



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA  
Biología Evolutiva

**Análisis de las modificaciones causadas por el proceso de domesticación en  
la relación hormigas (Formicidae) y *Gossypium hirsutum* L. en México.**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**Biól. Valeria Vázquez Barrios**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:**

Dra. Ana Laura Wegier Briuolo  
Jardín Botánico-Instituto de Biología, UNAM.

**COMITÉ TUTOR:**

Dra. Karina Boege Pare  
Instituto de Ecología, UNAM.

Dr. Martin Heil  
CINVESTAV Irapuato, IPN.

**CDMX. ENERO 2020**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA  
Biología Evolutiva

**Análisis de las modificaciones causadas por el proceso de domesticación en  
la relación hormigas (Formicidae) y *Gossypium hirsutum* L. en México.**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**Biól. Valeria Vázquez Barrios**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:**

Dra. Ana Laura Wegier Briuolo  
Jardín Botánico-Instituto de Biología, UNAM.

**COMITÉ TUTOR:**

Dra. Karina Boege Pare  
Instituto de Ecología, UNAM.

Dr. Martin Heil  
CINVESTAV Irapuato, IPN.

**MÉXICO, CDMX. NOVIEMBRE 2019**

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

OFICIO CPCB/1271/2019

ASUNTO: Oficio de Jurado

**M. en C. Ivonne Ramírez Wence**  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité por Campo de Conocimiento de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas, Biología Evolutiva y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 4 de noviembre de 2019, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **BIOLOGÍA EVOLUTIVA** de la alumna **VÁZQUEZ BARRIOS VALERIA** con número de cuenta **309338332** con la tesis titulada "**Análisis de las modificaciones causadas por el proceso de domesticación en la relación hormigas (formicidae) y *Gossypium hirsutum* L. en México**", realizada bajo la dirección de la **DRA. ANA LAURA WEGIER BRIUOLO**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. DANIEL IGNACIO PIÑERO DALMAU  
Vocal: DR. JOHNATTAN HERNÁNDEZ CUMPLIDO  
Secretario: DRA. KARINA BOEGE PARE  
Suplente: DR. RENÉ CERRITOS FLORES  
Suplente: DRA. ROCÍO SANTOS GALLY

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 22 de noviembre de 2019.

COORDINADOR DEL PROGRAMA



**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**



c. c. p. Expediente del alumno

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
UNIDAD DE POSGRADO

Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria  
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX

Tel. (+5255)5623 7002 <http://pcbiol.posgrado.unam.mx/>

## **Agradecimientos institucionales**

A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme sus puertas para mi formación profesional.

Al posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por la formación académica y apoyo recibido durante este proceso.

A CONACyT por otorgarme la beca que me permitió realizar estos estudios (núm. 477713).

Agradezco el financiamiento de la Comisión Nacional para el Uso y Conocimiento de la Biodiversidad (CONABIO) y a la Dirección General del Sector Primario y Recursos Naturales Renovables de la SEMARNAT, en el marco del proyecto “Programa para la conservación de las poblaciones silvestres del género *Gossypium* en México: Generación de elementos faltantes para la determinación de los centros de origen y diversidad genética”.

Al financiamiento otorgado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigaciones e Innovación Tecnológica (PAPIIT) para el proyecto “Análisis de la evolución adaptativa en hexápodos que interaccionan con plantas con transgenes del complejo silvestre-domesticado de algodón” con número IN214719.

Al Programa de Apoyo a los Estudiantes de Posgrado (PAEP) que me apoyo económicamente para presentar mi investigación en congresos internacionales (ESA, 2018 y Evolution, 2019) y poder asistir al curso modular “Domesticación, manejo y conservación *in-situ* de recursos genéticos” en la Universidad Nacional Agraria la Molina, Lima, Perú.

A mi tutora la Dra. Ana Wegier y a mi comité tutor integrado por la Dra. Karina Boege y el Dr. Martin Heil por ser la guía durante este proceso.

## **Agradecimientos a título personal**

Extiendo mis agradecimientos a la UNAM y al programa de Posgrado en Ciencias Biológicas por abrirme sus puertas y cada una de las oportunidades que brindan, las cuales han contribuido en mi formación profesional.

A mi tutora la Dra. Ana Wegier por ser una gran guía en este camino, por siempre confiar en mi y fortalecer el que yo confiara en mí. Gracias Ana por todo tu apoyo y por la amistad que me has brindado que al par de lo profesional me han hecho crecer en lo personal. Y gracias por creer en el proyecto que hemos construido el cual desde un inicio fue ambicioso y no importando los retos que se presentaron sigue siendo ambicioso y un gran reto.

A Johnattan, gracias por ser más que un guía académico un amigo, agradezco infinitamente todo el apoyo que me diste en todo momento, no importando hora o día. Pero, sobre todo, gracias por impulsarme a ir más allá y retarme cada día. Igualmente agradezco los regañones que hubo en su momento, porque esos también me hicieron crecer. Extiendo mis agradecimientos a tus pequeños por abrirme su laboratorio y compartir un poco.

A mi jurado la Dra. Kariana, Dr. Daniel, Dr. René, Dra. Rocío y Dr. Johnattan por sus valiosos comentarios que enriquecieron este trabajo.

A la Dra. Patricia, gracias por recibirme en su laboratorio y compartir su conocimiento sobre la biología, taxonomía y ecología de las hormigas el cual fue clave para mi trabajo.

A Rosa Adame del Cinvestav Irapuato, gracias infinitas por todo el apoyo y asesoría que me brindaste en la parte técnica y experimental de mi trabajo y por todas las veces que me salvaste con tu conocimiento.

A Rosalina, Gerardo y Rodrigo por ser la familia de la que estoy completamente orgullosa de pertenecer, gracias por todo su apoyo, por siempre estar presentes y apoyar cada uno de los objetivos que me planteo y por enseñarme que todo es posible mientras se haga con empeño, cariño y empatía.

A mi abuelito Luis por seguir siendo mi ejemplo de amor, trabajo y constancia. Por tu tiempo y pláticas que sin dudar enriquecieron este trabajo, quizás no desde lo académico, pero sí desde el conocimiento y pasión nata que posees y que me transmites.

A Tania, sabes lo mucho que te admiro y quiero y agradezco muchísimo el que hayas sido mi profesora en este periodo, agradezco todas tus enseñanzas en el laboratorio, que me compartieras tu pasión y dedicación a la biología molecular y sobre todo que me hicieras perder el miedo a cada uno de los instrumentos y aparatos del lab. Pero agradezco aún más la paciencia que me tuviste. Y de lo mejor me llevo de todo este chistecito son las risas, pláticas de vida y más que compartimos en los maratones de extracciones y PCR's y obviamente las pláticas de carácter ejecutivo en tu oficina el REY. Te quiero y sigamos construyendo buenos momentos y logros.

A mi equipo de campo, sin su apoyo y soporte no lo hubiera logrado y sobre todo por aguantar como guerreros las horas de sol, por el momento sé que vitamina D no les faltará. Y gracias por cada momento compartido, por cada sándwich de nutella remojado y por el atuncito en lata, gracias Serch, Pam, Euni, Javs, Ari y Ana.

Gracias a todos mis compañeros del laboratorio Genética de la Conservación que hicieron de mi estancia en la maestría un momento feliz, gracias Denise, Pam, Tania, Santi, Jorge, Euni, Amana, César, Mel, Oli, Duhya, Rodrigo, Gaby, Javs y Cris.

A Horacio, Amanda y Carolina por seguir permitiéndome caminar y crecer a su lado, los amo mucho.

A Difi y Otilia por su compañía y amor en cada momento de estrés.

A ti, por ser quien me movió por completo la realidad en el último año, por hacerme dudar en querer regresar a lo ya establecido y seguro, por hacerme ver que en sí nada era seguro ni tan controlado como lo contemplaba y por todas las palabras y apoyo para continuar y lograr acabar. Finalmente, por retarme a desafiar la distancia, por romper mi rutina y por ser quien aportó la parte dinámica en esta historia y ser el que me hizo sentir, disfrutar y compartir más de lo que vas a leer acá, gracias Rafa.



# Índice

Resumen.....	10
Abstract.....	11
Introducción .....	12
Método.....	18
Sistema de estudio.....	18
Sitio de estudio .....	19
Reserva Nacional de la Biosfera Ría Lagartos .....	19
Diseño experimental .....	20
Monitoreo de transgenes .....	20
Experimento 1. Efecto de la aplicación exógena de jasmonato de metilo sobre la producción de néctar extrafloral en <i>Gossypium hirsutum</i> . .....	23
Experimento 2: Efecto de la inducción de JaMe sobre riqueza, abundancia y composición de hormigas.....	24
Daño por herbivoría .....	25
Análisis de datos .....	26
Resultados .....	28
Efecto del tratamiento de inducción con JaMe sobre la producción de néctar extrafloral de algodón silvestre con y sin transgenes.....	28
Efecto de la inducción con JaMe sobre la abundancia, riqueza y composición de hormigas asociadas a algodón silvestre con y sin transgenes .....	29
Daño por herbivoría en plantas silvestres con y sin transgenes.....	34
Discusión y conclusiones .....	35
La expresión de los transgenes <i>cry</i> y <i>cp4-epsps</i> modifican la producción de néctar extrafloral (defensa inducida) en algodón silvestre.....	35
Contrario a la teoría, el efecto neutro en algodón silvestre GM no existe en la Duna Costera de la Península de Yucatán .....	37
Algodón silvestre con <i>cp4-epsps</i> .....	37
Algodón silvestre con <i>cry</i> .....	39
Figura resumen .....	44
Referencias bibliográficas .....	46

## **Figuras y tablas**

### **Figuras**

1. Mapa de las metapoblaciones de algodón silvestre en México
2. Primera etapa del diseño experimental: Monitoreo
3. Segunda etapa del diseño experimental: Experimentación
4. Efecto del tratamiento de inducción por JaMe en la producción de néctar extrafloral
5. Composición de hormigas asociadas a *Gossypium hirsutum*
6. Efecto del tratamiento de inducción sobre la abundancia de hormigas
7. Daño real por herbivoría
8. Figura resumen

### **Tablas**

1. Cebadores.
2. Frecuencia de transgenes en la Reserva de la Biosfera de Ría Lagartos
3. Composición y abundancia de hormigas asociadas a *Gossypium hirsutum*

## Resumen

Después de dos décadas utilizando cultivos transgénicos se ha documentado que existe flujo de genes e hibridación entre organismos genéticamente modificados (OGMs) y sus parientes silvestres. Los organismos genéticamente modificados que viven libremente en condiciones naturales en los ecosistemas representan un fenómeno nunca observado, y que resulta indispensable comenzar a explorar y analizar los posibles efectos eco-evolutivos que pueden presentar. En este trabajo evaluamos los cambios genéticos, fisiológicos y ecológicos que presenta dentro de su centro de origen el algodón silvestre (*Gossypium hirsutum*). Con un diseño experimental bajo condiciones naturales evaluamos a tres grupos de plantas silvestres de algodón con genotipos distintos, dos grupos expresan los transgenes *cry* y *cp4-epsps* y el tercero plantas silvestres sin transgenes, así como la su interacción mutualista de defensa con las hormigas. Se registró que la expresión de los genotipos silvestres con el transgén *cry* y silvestres con el transgén *cp4-epsps* en condiciones naturales modifican su producción de néctar extrafloral y, como consecuencia, las asociaciones mutualistas de defensa con diferentes especies de hormigas, favoreciendo la dominancia de la especie generalista *Camponotus planatus* en plantas con *cry* y la presencia de especies exóticas e invasoras *Monomorium ebeninum* y *Paratrechina longicornis* en plantas *cp4-epsps* y silvestres. El daño foliar por herbivoría fue también contrastante entre las plantas transgénicas. Nuestros resultados muestran cambios por la presencia de nuevos genes a diferentes escalas (i.e. genética, individual y comunitaria). Con lo anterior abrimos múltiples posibilidades de estudio, que nos permitirán comprender e integrar la información dispersa sobre el comportamiento y los mecanismos que promueven la sobrevivencia de los híbridos transgénicos de algodón en las poblaciones silvestres. Este conocimiento, además, permitiría implementar metodologías adecuadas para la evaluar los daños ambientales ocasionados por la presencia de transgenes y poder contribuir en el diseño de la conservación *in-situ* del conjunto genético primario de esta especie.

## Abstract

After two decades using transgenic crops it has been found that gene flow and hybridization between genetically modified organisms and their wild relatives occurs. Genetically modified organisms that currently live freely under natural conditions in natural ecosystems represent something that has never been observed before, and it is imperative to start exploring them by using integrative methodologies. Here, we carried out a bi-factorial experiment based on tri-trophic interactions (cotton plants-herbivores-ants), allowed us a better understanding of the genetical, physiological and ecological changes in wild plants of *Gossypium hirsutum* with *cry* and *cp4-epsps* transgenes in the cotton center of origin. We found that the expression of both Wild with *cry* and Wild with *cp4-epsps* genes present in wild cotton under natural conditions altered extrafloral nectar production, and as a consequence the defensive association with different ant species, favoring the dominance of the generalist species *Camponotus planatus* in *cry* plants and the presence of exotic and invasive ants *Monomorium ebeninum* and *Paratrechina longicornis* in *cp4-epsps* and wild plants. The levels of herbivore damage were also contrasting between transgenic plants. Our results show changes at different scales (i.e. genetic, individual and at a community level) under a natural ecological system due to the presence of new genes, which opens up infinite possibilities of study to generate new questions, integrating dispersed information. It can also facilitate the implementation of appropriate methodologies for risk assessment caused by the presence of transgenes and contribute to the *in-situ* conservation of the primary genetic pool of the species.

## Introducción

Una de las mayores preocupaciones desde la implementación de cultivos transgénicos fue la posibilidad de que existiera flujo génico entre los cultivos genéticamente modificados (GM) y sus parientes silvestres (Ellstrand, Prentice, y Hancock, 1999). A la fecha se tiene registro de este hecho, casos concretos son: el arroz (*Oryza sativa*), el girasol (*Helianthus annuus*) y el algodón (*Gossypium hirsutum*), así como con variedades nativas de papaya (*Carica papaya*) (Brocke, 2012; Manshardt, Bishaw, Pitz, y Stewart, 2016; Snow et al., 2003; Wegier et al., 2011; X. Yang et al., 2017). Aún con estos registros, se tiene poca evidencia de las consecuencias eco-evolutivas de la introgresión de nuevos rasgos dada por la expresión de los transgenes en las poblaciones naturales (Ellstrand, 2018). Aún sin tener información certera sobre el riesgo ambiental que puede generar la liberación de estos organismos, las innovaciones e investigaciones agrobiotecnologías presentan un rápido avance con el único objetivo de aplicar la información generada en la mejora de los paquetes tecnológicos (Elmore et al., 2001; Halpin, 2005; Zhao et al., 2003), sin considerar los efectos que el fenómeno de introgresión puedan tener en variedades silvestres.

Los paquetes tecnológicos para cultivos anuales se han desarrollado bajo los siguientes objetivos: 1) incrementar el rendimiento de los cultivos; 2) reducir el uso de insecticidas, herbicidas y fertilizantes; 3) generar resistencia a insectos plaga (cultivos *Bt*, principalmente) y 4) generar tolerancia a herbicidas. En particular, los genes que se han insertado para generar resistencia a plagas (i.e. larvas de lepidóptero), son los *cry*, los cuales provienen de la bacteria del suelo grampositiva *Bacillus thuringiensis* que codifican la toxina Cry. El mecanismo de acción de esta toxina es producir cristales  $\delta$ -endotoxinas en el intestino de los insectos blanco (e.g. larvas de lepidópteros) causando una parálisis total que finaliza con la muerte del insecto (Wu et al., 2009). Por otro lado, el gen que confiere resistencia al herbicida mayormente utilizado a nivel mundial, el glifosato, es el *cp4-epsps* aislado de la bacteria del suelo *Agrobacterium* sp. cepa CP4, que codifica la enzima EPSPS (3-enolpiruvylshikimate 5-fosfato sintasa). Las plantas tolerantes a glifosato poseen copias adicionales de la enzima EPSPS similares a las que produce la planta de

forma endógena, esta sobreexpresión confiere tolerancia a las dosis de glifosato recomendadas por la agroindustria. Cabe mencionar que la enzima EPSPS participa activamente de forma endógena en la síntesis de aminoácidos esenciales para el crecimiento, reproducción y defensa de la planta (triptófano, fenilalanina y tirosina) mediante la ruta de shikimato, por lo que hace tolerante a las plantas y no afecta los procesos la síntesis natural de estas moléculas (Costa, et al., 2007; Maeda y Dudareva, 2012).

Desde antes de las primeras liberaciones de los cultivos modificados genéticamente ha existido un gran debate con respecto a los transgénicos entre disciplinas como el manejo integrado de plagas (MIP), el fitomejoramiento y la genética de la conservación, respecto a los posibles efectos en insectos y plantas no blanco, así como en rasgos morfológicos y fisiológicos que no son objetivo de estas tecnologías. Resultado de estos debates, existen una gran variedad de investigaciones con conclusiones contrapuestas e individuales (Elmore et al., 2001; Halpin, 2005; Kolseth et al., 2015; Zhao et al., 2003).

Para la tecnología *Bt* se han registrado efectos negativos directos sobre la adecuación o rendimiento de insectos del tercer nivel trófico. En insectos, depredadores y parasitoides, se ha documentado un incremento en los estadios larvales y en la tasa de mortalidad de su progenie, así como consecuencias en las interacciones ecológicas que mantienen al presentar un decremento en la tasa de parasitismo y la presencia de la toxina después de ser alimentados con herbívoros que consumieron plantas GM (Hilbeck, 2001; Liuet al., 2005; Schmidt et al.2009; Zhang et al., 2011).

Por otro lado, en plantas de arroz y soya tolerantes a glifosato (con el transgén *cp4-epsps*) expuestas a dosis recomendadas del herbicida, se documentó un incremento significativo en su crecimiento, fecundidad, tasa fotosintética y producción de semillas (Erb, 2018; Strapasson, Pinto-Zevallos, y Zarbin, 2016). Y cuando se comparó maíz tolerante a glifosato con su línea isogénica se registró un incremento en la producción de compuestos orgánicos volátiles (VOC) (defensa inducida), así como un cambio de la

identidad de los mismos, lo que genera cambios en la atracción y abundancia de enemigos naturales de los herbívoros y polinizadores en las plantas GM (Holopainen y Gershenzon, 2010; Strapasson et al., 2016). De la misma forma, al evaluar el rendimiento entre soya GM y su línea isogénica en ausencia de glifosato, se encontró que los GM tuvieron una mayor producción (Owen et al., 2010). La modificación en la fecundidad en plantas con *cp4-epsps*, no sólo ha sido demostrada en especies domesticadas, estos mismos efectos se documentaron en la planta modelo *Arabidopsis*, al comparar la variedad transformada con este gen y el control (Fang et al., 2018)

De la misma forma que se han reportado estos cambios en cultivos, Snow y colaboradores (2003) registraron resultados similares en híbridos transgénicos de girasol (*H. annuus* L.) *Bt* creciendo en poblaciones silvestres en Arizona (EUA), estos incrementaron su producción de semillas en un 55% al reducir el daño por lepidópteros en comparación con los girasoles silvestres sin transgenes. Además, observaron bajo condiciones de invernadero el mismo fenómeno, donde las plantas transgénicas produjeron por planta 14% más semillas que las plantas control.

Los resultados presentados anteriormente evidencian modificaciones fenotípicas inesperadas por la presencia de transgenes en poblaciones naturales, mostrando cambios que están íntimamente ligados con la adecuación de las plantas (Hernández-Terán et al., 2019a), a su fisiología y con sus interacciones bióticas e inclusive en procesos evolutivos (Filipecki y Malepszy, 2006). Con excepción del trabajo de Snow et al. (2003), los demás estudios se han realizado bajo condiciones controladas (i.e. laboratorio, invernadero o en plantaciones experimentales) siempre con objetivos dirigidos a documentar la función del gen respecto al rendimiento de la planta, sin contemplar factores con los que la planta interactúa en sistemas abiertos, es decir, las interacciones bióticas y abióticas (Chen et al., 2017; Fang et al., 2018; Velázquez-López et al., 2018). Ignorar los factores de control ambiental y ecológico impiden poder extrapolar los resultados de dichos estudios a lo que potencialmente podría ocurrir bajo condiciones naturales (Ellstrand, 2018; Hernández-Terán et al., 2019b; Snow et al., 2003).

Por lo tanto, para generar información certera sobre las consecuencias eco-evolutivas de la presencia de transgenes en poblaciones silvestres se requiere el uso de metodologías experimentales dentro de un contexto ecológico complejo, que integren más allá de aspectos genéticos (i.e. monitoreo y función del gen insertado por ingeniería genética), aspectos ecológicos, evolutivos y ambientales, además de focalizar los estudios en los centros de origen y diversidad de estas especies, puesto que los híbridos transgénicos ya están establecidos y bajo selección, como es el caso del algodón en México, el arroz en China y el girasol en Estados Unidos (Snow et al., 2003; A. Wegier et al., 2011; B. Zhang et al., 2011).

Una aproximación ideal para el estudio de los efectos de los transgenes bajo condiciones naturales y que proponemos son las interacciones bióticas, puesto que han sido reconocidas como motores en la evolución de las especies, así como de la estructura y función del ecosistema (de Vries et al., 2012; Heijden et al., 2008).

Un sistema tritrófico integra a las plantas, insectos herbívoros y sus depredadores, y nos permite evaluar aspectos de su fisiología, ecología y de comportamiento, ya que se rigen por la interacción entre los diferentes niveles tróficos (Poppy, 1997). Un tipo en específico de un sistema tritrófico, son las defensas indirectas, en las cuales las plantas interactúan con el tercer nivel trófico, enemigos naturales de los herbívoros, para obtener protección ante el segundo nivel, los herbívoros y patógenos (Heil, 2007; Kessler y Heil 2011). El mecanismo por el cual las plantas obtienen esta protección es mediante la atracción de los enemigos naturales por recompensas, es decir, ofreciendo información al tercer nivel sobre la ubicación de sus presas por la emisión de compuestos orgánicos volátiles (VOCs), o bien, ofreciendo compuestos nutritivos, como el néctar extrafloral (NEF) o cuerpos alimenticios (cuerpo beltianos), los cuales se inducen en respuesta al daño por herbívoros (Kessler y Heil, 2011).

La mirmecofilia es la relación mutualista obligada o facultativa que tienen las plantas con las hormigas, en la cual las hormigas son atraídas por las recompensas alimenticias o refugio (domacios) que brinda la planta generando un importante



mecanismo indirecto de defensa a la misma (Diaz-Castelazo, et al., 2004; Oliveira, et al., 1999). Las investigaciones que se han realizado respecto a esta interacción son las que están mediadas por el NEF como recompensa y que se caracterizan por ser en su mayoría facultativas. Además de ser registrada en especies filogenéticamente separadas (Heil et al., 2004), se ha demostrado que la atracción y la presencia de hormigas en especies como el frijol lima (Hernandez-Cumplido et al., 2010 y 2016), el agodón *Gossypium thurberi* (Rudgers, Strauss, y Wendel, 2004), *Macaranga bancana* (Heil et al., 2001) y algunas de los géneros *Tachigali* (Fonseca, 1994) y *Leonardoxa* (Gaume et al., 1997) genera un decremento en el daño por herbívoros, lo que se refleja en un incremento en la producción de frutos y semillas. Así mismo, para las hormigas el consumo de NEF incrementa la densidad y salud de sus colonias (Heil y McKey, 2003).

Con base en lo anterior y conociendo que existe gran incertidumbre sobre el comportamiento de los organismos silvestres introgresados y que sobreviven en condiciones naturales bajo un conjunto de desafíos ecológicos complejos, el algodón mesoamericano *Gossypium hirsutum* L. es un excelente modelo de estudio en el cual se puede implementar una metodología integradora y experimental con base en la asociación de hormigas y algodón mediante el NEF. Partiendo de que México es el centro de origen, diversidad y domesticación de esta especie y sabiendo que en el país se encuentra el complejo silvestre-domesticado de la especie (Wegier, 2013). Además, Wegier y colaboradores (2011) mostraron introgresión de plantas silvestres con sus pares transgénicos en cuatro de las ocho metapoblaciones descritas en el país. Las metapoblaciones fueron definidas por la estructura genética, geográfica y ecológica encontrada en la investigación realizada entre 2004 y 2008.

Así mismo, el algodón *Gossypium hirsutum* presenta nectarios extraflorales en la vena media de las hojas y en las brácteas (Bentley, 1977; Wäckers y Bonifay, 2004). La secreción de néctar foliar se produce principalmente después del daño por herbívoros, por lo que se considera una defensa inducida y se asocia como recompensa para hormigas y en menor proporción para avispas parasitoides que brindan protección contra herbívoros (Cuautle y Rico-Gray, 2003; Oliveira et al., 1999). Además se ha observado que

no se requiere de un elicitador específico en la inducción de esta respuesta, es decir que el daño mecánico y la aplicación exógena de fitohormonas como el ácido jasmónico (AJ) y jasmonato de metilo (JaMe) también inducen esta recompensa (Wäckers y Wunderlin, 1999; Williams et al., 2017)

El propósito de este estudio es contribuir en el entendimiento de los mecanismos que están permitiendo el establecimiento de los transgenes *cry1Ac*, *cry2Ab* y *cp4-epsps* en la metapoblación silvestres de *Gossypium hirsutum* L. de la Península de Yucatán, además de comprender las consecuencias ecológicas de la expresión de estos transgenes en ausencia de plagas y glifosato como agentes de selección. Esta información podría resultar útil para la conservación *in-situ* del pool genético primario de la especie y para futuros procesos de domesticación. Para esto, centramos la investigación en un sistema tritrófico (algodón-herbívoros-hormigas). Se evaluó la interacción de plantas de algodón con y sin transgenes con hormigas mediada por NEF creciendo naturalmente en la Reserva de la Biosfera de Ría Lagartos, Yucatán, con los siguientes objetivos particulares: 1) cuantificar la respuesta de la aplicación exógena de jasmonato de metilo en la producción de néctar extrafloral, 2) evaluar el daño por herbívoros y 3) caracterizar a la comunidad de hormigas asociadas en términos de riqueza, abundancia y composición.

## Método

### Sistema de estudio

*Gossypium hirsutum* L. es la especie de algodón con centro de origen, diversidad genética y domesticación en Mesoamérica. Con bases genéticas, moleculares y ecológicas, se han caracterizado ocho metapoblaciones de plantas silvestres distribuidas en dunas costeras y selvas bajas del Pacífico, Golfo de México, Mar de Cortés y en la Península de Yucatán con bases genéticas, moleculares y ecológicas (Wegier et al., 2011). También, se ha descrito en México el complejo silvestre-domesticado para la especie, el cual incluye poblaciones silvestres, variedades nativas, variedades cultivadas mejoradas y variedades genéticamente modificadas (GM), además de plantas escapadas de cultivo (ferales o también llamadas cimarronas) o usadas como ornamentales (Mendoza et al., 2016; Ulloa et al., 2005). Las variedades GM están sembradas desde 1996 en el norte del país con tres modificaciones o características principales: 1) resistencia al ataque de larvas de lepidópteros o insectos plaga (*cry1Ab/Ac*, *cry2Ac*, *Cry1F* y *vip3A*); 2) tolerancia a herbicidas (*cp4 epsps (aroA:CP4)*, *2mepsps pat/bar*, *aad-12*, *dmo*) y 3) resistencia a antibióticos (*ntpII*, *aad-12*, *aad*, *aph4 (hpt)*) (Coronado Blanco y Zaldívar Riverón, 2014; ISAAA, 2017; Traxler y Godoy-Avila, 2004).

Con el objetivo de conservar la diversidad genética de las metapoblaciones silvestres de *Gossypium hirsutum* en México, como una medida de bioseguridad para impedir el flujo génico entre poblaciones silvestres y plantas domesticadas, la siembra de variedades GM se restringió al norte del país, donde no se conocían poblaciones cercanas. Sin embargo, entre 2004 y 2008 se detectó introgresión con individuos GM en la mitad de las metapoblaciones silvestres (Pacífico Norte, Pacífico Sur, Golfo Norte y Golfo Sur) (Wegier et al., 2011) (Fig. 1).

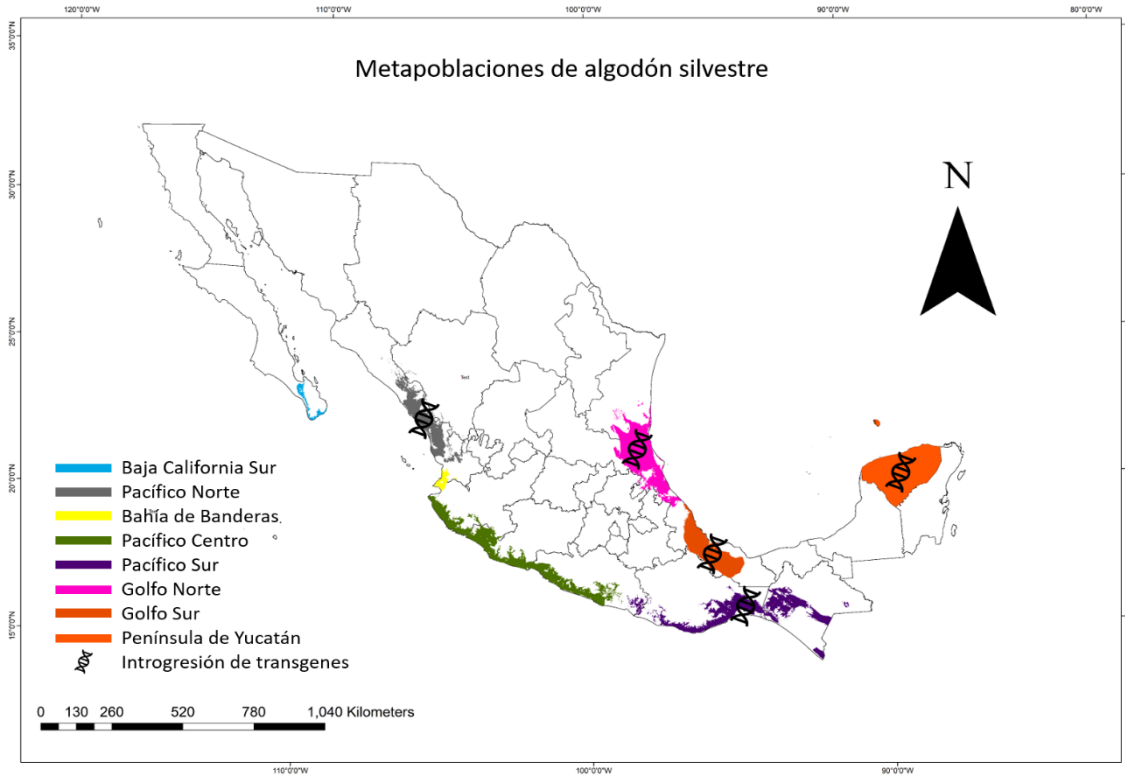


Figura 1. Metapoblaciones de algodón silvestre. La doble hélice de color negro en Pacífico Norte (gris), Golfo norte (rosa); Golfo sur (anaranjado fuerte) y Pacífico sur (morado) representa la presencia de transgenes con resistencia a insectos (*cry*) y tolerancia a glifosato (*cp4-epsps*) registrados en 2011 y el primer reporte para Península de Yucatán (anaranjado).

## Sitio de estudio

### Reserva Nacional de la Biosfera Ría Lagartos

Ría Lagartos se localiza en el estado de Yucatán al nordeste de la Península, al norte limita con el Golfo de México, al sur con los municipios de Tizimin, Río Lagartos y San Felipe y al este con el estado de Quintana Roo (20°27'0"N,90°13'12"W). La zona protegida comprende una superficie de 60, 348 ha (Andrews et al., 1998). La reserva presenta dos tipos de climas, el más seco de los áridos (BSo(h')w(x')iw'') con temperatura media anual mayor de 22°C en la región de Río Lagartos y el más seco de los cálidos húmedos (Ax'(wo)iw'') con lluvias durante todo el año y con temperatura media anual mayor a 22 °C en la región El Cuyo. Se caracteriza por poseer una alta diversidad de ambientes como

manglar, selva media subperennifolia, selva baja caducifolia, vegetación de dunas costeras, perenes y sabana representada por pastizal y carrizal (INE, 1999; Fraga, 2006).

## Diseño experimental

### Monitoreo de transgenes

En marzo de 2018 se recolectó tejido foliar de 69 plantas (seis hojas por planta) en la Reserva Nacional de la Biosfera de Ría Lagartos (RL). La elección del sitio se hizo con base en la presencia de introgresión de genes con resistencia a larvas de lepidópteros (*cry1Ac* y *cry2Ab*) y con resistencia al herbicida glifosato (*cp4-epsps*), por la gran abundancia de plantas (> 10 plantas en 3m<sup>2</sup>) y finalmente por tratarse de una zona protegida, lo cual garantizaba encontrar con vida a las plantas en las diferentes etapas del estudio (monitoreo y experimentación).

Todas las plantas fueron marcadas con una ficha de referencia y georreferenciadas con la finalidad de reconocerlas en la etapa de experimentación. El tejido foliar recolectado se conservó de forma individual en bolsas de papel estraza identificadas con el número de identidad de la planta y estas fueron almacenadas en bolsas Ziploc® con silica gel para desecar y conservar las muestras (Fig. 2A). La extracción de ADN y la detección de transgenes por PCR punto final se realizó en el Laboratorio Nacional de Biodiversidad (LaNaBio) del departamento de Botánica del Instituto de Biología, UNAM (Fig. 2B). La extracción de ADN genómico se realizó siguiendo el protocolo CTAB modificado de Doyle y Doyle (1987). Posterior a la extracción, se cuantificó la calidad y la concentración de ADN en un Qubit® 3.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos). Para amplificar los genes *cry1Ac*, *cry2Ab* y *cp4-epsps* se usaron los siguientes cebadores *cry1Ac* (F:5'GACCGCTTACAAGGAGGGATACG3', R:5'ACGGAGGCATAGTCAGCAGGACC 3') obteniendo un amplicón de 228 pb (Randhawa y Chhabra, 2013); *cry2Ab* (F:5'CAGCGGCGCCAACCTCTACG3', R:5'TGAACGGCGATGCACCAATGTC3') con amplicón de 260 pb (Randhawa et al., 2010), y

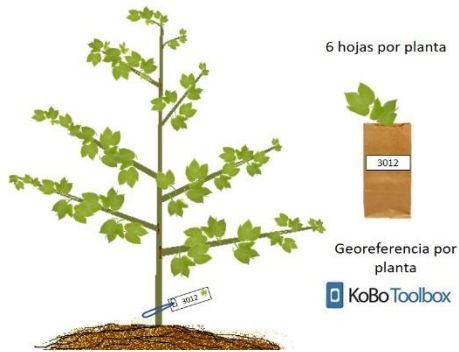
*cp4-epsps* (F:5'GCATGCTTCACGGTGCAA3', R:5'TGAAGGACCGGTGGGAGAT3') con amplicón de 108 pb (Barbau-Piednoir et al., 2012) (Eurofins Scientific®, Bruselas, Bélgica). La amplificación por PCR se llevó a cabo en un termociclador Applied Biosystem™ 2720 (Thermo Fisher Scientific®, Massachusetts, Estados Unidos) para 207 muestras (69 por transgén). Cada reacción fue compuesta por: Buffer 5x, 25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 100 mM de dNTPs, 10 µM de cebador (F y R), una unidad de taq polimerasa (GoTaq® Flexi de Promega) y 5 µL de ADN genómico a una concentración de 70 ng/µL. El volumen final de cada reacción fue de 25 µL. Las condiciones de reacción para los tres transgenes fueron las siguientes: 95 °C por 8 minutos (desnaturalización inicial), 30 ciclos a 95 °C de 20 segundos (desnaturalización), 60 °C por un minuto (alineamiento), 72 °C por un minuto (extensión) y una extensión final de 72 °C por 8 minutos. Como control positivo se utilizó ADN de una planta silvestre que presenta los tres transgenes de interés. Finalmente, los productos de PCR amplificados se observaron en geles de agarosa al 2% con buffer TBE 1x y teñidos con GelRed® (Biotium, Frmont California) en una cámara de electroforesis Easy Cast™ B1 (ThermoFisher Scientific®, Massachusetts, Estados Unidos). La visualización de los amplicones se realizó en un fotodocumentador MultiDoc-IT™ (UVP, California, Estados Unidos).

Hacer el monitorio de 69 plantas nos aseguró contar con las 21 plantas necesarias para montar los experimentos, ya que para el estudio se necesitaban 14 plantas transgénicas, siete que expresaran el gen *cry* y siete que expresaran el gen *cp4-epsps*, y el tercer grupo fue el control, es decir plantas sin transgenes.

# PRIMERA ETAPA: Monitoreo

## A Monitoreo de transgenes

Marzo 2018  
Reserva de la Biosfera de Ría Lagartos,  
Yucatán, México



## B Detección de transgenes

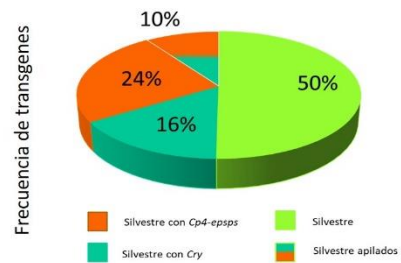


Figura 2. Primera etapa del diseño experimental: Monitoreo. A) Monitoreo de transgenes en la Reserva de la Biosfera de Ría Lagartos. Identificación con etiqueta y georeferencia de 69 plantas de algodón y colecta de 6 hojas por planta. B) detección de transgenes por PCR punto final y frecuencia de transgenes.

## Experimentación

Experimento 1. Efecto de la aplicación exógena de jasmonato de metilo sobre la producción de néctar extrafloral en *Gossypium hirsutum*.

Para llevar a cabo la fase experimental se hicieron pruebas preliminares bajo condiciones controladas y en ambiente seminatural, el invernadero del Jardín Botánico del Instituto de Biología, UNAM y en Tlayacapan, Morelos, respectivamente. Se evaluó a) si la aplicación exógena de la fitohormona jasmonato de metilo (JaMe) induce la producción de NEF, dado que se ha registrado que la aplicación exógena de fitohormonas como el ácido jasmónico (AJ), el jasmonato de metilo (JaMe) o el ácido salicílico (AS) es una herramienta que permite estudiar las defensas indirectas a nivel molecular, bioquímico y orgánico (Williams et al., 2017); y b) si esta respuesta se expresa de forma local o sistémica en la planta, ya que de esto último dependía el si se podía utilizar la misma planta para ambos tratamientos (inducción y control) o si tenía que ser en plantas distintas. Se registró respuesta a la inducción de NEF en ambas condiciones (invernadero y seminatural) y que esta respuesta es local.

Con los resultados del monitoreo de transgenes, en agosto de 2018 se realizó la parte experimental de este estudio. Se localizaron las 21 plantas necesarias en la RL, se dividieron en tres grupos de siete plantas en función del transgén expresado. El primer y segundo grupo corresponden a las plantas transgénicas: silvestres con *cry* (*Scry*) y silvestres con *cp4-epsps* (*Scp4-epsps*). El tercer grupo corresponde a las plantas silvestres (S), que se usó como control.

Para evaluar la respuesta a la inducción por JaMe sobre la producción de NEF, cada planta se dividió en dos secciones, una destinada al tratamiento de inducción y otro control. En cada sección se eligieron dos ramas, lo más separadas posibles una de otra, y en cada rama se utilizaron las primeras cinco hojas bien desarrolladas, por lo tanto, en cada tratamiento se evaluaron 10 hojas por planta. El tratamiento de inducción consistió en asperjar 2 mL de solución de JaMe al 450 mM a las 10 hojas experimentales, mientras que en el tratamiento control las hojas fueron asperjadas con agua destilada. Para evitar



el robo de NEF por insectos caminadores, en cada planta se colocó una barrera de 5 cm en la base de la planta y de cada rama de una resina orgánica llamada *tanglefoot* (Tangletrap®, The tanglefoot Corporation, Grand Rapids, MI) (Moreira et al., 2018). El experimento se realizó durante tres días consecutivos (18, 19 y 20 de agosto de 2018). La aspersión de JaMe se realizó a las 6:30 horas y la concentración de sólidos solubles se registró seis horas más tarde, hora del pico de producción NEF.

Se recolectó el NEF de 10 hojas (un nectario por hoja). La secreción de néctar se cuantificó como la cantidad de sólidos solubles utilizando una micropipeta de 3  $\mu$ L, la cual estaba graduada cada 1  $\mu$ L para poder hacer la medición de volumen de forma directa y la concentración del néctar se registró con un refractómetro portátil con compensación de temperatura (ATAGO, L. Kübler, Karlsruhe, Alemania). El néctar fue recolectado usando 3  $\mu$ L de agua destilada aplicándola directamente en los nectarios. Este procedimiento se repitió hasta obtener <1 % de grados Brix y el valor obtenido se sumó para obtener el valor global de NEF producido por hoja (Hernandez-Cumplido et al., 2016) (Fig. 3A).

## Experimento 2: Efecto de la inducción de JaMe sobre riqueza, abundancia y composición de hormigas

Se realizó un experimento bi-factorial con dos tratamientos en los tres grupos de plantas descritos anteriormente: a) inducción de NEF (control e inducción con JaMe) y b) atracción de hormigas. El diseño experimental para esta prueba fue el mismo que en el primer experimento, con la única diferencia de que solo se empleó una rama por tratamiento.

Las ramas empleadas para el tratamiento de inducción fueron asperjadas diariamente por cinco días con la finalidad de simular una inducción permanente, el tratamiento control se asperjó con agua destilada. La inducción se realizó a las 6:30 am y para tener un registro de la producción de néctar foliar se cuantificó seis horas después de la inducción.

Para conocer la abundancia y riqueza de hormigas se realizaron dos censos por día (10 y 16 horas) en dos días consecutivos, durante este tiempo se contabilizó el número de hormigas que patrullaron la rama, con especial atención a las visitas al nectario foliar. La elección de los horarios del censo corresponde al pico de actividad de las hormigas. Posterior al censo se recolectaron las hormigas en tubos Eppendorf de 1.5 mL con alcohol sin desnaturalizar al 70% para su posterior identificación taxonómica a nivel de especie (Fig. 3B).

#### Daño por herbivoría

Para estimar el porcentaje de herbivoría, se tomaron 20 fotografías de hojas por planta, es decir, se fotografiaron 140 hojas de cada uno de los grupos descritos anteriormente (*S*, *Scry* y *Scp4-epsps*), con una cámara Canon EOS Rebel T61 de 18 MP sin flash, con un objetivo de EOS 50 mm, colocada a una distancia de 15 cm de la hoja y con un fondo portátil blanco con escala. Esta técnica permitió hacer el análisis sin cortar la hoja. Las imágenes se guardaron en formato JPG. Finalmente se calculó el daño por herbivoría de cada grupo (*S*, *Scry* y *Scp4-epsps*) utilizando la aplicación móvil profesional BioLeaf™ versión 1.0, disponible para Android y iOS (Fig. 3C) (Machado et al., 2016).

## Análisis de datos

La concentración de néctar foliar se analizó con Modelos Lineales Generalizados con distribución Binomial Negativo (BN.GLM con la librería MASS del software R versión 3.5.0). Se eligió este modelo debido a la sobre dispersión que presentan los datos, cabe mencionar que se consideró la distribución Poisson y modelos inflados a cero, sin embargo al comparar el índice AIC el que mejor se ajustó a la dispersión de nuestros datos fue binomial negativo (Lindén y Mäntyniemi, 2011).

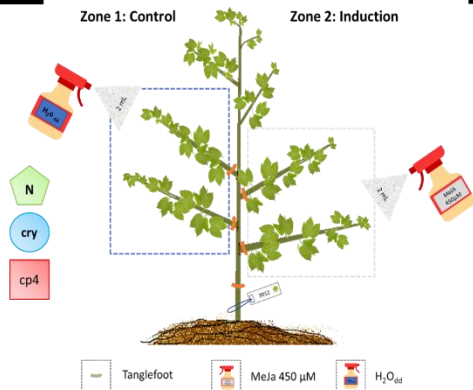
En primera instancia, el efecto del tratamiento de inducción (control vs. JaMe) y del genotipo (*S*, *Scry* y *ScP4-epsps*) se consideraron como factores fijos. Después se comparó el efecto del tratamiento, del genotipo y la fecha de medición y sus interacciones. Posteriormente se evaluó de forma individual el efecto del tratamiento y fecha en los distintos grupos de plantas en función del volumen del néctar foliar.

La abundancia de hormigas se evaluó con Modelos Lineales Generalizados (GLM) con distribución Quasipoisson (GLM con la librería *lme4* del software R versión 3.5.0). El tratamiento (control vs. JaMe) y el genotipo (*S*, *Scry* y *ScP4-epsps*) se consideraron como factores fijos. La riqueza y la composición se expresaron como el total de especies y el conjunto de ellas por genotipo.

Finalmente, el daño por herbivoría se evaluó con GLM con distribución Quasipoisson (GLM con la librería *lme4* del software R versión 3.5.0) donde el genotipo fue considerado como factor fijo.

# SEGUNDA ETAPA: Experimentación

## A Efecto de inducción

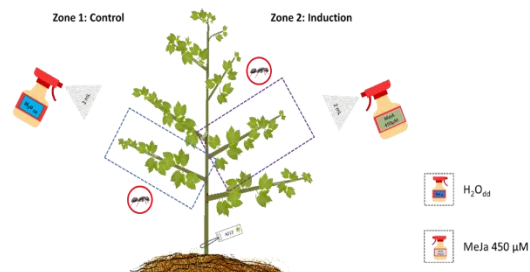
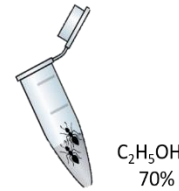


Medición de néctar extrafloral

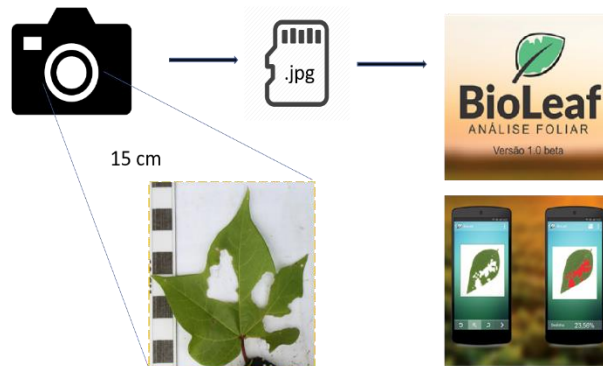


## B Estructura y composición de hormigas

- Censo
- Captura de hormigas



## C Daño por herbivoría



Brandoli-Machado et al. 2016

Figura 3. Segunda etapa del diseño experimental: Experimentación. A) Experimento 1: inducción de néctar extrafloral. Horario de inducción 6:30 horas. Cuantificación de volumen y sólidos solubles 6 horas después N= 420; n= 140. B) Experimento 2: Efecto de inducción sobre la riqueza, abundancia y composición de hormigas N=294; n=98. C) Daño por herbivoría N=420; n=140.

## Resultados

Se registró la presencia de los tres transgenes de forma individual, así como plantas que presentan los dos tipos de éstos (Tabla 1). Cabe mencionar que para este estudio incluimos en la categoría *cry* a las plantas que expresan los genes *cry1Ac* y *cry2Ab*, puesto que tienen la misma función, resistencia a lepidópteros y la diferencia en el nombre se refiere al evento al que pertenecen. Este registro agrega la metapoblación Península de Yucatán a la lista de metapoblaciones con presencia de transgenes (Fig. 1).

Tabla 1. Frecuencia de transgenes en 69 plantas de algodón silvestre de la Reserva de la Biosfera de Ría Lagartos

Genotipos	Frecuencia (%)
Silvestre sin transgenes (S)	50.72
Silvestre con <i>cry1Ac/2Ab</i> ( <i>Scry</i> ) Efecto insecticida	15.94
Silvestre con <i>cp4-epsps</i> ( <i>Scp4-epsps</i> ) Resistencia a Glifosato	24.63
Silvestres con apilamiento de <i>cry</i> y <i>cp4-epsps</i>	8.71

### Efecto del tratamiento de inducción con JaMe sobre la producción de néctar extrafloral de algodón silvestre con y sin transgenes

La aplicación exógena de JaMe incrementó significativamente la secreción de NEF en las plantas silvestres sin transgenes ( $P(\chi^2) = 0.048$ ,  $df = 1$ ). Mientras que los genotipos con transgenes (*Scry* y *Scp4-epsps*) no respondieron a este estímulo (*Scry*:  $P(\chi^2) = 0.375$   $df = 1$ ;

*Scp4-epsps*:  $P(\chi^2) = 0.388$ ,  $df = 1$ ). Sin embargo, la producción de NEF que presentaron fue contrastante, entre ellos. Las plantas con gen *cry* produjeron un volumen mayor  $20 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$  en ambos tratamientos, mientras que la producción de NEF del genotipo *Scp4-epsps* fue menor a los  $8 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$  (Fig. 4).

Al comparar la respuesta a la inducción del tratamiento control de las plantas *cry* y el tratamiento de inducción de las plantas silvestres sin transgenes no se obtuvieron diferencias significativas ( $P(\chi^2) = 0.637$ ,  $df = 1$ ).

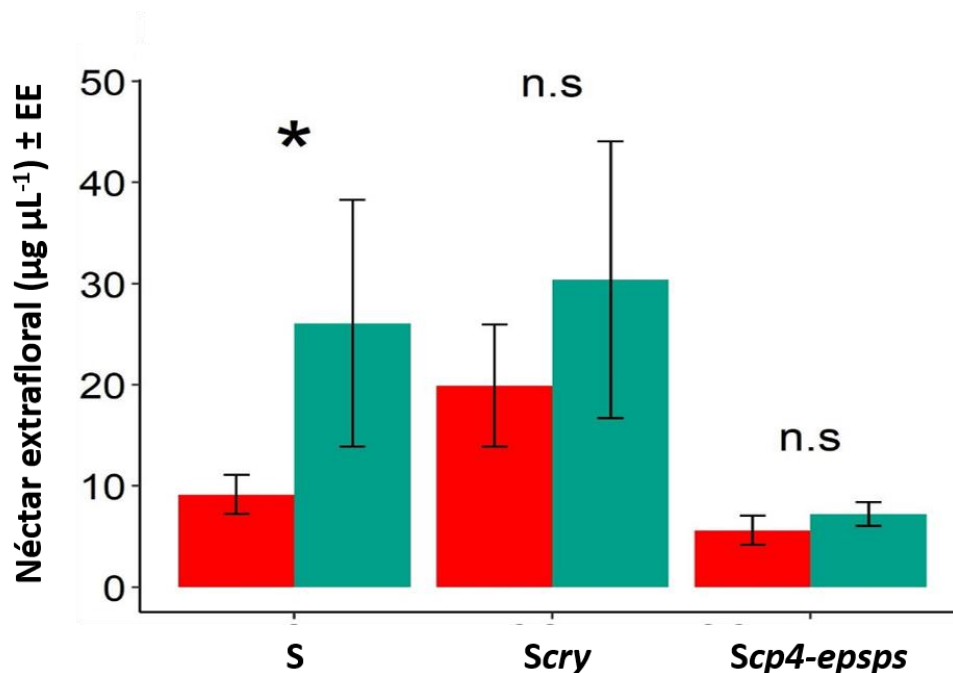


Figura 4. Efecto del tratamiento de inducción por JaMe sobre el volumen de néctar extrafloral en plantas de algodón silvestres y con expresión de genes *cry* y *cp4-epsps*. Las barras rojas representan el tratamiento control y las barras azules corresponden al tratamiento de inducción con Jasmonato de Metilo a 450 mM (JaMe) (N= 84; n= 14 ramas por genotipo y por tratamiento). El asterisco muestra diferencias significativas entre tratamientos con  $p < 0.05$  acorde con la prueba *posthoc* Tukey-Kramer, mientras que n.s. indica que no se encontraron diferencias.

### Efecto de la inducción con JaMe sobre la abundancia, riqueza y composición de hormigas asociadas a algodón silvestre con y sin transgenes

Se recolectaron 109 hormigas asociadas a los nectarios extraflorales de *Gossypium hirsutum* distribuidas en ocho especies (Fig. 5). La mayor abundancia y riqueza se registró

en el genotipo silvestre (S) (42 individuos y 7 especies), por su parte en los genotipos con transgenes, *SCry* y *SCp4-epsps* se recolectaron 33 y 34 individuos, distribuidos en cuatro y seis especies, respectivamente (Tabla 2).

De las ocho especies identificadas cuatro presentan comportamiento de defensa: *Camponotus planatus*, *Camponotus rectangularis aulicus*, *Dorymyrmex bicolor* y *Pseudomyrmex gracilis*. Además, la comunidad asociada a los NEF del algodón integra hormigas vagabundas como *Paratrechina longicornis* y *Monomorium ebeninum*.

La comunidad de hormigas asociada a los NEF del algodón cambió en función del genotipo de la planta. Las plantas silvestres tienen dos especies exclusivas, las plantas resistentes a glifosato (*Scp4-epsps*) una especie mientras que las plantas con función insecticida no presentan especies exclusivas. Los tres genotipos comparten cuatro especies (Fig. 5; Tabla 2).

Al evaluar la atracción de hormigas como respuesta a la inducción por la aplicación exógena de JaMe, se registró un incremento significativo en la abundancia de las hormigas asociadas al genotipo *Scry* en el tratamiento de inducción ( $P(\chi^2) < 0.001$ ,  $g.l.= 1$ ), principalmente por la especie *C. planatus*. Por otro lado, los genotipos S y *Scp4-epsps* no presentaron diferencias en la abundancia de hormigas atraídas en el tratamiento de inducción (S:  $P(\chi^2) = 0.4362$ ,  $g.l.= 1$ ; *SCp4-epsps*:  $P(\chi^2) = 0.2102$ ,  $g.l.= 1$ ) (Fig. 6) .

**Tabla 2. Composición y abundancia de la comunidad de hormigas asociada a plantas de *Gossypium hirsutum* con y sin transgenes**

	Silvestre		Silvestre con <i>cry</i>		Silvestre con <i>cp4-epsps</i>	
	S		Scry		Scp4-epsps	
<b>Especie de hormiga</b>	Control	JaMe	Control	JaMe	Control	JaMe
<i>Brachymyrmex</i> sp.	2	-	-	-	-	-
<i>Camponotus planatus</i>	8	14	3	20	1	5
<i>Camponotus rectangularis aulicus</i>	1	-	1	5	4	3
<i>Dorymyrmex bicolor</i>	-	1	-	-	1	6
<i>Paratrechina longicornis</i>	6	8	-	2	1	1
<i>Pseudomyrmex gracilis</i>	1	-	2	-	3	-
<i>Temnothorax subditivus</i>	1	-	-	-	-	-
<i>Monomorium ebeninum</i>	-	-	-	-	7	2



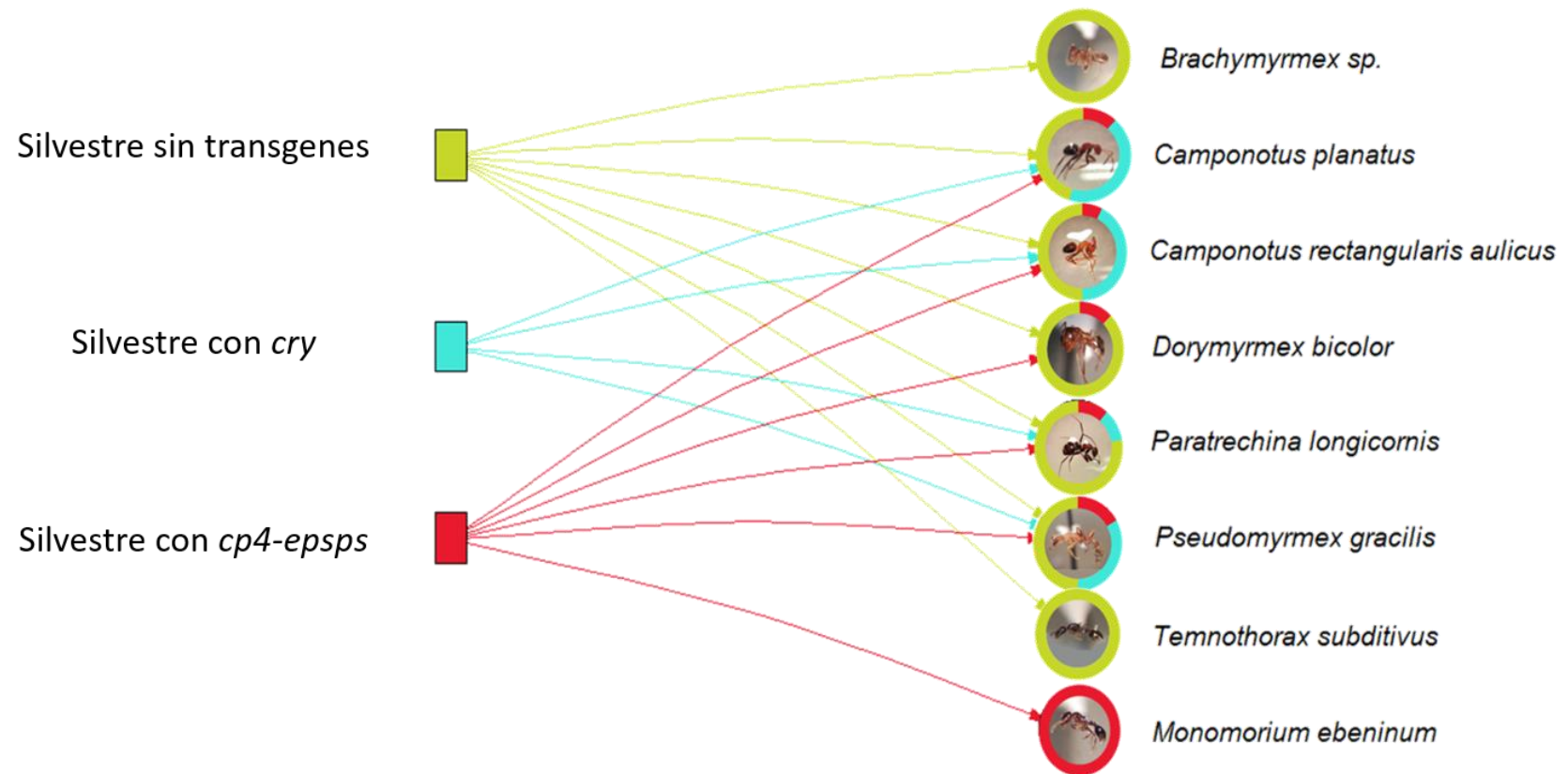


Figura 5. Composición de hormigas asociadas a tres genotipos de plantas silvestres de *Gossypium hirsutum*. Silvestre sin transgenes (S) (recuadro y flechas verdes), Silvestre con *Cry* (*Scry*) (recuadro y flechas azules) y Silvestre con *cp4-epsps* (recuadro y flechas rojas) N= 109

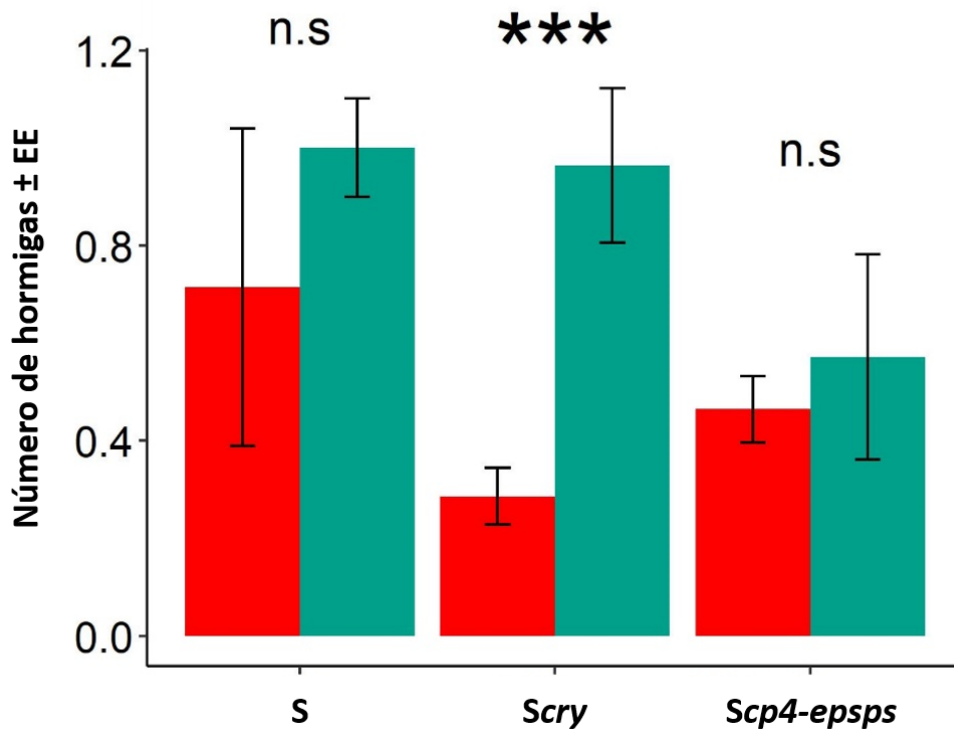


Figura 6. Efecto del tratamiento de inducción sobre la abundancia de hormigas en plantas de algodón silvestres y con expresión de genes *cry* y *cp4-epsps*. Las barras rojas representan el tratamiento control y las barras azules corresponden al tratamiento de inducción con Jasmonato de Metilo a 450 mM (JaMe) (N= 42 ; n= 7 ramas por genotipo y por tratamiento). Los asteriscos muestran diferencias significativas entre tratamientos con  $p < 0.05$  acorde con la prueba posthoc de *Turkey-Kramer*, mientras que *n.s.* indica que no se encontraron diferencias

## Daño por herbivoría en plantas silvestres con y sin transgenes

Al evaluar el daño por herbivoros se registró que las plantas con resistencia a glifosato (*Scp4-epsps*) presentaron el mayor valor y el daño fue significativamente diferente a los otros dos genotipos (S y *Scry*) ( $P(\chi^2) < 0.001$ , g.l. = 2) (Fig. 7). El menor daño lo registró el genotipo *Scry*, sin embargo, no fue diferente al de las plantas silvestres (S).

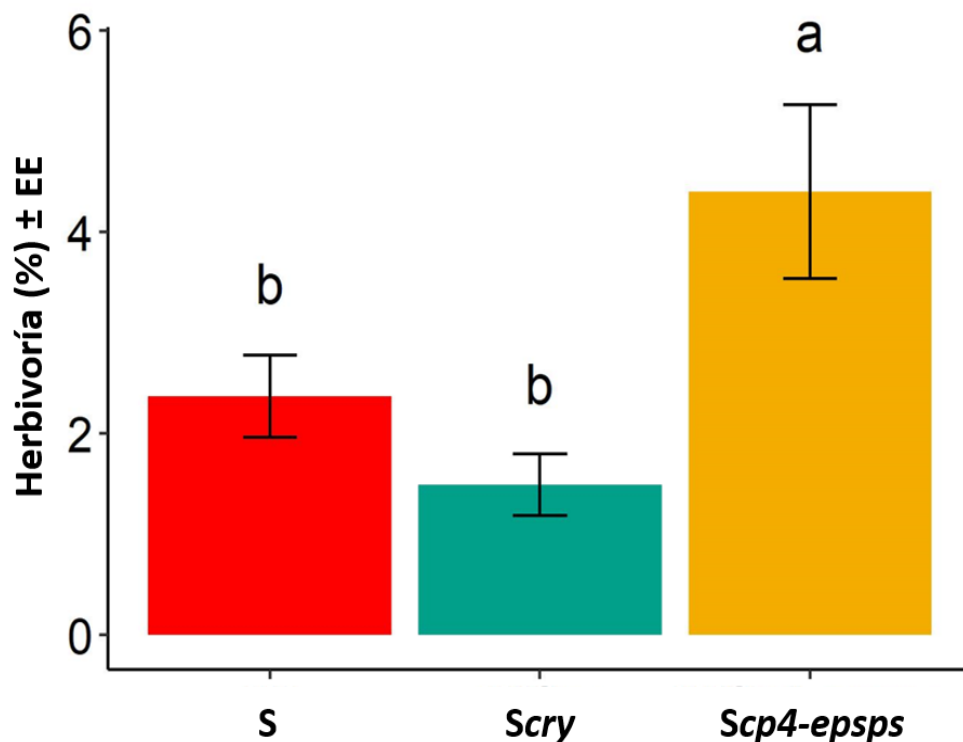


Figura 7. Daño por herbivoría en tres genotipos de *Gossypium hirsutum* silvestre. Silvestre sin transgenes (S: barra roja), Silvestre con *Cry* (*Scry*; barra azul) y Silvestre con *cp4-epsps* (*Scp4-epsps*; barra amarilla). Las barras representan la media  $\pm$  EE de los datos (N= 210, n=70). Las letras diferentes indican diferencias significativas acorde a la prueba Post-hoc Tukey-Kramer.

## Discusión y conclusiones

La expresión de los transgenes *cry* y *cp4-epsps* modifican la producción de néctar extrafloral (defensa inducida) en algodón silvestre

A lo largo de su historia evolutiva las plantas han desarrollado diversas estrategias de defensa que median y mantienen interacciones con herbívoros, patógenos y con los enemigos naturales de estos (Aljory y Chen, 2018). Uno de los mecanismos que poseen son las defensas indirectas, las cuales son respuestas ante estímulos externos, principalmente el daño por herbívoros, pero a diferencia las respuestas directas (e.g. tricomas y metabolitos secundarios) que tienen un efecto directo en los herbívoros, estas incluyen al tercer nivel trófico (i.e. depredadores y parasitoides de los herbívoros). Para atraer al tercer nivel trófico, las plantas ofrecen recompensas nutritivas como el NEF y los corpúsculos de Belt, o bien envían señales volátiles (VOCs) que indican donde pueden localizar a sus presas (Bronstein et al., 2006; Heil, 2007; Rudgers et al., 2004). Además, la aplicación exógena de fitohormonas como el ácido jasmónico (AJ), el jasmonato de metilo (JaMe) o el ácido salicílico (AS) son una herramienta que permite estudiar a las defensas indirectas a nivel molecular, bioquímico y orgánico, así como comprender las interacciones entre la respuesta de la planta (producción de NEF y VOCs) y la respuesta de los insectos con los que interactúa (atracción de enemigos naturales de herbívoros (Hagenbucher et al., 2017; Wang y Wu, 2013; Williams et al., 2017). En este estudio, la respuesta que se obtuvo al inducir NEF en los tres genotipos de las plantas silvestres fue contrastante, al ser el genotipo silvestre el único sensible al tratamiento de inducción, mientras que los genotipos silvestres con transgenes no respondieron al tratamiento (S:  $P(\chi^2) = 0.0478$ , g.l. = 1; *Scry*:  $P(\chi^2) = 0.1710$ , g.l. = 1; *Scp4-epsps*:  $P(\chi^2) = 0.3885$ , g.l. = 1 ) (Fig. 4). Esto contrasta con lo reportado previamente en variedades cultivadas de algodón *Bt* y resistente a glifosato (*cp4-epsps*) asperjadas con AJ y JaMe, ya que se ha documentado un incremento en la producción de defensas indirectas: NEF (133%) y VOC (171.2%) (Williams et al., 2017). Si bien en este estudio no se evaluaron explícitamente las defensas directas, trabajos anteriores registran incremento en terpenoides como gossypol

(160%), hemigossiolon (160%) y helicocida 1|4 (213%) (Hagenbucher et al., 2017), lo cual nos indica que posiblemente las defensas directas también se pueden modificar por la expresión de transgenes en condiciones naturales.

Al observar de forma independiente la capacidad de inducir néctar extrafloral en plantas de genotipos transgénicos podemos observar respuestas diferenciales. Mientras que las plantas *Scry* presentan una producción de NEF equivalente al estado inducido de las plantas *S*, la producción de NEF en las plantas *Scp4-epsps* fue muy baja (8 µg/mL) en ambos tratamientos (Fig. 4). Comparando con los resultados obtenidos bajo condiciones controladas (i.e. invernaderos y campos de cultivos experimentales), se sugiere que nuestros resultados sobre la producción de NEF están ligados tanto a la expresión de los transgenes como al estrés abiótico que representa la duna costera como hábitat (Williams et al., 2017). Una posible consecuencia en la modificación de la producción de NEF se observó en la composición de la comunidad de hormigas asociadas y en la intensidad del daño por herbívoros. Se identificaron ocho especies de hormigas asociadas a los nectarios extraflorales del algodón *Gossypium hirsutum* silvestre, siendo el primer reporte para la especie. Sin embargo, la composición de estas hormigas fue diferente entre cada genotipo. Las plantas *S* mantienen asociadas a siete especies, las *Scp4-epsps* a seis y las plantas *Scry* cuatro especies (Fig. 5). Estos resultados sugieren que el cambio en la cantidad y posiblemente en la composición y calidad del NEF puede influir en la comunidad de hormigas asociada al algodón (Heil, 2011; Pacelhe, et al., 2019; Rico-Gray y Oliveira, 2013).

## Contrario a la teoría, el efecto neutro en algodón silvestre GM no existe en la Duna Costera de la Península de Yucatán

### Algodón silvestre con *cp4-epsps*

En general se ha asumido que los genotipos introgresados y silvestres deberían mostrar fenotipos similares en ausencia de agentes de selección dirigidos a los transgenes (Ellstrand et al., 1999). En este trabajo se mostró que en ausencia del herbicida glifosato, las plantas *SCp4-epsps* exhibieron una producción muy baja de NEF en ambos tratamientos (i.e. control e inducción) ( $< 8 \mu\text{g/mL}$ ), comparada con las plantas S (Fig. 4). Esto puede sugerir que existe una modificación a nivel fisiológico, al generarse una interferencia entre la ruta metabólica de los jasmonatos (AJ) y la ruta del ácido salicílico (AS) (Figura resumen; sección anaranjada y purpura). En otras especies, se ha comprobado que la señalización del AS afecta negativamente la señalización de la ruta de los jasmonatos (e.g. maíz (*Zea mays*), tomate (*Solanum lycopersicum*), tabaco (*Nicotina tabacum*), algodón americano (*Gossypium hirsutum*) y *Arabidopsis thaliana*) (Beckers y Spoel, 2006; Kunkel y Brooks, 2002; Thaler et al., 2012; Thaler et al., 2002; Zhang et al., 2011). Una de las razones por la cual sugerimos la existencia de la interferencia entre estas rutas metabólicas es debido a la sobreexpresión de la enzima EPSPS que puede modificar la segunda parte de la ruta metabólica del ácido shikímico (posterior al ácido corísmico) y que finaliza con la síntesis de tres aminoácidos esenciales para el desarrollo, reproducción y defensa, el triptófano (Trp), la fenilalanina (Phe) y la tirosina (Tyr), este último precursor en la síntesis del ácido benzoico ABe y este del AS (Figura resumen; sección purpura) (Dempsey et al., 2011; Verberne et al., 2000). En arroz, la ausencia de glifosato beneficia la sobrevivencia de la especie en ambientes extremos (Fang et al., 2018), algo similar a lo que podría verse a largo plazo en las condiciones naturales de las dunas costeras, en donde se distribuye naturalmente el algodón. Además, la evidencia en la interferencia en las diferentes rutas metabólicas nos sugiere que esta interferencia (“*crosstalk*”) puede escalar al fenotipo de la planta.

Los cambios en la regulación del NEF pueden potencialmente comprometer la atracción de los enemigos naturales de los herbívoros, al modificar la disponibilidad y la calidad de la recompensa. En este estudio la disponibilidad del NEF tuvo como consecuencia una variación en la composición y abundancia de hormigas sobre las plantas. Para el genotipo silvestre S, se registró una atracción total de 34 hormigas ( $1.41 \pm 0.10$ ), las cuales se caracterizan por ser especies exóticas como *Monomorium ebeninum* y la especie invasora *Paratrechina longicornis* lo que representa un peligro potencial para las hormigas nativas del género *Camponotus* y *Pseudomyrmex* que pueden llegar a ser fácilmente desplazadas (Koptur et al., 2010). Además, la presencia de estas especies de hormigas puede incrementar el daño por herbívoros al no proveer defensa a la planta (Del-Claro et al., 2016; Hernández-Cumplido et al., 2010; Villamil et al., 2019), como la que proporcionan las especies *Camponotus planatus*, *Camponotus rectangulatus* y *Pseudomyrmex brunneus* (Tabla 2) (Díaz-Castelazo et al., 2004; Rico-Gray et al., 1989).

Por otro lado, el daño por herbívoros que presentaron las plantas tolerantes a glifosato (*Scp4-epsps*) podría sugerir que la ausencia de las hormigas está afectando negativamente en la defensa que puede obtener la planta, ya que, se registró el mayor daño respecto al que presentaron los genotipos S y el *Scry* ( $P(\chi^2) < 0.001$ , g.l. = 2) (Fig. 7). Sin embargo, como se demostró en otro trabajo desarrollado en algodón, estas plantas pueden compensar la herbivoría en niveles menores al 50% de daño foliar infringido por insectos masticadores de hojas (i.e. ortópteros y lepidópteros) sin comprometer la reproducción de la especie (Quijano-Medina et al., 2019). En nuestro estudio el daño foliar hecho por estos insectos fue en promedio menor al 10% por lo tanto no compromete su crecimiento ( $4.40 \pm 0.86$ ). Aunque en este trabajo no se evaluó el daño en los meristemos apicales, se ha demostrado que en especies con dominancia apical existe una sobrecompensación al daño siendo benéfica para la planta (Strauss y Agrawal, 1999). En algodón se sabe que la dominancia apical puede influenciar la resistencia a los herbívoros, y que los efectos de esta dominancia pueden estar interactuando con otros rasgos, por ejemplo, los niveles de defensa (Sadras y Fitt, 1997).

Incluso con los cambios que se presentaron en la producción de NEF, en la composición de hormigas y el daño por herbivoría, es necesario evaluar los mecanismos que podrían estar promoviendo la sobreexpresión de *epsps* en la duna costera; por ejemplo: asociaciones micorrícicas, tasa de germinación, tasa fotosintética, atracción de polinizadores, experimentos de estrés abiótico y ahondar en cómo este genotipo (*Scp4-epsps*) ejerce la compensación del daño por herbívoros, ya que, la densidad de plantas que registramos para este genotipo en el monitoreo de transgenes del año 2018 representa el 33.34% de la población, lo cual sugiere que el transgén persiste (Tabla 1). Lo anteriormente descrito ya se ha documentado en híbridos transgénicos de arroz y soya, especies en las que en ausencia de glifosato se producen cambios en la fenología e incrementan su éxito reproductivo, al presentar una floración temprana y una mayor producción de frutos y semillas por planta, que germinaron en menos tiempo en comparación con sus parientes silvestres (PS). Esto sugiere que la sobreexpresión de *epsps* es responsable de estos efectos sobre la adecuación de la planta, dados los factores bióticos y abióticos que activan la ruta del ácido shikímico (Strapasson et al., 2016; Yang et al., 2017).

#### Algodón silvestre con *cry*

Las plantas con *cry* mostraron la producción de NEF como una respuesta constitutiva ( $P(\chi^2) = 0.1710$ , g.l.= 1). Se han descrito cuatro genes claves en esta ruta metabólica para la síntesis de AJ y JaMe: *AOS*, *AOC*, *HPL* y *COII* (F. Yang et al., 2015). Recientemente en maíz *Bt* se ha documentado una sinergia entre las defensas directas y los genes *cry* debido a la aplicación exógena de AJ (Figura resumen; sección anaranjada), los autores reportan que en la síntesis de AJ participan los genes *ZmAOC* y *ZmHPL*, entonces al comparar entre maíz *Bt* y su línea isogénica, los primeros reportan un incremento de 24% en fenoles y 63% de DIMBOA (2,4-dihidroxi-7-metoxi-1,4-benzoxazin-3-ona; defensa natural contra herbívoros en maíz) (Feng et al., 2007). Por lo tanto, se sugiere que algo similar podría estar presentando las plantas *Scry*, dado que los genes que activan la ruta de los jasmonatos



son homólogos a los reportados en maíz, *GhAOS* y *GhCOII*, además del gen *Ghppol1* que confiere resistencia natural a las larvas de lepidópteros como *Helicoverpa armigera* (Chu et al., 2017). Por lo tanto, la posible interacción génica entre los genes claves en la síntesis de AJ y JaMe con los genes *cry* en el algodón podrían estar modificando la producción de NEF y mostrarla como constitutiva, tomando como base que la síntesis de esta recompensa esta mediada por esta ruta metabólica (Heil, 2011).

Como consecuencia de la producción constante de NEF en este genotipo, la hormiga *Camponotus planatus* fue la especie dominante para ambos tratamientos (control e inducción) lo cual representa una ventaja defensiva para la planta. Curiosamente, aunque no hubo variación en la cantidad de néctar entre los tratamientos, la atracción de hormigas fue mayor en el tratamiento de inducción ( $P(\chi^2) < 0.001$ , g.l. = 1) (Fig.6). La colonización de una sola especie de hormiga en este genotipo puede resultar en un beneficio directo para los dos interactuantes, por un lado, reducir el daño por herbívoros y por otro, promover un incremento en la producción de semillas por planta, como se ha reportado en *Turnera ulmifolia* (Cuautle et al., 2003; Cuautle et al., 2005), *Schomburgkia tibicinis* (Rico-Gray y Thien, 1989) y *Opuntia stricta* (Oliveira et al., 1999). A su vez los nutrientes obtenidos de esta recompensa se pueden reflejar en un incremento de la adecuación de la colonia de especie de hormiga (Heil y McKey, 2003). Sin embargo, dado el comportamiento agresivo y dominante que pueden presentar estas hormigas, a la par de la modificación en el patrón de secreción de NEF se podrían generar interacciones antagonistas con los polinizadores, lo que representaría un costo ecológico para la planta (Raine et al. 2004; Villamil et al., 2019). En este trabajo, no se evaluaron a los polinizadores, por lo tanto se necesita investigar los efectos de estas modificaciones incluyendo las partes reproductivas de las plantas y a sus polinizadores, puesto que conocemos que la polinización cruzada en algodón silvestre y domesticado representa >50% del *seed-set* de las plantas (Velázquez-López et al., 2018). Finalmente, unir la información resultante del estudio de los polinizadores con las modificaciones en la interacción con las hormigas nos aportaría información para comprender los mecanismos por los que se está dando la segregación y dispersión de los genes *cry* en la población.

Los niveles bajos de herbivoría que presentó este genotipo los podemos ligar a la alta abundancia de *Camponotus planatus*, así como a la función objetivo del gen insertado (efecto insecticida). La expresión de los genes *cry* puede ser ventajosa en las plantas que lo expresan dentro de la distribución natural de la especie, al ser un rasgo nuevo en la población y que está íntimamente ligado al principal agente de selección como lo es la herbivoría. Por ejemplo, expresar este gen dentro de la distribución natural de los girasoles silvestres, resultó en un menor daño por herbívoros respecto a sus parientes silvestres, lo que condujo en un incremento del 55% en su producción de semillas (Snow et al., 2003). En este trabajo no se encontraron diferencias entre el genotipo *Scry* y el S, por lo que se sugiere que la expresión de este transgén no representa aún una ventaja. Por lo tanto, sugerimos que es indispensable caracterizar a las especies de herbívoros que consumen la planta, ya que bajo condiciones silvestres se desconocen y dada la función de la expresión de este transgén, podemos sugerir que el principal herbívoro no es del Orden blanco de la tecnología *Bt*, los lepidópteros, y que posiblemente sean ortópteros o escarabajos.

Por otro lado, la presencia de este genotipo en la población puede generar efectos indirectos en los herbívoros nativos, por ejemplo, en condiciones de laboratorio y en experimentos en campos experimentales de maíz *Bt* se registraron efectos negativos en la tasa de crecimiento, desarrollo y sobrevivencia de insectos no blanco (Lang y Otto, 2010). De igual modo, se observaron diferencias en la calidad nutritiva del tejido de estos herbívoros, efecto que resulta en una cascada a los niveles tróficos superiores (Hilbeck, 2001; Lang y Otto, 2010; Romeis et al., 2006), incrementando la tasa de mortalidad, modificando la longevidad o el desarrollo de los depredadores con mandíbulas (e.g. crisopas de la especie *Chrysoperla carnea* y escarabajos de la familia Coccinellidae), principalmente por que ingieren el intestino de su presa siendo el órgano donde se concentra mayormente la toxina (Romeis et al., 2006). También se ha registrado que los parasitoides son afectados por el consumo de la toxina contenida en sus presas. Por ejemplo, la avispa parasitoide *Microplitis mediator* de *Helicoverpa armigera*, al ser alimentada con larvas con niveles bajos de la toxina Cry, se incrementó entre 1 y 2 días el

tiempo de desarrollo de los huevos de su progenie y disminuyó 35% el peso las pupas, mientras que cuando las concentraciones de la toxina son superiores a 4  $\mu\text{g/g}$  su longevidad disminuye (Liu et al., 2005; Liu et al., 2005). Por lo tanto, una pregunta de investigación que subyace es el cómo las plantas *Scry* en condiciones naturales afectan la adecuación de las poblaciones de herbívoros y depredadores nativos.

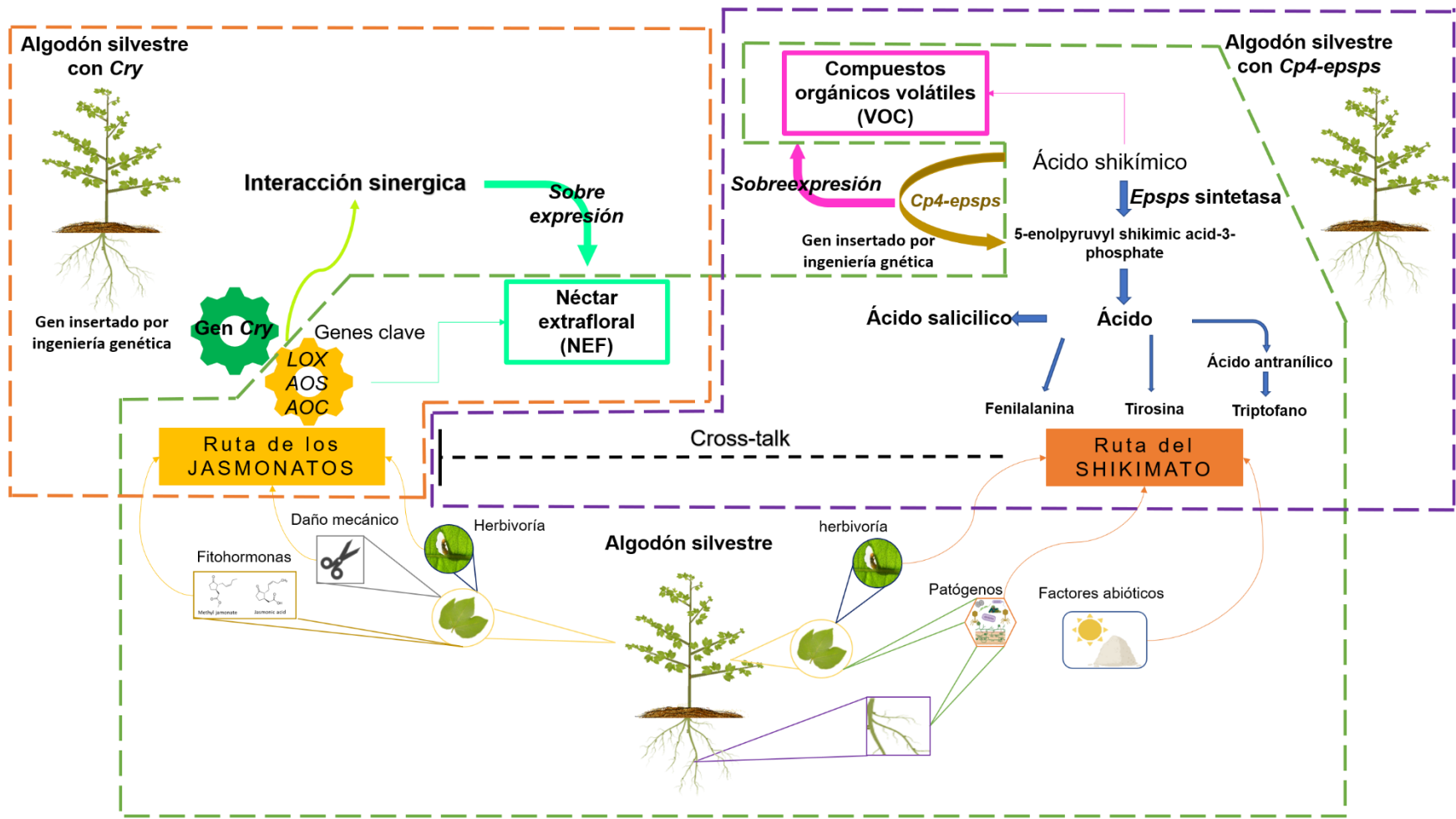
Al aprovechar una metodología integradora para evaluar el efecto de la expresión de los genes *cry* y *cp4-epsps* en plantas silvestres de algodón, destacamos los siguientes resultados: 1) cambios en el mecanismo de defensas inducidas (producción de néctar extrafloral) y 2) modificaciones en las interacciones bióticas con organismos relevantes en condiciones naturales (hormigas).

En este trabajo se analizaron los cambios en un sistema ecológico natural dados por la presencia de nuevos genes en diferentes escalas (i.e. genética, individual y comunitaria), lo que abre múltiples posibilidades a partir de la investigación de nuevas preguntas, pero también para integrar la información dispersa. Dado que varias de las hipótesis que se han planteado sobre la liberación de nuevas tecnologías al medio ambiente solo se han probado en condiciones controladas, en este trabajo se muestra que es posible probarlas en condiciones silvestres. En específico, este trabajo encontró que algunas de las preocupaciones basadas en la teoría (i.e. flujo génico, hibridación y efectos ecológicos) se confirman cuando se realizan diseños experimentales funcionales. Primero, es posible investigar los impactos ecológicos y evolutivos de los nuevos genes bajo condiciones naturales. Segundo, en este trabajo se encontraron cambios fisiológicos y ecológicos generados por la expresión de transgenes en plantas de algodón silvestre en ambientes libres de su factor de selección (plagas y glifosato) dentro de su centro de origen y diversidad. Tercero, la Península de Yucatán es la quinta metapoblación de algodón silvestre con introgresión (el último monitoreo se realizó entre 2003 y 2008), y hasta ahora se reportan 49.28% de 69 plantas con transgenes (Tabla 1). El incremento de frecuencia debe ser monitoreado y explicado, porque hasta ahora se desconocen las rutas de dispersión, pero con lo que se muestra en este trabajo, se sabe que existen mecanismos que están favoreciendo el establecimiento de plantas con estos nuevos

genes, principalmente por su interacción con las principales rutas metabólicas involucradas en su crecimiento, desarrollo, defensa y reproducción de las plantas.

## Figura resumen

El diagrama ilustra cómo la expresión de los transgenes *cry* y *cp4-epsps* en ausencia de su factor de selección (insectos plaga y glifosato) afectan la producción de NEF. La producción de NEF es una respuesta de los siguientes estímulos 1) daño por herbivoría, 2) daño mecánico y 3) aplicación exógena de fitohormonas (AJ, JaMe y AS). Estos factores activan la vía metabólica de los octadecanoides, y por lo tanto la producción de NEF (rectángulo azul claro). La sección verde es un ejemplo de esta reacción en plantas silvestres de algodón (control). Después del daño, los genes claves (engrane amarillo) de la vía de los octadecanoides se activan y producen NEF. Otro escenario es cuando el algodón silvestre expresa los genes *cry* (sección anaranjada), en este caso, los genes clave interactúan de forma sinérgica con el transgén *cry* (engrane verde), lo que desencadena una sobreexpresión en la producción de NEF (flecha gruesa color azul claro) cambiando la respuesta a constitutiva, como se registra en este trabajo (Fig. 4). Cuando las plantas expresan el transgén *cp4-epsps* se inhibe la producción de NEF (sección púrpura). Una posible explicación es que hay una sobreexpresión del gen (flecha curva dorada), que aumenta la producción de ácido salicílico, lo que crea una interferencia entre las vías metabólicas de Shikimato y la de los octadecanoides (línea negra). Cuando se activa la vía metabólica del Shikimato la principal defensa inducida es la producción de compuestos orgánicos volátiles (VOC) (rectángulo rosa).



## Referencias bibliográficas

- Aljbory, Z., y Chen, M. S. (2018). Indirect plant defense against insect herbivores: a review. *Insect Science*, 25(1), 2–23. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12436>
- Barbau-Piednoir, E., Lievens, A., Vandermassen, E., Mbongolo-Mbella, E. G., Leunda-Casi, A., Roosens, N., ... van den Bulcke, M. (2012). Four new SYBR<sup>®</sup>Green qPCR screening methods for the detection of Roundup Ready<sup>®</sup>, LibertyLink<sup>®</sup>, and CryIAb traits in genetically modified products. *European Food Research and Technology*, 234(1), 13–23. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1605-7>
- Beckers, G. J. M., y Spoel, S. H. (2006). Fine-Tuning Plant Defence Signalling: Salicylate versus Jasmonate. *Plant Biology (Stuttgart, Germany)*, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1055/s-2005-872705>
- Bentley, B. L. (1977). Extrafloral Nectaries and Protection by Pugnacious Bodyguards. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 8(1), 407–427. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.08.110177.002203>
- Brocke, K. (2012). Breeding Strategies for Adaptation of Pearl Millet and Sorghum to Climate Variability and Change in West Africa. <https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.2012.00526.x>
- Bronstein, J. L., Alarcón, R., y Geber, M. (2006). The evolution of plant-insect mutualisms. *New Phytologist*, 172, 412–428. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01864.x>
- Chen, Y. H., Shapiro, L. R., Benrey, B., y Cibrián-Jaramillo, A. (2017). Back to the origin: In situ studies are needed to understand selection during crop diversification. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 5, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fevo.2017.00125>
- Chu, B., Zhang, S., Wang, L., Zhu, X. Z., Luo, J. Y., Wang, C. Y., ... Cui, J. J. (2017). Genetic regulation of defence responses in cotton to insect herbivores. *AoB PLANTS*, 9(5). <https://doi.org/10.1093/aobpla/plx048>
- Coronado Blanco, J. M., y Zaldívar Riverón, A. (2014). Biodiversidad de Braconidae ( Hymenoptera : Ichneumonoidea ) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 372–378.

<https://doi.org/10.7550/rmb.32000>

- Costa, J., R Eulalio, J. Fernández-Añero, R. Garnett, C. Martín, N. Muelleder, C. Novillo, M. . P. y A. P. (2007). *Seguridad del herbicida Roundup Ready® , y de su empleo sobre variedades modificadas genéticamente para tolerancia a glifosato.*
- Cuautle, M., y Rico-Gray, V. (2003). The effect of wasps and ants on the reproductive success of the extrafloral nectaried plant *Turnera ulmifolia* (Turneraceae). *Functional Ecology*, 17(3), 417–423. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.2003.00732.x>
- Cuautle, M., Rico-Gray, V., y Diaz-Castelazo, C. (2005). Effects of ant behaviour and presence of extrafloral nectaries on seed dispersal of the Neotropical myrmecochore *Turnera ulmifolia* L. (Turneraceae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 86(1), 67–77. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2005.00525.x>
- De Vries, F. T., Manning, P., Tallowin, J. R. B., Mortimer, S. R., Pilgrim, E. S., Harrison, K. A., ... Bardgett, R. D. (2012). Abiotic drivers and plant traits explain landscape-scale patterns in soil microbial communities. *Ecology Letters*, 15(11), 1230–1239. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2012.01844.x>
- Del-Claro, K., Rico-Gray, V., Torezan-Silingardi, H. M., Alves-Silva, E., Fagundes, R., Lange, D., ... Rodriguez-Morales, D. (2016, May 1). Loss and gains in ant–plant interactions mediated by extrafloral nectar: fidelity, cheats, and lies. *Insectes Sociaux*. Birkhauser Verlag AG. <https://doi.org/10.1007/s00040-016-0466-2>
- Dempsey, D. A., Vlot, A. C., Wildermuth, M. C., y Klessig, D. F. (2011). Salicylic Acid Biosynthesis and Metabolism. *The Arabidopsis Book*, 9, e0156. <https://doi.org/10.1199/tab.0156>
- Diaz-Castelazo, C., Rico-Gray, V., Oliveira, P. S., y Cuautle, M. (2004). Extrafloral nectary-mediated ant-plant interactions in the coastal vegetation of Veracruz, Mexico: Richness, occurrence, seasonality, and ant foraging patterns. *Ecoscience*, 11(4), 472–481. <https://doi.org/10.1080/11956860.2004.11682857>
- Doyle J.J., D. J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11–15. Retrieved from



<http://www.sci epub.com/reference/60627>

Ecología, I. N. de. (1999). *Programa de manejo Reserva de la Biosfera La Sepultura, México*.

<https://doi.org/doi:10.1016/j.landurbplan.2004.09.008>

Ellstrand, N. C. (2018). “Born to Run”? Not Necessarily: Species and Trait Bias in Persistent Free-Living Transgenic Plants. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6, 1–10.

<https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00088>

Ellstrand, N. C., Prentice, H. C., y Hancock, J. F. (1999). Gene flow and introgression from domesticated plants into their wild relatives. *Annual Review of Ecology and Systematics*,

30, 539–563. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.30.1.539>

Elmore, R. W., Roeth, F. W., Nelson, L. A., Shapiro, C. A., Klein, R. N., Knezevic, S. Z., y Martin, A. (2001). Glyphosate-Resistant Soybean Cultivar Yields Compared with Sister Lines.

*Agronomy Journal*, 93(2), 408. <https://doi.org/10.2134/agronj2001.932408x>

Erb, M. (2018). Volatiles as inducers and suppressors of plant defense and immunity — origins, specificity, perception and signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 44, 117–121.

<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.03.008>

Fang, J., Nan, P., Gu, Z., Ge, X., Feng, Y. Q., y Lu, B. R. (2018). Overexpressing exogenous 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) genes increases fecundity and auxin content of transgenic arabidopsis plants. *Frontiers in Plant Science*, 9.

<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00233>

Feng, Y. jiao, Wang, J. wu, y Luo, S. ming. (2007). Effects of Exogenous Jasmonic Acid on Concentrations of Direct-Defense Chemicals and Expression of Related Genes in Bt (*Bacillus thuringiensis*) Corn (*Zea mays*). *Agricultural Sciences in China*, 6(12), 1456–1462.

[https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(08\)60008-5](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(08)60008-5)

Filipecki, M., y Malepszy, S. (2006). Unintended consequences of plant transformation: A molecular insight. *Journal of Applied Genetics*. Polska Akademia Nauk.

<https://doi.org/10.1007/BF03194637>

- Fonseca, C. R. (1994). Herbivory and the Long-Lived Leaves of an Amazonian Ant-Tree. *The Journal of Ecology*, 82(4), 833. <https://doi.org/10.2307/2261447>
- Fraga, J. (2006). Local perspectives in conservation politics: The case of the Ría Lagartos Biosphere Reserve, Yucatán, México. *Landscape and Urban Planning*, 74(3–4), 285–295. <https://doi.org/10.1016/j.landurbplan.2004.09.008>
- Gaume, L., McKey, D., y Anstett, M. C. (1997). Benefits conferred by “timid” ants: Active anti-herbivore protection of the rainforest tree *Leonardoxa africana* by the minute ant *Petalomyrmex phylax*. *Oecologia*, 112(2), 209–216. <https://doi.org/10.1007/s004420050302>
- Hagenbucher, S., Eisenring, M., Meissle, M., y Romeis, J. (2017). Interaction of transgenic and natural insect resistance mechanisms against *Spodoptera littoralis* in cotton. *Pest Management Science*, 73(8), 1670–1678. <https://doi.org/10.1002/ps.4510>
- Halpin, C. (2005). Gene stacking in transgenic plants - The challenge for 21st century plant biotechnology. *Plant Biotechnology Journal*, 3(2), 141–155. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2004.00113.x>
- Heijden, M. G. A. Van Der, Bardgett, R. D., y Straalen, N. M. Van. (2008). The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, 11(3), 296–310. [https://doi.org/10.1111/J.1461-0248.2007.01139.X@10.1111/\(ISSN\)1461-0248.YEAR-OF-BIODIVERSITY](https://doi.org/10.1111/J.1461-0248.2007.01139.X@10.1111/(ISSN)1461-0248.YEAR-OF-BIODIVERSITY)
- Heil, M. (2007). Indirect defence via tritrophic interactions. In *Tritrophic interactions and insect behaviour* (pp. 41–61).
- Heil, M. (2011). Nectar: Generation, regulation and ecological functions. *Trends in Plant Science*, 16(4), 191–200. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.01.003>
- Heil, M., Fiala, B., Maschwitz, U., y Linsenmair, K. E. (2001). On benefits of indirect defence: Short- and long-term studies of antiherbivore protection via mutualistic ants. *Oecologia*, 126(3), 395–403. <https://doi.org/10.1007/s004420000532>

- Heil, M., Hilpert, A., Krüger, R., y Linsenmair, K. E. (2004). Competition among Visitors to Extrafloral Nectaries as a Source of Ecological Costs of an. *Source: Journal of Tropical Ecology*, 20(2), 201–208. <https://doi.org/10.1017/S026646740300110X>
- Heil, M., y McKey, D. (2003). Protective Ant-Plant Interactions as Model Systems in Ecological and Evolutionary Research. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34(1), 425–553. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132410>
- Hernandez-Cumplido, J., Forter, B., Moreira, X., Heil, M., y Benrey, B. (2016). Induced Floral and Extrafloral Nectar Production Affect Ant-pollinator Interactions and Plant Fitness. *Biotropica*, 48(3), 342–348. <https://doi.org/10.1111/btp.12283>
- Hernández-Terán, A., Wegier, A., Benítez, M., Lira, R., Sosa Fuentes, T. G., y Escalante, A. E. (2019a). In vitro performance in cotton plants with different genetic backgrounds: the case of *Gossypium hirsutum* in Mexico, and its implications for germplasm conservation. *PeerJ*, 7(June), e7017. <https://doi.org/10.7717/peerj.7017>
- Hernández-Terán, A., Wegier, A., Benítez, M., Lira, R., Sosa Fuentes, T. G., y Escalante, A. E. (2019b). In vitro performance in cotton plants with different genetic backgrounds: the case of *Gossypium hirsutum* in Mexico, and its implications for germplasm conservation. *PeerJ*, 7, 1–18. <https://doi.org/10.7717/peerj.7017>
- Hernandez-Cumplido, J., Benrey, B., y Heil, M. (2010). Attraction of flower visitors to plants that express indirect defence can minimize ecological costs of ant-pollinator conflicts. *Journal of Tropical Ecology*, 26(5), 555–557. <https://doi.org/10.1017/S0266467410000234>
- Hilbeck, A. (2001). Transgenic host plant resistance and non-target effects. In *Genetically Engineered Organisms* (pp. 167–185). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420042030.ch7>
- Holopainen, J. K., y Gershenzon, J. (2010). Multiple stress factors and the emission of plant VOCs. *Trends in Plant Science*, 15(3), 176–184. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.01.006>
- ISAAA. (2017). Isaaa Brief 2017, (53).

- Kessler, A., y Heil, M. (2011). The multiple faces of indirect defences and their agents of natural selection. *Functional Ecology*, 25(2), 348–357. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2010.01818.x>
- Kolseth, A. K., D’Hertefeldt, T., Emmerich, M., Forabosco, F., Marklund, S., Cheeke, T. E., ... Weih, M. (2015). Influence of genetically modified organisms on agro-ecosystem processes. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 214, 96–106. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2015.08.021>
- Koptur, S., Pascale, W., y Zuriany, O. (2010). Ants and plants with extrafloral nectaries in fire successional habitats on Andros (Bahamas). *Florida Entomologist*, 93.
- Kunkel, B. N., y Brooks, D. M. (2002). Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(4), 325–331. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12179966>
- Lang, A., y Otto, M. (2010, May). A synthesis of laboratory and field studies on the effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* (Bt) maize on non-target Lepidoptera. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2010.00981.x>
- Lindén, A., y Mäntyniemi, S. (2011). Using the negative binomial distribution to model overdispersion in ecological count data. *Ecology*, 92(7), 1414–1421. <https://doi.org/10.1890/10-1831.1>
- Liu, X., Zhang, Q. W., Zhao, J. Z., Li, J. C., Xu, B. L., y Ma, X. M. (2005). Effects of Bt transgenic cotton lines on the cotton bollworm parasitoid *Microplitis mediator* in the laboratory. *Biological Control*, 35(2), 134–141. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.08.006>
- Liu, X., Zhang, Q., Zhao, J. Z., Cai, Q., Xu, H., y Li, J. (2005). Effects of the Cry1Ac toxin of *Bacillus thuringiensis* on *Microplitis mediator*, a parasitoid of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 114(3), 205–213. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2005.00248.x>
- Machado, B. B., Orue, J. P. M., Arruda, M. S., Santos, C. V., Sarath, D. S., Goncalves, W. N., ... Rodrigues-Jr, J. F. (2016). BioLeaf: A professional mobile application to measure foliar

- damage caused by insect herbivory. *Computers and Electronics in Agriculture*, 129(November), 44–55. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2016.09.007>
- Maeda, H., y Dudareva, N. (2012). The Shikimate Pathway and Aromatic Amino Acid Biosynthesis in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 63(1), 73–105. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105439>
- Manshardt, R., Bishaw, D., Pitz, K., y Stewart, C. N. (2016). Gene flow from commercial transgenic papaya fields into feral populations in Hawaii. In *Acta Horticulturae* (Vol. 1124, pp. 33–40). International Society for Horticultural Science. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1124.5>
- Mendoza, P., Gómez, T., Rosario, M., Gonzalez, O., Padilla, L., Jesús, F. De, ... Ariel, J. (2016). Genetic resources of cotton in Mexico : ex situ and in situ conservation and use Resumen. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7, 5–16.
- Moreira, X., Abdala-Roberts, L., Gols, R., y Francisco, M. (2018). Plant domestication decreases both constitutive and induced chemical defences by direct selection against defensive traits. *Scientific Reports*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31041-0>
- Oliveira, P. S., Rico-Gray, V., Díaz-Castelazo, C., y Castillo-Guevara, C. (1999). Interaction between ants, extrafloral nectaries and insect herbivores in Neotropical coastal sand dunes: Herbivore deterrence by visiting ants increases fruit set in *Opuntia stricta* (Cactaceae). *Functional Ecology*, 13(5), 623–631. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.1999.00360.x>
- Owen, M. D. K., Pedersen, P., De Bruin, J. L., Stuart, J., Lux, J., Franzenburg, D., y Grossnickle, D. (2010). Comparisons of genetically modified and non-genetically modified soybean cultivars and weed management systems. *Crop Science*, 50(6), 2597–2604. <https://doi.org/10.2135/cropsci2010.01.0035>
- Pacelhe, F. T., Costa, F. V., Neves, F. S., Bronstein, J., y Mello, M. A. R. (2019). Nectar quality affects ant aggressiveness and biotic defense provided to plants. *Biotropica*, 51(2), 196–204. <https://doi.org/10.1111/btp.12625>

- Poppy, G. M. (1997). Tritrophic interactions: Improving ecological understanding and biological control. *Endeavour*, 21(2), 61–65. [https://doi.org/10.1016/S0160-9327\(97\)01042-9](https://doi.org/10.1016/S0160-9327(97)01042-9)
- Quijano-Medina, T., Covelo, F., Moreira, X., y Abdala-Roberts, L. (2019). Compensation to simulated insect leaf herbivory in wild cotton (*Gossypium hirsutum*): responses to multiple levels of damage and associated traits. *Plant Biology (Stuttgart, Germany)*, 21(5), 805–812. <https://doi.org/10.1111/plb.13002>
- Raine, N. E., Gammans, N., Macfadyen, I. J., Scrivner, G. K., y Stone, G. N. (2004). Guards and thieves: Antagonistic interactions between two ant species coexisting on the same ant-plant. *Ecological Entomology*, 29(3), 345–352. <https://doi.org/10.1111/j.0307-6946.2004.00608.x>
- Randhawa, G. J., y Chhabra, R. (2013). Genetically Modified Cotton in India and Detection Strategies (pp. 17–28). [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-212-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-212-4_2)
- Randhawa, G. J., Singh, M., Chhabra, R., y Sharma, R. (2010). Qualitative and Quantitative Molecular Testing Methodologies and Traceability Systems for Commercialised Bt Cotton Events and Other Bt Crops Under Field Trials in India. *Food Analytical Methods*, 3(4), 295–303. <https://doi.org/10.1007/s12161-010-9126-8>
- Rico-Gray, V., y Thien, L. B. (1989). Effect of different ant species on reproductive fitness of *Schomburgkia tibicinis* (Orchidaceae). *Oecologia*, 81(4), 487–489. <https://doi.org/10.1007/BF00378956>
- Rico-Gray, Victor, y Oliveira, P. S. (2013). *The Ecology and Evolution of Ant-Plant Interactions*. *The Ecology and Evolution of Ant-Plant Interactions*. University of Chicago Press. <https://doi.org/10.7208/chicago/9780226713540.001.0001>
- Rico-Gray, Victor, y Thien, T. B. (1989). Ant-Mealybug Interaction Decreases Reproductive Fitness Of *Schomburgkia Tibicinis* (Orchidaceae) In Mexico. *Journal of Tropical Ecology*, 5(1), 109–112. <https://doi.org/10.1017/S0266467400003266>
- Romeis, J., Meissle, M., y Bigler, F. (2006a). Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. *Nature Biotechnology*, 24(1), 63–71.

<https://doi.org/10.1038/nbt1180>

Romeis, J., Meissle, M., y Bigler, F. (2006b, January). Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. *Nature Biotechnology*.

<https://doi.org/10.1038/nbt1180>

Rudgers, J. A., Strauss, S. Y., y Wendel, J. F. (2004). Trade-offs among anti-herbivore resistance traits: Insights from *Gossypieae* (Malvaceae). *American Journal of Botany*.

<https://doi.org/10.3732/ajb.91.6.871>

Sadras, V. O., y Fitt, G. P. (1997). Apical dominance - Variability among cotton genotypes and its association with resistance to insect herbivory. *Environmental and Experimental Botany*, 38(2), 145–153. [https://doi.org/10.1016/S0098-8472\(97\)00008-7](https://doi.org/10.1016/S0098-8472(97)00008-7)

Schmidt, J. E. U., Braun, C. U., Whitehouse, L. P., y Hilbeck, A. (2009). Effects of activated Bt transgene products (Cry1Ab, Cry3Bb) on immature stages of the ladybird *adalia bipunctata* in laboratory ecotoxicity testing. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 56(2), 221–228. <https://doi.org/10.1007/s00244-008-9191-9>

Snow, A. A., Pilson, D., Rieseberg, L. H., Paulsen, M. J., Pleskac, N., Reagon, M. R., ... Selbo, S. M. (2003). A Bt transgene reduces herbivory and enhances fecundity in wild sunflowers. *Ecological Applications*, 13(2), 279–286. [https://doi.org/10.1890/1051-0761\(2003\)013\[0279:ABTRHA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1051-0761(2003)013[0279:ABTRHA]2.0.CO;2)

Strapasson, P., Pinto-Zevallos, D. M., y Zarbin, P. H. G. (2016). Soybean (*Glycine max*) plants genetically modified to express resistance to glyphosate: can they modify airborne signals in tritrophic interactions? *Chemoecology*, 26(1), 7–14. <https://doi.org/10.1007/s00049-015-0202-9>

Strauss, S. Y., y Agrawal, A. A. (1999, May 1). The ecology and evolution of plant tolerance to herbivory. *Trends in Ecology and Evolution*. Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(98\)01576-6](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(98)01576-6)

Thaler, J. S., Humphrey, P. T., y Whiteman, N. K. (2012). Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends in Plant Science*, 17(5), 260–270.

<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.02.010>

Thaler, J. S., Karban, R., Ullman, D. E., Boege, K., y Bostock, R. M. (2002). Cross-talk between jasmonate and salicylate plant defense pathways: Effects on several plant parasites.

*Oecologia*, 131(2), 227–235. <https://doi.org/10.1007/s00442-002-0885-9>

Traxler, G., y Godoy-Avila, S. (2004). Transgenic cotton in Mexico. *AgBioForum*, 7(1–2), 57–62.

Ulloa, M., Saha, S., Jenkins, J. N., Meredith, W. R., McCarty, J. C., y Stelly, D. M. (2005).

Chromosomal assignment of RFLP linkage groups harboring important QTLs on an intraspecific cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Joinmap. *The Journal of Heredity*, 96(2), 132–144. <https://doi.org/10.1093/jhered/esi020>

Velázquez-López, R., Wegier, A., Alavez, V., Pérez-López, J., Vázquez-Barrios, V., Arroyo-Lambaer, D., ... Kunin, W. E. (2018). The mating system of the wild-to-domesticated complex of *Gossypium hirsutum* L. Is mixed. *Frontiers in Plant Science*, 9.

<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00574>

Verberne, M. C., Verpoorte, R., Bol, J. F., Mercado-Blanco, J., y Linthorst, H. J. (2000).

Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance. *Nature Biotechnology*, 18(7), 779–783. <https://doi.org/10.1038/77347>

Villamil, N., Boege, K., y Stone, G. N. (2019). Testing the Distraction Hypothesis: Do extrafloral nectaries reduce ant-pollinator conflict? *The Journal of Ecology*, 107(3), 1377–1391.

<https://doi.org/10.1111/1365-2745.13135>

Wäckers, F. L., y Wunderlin, R. (1999). Induction of cotton extrafloral nectar production in response to herbivory does not require a herbivore-specific elicitor. In *Proceedings of the 10th International Symposium on Insect-Plant Relationships* (pp. 149–154). Dordrecht:

Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-1890-5\\_18](https://doi.org/10.1007/978-94-017-1890-5_18)

Wäckers, Felix L., y Bonifay, C. (2004). How to be sweet? Extrafloral nectar allocation by

*Gossypium hirsutum* fits optimal defense theory predictions. *Ecology*, 85(6), 1512–1518.

<https://doi.org/10.1890/03-0422>



- Wang, L., y Wu, J. (2013). The essential role of jasmonic acid in plant-herbivore interactions-- using the wild tobacco *Nicotiana attenuata* as a model. *Journal of Genetics and Genomics = Yi Chuan Xue Bao*, 40(12), 597–606. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2013.10.001>
- Wegier, A., Piñeyro-Nelson, A., Alarcón, J., Gálvez-Mariscal, A., Álvarez-Buylla, E. R., y Piñero, D. (2011). Recent long-distance transgene flow into wild populations conforms to historical patterns of gene flow in cotton (*Gossypium hirsutum*) at its centre of origin. *Molecular Ecology*, 20(19), 4182–4194. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05258.x>
- Wegier, Ana. (2013). *Diversida genética y conservación de Gossypium hirsutum silvestre y cultivado en México*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Williams, L., Rodríguez-Saona, C., y del Conte, S. C. C. (2017). Methyl jasmonate induction of cotton: A field test of the “attract and reward” strategy of conservation biological control. *AoB PLANTS*, 9(5), 1–15. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plx032>
- Wu, Y., Vassal, J. M., Royer, M., y Pieretti, I. (2009). A single linkage group confers dominant resistance to *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin Cry1Ac in *Helicoverpa armigera*. *Journal of Applied Entomology*, 133(5), 375–380. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2008.01368.x>
- Yang, F., Zhang, Y., Huang, Q., Yin, G., Pennerman, K. K., Yu, J., ... Guo, A. (2015). Analysis of key genes of jasmonic acid mediated signal pathway for defense against insect damages by comparative transcriptome sequencing. *Scientific Reports*, 5, 16500. <https://doi.org/10.1038/srep16500>
- Yang, X., Li, L., Jiang, X., Wang, W., Cai, X., Su, J., ... Lu, B. R. (2017). Genetically engineered rice endogenous 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (epsps) transgene alters phenology and fitness of crop-wild hybrid offspring. *Scientific Reports*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07089-9>
- Zhang, B., Chen, M., Zhang, X., Luan, H., Tian, Y., y Su, X. (2011). Expression of Bt-Cry3A in transgenic *Populus alba*  $\times$  *P. glandulosa* and its effects on target and non-target pests and the arthropod community. *Transgenic Research*, 20(3), 523–532. <https://doi.org/10.1007/s11248-010-9434-1>

Zhang, P., Zhu, X., Huang, F., Liu, Y., Zhang, J., Lu, Y., y Ruan, Y. (2011). Suppression of jasmonic acid-dependent defense in cotton plant by the mealybug *Phenacoccus solenopsis*. *PLoS One*, 6(7), e22378. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022378>

Zhao, J. Z., Cao, J., Li, Y., Collins, H. L., Roush, R. T., Earle, E. D., y Shelton, A. M. (2003). Transgenic plants expressing two *Bacillus thuringiensis* toxins delay insect resistance evolution. *Nature Biotechnology*, 21(12), 1493–1497. <https://doi.org/10.1038/nbt907>