

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA  
DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO



Estandarización de Protocolos para Bioensayos con *Spodoptera frugiperda* en  
Algodón Genéticamente Modificado

Por:

**EMIR JONATHAN ROBLERO GUZMÁN**

TESIS

Presenta como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN**

Saltillo, Coahuila, México

Noviembre, 2019.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA  
DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO

Estandarización de Protocolos para Bioensayos con *Spodoptera frugiperda* en  
Algodón Genéticamente Modificado

Por:

**EMIR JONATHAN ROBLERO GUZMÁN**

TESIS

Presenta como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN**

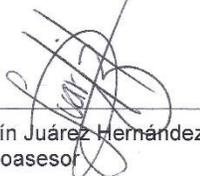
Aprobada por el Comité de Asesoría:



Dr. Luis Alberto Aguirre Uribe  
Asesor Principal Interno



Dra. Miriam Sánchez Vega  
Asesor Principal Externo



Dr. Agustín Juárez Hernández  
Coasesor

Arturo Mancera  
Dr. Arturo Mancera Rico  
Coasesor



Dr. José Antonio González Fuentes  
Coordinador de Agronomía



Saltillo, Coahuila, México  
Noviembre, 2019

## **AGRADECIMIENTOS**

A **DIOS** por darme bendiciones todos los días, por siempre cuidar de mí y de toda mi familia y nunca dejarme solo en momentos difíciles, todos los días daré lo mejor de mí, realizare las cosas lo mejor posible y ayudaré a los demás, siempre. Sé que grandes momentos vendrán y con Dios siempre estaré muy agradecido.

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro**, por haberme dado la oportunidad de empezar y concluir una meta más en mi vida, siempre llevaré momentos muy gratos, fue y será mi segundo hogar, donde adquirí conocimientos, visiones, metas, y sobre todo amistades para toda la vida, los llevaré siempre en mi mente y corazón, gracias.

## DEDICATORIA

### ***A mis padres:***

**Artemio Roblero Gonzales y Eloísa Guzmán Arriaga**, por darme su apoyo incondicional, a pesar de la distancia siempre estuvieron al pendiente de mi dándome ánimos para que saliera adelante y sobre todo les agradezco mucho por los principios, valores y consejos que me ensañaron para hacerme una persona de bien y así sentirme muy orgulloso de ser quien soy y del lugar de donde vengo.

### ***A mis hermanos:***

Por siempre darme su apoyo y consejos en todo momento, así como su orientación para que logre mis metas y sueños.

### ***Amigos:***

A todos los que siempre estuvieron conmigo a lo largo de mi formación agradecerles mucho por siempre brindarme su apoyo, principalmente Paola, Flor, Lázaro, Marilyn, Doc. Adriana, siempre estaré muy agradecido con Dios por haberme dado grandes amistades y siempre les deseare lo mejor, de ante mano gracias.

A la **Dra. Mirian Sánchez Vega** por darme la oportunidad y confianza y sobre todo el apoyo en todo el proceso de la realización de este trabajo, ya que sin su valiosa cooperación y ayuda no hubiese sido posible llevarse a cabo...gracias.

A todas las personas que en la vida me ha tocado conocer, y de los cuales he aprendido mucho, gracias por haberme regalado consejos, motivaciones o palabras de aliento y correcciones en mi persona, gracias porque siempre recordare de todos ustedes un poco. Espero aprender de muchas personas más que la vida me regale a lo largo de mi historia.

# ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS .....	i
DEDICATORIA.....	ii
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	iii
ÍNDICE DE CUADROS .....	v
ÍNDICE DE FIGURAS .....	vii
RESUMEN.....	viii
I. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Objetivos .....	2
1.1.1. Objetivo general.....	2
1.1.2. Objetivo específicos.....	3
1.1.3. Hipótesis .....	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. Importancia de las plagas en la producción agrícola.....	4
2.1.1. Descripción y ciclo de vida de <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	5
2.1.2. Descripción y ciclo de vida de <i>Spodoptera exigua</i> .....	6
2.1.3. Descripción y ciclo de vida de <i>Helicoverpa zea</i> .....	7
2.1.4. Descripción y ciclo de vida de <i>Heliothis virescens</i> .....	8
2.2. Importancia de los cultivos genéticamente modificados con genes de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	9
2.2.1. Mecanismos y modo de acción de las toxinas Cry.....	10
2.2.2. Resistencia de insectos a las toxinas Cry .....	11
2.2.3. Efecto de las toxinas Cry sobre las plagas.....	13
2.3. Antecedentes de estudios realizados con tablas de vida en insectos.....	14
2.4. Tipos de bioensayos que se establecen para evaluar cultivos Bt o resistencia.....	15
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
3.1. Localización del experimento .....	16
3.2. Material biológico .....	16
3.3. Muestreos del material biológico .....	17
3.4. Identificación de especies .....	17
3.5. Cría de lepidópteros.....	17
3.5.1. Tabla de vida de las poblaciones de lepidópteros .....	18
3.6. Establecimiento de bioensayos.....	19
3.6.1. Descripción de los bioensayos.....	20

3.7. Análisis estadísticos.....	22
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	23
4.1. Especies de lepidópteros colectadas .....	23
4.2. Cría de lepidópteros.....	26
4.2.1. Tabla de vida para <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	29
4.3. Bioensayos .....	34
4.3.1. Primer bioensayo.....	34
4.3.2. Segundo bioensayo.....	36
4.3.3. Tercer bioensayo.....	38
V. CONCLUSIONES.....	40
VI. LITERATURA CITADA.....	41

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Dieta artificial para lepidópteros: <i>Heliothis virescens</i> , <i>Helicoverpa zea</i> y <i>Spodoptera spp.</i> Ingredientes para un litro de dieta.....	18
Cuadro 2. Colectas de material biológico de lepidópteros plaga, para establecimiento de líneas presuntamente susceptibles a las toxinas Cry del Bt, provenientes del centro y occidente de México, 2017.....	24
Cuadro 3. Recolectas de material genético para establecimiento de líneas presuntamente resistentes a las toxinas Cry del Bt, de la región productora de algodón GM, en el estado de Coahuila, 2017 .....	26
Cuadro 4. Tabla de vida de la especie <i>S. frugiperda</i> en periodo de adaptación a las condiciones artificiales de laboratorio para cría y mantenimiento, en la cohorte del centro de México, 2017.....	30
Cuadro 5 .Tabla de vida de la especie <i>S. frugiperda</i> en periodo de adaptación a las condiciones artificiales de laboratorio para cría y mantenimiento, en la cohorte de la Región lagunera, México, 2017.....	30
Cuadro 6. Cuadros medios del análisis de varianza sobre la mortandad de larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> , alimentadas con explantes de hoja y fruto de 10 híbridos de algodón GM. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México, 2017. ....	34
Cuadro 7. Comparación de medias ajustadas entre híbridos de algodón por la prueba de Kruskal-Wallis, para el porcentaje de mortalidad con dieta natural (explantes de hoja/rebanada de bellota). Buenavista, Saltillo, Coahuila, México, 2017.....	36

Cuadro 8. Cuadrados medios del análisis de varianza sobre la mortandad de larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> , alimentadas con fruto (rebanadas centrales de bellotas con 1.5 a 2.0 cm de diámetro) para 10 híbridos de algodón GM. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México, 2017.....	37
Cuadro 9. Cuadrados medios del análisis de varianza sobre la mortandad de larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> , alimentadas con explantes de hoja (1.0 cm <sup>2</sup> ) para 10 híbridos de algodón GM. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México, 2017. ....	38
Cuadro 10. Comparación de medias ajustadas entre híbridos de algodón por la prueba de Kruskal - Wallis, para el porcentaje de mortandad con dieta a base de hojas de Algodón Buenavista, Saltillo, Coahuila, México, 2017.....	40

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proporción de las especies de lepidópteros colectadas en localidades del centro y occidente del país. México, 2017. ....	23
Figura 2. Proporción de las especies de lepidópteros colectadas en la región de La Laguna, México, 2017. ....	25
Figura 3 Cámara de oviposición utilizada en la cría y mantenimiento de colonias de lepidópteros. ....	28
Figura 4. Supervivencia (Ix) por generaciones de <i>Spodoptera frugiperda</i> bajo condiciones de laboratorio. Población proveniente del centro de México, 2017. ...	32
Figura 5. Supervivencia por generaciones de <i>Spodoptera frugiperda</i> bajo condiciones de laboratorio, población proveniente de la Región lagunera, México, 2017. ....	33

## RESUMEN

El control de insectos plaga es muy importante en la agricultura, no sólo por la razón obvia de que los insectos se alimentan de los cultivos, sino además porque son vectores de importantes enfermedades. Una herramienta de control biológico la constituye el uso de la bacteria *Bacillus thuringiensis* que produce cristales de proteínas denominadas Cry, que cuando los insectos las ingieren al alimentarse de la planta, las proteínas se procesan y liberan una *delta*-endotoxina que se une a las células intestinales creando poros, llevando a un desbalance de iones y a la parálisis del sistema digestivo que provoca la muerte de la larva en pocos días. El objetivo de este trabajo fue evaluar protocolos de cría y mantenimiento de lepidópteros tanto susceptibles como presuntamente resistentes a las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* (Bt). Se estimó la supervivencia hasta la F5 de *Spodoptera frugiperda* como una especie susceptible a las toxinas Cry de Bt; además, se establecieron bioensayos con poblaciones de este lepidóptero, donde se probó la fuente de toxinas Cry mediante explantes de hojas y bellotas provenientes de ocho híbridos de algodón Bt (DP1321 B2RF, DP0912 B2RF, DP0935 B2RF, FM1740 B2F, FM1830 GLT, FM1900 GLT, FM2007 GLT, FM2334 GLT) uno con gen de resistencia a herbicidas (FM1441) y uno convencional (DP989). Se realizó un diseño experimental completamente al azar en los bioensayos y una comparación de medias con el método de Kruskal-Wallis. Los explantes de hoja presentaron el mayor porcentaje de mortandad (63.37%), y la dieta con bellota se expresó menor porcentaje (56.62%). Los híbridos DP989, DP0912 y FM1740 fueron estadísticamente diferentes al resto, con menor porcentaje de mortandad, lo que indica que las larvas se adaptaron a la dieta o la fuente de toxina Cry en esos híbridos, no fue tan efectiva por las condiciones en las que se colectó el material vegetal. La utilización de explantes de hoja de híbridos de algodón Bt son una fuente de toxinas Cry en el establecimiento de bioensayos para protocolos de investigación y permiten evaluar poblaciones de lepidópteros presuntamente resistentes provenientes de campos cercanos a los cultivos Bt.

**Palabras clave:** Cultivos Bt, *Spodoptera frugiperda*, algodón, toxinas Cry, resistencia.

## I. INTRODUCCIÓN

El control de insectos plaga es muy importante en la agricultura, no sólo por la razón obvia de que los insectos se alimentan de los cultivos, sino además porque son vectores de importantes enfermedades causadas por virus, bacterias, protozoarios y hongos. Una herramienta de control biológico contra plagas la constituye el uso de la bacteria *Bacillus thuringiensis*, que vive normalmente en el suelo y que al esporular produce una proteína en grandes cantidades que llega a formar un cristal geométrico. La proteína principal de este cristal se llama *delta*-endotoxina, también conocida como proteína Cry. La biotecnología agrícola ha sido empleada en un número importante de cultivos agrícolas como maíz, algodón, soya, canola, papa, tomate, lechuga, entre otros, y los principales logros han sido alcanzados con un limitado número de rasgos y modificaciones genéticas, entre ellas la tolerancia a herbicidas, insectos y enfermedades (Galeano *et al.*, 2015).

El desarrollo de plantas resistentes a algunas plagas ya es una realidad y se han comprobado los beneficios derivados de esta tecnología en diversos cultivos y en diferentes partes del mundo cultivos económicamente importantes como el algodón y el maíz han sido transformados genéticamente introduciendo genes que codifican proteínas con acción insecticida contra las principales plagas de estos cultivos. (Galeano *et al.*, 2015).

Los lepidópteros son una de las plagas de mayor importancia en la agricultura y son el objetivo principal a la cual se destinó el mejoramiento de cultivos mediante la ingeniería genética; las toxinas Cry en los cultivos Bt, como el algodón, matan plagas clave del Orden Lepidoptera como *Heliothis virescens*, *Pectinophora gossypiella*, *Helicoverpa zea* y *Spodoptera frugiperda*, esta última especie es la principal plaga de maíz en nuestro país, así como en América del Sur y del Norte. Es una plaga polífaga que se alimenta de una variedad de cultivos diferentes además del maíz (Aranda *et al.*, 1996; Blanco *et al.*, 2010).

Además, es una plaga invasiva que se ha extendido rápidamente en los países de América Latina, África y Asia que pone en peligro la producción de maíz, mijo y sorgo en esos países<sup>1</sup> (Goergen *et al.*, 2016).

Las toxinas Cry muestran baja toxicidad contra *S. frugiperda* y puede desarrollar resistencia a las toxinas Cry, esta es la amenaza grave para la eficacia de las toxinas Bt, principalmente en campo. Por lo que el desarrollo de bioensayos donde se pruebe la eficiencia de una fuente confiable de toxinas Cry con esta especie favorece al conocimiento de esta plaga con respecto al efecto que pueda ocurrir en campo con la tecnología Bt. Por lo antes señalado en el presente trabajo de investigación se realizó la estandarización de protocolos para determinar si son factibles en la determinación de la resistencia de lepidópteros a las toxinas Cry del Bt, dentro del proyecto 1043 de Cátedras-CONACYT, titulado: “Monitoreo de la resistencia de insectos a las toxinas Cry del Bt”. Por lo que se realizaron pruebas con material vegetal de algodón GM y convencional y una población de *S. frugiperda* de laboratorio.

## **1.1. Objetivos**

### **1.1.1. Objetivo general**

Estandarizar protocolos de cría y mantenimiento de lepidópteros tanto susceptibles como presuntamente resistentes a las toxinas Cry del *Bacillus thuringiensis* (Bt), así como de bioensayos para determinar la condición de resistencia en poblaciones de lepidópteros presentes en los campos de algodón Bt de México.

---

<sup>1</sup> <https://www.cabi.org/isc/datasheet/29810>

### **1.1.2. Objetivo específicos**

- Establecer poblaciones de lepidópteros tanto susceptibles, como presuntamente resistentes a las toxinas Cry de Bt, provenientes de campo, bajo condiciones de laboratorio, para su cría y mantenimiento.
- Obtener parámetros de ecología poblacional relacionado a tablas de vida por cohorte de la especie *Spodoptera frugiperda*, bajo condiciones artificiales de laboratorio.
- Ajustar las condiciones adecuadas para llevar a cabo bioensayos con material vegetal proveniente de algodón Bt y poblaciones de *S. frugiperda*, con la finalidad de determinar si existe resistencia a las toxinas Cry de Bt.

### **1.1.3. Hipótesis**

- Las condiciones artificiales para la cría y mantenimiento de poblaciones de *S. frugiperda* en laboratorio reducen la esperanza de vida de dichos insectos.
- El uso de material vegetal fresco de algodón Bt, como alimento en bioensayos es factible como fuente de toxinas Cry para determinar la resistencia de insectos a las toxinas Cry de Bt.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Importancia de las plagas en la producción agrícola

La agricultura, tal como la conocemos, mayormente basada en la masiva aplicación de agroquímicos y el uso de cultivares mejorados de alto potencial de rendimiento, recién ha hecho su aparición, tan solo un instante en la historia del género humano sobre este planeta (Sarandón & Flores, 2014).

En la actualidad la producción agrícola y particularmente la sanidad vegetal, se enfocan cada vez más en estrategias de manejo basadas en las tecnologías de la información, mismas que han mostrado ser de gran utilidad para incrementar la productividad de los cultivos y aminorar la contaminación y el impacto ambiental (Pesquera, 2016)

El concepto de plaga agrícola implica reducción en el valor o en el beneficio económico que se obtiene de la cosecha; puede tratarse de reducciones en cantidad de la cosecha, en la calidad del producto, o en el incremento de los costos de producción. Se entiende por pérdida de calidad el deterioro en la presentación o aspecto del producto cosechado, o la disminución de su valor nutritivo u otra cualidad que influya en el uso del producto y baje su valor unitario. Cuando la reducción de la cosecha se produce en grandes extensiones, la escasez del producto suele traer consigo el incremento de su precio en el mercado (Cisnero H. , 2018).

El hombre ha logrado dominar el ecosistema; sin embargo, actualmente, con el acelerado avance científico-tecnológico, ya sea por su inadecuado uso o desconocimiento, este ha actuado en contra de la naturaleza y por tanto podría desencadenar la destrucción del propio hombre y las futuras generaciones (Zepeda-Jazo, 2017).

A finales del siglo pasado, con las dificultades encontradas en dominar las múltiples formas en las que plagas atacaban y asediaban los cultivos, y la fuerte demanda de producción agrícola se optó por recurrir al desarrollo de medios químicos de control, es decir, a los plaguicidas. Actualmente, aunque los plaguicidas sintéticos representan una de las principales y más efectivas armas para el manejo de plagas agrícolas, estos provocan altos costos económicos, contaminación ambiental, disminución de organismos benéficos y especies silvestres, intoxicaciones, efectos negativos sobre aplicadores y personas relacionadas con su manejo y el desarrollo de resistencia de las plagas (García-Gutiérrez y Rodríguez-Meza, 2012).

### **2.1.1. Descripción y ciclo de vida de *Spodoptera frugiperda***

*Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) es conocida comúnmente como “el gusano cogollero del maíz” (por el daño que causa al cogollo del maíz) o “gusano soldado” ya que, si el alimento se hace escaso, las larvas se trasladan a otros cultivos desplazándose en masa (Casmuz *et al.*, 2010).

**Huevo:** son de forma globosa con estrías radiales, de color rosado pálido que se torna gris a medida que se aproxima la eclosión (Chango, 2012).

**Larva o gusano:** las larvas se alimentan de diferentes partes de la planta, su color varía según el alimento, pero en general son oscuras con tres rayas pálidas estrechas y longitudinales; las larvas pasan por 6 o 7 estadios o mudas, siendo de mayor importancia para tomar las medidas de control los dos primeros; en el primer instar mide 2-3 milímetros y la cabeza es color negra completamente, el segundo mide 4-10 milímetros, las larvas pueden alcanzar hasta 35 milímetros en su último estadio. (Chango, 2012).

**Pupa.** Son de color caoba y miden 14 a 17 milímetros de longitud, con su extremo abdominal (cremáster) terminando en 2 espinas o ganchos en forma de U invertida. Esta fase se desarrolla en el suelo y el insecto está en reposo hasta los 8 días a 10 días en que emerge el adulto o mariposa. (Chango, 2012).

**Adulto.** La mariposa vuela con facilidad durante la noche, siendo atraída por la luz; es de coloración gris oscura, las hembras tienen a las traseras de color blanquecino, mientras que los machos tienen figuras irregulares llamativas en alas delanteras, y las traseras son blancas (Chango, 2012).

El cogollero hace raspaduras sobre las partes tiernas de las hojas, que posteriormente aparecen como pequeñas áreas translúcidas; una vez que la larva alcanza cierto desarrollo, empieza a comer follaje perfectamente en el cogollo que, al desplegarse, las hojas muestran una hilera regular de perforaciones a través de la lámina o bien áreas alargadas comidas. En esta fase es característico observar los excrementos de la larva en forma de aserrín (Chango, 2012).

### **2.1.2. Descripción y ciclo de vida de *Spodoptera exigua***

*Spodoptera exigua* (Hübner), es un insecto plaga de importancia agrícola mundial que afecta una gran variedad de cultivos, entre los que destacan ornamentales, granos básicos y hortalizas. También conocido como rosquilla verde, trozador de la remolacha y gusano de la remolacha, es un insecto originario del Sureste Asiático que afecta a una gran cantidad de cultivos a nivel mundial (Peña *et al.*, 2013).

**Huevos:** se encuentran normalmente depositados en pequeños grupos (10-250 huevos), recubiertos de escamas blancas, denominados posturas. De forma individual, cada huevo presenta una coloración que va del blanco al marrón-amarillento recién puestos, y marrón oscuro antes de su eclosión. Presentan también estrías verticales y una forma similar a la de una cúpula. El tamaño medio oscila de 0.35 a 0.37 mm. (Peña *et al.*, 2013).

**Larvas:** son de color variable, dependiendo de la alimentación e incluso de si están agrupadas, generalmente verde, cuando están en fase solitaria y de color marrón, cuando están en fase gregaria. Las larvas de los últimos estadios tienen la cabeza de color ocre, con un reticulado blanquecino. Poseen franjas oscuras arrugadas en posición dorsal y líneas a lo largo del cuerpo de color amarillo. (Peña *et al.*, 2013).

**Pupas:** son de color verde al principio, tomando después color hueso-marrón. Están provistas de cuatro ganchos en su parte inferior, cuya función es la sujeción del adulto al emerger de la crisálida. El tamaño medio es de 20 mm. (Peña *et al.*, 2013).

**Adultos:** poseen una envergadura alar de 2.5 a 3.0 cm. Las alas anteriores son de color marrón terroso a gris. Tienen dos manchas: orbicular y renal de colores anaranjados características, que destacan del resto. Las alas posteriores son blancas con nervaduras más oscuras y el borde de las mismas es de color marrón negruzco difuso (Peña *et al.*, 2013).

### **2.1.3. Descripción y ciclo de vida de *Helicoverpa zea***

El gusano elotero *Helicoverpa zea* (Boddie) es una de las principales especies que provoca graves daños y pérdidas económicas, afectando principalmente al cultivo de maíz en etapas de reproducción. Se encuentra ampliamente distribuido desde Norteamérica hasta Sudamérica y en algunas regiones de Europa y Asia. Esta plaga se alimenta de distintos cultivos, entre los cuales destacan maíz, sorgo, tomate y algodón (INTAGRI, 2017).

El gusano elotero es una plaga que presenta cuatro fases de desarrollo durante su ciclo biológico, mismo que tiene una duración de 28 a 45 días. Su ciclo empieza cuando las hembras ovopositan de 500 a 3,000 huevecillos en la etapa R1; estos huevecillos eclosionan 2 a 5 días después, dando lugar a las larvas. La fase de larva tiene una duración de 14 a 15 días, y en este periodo se alimenta de la seda de la mazorca y los granos de elote en los estados lechoso y masoso, causando severos daños al cultivo a medida que las larvas maduran (INTAGRI, 2017).

Después pasa al siguiente estado de desarrollo conocido como pupa. En esta fase la plaga deja de alimentarse y cae al suelo donde se alberga a una profundidad de 5 a 10 cm; puede durar de 12 hasta 15 días bajo esta condición (INTAGRI, 2017)..

La plaga concluye su ciclo con la fase adulta, donde la polilla sobrevive de 15 a 30 días (INTAGRI, 2017).

#### 2.1.4. Descripción y ciclo de vida de *Heliothis virescens*

El gusano bellotero *Heliothis virescens* Fabricius es un insecto que ataca una gran variedad de cultivos (por lo cual se considera polífago) y es una plaga de mucha importancia en el algodón. Conocido como el "perforador grande de la bellota" este gusano causa daños principalmente en cultivos de porte bajo, aunque también puede atacar otro tipo de cultivos, como el tabaco (CropLife, 2019).

Los daños ocasionados por el gusano elotero repercuten en forma directa sobre la calidad de la fibra, principalmente en consistencia y color, reduciendo la producción y causando grandes pérdidas económicas a los productores de este cultivo. En el algodón, el daño se manifiesta porque al atacar los botones florales causa su apertura y caída lo que significa pérdida de estas estructuras (CropLife, 2019).

**Huevo:** son depositados en forma individual, con frecuencia varios sobre una misma estructura, por lo general en el tercio superior de la planta. Miden aproximadamente 0.5 mm de diámetro. Son esféricos, ligeramente aplanados, con la superficie estriada radialmente, su duración tiene un periodo de 2 a 6 días (CropLife, 2019).

**Larva:** Se alimenta del tejido foliar y posteriormente van en busca de órganos fructíferos. Son eruciformes con tres patas torácicas, cuatro pares de pseudopatas y abdominales y un par anal o telson. Miden 1.0 a 1.5 mm de largo. Normalmente se presentan seis estadios larvales en esta especie y cuando alcanzan su desarrollo óptimo miden 30 a 45 mm (CropLife, 2019).

**Pupa:** Mide 15 a 18 mm de longitud, son de tipo obtecta, de color café oscuro, liso y brillante, el cremaste está constituido por dos espinas diminutas. El sexo puede determinarse por la posición de la apertura de la genitalita, que en la hembra está localizada en el octavo segmento abdominal y el macho en el noveno, el estado de la pre-pupa dura de 1 a 4 días y la pupa de 9 a 28 días (CropLife, 2019).

## **2.2. Importancia de los cultivos genéticamente modificados con genes de *Bacillus thuringiensis***

Las plagas son de gran importancia en la agricultura, por lo que se han diseñado algunas estrategias para su control, entre ellas, la modificación del manejo del cultivo, el uso de productos químicos, el control biológico y en algunos casos la modificación genética del cultivo. La ingeniería genética ha logrado desplazar el uso de insecticidas químicos con el empleo de cultivos transgénicos que permiten resistir a insectos plaga, esta tecnología ha reducido el uso de químicos en 21,000 toneladas (Dussán *et al.*, 2013).

En el campo de la agricultura las aplicaciones de la biotecnología son innumerables dada la gran cantidad de problemas que enfrenta la industria agrícola. Estos problemas de diversa índole son ocasionados, en términos generales, por efectos bióticos y abióticos, generando un impacto negativo en el volumen de la cosecha y la consecuente pérdida económica para los productores de granos, frutas y hortalizas. Las técnicas tradicionales de cultivo han empleado diferentes estrategias para contrarrestar dichos problemas y han logrado mejorar significativamente el rendimiento de los cultivos, sin embargo; los procesos de mejoramiento tradicional requieren muchos años y muchas generaciones del cultivo con el fin de obtener una característica deseada. Como alternativa, la biotecnología vegetal representa una herramienta para resolver problemas agrícolas en menor tiempo y con el mínimo riesgo, donde sólo es modificada aquella característica que se quiere contrarrestar, logrando resultados rápidamente en una sola generación (Galeano *et al.*, 2015).

Una herramienta de control biológico la constituye el uso de la bacteria *Bacillus thuringiensis* que vive normalmente en el suelo y que al esporular produce una proteína en grandes cantidades que llega a formar un cristal geométrico. La proteína principal de este cristal se llama *delta*-endotoxina, también conocida como proteína Cry o Cyt (Galeano *et al.*, 2015).

Existen diferentes clases de toxinas, que se han clasificado en función del tipo de insecto que controlan, de tal forma que existen toxinas contra lepidópteros, coleópteros, dípteros (mosquitos), himenópteros, ácaros, nematodos, gusanos planos y protozoarios. Las proteínas son ingeridas por las larvas de los insectos al alimentarse de la planta; estos insectos tienen un intestino medio alcalino, lo que favorece la solubilización del cristal y su procesamiento. Las plantas genéticamente modificadas que expresan la proteína insecticida de *Bacillus thuringiensis* ya se usan comercialmente y parten del principio de que el gen aislado de la bacteria puede expresarse en la planta en los niveles adecuados como para controlar a su insecto blanco. La biotecnología agrícola ha sido empleada en los últimos años en un número importante de cultivos agrícolas como maíz, algodón, soya, canola, papa, tomate, lechuga, entre otros, y los principales logros han sido alcanzados con un limitado número de rasgos y modificaciones genéticas, entre ellas la tolerancia a herbicidas, insectos y enfermedades. Actualmente, diferentes grupos de investigación alrededor del mundo trabajan para ofrecer nuevos desarrollos en biotecnología agrícola (Galeano *et al.*, 2015).

### **2.2.1. Mecanismos y modo de acción las toxinas Cry**

La bacteria *B. thuringiensis* produce cristales de proteínas denominadas Cry. Cuando los insectos la ingieren al alimentarse de la planta, las proteínas se procesan y liberan una *delta-endotoxina* que se une a las células intestinales creando poros, llevando a un desbalance de iones y a la parálisis del sistema digestivo que provoca la muerte de la larva en pocos días (Galeano *et al.*, 2015). Cuando el insecto consume la proteína Cry presenta cese de la ingesta, parálisis del intestino, vómito, diarrea, descompensación osmótica, parálisis total y la muerte. Para que se lleve a cabo la muerte del insecto, la pro-toxina debe estar presente en un ambiente reductor que desestabilice sus puentes disulfuros y pueda ser activada. Dependiendo de la naturaleza de la proteína Cry se realiza la solubilización y activación de la misma, pues se ha demostrado que las proteínas Cry1 presentan

mayor cantidad de aminoácidos básicos por lo cual los cristales se solubilizan a un pH alcalino presente en el intestino medio del insecto. Para que sean activadas no es suficiente con la solubilización, se requiere de la acción de la proteasa presente en el intestino medio del insecto. Se ha encontrado que las enzimas digestivas que predominan en los lepidópteros y dípteros son la tripsina, quimiotripsina, serino–proteasas y termolisinas; mientras que en los coleópteros predominan la quimiotripsina, cisteíno y aspartato proteasas. Una vez se activa la toxina, ésta debe reconocer receptores específicos sobre vesículas de membrana de la microvellosidad apical de las células columnares del intestino medio (Dussán *et al.*, 2013).

Una vez que se ha dado la inserción dentro de la membrana apical, la toxina induce la formación de canales de iones o poros con un diámetro de 1 a 2 nanómetros en la membrana celular en forma de oligómeros que rompen el potencial de membrana, esto finalmente hace que se aumente la permeabilidad de la membrana celular, permitiendo la entrada de agua, aniones, cationes, afectando el pH al alcalinizar el citoplasma y permitiendo la entrada de moléculas de mayor peso molecular que finalmente destruirán el epitelio intestinal. Una vez se destruye el epitelio las esporas de Bt se introducen en la hemolinfa donde se difunden generando una septicemia y muerte de la larva (Dussán *et al.*, 2013).

### **2.2.2. Resistencia de insectos a las toxinas Cry**

Se produce resistencia a las toxinas de Bt cuando en algunos individuos se generan ciertas variaciones genéticas que los hacen resistentes a ellas (Chattopadhyay *et al.*, 2004). La utilización de Bt como agente de biocontrol ha generado un proceso de presión evolutiva que ha fomentado la aparición de resistencia en los insectos (Jiménez, 2019).

Los insectos que presentan resistencia a los insecticidas existen antes de que sean sometidos a dicho agente tóxico, a esto se le llama variabilidad genética. En una población donde la diversidad genética es alta, cada individuo va a responder de manera diferente a algún estímulo; en este caso, el estímulo es la toxina Cry (Leon, 2010). En 1985 se dio a conocer el primer caso de resistencia contra Bt en la especie *Plodia interpunctella* (polilla India de la harina). A partir de ese momento se han informado de más casos de resistencia, tanto contra bioinsecticidas como a cultivos basados en Bt, en algunos países de Centroamérica, España, Australia y Sudáfrica (Melo *et al.*, 2014).

La resistencia se puede adquirir a través de mutaciones en los insectos que influyen en el modo de acción de las toxinas y se han demostrado diversos mecanismos que la desarrollan, entre los cuales se destacan el secuestro de las toxinas Cry por esterases o lipoforinas debido a una fuerte respuesta inmune y la alteración tanto en la activación de las toxinas Cry como de los receptores de estas, lo que provoca una menor cantidad de uniones en la membrana epitelial del intestino medio de los insectos (Jiménez, 2011).

Los insectos que han desarrollado tolerancia a toxinas de Bt, han mostrado un mecanismo que interfiere en algún paso involucrado en el modo de acción. Este evento fue demostrado en *P. interpunctella* donde la base molecular de la resistencia involucró un cambio en el receptor y una correlación entre la reducción de la toxicidad y disminución en la afinidad de unión. La unión al receptor ha sido caracterizada, así como analizada usando vesículas (BBMV) del intestino de varias larvas de lepidópteros y de ciertas proteínas de Bt (Medina, 2014).

### **2.2.3. Efecto de las toxinas Cry sobre las plagas**

Una de las mayores ventajas del uso de las toxinas Cry para el control de plagas es su alta especificidad en su acción insecticida que se limita a nivel de orden como categoría taxonómica. Esta cualidad está directamente relacionada con los receptores específicos que requiere la toxina para actuar, siendo solo algunos insectos quienes lo expresan (Leon, 2010).

Las proteínas Cry son delta endotoxinas producidas por la bacteria del suelo Bt en la etapa de crecimiento durante su fase de esporulación y se han usado comercialmente como bioinsecticidas. Las formulaciones agrícolas que contienen Bt usadas contra insectos se han aplicado en forma de pulverización y generalmente están compuestas por una mezcla de esporas secas y las proteínas cristalinas que se aplican en áreas como las hojas y las raíces, donde se alimentan los insectos y sus larvas (Medina, 2014).

Los síntomas que se observan a partir de que las larvas de insectos susceptibles ingieren los cristales y esporas de Bt son: cese de la ingesta, parálisis del intestino, diarrea, parálisis total y finalmente la muerte. De manera general se acepta que las toxinas Cry son formadoras de poro que ejercen su actividad tóxica al provocar un desequilibrio osmótico en las células epiteliales donde se insertan en la membrana. Soberon y Bravo (2007) proponen el modo de acción donde existe la formación de un poro lítico una vez que las toxinas se insertan a la membrana. Las proteínas Cry son producidas como protoxina que requieren ser procesadas proteolíticamente por proteasas presentes en el intestino de insectos susceptibles. Este procesamiento proteolítico libera fragmentos tóxicos de 55 a 65 kDa que interaccionan con proteínas receptoras presentes en la microvellosidad de las células intestinales de los insectos blanco. A la fecha se han resuelto las estructuras tridimensionales de varias toxinas Cry activas contra insectos coleópteros, lepidópteros, dípteros y una con actividad dual (Medina, 2014).

### 2.3. Antecedentes de estudios realizados con tablas de vida en insectos

Las tablas de vida son de gran utilidad para conocer en detalle el comportamiento de una población y para saber si la población crece, se reduce o se mantiene constante. También permiten identificar los estadios, edades o categorías de tamaño en los que se da la mayor mortalidad y en los que, por consiguiente, los individuos de una población son más vulnerables. En el caso de las especies en peligro de extinción, estos aspectos de la tabla de vida sirven para identificar las categorías en las que se deben concentrar los mayores esfuerzos de conservación. Se consideran una de las herramientas demográficas más utilizadas en ecología es un formato en el que se registran los principales parámetros demográficos de una población, particularmente la supervivencia y la reproducción. Existen dos tipos generales de tablas de vida (Carabias *et al.*, 2009).

- a) **De cohorte** (también llamadas dinámicas u horizontales), las cuales se basan en el seguimiento de una cohorte, desde el nacimiento de los individuos hasta la muerte del último de sus miembros. Una cohorte es un grupo de organismos que nacieron más o menos al mismo tiempo. Conforme transcurre el tiempo, se registra cuántos organismos de la cohorte original alcanzan las diferentes categorías de edad y cuántos mueren en cada una de ellas. También se registra cuántos descendientes dejan los organismos de las diferentes categorías de edad (Carabias *et al.*, 2009).
- b) **Estáticas** (también llamadas verticales), las cuales se basan en la estructura de las edades que tiene una población en un momento dado. Es decir, se parte del número de organismos que hay en cada categoría de edad y se hace la suposición de que esta estructura de edades refleja el comportamiento de una cohorte a través del tiempo (Carabias *et al.*, 2009).

## **2.4. Tipos de bioensayos que se establecen para evaluar cultivos Bt o resistencia**

El bioensayo implica la medición del efecto que ejerce un determinado estímulo sobre una población de organismos. Para Bt se mide la potencia del agente activo sobre un estado específico del organismo potencialmente susceptible para lo cual se aplica una metodología que permite evaluar la actividad tóxica de una cepa, producto activo u organismo recombinante sin que los resultados se vean afectados por las variaciones propias de los sistemas biológicos. El bioensayo se realiza con pruebas que consisten en amplios rangos de concentración de producto activo y un control negativo que debe contemplar agua o soluciones buffer (si el bioproducto lo contiene), y un control positivo (en general una cepa o toxina de la cual ya se reconozca su efecto) (Dussán *et al.*, 2013).

En ocasiones se puede usar un control absoluto que puede ser una sustancia letal para el insecto, aunque no esté relacionada con el bioproducto a evaluar. Los ensayos biológicos se realizan comúnmente sobre larvas de primer o segundo estadio ya que son los estados más susceptibles del insecto y dan una respuesta más exacta del nivel de actividad de la cepa bacteriana, de manera general son los estadios que controlar en campo, están disponibles en un número más grande que otros estadios. El periodo de bioensayo es generalmente corto y la precisión es más alta ya que la mortalidad es uniforme y los intervalos de confianza son más pequeños. Para evaluar efectos a largo plazo y daños intestinales se puede utilizar estadios avanzados. Es conveniente checar el peso, tamaño y describir el estadio larval, se deben utilizar neonatos de 0 a 12 horas de eclosionadas y con privación de alimento, la mortalidad se evalúa entre 48 a 96 horas. Los diseños experimentales más empleados son el completamente aleatorizado, cuando la variabilidad natural no tiene ninguna tendencia clara, o el de bloques completamente aleatorizados cuando existe una variable con una tendencia clara. Se considera que 30 es el número mínimo de larvas a emplear por concentración con no menos de 3 repeticiones. (Dussán *et al.*, 2013).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Localización del experimento

La presente investigación se realizó en Saltillo, Coahuila, México, bajo condiciones de laboratorio, en las instalaciones del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, y se encuentra dentro de las coordenadas geográficas 23° 37" latitud norte y 100° 38" longitud oeste, con una altitud de 1581 msnm. Las colectas de lepidópteros se realizaron en el año 2017 en dos zonas geográficas, una de ellas en el centro del país y la otra de las colectas se realizó en el norte del país en la región de La Laguna, específicamente en el estado de Coahuila, México, siendo una de las zonas con mayor importancia donde se cultiva el algodón genéticamente modificado (GM).

#### 3.2. Material biológico

Se colectaron insectos vivos del Orden Lepidoptera, principalmente de instar larvales. Se consideraron dos condiciones; una de ellas que los individuos colectados, no se encontraran cerca de las zonas donde se establece el algodón genéticamente modificado (GM), o con influencia de este tipo de cultivos que fue en localidades de los estados de Guanajuato, Michoacán, México, Morelos y Oaxaca. También se colectaron insectos que se encontraran en el área de influencia con cultivos GM como es la región productora de algodón, denominada Comarca lagunera, en los municipios de Matamoros y San Pedro del estado de Coahuila, México.

Entre las especies objetivo a coleccionar se buscó que fueran: *S. frugiperda*, *H. zea*, *H. virescens* y *S. exigua* en cultivos hospederos cercanos, como el algodón, maíz y la maleza que se encontraba en los alrededores; en algunos casos se consideró cualquier otro cultivo.

### **3.3. Muestreos del material biológico**

Los muestreos en el caso de las áreas fuera de la influencia con la producción de cultivos GM (centro del país) se realizó en los meses de abril-marzo y en junio-julio; mientras que los colectados en el área de influencia con cultivos GM, se realizó partir del mes de junio a septiembre, en este caso las colectas se hicieron cada quince días. Los individuos colectados fueron trasladados al laboratorio y la cámara bioclimática, para su cría en dieta artificial e incrementar la población, para su posterior uso en bioensayos.

### **3.4. Identificación de especies**

La identificación de las especies de los lepidópteros colectados se realizó a nivel de larvas, se recurrió a observación directa de las características típicas de cada especie, bajo estereoscopio, uso de claves de identificación de larvas de Noctuidae y de familias de Lepidoptera (Frederick, 2005; Perea, 1962; FAO 2002;) y mediante la comparación de imágenes de larvas con el material genético colectado (Bautista, 2006), también se realizó la verificación de la identidad de la especie con taxónomos expertos del Departamento de Parasitología de la UAAAN.

### **3.5. Cría de lepidópteros**

Con los especímenes inmaduros se realizó una prueba para estandarizar el protocolo de cría y mantenimiento de los lepidópteros colectados, por lo que los especímenes debidamente identificados, se llevó a cabo el siguiente procedimiento: a) se colocaron en recipientes de plástico con dieta artificial (Juárez-Hernández, 2016; Comunicación personal) (Cuadro 1).

Para purificar las poblaciones, se eliminaron, larvas enfermas, parasitadas, con daño mecánico, en estado de diapausa y que no aceptaron la dieta como alimento; las larvas sanas se mantuvieron hasta llegar a su estadio de pupa y fueron retiradas de la dieta artificial para posteriormente completar el ciclo como adultos en una jaula o cámara de oviposición, colocándose 30 pupas por jaula. La alimentación de adultos se basó en una solución azucarada con 20 g de miel, 20 g de azúcar y 6 g de ácido ascórbico por litro (Juárez-Hernández, 2016; Comunicación personal1) (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Dieta artificial para lepidópteros: *Heliothis virescens*, *Helicoverpa zea* y *Spodoptera spp.* Ingredientes para un litro de dieta.

Inmaduros	Adultos
85.0 g de harina de soya	20.0 g de miel
60.0 g de germen de trigo	20.0 g de azúcar
25.0 g de levadura	6.0 g de ácido ascórbico
3.0 g de ácido ascórbico	1.0 mL de vitaminas
3.0 g de Nipagin (Methyl 4-hydroxybenzoate)	
1.0 g de ácido sórbico	
12.0 g de agar bacteriológico	
1000 mL de agua	
500 mg de Terramicina (bactericida)	
0.5-1.0 g Manzate (fungicida)	
2.0 g sal de Wesson	
1.0 mL vitaminas (formula comercial)	

Las condiciones del área de cría oscilaron entre los 26 a 28°C, y alrededor del 60% de humedad relativa, con un fotoperiodo de 14 horas día (mediante luz blanca artificial) por 10 horas de obscuridad.

### 3.5.1. Tabla de vida de las poblaciones de lepidópteros

La tabla de vida para los lepidópteros colectados se realizó con la especie que presentó mayor número de individuos y que se adaptara mejor a las condiciones artificiales para su cría y mantenimiento.

Se realizó mediante la toma de datos de los individuos desde que llegaban de campo, por lo que se evaluó, el número de individuos que se recibieron de campo, el número de individuos que murieron por la presencia de patógenos, según los síntomas se clasificó en efecto por virus, hongos y bacteria, y por daño fisiológico, debido a la adaptación a las condiciones artificiales y/o entraron en diapausa.

Para la tabla de vida se tomaron las siguientes variables, según Carabias *et al.* (2009):

$N_x$ = número de individuos que sobrevivieron para ingresar a cada una de las categorías, se determinó como categoría las generaciones filiales, hasta la F5.

$l_x$ = proporción de individuos sobrevivientes con respecto al número inicial de individuos, conocida también como índice de sobrevivencia y se calcula con la fórmula:  $l_x = n_x / n_0$ ; donde  $n_0$ , son el número de individuos de la población colectada en campo, sin purificar.

$d_x$ = proporción de individuos que murieron durante el intervalo que duró la categoría, con respecto al número inicial y se calcula con la siguiente formula:  $d_x = n_x - n_{x-1}$ .

$q_x$ = es la tasa de mortalidad, que representa la proporción de individuos que murieron durante el intervalo que duró la categoría, con respecto al número que ingresó a la categoría. Formula:  $q_x = d_x / l_x$ .

$P_x$ = proporción de individuos que sobreviven con respecto al total que ingreso a la clase. Formula:  $P_x = 1 - q_x$ .

### **3.6. Establecimiento de bioensayos**

Se realizaron pruebas con las poblaciones de los lepidópteros con la finalidad de estandarizar los protocolos para determinar la condición de las poblaciones con respecto al efecto por las toxinas Cry del Bt, presentes en el cultivo del algodón Bt.

La fuente de las toxinas del Bt, para los bioensayos, fue obtenida de plantas de algodón Bt la cual se suministró como dieta natural (material vegetal: hoja, botón floral y fruto), proveniente de variedades de algodón GM, y se realizó con la finalidad de evaluar el efecto indirecto del consumo de las toxinas Cry, por medio de la expresión en material vegetal, esto como una alternativa a la evaluación de los niveles de resistencia a las toxinas Cry del Bt en poblaciones de lepidópteros blanco a dicha tecnología, y como un primer acercamiento en el monitoreo de la resistencia de insectos a éstas toxinas.

Los bioensayos se establecieron con dos líneas genéticas, una línea presuntamente susceptible a las toxinas Cry (lepidópteros obtenidos del centro del país) y otra línea presuntamente resistente (lepidópteros obtenidos de la región productora de La Laguna). Las poblaciones de los lepidópteros establecidas en los bioensayos fueron manejadas en las generaciones filiales 3-5 (F3, F4 y F5) y se sometieron a las pruebas las larvas del tercer estadio de desarrollo.

La evaluación del efecto de la dieta se llevó a cabo con respecto a la inactividad del insecto en estado larvario, por lo que se consideró: cuando detuvieron su desarrollo, dejaron de alimentarse, se paralizaron o murieron. Mediante observación o cuando mostraron inactividad al tocarlas con un pincel de cerdas suaves. Se contó el número de larvas sin actividad cada 24 horas después del establecimiento de cada bioensayo por siete días.

### **3.6.1. Descripción de los bioensayos**

Se realizaron tres bioensayos en el laboratorio; para el establecimiento se utilizó material vegetal de algodón Bt, como fuente de toxinas Cry. Para esto, se colectaron hojas, brotes terminales, cuadros y bellotas de ocho híbridos de algodón Bt Delta Pine etc... (DP1321 B2RF, DP0912 B2RF, DP0935 B2RF, FM1740 B2F, FM1830 GLT, FM1900 GLT, FM2007 GLT, FM2334), uno tolerante a herbicida sin resistencia a lepidópteros (DP1441) y uno convencional que sirvió de refugio (DP0989), estas últimas se utilizaron como testigo.

Los tratamientos fueron alojados en un diseño experimental completamente al azar, el número de repeticiones por unidad experimental estuvo condicionados por el número de larvas disponibles para las pruebas y el material vegetal.

Los diez híbridos de algodón estaban establecidos en los terrenos del Rancho “El Rincón del Buitre” de la UAAAN, ubicado en la localidad del Retiro en San Pedro de las colonias, Coahuila con las coordenadas geográficas 26° 38” latitud Norte y 103° 14” longitud Oeste y con una altitud de 1 522 msnm. Los tres bioensayos se establecieron como prueba preliminar para evaluar la respuesta de las larvas a la dieta vegetal de los materiales Bt.

El material vegetal utilizado fue lavado con jabón líquido y abundante agua y posteriormente desinfestado con iodo al 2%, se dejó secar a temperatura ambiente. Los explantes vegetativos fueron colocados en botes del número 00 (volumen de 5.0 mL). Las condiciones para cada bioensayo se describen a continuación:

**Primer bioensayo:** se sometieron a la prueba larvas de *S. frugiperda*, la dieta consistió en rebanadas de bellotas de 3.0 mm de grosor y explantes de hojas de 10.0 mm<sup>2</sup>, fueron cuatro repeticiones por tratamiento, para lo cual se consideraron a los 10 híbridos de algodón como los tratamientos; la unidad experimental conformada por un bote con su respectivo material vegetal y dos larvas del 3er estadio por repetición. Se cortaron las bellotas de la parte central para la obtención de la rebanada, se colocó en el fondo del bote y encima se pusieron las larvas y para las hojas se cortó el explantes de la parte central.

Los datos que se tomaron estuvieron en función al porcentaje de mortandad de las larvas expuestas a cada tratamiento, para lo cual el registro se realizó cada 24 horas, por una semana.

**Segundo bioensayo:** este bioensayo consistió en cinco repeticiones, los híbridos de algodón fueron los tratamientos, se sometieron a la prueba larvas de *S. frugiperda*; la unidad experimental fue de cinco botes con rebanadas de bellotas (5.0 mm de grosor con 1.5 a 2.0 cm de diámetro) y 10 larvas del 3er estadio. Se cortaron las bellotas de la parte central para la obtención de la rebanada, se colocó en el fondo del bote y encima se pusieron las larvas, se obtuvo el porcentaje de mortalidad de las larvas y se realizaron dos conteos con una semana de diferencia a los 3 días después de haber establecido el experimento.

**Tercer bioensayo:** para este bioensayo, las condiciones fueron las mismas que el anterior, solo que como fuente de toxina Cry y alimento se les dieron trozos de hojas de 1.0 cm<sup>2</sup>, las hojas se cortaron de la parte central.

### **3.7. Análisis estadístico**

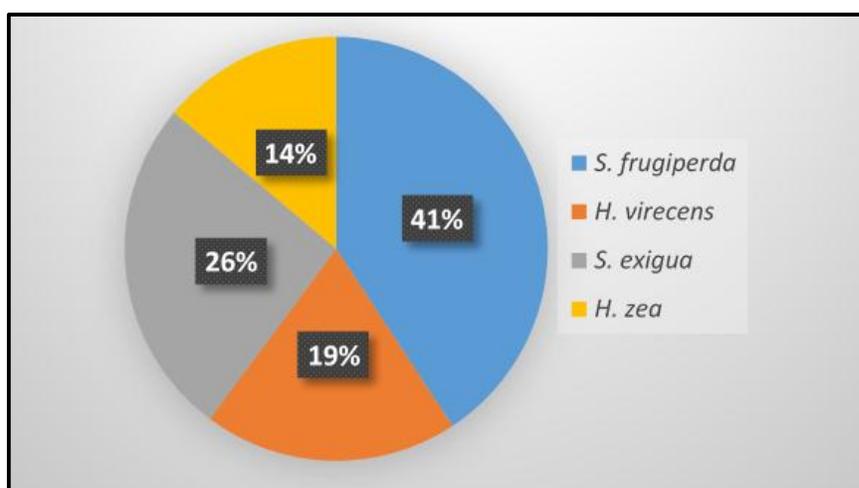
Los datos obtenidos fueron empleados para determinar la eficiencia de los protocolos establecidos para la cría, mantenimiento y establecimiento de bioensayos, sobre todo estos últimos con el uso de material vegetal como fuente de las toxinas Cry del Bt.

Para el análisis estadístico se llevó a cabo un análisis de varianza ajustado al modelo completamente al azar y una comparación múltiple de medias entre tratamientos usando el paquete estadístico computacional de SAS (SAS Institute, 2002), bajo una prueba no paramétrica, debido a que se trabajó con el porcentaje de mortandad de larvas, con el método de Kruskal-Wallis con una confiabilidad del 99% ( $\alpha \leq 0.01$ ).

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Especies de lepidópteros colectadas

En los muestreos realizados en campos de cultivo y zonas aledañas con maleza, se colectaron las especies de *S. frugiperda*, *S. exigua*, *H. virescens* y *H. zea* (Figura 1) como plagas lepidópteras de algunos cultivos, por lo que durante los recorridos para realizar las colectas en el centro y occidente del país (Cuadro 2), se revisaron parcelas de maíz, caña de azúcar, tomate de cáscara, jitomate y alcachofa, entre otros cultivos característicos y hospederos de las plagas objetivo; se detectaron los daños por larvas y se buscaron los insectos, entre las plantas, los frutos y el suelo; los inmaduros se colocaron en botes plástico del no. 00 (volumen 5.0 mL) y se mantuvieron con dieta natural a base de jilotes, frutos de jitomate y hojas de maíz; se trasladaron a las instalaciones de la UAAAN en Saltillo.

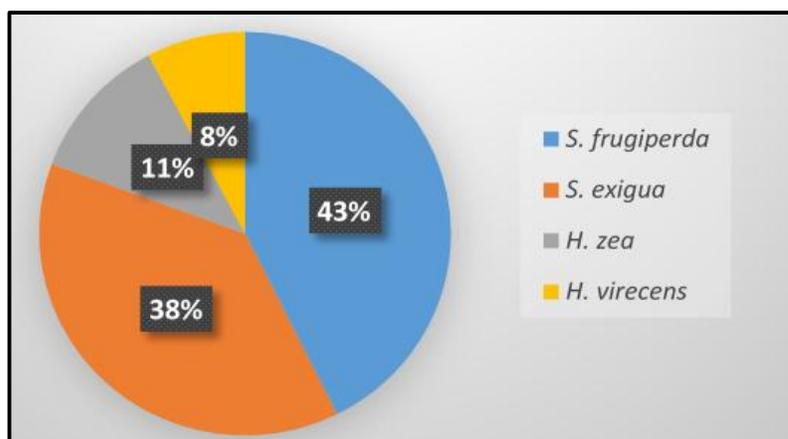


**Figura 1.** Proporción de las especies de lepidópteros colectadas en localidades del centro y occidente del país. México, 2017.

**Cuadro 2.** Colectas de material biológico de lepidópteros plaga, para establecimiento de líneas presuntamente susceptibles a las toxinas Cry del Bt, provenientes del centro y occidente de México, 2017.

No.	Localidad	Coordenadas geográficas	Cultivo	Especies	Mes de colecta
1	Churincillo, Pénjamo, Gto.	Latitud: 20°25'55"N Longitud: 101°43'15"W	Maíz	<i>S. frugiperda</i> y <i>H. zea</i>	Febrero y Marzo
2	Susupuato de Guerrero, Mich.	Latitud: 19°12'55"N Longitud: 100°24'28"W	Maíz	<i>S. frugiperda</i> y <i>H. zea</i>	Febrero y Marzo
3	Los Pocitos, Santiago Pinotepa Nacional, Oax.	Latitud: 16°20'18"N Longitud: 98°03'19"W	Maíz	<i>S. frugiperda</i> y <i>H. zea</i>	Febrero y Marzo
4	Tenextepango, Ayala, Mor.	Latitud: 18°43'44"N Longitud: 98°57'28"W	Maíz	<i>S. frugiperda</i> y <i>H. zea</i>	Febrero y Marzo
5	Oacalco, Yautepec, Mor.	Latitud: 18°55'54"N Longitud: 99°01'30"W	Maíz y jitomate	<i>S. frugiperda</i> , <i>S.</i> <i>exigua</i> y <i>H. zea</i>	Abril
6	San Carlos, Yautepec, Mor.	Latitud: 18°52'54"N Longitud: 99°04'01"W	Jitomate	<i>S. frugiperda</i> y <i>S. exigua</i>	Abril
7	San Vicente, Chicoloapan, Edo. de Mex.	Latitud: 19°25'00"N Longitud: 98°54'07"W	Alcachofa, maíz, tomate de cáscara y calabaza	<i>S. frugiperda</i> , <i>S.</i> <i>exigua</i> , <i>H. virescens</i> y <i>H. zea</i>	Abril y Julio
8	Montecillo, Texcoco, Edo. de Mex.	Latitud: 19°27'25"N Longitud: 98°54'29"W	Maíz	<i>H. virescens</i> y <i>H. zea</i>	Julio
9	Chapingo, Texcoco, Edo. de Mex.	Latitud: 19°28'59"N Longitud: 98°54'00"W	Maíz	<i>H. virescens</i> y <i>H. zea</i>	Julio

Las colectas que se realizaron en el norte del país con influencia a los cultivos GM (región de La Laguna), se llevaron a cabo cada 15 días a partir del 21 de junio del año 2017, mediante el apoyo de siete técnicos pertenecientes a la Junta Local de la Región Lagunera del Comité Estatal de Sanidad Vegetal, se entregaban 25 botes con dieta artificial a los técnicos y ellos los regresaban a los 15 días, con las larvas de lepidópteros plaga colectados en el cultivo de algodón Bt y/o cultivos aledaños o malezas hospederas (Figura 2; Cuadro 3). La dieta artificial fue muy útil para facilitar el manejo de los insectos, durante los recorridos de campo en las parcelas hechas por los técnicos, como para el traslado a las instalaciones de la UAAAN.



**Figura 2.** Proporción de las especies de lepidópteros colectadas en la región de La Laguna, México, 2017.

La plaga lepidóptera *S. frugiperda* es una de las especies más colectadas en el país, principalmente en la región de la Laguna en el estado de Coahuila, esto se debe a que es una especie cosmopolita, distribuida en diferentes ambientes, y que puede afectar diferentes cultivos, de hecho, se reporta como la especie plaga que más ha causado pérdidas productivas y económicas a los productores (Jimenez, 2011). Esto lo confirma Barrientos-Gutiérrez *et al.*, (2013). Quienes reportan que es una especie polífaga que se alimenta de varias familias vegetales. Su control se realiza con frecuencia mediante aplicación de insecticidas químicos, aumentando los costos de producción

**Cuadro 3.** Recolectas de material genético para establecimiento de líneas presuntamente resistentes a las toxinas Cry del Bt, de la región productora de algodón GM, en el estado de Coahuila, 2017

Localidad	Coordenadas geográficas	Cultivo	Especies
Rincón del Buitre, rancho de la UAAAN, y pequeña propiedad (p.p.) las Palmas, municipio San Pedro de las Colonias.	Latitud: 25°46' N Longitud: 102°59' W	Algodón Bt	<i>S. frugiperda</i> , <i>S. exigua</i> , <i>H. virescens</i> y <i>H. zea</i>
Ejido El Ancora, p.p. Guadalupe, municipio San Pedro de las Colonias.	Latitud: 27°46' N Longitud: 101°01' W	Algodón Bt, convencional y maíz	<i>S. frugiperda</i> , <i>S. exigua</i> , <i>H. virescens</i> y <i>H. zea</i>
Ejido El Ancora, p.p. Guadalupe, ejido San Isidro y Gatas mochas, municipio San Pedro de las Colonias.	Latitud: 25°45' N Longitud: 102°59' O	Algodón Bt, convencional y maíz	<i>S. frugiperda</i> , <i>S. exigua</i> , <i>H. virescens</i> y <i>H. zea</i>
Ejido la Luz, municipio de Matamoros y p.p. Medio Lote, p.p. San Marcos y p.p. el Eucalipto, municipio San Pedro de las Colonias.	Latitud: 25° 43' N Longitud: 103° 14' O	Algodón Bt,	<i>S. frugiperda</i> , <i>S. exigua</i> , <i>H. virescens</i> y <i>H. zea</i>
Ejidotes Tacubaya, Altamira, Carolina, El Porvenir y p.p. Santa Anita, municipio San Pedro de las Colonias.	Latitud: 25°41' N Longitud: 103° 04' O	Algodón Bt, convencional, maíz y cucurbitáceas	<i>S. frugiperda</i> , <i>S. exigua</i> , <i>H. virescens</i> y <i>H. zea</i>
p.p. Rinconada, p.p. Candelaria y Ejido San Isidro, municipio San Pedro de las Colonias.	Latitud: 25°45' N Longitud: 102° 59' O	Algodón Bt	<i>S. frugiperda</i> , <i>S. exigua</i> , <i>H. virescens</i> y <i>H. zea</i>
Ejido Carolina, municipio San Pedro de las Colonias.	Latitud: 25° 48' N Longitud: 103° 00' O	Algodón Bt y maíz	<i>S. frugiperda</i> , <i>S. exigua</i> , <i>H. virescens</i> y <i>H. zea</i>

## 4.2. Cría de lepidópteros

Se realizaron diferentes pruebas con los reactivos pues las larvas empezaron a mostrar inactividad y no aceptaban la dieta, por lo que se cambiaron algunos reactivos: el bactericida se cambió por Gentamicina de uso veterinario, un mililitro por litro de dieta y el fungicida, también se cambió por Ketoconazol de uso médico una tableta por litro de dieta.

Por la falta de disponibilidad para conseguir algunos reactivos, en vez de harina de soya, se agregó leche de soya; el Nipagin fue sustituido por Benzoato de sodio que es un conservador de alimento y además de más fácil adquisición; la sal de Wesson, no se pudo agregar a la dieta, ya que no fue posible adquirirla. El agar bacteriológico fue de la marca MCD LAB<sup>®</sup>, ya que, con este reactivo, las larvas completaban su ciclo a diferencia que cuando se utilizó otra marca. Las pruebas realizadas con la dieta se realizaron con la finalidad de estandarizar la técnica de crianza y mantenimiento de las poblaciones. También se regularon las condiciones ambientales aptas para la reproducción y mantenimiento de las poblaciones.

Se realizaron varias pruebas para el establecimiento de jaulas de oviposición para adultos, debido a que la población de los lepidópteros era baja, por lo que primeramente se realizó en botes de 20 litros, forrados de papel estraza y cubiertos con una tela de organza, pero la manipulación fue complicada, posteriormente se trabajó con tubos de pvc de 4"1/2, pero aun así se complicó el manejo, por el tamaño. Se optó por el uso de botes con capacidad de un litro para facilitar el manejo del bajo número de individuos por recipiente, mismos que fueron acondicionados con tiras de papel china azul pegado en las paredes y favorecer mejor manejo de las oviposturas, se le hicieron perforaciones a la tapa y se cubrió con organza para la aireación, al fondo se colocó un recipiente de menor tamaño y capacidad (volumen de 5.0 mL) que fungió como contenedor del algodón humedecido con la dieta para adultos.

Las oviposturas se recortaron de las tiras de papel china y se pegaron en las paredes de recipientes de 250 mL con dieta artificial para larvas, hasta que eclosionaron los huevos y hasta llegar al tercer estadio, posteriormente estas se individualizaron en recipientes.

Se desecharon los individuos que presentaron síntomas de enfermedad y falta de adaptación a las condiciones artificiales de crianza y mantenimiento, problemas con parasitoides, o sintomatología por entomopatógenos, así como aquellas que entraron en diapausa.



**Figura 3** Cámara de oviposición utilizada en la cría y mantenimiento de colonias de lepidópteros

(Arévalo *et al.*, 2011) definen que una dieta a base de harinas de frijol grueso y fino, ampicilina y estreptomycin es la dieta adecuada para mantener y/o incrementar el número de larvas de *Diatraea saccharalis*, ya que obtuvieron el valor promedio más alto para la eficiencia huevo-larva, así como también hubo un desarrollo de la cría masiva, con el objeto de su empleo en control biológico

Herrera *et al.*, (2016) describe que la técnica de cría de *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae) sobre una dieta artificial permite mantener la colonia de insectos desde larvas neonatas hasta el estado pupal, sin necesidad de cambiar de recipientes ni reponer la dieta, evitando la manipulación de los ejemplares y reduciendo los riesgos de contaminación. Dietas empleadas por Murúa *et al.* (2003), a base de maíz colorado y germen de trigo, la duración larval fue de  $37.4 \pm 6.3$  días y, a base de arroz, fécula de maíz y germen de trigo, la duración larval fue de  $43.5 \pm 3.37$  días, indicando, claramente, la influencia de la dieta alimenticia.

Maldonado y Polanía (2009) describen que la implementación de la dieta ICRISAT Diet 3 en *S. frugiperda* es factible para obtener menor tiempo en estado de larva, número de instares larvales y mayor peso en las larvas y pupas, menor costo y ciclo,

sin importar la generación en la que se encuentren las poblaciones en estudio, además que se considera un mayor valor nutritivo estable para la larva. Es importante mencionar que el agar, es el ingrediente con mayor participación en el uso de dietas para lepidópteros y que es el reactivo que presenta mayor costo. En este sentido, trabajos como el de Abbasi *et al.*, (2007) evaluaron con resultados positivos, el almidón de yuca como reemplazo, logrando reducir los costos en más del 50%.

La dieta establecida en este trabajo de investigación requiere de cambios para obtener mejores resultados como un mayor número de larvas, número de instares larvales, peso y nutrición en larvas; estos resultados, confirman la variación en la duración larval, la cual se debe a la calidad y al tipo de alimento.

Murúa *et al.*, (2003) describe que las condiciones ambientales del laboratorio son prioritarias para el desarrollo de los individuos, en este sentido, las condiciones que se tuvieron en el establecimiento de las crías fueron muy variantes y no favorecieron a la cría de los lepidópteros.

#### **4.2.1. Tabla de vida para *Spodoptera frugiperda***

La tabla de vida se realizó solo para la especie de *S. frugiperda*, debido a que fue la especie que más número de individuos se colectaron y que presentó mayor adaptabilidad a las condiciones artificiales de laboratorio, sin embargo, fue considerada solo para la generación filial cinco (F5) y fue posible determinarla hasta la F5, tanto para las poblaciones provenientes del centro del país como del norte (Región Lagunera) (Cuadros 4 y 5).

**Cuadro 4.** Tabla de vida de la especie *S. frugiperda* en periodo de adaptación a las condiciones artificiales de laboratorio para cría y mantenimiento, en la cohorte del centro de México, 2017.

Generación filial	Proporción de individuos de <i>S. frugiperda</i>				
	<i>N<sub>x</sub></i>	<i>L<sub>x</sub></i>	<i>d<sub>x</sub></i>	<i>q<sub>x</sub></i>	<i>P<sub>x</sub></i>
F0	253	1.000	0.170	0.170	0.830
F1	210	0.830	0.170	0.205	0.795
F2	157	0.748	0.252	0.338	0.662
F3	146	0.930	0.070	0.075	0.925
F4	140	0.959	0.041	0.043	0.957
F5	137	0.979	0.021	0.022	0.978

*N<sub>x</sub>*: número de individuos que sobrevivieron para ingresar a cada una de las categorías; *l<sub>x</sub>*: índice de sobrevivencia (individuos); *d<sub>x</sub>*: proporción de individuos que murieron durante el intervalo que duró la categoría, con respecto al número inicial; *q<sub>x</sub>*: es la tasa de mortalidad, que representa la proporción de individuos que murieron durante el intervalo que duró la categoría, con respecto al número que ingresó a la categoría; *P<sub>x</sub>*: proporción de individuos que sobreviven con respecto al total que ingreso a la clase.

**Cuadro 5.** Tabla de vida de la especie *S. frugiperda* en periodo de adaptación a las condiciones artificiales de laboratorio para cría y mantenimiento, en la cohorte de la Región lagunera, México, 2017.

Generación filial	Proporción de individuos de <i>S. frugiperda</i>				
	<i>N<sub>x</sub></i>	<i>L<sub>x</sub></i>	<i>D<sub>x</sub></i>	<i>q<sub>x</sub></i>	<i>P<sub>x</sub></i>
F0	1225	1.000	0.131	0.131	0.869
F1	1065	0.869	0.131	0.150	0.850
F2	650	0.568	0.432	0.760	0.240
F3	605	0.992	0.008	0.008	0.992
F4	600	0.817	0.183	0.224	0.776
F5	490	0.857	0.143	0.167	0.833

*N<sub>x</sub>*: número de individuos que sobrevivieron para ingresar a cada una de las categorías; *l<sub>x</sub>*: índice de sobrevivencia (individuos); *d<sub>x</sub>*: proporción de individuos que murieron durante el intervalo que duró la categoría, con respecto al número inicial; *q<sub>x</sub>*: es la tasa de mortalidad, que representa la proporción de individuos que murieron durante el intervalo que duró la categoría, con respecto al número que ingresó a la categoría; *P<sub>x</sub>*: proporción de individuos que sobreviven con respecto al total que ingreso a la clase.

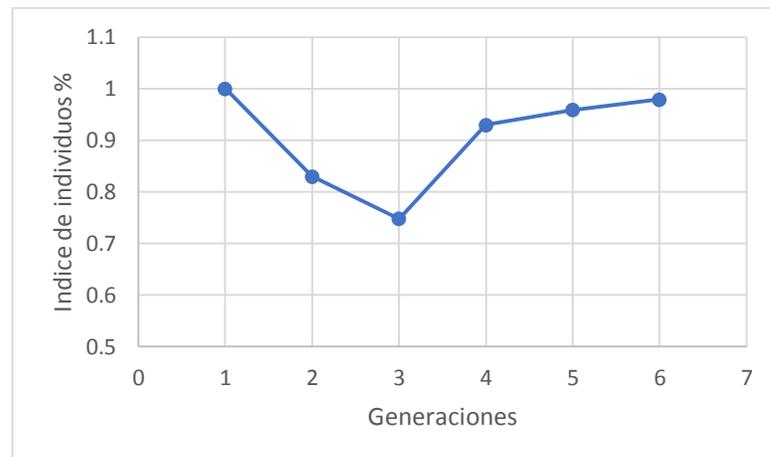
En el caso de este tipo de estudios y variables, se requiere considerar más datos para establecer la tabla de vida para la cohorte de cada una de las etapas del ciclo de vida de la especie y por cada generación filial e incluso colecta de individuos, para tener más exactitud en los cálculos y poder determinar la esperanza de vida de la población y predecir al menos el número de individuos que se obtendrán, para poder planear en forma adecuada los bioensayos a establecer; por lo que es necesario, tomar registro del número de ovipositoras, huevos, conteo de larvas en los diferentes instares, así como de pupas y adultos, como lo indican algunos estudios realizados en lepidópteros.

Al respecto Batiz *et al.*, (2016) estudiaron a *Lacertinella australis* una especie de interés fitosanitario, por lo que evaluaron el comportamiento y aspectos del ciclo de vida a través de una tabla de vida vertical bajo condiciones controladas en el laboratorio y con una segunda tabla obtuvieron datos de la especie sobre la base de un muestreo de una población natural, estos autores estimaron los atributos poblacionales: tasa reproductiva básica o tasa de reemplazo ( $R_0$ ), tasa finita de crecimiento poblacional ( $\lambda$ ), capacidad de incremento poblacional ( $rc$ ), valor reproductivo ( $V_x$ ), tiempo generacional de la cohorte ( $T_c$ ) y el promedio del tiempo de desarrollo por estadios, por lo que es de importancia ser consistentes en estos datos dentro de estudios poblacionales

En estudios previos a campo Batiz *et al.*, (2016), observó que la estructura de edades de las poblaciones de *L. australis* fluctuó entre meses y las poblaciones fueron multivoltinas, dado que mostraron ser reproductivamente activas todo el año, no evidenciando fase de dormancia durante el desarrollo postembrionario

La supervivencia de generaciones filial ( $l_x$ ) para *S. frugiperda* bajo condiciones de laboratorio indica que la especie se puede adaptar en forma constante a las condiciones artificiales de crianza y da a conocer la cantidad de insectos que podemos encontrar en cada uno de ellos (Figura 4 y 5), sin embargo, la adaptación de las poblaciones es diferente, los individuos que provenían de la región productora de algodón GM muestran mayor variación en la supervivencia de las generaciones en estudio.

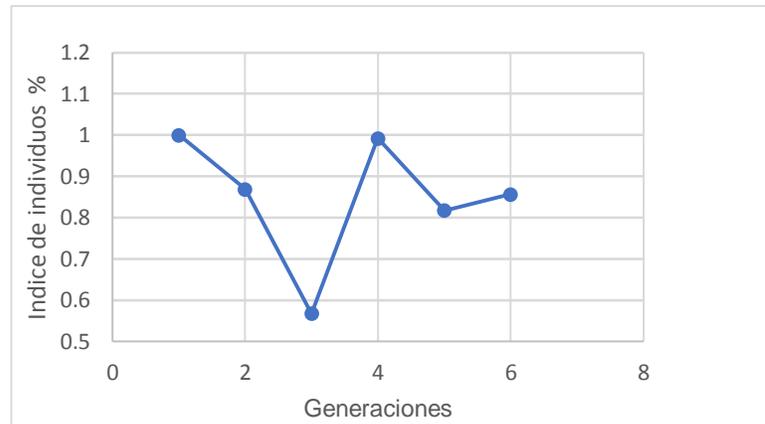
La disminución poblacional, en cada uno de los cohortes evaluados se debió a la falta de sanidad y control de las condiciones ambientales, pues a pesar de que se trabajó en cámara bioclimática, no es posible, mantener el control al cien por ciento de las condiciones, además que en ese año se presentó una nevada, siendo los meses de Noviembre y Diciembre, los más fríos, teniendo una temperatura de  $-8.0^{\circ}\text{C}$  en la localidad (Buenavista, Saltillo, Coahuila, México) que favoreció la disminución de los individuos o que estos entraran en diapausa.



**Figura 4.**Supervivencia ( $I_x$ ) por generaciones de *Spodoptera frugiperda* bajo condiciones de laboratorio. Población proveniente del centro de México, 2017.

c menciona que las curvas de supervivencia varían de una especie a otra, influidas por las condiciones ambientales y otros factores, aunque también se pueden observar variaciones en una misma especie.

Por otro lado, Batiz *et al.* (2016) señala que las curvas de supervivencia no son características constantes de una población o de una especie, sino que son una forma de expresar la mortalidad de una población, por lo que son muy sensibles a las condiciones ambientales, sexo, características genotípicas, y a la posición en la comunidad en que viven los individuos.



**Figura 5.** Supervivencia por generaciones de *Spodoptera frugiperda* bajo condiciones de laboratorio, población proveniente de la Región lagunera, México, 2017.

Por lo general, las condiciones abióticas de cada hábitat varían de forma moderada, lo que permite que las poblaciones de muchas especies logren vivir en ese lugar. Pero de vez en cuando algunos factores abióticos varían a tal grado que llegan a causar la muerte de muchos organismos (Carabias *et al.*, 2009).

Carabias *et al.*, (2009) postularon que cada especie tiene un nicho fundamental y un nicho realizado. El nicho fundamental es el que cada especie puede ocupar potencialmente, según sus requerimientos y tolerancias fisiológicas. Por su parte, el nicho realizado es el que ocupa en la realidad y puede ser más restringido que el nicho fundamental, como producto de la competencia, o más amplio, en el caso de que alguna interacción mutualista lo permita

La mortandad que se presentó en las larvas fue principalmente ocasionada por la presencia de patógenos, a pesar de que la dieta contenía bactericida y fungicida, para lo cual fue posible identificar a estos organismos por los síntomas que presentaban las larvas desde la purificación, así como en la cría y mantenimiento, por lo que se realizó un porcentaje estimado de la mortandad por las diferentes causas de muerte; los virus ocuparon el 23% del total de la mortandad, las bacterias un 5%, los hongos un 21%, parasitoides 7% y daño fisiológico debido a la adaptación a las condiciones artificiales y/o entraron en diapausa un 44%.

### 4.3. Bioensayos

Los bioensayos que se realizaron fueron para determinar la respuesta de los lepidópteros a las toxinas Cry del Bt, mediante una fuente vegetativa de estas toxinas, solo fue posible trabajarlos con la especie *S. frugiperda*, ya que fue la única de la cual se logró obtener individuos debido a que se adaptó mejor a la cría artificial por lo tanto se tuvo mayor número de individuos, necesarios para las pruebas, los bioensayos se ajustaron al número de larvas disponibles.

#### 4.3.1. Primer bioensayo

Existen diferencias estadísticas altamente significativas entre los diferentes híbridos de algodón GM que se evaluaron como tratamientos, con una confiabilidad del 99% ( $\alpha \leq 0.01$ ) al evaluar la mortandad de larvas de *S. frugiperda* expuestas a las toxinas Cry de Bt, mediante explantes de hoja y rebanadas de bellota de la planta de algodón, como dieta natural (Cuadro 6).

**Cuadro 6.** Cuadrados medios del análisis de varianza sobre la mortandad de larvas de *Spodoptera frugiperda*, alimentadas con explantes de hoja y fruto de 10 híbridos de algodón GM. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México, 2017.

Fuente de variación	gl	Mortandad en hoja	Mortandad en bellota
Híbridos de algodón Bt	9	282.94**	189.56**
Error	27	17.17	46.75
Total	39		
Media		78.75%	51.24%
Desviación estándar		39.03	48.68
Coefficiente de variación		20.21%	33.35%

\*\* , NS: Diferencia significativa con  $\alpha \leq 0.01$  y No Significativa, respectivamente; gl: grados de libertad del error

Los resultados obtenidos con el análisis de varianza indican que al menos la dieta con explantes de hoja, presentó mayor porcentaje de mortandad (79% aproximadamente), mientras la dieta por medio de rebanadas de bellota presentó una mortandad de 51% (Cuadro 6), lo que indica que al alimentar larvas con hojas de algodón Bt, puede ser una opción factible como fuente de toxinas Cry, en el establecimiento de experimentos para monitorear los niveles de resistencia a la tecnología Bt de poblaciones de lepidópteros en campo.

Blanco *et al.*, (2009) han comprobado cómo se puede encontrar una respuesta diferencial, debido a la cantidad de alimento ingerido y, con ello, de toxina consumida y que algunos ingredientes puedan interferir en la activación de las protoxinas Cry

La comparación de medias por la prueba de Kruskal-Wallis (K-W), se realizó debido a que los supuestos básicos en el planteamiento del experimento no cumplen con una escala nominal u ordinal durante el registro de los datos experimentales o diseños experimentales comunes como lo indica Castillo (2007), pues los datos empleados para el análisis no fueron transformados y se trabajó con valores porcentuales de mortandad; además reduce el coeficiente de variación (Cuadro 6) para cada variable, lo que no sucede al hacerlo con un análisis de varianza paramétrico (datos no presentados). De esta forma se logró identificar en cuál de los híbridos de algodón sometidos en el experimento hubo mayor mortandad de larvas (Cuadro 7).

La diferencia entre las medias de rangos ajustadas a los tratamientos por el método K-W identificó, que de un total de 45 comparaciones entre los híbridos de algodón, solo 22 (48.8%) presentaron un nivel de significancia del 99% ( $\alpha \leq 0.01$ ) para la variable mortandad con dieta a base de explantes de hoja, mientras que para la mortandad con dieta a base de rebanadas de bellota solo seis (13.3%) fueron altamente significativas, lo que corrobora la eficiencia del uso de hoja como alimento para larvas, en este tipo de experimentos (Cuadro 7). Los híbridos que presentaron mayor número de comparaciones estadísticamente diferentes al resto fueron: DP989, DP0912 y FM1740 (Cuadro 7), en este mismo sentido cabe indicar que el híbrido DP9089, fue considerado como uno de los testigos evaluados, ya que es

convencional, y no tiene en su estructura genética, la fuente de toxinas Cry, material que presento valores bajos de mortandad de larvas en cada uno de los dos tipos de dieta (25% con hoja y 37.50% con bellota); en el caso de los híbridos DP0912 y FM1740, estos no mostraron efectividad de las toxinas Cry, ya que solo el 12.5% de la mortandad se expresó con la dieta por hoja y el 50% con bellota para el primero híbrido, mientras que para el segundo, se expresó sólo el 50% tanto en hoja, como para bellota (Cuadro 7).

**Cuadro 7.** Comparación de medias ajustadas entre híbridos de algodón por la prueba de Kruskal-Wallis, para el porcentaje de mortalidad con dieta natural (explantos de hoja/rebanada de bellota). Buenavista, Saltillo, Coahuila, México, 2017.

Híbridos de algodón	Porcentaje mortalidad hoja/bellota	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 DP1321	100/100										
2 DP0912	12.5/50	**/NS									
3 DP0935	100/62.5	NS/NS	**/NS								
4 FM1740	50/50	**/NS	**/NS	**/NS							
5 FM1830	100/100	NS/NS	**/NS	NS/NS	**/NS						
6 FM1900	100/50	NS/NS	**/NS	NS/NS	**/NS	NS/NS					
7 FM2007	100/50	NS/NS	**/NS	NS/NS	**/NS	NS/NS	NS/NS				
8 FM2334	100/12.5	NS/**	**/NS	NS/NS	**/NS	NS/**	NS/NS	NS/NS			
9 DP1441	100/0	NS/**	**/NS	NS/NS	**/NS	NS/**	NS/NS	NS/NS	NS/NS		
10 DP989	25/37.5	**/**	NS/NS	**/NS	**/NS	**/**	**/NS	**/NS	**/NS	**/NS	

\*\* , NS: Diferencia significativa con  $\alpha \leq 0.01$  y No Significativa, respectivamente;

Según Helber *et al.* (2011). a medida que el cultivo se desarrolla, la concentración de la proteína disminuye, por ende, en sus primeros estados fenológicos, la planta expresará la mayor concentración de proteína Cry1Ac.

#### 4.3.2. Segundo bioensayo

Con los resultados anteriores, se efectuó un segundo experimento en el que se sometieron de la especie del 3er instar por unidad experimental. Se les alimentó con rebanadas de bellota de los 10 híbridos en estudio. El análisis de varianza bajo un supuesto estadístico no paramétrico arrojó que no existen diferencias significativas entre los 10 híbridos estudiados (Cuadro 8).

En el primer bioensayo, se obtuvo que, al utilizar frutos de algodón, no existe mucha eficacia en la mortandad de larvas, esto debido a que la concentración de las toxinas en las diferentes partes de la planta es diferente. Arévalo *et al.*, (2011) indican que la dieta ideal para poder evaluar la susceptibilidad de la especie a las diferentes toxinas Cry, es aquella en la que el consumo y la presencia de nutrientes sean similares a la planta hospedera y, de la misma forma, que ninguno de los ingredientes altere la activación de la protoxina (Helber *et al.*, 2011).

**Cuadro 8.** Cuadrados medios del análisis de varianza sobre la mortandad de larvas de *Spodoptera frugiperda*, alimentadas con fruto (rebanadas centrales de bellotas con 1.5 a 2.0 cm de diámetro) para 10 híbridos de algodón GM. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México, 2017.

<b>FUENTE DE VARIACIÓN</b>	<b>gl</b>	<b>PORCENTAJE DE MORTALIDAD</b>
Híbridos	9	250.83 <sup>NS</sup>
Repetición	4	209.46 <sup>NS</sup>
Error	36	197.24
Total	49	
Media		62%
Desviación estándar		22.94
Coefficiente de variación		55.07%

<sup>NS</sup>: Diferencias no significativas con  $\alpha \leq 0.01$  y  $\alpha \leq 0.05$ ; gl: grados de libertad del error

La especificidad de las proteínas Cry o *delta*-endotoxinas de *B. thuringiensis* es tan alta que sólo atacan a un grupo específico de insectos, como por ejemplo las larvas de los lepidópteros. Cuando estos genes son integrados al genoma de las plantas, éstas producen la toxina como cualquier otra proteína en sus tejidos, en forma sistémica. Si una plaga susceptible ingiere el tejido de la planta transgénica, la plaga se intoxicará y morirá sin siquiera haber causado un daño perceptible a la planta. Se ha observado que los cultivos Bt presentan su máxima expresión durante la floración del cultivo, para después disminuir significativamente sus niveles de expresión. Cuando los tejidos de la planta mueren, la proteína Cry también se degrada rápidamente (Ibarra *et al.*, 2015)

### 4.3.3. Tercer bioensayo

Al probar las mismas condiciones experimentales que el segundo bioensayo, pero cambiando solo la dieta a explantes de hoja, se pudieron apreciar diferencias significativas en el análisis de varianza con una confiabilidad del 95% y un  $\alpha \leq 0.05$ , entre los híbridos de algodón (Cuadro 9), por lo que al utilizar este tipo de tejido vegetal como dieta a lepidópteros y como fuente de toxinas Cry en pruebas de resistencia a la tecnología Bt en cultivos GM

Se pueden obtener resultados favorables y confiables en el monitoreo de las poblaciones provenientes de campo y la determinación de los niveles de resistencia de los insectos a las toxinas Cry del Bt.

**Cuadro 9** Cuadrados medios del análisis de varianza sobre la mortandad de larvas de *Spodoptera frugiperda*, alimentadas con explantes de hoja (1.0 cm<sup>2</sup>) para 10 híbridos de algodón GM. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México, 2017.

FUENTE DE VARIACIÓN	gl	PORCENTAJE DE MORTALIDAD
Híbridos ()	9	416.93*
Repetición	4	70.55 <sup>NS</sup>
Error	36	142.92
Total	49	
Media		48%
Desviación estándar		39.07
Coefficiente de variación		48.88%

\*\* , <sup>NS</sup>: Diferencia significativa con  $\alpha \leq 0.01$  y No Significativa, respectivamente; gl: grados de libertad del error

La comparación de medias entre los valores de mortandad registrado en cada uno de los híbridos para la significancia obtenida en el análisis de varianza indicó, que solo cuatro comparaciones presentaron una confiabilidad del 99% ( $\alpha \leq 0.01$ ) y nueve del 95% ( $\alpha \leq 0.05$ ), todas con respecto a un total de 45 posibles comparaciones entre los rangos ajustados de la variable en estudio por la prueba de K-W en el análisis no paramétrico.

El porcentaje de mortalidad de las larvas bajo dieta con explantes de hoja en los híbridos DP1321 y FM1830 (ambos con el 90% de la mortandad de larvas) son diferentes estadísticamente, considerando una confiabilidad del 99% y un  $\alpha \leq 0.01$ , al porcentaje que presentaron los híbridos FM2007 (20%) y DP1441 (10%), siendo este último un testigo como la fuente de toxinas Cry; para el otro testigo completamente convencional, el híbrido DP989 se reportó un porcentaje de mortandad del 40% (Cuadro 10).

**Cuadro 10.** Comparación de medias ajustadas entre híbridos de algodón por la prueba de Kruskal-Wallis, para el porcentaje de mortalidad con dieta a base de hojas de algodón. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México, 2017.

Híbridos de algodón	Porcentaje de mortalidad hoja	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 DP1321	90										
2 DP0912	40	*									
3 DP0935	40	*	NS								
4 FM1740	50	NS	NS								
5 FM1830	90	NS	*	*	NS						
6 FM1900	40	*	NS	NS	NS	*					
7 FM2007	20	**	NS	NS	NS	**	NS				
8 FM2334	60	NS									
9 DP1441	10	**	NS	NS	NS	**	NS	NS	*		
10 DP989	40	*	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS	

\*, \*\*, NS: Diferencia significativa con  $\alpha \leq 0.01$ ,  $\alpha \leq 0.05$  y No Significativa, respectivamente;

Las plantas transgénicas se han desarrollado con el objeto de resolver una gran diversidad de problemas como la tolerancia a factores ambientales, el aumento en la calidad nutricional de los cultivos, la producción de materiales industriales o de vacunas y la resistencia a plagas y enfermedades, los productos bioinsecticidas con base en *B. thuringiensis* han demostrado desde hace varias décadas su inocuidad hacia los insectos no-blanco. Las toxinas de *B. thuringiensis* son muy específicas hacia las plagas que controla. La mayoría de las toxinas conocidas tiene un efecto variable entre larvas de las especies de lepidópteros, es importante hacer notar que sólo algunas especies de lepidópteros son plagas agrícolas, y que el resto de los lepidópteros son potencialmente susceptibles a las toxinas que producen los cultivos Bt (Ibarra *et al.*, 2015).

## V. CONCLUSIONES

Las condiciones artificiales de cría y mantenimiento de poblaciones de insectos lepidópteros requieren de un control estricto de las condiciones ambientales y fotoperiodo, así como del manejo de la sanidad para el buen establecimiento y evaluación de los individuos en laboratorio.

La utilización de la dieta vegetal proveniente de materiales de Algodón Bt permite evaluar la respuesta de las larvas a las toxinas Cry mediante el establecimiento de bioensayos.

La utilización de explantes de hoja de híbridos de algodón Bt son una fuente promisoría de toxinas Cry en el establecimiento de bioensayos para protocolos de investigación y permiten evaluar poblaciones de lepidópteros presuntamente resistentes provenientes de campos cercanos a los cultivos GM con resistencia a lepidópteros

## VI. LITERATURA CITADA

Abbasi BH, Saxena PK, Murch SJ, Liu CZ (2007) Biotecnología de la equinácea : desafíos y oportunidades. Sociedad para Biología invitro, 43: 481–492

Doi: 10.1007 / s11627-007-9057-2

Aranda E, Sanchez J, Perferoen M, Güereca L, Bravo A. 1996. Interactions of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with the mid-gut epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Invertebr. Pathol. 68: 203-212

Arévalo, H., Zenner, P, I., Romero, L. (2011). Efecto de dietas merídicas en la toxicidad de la Proteína Cristalina (Cry) de *Bacillus thuringiensis* sobre tres plagas del Algodonero (Lepidoptera: Noctuidae). Colombia. Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica , 14 (1): p.29-48.

Barrientos-Gutiérrez , J. E., Peña, A. H., Escobedo-Garrido, J. S., & López-Olguín, J. F. (2013). Manejo convencional de *Spodoptera exigua* en cultivos del municipio de Los Reyes de Juárez, Puebla. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 4 (8): 1197-1208.

Batiz, R., Maciá, F. M., & Marino, R. L. (2016). Tabla de vida y parámetros poblacionales de *Lacertinella australis* (Insecta-Hemiptera-Fulgoromorpha) Argentina. Revista de la Sociedad Entomológica Argentina. 75: 117-126.

Bilenca, D. N; Villafañe, I. G; Cavia, R. & Busch, M., (2003). Variación intra-granja de infestaciones de roedores en granjas avícolas del centro de Argentina. British Poultry Science, 44: 669-673. Doi: 10.1080 / 00071660210001643642

Blanco, C. A., Portilla, M., Jurat-Fuentes, J. L., Sánchez, J. F., Viteri, D., Vega-Aquino, P., Terán-Vargas, A. P., Azuara-Dominguez, A., Lopez JR., J.D.; Arias, R., Zhu, y., Lugobarrera, D., Jackson, R. (2010). Susceptibilidad de las isofamilias de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) a las proteínas Cry1Ac y Cry1Fa de *Bacillus thuringiensis*. Estados Unidos. Southwestern Entomologist. 35 ( 3): 409-415. <https://doi.org/10.3958/059.035.0325>

Blanco, C. A., Gould, F., Vega-Aquino, P., Juratfuentes, J. L., Perera, O. P., Abel, C., (2009). Respuesta de cepas de *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac incorporado en diferentes dietas artificiales para insectos. Estados Unidos J. Econ. Entomol. 102 (4): 1599-1606

<https://doi.org/10.1603/029.102.0426>

Carabias, J., Meave, J. A., Valverde, T., & Santana, Z. C. (2009). Ecología y medio ambiente en el siglo XXI. Pearson Educación, Mexico :264.

Casmuz, A.; Juárez, M. L.; Socías, M. G.; Murúa, M. G.; Prieto, S.; Medina, S.; Willink, E. y Gastaminza, G. 2010. Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Revista de la Sociedad Entomologica de Argentina. 69: 209-231.

Castillo, (2007). Introduccion al Sas paa Windows. Universidad Autonoma Chapingo.Mexico.p. 295.

Chango A., L. I. (2012). Control de gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*) en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.) Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ingenieria Agronómica (Tesis de licenciatura). p.81.

Chattopadhyay, A., Bhatnagar, N. B. & Bhatnagar, R. (2004) Bacterial insecticidal toxins. Critical Review in Microbiology. 30 (1): 33 54.

Doi: 10.1080/10408410490270712

Cisnero, F. H. (2018). Generalidades Sobre las Plagas Agrícolas. Departament of Horticultural Science recuperado de:

<https://hortintl.cals.ncsu.edu/es/content/generalidades-sobre-las-plagas-agr%C3%ADcolas>

CropLife Latin America (2019). Gusano Bellotero o *Heliothis virescens*. Recuperado de: <https://www.croplifela.org/es/plagas/listado-de-plagas/gusano-bellotero>

Dussán, D. D., Giraldo, A. C., & Pazos, S. A. (2013). La biotecnología de *Bacillus thuringiensis* en la agricultura. *Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, 11: 87-95.

Frederick, W. S. (2005). Orden Lepidoptera. En: Frederick WS (Ed.). *Insectos Inmaduros*. Estados Unidos: 1, págs. 288-596.

Galeano, D. F., Medrano, R. R., & Cázares, B. X. (2015). Estado actual de los cultivos genéticamente modificados en Mexico y su contesxto internacional. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Mexico. pp. 6-72.

García-Gutiérrez, C. & Rodríguez-Meza, G. D. (2012). Problemática y riesgo ambiental por el uso de plaguicidas en Sinaloa. *Ra Ximhai*. 8 (3b):1-10.

Goergen G, Kumar PL, Sankung SB, Togola A, Tamo M. 2016. First report of outbreaks of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera Noctuidae), a new alien invasive pest in west and central Africa. *Plos ONE* 11: e0165632

Doi:10.29312/remexca.v4i8.1133.

Helber, A., Polanía, S. I., & Romero, L. (2011). Efecto de dietas merídicas en la toxicidad de la proteína cristalina (Cry) del *Bacillus thuringiensis* sobre tres plagas del algodónero (Lepidoptera: noctuidae) Colombia. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 14(1), 39-48.

Herrera, M. E., Dagatti, C. V., & Becerra, V. C. (2016). Método práctico de cría masiva de *Lobesia botrana* Den. & Schiff. (Lepidoptera: Tortricidae) en condiciones de laboratorio. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 75 (3-4): p.160-164.

Ibarra, J. E., & Castro, M. C. (2015). Mitos y realidades sobre las plantas transgénicas resistentes a insectos. Mexico. *Acta Universitaria*, 25:13-23.

Doi:10.15174/au.2015.905

INTAGRI (2017). Manejo Integrado del Gusano Elotero (*Helicoverpa zea*). Serie Fitosanidad. Núm. 82. Artículos Técnicos de INTAGRI. México. Extraído de: <https://www.intagri.com/articulos/fitosanidad/manejo-integrado-del-gusano-elotero-helicoverpa-zea>

Jiménez G., A.D. (2019). Bacterias entomopatógenas como alternativa para el control biológico de plagas. Universidad de La Laguna. Sección Biología, España (Tesis Licenciatura). 31 p.

Jimenez, L. D. (2011). Efectividad biológica de extractos vegetales sobre larvas de *Spodoptera frugiperda*. Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (Tesis licenciatura).45p.

Juárez, A. H. (2012). Efectividad Biológica del Maíz Genéticamente Modificado para control de Lepidopteros y su efecto sobre la Diversidad de Artrópodos no Blanco. En tesis de Maestría (pág. p.105). Buenavista, Saltillo; Coahuila: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Leon, G. D. (2010). Caracterización aspecto de acción de la toxina Cry1 Ab Modificada activa contra insectos resistentes, y su comparación con la toxina convencional Cry1 Ab de *Bacillus thuringiensis*. Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de México (Tesis Licenciatura). 65p.

Medina, L. J. O. (2014). Obtención de *Helicoverpa zea* (Boddie) resistente a la  $\delta$ -endotoxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis*. facultad de ciencias biológicas Universidad Autónoma de Nuevo León.(Tesis Licenciatura). 45p.

Melo, A. L. A, Soccol, V. T. & Soccol, R. C. (2014) *Bacillus thuringiensis*: mecanismo de acción, resistencia y nuevas aplicaciones: Revisiones críticas en Biotecnología 36: (2), 317-326.

Doi: [10.3109 / 07388551.2014 .960793](https://doi.org/10.3109/07388551.2014.960793)

Murúa, G., Defagó, V. & Virla, E. G. (2003). Evaluación de cuatro dietas artificiales para la cría de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera Noctuidae) destinada a mantener poblaciones experimentales de himenópteros parasitoides: Bol. San. Veg. Plagas 29 (1): 43-51.

Peña, A. H., Gutiérrez, J. E., Garrido, J. S., & Olguín, J. F. (2013). Manejo convencional de *Spodoptera exigua* en cultivos. Puebla Mexico: Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 4(8):1197-208

<https://doi.org/10.29312/remexca.v4i8.1133>

Pesquera, S. d. (10 de septiembre de 2019). El impacto de las plagas y enfermedades en el sector agrícola. Obtenido de

<https://www.gob.mx/siap/articulos/el-impacto-de-las-plagas-y-enfermedades-en-el-sector-agricola>

Polanía, I. Z., Rodríguez, J. A., Maldonado, H. A., & Cruz, R. M. (2008). susceptibilidad de cuatro nóctuidos plaga (Lepidoptera) al gen Cry1Ac. Revista Colombiana de Entomología. 34(1): 41-50.

Sarandón, S. J., & Flores, C. C. (2014). Agroecología: bases teóricas para el diseño y manejo de Agroecosistemas sustentables. Argentina. Edulp integra la Red de Editoriales Universitarias Nacionales. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de Universidad Nacional de La Plata: p.467.

Soberon, M., Bravo, A. (2007). Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación. Obtenido de [http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/libro\\_25\\_aniv/capitulo\\_27.pdf](http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/libro_25_aniv/capitulo_27.pdf)

Zepeda-Jazo, I. (2017). Manejo Sustentable de plagas agrícolas en México. Agricultura, Sociedad y Desarrollo 15: 99-108.