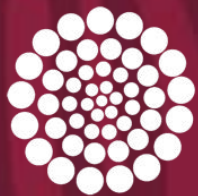


Bases para el mejoramiento genético de algodón convencional en México: estrategias para recuperación de germoplasma y generación de una variedad convencional

Marzo, 2023



CONACYT

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



2023
AÑO DE
Francisco
VILLA

EL REVOLUCIONARIO DEL PUEBLO

México es el centro de origen, domesticación y diversidad del cultivo de algodón. y en la década de 1960 llegó a ser uno de los principales productores y exportadores de fibra de algodón, pero la importancia del cultivo decayó durante los 70 hasta casi desaparecer, como consecuencia de múltiples factores como la caída de los precios internacionales, la falta de una política de apoyo efectiva para el manejo de los problemas nacionales y el mejoramiento enfocado a estos, así como los altos costos de producción derivados de las necesidades del manejo de plagas, principalmente de mosquita blanca y picudo del algodonoero, los cuales ocasionaron pérdidas completas de la producción de los campos.

En 1996 se introdujeron al país variedades de algodón GM, principalmente con dos características: resistencia al ataque de larvas de lepidópteros (inserción del gen *Cry*) y tolerancia al herbicida glifosato (gen *cp4-epsps*), con lo anterior se abandonó el mejoramiento de las variedades convencionales, ocasionando una dependencia total a las semillas GM.

Objetivo general: Generar las bases de programas de mejoramiento genético algodnero convencional libre de transgénicos, estandarizando los protocolos con una nueva variedad convencional para el norte de México.

Beneficiarios del proyecto: Personas productoras y fitomejoradoras de algodón, así como la comunidad científica interesada en el desarrollo de nuevas variedades adaptadas a condiciones agroclimáticas del país y que respondan a las necesidades de México.

Principales aportaciones científicas, tecnológicas y/o de incidencia:

1. Establecimiento de bases para la producción de semillas de algodón libre de transgenes.
2. Unificación de protocolos de laboratorio para la detección de transgenes y monitoreo
3. Fortalecimiento de grupos de trabajo interesados en desarrollar estrategias de producción de semillas de algodón de variedades libres de transgenes.

Objetivo:

Generar las bases de programas de mejoramiento genético algodónero convencional libre de transgenes, estandarizando los protocolos con una nueva variedad convencional para el norte de México.

Metas:

1. Planificar la logística para el establecimiento de plantas y muestreo para el monitoreo.
2. Comparar los métodos para la detección de transgenes compatibles con un programa de mejoramiento genético de algodón libre de transgenes.
3. Establecer en invernadero el material convencional para la obtención de semilla base libre de transgenes.
4. Adecuar el plan de manejo de plantas libres de transgenes en el invernadero.
5. Caracterizar la dinámica ecológica de la artropodofauna asociada al cultivo algodónero.
6. Conformar una colección de materiales de propagación de algodónero convencionales libres de transgenes.
7. Diseñar la estrategia para el análisis de la variación genética entre los materiales de propagación.

Instituciones participantes



- Instituto de Biología, UNAM
- Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP)
 - Áreas de Biotecnología con Acentuación en Recursos Naturales (CIRNO)
 - Campo de Investigación Regional Norte-Centro, La Campana, Chihuahua (CIRNOC)
 - Campo de Investigación Disciplinaria en Conservación y Mejoramiento de Ecosistemas Forestales (CENID-COMEF)
- Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC)



1. Propuesta logística para el establecimiento de planta y muestreo para su monitoreo

Meta

Presentar la propuesta logística para el establecimiento de plantas progenitoras de Azteca libres de GM en Invernaderos en Sonora y Chihuahua

Sistema de producción de semilla base de Azteca libre de transgenes

Actividades

Invernaderos: Adecuar estructura para limitar polinizadores e ingreso de polen externo: compra de materiales y trabajo de habilitación de los invernaderos.

Estandarización de técnicas de detección de transgenes y eliminación de plantas positivas.

Análisis de diversidad genética en variedad Azteca.

Productos

Evidencia fotográfica de invernaderos habilitados para la siembra y producción de semillas libres de transgenes.

Protocolos de detección de transgenes.
Plantas libres de transgenes.

Estandarización de técnica de extracción de ADN de plantas de algodón.

Verificación

Evidencia fotográfica

Bases de datos de seguimiento de detección de transgenes en plantas muestreadas.

Informe

Conclusiones

Se logró establecer una estrategia logística para ser desarrollada en la primera etapa de la producción de semilla libre de transgenes.

2. Informe del análisis comparativo de técnicas para la detección de principales transgenes en algodón

Meta

Diseñar la metodología para la detección de transgénesis compatible con un programa de mejoramiento genético de algodón libre de transgenes.

Comparación de tres técnicas para la detección de transgenes en algodón

Actividades:

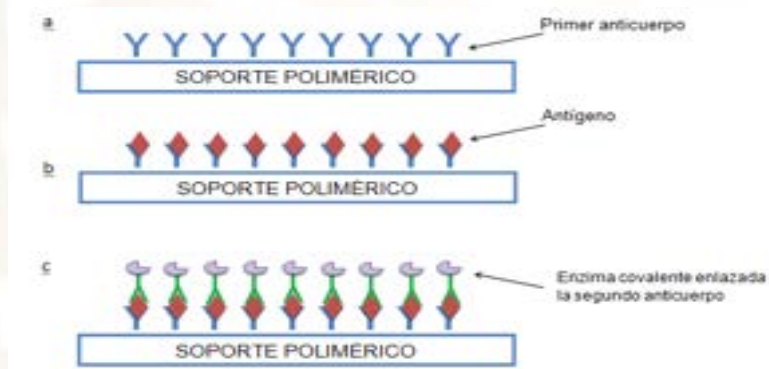
- Revisión bibliográfica de las principales técnicas empleadas para la detección de transgenes en algodón.
- Implementación de distintos protocolos en las dependencias participantes, de acuerdo a sus recursos y posibilidades:
 - Instituto de Biología, UNAM: inmunodetección (ELISA y tiras reactivas), PCR punto final, PCR tiempo real y protocolo de susceptibilidad al glifosato.
 - INECC: PCR-tiempo real con sondas Taqman;
 - CENID COMEF: PCR punto final y PCR-tiempo real con sondas comerciales.
 - CIRNO: PCR punto final.

Principales métodos de detección basados en proteínas:

Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA)

Esta prueba utiliza anticuerpos o antígenos conjugados con una enzima que al reaccionar con el sustrato específico producen una reacción colorimétrica que se puede cuantificar en un espectrofotómetro a determinada longitud de onda.

Ventajas: Es sensible a un nanogrammo de analito. Es una técnica muy utilizada para el monitoreo de OGM debido a que permite realizar análisis simultáneos de múltiples muestras de manera sensible y relativamente rápida, así como análisis cualitativos y cuantitativos (Kamle et al, 2018).



Esquema general de una prueba de ELISA (Fuente: Perez-García, 2013)

Tiras reactivas

Instrumento de diagnóstico básico, su objetivo es detectar algunas enzimas específicas o productos finales del metabolismo de ciertos organismos.

Ventajas: usan pequeñas cantidades de sustrato y una porción alta de antígeno, lo que permite la reacción bioquímica en un periodo corto de tiempo (García et al. 2003).

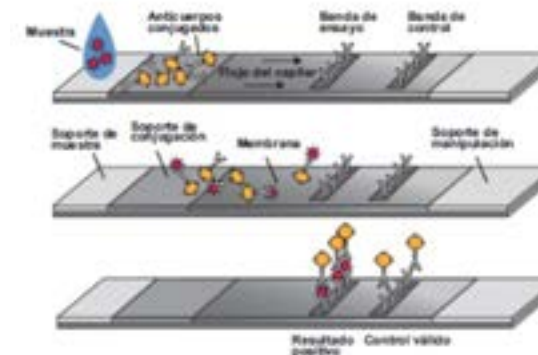
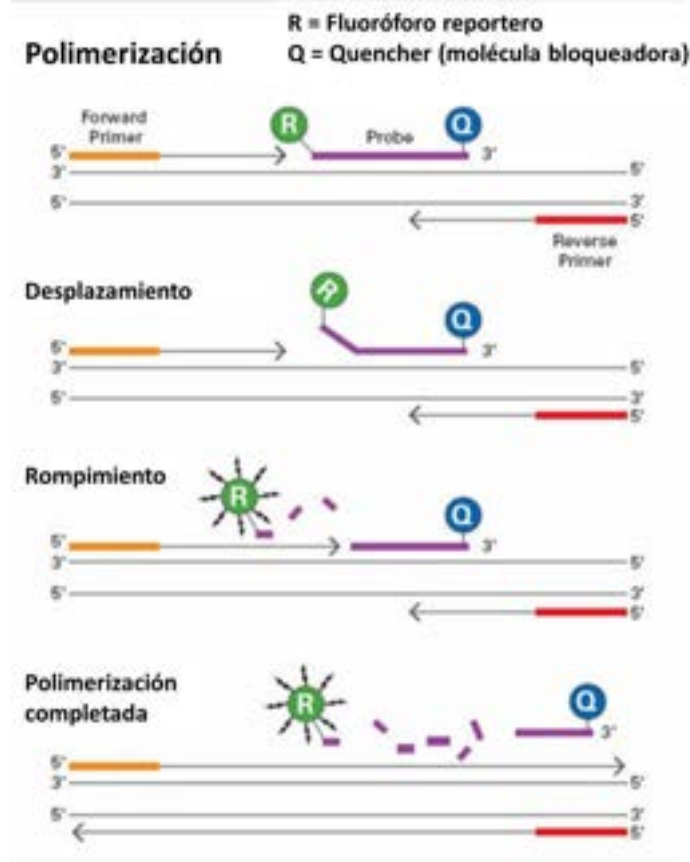
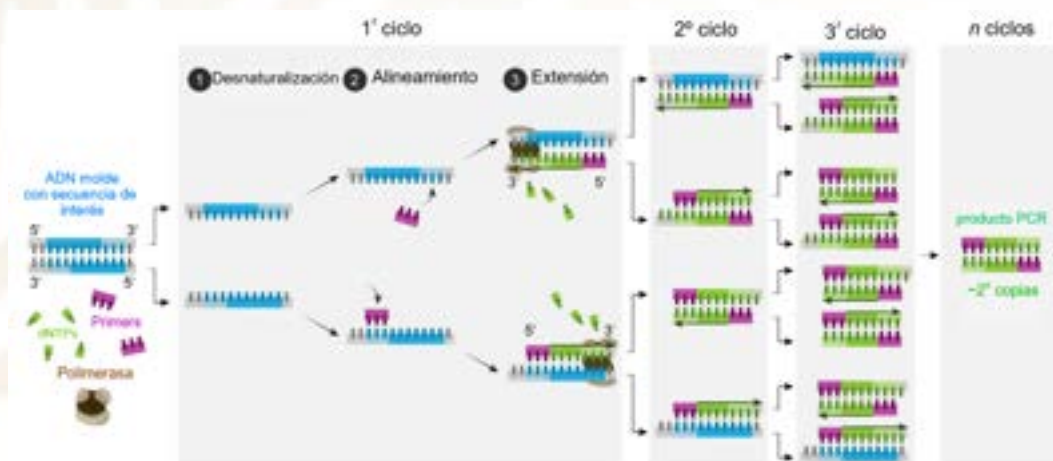


Diagrama de tiras de inmunodetección vertical. (Fuente: Maldonado et al., 2007)

Análisis de ADN basado en PCR

PCR punto final

Determina la presencia o ausencia de la secuencia de ADN insertada en el organismo al final de los ciclos de amplificación seguido de una separación por electroforesis de los fragmentos amplificados (Fernández, 2017).



PCR en tiempo real

Determina límites de detección y cuantificación, de esa manera se pueden obtener contenidos aproximados del transgen con mayor precisión.

La PCR en tiempo real ha sido utilizada debido a su desarrollo cuantitativo, así como por una mayor sensibilidad (Maldonado et al., 2007).

Prueba rápida para la detección de algodón resistente al herbicida glifosato

El glifosato es un herbicida no selectivo sistémico de acción foliar, que ingresa a la planta a través de las hojas para posteriormente migrar a otras partes del tejido vegetal donde será mínimamente metabolizado (Cortina, et al., 2017).

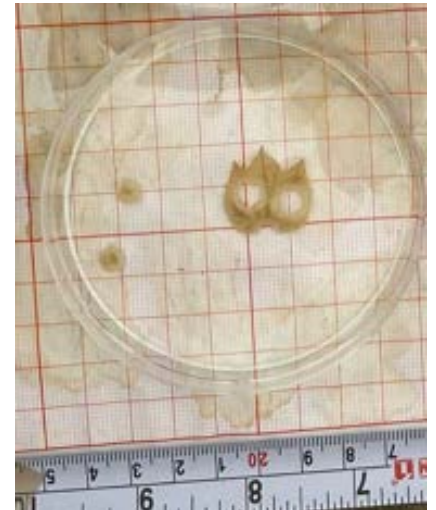
Este herbicida actúa a través de la inhibición de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos en las plantas (triptófano, fenilalanina y tirosina) mediante la inhibición de la enzima 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato-sintetasa (EPSPS) (López, 2011).

A las plantas resistentes a glifosato se les insertó el “*epsps*” de la cepa cp4 de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, con la inserción de este gen no se ve afectada la síntesis de la enzima EPSPS por lo que la producción de aminoácidos esenciales continua y la planta no muere ante la aparición de glifosato (Nadula, 2010).

Las plantas tolerantes al glifosato al estar en contacto con este herbicida no presentan cambios de coloración en sus hojas, mientras que las plantas sin el gen “*EPSPS*” presentan pérdida de pigmentación provocada por clorosis y finalmente mueren.



Hoja GM tolerante a glifosato



Hoja no GM

Al evaluar cada una de las técnicas propuestas para la detección de transgenes en plantas de algodón, se identificaron las ventajas y desventajas de cada una de ellas, advirtiendo que estas son complementarias para el análisis de las muestras, y dependerá tanto de los recursos con los que se cuente como de las condiciones de campo para poder decidir sobre su uso y poder reducir el riesgo de falsos negativos.

Estos resultados requieren adecuación a las condiciones espacio temporales, ya que a medida que cambia la probabilidad de encontrar nuevas secuencias y proteínas en el ambiente se deben establecer los protocolos

3. Informe sobre el establecimiento y sobrevivencia de plantas de material convencional para la obtención de semilla básica libre de transgenes

Meta

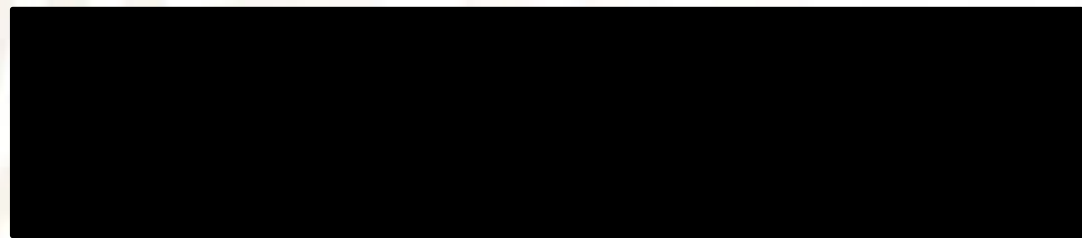
Establecer 600 plantas de material convencional en invernadero para la obtención de semilla básica libre de transgenes, suficientes para el establecimiento de 3 parcelas experimentales en etapas subsecuentes del proyecto fue necesario evaluar las condiciones previas de los invernaderos en INIFAP e IBUNAM

Siembra de plantas en los invernaderos

En el Invernadero [redacted] se sembraron las semillas de algodón en tres etapas:

1. Septiembre 2022
2. Octubre de 2022
3. Noviembre de 2022

Se sembraron un total de 600 plantas.



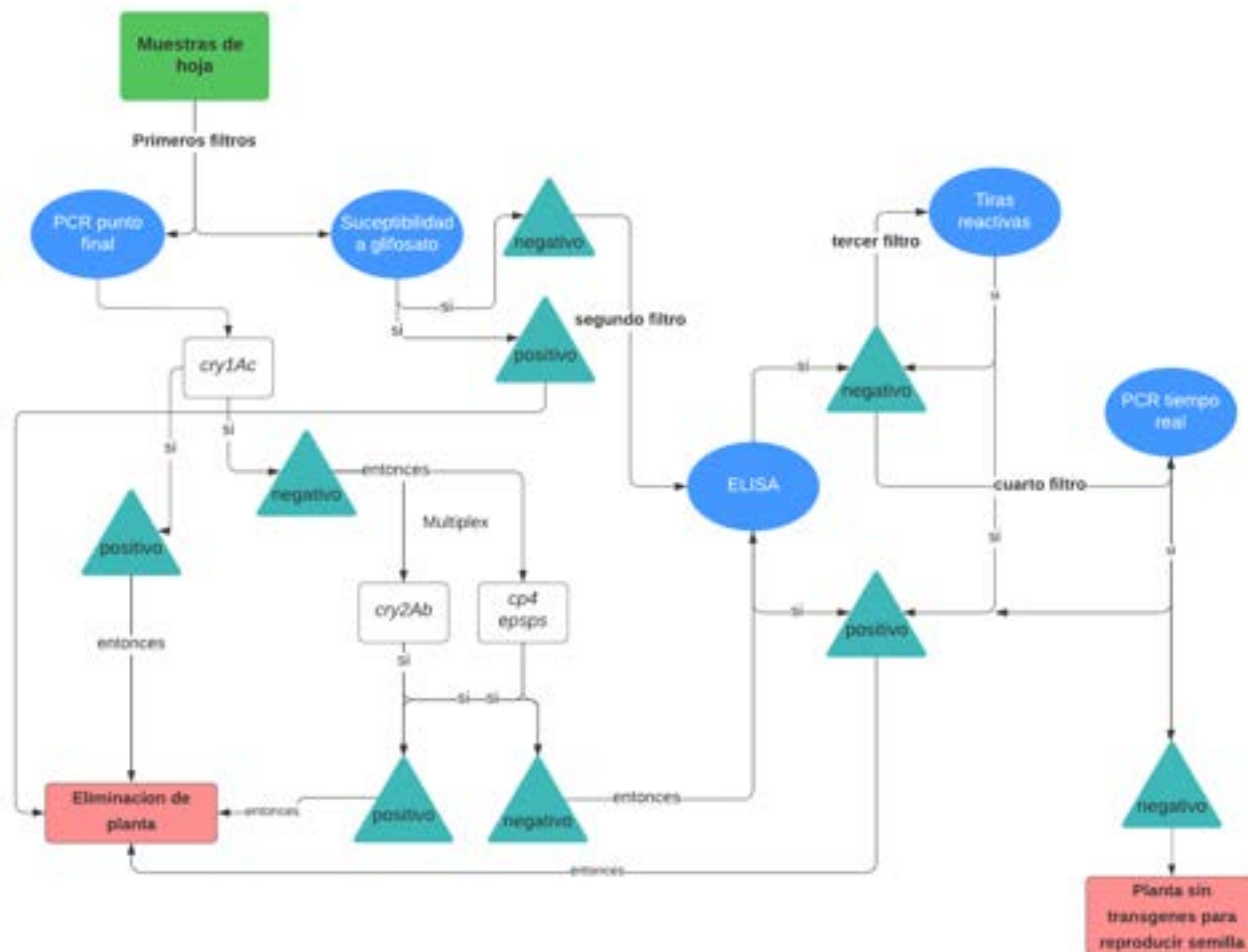
Preparación del sustrato



Siembra de plantas en invernadero



Estrategia para realizar el monitoreo de la presencia/ausencia de transgenes, con cuatro filtros, durante el desarrollo de las 600 plantas



Análisis empleados en el monitoreo de presencia/ausencia de transgenes.

1. PCR punto final
2. Susceptibilidad a glifosato
3. ELISA
4. Tiras reactivas
5. PCR tiempo real

Semillas que germinaron: 1,133

Sobrevivencia: 834

Plantas libres de transgenes: 180 individuos

Tabla 1. Número de plantas analizadas por cada técnica de detección de transgenes.

Técnica usada para la detección de transgenes	Número de plantas procesadas	Muestras positivas para la presencia de transgenes	Muestras negativas para la presencia de transgenes	Total de pruebas realizadas
Prueba rápida de susceptibilidad a glifosato	87	0	87	87
PCR punto final	738	257	180	2,234
PCR tiempo real	31	0	31	31
ELISA	182	2	180	415
Tiras reactivas	61	0	61	61

Se logró estandarizar las diferentes técnicas de detección de transgenes, gracias a la siembra de plantas en tres diferentes regiones.

Establecer la siembra de plantas en tres regiones redujo el riesgo de perder el material vegetal por eventualidades climáticas y/o de inseguridad.

Tras la detección y eliminación de las plantas con transgenes, cribar las muestras de plantas negativas incrementa la probabilidad de producir semilla libre de transgenes.

4. Informe del manejo agrícola de plantas de algodón libres de transgenes en invernadero

Meta

Describir el plan de manejo agrícola en diferentes etapas de crecimiento para las plantas de algodón que crecen en invernadero.

Manejo de plagas y enfermedades

El manejo consistió en dos etapas: prevención y eliminación

Prevención:

Aplicación de producto orgánico a base de extractos de neem y canela.

Eliminación:

Se aplicaron insecticidas sistémicos y de contacto: Imidacloprid (210 g i.a./L) y Betacyfluthrin (90 g i.a./L), que controlan y eliminan las poblaciones de insectos chupadores, larvas de lepidópteros y algunos coleópteros.

Para la prevención y control de gusanos belloteros (*Helicoverpa zea*, *Heliothis virescens*), gusano trozador (*Spodoptera* sp.), gusano soldado (*Spodoptera exigua*), gusano peludo (*Estigmene acrea*), gusano rosado (*Pectinophora gossypiella*), perforador (*Bucculatrix thurberiella*), gusano falso medidor (*Trichoplusia ni*) se aplicó un piretroide de amplio espectro a los 60 y 90 días.

Enfermedades:

Las plantas que presentaron pudrición de la raíz fueron eliminadas y a las plantas restantes se les aplicó un biofertilizante a base de hongos (*Trichoderma* sp. *Aspergillus* sp. *Penicillium* sp.) y bacterias (*Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis* y *Azotobacter* sp.)



Manejo de plagas y enfermedades

Mediante la implementación del manejo agrícola en dos etapas (prevención y eliminación) se evitó la propagación de mosquita blanca, y de otros insectos que pudieran comprometer la salud de las plantas. Así mismo, la eliminación temprana de plantas con pudrición en la raíz permitió detener la infección en el resto de las plantas, sin embargo es importante que se defina cuál es la causa de esta enfermedad.

5. Artropodofauna asociada al algodón convencional *Gossypium hirsutum* durante su desarrollo y crecimiento en condiciones de invernadero

Meta

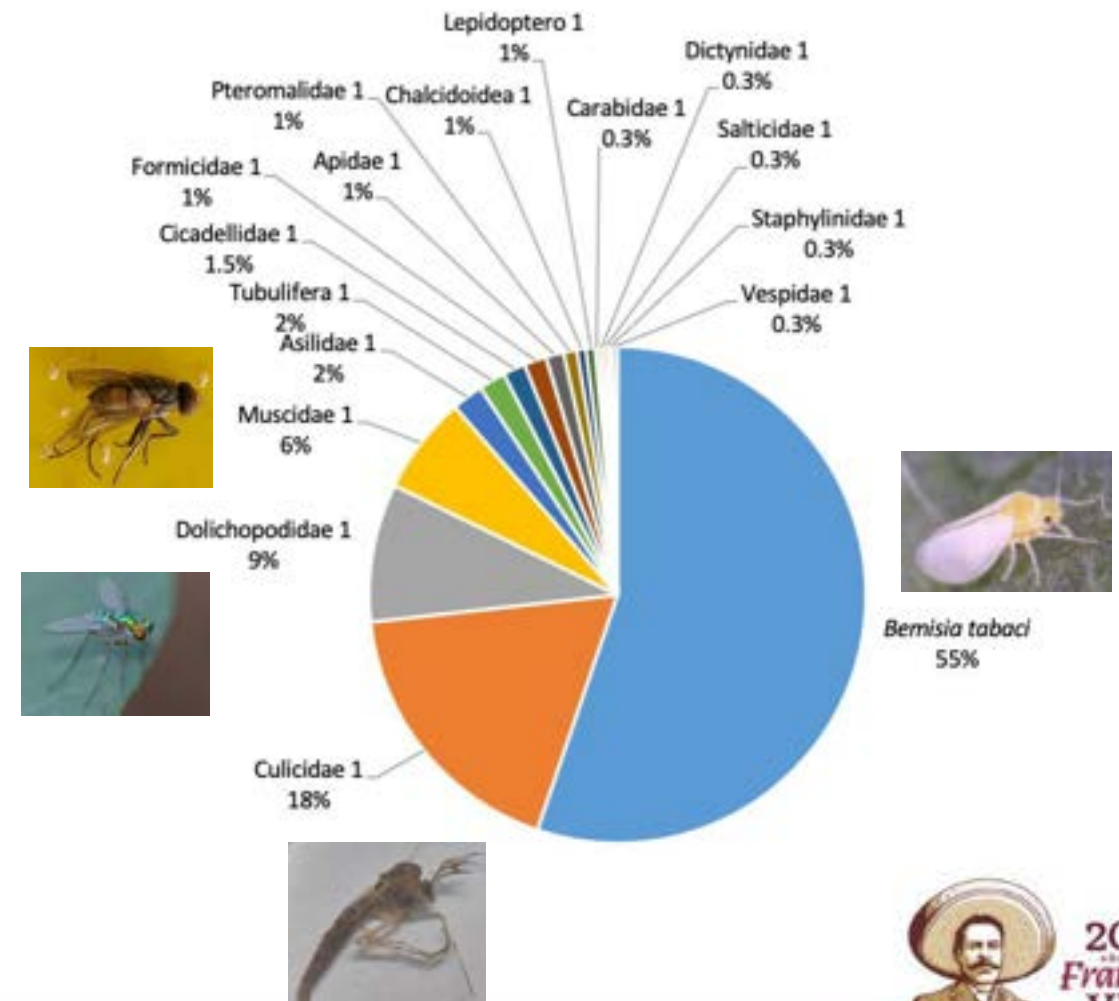
Describir la artropodofauna presente en el invernadero y determinar aquellos organismos con el potencial de ser plaga para el cultivo de algodón.

Comunidad de artrópodos en el invernadero durante el desarrollo del cultivo

La comunidad de artrópodos presente en el invernadero **estuvo compuesta de 17 morfotipos**, a partir de 344 individuos colectados por medio de trampas acuosas y pegajosas.

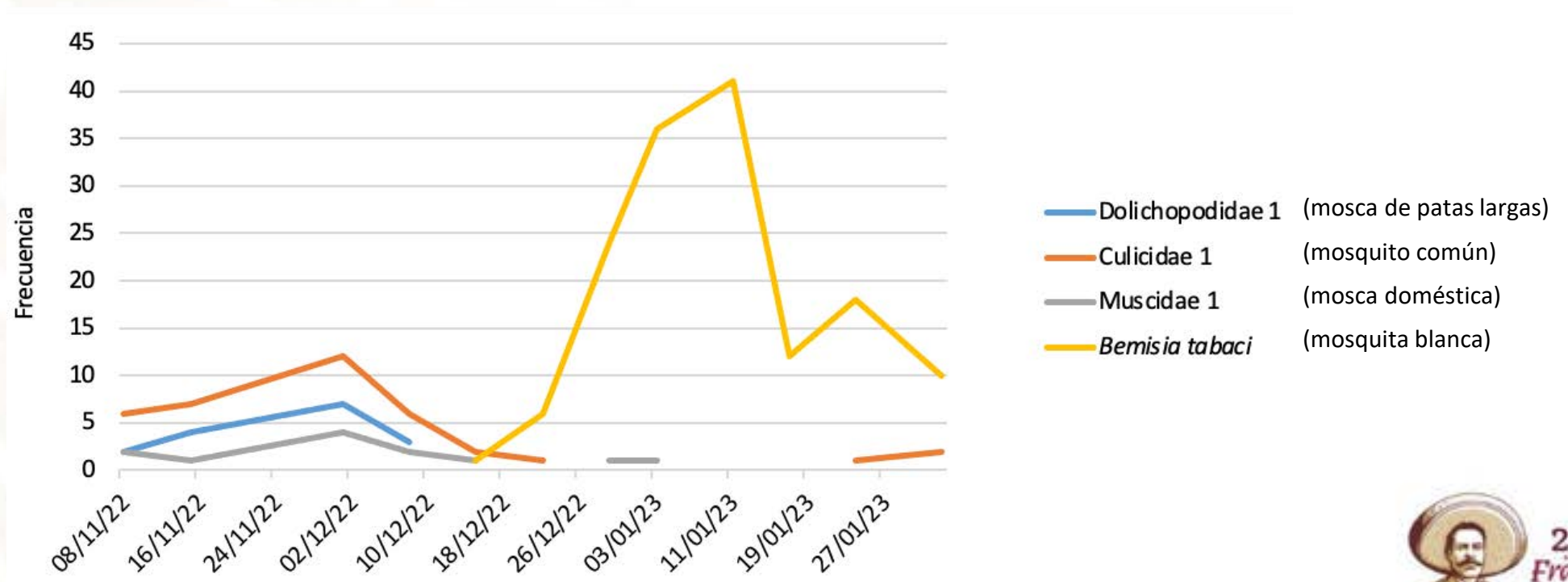
Los **morfotipos más abundantes** fueron la **mosquita blanca** (*Bemisia tabaci*), un **mosquito común** (Culicidae 1), y **dos tipos de moscas** (Dolichopodidae 1 y Muscidae 1). En conjunto **conforman el 88% de los individuos colectados** durante 3 meses.

Se encontraron polinizadores como abejas, las cuales son indeseables en este sistema debido a su potencial como vectores de flujo génico de algodones con transgenes del exterior.



Fluctuación poblacional de los artrópodos más abundantes

En diciembre de 2022 hubo un pico para tres morfotipos. Mientras que la mosquita blanca (*B. tabaci*) presentó su pico en enero de 2023 y fue tres veces más alto que el segundo morfo más abundante.



Fluctuación poblacional de los artrópodos más abundantes

Se registraron artrópodos fitófagos dentro del invernadero y daños a los algodones, sin embargo, la mosquita blanca (*Bemisia tabaci*) fue la especie con mayor potencial de convertirse en plaga, la cual no llegó a ser problema por el manejo agrícola aplicado, se utilizó un control integral con insecticidas, repelentes orgánicos, agua con jabón y trampas de insectos. Por lo que en enero de 2023 se observó un decaimiento en su población.



Minas foliares



Defoliación



Manchas foliares



Métodos de control de plagas

El monitoreo de la artropodofauna asociada al cultivo de algodones perennes en el invernadero, es indispensable para conocer la presencia de especies con potencial de convertirse en plaga y poder actuar a tiempo con un control integral.

Los artrópodos que se registraron en este estudio y que fueron potencialmente un riesgo para el cultivo de algodón perenne fueron en su mayoría organismos voladores (i.e., mosquita blanca, y abejas), es importante una constante revisión a las instalaciones de los invernaderos con el fin de reducir la entrada de estos organismos.

Con base en estos resultados se avanzó en la estructura del manuscrito sobre el catálogo artropofauna asociada a cultivos de algodón perennes en invernadero.

6. Avances del manuscrito de catálogo de artropodofauna versión digital, con el método de captura y análisis para divulgación.

Meta

Elaborar la propuesta de contenido para el catálogo de artropodofauna asociada al algodón.

Propuesta de índice para el catálogo de artropodofauna asociada al algodón

Actividad:

Se presenta propuesta de índice para el catálogo de la artropodofauna asociada al algodón, se propone que el catálogo está conformado de la siguiente manera:

Sección 1: Introducción

Sección 2: Metodologías para la colecta e identificación taxonómica y molecular de los artrópodos asociados a cultivos algodoneiros en Baja California y Sonora.

Sección 3: Catálogo de artropodofauna asociada al cultivo algodoneiro en el Valle de Mexicali en Baja California y Valle del Yaqui, Sonora

7. Lista de posibles líneas progenitoras convencionales candidatas: bases para una colección de semillas de materiales de propagación de algodón convencional libre de transgenes

Meta

Conformar una colección de materiales de propagación de algodón convencional libre de transgenes.

Actividad: Establecimiento de colección de semillas de algodón

- Acopio de material convencional:
 - Cinco cultivares convencionales desarrollados por el Inifap (1980-1990) y multiplicadas en Delicias, Chihuahua en 2017:
 - Cian Precoz,
 - Cian 95,
 - Nazas 87,
 - Laguna 89 y
 - Juárez 91.
 - 16 líneas convencionales de distintos orígenes, destacan los siguientes colectadas en campo:
 - Egipto,
 - India,
 - Organizaciones BetterCotton y
 - Semillas Sostenibles Ibérica.
- Solicitud de donación de 15 accesiones de la colección de germoplasma de algodón de USDA (CottonGen). Elegidas con base a caracteres de resistencia a enfermedades, plagas y condiciones ambientales. Procedencias: EEUU, China, Australia y Pakistán.



Visita a zona algodонера en Chihuahua

Visita a zonas algodonerías en Chihuahua.

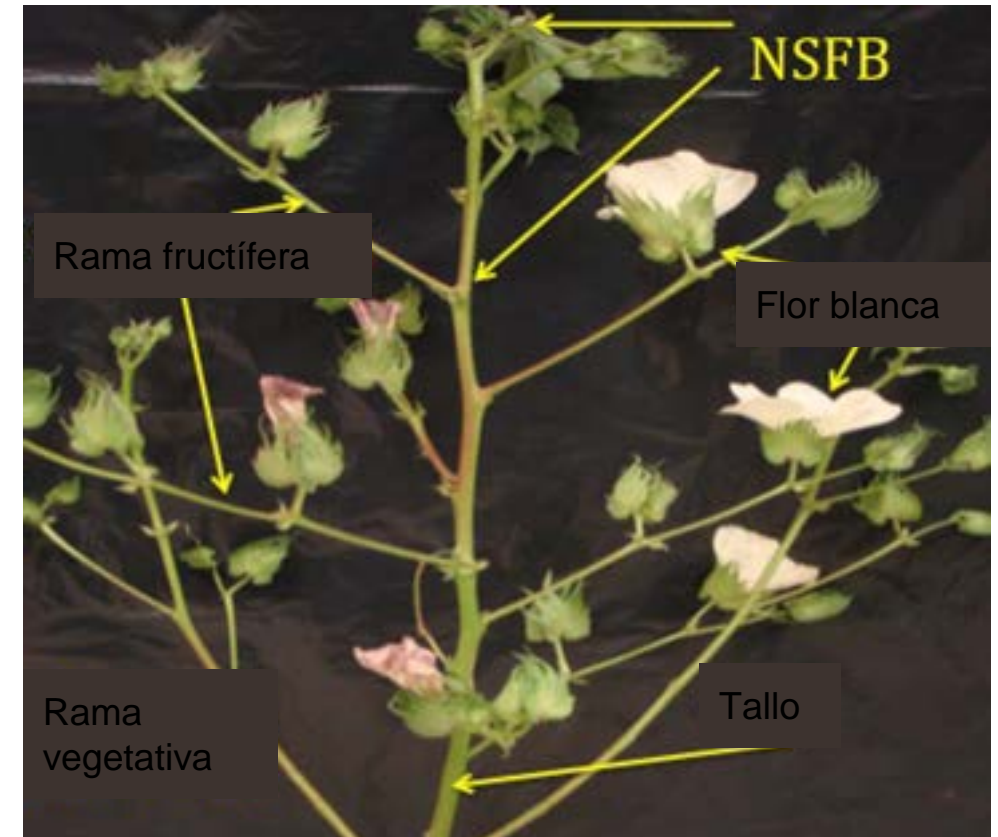
- Despepite de ALGODONERA UNIÓN DEL PROGRESO SPR DE RL DE CV, en la Colonia Nueva Holanda, Ojinaga.
- Comité Estatal de Sanidad Vegetal, Delicias.

Las personas entrevistadas no cuentan con un acopio de semillas convencionales utilizadas o conservadas.



Consiste en la toma de datos en, por lo menos, cuatro puntos de muestreo de cinco plantas. Se obtendrán un total de doce variables en tres periodos de monitoreo.

- **Prefloración:** patrón de crecimiento temprano, desarrollo de nudos y área foliar.
- **Floración:** velocidad para alcanzar madurez fisiológica, retención de flores y fructificación.
- **Pre-maduración:** madurez de las bellotas y su apertura, coordinación de actividades de ayuda a la cosecha.



Se cuenta con semilla de 21 cultivares potencialmente convencionales con las que se inicia la colección de germoplasma parental.

Se identificaron 15 líneas que se solicitarán al USDA, estas se eligieron por ser tolerantes al estrés biótico y abiótico.

Se logró el establecimiento de la colección en tres sitios diferentes, lo que permitirá observar la adaptación a las condiciones ambientales de cada uno de los sitios.

8. Evidencias fotográficas de invernaderos adecuados para líneas progenitoras

Meta

Habilitar invernaderos y compra de insumos para realizar la siembra de plantas de algodón Azteca para la obtención de semilla convencional libre de transgenes, así como para el establecimiento de una colección de potenciales plantas progenitoras en las instalaciones del Campo Experimental La Campana (CIRNOC) del INIFAP.

Campo experimental La Campana (CIRNOC)



Ubicación: [Redacted]

Instalaciones: Cuenta con 3 invernaderos para el desarrollo del proyecto

Actividades realizadas: Habilitación y adecuación de los invernaderos.

Recursos humanos: Personal de apoyo en campo para realizar estas actividades.



Habilitación y restauración Invernadero 1

Características: Invernadero de plástico de 4 x 5 m². Cuenta con piso de malla y grava para evitar el crecimiento de malezas, conexión de agua y tinaco para riego.

Actividades realizadas: Limpieza y deshierbe, reemplazo de plástico de ventanas, reparación de la puerta, ventilador y de la conexión del riego, arreglos menores de malla antiáfidos, e instalación de una puerta-cortina de malla antiáfidos con cierre para el acceso.

Uso: Se utilizará para sembrar en maceta plantas para producción de semilla libre de transgenes.

*Cabe mencionar que el arreglo realizado en el riego se hizo con el objetivo de aportar de agua a otro invernadero.



Habilitación y restauración Invernadero 2

Características: Invernadero de plástico de dimensión 5x6 m² para siembra directa en suelo.

Actividades realizadas: Colocación de malla antiáfidos en las ventanas, cambio de plásticos, conexión al sistema de riego, colocación de piso en la caseta sanitaria y puerta.

Uso: Se utilizará para la producción de semillas libres de transgenes.



Habilitación y restauración Invernadero 3

Características: Invernadero de malla sombra de 6 x 10 m².

Uso: siembra en macetas de plantas para la colección de germoplasma del algodónero.

Actividades realizadas: Limpieza y deshierbe, instalación de puerta, reparaciones menores de la malla sombra y mantenimiento del sistema de riego.



Habilitación y restauración Invernadero 1, Jardín Botánico, UNAM

Características: Invernadero de plástico y malla antiáfidos 6 x 5 m².

Uso: siembra en macetas de plantas para la producción de semillas libres de transgenes.

Actividades realizadas: Limpieza y deshierbe alrededor del invernadero, instalación de puerta de válvula con doble cierre, reparaciones menores de la malla de ventanas y mantenimiento al sistema de riego y desagüe.





Material para sustrato:

- “Dompe” de tierra de jardín),
- Peatmoss,
- Tambos para esterilizar sustrato

Sustrato:

Mezcla de tierra de jardín y peatmoss en una proporción 1:1.

Conclusión

Durante la etapa se cumplió con la adecuación de tres invernaderos en el Campo Experimental La Campana (CIRNOC) del INIFAP y uno en el Instituto de Biología de la UNAM (IBUNAM), como preparativo para la siembra de la línea convencional Azteca y de la colección de germoplasma convencional durante la segunda etapa del proyecto.

Conclusión general

Se generaron las bases para poder establecer un programas de mejoramiento genético del algodónero comercial libre de transgenes. El desarrollo depende de la resolución de retos para su implementación a mayores escalas, mucha organización de logística para la trazabilidad y el empleo de recursos en los análisis moleculares.