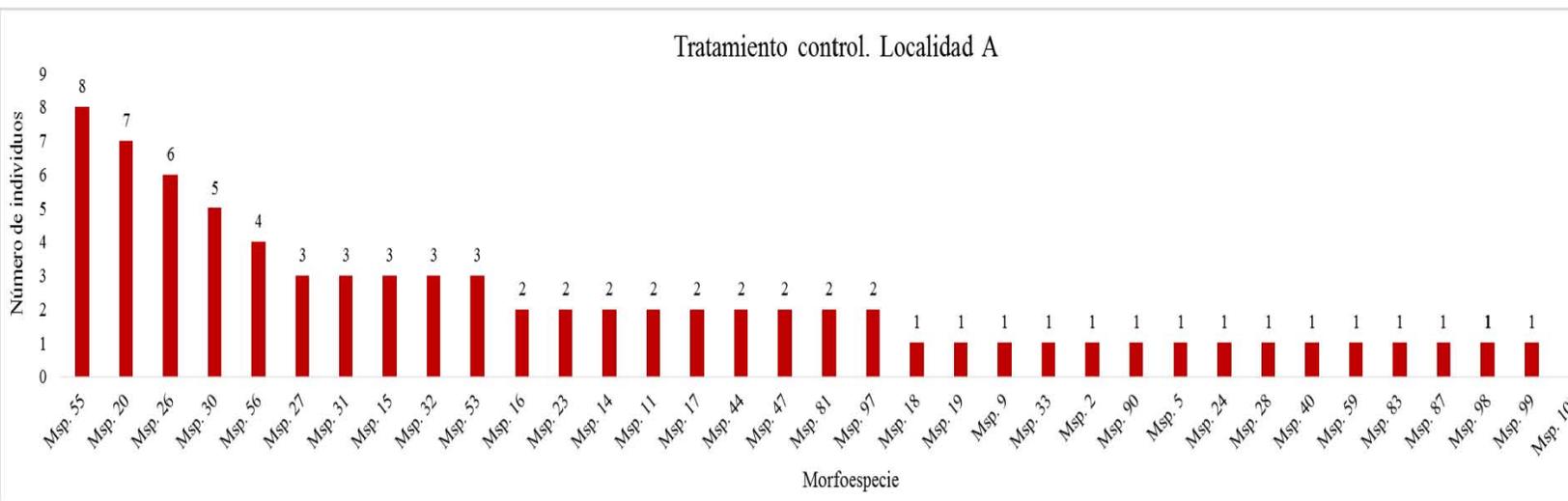
10.4. Especies con un individuo de abundancia en los tratamientos control

Localidad A. Con Cry		Localidad B. Sin Cry	
Msp.	Especie	Msp.	Especie
33	<i>Cissia themis</i> (Butler, 1867)	1	<i>Smyrna blomfieldia datis</i> (Fruhstorfer, 1908)
40	<i>Prestonia clarki</i> (Schaus, 1920)	5	<i>Hamadryas feronia farinulenta</i> (Fruhstorfer, 1916)
57	<i>Hamadryas atlantis atlantis</i> (Bates, 1864)	7	<i>Parides montezuma</i> (Westwood, 1842)
59	59	13	<i>Pyrisitia dina westwoodi</i> (Boisduval, 1836)
65	65	21	<i>Heliopetes marcaira marcaira</i> (Reakirt, 1867)
68	68	29	<i>Chlosyne rosita riobalsensis</i> (Bauer, 1961)
78	78	40	<i>Prestonia clarki</i> (Schaus, 1920)
83	83	41	<i>Zaretis ellops</i> (Ménétriés, 1855)
87	87	48	<i>Adelpha basiloides</i> (Hübner, 1865)
90	90	57	<i>Hamadryas atlantis atlantis</i> (Bates, 1864)
98	98	67	Msp. 67
99	99	68	Msp. 68
102	102	72	Msp. 72
112	112	73	Msp. 73
		74	Msp. 74
		76	Msp. 76
		79	Msp. 79
		90	Msp. 90
		91	Msp. 91
		104	Msp. 104
		107	Msp. 107
		108	Msp. 108
		110	Msp. 110
		113	Msp. 113
		115	Msp. 115
		118	Msp. 118
		120	Msp. 120
		121	Msp. 121
		122	Msp. 122
		123	Msp. 123
		125	Msp. 125
		126	Msp. 126

10. 5. Curva de frecuencias de los tratamientos con *G. hirsutum*.



10.6. Curva de frecuencias de los tratamientos control.



XI. GLOSARIO⁵

Adversidad: Tipo de daño que se puede clasificar de acuerdo al efecto que han tenido los organismos genéticamente modificado en el ambiente (Wegier y Alavez, 2012).

Caso por caso - Se refiere a un enfoque de evaluación del riesgo, en donde para cada una de las liberaciones de organismos vivos modificados se considera el medio en el que se produce su liberación y su uso previsto.

Consecuencia (del efecto adverso) – Se refiere al resultado, alcance y severidad de un efecto adverso asociado a una exposición a un organismo vivo modificado, su manipulación y uso, o a sus productos.

Efectos acumulativos – Consecuencias que se presentan debido a la introducción de uno o más organismos vivos modificados en su medio receptor.

Efectos combinatorios – Consecuencias que se dan a partir de la interacción entre dos o más genes insertados en un organismo, que incluyen interacciones epistáticas.

Efectos no previstos – Efectos que no fueron contemplados en los análisis de riesgo y que se presentan después de la liberación de los organismos vivos modificados al ambiente receptor. Aparecen en adición a, o en algunos casos en lugar de, los efectos previstos. Algunos efectos no previstos pueden pronosticarse, otros no.

Evaluación del riesgo – Es el proceso mediante el cual se calculan los de calcular riesgos que podrían estar asociados a un organismo vivo modificado. Esta evaluación debe de considerar los efectos adversos, la probabilidad de ocurrencia y sus consecuencias.

Flujo génico –Transferencia de material genético de un organismo a otro por medio de la descendencia o del desplazamiento de los organismos de un medio a otro.

Meta de protección –Resultados definidos y valorados desde el punto de vista ambiental que guían la formulación de estrategias para la gestión de actividades que podrían afectar el ambiente.

⁵ Las definiciones fueron adaptadas de la Guía Explicativa del Protocolo de Cartagena sobre la Seguridad de la Biotecnología (UICN, 2004).

Organismo Blanco (OB)- Organismos que pretenden verse afectados al ingerir las proteínas recombinantes Cry. Por lo general son plagas de algún cultivo.

Organismo no blanco (ONB)- Son todos aquellos organismos sobre los que no se espera que las proteínas Cry tengan algún efecto.

Permanencia- Se refiere al tiempo en el que un efecto no adverso causado por algún tipo de acción humana sobre el ambiente, se puede revertir. Para efecto del dictamen es necesario que se clarifique de qué tipo de acciones dependerá la reversibilidad del daño (Wegier y Alavez, 2012).

Probabilidad (del efecto adverso) – Probabilidad de que se produzca el efecto adverso, considerando el nivel y tipo de exposición del organismo vivo modificado en el probable medio receptor.

Riesgo – La combinación de la magnitud de las consecuencias de un peligro y de la probabilidad de que éstas se den de manera directa o indirecta en el ambiente.

Significancia- Es el efecto relacionando con los niveles ecológicos en donde ha tenido impacto la actividad humana a evaluar en los análisis de riesgo. La significancia de un efecto puede agravarse con el hecho de afectar a especies y/o las áreas protegidas legalmente (Wegier y Alavez, 2012).

Transgén – Secuencia de ácido nucleico en un organismo vivo modificado que es el resultado de la aplicación de la biotecnología moderna.