

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



Efecto de Semillas de Maíz Osmocondicionadas con Toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* sobre *Sitophilus zeamais* (Motschulsky)

Por:

MIGUEL HUERTA MOLINA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Saltillo, Coahuila, México

Noviembre, 2023

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

Efecto de Semillas de Maíz Osmoacondicionadas con Toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* sobre *Sitophilus zeamais* (Motschulsky)

Por:

MIGUEL HUERTA MOLINA


TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Aprobada por el Comité de Asesoría:


Dra. Miriam Sanchez Vega
Asesor Principal


Dr. Luis Alberto Aguirre Uribe
Coasesor


Dr. Agustín Hernández Juárez
Coasesor


Dr. Alberto Sandoval Rangel
Coordinador de la División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México
Noviembre, 2023



Declaración de no plagio

El autor quien es el responsable directo, jura bajo protesta de decir verdad que no se incurrió en plagio o conducta académica incorrecta en los siguientes aspectos:

Reproducción de fragmentos o textos sin citar la fuente o el autor original (corta y pega); reproducir texto propio publicado anteriormente sin hacer referencia al documento original (auto plagio); comprar, robar o pedir prestados los datos o la tesis para presentarla como propia; omitir referencias bibliográficas o citar textualmente sin usar comillas; utilizar ideas o razonamientos de un autor sin citarlo; utilizar material digital como imágenes, videos, ilustraciones, graficas, mapas o datos sin citar y/o fuente, así mismo tengo conocimiento de que cualquier uso distinto de estos materiales como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos del Autor.

Por lo anterior me responsabilizo de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaro que este trabajo es original.

Pasante



Miguel Huerta Molina

Asesor Principal



Dra. Mirjam Sánchez Vega

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, a Dios.

Por la vida que me regalo, por ser mi guía, mi protector y mi fortaleza en cada momento. Por darme la capacidad y la sabiduría para culminar mis estudios.

A mi querida Universidad ¡Mi Alma Terra Mater!

Gracias por abrirme sus puertas, por acogerme como mi segunda casa, por todas las herramientas que me brindo para formarme como un profesional, por todos los maravillosos momentos y buenos recuerdos durante mi estancia, por todo, **Mil gracias.**

A mis asesores.

A la Dra. **Miriam Sánchez Vega** por todo su apoyo para llevar a cabo este proyecto, por motivarme a terminarlo por su paciencia y confianza y por siempre ser una gran persona.

Al Ing. **Marcos Librado García Morales**, por ser mi asesor y de gran ayuda en este proyecto, brindarme sus conocimientos y ser una gran persona.

Al Dr. **Luis Alberto Aguirre Uribe**, por la confianza y apoyo para llevar a cabo este proyecto.

Al Dr. Agustín Hernández Juárez, por la confianza y apoyo para este trabajo.

A la Dra. Alejandra Bravo de la Parra, por su disponibilidad para proporcionarnos las toxinas empleadas en este proyecto y por sus sugerencias en la realización de la fase experimental.

Al CONAHCYT, por medio del programa de IxM al cual pertenece la Dra. Miriam, este trabajo forma parte de los productos obtenidos en el proyecto 1043: Monitoreo de la resistencia de insectos a las toxinas Cry de *Bt*.

A la memoria del M.C. Víctor Sánchez Valdés (Q.E.P.D) por los conocimientos que me aportó en la carrera y una gran amistad.

A mis maestros

Al M.C. Abiel Sánchez Arizpe por ser mi tutor durante la carrera, sus consejos y regaños que serán de gran importancia por el resto de mi vida.

Al Dr. Oswaldo García por sus conocimientos que me aportó y su gran amistad. Por aportarme sus conocimientos durante y ser parte de mi formación profesional y sus consejos para cada día ser mejor persona,

Al Dr. Gabriel Gallegos Morales, por aportarme sus conocimientos, consejos y su buena amistad.

A la Ing. Esmeralda Hernández López, por su disposición y su gran apoyo en este trabajo.

Al Ing. Javier Eliorep Rodríguez Chipi, por su amistad y apoyo durante la carrera.

Al Departamento de Parasitología y la generación CXXXIV mis compañeros y amigos.

A mis amigos de toda la vida, Pedro, Mario, Aarón, Báez, Heriberto, Mayo, Payo, Pablo, Joshi, El Triste, Juanca, por su amistad y apoyo siempre en todo momento, al equipo de box, a los profes Joel y el Negro por sus consejos para ser un buen deportista.

DEDICATORIA

A Dios. Por darme buena salud y ser mi guía en todo momento.

A mis Padres.

Porfirio Huerta Villaseñor

María de los Ángeles Molina Rodríguez

Por todo el apoyo que me han brindado desde mi infancia y hasta la fecha, por siempre darme lo mejor, sus consejos para ser la persona que ahora soy, aprovecho para decirles cuanto los quiero y estimo, por ser los mejores padres que pueden existir.

A mis hermanas.

Sagrario Yovana

Guadalupe Dariana

Por siempre apoyarme emocionalmente y por creer siempre en mí, por motivarme siempre con sus palabras.

A mi Esposa.

De una manera muy especial a mi esposa, LUCERO CASTRO ROSALES.

No tengo palabras para terminar de agradecer que estés a mi lado, por siempre estar en los momentos más importantes de mi carrera y de mi vida, por los años que has pasado a mi lado siendo este un reto muy importante en nuestras vidas y gracias a tu apoyo incondicional, por tus palabras de

aliento siempre en los momentos más difíciles. Por todo tu amor y comprensión por siempre Gracias, ¡Te Amo!

A mis Hijos.

Felipe de Jesús

Dulce Sofía Huerta Castro, (mi pollito y pollita).

Por ser el motor de mi vida para seguir adelante y poder concluir este capítulo más en mi vida, que es de ustedes y para ustedes.

A mis suegros.

Leoncio Castro Rodríguez

Juana Rosales Calderón

Por todo el gran apoyo que me han brindado, por aceptarme en su familia como un hijo más.

A mis cuñados MC. Laura Castro Rosales y al Doctor Gregorio Castro Rosales, su esposa Guillermina Herrera, mis sobrinas Estefi y Sofí, por su apoyo incondicional, recibéndome siempre con los brazos abiertos en su casa, no tengo como agradecer todo lo que me brindaron.

A toda mi familia

Por sus buenos deseos, por siempre creer en mí alentándome a seguir adelante, mis padrinos José y Delfina por creer en mí y sus palabras de aliento, a mis abuelitas Carmen y Vicenta por sus bendiciones y siempre estar al

pendiente que este bien, mis tíos Alfonso, Amador, Rigo, Isela, Elodia, Caro, Clemente, Sofí +, mis sobrinos Gabi y Teresita, mis primas Aliss, Carol, Anahí, Yuli, Ely, Vanesa, Belinda, Fer, Bruno, Yael, Yera, Jaime, a tod@s gracias por creer en mí.

A los ingenieros Juan Carlos, Francisco, Ricardo y Gabriel Castro Herrera por su apoyo y amistad de toda la vida.

A todos y cada uno de ustedes ¡Muchas Gracias! porque lo que ahora soy, es por las personas que me rodean y están a mi lado.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	I
DEDICATORIA.....	IV
ÍNDICE DE CONTENIDOS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	X
RESUMEN	XII
INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivo general	2
1.1.1. Objetivos específicos	2
1.2. Hipótesis	2
REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. Origen del maíz.....	3
2.1.1. Importancia del maíz a nivel mundial.....	3
2.1.2. Producción mundial.....	4
2.1.3. Importancia del maíz en México	5
2.1.4. Producción de maíz en México	5
2.2. Taxonomía del maíz.....	6
2.2.1. Morfología del maíz.....	7
2.3. Características del grano de maíz.....	8
2.3.1. Almacenamiento y conservación de granos y semillas.....	8
2.3.2. Antecedentes de las plagas de granos almacenados.....	9
2.4. Origen y evolución de los insectos de almacén.....	10
2.4.1. Clasificación y distribución de las plagas de almacén.....	10
2.4.1.1. Plagas primarias:	10
2.4.1.2. Plagas secundarias:	11
2.4.1.3. Plagas terciarias:	11
2.4.2. Clasificación taxonómica de <i>Sitophilus zeamais</i> M.....	11
2.4.3. Descripción general del gorgojo del maíz <i>Sitophilus zeamais</i> M.	12
2.4.4. Distribución e importancia del gorgojo del maíz.....	12
2.5. Descripción morfológica de <i>Sitophilus zeamais</i> M.	13
2.5.1. Huevecillo	13

2.5.2.	Larva.....	14
2.5.3.	Pupa.....	15
2.5.4.	Adulto.....	15
2.5.5.	Ciclo de vida	17
2.6.	Métodos de control para plagas de almacén.....	17
2.6.1.	Control preventivo.....	18
2.6.2.	Control físico	18
2.6.3.	Control biológico	19
2.6.4.	Control químico.....	20
2.6.5.	Control tradicional.....	20
2.7.	Características de <i>Bacillus thuringiensis</i>	21
2.7.1.	Importancia de <i>Bacillus thuringiensis</i>	22
2.7.2.	Las toxinas Cry	23
2.7.3.	Mecanismo de acción de las toxinas Cry	24
2.7.4.	Productos en el mercado con <i>Bt</i>	25
2.8.	Plagas que controla las toxinas Cry de <i>Bt</i>	25
2.8.1.	Descripción de la toxina Cry3Aa	26
2.8.2.	Descripción de la toxina Cry3Ab	26
2.8.3.	Descripción de la toxina Cry1F	27
2.8.4.	Descripción de la toxina Cry1C.....	27
2.9.	Trabajos reportados con toxinas Cry.....	27
3.1.	Osmoacondicionamiento.....	29
	MATERIALES Y METODOS.....	31
4.1.	Ubicación de la zona de investigación	31
4.2.	Diseño experimental.....	31
4.3.	Obtención de las diferentes toxinas Cry de <i>Bt</i> para los tratamientos	32
4.4.	Descripción de los tratamientos	32
4.5.	Obtención de insectos y establecimiento de colonia para bioensayos.....	33
4.6.	Metodología de los bioensayos	33
4.7.	Periodo de imbibición	34
4.8.	Periodo de secado	36

4.9. Periodo de exposición de los insectos	36
5.1. Variables evaluadas	37
5.2. Análisis estadístico.....	38
RESULTADOS Y DISCUSION.....	39
6.1. Total de individuos por toxina.....	39
6.2. Porcentaje de adultos por tratamiento.....	40
6.3. Total de pupas por tratamiento.....	41
6.4. Porcentaje de larvas expuestos a <i>Bt</i>	42
6.5. Porcentaje de larvas del primer estadio	44
6.6. Porcentaje de larvas del segundo estadio.....	45
6.7. Porcentaje de larvas del tercer estadio	46
6.8. Porcentaje de mortalidad de las larvas por estadio.....	47
CONCLUSIONES	49
LITERATURA CITADA.....	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Rankin de maíz a nivel mundial (Merino, 2018).	4
Figura 2. Taxonomía del grano de maíz (Rábago, 2017).	8
Figura 3. Huevecillo de <i>Sitophilus zeamais</i> M (Proain, 2020).	14
Figura 4. Larva de <i>Sitophilus zeamais</i> (Proain, 2020).	14
Figura 5. Pupa de <i>Sitophilus zeamais</i> M (Proain, 2020).	15
Figura 6. Adulto de <i>Sitophilus zeamais</i> M (Alpert, 2021).	16
Figura 7. Dimorfismo sexual en base al área cefálica de <i>Sitophilus zeamais</i> M (Iannacone, 2012).	16
Figura 8. Ciclo de vida de <i>Sitophilus zeamais</i> (García-Saldaña, 2017).	17
Figura 9. Mecanismo de acción de <i>Bacillus thuringiensis</i> : 1) Ingestión de la bacteria, 2) Solubilización de los cristales, 3) Activación de los cristales, 4) Unión de proteínas a los cristales, 5) Formación de poros en la membrana y lisis celular (Schünemann <i>et al.</i> , 2014).	24
Figura 10. Ubicación del Departamento de Parasitología de la UAAAN.	31
Figura 11. Frascos utilizados para los bioensayos.	34
Figura 12. Cantidad de agua requerida para cubrir los granos de maíz.	34
Figura 13. Imbibición de los granos hasta cubrirlos totalmente.	35
Figura 14. Granos cubiertos totalmente.	35
Figura 15. Proceso de secado de los granos a temperatura ambiente por 12 horas.	36
Figura 16. Granos con las toxinas Cry de <i>Bt</i> e insectos de <i>S. zeamais</i>	37
Figura 17. Número total de individuos de <i>S. zeamais</i> obtenidos después de haber sido alimentados, sus progenitores con granos de maíz osmoacondicionados con toxinas Cry de <i>Bt</i>	39
Figura 18. Porcentaje de adultos obtenido como progenie después de la exposición de los insectos de <i>S. zeamais</i> a toxinas Cry de <i>Bt</i> , por medio de granos de maíz osmoacondicionados.	40

Figura 19. Porcentaje de pupas obtenido después de la exposición de los insectos de <i>S. zeamais</i> a toxinas Cry de <i>Bt</i> , por medio de granos de maíz osmoacondicionados.	42
Figura 20. Porcentaje de larvas obtenido después de la exposición de los insectos de <i>S. zeamais</i> a toxinas Cry de <i>Bt</i> por medio de granos de maíz osmoacondicionados.	43
Figura 21. Porcentaje de larvas vivas y muertas del primer estadio, obtenido después de la exposición de los insectos de <i>S. zeamais</i> a toxinas Cry de <i>Bt</i> por medio de granos de maíz osmoacondicionados.	45
Figura 22. Porcentaje de larvas vivas y muertas del segundo estadio, obtenido después de la exposición de los insectos de <i>S. zeamais</i> a toxinas Cry de <i>Bt</i> , por medio de granos de maíz osmoacondicionados.	46
Figura 23. Porcentaje de larvas vivas y muertas del tercer estadio, obtenido después de la exposición de los insectos de <i>S. zeamais</i> a toxinas Cry de <i>Bt</i> , por medio de granos de maíz osmoacondicionados.	47

RESUMEN

El mayor problema de pérdidas en los granos almacenados es ocasionado por plagas, enfermedades o eventos climáticos, que deterioran y destruyen los granos. Este problema es importante para los productores, ya que el maíz es parte de los alimentos básicos consumidos durante todo el año. *Sitophilus zeamais* Motschulsky es una de las plagas que más afecta al cultivo en postcosecha, ya que genera pérdidas durante el almacenamiento, que va desde un 10 a un 40%. El objetivo de la presente investigación fue demostrar, que las toxinas Cry reportadas para coleópteros tienen efectos negativos sobre el insecto *S. zeamais*, plaga de granos almacenados. La investigación se llevó a cabo con insectos de *S. zeamais*, se realizó un bioensayo, en el cual se utilizaron 150 g de semilla de maíz osmoacondicionada con 73 mL de H₂O y una concentración para todos los tratamientos de 1000 ppm con toxinas Cry de *Bt* modificadas (Cry3Aa, Cry3Ab, Cry1F, Cry1C y un testigo con H₂O). Este bioensayo se estableció en condición de laboratorio, con cuatro repeticiones y se agregaron insectos sexados como unidad experimental. Para el bioensayo se utilizaron diez insectos, en la proporción 1♂: 1♀, respectivamente, incubados a una temperatura de 25–30°C y una humedad relativa de 60±5%. Los resultados obtenidos en la prueba no presentaron diferencias significativas, pero se observó una alta mortalidad con la toxina Cry3Ab y menor con la Cry3Aa siendo estas específicas para coleópteros, la Cry1C tuvo un porcentaje significativo de mortalidad mientras que la Cry1F mostro mayor número de larvas vivas; sin embargo, las cuatro toxinas evaluadas retrasaron el ciclo biológico del insecto, con respecto al testigo.

Palabras clave: plagas de granos almacenados, *Zea mays*, toxinas Cry de *Bt*, proteínas insecticidas.

INTRODUCCIÓN

El maíz es sin duda, el grano que ocupa el primer lugar como cultivo y consumo en México y otros países de Sudamérica como Guatemala, Honduras, El Salvador y África del sur (Guzmán, 2009). El incremento en la población mundial cada día está en aumento y la demanda de alimentos ha ocasionado, que se empleen nuevas tecnologías para el control fitosanitario de las plagas que afectan a los principales cultivos de importancia económica. Una de las bases indispensables para aplicar estas tecnologías, es la identificación correcta de la plaga, para poder determinar las acciones necesarias a desarrollar (Bautista, 2006).

El maíz exhibe una gran biodiversidad, ocupando el tercer lugar en importancia después del trigo y el arroz, y se emplea como alimento, forraje y materia prima para la industria (Rathna Priya & Manickavasagan, 2021). Su producción se mantiene todo el año, lo que genera condiciones favorables para el desarrollo de diferentes plagas y enfermedades, por lo que su prevalencia es un riesgo potencial para el manejo del cultivo (Hernández-Cruz *et al.*, 2019).

El gorgojo del maíz *Sitophilus zeamais* (Motschulsky) es un insecto del orden coleoptera: de la familia Curculionidae, se considera una de las principales plagas en pre y postcosecha de granos, cuyo daño se detecta principalmente durante el almacenamiento (Mamoon-Ur-rashid *et al.*, 2021), donde produce de un 10 hasta un 60% de pérdidas de peso como de calidad y porcentaje de germinación dentro de los primeros 3 a 6 meses de almacenamiento en los países en desarrollo (Ileke *et al.*, 2020). Su distribución es cosmopolita es decir se encuentra en todo el mundo, afecta principalmente a regiones tropicales, subtropicales húmedas y templadas (Hong *et al.*, 2018). El daño que ocasiona el adulto es que perfora el grano para ovipositar, mientras que las larvas forman surcos en el endospermo al alimentarse, su ciclo de vida tiene una duración de 30 a 113 días dependiendo las condiciones climatológicas; y su presencia favorece el ataque de otros organismos (García-Lara

et al., 2019). De acuerdo a lo anterior el objetivo de esta investigación es evaluar las diferentes toxinas de *B. thuringiensis* que han sido procesadas en el laboratorio mediante mutaciones, para determinar los efectos que pueda ejercer sobre *S. zeamais* y su desarrollo en granos de maíz osmoacondicionados, con la finalidad de que esta estrategia funja como una alternativa al manejo de la plaga en almacén.

1.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*, sobre el desarrollo de la especie *S. zeamais*, bajo condiciones controladas de laboratorio, mediante semillas de maíz osmoacondicionadas.

1.1.1. Objetivos específicos

- Determinar la mortalidad sobre la generación F1 de *S. zeamais*, alimentados con maíz tratado con toxinas Cry de *Bt*.
- Evaluar el efecto en el ciclo de vida de *S. zeamais* causado por las toxinas Cry de *Bt*.
- Seleccionar la toxina que provoco mayor mortalidad y disminución de individuos en los diferentes estadios larvarios de *S. zeamais* y que impacto en el número de adultos emergidos.

1.2. Hipótesis

Se espera que al menos una de las toxinas Cry de *Bt*, presente efecto en la reducción de la población de *S. zeamais*, bajo condiciones controladas de laboratorio y con alimentación de semilla osmoacondicionada con las toxinas.

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Origen del maíz

El cultivo del maíz tuvo su origen en América Central, especialmente en México, de donde se difundió, hacia el norte hasta Canadá y hacia el sur hasta la Argentina. La evidencia más antigua de la existencia del maíz es de unos 7,000 años de antigüedad, ha sido encontrada por arqueólogos en el valle de Tehuacán, Puebla, México. Pero es posible que hubiese otros centros secundarios de origen en América. Este cereal era un producto esencial en las civilizaciones maya y azteca y tuvo un importante papel en sus creencias religiosas, festividades y nutrición; ambos pueblos incluso afirmaban que la carne y la sangre estaban formadas por maíz. La supervivencia del maíz más antiguo y su difusión se debió a los seres humanos, quienes recogieron las semillas para posteriormente plantarlas. A finales del siglo XV, tras el descubrimiento del continente americano por Cristóbal Colón, el grano fue introducido en Europa a través de España. Se difundió entonces por los lugares de clima más cálido del Mediterráneo y posteriormente a Europa septentrional (Valencia, 2013). El maíz se cultiva en todas las regiones del mundo aptas para actividades agrícolas y que se recoge en algún lugar del planeta todos los meses del año. Crece desde los 58° de latitud norte en Canadá y Rusia hasta los 40° de latitud sur en el hemisferio meridional. Se cultiva en regiones por debajo del nivel del mar en la llanura del Caspio y a más de 4000 metros de altura en los Andes Peruanos (Revelo Benavides, 2011).

2.1.1. Importancia del maíz a nivel mundial

El maíz es uno de los cereales más importantes del mundo, es una fuente nutricional de los seres humanos, así como de animales. Tiene un papel fundamental como materia prima básica de la industria. La planta cuando esta tierna es empleada como forraje, además se ha utilizado con gran éxito en las industrias

lácteas y cárnicas. Tras la recolección del grano, las hojas secas y la parte superior, incluida las flores, se utilizan como forraje de calidad relativamente bueno para la alimentación de rumiantes de muchos pequeños agricultores de países en desarrollo (FIRCO, 2017).

2.1.2. Producción mundial

USDA (2022) estima que la producción mundial de maíz 2022/2023 sería de 1,161.86 millones de toneladas. México ocupa el séptimo lugar en la producción mundial, siendo los primeros tres, los principales productores: Estados Unidos con 353. 8 millones de toneladas, China con 274 millones de toneladas y Brasil con 126 millones de toneladas (Figura 1). La producción de maíz del 2021 fue de 1,216.87 millones de toneladas.

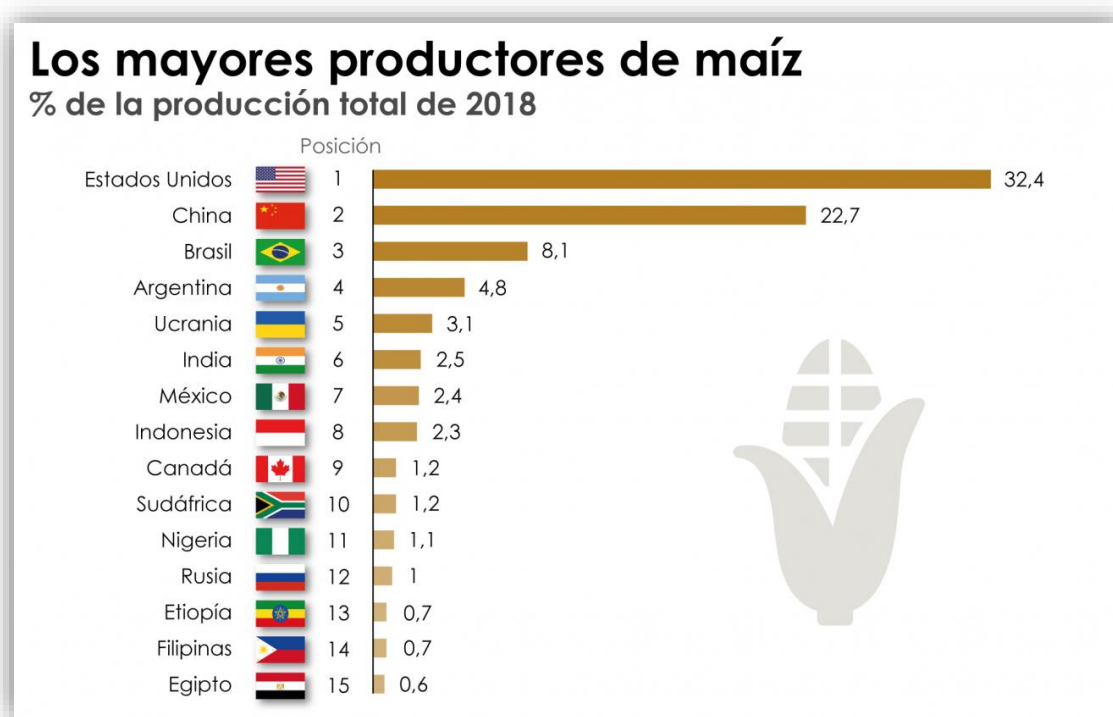


Figura 1. Rankin de maíz a nivel mundial (Merino, 2018).

2.1.3. Importancia del maíz en México

México es el centro de origen y diversidad del maíz, un cultivo de importancia global. Dentro de México, el maíz es un alimento básico que provee carbohidratos y conforma un elemento central de las dietas de consumidores urbanos y rurales. Adicionalmente, este cultivo tiene un gran valor cultural, representando el origen de la vida en muchas de las costumbres de los grupos indígenas de México y otros países de América central (FAO, 2013).

En México, dada su importancia en la dieta diaria de la población mexicana, de los más de 30 millones de toneladas que se consumen anualmente, solo 22.6 millones se producen en el país. Es decir, hay un déficit del 28.1% del consumo nacional aparentemente del cual se importan 11 millones de toneladas promedio anual, representando el 30% de la demanda interna de maíz blanco y amarillo (SAGARPA-SIAP, 2014).

El maíz, es uno de los cereales de mayor importancia a nivel mundial, suministra elementos nutritivos a los seres humanos, a los animales y es una materia prima básica de la industria. El maíz es un cultivo representativo de México por su importancia económica, social y cultural. Su producción se divide en blanco y amarillo, el maíz blanco se destina principalmente al consumo humano, mientras que la producción de maíz amarillo se destina a la industria o la fabricación de alimentos balanceados para la producción pecuaria (SADER, 2018).

2.1.4. Producción de maíz en México

La Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER, 2021) informó un crecimiento de 2.6% de la producción de maíz grano en México en el año agrícola 2021, con un volumen de 28 millones 427 mil 436 toneladas. (SIAP), esta producción incluye tanto el maíz amarillo como el blanco. En el año agrícola 2020,

la producción de maíz grano totalizó en 27 millones 707 mil 775 toneladas, lo que significó un aumento de 1.8 por ciento en comparación con los 27 millones 228 mil 242 toneladas del 2019. En el caso del maíz blanco, hubo una producción de 24 millones 747 mil 585 toneladas, sin embargo, la disponibilidad del producto en el país, así como la influencia de los precios internacionales, mantiene cierta presión al alza en los precios del grano. En el caso del maíz amarillo, la producción fue de tres millones 352 mil 155 toneladas, para el ciclo agrícola 2021. Por entidades, el estado de Guerrero produjo poco más de un millón 379 mil toneladas de maíz en el año agrícola 2020. Entre el 65 y el 68% de este volumen es usado por las familias campesinas para autoconsumo. En el mismo año y para maíz blanco, Jalisco registró tres millones 087 mil 917 toneladas, en Michoacán la producción fue de un millón 967 mil 114 toneladas, mientras que el Estado de México tuvo un millón 841 mil 677 toneladas. Para el maíz amarillo, Chihuahua registró una producción de un millón 149 mil 104 toneladas, Jalisco 851 mil 479 y Tamaulipas 345 mil 444 toneladas. Históricamente México ha presentado insuficiencia en esta variedad, pues alrededor del 69% se ha cubierto con importaciones que se destinan, principalmente, al consumo de la industria pecuaria (SADER, 2021).

2.2. Taxonomía del maíz

Clasificación taxonómica del maíz (Cabrerizo, 2012).

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Poales

Familia: Poaceae

Género: *Zea*

Especie: *mays* L.

2.2.1. Morfología del maíz

La planta de maíz pertenece a la familia Poaceae o también conocida como gramíneas, es de ciclo anual y de tallos resistentes y erectos que pueden alcanzar los 2.5 m de altura. A lo largo del tallo aparecen diversos entrenudos, de los que brotan las hojas, las características morfológicas específicas para esta especie son mencionadas por Máxima (2020), las cuales se describen a continuación:

Raíces: presenta dos tipos de raíz: las primarias y fibrosas que van bajo la tierra y las adventicias que brotan del primer nudo de la planta y son superficiales. Ambas permiten que se mantenga erguido el largo del tallo.

Tallo: está compuesto a su vez por tres capas, una impermeable transparente, una pared vegetal por la que circula la sabia y una medula de tejido esponjoso y blanco en donde se almacenan los azúcares.

Hojas: generalmente lanceoladas, largas y finas, alcanzando los 120.0 centímetros de longitud y los 9.0 centímetros de ancho.

Inflorescencia: se trata de las flores de la planta, distintas según el sexo de esta:
Mascullinas: llamadas panícula, panoja, espiga o miahuatl, consiste en un eje central y ramas laterales, en donde se produce el polen necesario para fecundar a las hembras.

Femeninas: llamadas mazorcas, son espigas cilíndricas dotadas de flores en hileras paralelas, provistas de ovarios en los que el polen germina, produciéndose así las semillas o granos que, al estar maduros, adquieren una forma bulbosa y coloración uniforme.

2.3. Características del grano de maíz

El grano de maíz se denomina en botánica cariósipide o cariopsis; cada grano contiene revestimiento de la semilla o cubierta seminal y la semilla, como se muestra en la Figura 2. También se muestran las cuatro estructuras físicas fundamentales del grano: el pericarpio, cascarilla, el endospermo, el germen o embrión y el pedicelo (Rábago, 2017).

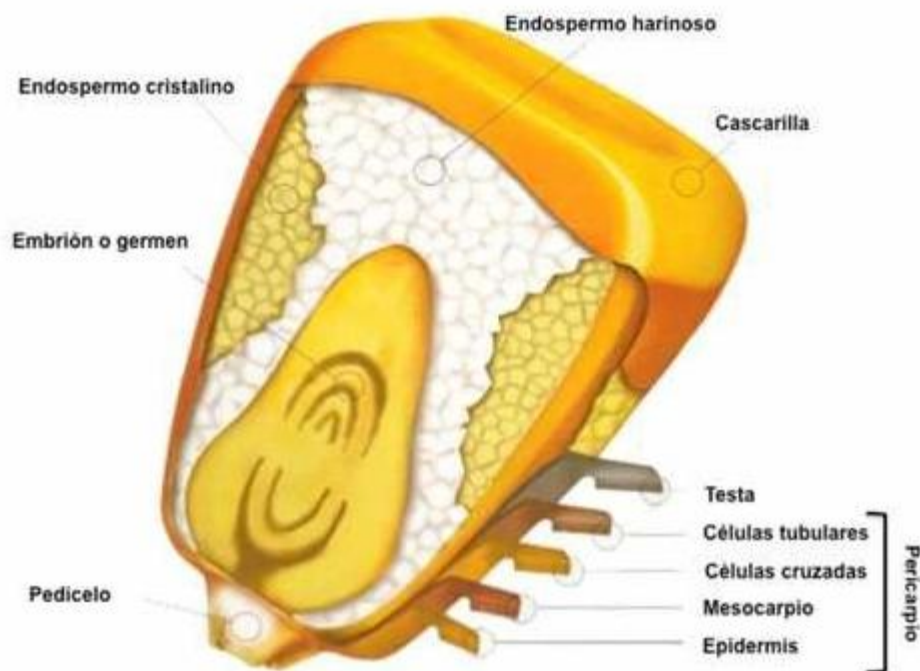


Figura 2. Taxonomía del grano de maíz (Rábago, 2017).

2.3.1. Almacenamiento y conservación de granos y semillas

El almacenamiento de alimentos se refiere a concentrar la producción en lugares estratégicamente seleccionados; en tanto que la conservación implica proporcionar a los productos almacenados las condiciones necesarias para que no sufran daños por plagas, enfermedades o del medio ambiente, evitando así disminución en su peso, reducciones en su calidad o, en casos extremos, la pérdida total. En México

no existen cifras precisas que indiquen el volumen de pérdida de granos y semillas; sin embargo, se estima que anualmente se pierde entre el 5 y el 25% de la producción total de maíz, trigo y frijol, principales granos básicos del país. El grano o la semilla son entes vivientes que respiran oxígeno del ambiente y producen como resultado bióxido de carbono, agua y energía que se traduce en calor; consecuentemente, en la medida en que se acelere el proceso de la respiración, lo hará también el deterioro del grano o la semilla. Los principales factores que determinan y acentúan las pérdidas de granos y semillas en el almacén, son: los altos contenidos de humedad del producto almacenado, elevada temperatura y/o humedad en el ambiente, elevado porcentaje de impurezas mezcladas en granos y semillas como por ejemplo; granos o semillas quebradas, restos de plantas, insectos muertos y tierra, carencia de almacenes adecuados para mantener los granos, presencia de insectos, hongos, bacterias y roedores, manejo deficiente de los granos y desconocimiento de los principios de la conservación (FAO, 2016).

2.3.2. Antecedentes de las plagas de granos almacenados

El origen de las plagas de almacén se remonta a los inicios de la civilización humana, específicamente al inicio de la agricultura y al hábito de acumular alimentos para reducir la dependencia de los ciclos productivos de la naturaleza a agricultura. Las nuevas estructuras creadas para el almacenamiento de granos, semillas y otros alimentos, fueron colonizadas rápidamente por insectos, roedores y aves desde sus hábitats naturales, gracias a que no eran herméticas y por las adaptaciones de las plagas que les permitían explotar estos nuevos recursos. La característica que tienen en común estas plagas es la adaptación a sitios con bajo contenido de humedad, espacio, aireación y luz, así como poseer estructuras bucales en alguna etapa de su ciclo de vida que les permitiera aprovechar los productos almacenados. Su control fue y es muy complicado, por las dinámicas de conservación, cambios importantes en la ecología, el clima y el comportamiento humano que favorecen su desarrollo (DEGESCH, 2017).

2.4. Origen y evolución de los insectos de almacén

En los estudios de historia se cree que los insectos de almacén hicieron su aparición en la era neolítica, cuando el hombre comenzó a criar animales domésticos, a cultivar plantas y a almacenar cereales. Las especies conocidas hoy como plagas de almacén se desarrollaron primeramente en sus hábitats naturales y después se trasladaron o fueron trasladados a los lugares de almacenaje, ya que estos lugares les proporcionaban las condiciones adecuadas para su desarrollo. Algunas especies de insectos, actualmente asociados con los productos almacenados han sido encontrados en tumbas del antiguo Egipto, insectos como *Tribolium spp.* y *Sitophilus granarius* alrededor de 2300 a 2500 a. C. respectivamente (Moroto Borrego, 2014).

2.4.1. Clasificación y distribución de las plagas de almacén

Los insectos que se alimentan de granos almacenados son clasificados en tres categorías (Gutiérrez, 2023). las cuales son:

2.4.1.1. Plagas primarias:

Son insectos que tienen la capacidad de romper la cubierta externa de los granos y penetrarlos o también ovipositar sobre el grano y al emerger la larva, esta perfora y se alimenta de la semilla, especies como: *S. zeamais*, *Sitophilus orizae* (L.), *S. granarius* (L.), *Acanthoscelides obtectus* (Say), *Sitotroga cerealella* (Olivier), *Prostephanus truncatus* (Horn), *Rhyzopertha dominica* (F.) y *Plodia interpunctella* (Hubber) (García Lara *et al.*, 2007)

2.4.1.2. Plagas secundarias:

Estos insectos se desarrollan después que exista un daño en los granos hechos por plagas primarias, normalmente se alimentan de harina y granos perforados por las plagas primarias, como son: *Tribolium castaneum* (Herbst), *Tribolium confusum* (Duval), *Orizaephillus surinamensis* (L.), *Cryptolestes pusillus* (Schonherr) (Gutiérrez, 2023).

2.4.1.3. Plagas terciarias:

Estos se desarrollan después de que los insectos primarios y secundarios han realizado su daño, estos se alimentan de impurezas, granos perforados o con otros daños, residuos dejados por los otros insectos, algunos incluso se alimentan de hongos desarrollados en los granos que se han deteriorado (Gutiérrez, 2023).

2.4.2. Clasificación taxonómica de *Sitophilus zeamais* M

Reino: Animal

Phylum: Artrópoda.

Clase: Insecta

Subclase: Pterigota

Orden: Coleóptera

Suborden: Pollyphaga

Superfamilia: Curculionidea

Familia: Curculionidae

Subfamilia: Rhynchophorinae

Género: *Sitophilus*

Especie: *zeamais* M.

(Borror *et al.*, 1981; Guijón, 2022).

2.4.3. Descripción general del gorgojo del maíz *Sitophilus zeamais* M.

A este insecto se le conoce con diferentes nombres comunes como: gorgojo y/o picudo del maíz. Su nombre científico es *S. zeamais* M. Esta especie de insecto se considera de las más destructivas y común de todas las especies que atacan los granos almacenados como el maíz, sorgo, arroz y cereales menores. Esta especie tiene un par de antenas en forma de codo, muy peculiar en los curculionidos. Los adultos miden de 2.5 a 4 mm de largo, son de color café a negrozco. El pronoto es casi tan largo como los élitros, los élitros tienen ranuras longitudinales. El adulto de *S. zeamais* presenta cuatro manchas amarillentas o rojizas en los élitros y solo se pueden diferenciar por sus genitales de *S. oryzae*. (Bacopulos, 2003).

2.4.4. Distribución e importancia del gorgojo del maíz

Este insecto es una plaga cosmopolita, es decir se encuentra en todo el mundo, pero principalmente en las zonas cálidas, húmedas, tropicales y subtropicales. Ha desplazado paulatinamente al gorgojo del arroz, en algunos países con climas tropicales, que originalmente era predominante. *S. zeamais*, tiene preferencia por el maíz, de ahí viene su nombre vulgar y técnico. Además del maíz, ataca un gran número de cosechas de granos, causando cuantiosas pérdidas en las regiones de clima caliente y húmedo, reduciendo las semillas a polvo y cascara. Los adultos tienen la capacidad de volar, por ello pueden volar de los graneros a los campos, donde inician las infestaciones, las que pueden continuarse después de las cosechas y constituirse en una plaga destructiva en el almacén. Al gorgojo del maíz se le considera como una plaga primaria porque el adulto es capaz de dañar los granos sanos y las larvas se alimentan de su interior. Al emerger el adulto, deja típicos orificios en los granos. En harina y productos de la molienda se le considera de importancia secundaria, ya que no es capaz de multiplicarse. Se ha reportado

causando daños en semillas de oleaginosas, pero en este caso, no se reporta el daño en frijol (Torres, 2011).

Durante la etapa de almacenamiento de los granos pueden ocurrir daños que oscilan entre el 5 y 30%, de estos; el 10% puede ser causado por el ataque de insectos plaga (Zunjare *et al*, 2016).

Los insectos, además de alimentarse y destruir el grano, lo contaminan con hongos, bacterias y virus, infectándolo con su excremento y cuerpos muertos, por otra parte, debido al metabolismo de estos insectos, se produce una condición anormal del grano, disminuye la calidad alimentaria, se reduce el valor económico y poder germinativo de las semillas (Alvarado, 2017).

2.5. Descripción morfológica de *Sitophilus zeamais* M.

2.5.1. Huevecillo

Los huevecillos son de color blanco aperlado casi llegando a un color oscuro (Figura 3), éstos son depositados por la hembra en el interior del grano y posteriormente son cubiertos por una secreción como forma de protección, tienen forma de pera u ovoide, ensanchados en la parte media de abajo, miden aproximadamente 0.3 mm de ancho y 0.7 mm de largo. El huevecillo eclosiona a los 6 días. Cada hembra adulta puede producir de 300 a 400 huevecillos y el ciclo completo puede durar de 30 a 113 días según las condiciones en que se encuentre (Torres, 2011).



Figura 3. Huevecillo de *Sitophilus zeamais* M (Proain, 2020).

2.5.2. Larva

Las larvas son pequeñas, mide de 2.5 a 2.75 mm de largo, son de color blanco aperlado, el cuerpo es grueso y apodo, cabeza pequeña de un color café claro, con la capsula cefálica de color oscuro y el cuerpo recurvado en forma de C, más larga que ancha (Figura 4). Pasa por cuatro estadios larvales y todos en el interior del grano. La larva tiene un periodo de 3 semanas desde que eclosiona del huevecillo hasta el estadio de pupa (Torres, 2011).



Figura 4. Larva de *Sitophilus zeamais* (Proain, 2020).

2.5.3. Pupa

El estado de pupa inicia de color blanco pálido, hasta tornarse de un color café claro en su final, es de tipo exarate y mide de 2.75 a 5.0 mm de longitud, presenta una probóscide larga, dirigida hacia la parte anterior, igualmente se encuentra en el interior del grano (Figura 5). La pupa tiene una duración de 5-30 días (Torres, 2011).



Figura 5. Pupa de *Sitophilus zeamais* M (Proain, 2020).

2.5.4. Adulto

El adulto es muy similar al gorgojo del arroz, aunque presenta una coloración más oscura y más grande; mide de 2.5 a 4.5 mm de longitud, de color oscuro y presenta un pico o rostrum alargado con antenas acodadas de ocho segmentos, protórax con marcadas punturas en el pronoto a lo largo de la línea media del cuello al escutelum, el pronoto casi tan largo como los élitros, alas funcionales, presentan cuatro manchas de color amarillo a rojizas en los élitros (Figura 6). A medida que emerge del grano alcanza una longevidad que oscila entre 109 y 113 días (Ojo y Omoloye, 2016).

La hembra se diferencia del macho por sus genitales, son más grandes y el pico o rostrum es más largo y más rugoso que el del macho (Figura 7) (Torres, 2011).



Figura 6. Adulto de *Sitophilus zeamais* M (Alpert, 2021).

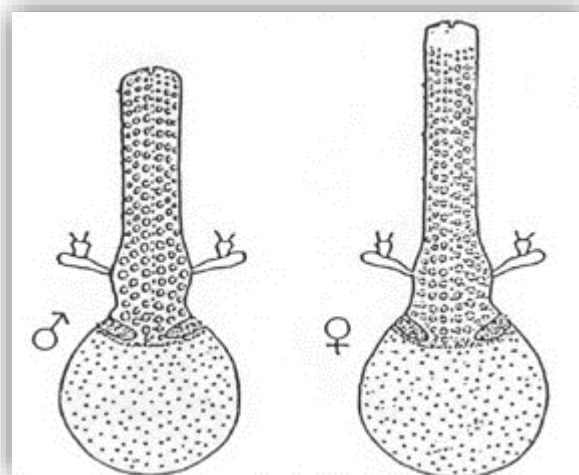


Figura 7. Dimorfismo sexual en base al área cefálica de *Sitophilus zeamais* M (Iannacone, 2012).

2.5.5. Ciclo de vida

El ciclo de vida de *S. zeamais* es de metamorfosis completa, la cual comprende cuatro etapas o estadios de desarrollo del insecto, que son: huevo, larva, pupa y adulto, el cual tiene una duración que va de 30 a 113 días dependiendo las condiciones climatológicas (Figura 8).

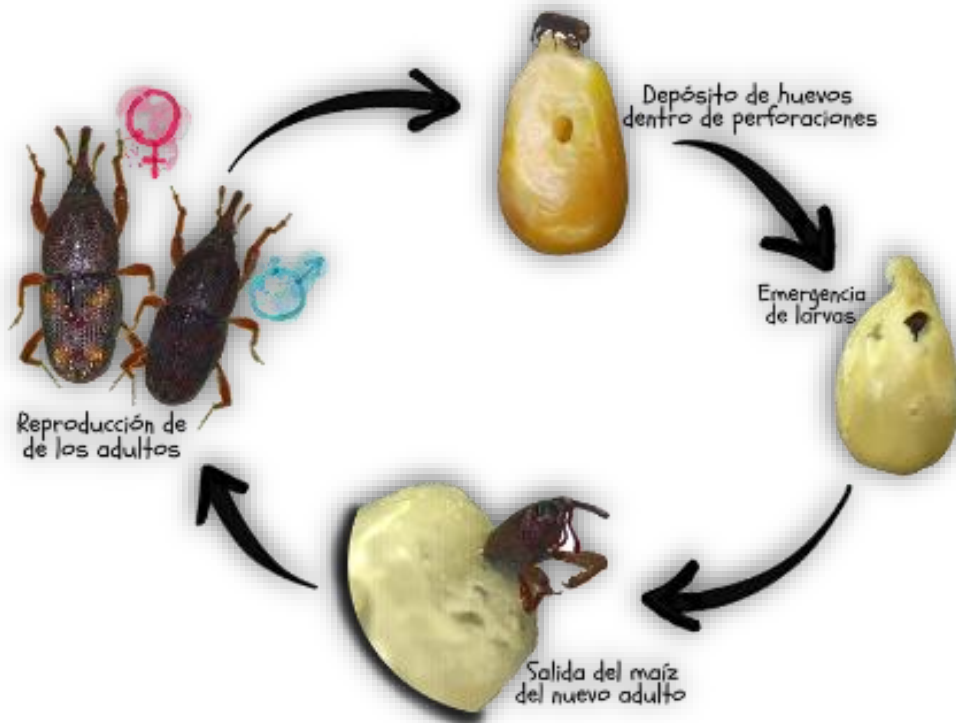


Figura 8. Ciclo de vida de *Sitophilus zeamais* (García-Saldaña, 2017).

2.6. Métodos de control para plagas de almacén

Existen diversos tipos de control de plagas de los granos almacenados, pero la mayoría resultan poco accesibles para ser usados por los medianos y pequeños productores (Pérez *et al.*, 2007).

De acuerdo con AGROWARE (2016) las medidas de control que se deben seguir son:

2.6.1. Control preventivo

Limpieza de almacenes: previo al almacenaje de los granos es indispensable la limpieza profunda tanto del almacén como de las áreas adyacentes al mismo, incluyendo todo equipo que forme parte de este procedimiento para evitar que queden restos de granos, polvos, insectos entre otros que provoquen una infección.

Usar envolturas resistentes a la penetración de insectos: entre los materiales más resistentes están las hojas de aluminio, las películas de polietileno, papel celofán y el papel kraft.

Pre limpieza del grano: reducir la cantidad de granos dañados e impurezas y así mejorar su aireación. Conjuntamente realizar el descorazonado del silo.

Monitoreo e inspección: es necesario llevar un estricto y adecuado informe de cuando se toman muestras de granos, cuando y donde se colocarán las trampas para insectos y cuando se realizará el análisis de estas (AGROWARE 2016; Martínez *et al.*, 2023)

2.6.2. Control físico

Aireación: una vez que el grano ingrese en silo, la medida de prevención de insectos más importante, es el enfriado por medio de aireación con aire en el ambiente y refrigeración artificial. El objetivo es enfriar el grano lo antes posible y mantenerlos posteriormente por debajo de los 17°C, ya que las bajas temperaturas ayudan a evitar el desarrollo de los insectos en el granel y disminuyen la tasa de respiración de los granos, esto evita las condiciones idóneas para que el insecto se establezca. Es necesario llevar a cabo una medición periódica de la temperatura de

los granos en distintos puntos de la estructura del almacén, para establecer cuando aplicar. En aquellos lugares donde las condiciones climáticas no permiten mantener los granos a baja temperatura utilizando aireación, se puede utilizar la refrigeración artificial, sin embargo, es más costosa esta última (AGROWARE 2016; Gutiérrez, 2023).

2.6.3. Control biológico

Es importante tener en cuenta que toda plaga tiene enemigos naturales. Dentro de esta alternativa se tiene:

Depredadores/parasitoides: atacan diversos grupos de insectos en el transcurso de su ciclo de vida minimizando daños. Ejemplos: Chinche *Xylocoris flavipes*, (Reuter), depredador cosmopolita de diferentes plagas de productos almacenados. Avispilla parasítica *Anisopteromalus calandrae* (Howard), es un parasitoide de granos almacenados, cosmopolita, ya que los insectos que parasita también son cosmopolitas (Pradera, 2014). En México se reportan tres depredadores que son: *Cephalonomia torsalis* (Ashmead), *Teretriosoma nigrescens* (Lewis) y *Xylocoris flavipes* (Reuter).

Patógenos de plagas: pueden reducir e inclusive eliminar una determinada población; son altamente específicos e incluso pueden ser compatibles con los insecticidas tradicionales. Ejemplos: *Metarhizium anisopliae*, es un hongo que ha sido usado exitosamente para el control de plagas de granos almacenados particularmente contra *S. oryzae* L.

Feromonas: son sustancias de naturaleza hormonal que se utilizan para alterar el comportamiento de la población en sus hábitos sexuales. Se usa en monitoreo y para reducir la copula por alteración del medio.

Reguladores de crecimiento: son compuestos que pueden ser utilizados en aquellos casos cuando el almacenaje es por tiempo prolongado, ya que brindan protección a largo plazo y actúan sobre el ciclo biológico y por consecuencia en la reducción de la población, aunque es difícil que afecten algunos estadios que se encuentran dentro de los granos, debido a que los insectos están ocultos y no se tienen contacto, con los productos aplicados (AGROWARE 2016; Mora *et al.*, 2023).

2.6.4. Control químico

Fumigación: este es el método más usado en la actualidad, consiste en usar un gas letal llamado fosfina, capaz de eliminar todos los estadios de desarrollo de los insectos, incluso de otras plagas primarias. La fosfina se genera comúnmente por descomposición de fosfuros metálicos (de aluminio o de magnesio) al entrar en contacto con la humedad del aire. Como ventajas presenta no poseer poder residual y no afectar el poder germinativo de las semillas, sin embargo, es un procedimiento riesgoso para quien lo aplique. El fosfuro de aluminio es muy difundido como método curativo. Se requiere de un mayor grado de hermeticidad posible y un tiempo de exposición determinado. Son factores importantes la temperatura y el método de aplicación. La desventaja de este es el llegar a dejar residuos y no brindan protección contra futuras generaciones.

Polvos y líquidos residuales: los polvos se aplican sobre el grano en movimiento, preferiblemente mediante pulverización para lograr una distribución más uniforme, estos son usados de manera preventiva (AGROWARE 2016; Martínez *et al.*, 2023).

2.6.5. Control tradicional

En algunas regiones de México se aplican formas tradicionales de control: cosechar el grano en luna llena vieja o maciza, en Chiapas, Puebla y Oaxaca para que el grano fuera más resistente a los gorgojos durante su almacenamiento. En la región

chatina de Oaxaca se asolea el grano por dos días para eliminar insectos plaga, y en Michoacán se traspalean (cambiar de un lugar a otro) las mazorcas durante su exposición al sol para secar más el grano y exponer los insectos al sol.

En algunas comunidades de Jalisco se entierra el maíz en arena dentro de una estructura cerrada de concreto, la cual permite lograr un micro clima con poca humedad, baja temperatura y reducida oxigenación que evita la proliferación de insectos. Por cada 100 kilogramos de grano almacenados se utilizan 10 kilogramos de arena (AGROWARE 2016).

2.7. Características de *Bacillus thuringiensis*

La bacteria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) fue descubierta por el biólogo japonés Shigetane Ishiwata en 1901, trabajando con el gusano de seda, y la denominó *Bacillus sotto*. Diez años después, en la provincia alemana de Turingia, Ernst Berliner aisló la misma bacteria a partir de la polilla mediterránea de la harina y la llamó *Bacillus thuringiensis*, nombre con el que se la conoce en la actualidad (Siegel, 2000).

Pertenece al reino Eubacteria, a la familia Bacillaceae y al género *Bacillus* (Portela-Dussan *et al.*, 2013). Es una bacteria Gram-positiva, de flagelación peritrica, que mide de 3.0 a 5.0 μm (micras) de largo por 1.0 a 1.2 μm de ancho, aerobia, estricto organismo nativo del suelo y catalogado como cosmopolita *Bt* se ha aislado de ecosistemas como bosques tropicales, zonas desérticas, sabanas, archipiélagos, frutales, suelos agrícolas y arena en los cinco continentes (Portela-Dussan *et al.*, 2013). Es considerada una bacteria ubicua, ya que se ha aislado de todas partes del mundo y de muy diversos ecosistemas, como suelo, agua, hojas de plantas, insectos muertos e incluso de telarañas (Soberon & Bravo, 2007).

Durante su fase de esporulación produce una inclusión parasporal, conformada por proteínas Cry con actividad biológica contra insectos-plaga. Gracias a estas proteínas, *Bt* presenta toxicidad contra larvas de insectos-plaga de los órdenes Lepidoptera, Coleoptera y Diptera entre otros. Además, es amigable con el medioambiente, razones por las cuales se ha hecho común el uso y desarrollo de productos comerciales y plantas transgénicas a base de toxinas Cry en el sector agrícola (Portela-Dussan *et al.*, 2013).

Esta bacteria se utiliza como un insecticida biológico en todo el mundo, principalmente para lepidópteros o vectores. Su principal característica es la síntesis de proteínas, que afectan insectos y que durante la esporulación se produce la llamada δ -endotoxina (proteínas Cry o Cyt) (Suárez-Machín *et al.*, 2016).

2.7.1. Importancia de *Bacillus thuringiensis*

El control de insectos plaga en la agricultura y de vectores de enfermedades humanas se ha realizado principalmente con la aplicación de insecticidas químicos. Estos insecticidas han generado problemas de contaminación ambiental, de toxicidad a insectos no blancos y de manera más importante, a los agricultores que lo aplican. Estos insecticidas químicos han perdido eficacia en el control de insectos, ya que su aplicación ha generado la aparición de poblaciones de insectos resistentes. Hoy en día existe una necesidad crítica de contar con herramientas seguras y efectivas para el control de plagas, lo ideal es un insecticida que sea tóxico solo para el insecto blanco, que no sea recalcitrante, que no contamine el ambiente y que no genere la aparición de insectos resistentes. Existen herramientas de control biológico donde se usan patógenos como agentes de biocontrol (Soberon & Bravo, 2008).

Hasta ahora *Bt* es el insecticida biológico más utilizado comercialmente, y tradicionalmente se ha ocupado para el control de insectos plaga en la agricultura y

de mosquitos vectores de enfermedades como la malaria y el dengue. Esta posee una toxicidad selectiva alta debido a su estrecho rango de especificidad y gracias a ello genera un bajo impacto ambiental. Además de su alta especificidad es inocuo para vertebrados y otros insectos no blancos (Sauka & Benintende, 2008).

Las cepas de *Bt* muestran diferentes efectos de su actividad insecticida hacia insectos plaga, y constituye una reserva de genes que codifican para proteínas insecticidas, las cuales son acumuladas en inclusiones cristalinas producidas en la esporulación bacteriana (proteínas Cry y Cyt) o expresadas durante su crecimiento bacteriano, las proteínas Vip (Gatehouse, 2008). Diferentes genes derivados de *Bt* han sido transferidos exitosamente a algodón, maíz, tomate y papa. Sin embargo, esta tecnología corre el riesgo de que aparezcan poblaciones de insectos resistentes a las toxinas Cry (Torres & Ruberson, 2008).

2.7.2. Las toxinas Cry

La δ -endotoxina es el resultado del ensamblaje de varias unidades polipeptídicas de diferentes pesos moleculares, que oscilan entre 27 y 140 kDa (Kilodalton), que se han denominado Cry (del inglés crystal) o Cyt (del inglés cytotoxic); una proteína Cry es una inclusión parasporal proteínica de *Bt* que presenta efectos tóxicos verificables experimentalmente sobre un organismo susceptible, o bien una proteína que posee una obvia similitud de secuencia con alguna proteína Cry conocida (Crickmore *et al.*, 2009).

El resultado final de la manera en que la proteína Cry ejecuta su actividad letal conlleva la formación de poros líticos en la membrana apical del intestino medio del insecto susceptible mediada por el reconocimiento de un receptor proteico (Roh *et al.*, 2007).

2.7.3. Mecanismo de acción de las toxinas Cry

El insecto cuando consume la proteína Cry presenta disminución de la ingesta, parálisis del intestino, vómito, diarrea, descompensación osmótica, parálisis total y la muerte (Vochon *et al.*, 2012). El insecto muere al momento que su pH cambia dentro de la hemofilia y se genera una infección generalizada al producirse la bacteria *Bt* y otras bacterias de su flora intestinal. La bacteria produce los cristales de proteínas Cry, cuando los insectos la consumen, las proteínas se activan rápidamente y se procesan, para después liberar la δ -endotoxina que se adhiere a las células del intestino creando poros, esto lleva a un desbalance de los iones y paraliza el sistema digestivo, lo que provoca la muerte de la larva en pocos días (Figura 9) (Bravo *et al.*, 2013).

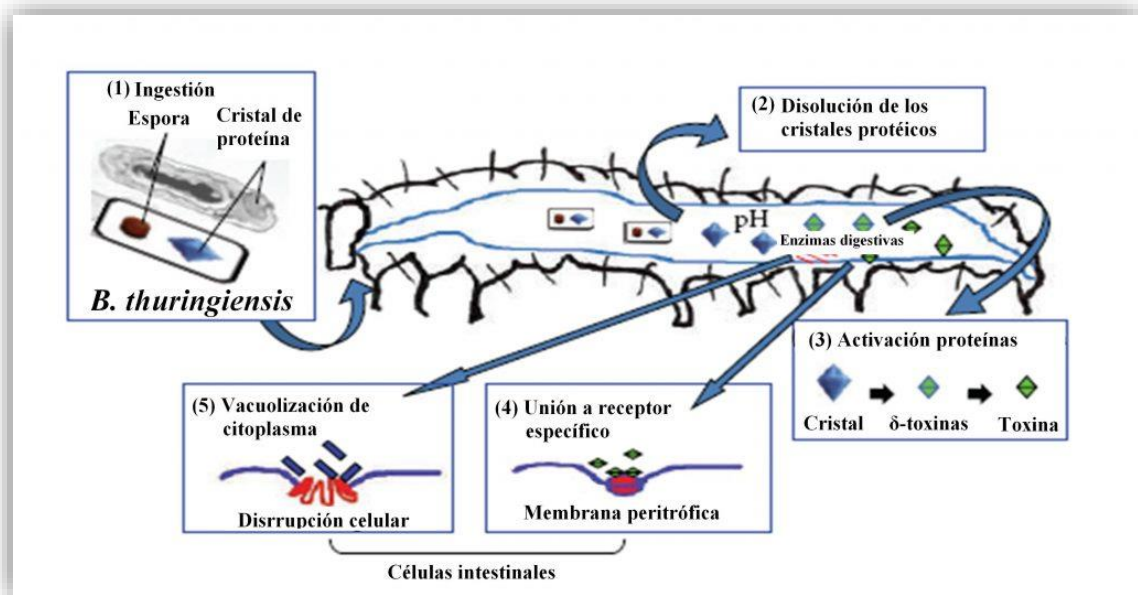


Figura 9. Mecanismo de acción de *Bacillus thuringiensis*: 1) Ingestión de la bacteria, 2) Solubilización de los cristales, 3) Activación de los cristales, 4) Unión de proteínas a los cristales, 5) Formación de poros en la membrana y lisis celular (Schünemann *et al.*, 2014).

El mecanismo de acción en insectos coleópteros de la toxina Cry, logra su efecto formando poros líticos sobre las células del intestino medio del insecto susceptible.

El conjunto de reacciones que se llevan a cabo para que una toxina Cry ejerza su efecto han sido estudiadas primordialmente en el contexto del orden Lepidoptera (Pigott & Ellar, 2007).

2.7.4. Productos en el mercado con *Bt*

Existe una gran diversidad de productos a base de *B. thuringiensis* para control de insectos plaga en el mercado, hasta ahora se han registrado más de 400 formulaciones basadas en *Bt* y la mayoría contiene proteínas insecticidas y esporas visibles. Estos productos se aplican directamente en forma de aerosoles. Pero hasta ahora uno de los métodos más exitosos ha sido el de expresar genes que codifiquen las toxinas en plantas transgénicas para atacar al insecto objetivo. Otros productos de *Bt* que son efectivos contra plagas coleópteros son el M-Trak, Foli y Novador que contienen la proteína Cry3A de *Bt* var. San diego y *B. thuringiensis* var Tenebrionis, comercializados principalmente para combatir al escarabajo colorado de la papa *Leptinotarsa decemlineata* (Soberon *et al.*, 2009).

2.8. Plagas que controla las toxinas Cry de *Bt*.

Las toxinas de *Bt* tiene acción insecticida contra:

Larvas de lepidópteros (lepidópteros). Ejemplos: gusano bellotero *Helicoverpa zea*, (Boddie), gusano rosado *Pectinophora gossypiella* (Saunders), gusano soldado *Mythimna unipuncta*, (Haworth), gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), palomilla de los granos *Sitotroga cerealella*, (Olivier), polilla de la harina *Plodia interpunctella*, (Hubber).

Escarabajos (coleópteros). Gorgojo del maíz *S. zeamais* (M), gorgojo del arroz *S. orizae* (L), gorgojo del trigo *S. granarius* (L), gorgojo del frijol *Acanthoscelides obtectus* (Say), barrenador del maíz *Prostephanus truncatus* (Horn), taladrillo de

los granos *Rhyzopertha dominica* (F), broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Sanahuja *et al.*, 2011).

Moscas y mosquitos (dípteros). Mosquito del dengue *Aedes aegypti* (L), mosquito común *Culex quinquefasciatus* (Say), mosquito del paludismo *Anopheles albimanus* (Wiedeman).

Chinches (hemípteros). Ejemplos: chicharrita del algodón *Amrasca biguttula* (Ishida), cotorrita de la papa *Empoasca fabae* (Harris), chinche opaca de las plantas *Lygus hesperus* (Hahn).

Nematodos. Nematodo parasito *Haemonchus contortus* (Ochoa & Arrivillaga, 2009).

2.8.1. Descripción de la toxina Cry3Aa

Pertenece al grupo de tres dominios la cual se utiliza en todo el mundo para el control de insectos plaga, específica para el orden coleóptero. Esta toxina es formadora de poros (PFT) que afectan a los insectos, las toxinas Cry interactúan con receptores específicos ubicados en la superficie de la célula huésped y son activadas por proteasas del huésped después de la unión del receptor, lo que da como resultado la formación de una estructura oligomérica previa al poro que es competente en inserción (Bravo & Soberon, 2007).

2.8.2. Descripción de la toxina Cry3Ab

Para inducir la formación de poros de las toxinas Cry3, los cristales parasporales tienen que ser ingeridos por larvas susceptibles, solubilizados por las condiciones de pH del intestino del insecto, alcalinos en el caso de insectos lepidópteros y dípteros, y ácidos en el caso de coleópteros, activados por proteasas del intestino

medio para producir el núcleo resistente tridimensional de la toxina activada (Bravo *et al.*, 2011).

2.8.3. Descripción de la toxina Cry1F

Se ha encontrado y comercializado en maíz híbrido y está especificada para el control de varias especies de lepidópteros destructivos de maíz. Se ha probado en diferentes especies de lepidópteros como *Sitotroga cerealella*, provocando un aumento en la mortalidad y un retraso en el desarrollo y en la emergencia de pupas. Ha sido evaluada ampliamente por su potencial para controlar otros insectos de los granos almacenados (Oppert *et al.*, 2010).

2.8.4. Descripción de la toxina Cry1C

El grupo Cry1C de endotoxinas delta de *Bt* contiene 10 miembros altamente homólogos del subgrupo de toxinas Cry1Ca y tres miembros adicionales del subgrupo Cry1Cb que difieren en la secuencia del dominio III. El espectro bioinsecticida Cry1Ca abarca insectos lepidópteros que son total o parcialmente tolerantes a los cultivos *Bt* utilizados comercialmente (Avisar *et al.*, 2009).

2.9. Trabajos reportados con toxinas Cry

Proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* y su interacción con coleópteros.

Existen proteínas con actividad dual Lepidoptera-Coleoptera (Cry1B y Cry1I), e incluso se conoce la acción de proteínas binarias (Cry34 y Cry35, cuya acción letal resulta de una combinación de ambas toxinas) hacia coleópteros. Otras toxinas que afectan este orden de organismos incluyen Cry35, Cry36, Cry37, Cry43 y Cry55 (López y Cerón, 2010)

En un trabajo sobre caracterización de toxinas Cry de aislados de *Bacillus thuringiensis* autóctonos de México.

Observaron una mortalidad elevada en las larvas infectadas con las cepas que estudiaron, particularmente la cepa *Bt-D*, la cual el análisis molecular mostro que posee una toxina tipo Cry3Ac, específica para coleópteros (Camacho-Millán *et al.*, 2017).

Efectos de Cry1F y Cry34Ab1/35Ab1 sobre plagas de almacenamiento.

Provocaron un aumento de la mortalidad larvaria y se observó un retraso en el desarrollo y no emergieron pupas indicando que las toxinas utilizadas tienen efecto en coleópteros (Oppert *et al.*, 2010).

Un estudio sobre la caracterización molecular del mecanismo de patogénesis de las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* activas contra insectos coleópteros.

Proporcionó una base útil de cepas para el desarrollo de insecticidas mejorados dirigidos contra estas importantes plagas agrícolas, permitiendo ampliar el rango y los niveles de toxicidad de las proteínas insecticidas y abordar problemas como la aparición de resistencia. Dos especies de insecto relevantes en este orden: la especie modelo *Tribolium castaneum* por su condición de plaga, la disponibilidad de la secuencia de su genoma y las numerosas herramientas genéticas y genómicas desarrolladas en dicho organismo que facilitan enormemente el análisis funcional y *Leptinotarsa decemlineata*, una de las plagas más importantes a nivel mundial en este orden (Navarro, 2013).

La caracterización de cepas mexicanas de *Bacillus thuringiensis* tóxicas para larvas de lepidópteros y coleópteros.

Son de los trabajos en los que se tienen avances contundentes, estos trabajos indican que algunas cepas llegan a sintetizar proteínas de cristal de 130-140 kDa, específicamente las cepas C-4, GM-7 y GM-16 10 expresaron genes Cry1 y la cepa C-9 expreso los genes Cry3 y Cry 7/8; además, se observó que esta última cepa

favorece el control de varios coleópteros de importancia agrícola (Tamez Guerra *et al.*, 2005).

3.1. Osmoacondicionamiento

El osmoacondicionamiento consiste en la inmersión de las semillas en soluciones osmóticas o en agua por determinado tiempo con o sin deshidratación previa a la siembra y permiten que una gran proporción de las mismas alcance rápidamente el nivel de humedad y estado metabólico deseado como consecuencia de la activación de numerosos procesos bioquímicos-fisiológicos relacionados con la germinación, la tolerancia al estrés ambiental y a la auto reparación enzimática de las membranas celulares. El análisis de transcriptoma ha proporcionado nuevos conocimientos sobre las funciones reguladoras del endospermo durante la germinación de la semilla; este análisis realizado en semillas no dormantes de *Arabidopsis*, imbibidas 6 a 24 horas, mostraron una expresión semejante de genes. Sin embargo, a las 24 horas, la proporción de genes expresados específicos del endospermo, se incrementó. El endospermo asume funciones específicas a medida que progresa la germinación. Al parecer, para la semilla, hay un antes y un después de la ruptura de la testa (Yan *et al.*, 2014).

La técnica de osmoacondicionamiento de semillas (imbibición controlada) con soluciones osmóticas o agua se ha utilizado principalmente con la finalidad de acelerar el proceso de germinación y controlar hongos presentes en el suelo (Valle *et al.*, 2017).

El osmoacondicionamiento se ha reportado como un método eficaz para mejorar la velocidad, uniformidad y tasa de germinación (Farooq *et al.*, 2007) así como el crecimiento, precocidad de floración y rendimiento de las plantas que resultan de este tratamiento (Du & Tuong, 2002). Los beneficios se deben principalmente al

rápido crecimiento de la raíz, lo que facilita la absorción de humedad del suelo más rápido y a mayor profundidad (Chen & Arora, 2013).

MATERIALES Y METODOS

4.1. Ubicación de la zona de investigación

El experimento se llevó a cabo en las instalaciones del Departamento de Parasitología en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. La universidad se ubica geográficamente en los $25^{\circ}35'23''$ de latitud norte y $101^{\circ}02'72''$ de latitud oeste, con altitud de 1743 m.s.n.m. (Figura 10).

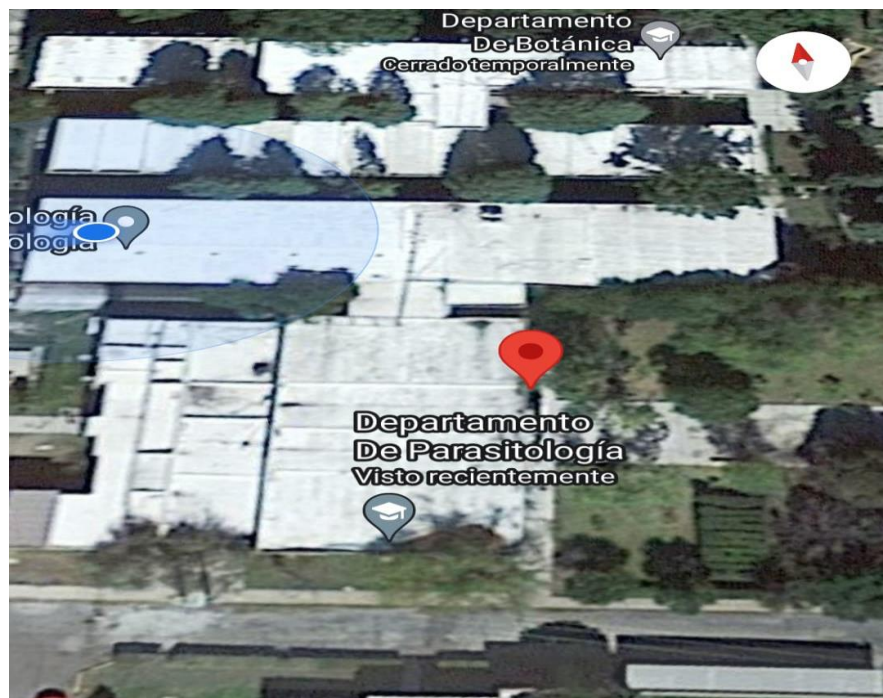


Figura 10. Ubicación del Departamento de Parasitología de la UAAAN.

4.2. Diseño experimental

Se estableció un experimento bajo un arreglo experimental completamente al azar con cinco tratamientos, cuatro con toxinas Cry y un testigo, con solo agua. Para

cada tratamiento se establecieron cuatro repeticiones. Como unidad experimental se consideró un frasco de 250 mL con 150 g de maíz y 10 insectos.

4.3. Obtención de las diferentes toxinas Cry de *Bt* para los tratamientos

Las toxinas utilizadas fueron proporcionadas por la Dra. María Alejandra Bravo de la Parra del Instituto de Biotecnología de la UNAM, las toxinas que se utilizaron fueron: Cry3Aa, Cry3Ab específicas para coleopteros y las toxinas CryC1 y Cry1F donde estudios preliminares indican que son específicas para lepidópteros.

4.4. Descripción de los tratamientos

Los tratamientos se definieron con base en una sola concentración a 1000 ppm (Cuadro 1), esto debido a la cantidad de toxinas con las que se contaba en el momento de la estandarización de este protocolo, además que se quería comprobar si está ocasionaban efecto en la población de picudos a una dosis alta con la finalidad de establecer posteriormente una ventana biológica para otros bioensayos (estos datos no se muestran en esta investigación).

Cuadro 1. Concentraciones de los tratamientos con toxinas Cry a 1000 ppm.

Tratamientos	C1: mg·mL⁻¹	C2: 1000 ppm	Volumen 1 (mL)	Volumen 2 (L)
Cry3Aa	1.21	1000 ppm	830	0.415
Cry3Ab	1.06	1000 ppm	940	0.470
Cry1F	1.01	1000 ppm	990	0.495
Cry1C	1.02	1000 ppm	980	0.490
Testigo	H₂O		1000	1

4.5. Obtención de insectos y establecimiento de colonia para bioensayos

El maíz que se utilizó proveniente de Tlacuilotepec, Puebla, México, los insectos fueron colectados en sacos con maíz almacenado, infectados con diferentes plagas insectiles, fueron trasladados a las instalaciones de la UAAAN, Unidad Saltillo, en el Departamento de Parasitología, donde se purificaron y separaron de otras plagas, la especie que se utilizó fue *S. zeamais*.

Para el mantenimiento de la colonia e incremento de los insectos, se compró maíz comercial puro, libre de plaguicidas y alguna otra plaga. El maíz se inoculó con los adultos del gorgojo *S. zeamais* obtenidos de la purificación con la finalidad de que se estableciera una colonia de laboratorio sana y pura.

4.6. Metodología de los bioensayos

Se utilizaron 150 g de grano de maíz sin tratamiento o libre de insecticidas, el cual se colocó en recipientes de 250 mL de capacidad (Figura 11), se llevó a cabo un protocolo de estandarización de las condiciones de osmocondicionamiento, por lo que se utilizó 73 mL de agua, que es lo mínimo requerido de agua para cubrir los granos en su totalidad y evitar desperdicio de toxina (Figura 12). En el Cuadro 1, se pueden observar los tratamientos con las toxinas Cry que se utilizaron en los bioensayos, al igual que las dosis que se evaluaron en el presente trabajo.

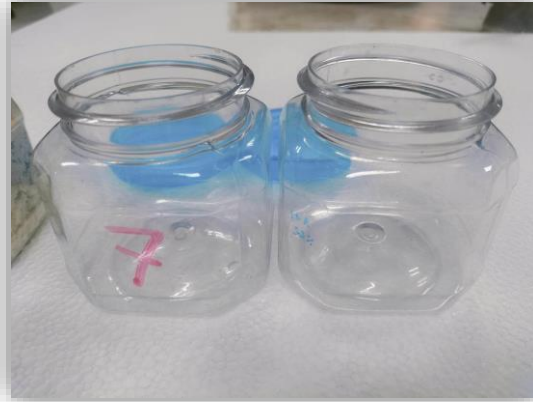


Figura 11. Frascos utilizados para los bioensayos.



Figura 12. Cantidad de agua requerida para cubrir los granos de maíz.

4.7. Periodo de imbibición

La imbibición de las semillas se llevó a cabo en un periodo de 18-24 horas, cuidando que las semillas se cubran totalmente con el agua y la toxina, según cada tratamiento (Figura 13 y 14), la duración de absorción de agua con base en la estandarización se determinó de hasta 24 horas, interrumpiéndose dicho proceso antes de la protrusión de la radícula. Esto se realizó con la finalidad de que el grano solo absorbiera el agua con la toxina, sin que pasará a la fase de la germinación conocida como activación de enzimas y así asegurar que las toxinas estén dentro

de los granos de maíz, pero evitar la germinación (hay que tomar en cuenta que si pasa a la etapa de germinación ya no hay vuelta atrás, por lo que es un proceso irreversible).



Figura 13. Imbibición de los granos hasta cubrirlos totalmente.



Figura 14. Granos cubiertos totalmente.

4.8. Periodo de secado

Después del osmoacondicionamiento de la semilla y transcurridas las horas antes mencionadas, se colocaron en sanitas previamente esterilizadas para poder secar a temperatura ambiente por 12 horas (Figura 15), esto es muy importante, ya que si las colocamos en una estufa de secado a temperaturas altas se corre el riesgo que las toxinas se degraden o pierdan la viabilidad y no puedan mostrar el efecto hacia los insectos. Por otro lado, se tuvo que reducir el contenido de humedad a un nivel que es adecuado para el almacenamiento (13%). Esta etapa es muy importante, ya que se debe evitar el desarrollo de organismos causantes de pudriciones como hongos y bacterias o el desarrollo de plagas secundarias como los ácaros, así mismo evitar el envejecimiento acelerado de la semilla de maíz.



Figura 15. Proceso de secado de los granos a temperatura ambiente por 12 horas.

4.9. Periodo de exposición de los insectos

Una vez que los granos de maíz llegaron a la humedad requerida, se colocan nuevamente en los frascos de 250 mL, y se inocularon con 5 pares de insectos adultos de *S. zeamaiz*, sexados 1:1 (macho y hembra) con la finalidad de asegurar la ovoposición en los granos de maíz, posteriormente se incubaron a 27 ± 3 °C y 60 ± 5

HR y sin intensidad lumínica (Figura 16), esto con base en los requerimientos del insecto y promover su actividad. Se incubaron por 40 días (que es el tiempo aproximado para que el insecto cumpla su ciclo de vida), para posteriormente evaluar.



Figura 16. Granos con las toxinas Cry de *Bt* e insectos de *S. zeamais*.

5.1. Variables evaluadas

Una vez establecidas las unidades experimentales del bioensayo e incubados los insectos se determinó el efecto de las toxinas sobre la disminución en la descendencia a nivel de estadios larvales y en adultos, por lo tanto, se realizaron conteos y se determinaron porcentajes de las siguientes variables:

- Número y porcentaje de adultos
- Número y porcentaje de pupas
- Número y porcentaje de larvas de 1er estadio
- Número y porcentaje de larvas del 2do estadio
- Número y porcentaje de larvas del 3er estadio
- Porcentaje de mortalidad por toxina Cry
- Porcentaje de mortalidad por estadio del insecto.
- Observación de signos por *Bt* en los estadios larvarios.

5.2. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza y comparación de medias mediante la prueba Tukey ($\alpha \leq 0.05$), utilizando el programa (Infostat, 2020). Además, se realizó un análisis básico descriptivo, con la elaboración de graficas de barras con los promedios y porcentajes obtenidos por tratamiento, es decir por cada toxina evaluada, comparadas con el testigo y el porcentaje de mortandad para cada evaluación. Los datos obtenidos se corrigieron por medio de la fórmula de Henderson y Tilton (1955) debido a la falta de homogeneidad en los valores evaluados en los individuos para cada variable. La fórmula de corrección de datos utilizada es la siguiente:

$$\%E: 1 - [(Y2) (X1) / (Y1) (X2)] * 100$$

Donde:

E: Eficiencia

Y1: tratamiento antes de la aplicación

Y2: tratamiento después de la aplicación

X1: Testigo antes de la aplicación

X2 Testigo después de la aplicación

RESULTADOS Y DISCUSION

6.1. Total de individuos por toxina

Para el caso de número total de individuos, no hubo diferencias significativas, pero se pudo observar que el testigo fue quien mostró más individuos con un total de 2,187. En el tratamiento Cry1F se encontró que hubo una menor cantidad de individuos (Figura 17) tomando en cuenta que esta toxina no es específica para coleópteros más bien es para lepidópteros, por lo que puede influir en la población, y el número de individuos de la progenie del insecto en su ciclo de vida.

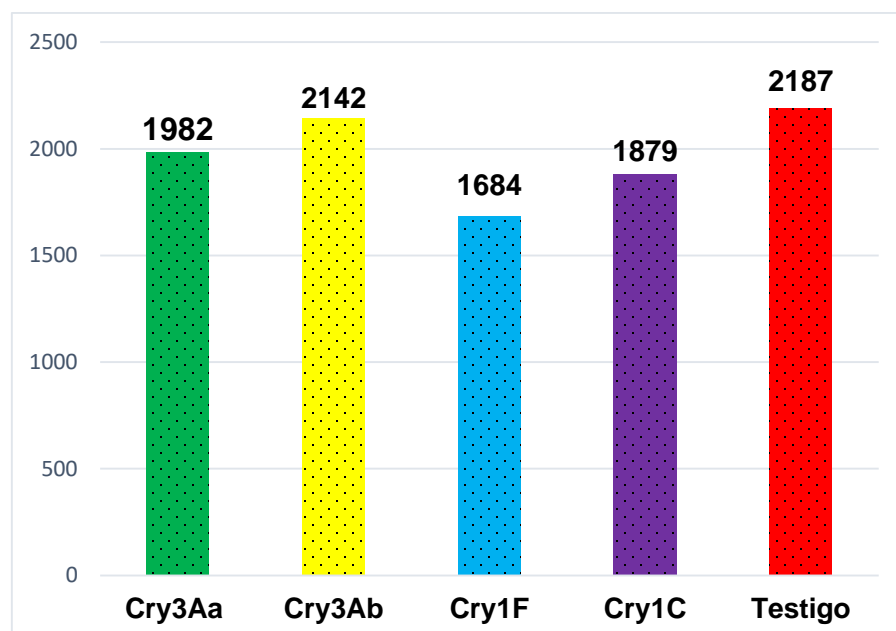


Figura 17. Número total de individuos de *S. zeamais* obtenidos después de haber sido alimentados, sus progenitores con granos de maíz osmoacondicionados con toxinas Cry de *Bt*.

Cerna *et al.* (2010) mencionan que *S. zeamais* es una de las especies de gorgojo que más pérdidas causa en granos almacenados en el mundo, su control se basa principalmente en productos químico-sintéticos, que con el paso del tiempo van perdiendo efectividad. Con los resultados obtenidos en esta investigación podemos

considerar que la selección de toxinas de *Bt*, pueden ser favorables como una alternativa biológica en el control de esta plaga.

6.2. Porcentaje de adultos por tratamiento

En la Figura 18, se aprecia el porcentaje total de adultos encontrados en cada tratamiento con cada toxina, se observó que la Cry1F mostró un menor número de adultos 16.6% con respecto al testigo que fue de 22.3%, que es lo que se espera en los resultados, ya que en este caso el grano de maíz solo fue imbibido con agua y no fue tratado con ninguna toxina que pueda afectar la progenie y con ello el establecimiento de adultos de este insecto.

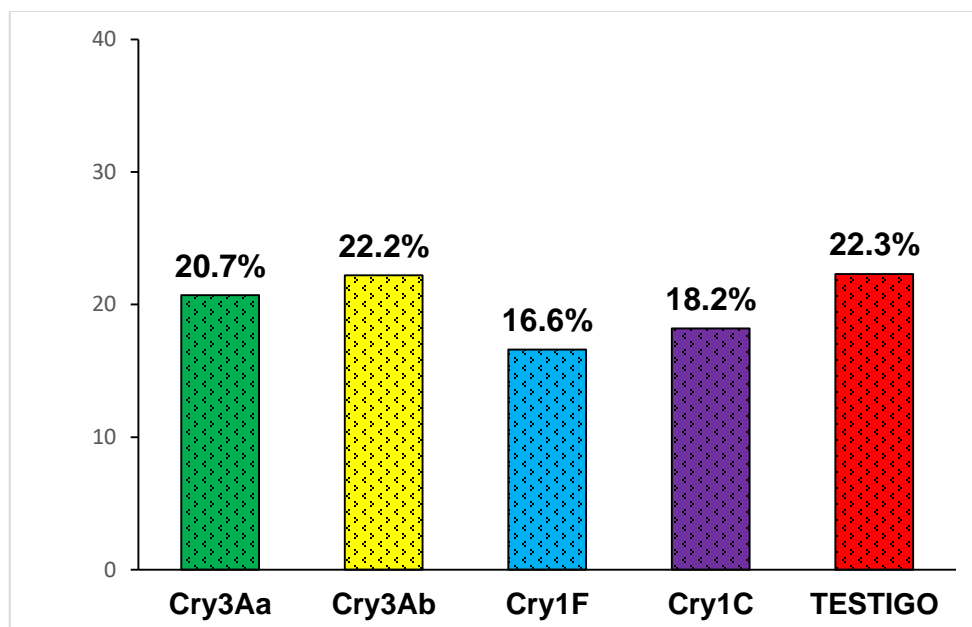


Figura 18. Porcentaje de adultos obtenido como progenie después de la exposición de los insectos de *S. zeamais* a toxinas Cry de *Bt*, por medio de granos de maíz osmoacondicionados.

Oppert *et al.* (2010) evaluaron los efectos de la toxina CryF1 sobre plagas de almacenamiento. Demostraron que la toxina CryF1 causó aumento en la mortalidad de larvas de coleópteros y observaron un retraso en el desarrollo de pupas y una tasa muy baja de emergencia de pupas, estos resultados explican, por tanto, que la

exposición de insectos a la toxina Cry1F, mediante tratamiento de granos de maíz osmoacondicionados con dicha toxina, probablemente se presentó menor número de adultos en la progenie evaluada a los 40 días de incubación.

6.3. Total de pupas por tratamiento

Se evaluó el total de pupas por tratamiento y el que menor porcentaje tuvo fue el tratamiento con la toxina Cry3Aa con 6.5%, comparado con el testigo que presentó 63.6%, en general todos los tratamientos con las toxinas mostraron bajos porcentajes en esta variable, esto demuestra que hubo un efecto sobre el desarrollo y capacidad de pupación de las larvas, Cry1F y Cry1C, a pesar de que éstas dos no son para coleópteros si no para lepidópteros (Figura 19). Al respecto, (Curis *et al.*, 2013). encontraron efecto sobre el estado pupal en el coccinélido *Eriopis connexa* al ser alimentados de forma indirecta con insectos que habían consumido plantas de maíz *Bt*, donde registran que el porcentaje de pupación fue menor y más tardío para alcanzar este estado, estos autores, también indican que las toxinas Cry de *Bt* son selectivas para ciertos ordenes, pero si hay interacción constante con éstas o consumo indirecto continuo, mencionan que existe afectación en la duración de las etapas de desarrollo de los insectos y retraso en el ciclo de vida. En el experimento que se realizó con *S. zeamais*, el osmoacondicionamiento de las semillas de maíz con toxinas Cry de *Bt*, permitió que estas estuvieran disponibles y activas, además el consumo y exposición constante de *Bt* en los insectos puede tener efectos subletales reflejados en la cantidad de individuos que llegaron a estado pupal (Figura 19) por lo que se vieron afectados directamente por la dieta y el consumo de las Cry.

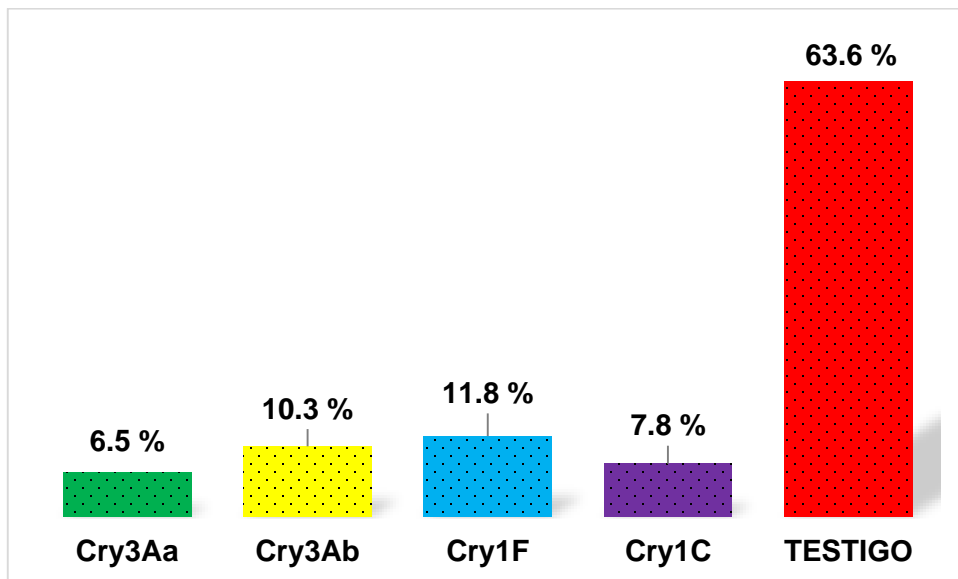


Figura 19. Porcentaje de pupas obtenido después de la exposición de los insectos de *S. zeamais* a toxinas Cry de *Bt*, por medio de granos de maíz osmoacondicionados.

Jurat-Fuentes y Adang (2006) evaluaron los efectos de las toxinas en diferentes plagas de lepidópteros y coleópteros, como la mortalidad, la inhibición del crecimiento y/o el tiempo de desarrollo.

6.4. Porcentaje de larvas expuestas a *Bt*

Las larvas que se encontraron en cada tratamiento, fueron contabilizadas en su totalidad y separadas entre larvas vivas y muertas y después por estadio; por lo que el porcentaje de mortalidad del total de las larvas con respecto al porcentaje de las larvas vivas en cada toxina, indicó que la toxina Cry3Ab es la que tuvo el mayor efecto con un 61% de mortalidad, siendo la más eficiente en el control de coleópteros y por ende la que altera mayormente el desarrollo de la plaga, reduciendo la progenie; cabe mencionar que todas las toxinas mostraron un retraso en el ciclo de vida del insecto, debido a la afectación en los estadios larvales, como era de esperarse, esto se corrobora al comparar los resultados obtenidos en cada toxina con el testigo que solo se tuvo un 11.2% de mortalidad y un 88.8% de larvas

vivas, el porcentaje de mortalidad encontrado en el testigo, pudo haberse debido a factores externos de aclimatación por parte de los insectos a las condiciones que se les dieron en los bioensayos en el laboratorio, por lo que en otros trabajos puede considerarse esto como un factor de corrección para los otros tratamientos, mediante la fórmula de Henderson y Tilton (1955), por lo que se muestran los porcentajes de los promedios obtenidos de los conteos para cada tratamiento (Figura 20).

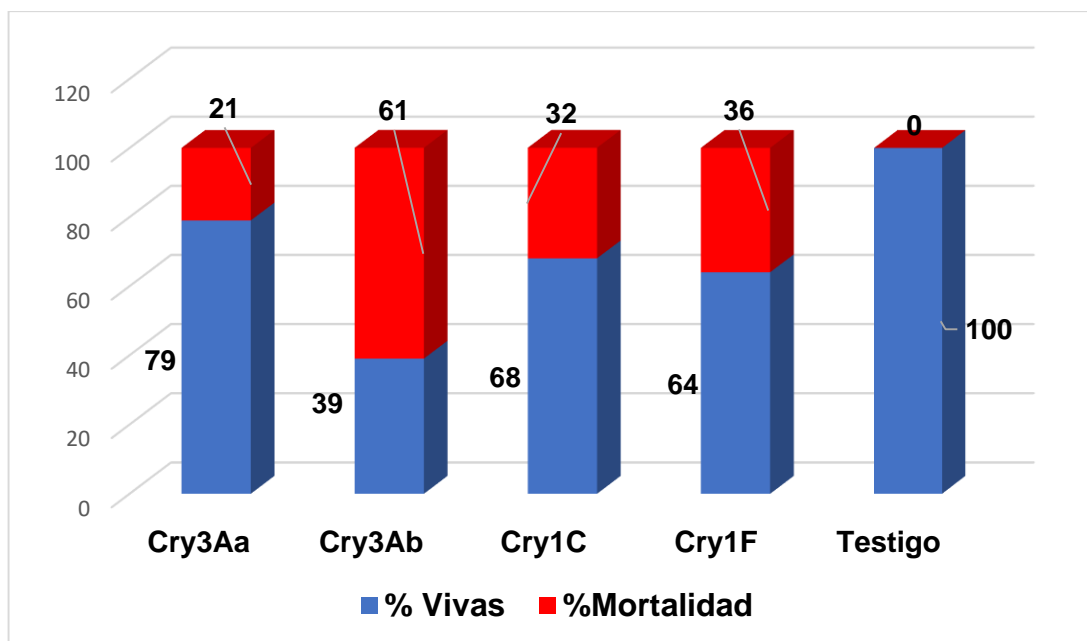


Figura 20. Porcentaje de larvas obtenido después de la exposición de los insectos de *S. zeamais* a toxinas Cry de *Bt* por medio de granos de maíz osmoacondicionados.

Cárdenas *et al.* (2001) probaron la toxicidad y especificidad de las toxinas Cry1 hacia *Trichoplusia ni*, comprobando que una de las proteínas más tóxicas es la Cry1C para este insecto, por lo que esta toxina mostró alta afectación y especificidad a este lepidóptero. Sin embargo, en este trabajo, la toxina también tuvo alto porcentaje de larvas muertas (32%; Figura 20) en coleópteros, por lo que el espectro de acción puede ser más amplio que como se ha reportado en la literatura.

6.5. Porcentaje de larvas del primer estadio

Una vez realizado el análisis para el total de larvas obtenidas como progenie en cada tratamientos, estas fueron separadas por estadios, para el primer estadio, se mantuvo la alta mortalidad, expresada por la toxina Cry3Ab, como se presentó en los anteriores resultados, pero en el resto de las toxinas, el número de larvas vivas superó a las muertas, estas tendencias se pueden explicar debido a que pasaron 40 días para hacer la evaluación de la progenie, lo que pudo haber causado que por el periodo prolongado las toxinas se inactivaran, pero que al menos la Cry3Ab, se mantuviera aún con efectos sobre los individuos de *S. zeamais*. Por tanto, el valor obtenido para esta toxina en larvas del primer estadio fue de 41% vivas y 59% muertas, por lo que se considera como la toxina Cry más efectiva para la reducción de la población de este insecto plaga con efecto sobre los estadios larvales más propensos, bajo las condiciones experimentales en las que se sometió. (Figura 21). Con estos resultados se puede corroborar lo reportado por Domínguez-Arrizabalaga *et al.* (2020), donde evaluaron la actividad insecticida de *Bacillus thuringiensis* contra plagas de coleópteros y demostraron que la toxina Cry3Ab cuenta con actividad insecticida en coleópteros, con mortalidad alta.

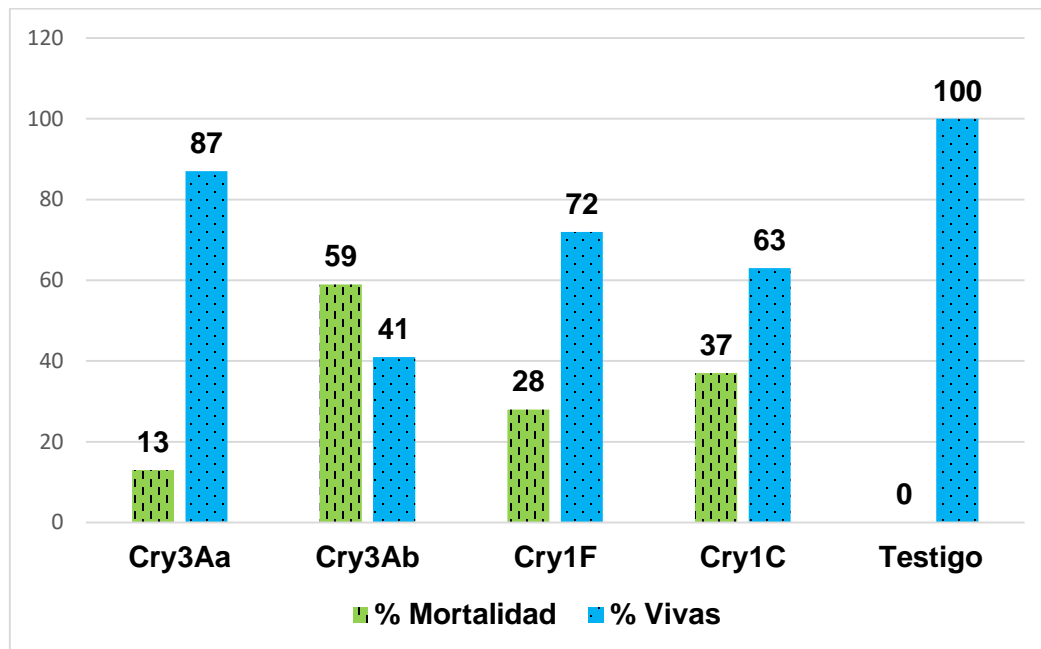


Figura 21. Porcentaje de larvas vivas y muertas del primer estadio, obtenido después de la exposición de los insectos de *S. zeamais* a toxinas Cry de *Bt* por medio de granos de maíz osmoacondicionados.

6.6. Porcentaje de larvas del segundo estadio

Las larvas del segundo estadio tuvieron un porcentaje de mortalidad mayor al del primer estadio con un 41.4% del total, observando que nuevamente la toxina Cry3Ab presento un porcentaje de mortalidad más alto con el 58%, con respecto a los otros tratamientos, siendo nuevamente la más eficiente contra *S. zeamais*. (Figura 22). Con los resultados obtenidos se corrobora lo que encontraron Chickmore *et al.* (2009), quienes demostraron que el picudo del arroz (*S. oryzae*) tuvo alta mortalidad con la toxina Cry3A modificada.

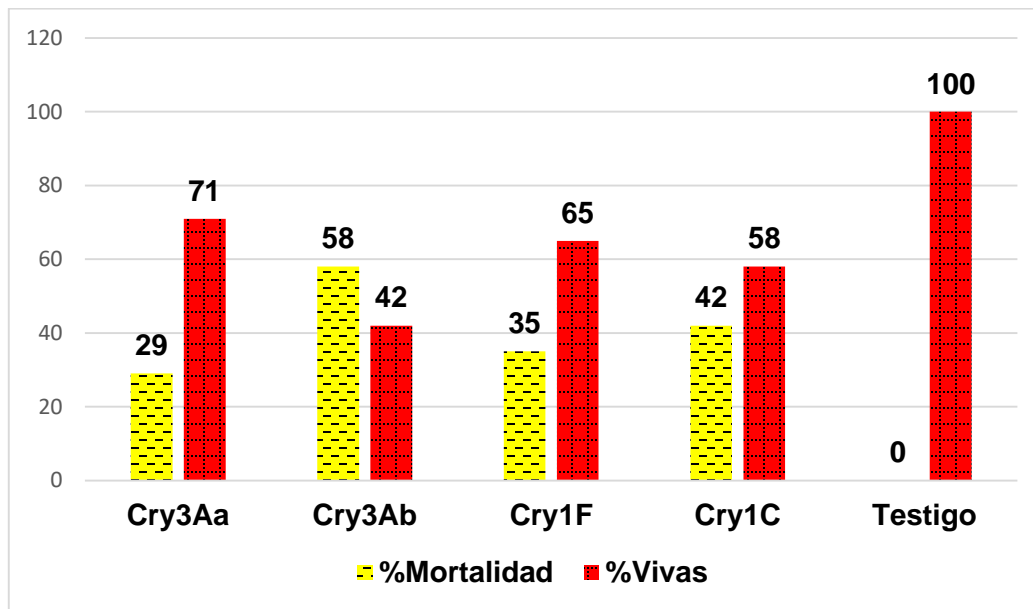


Figura 22. Porcentaje de larvas vivas y muertas del segundo estadio, obtenido después de la exposición de los insectos de *S. zeamais* a toxinas Cry de *Bt*, por medio de granos de maíz osmoacondicionados.

6.7. Porcentaje de larvas del tercer estadio

En el tercer estadio los resultados obtenidos, mostraron las mismas tendencias que los dos anteriores relacionados a los estadios larvarios, donde destaca la actividad insecticida de la toxina Cry3Ab con 65% de larvas muertas, esto también indica que a mayor edad de las larvas éstas presentan mayor adaptación y resistencia a las condiciones del medio, por ser los resultados más notorios, pero también puede apreciarse esta tendencia en los tratamientos con las toxinas Cry (Figura 23). Sin embargo, la toxina Cry3Ab, mantienen constante el alto número de individuos muertos, por lo que ejerce presión de selección hacia los instar larvarios de *S. zeamais*, se requiere de mayor número de estudios y que estos sean robustos, para poder proponer un control de esta plaga a nivel comercial por medio de toxinas Cry de *Bt* específicamente con la Cry3Ab, así mismo, esta toxina, puede ser una propuesta para ser considerada dentro del estudio de las alternativas al control de este insecto plaga en almacén. Como parte de los estudios realizados con esta toxina Cry, López-Pazos, *et al.*, (2010) estudiaron la toxina Cry3A en diferentes

especies de coleopteros observando que tiene un efecto insecticida en estos insectos además de toxicidad en larvas del primer estadio de la broca del café. Esto prueba la comparación con nuestra investigación la eficacia de la toxina en larvas de coleopteros de diferentes estadios.

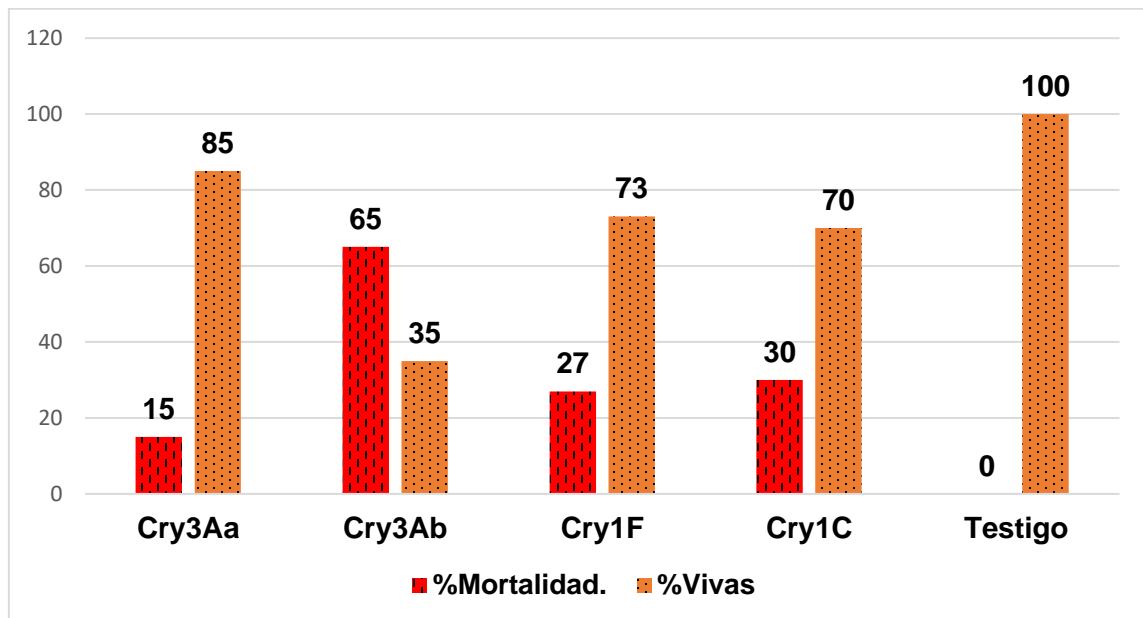


Figura 23. Porcentaje de larvas vivas y muertas del tercer estadio, obtenido después de la exposición de los insectos de *S. zeamais* a toxinas Cry de *Bt*, por medio de granos de maíz osmoacondicionados.

6.8. Porcentaje de mortalidad de las larvas por estadio

Con respecto a las tasas de mortalidad de larvas de *S. zeamais* que se presentó con las toxinas Cry como tratamientos, se encontró que la toxina que presento los valores más altos fue la toxina Cry3Ab con porcentajes por arriba del 60% de mortalidad de larvas de cada instar, tomando en cuenta que esta toxina es específica para coleópteros, se verifica su potencia de toxicidad insecticida sobre este orden; seguida de la toxina Cry1C, con el segundo porcentaje de mortalidad más alto en comparación con las otras toxinas. La toxina Cry3Aa, mostro un menor porcentaje de mortalidad de larvas, pero logró afectar el ciclo de vida de los coleópteros, ya que este fue más tardío con respecto al testigo. La toxina Cry1F

también tuvo efecto en coleópteros, aunque el porcentaje es bajo (Cuadro 2), esto se explica a que esta toxina tiene mayor especificidad sobre el orden de los lepidópteros.

Cuadro 2. Mortalidad de *S. zeamais* a los 40 días por la exposición a las toxinas Cry3Aa, Cry3Ab, Cry1F y Cry1C en bioensayos con granos de maíz osmoacondicionados, como dieta a los insectos.

Tratamientos	Porcentaje de mortalidad (%)			
	Primer estadio	Segundo estadio	Tercer estadio	
Cyr3Aa	13	29	15	
Cry3Ab	59	58	65	
Cry1F	28	35	27	
Cry1C	37	42	30	
Testigo	0	0	0	
% total por estadio	29.3	41.4	29.3	100%

Da Silva *et al.*, 2016 evaluaron la susceptibilidad de diferentes poblaciones de *S. frugiperda* a la proteína Cry1F de *Bt.* lo cual indico que este insecto comienza a presentar una resistencia a esta toxina, en comparación con nuestro trabajo, para *Sitophilus* si causo un daño notable sabiendo que no hay estudios que comprueben a la toxina para coleópteros.

CONCLUSIONES

Las toxinas Cry de *Bt* suministradas a *S. zeamais*, mediante semilla de maíz osmoacondicionada tuvieron efecto sobre la progenie y el ciclo de vida del insecto, ya que expresaron mayor mortalidad y menor número de individuos en los diferentes estadios de la plaga, con respecto al testigo y bajo condiciones controladas de laboratorio.

Se observó que la toxina con el porcentaje más alto de mortalidad fue la Cry3Ab en comparación con la Cry3Aa que son específicas para coleópteros, mientras que las toxinas Cry1F y Cry1C tuvieron un porcentaje significativo de mortalidad, incluso por encima de la Cry3Aa, resaltando que las toxinas Cry1F y Cry1C son de efecto insecticida para lepidópteros; sin embargo, las cuatro toxinas evaluadas retrasaron el ciclo biológico del insecto, con respecto al testigo, demostrando que aunque no son exclusivas para coleópteros se pueden utilizar como control biológico para esta plaga.

La toxina Cry3Ab, tuvo mayor efecto en cuanto al porcentaje de mortalidad, ya que expuso los valores más altos, sobre los instares larvarios y número de pupas que las otras toxinas, por lo que esta toxina puede llegar a ser una opción para el control de *S. zeamais*, en almacén.

LITERATURA CITADA

- AGROWARE, 2016. El control Biológico de Plagas. Principales Métodos y Beneficios. Recuperado de: <https://sistemaagrícola.com.mx/blog/control-biologico-de-plagas-metodos-beneficios/>.
- Alvarado B. W. 2017. Evaluación de especies vegetales para el control de gorgojo (*Sitophilus zeamais*) en maíz almacenado. Tesis de pregrado en agronomía. Universidad Rafael Landívar. 59 p.
- Alpert, G. 2021. Ciclo biológico del gorgojo del maíz (*Sitophilus zeamais* M). Harvard University Bugwood.org. *In*: <https://agroproductores.com/sitophilus-zeamais-motschulsky/>.
- Avisar, D.; Eilenberg, H.; Keller, M.; Reznik, N.; Segal, M.; Sneh, B. & Zilberstein, A. 2009. The *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1C as a potential bioinsecticide in plants. *Plant Science*, 176(3): 315-324.
- Bacopulos, M. E. 2003. Control de *Sitophilus zeamais* Motschulsky en almacén con aplicación de Clorpirifos metil, Deltametrina y su efecto en la calidad de la semilla de maíz. Tesis Maestría. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila. México, p 8.
- Bautista, M, N. 2006. Insectos plaga. Una guía ilustrada para su identificación. Colegio de postgraduados. Primera edición. Texcoco, México.
- Borror, D. J., D. M. de Long., & Ch. A. Triplehorn. 1981. Introduction to the study of insect. 5a. Ed. New York. 928 p.
- Bravo A., Gill S. S. & Soberón M. 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49: 423-435.
- Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S.S y Soberón, M. 2011. *Bacillus thuringiensis*: una historia de un bioinsecticida exitoso. *Bioquímica de insectos y biología molecular*, 41(7), 423-431.
- Bravo, A., Gómez, I., Porta, H., García-Gómez, B. I., Rodríguez-Almazan, C., Pardo, L., & Soberón, M. 2013. Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. *Microbial biotechnology*, 6(1), 17-26.

- Cabrerizo, C. 2012. "El maíz en la alimentación humana". *In*: <https://www.fao.org/3/t0395s/T0395S02.htm> [consulta 10 de julio de 2023].
- Camacho-Millán, R., Aguilar-Medina, E. M., Quezada, H., Medina-Contreras, O., Patiño-López, G., Cárdenas-Cota, H. M., & Ramos-Payán, R. 2017. Caracterización de toxinas Cry de aislados de *Bacillus thuringiensis* autóctonos de México. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 74(3): 193-199.
- Cárdenas, I., María M., Wong, G., Jesús, L., Manzanero, F. J. & Pereyra, A. B. 2001. Selección de toxinas Cry contra *Trichoplusia ni*. *Ciencia UANL*, 4(1): 55-62.
- Cerna C. E., Guevara A. L., Landeros F. J., Ochoa F. Y., Badii Z.M. H & V. Olalde P. 2010. Evaluación de aceites y extractos vegetales para el control de *Sitophilus zeamais* y su efecto en la calidad de semillas de maíz. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo. Argentina*, 42(2): 135-145.
- Chen, K. & Arora, R. 2013. Priming memory invokes seed stress-tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 94: 33-45.
- Crickmore, N., Zeigler, D. R., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Bravo, A. & Dean, D. H. 2009. *Bacillus thuringiensis* Toxin Nomenclature. http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt.
- Curis, M. C., & Bertolaccini, M. A. T. I. 2013. Influencia de presas criadas sobre maíces *Bt* sobre parámetros biológicos de *Eriopsis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae). *Revista de Ciencias Agrarias*, 36(2), 174-181.
- Da Silva, F. K., Spencer, A. T., Crespo, L. B. A. & D. B. Siegfried. 2016. Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) field populations to the Cry1F *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein. *Florida Entomologist*, 99(4): 629-633.
- DEGESCH, 2017. Manejo integrado de plagas (MIP) en granos Almacenados. *In*: <http://degeschmexico.com/soluciones-integrales/> [consulta, julio 2023].

- Domínguez-Arrizabalaga, M., Villanueva, M., Escriche, B., Ancín-Azpilicueta, C., & Caballero, P. 2020. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* proteins against coleopteran pests. *Toxins*, 12(7): 430.
- Du, L.V., y Tuong, T.P. 2002. Mejora del rendimiento del arroz con semillas secas: efectos de la preparación de las semillas, la tasa de plántula y el momento de la plántula. *Siembra directa: estrategias y oportunidades de investigación*, 241-256.
- FAO, 2013. Consulta sobre la producción mundial del maíz [documento en línea]. Disponible en: <https://www.fao.org/resources/apps/apps-info-details/es/c/211291/> [Consulta: Julio 2023].
- FAO, 2016. Manual de manejo postcosecha de granos a nivel rural. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/x5027s/x5027S0h.htm>. [Consulta: Julio 2023].
- Farooq, M.; Basra, S. M. & Ahmad, N. 2007. Improving the performance of transplanted rice by seed priming. *Plant Growth Regulator*, 2(51): 129-137.
- Fideicomiso de Riesgo Compartido (FIRCO). 2017. El maíz, Base de la Dieta Mexicana desde Época Prehispánica. *In*: <https://www.gob.mx/firco/articulos/el-maiz-base-de-la-dieta-mexicana-desde-epoca-prehispanica>. (Consultado agosto 2023).
- García-Lara, S., Espinosa Carrillo, C., & Bergvinson, D. J. 2007. Manual de plagas en granos almacenado y tecnologías alternas para su manejo y control. CIMMYT.
- García-Lara S, Chuck-Hernandez C, Serna-Saldivar S. O. 2019. Development And Structure Of The Corn Kernel. En: *Corn: Chemistry and Technology 3 Edition* (Ed. Serna-Saldivar SO), pp. 147- 163. AACCC International press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811971-6.00006-1>.
- García-Saldaña, E. 2017. Ciclo de vida del gorgojo del maíz. *In* <http://inecol.edu.mx/inecol/index.php/en/2017-06-26-16-35-48/17-ciencia-hoy/1941-silenciando-insectos-plaga>. [Consultado Julio de 2023].
- Gatehouse, J. A. 2008. Biotechnological Prospects for Engineering Insect-Resistant Plants. *Plant Physiology*, 146(3): 881-887.

- Guijón T. M. C. 2022. Protección de Semilla de Maíz con *Phoradendron* spp. Pulverizado Ante el Daño de *Sitophilus zeamais* Motschulsky. Tesis de Licenciatura UAAAN. Buenavista Saltillo, Coahuila, México. p 13.
- Guzmán I., M. 2009. Monografía. Conservación de granos almacenados. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila. 63p.
- Gutiérrez, E. V. H. 2023. Evaluación del efecto de dos insecticidas sobre el control de Gorgojo del maíz (*Sitophilus zeamais* M). Tesis de licenciatura. Instituto Tecnológico de Tlajomulco Jal. Pp.8-9.
- Henderson, C.F. y TILTON, E.W. 1955. Ensayos con acaricidas contra el ácaro pardo del trigo. *Revista de entomología económica*, 48(2), 157-161.
- Hernández-Cruz J, Luna-Cruz A, Loera-Alvarado E, Villanueva-Sánchez E, Landero-Valenzuela N, Zárata-Nicolás, B.H, Granados-Echegoyen, C.A. 2019. Efficiency of the essential oil of *Porophyllum linaria* (Asteraceae) a Mexican endemic plant against *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Insect Science* 2019: iez079. <https://doi.org/10.1093/jisesa/iez079>.
- Hong KJ, Lee W, Park YJ, Yang J.O. 2018. First confirmation of the distribution of rice weevil, *Sitophilus oryzae*, in South Korea. *Journal of AsiaPacific Biodiversity* 11: 69-75. <https://doi.org/10.1016/j.japb.2017.12.005>.
- Iannacone, J. 2012. Resistencia de granos almacenados de cultivares de maíz amarillo duro a *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855 (Coleóptera: Curculionidae) en el Perú. *Revista peruana de Entomología*, 47: 1-6.
- Ileke K.D. Idoko J.E. Ojo D.O. Adesina B.C. 2020. Evaluation of botanical powders and extracts from Nigerian plants as protectants of maize grains against maize weevil, *Sitophilus zeamais* (Motschulsky) [Coleoptera: Curculionidae]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 27: 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101702>.
- Jurat-Fuentes, J. L. & Adang, M. J. 2006. La proteína cadherina de *Heliothis virescens* expresada en células de *Drosophila* S2 funciona como un receptor

- para las toxinas Cry1A de *Bacillus thuringiensis*, pero no para las toxinas Cry1Fa. *Bioquímica*, 45(32): 9688-9695.
- López P., S. A., & Cerón, J. 2010. Proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* y su interacción con coleópteros. *Nova*, 8(14): 183-194. <https://doi.org/10.22490/24629448.449>.
- Martínez Hernández, C. M., Alserhan Robaina, D., Saucedo Castillo, O. M., & Cárdenas Morales, M. 2023. Análisis preliminar de métodos alternativos para la eliminación de plagas de almacén. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, 32(2).
- Máxima U. J. 2020. Definición y Características del Maíz. *In*: <http://www.caracteristicas.com/maiz/> [consulta, julio 2023].
- Mamoon-Ur-rashid M, Riaz-Ud-din, Naeem M, Khan M.A., Ashfaq M. 2021. Relative resistance of maize varieties against maize weevil, *Sitophilus zeamais* (Motschulsky), (coleoptera: Curculionidae). *Pakistan Journal of Agricultural Sciences* 58: 1169-1176. <https://doi.org/10.21162/PAKJAS/21.45>.
- Merino, A. 2019. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico. *In*: <https://elordenmundial.com/mapas-y-graficos/paises-que-mas-maiz-producen/> [Consultado agosto 2023].
- Maroto Borrego, J. V. (2014). Historia de la Agronomía. Ediciones Mundi-Prensa.
- Merino, A. 2019. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico. *In*: <https://elordenmundial.com/mapas-y-graficos/paises-que-mas-maiz-producen/> [Consultado agosto 2023].
- Mora, M. C., De Castro, I. A., & Pedraza, M. C. E. 2023. Evaluación de técnicas para el control biológico en cultivos agrícolas del municipio de Monterrey-Casanare, Colombia. *Revista EIA*, 20(39), 3912-pp.
- Navarro, E. C. 2013. Caracterización molecular del mecanismo de patogénesis de las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* activas contra insectos coleópteros (Doctoral dissertation, Universitat de València).

- Ojo, J.A. y Omoloye, A.A. 2016. Desarrollo e historia de vida de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) en cultivos de cereales. *Avances en Agricultura*, 2016, 1-8.
- Oppert, B., Ellis, R. T. & Babcock, J. 2010. Efectos de Cry1F y Cry34Ab1/35Ab1 sobre plagas de almacenamiento. *Revista de investigación de productos almacenados*, 46(3): 143-148.
- Pigott, C. R. & Ellar, D. J. 2007. Role of Receptors in *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin Activity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71: 255-281.
- Portela-Dussán, D. D, Chaparro-Giraldo, A., & López-Pazos, S. A. 2013. La biotecnología de *Bacillus thuringiensis* en la agricultura. *Nova*, 11(20): 87-96.
- Pradera, C. 2014. El Desinsectador y Desratizador. In <https://desinsectador.com/2014/03/01/avispilla-parasita-anisopteromalus-calandrae-hyennoptera-pteromalidae/> [Consultado agosto 2023].
- Proain, Tecnología Agrícola. 2020. Importancia del almacenaje de granos básicos. In <https://proain.com/blogs/notas-tecnicas/importancia-del-almacenaje-de-granos-basicos> [Consultado agosto 2023].
- Rábago Monzón, Á. 2017. Actividad Antibacteriana y Antioxidantes de Tortillas De Maíz (*Zea mays* L.) Criollo Azul Obtenidas por el Proceso de Nixtamalización. 10.13140/RG.2.2.27236.91529.
- Rathna Priya, T.S. & Manickavasagan, A. 2021. Caracterización del grano de maíz mediante imágenes infrarrojas y técnicas espectroscópicas: una revisión. *Revista de medición y caracterización de alimentos*, 15, 3234-3249.
- Revelo Benavides, M. F. 2011. Proyecto de factibilidad para la creación de una empresa productora y comercializadora de maíz híbrido para las regiones de la sierra y Amazonía, ubicada en el cantón Lago Agrio, provincia de Sucumbios (Bachelor's thesis).
- Roh J. Y., Choi J. Y., Li M. S., Jin B. R. & Je Y. H. 2007. *Bacillus thuringiensis* as a Specific, Safe, and Effective Tool for Insect Pest Control. *Journal of Microbiolog and Biotechnology*, 17: 547–559.

- SADER, 2018. Maíz grano cultivo representativo de México. Disponible en; <https://www.gob.mx/aserca/articulos/maiz-grano-cultivo-representativo-de-mexico> (Consulta Julio 2023).
- SADER, 2021. Producción de maíz en México. Disponible en; <https://www.gob.mx/agricultura/prensa/estima-agricultura-crecimiento-de-2-6-por-ciento-en-la-produccion-de-maiz-grano-en-ano-agricola-2021> (10 de Julio de 2023).
- SAGARPA-SIAP. 2014. Situación actual del maíz al 31 de marzo de 2014. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/agresumen-nacional-por-cultivo> [Consulta: julio 2023].
- Sanahuja, G., Banakar, R., Twyman, R. M., Capell, T., & Christou, P. 2011. *Bacillus thuringiensis*: A century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnology Journal*, 9(3), 283–300.
- Sauka, D. H., & Benintende, G. B., 2008. *Bacillus thuringiensis* generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Revista de Microbiología*, 40: 124-140. Disponible en: <http://www.scielo.org.ar/pdf/ram/v40n2/v40n2/v40n2a13.pdf>.
- Siegel, J. P. 2000. Bacterias. En Manual de Campo de Técnicas en Patología de Invertebrados: Aplicación y evaluación de patógenos para el control de insectos y otras plagas de invertebrados (págs. 209-230). Dordrecht: Springer Países Bajos.
- Schünemann, N., Knaak, N. y Fiuza, L., 2014. Mode of action and specificity of *Bacillus thuringiensis* toxins in the control of caterpillars and stink bugs in soybean culture. ISRN microbiology, 135675. Disponible en <http://doi.org/10.1155/2014/135675>.
- SIIA, 2015. Sistema Integrado de Información Agropecuaria. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Diponible en: http://www.sii.gov.ar/_apps/siia/estimaciones/estima2.php. Último acceso: junio 2023.

- Soberón, M. & Bravo, A. 2007. Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación. pp 303-313.
- Soberón, M., S. S. Gill, & A. Bravo, 2009. Signaling versus punching hole: How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(8): 1337-1349.
- Suárez-Machín, C., Garrido-Carralero, N. A., & Guevara-Rodríguez, C. A. 2016. Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. Revisión bibliográfica. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 50(1): 20-28.
- Tamez Guerra, P., Iracheta Cárdenas, M.M. Pereyra Alférez, B., Galán Wong, L.J. Gómez Flores, R.A. Tamez Guerra, R.S. & Rodríguez Padilla, C. 2005. Caracterización de cepas mexicanas de *Bacillus thuringiensis* tóxicas para larvas de lepidópteros y coleópteros. *Ciencia UANL*, 8(4).
- Torres B., A. I. 2011. Efectividad de la tierra de diatomeas en el control de tres plagas de almacén (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).
- Torres, J. B. & Ruberson, J. R. 2008. Interactions of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in genetically engineered cotton with predatory heteropterans. *Transgenic Research*, 17: 345-354.
- USDA, 2022. Producción mundial de maíz 2022/2023. <http://www.produccionagricolamundial.com/cultivos/maiz>. [Consulta: Julio 2023].
- Vachon, V., Laprade, R., & Schwartz, J. L. 2012. Modelos actuales del modo de acción de las proteínas cristalinas insecticidas de *Bacillus thuringiensis*: una revisión crítica. *Revista de patología de invertebrados*, 111(1), 1-12.
- Valencia Alba., B. 2013. El maíz relacionado con la gastronomía ibarreña. [Tesis de postgrado, Universidad Técnica del Norte]. Recuperado de: <http://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/2235>.
- Valle-Moysén, R., Covarrubias-Prieto, J., Ramirez-Pimentel, J.G., Aguirre-Mancilla, C. L., Iturriaga de la Fuente, G., & Raya-Perez, J. C. 2017.

Osmoacondicionamiento de semillas de maíz pigmentado (*Zea mays* L.) Bofa y Celaya. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 8(5), 1073-1086.

Yan, D.; Duermeyer, L.; Leoveanu, C. & Nambara, E. 2014. Functions of endosperm during seed germination. *Plant Cell Physiology*, 55(9): 1521-1533. Doi:10.1093/pcp/pcu089

Zunjare R., Hossain F., Muthusamy V., Jha S. K., Kumar P., Sekhar J. C. & Gupta S. H. 2016. Genetic variability among exotic and indigenous maize inbreds for resistance to stored grain weevil *Sitophilus oryzae* L. infestation. *Cogent Food Agriculture*, 2(1): 113-156.