

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



Monitoreo de Alelos de Resistencia a *Bacillus thuringiensis* en *Spodoptera frugiperda* de Maíz Asociado al Algodón Genéticamente Modificado.

Por:

DIANA BELEN MORENO SALINAS

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Saltillo, Coahuila, México

Noviembre, 2018

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

Monitoreo de Alelos de Resistencia a *Bacillus thuringiensis* en *Spodoptera frugiperda* de Maíz Asociado al Algodón Genéticamente Modificado

Por:

DIANA BELEN MORENO SALINAS

TESIS

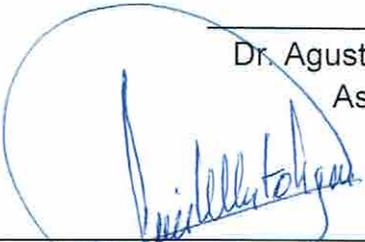
Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Aprobada por el Comité de Asesoría:



Dr. Agustín Hernández Juárez
Asesor Principal



Dr. Luis Alberto Aguirre Uribe
Coasesor



Ing. Aideé González Ruíz
Coasesor



Dr. Gabriel Gallegos Morales
Coordinador de la División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México

Noviembre, 2018



AGRADECIMIENTOS

Agradezco enormemente a Dios por guiar mi camino, por estar en todo momento conmigo y nunca dejarme sola, así mismo a mi bella universidad ¡MI ALMA MATER! Por abrirme las puertas a desarrollarme profesionalmente, que hoy en día está dando fruto por obtener el grado, por siempre en mi mente y corazón todos los recuerdos bellos que pase con amigos y maestros en esta nuestra casa Antonio Narro. BUITRE POR SIEMPRE.

Dr. Agustín Hernández Juárez

Agradezco la amabilidad, respeto y dedicación que ofrece a sus alumnos, así mismo por la realización de este proyecto en el cual se le dedico tiempo siendo asesor principal, un excelente doctor.

Ing. Aideé González Ruiz

Agradezco su amistad en muy poco tiempo, su tiempo dedicado en todo el aspecto de laboratorio, en tardes de trabajo y claro risas y pláticas, así mismo por contribuir en este proyecto de tesis del cual estoy muy satisfecha.

Dr. Luis Alberto Aguirre Uribe

Agradezco por contribuir en la participación y evaluación de mi proyecto de tesis.

Dr. Mariano Flores Dávila

Agradezco por contribuir en la participación y evaluación de mi proyecto de tesis.

Dr. Alberto Flores Olivas

Agradezco su disponibilidad por haber facilitado las instalaciones del Laboratorio de Parasitología Molecular para el desarrollo de esta investigación.

DEDICATORIA

Mis Padres.

Alejandrino Moreno Ibarra
Guadalupe A. Salinas Herrera

Mis Hermanos.

Cindy Salinas Herrera
Pavel Alejandro Moreno Salinas

Mi Familia.

Miguel Salinas López (+)
Alejandrina Herrera Camero
Alejandrino Moreno Quiterio
Teresa Ibarra Agama
Montserrat Salinas Herrera
Brandon Miguel Mendoza Salinas

Mi Novio.

Julio Cesar Ramón Anica

Mis Amigos

Úrsula Marroquín, Alondra Sánchez, Luz María Ragoytia, Rosy Roblero, Ana Ilesmin Rincon, Victor Figueroa, Elver Garcia, Oscar Hernández, Horacio Samayoa, Eder Díaz, Mallo Aparicio, Agradezco cada momento compartido, cada locura, cada aprendizaje, cada platica y sobre todo por permitir conocer de ustedes, De igual forma tambien a todo el equipo de colecta Juan Mallo, Jaime Gonzalez, Agustín Hernández y Úrsula por pasar momentos juntos donde además del trabajo realizado en torreón fueron risas y diversión mil gracias. También a mi amiga Karen Ramos por ser siempre incondicional a mí y apoyarme a distancia cuando más lo necesito.

No son nada más y nada menos que un solo conjunto de seres queridos que suponen benefactores de importancia inimaginable en mis circunstancias de humano. No podría sentirme más amena con la confianza puesta sobre mi persona, especialmente cuando he contado con su mejor apoyo desde que siquiera tengo memoria.

Este nuevo logro es en gran parte a ustedes, he logrado concluir con éxito un proyecto que en un principio podría parecer tarea interminable. Dedico mi tesis a ustedes, personas de bien, seres que ofrecen amor, bienestar y los finos deleites de la vida.

¡GRACIAS!

INDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	iii
DEDICATORIA	iv
INDICE DE CONTENIDO	vi
INDICE DE FIGURAS.....	viii
INDICE DE CUADROS	ix
RESUMEN.....	xi
1- INTRODUCCION.....	1
2- REVISION DE LITERATURA.....	4
2.1. – Resistencia a <i>Bacillus thuringiensis</i>	4
2.1.1. - Resistencia cruzada positiva.....	4
2.1.2. - Resistencia múltiple.....	5
2.2. - Mecanismos de resistencia	5
2.2.1.- Resistencia metabólica.	5
2.2.2.- Resistencia del sitio objetivo	5
2.2.3. - Resistencia a la penetración	6
2.2.4. - Resistencia por comportamiento.....	6
2.3. - Tipos de resistencia en insectos.....	6
2.3.1 - Resistencia por comportamiento	6
2.3.2. - Resistencia morfológica.....	7
2.3.3. - Resistencia fisiológica o bioquímica	7
2.4. - Plantas transgénicas Bt	8
2.4.1. - Ventajas de las plantas Bt	8
2.5. - Resistencia a las proteínas Cry	9
2.5.1. – Generalidades	9
2.6. - Cultivos genéticamente modificados para resistencia a insectos	9
2.7. - Casos de Resistencia.....	10
2.8. - Características generales de <i>Bacillus thuringiensis</i>	12
2.8.1. - <i>Bacillus thuringiensis</i>	12
2.9. - Modo de acción de <i>B. thuringiensis</i>	14
2.10. - Importancia de <i>Bacillus thuringiensis</i>	16

2.11. - Situación de cultivos genéticamente modificados	17
2.12. - Algodón Genéticamente Modificado	19
2.13. - Genes codificantes de proteínas insecticidas Cry	20
2.14. - Genes Cry que codifican proteínas tóxicas para insectos lepidópteros.....	21
2.14.1. - Genes Cry1	21
2.14.2. - Genes Cry2.....	21
2.14.3. - Genes Cry9.....	21
2.14.4. - Genes Cry15	22
2.15. - Toxina Cry	22
2.16. - Proteínas Cry y Vip toxicas para insectos lepidópteros.....	22
2.17. - Gusano cogollero <i>Spodoptera frugiperda</i>	26
2.17.1. – Generalidades	26
2.18. - Clasificación Taxonómica.....	27
2.19. - Biología y Descripción Taxonómica.....	27
2.19.1. – Huevo	27
2.19.2. – Larva.....	28
2.19.3. – Pupa.....	29
2.19.4. – Adulto.....	29
2.20. - Origen y Distribución	30
2.21. – Importancia	30
3- MATERIALES Y METODOS	31
4- RESULTADOS Y DISCUSION.....	41
5- CONCLUSION	71
6- LITERATURA CITADA.....	72

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.- <i>Bacillus thuringiensis</i>	13
Figura 2.- Modo de Acción de las proteínas Cry.....	15
Figura 3.- Modo de Acción de la endotoxina de <i>Bacillus thuringiensis</i>	16
Figura 4.- Cultivos Genéticamente Modificados	18

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Toxicidad de proteínas Cry y Vip para insectos del Orden Lepidoptera.	22
Cuadro 2. Buffer 1x de corrida y solución para preparación de agarosa.....	34
Cuadro 3. Reactivos y orden de agregación para el elaborar el Mixer para PCR. 40	
Cuadro 4. Observación de ADN de Spodoptera frugiperda en gel de agarosa al 1% de Matamoros Coahuila.	41
Cuadro 5. Observación de ADN de Spodoptera frugiperda en gel de agarosa al 1% de Francisco I. Madero, Coahuila.	43
Cuadro 6. Observación de ADN de Spodoptera frugiperda en gel de agarosa al 1% de la línea susceptible de Jalisco, Veracruz, Morelos y Coahuila.	44
Cuadro 7. Amplificación y visualización del producto de PCR de Spodoptera frugiperda en gel de agarosa al 1% con el juego de primer's 1S-R y r1-F, de Matamoros, Coahuila.	45
Cuadro 8. Amplificación y visualización del producto de PCR de Spodoptera frugiperda en gel de agarosa al 1% con el juego de primer's 1S-R y r1-F, de Francisco I. Madero, Coahuila.	46
Cuadro 9. Amplificación y visualización del producto de PCR de Spodoptera frugiperda en gel de agarosa al 1% con el juego de primer's r1-R y r1-F, de Matamoros, Coahuila.	47
Cuadro 10. Amplificación y visualización del producto de PCR de Spodoptera frugiperda en gel de agarosa al 1% con el juego de primer's r1-R y r1-F, de Francisco I. Madero, Coahuila.	48
Cuadro 11. Amplificación y visualización del producto de PCR de Spodoptera frugiperda en gel de agarosa al 1% con el juego de primer's r2r3-F y r2r3-R, de Matamoros, Coahuila.	49
Cuadro 12. Amplificación y visualización del producto de PCR de Spodoptera frugiperda en gel de agarosa al 1% con el juego de primer's r2r3-F y r2r3-R, de Francisco I. Madero, Coahuila.	50
Cuadro 13. Amplificación y visualización del producto de PCR de Spodoptera frugiperda en gel de agarosa al 1% con el juego de primer's r4-F y r4-R, de Matamoros, Coahuila.	51
Cuadro 14. Amplificación y visualización del producto de PCR de Spodoptera frugiperda en gel de agarosa al 1% con el juego de primer's r4-F y r4-R, de Francisco I. Madero, Coahuila.	52
Cuadro 15. Amplificación y visualización del producto de PCR de Spodoptera frugiperda en gel de agarosa al 1% con el juego de primer's r5-F y r5-R, de Matamoros, Coahuila.	53

Cuadro 16. Amplificación y visualización del producto de PCR de <i>Spodoptera frugiperda</i> en gel de agarosa al 1% con el juego de primer's r5-F y r5-R, de Francisco I. Madero, Coahuila.	54
Cuadro 17. Amplificación y visualización del producto de PCR de <i>Spodoptera frugiperda</i> en gel de agarosa al 1% con el juego de primer's r6-F y r6-R, de Matamoros, Coahuila.	55
Cuadro 18. Amplificación y visualización del producto de PCR de <i>Spodoptera frugiperda</i> en gel de agarosa al 1% con el juego de primer's r6-F y r6-R, de Francisco I. Madero, Coahuila.	56
Cuadro 19. Amplificación y visualización del producto de PCR de <i>Spodoptera frugiperda</i> en gel de agarosa al 1% con el juego de primer's r7-F y r7-R, de Matamoros, Coahuila.	57
Cuadro 20. Amplificación y visualización del producto de PCR de <i>Spodoptera frugiperda</i> en gel de agarosa al 1% con el juego de primer's r7-F y r7-R, de Francisco I. Madero, Coahuila.	58
Cuadro 21. Amplificación y visualización del producto de PCR de <i>Spodoptera frugiperda</i> en gel de agarosa al 1% con el juego de primer's r8-F y r8-R, de Matamoros, Coahuila.	59
Cuadro 22. Amplificación y visualización del producto de PCR de <i>Spodoptera frugiperda</i> en gel de agarosa al 1% con el juego de primer's r8-F y r8-R, de Francisco I. Madero, Coahuila.	60
Cuadro 23. Amplificación y visualización del producto de PCR de <i>Spodoptera frugiperda</i> en gel de agarosa al 1% con el juego de primer's Cad-HaF y Cad-HaR, de Matamoros, Coahuila.	61
Cuadro 24. Amplificación y visualización del producto de PCR de <i>Spodoptera frugiperda</i> en gel de agarosa al 1% con el juego de primer's Cad-HaF y Cad-HaR, de Francisco I. Madero, Coahuila.	62
Cuadro 25. Amplificación y visualización del producto de PCR de <i>Spodoptera frugiperda</i> en gel de agarosa al 1% con el juego de primer's Cad-HzF y Cad-HzR, de Matamoros, Coahuila.	63
Cuadro 26. Amplificación y visualización del producto de PCR de <i>Spodoptera frugiperda</i> en gel de agarosa al 1% con el juego de primer's Cad-HzF y Cad-HzR, de Francisco I. Madero, Coahuila.	64
Cuadro 27. Amplificación y visualización del producto de PCR de <i>Spodoptera frugiperda</i> en gel de agarosa al 1% con 5 juegos de primer's, de localidades de Jalisco, Veracruz, Morelos y Coahuila.	65
Cuadro 28. Amplificación y visualización del producto de PCR de <i>Spodoptera frugiperda</i> en gel de agarosa al 1% con 5 juegos de primer's de localidades de Jalisco, Veracruz, Morelos y Coahuila.	66

RESUMEN

Los bioinsecticidas con base en las proteínas producidas por *Bacillus thuringiensis* son de los más utilizados para el control de plagas en todo el mundo. Su uso se ha incrementado con el cultivo de plantas genéticamente modificadas que expresan uno o más genes que codifican proteínas Cry, capaces de producirlas en todos sus tejidos. Los genes más usados son aquellos que codifican para las toxinas Cry1A, Cry1Ab y la Cry1Ac, principalmente en cultivos como algodón y maíz. El uso de estos cultivos Bt desde su introducción comercial en 1996, causó toda una revolución en la agricultura contemporánea, y cada año se emplean en mayores extensiones de tierra para su siembra. Las plantas modificadas genéticamente para producir toxinas de *B. thuringiensis*, reduce la dependencia de insecticidas químicos convencionales, proporcionando beneficios en lo económico, en la salud y son una alternativa ecológica, ya que; en comparación con los insecticidas químicos son menos perjudiciales para la vida silvestre, debido a su baja toxicidad para los vertebrados y la mayoría de los organismos benéficos, sin embargo; la evolución de resistencia a las toxinas Bt por las plagas podría interrumpir dichos beneficios y plantea una amenaza constante para su uso sostenible en la agricultura. En la comarca Lagunera. Se siembra algodón genéticamente modificado desde hace 22 años, y cercano a este también se siembra maíz convencional para su uso como forraje principalmente. El algodón y maíz son cultivos que comparten algunas plagas y que son objetivo de *B. thuringiensis*, como son *Helicoverpa zea*, *Heliothis virescens* y *Spodoptera frugiperda*, aunque esta última con mayor preferencia por el maíz; lo que sugiere un flujo constante de estos insectos entre estos cultivos, y donde el maíz puede ser un reservorio para individuos con características de resistencia a la toxina de Bt; además, de que se predispone la entrada de nuevos cultivos GM, que comparten plagas blanco de Bt, como es el caso del maíz Bt, lo que podría traer consigo falta de eficacia del nuevo cultivo, mucho antes de su establecimiento. El objetivo del presente trabajo fue monitorear alelos de resistencia a la toxina Cry1Ac de *B. thuringiensis* en *S. frugiperda* de maíz convencional, asociado a algodón genéticamente modificado. Se realizó la extracción de ADN y amplificación por PCR de larvas de tercer estadio de *S. frugiperda* de localidades de Francisco I. Madero y Matamoros Coahuila (asociado a algodón Bt) y se comparó con poblaciones de *S. frugiperda* libres de cultivos Bt provenientes del Estado de Veracruz, Morelos y Jalisco. En la PCR se utilizaron 10 pares de primer's para la amplificación de alelos de resistencia del gen que codifica para la toxina Cry1Ac de *B. thuringiensis*. La extracción de ADN y su visualización dieron como resultado positivo, indicando la presencia de ADN con bandas suficientemente marcadas y/o visibles (buena calidad del ADN), el cual se procesó por PCR, dando como resultado una amplificación negativa para todas las muestras, mostrando que no existe ningún alelo que le confiera resistencia a *S. frugiperda* a la toxina Cry1Ac del algodón

genéticamente modificado, por lo que la tecnología Bt se mantiene efectiva contra *S. frugiperda* y no predispone la entrada de nuevos cultivos Bt, particularmente maíz.

Palabras clave: Gen Bt, gusano cogollero, resistencia, toxina Cry1Ac, transgénico

1- INTRODUCCION

El gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) es un insecto polífago que ocasiona numerosas pérdidas en diversos cultivos; esta característica, junto a su poder de aclimatación a diferentes condiciones permite que su distribución geográfica sea amplia (Abbas *et al.* 1989). Es la plaga del maíz *Zea mays* L. (Poaceae) más importante en diferentes países del continente americano (Casmuz *et al.*, 2010). Ataca este cultivo con niveles de densidad variables, pero siempre poniendo en riesgo la productividad del mismo. Cuando afecta las plantas jóvenes, los daños pueden ser totales, mientras que, si afecta las plantas en estados fenológicos avanzados, pueden reponerse de la defoliación llegando a una producción normal (Andrews, 1988; Willink *et al.*, 1993 a, b; Artigas, 1994; Virla *et al.*, 1999; Clavijo y Pérez, 2000; Pogue, 2002).

Actualmente, las estrategias para el manejo de esta plaga, incluyen el uso de insecticidas químicos y la utilización de cultivos transgénicos que expresan toxinas derivadas de la bacteria *Bacillus thuringiensis* Berliner. Estas plantas resistentes a insectos han sido modificadas por ingeniería genética para producir toxinas de tipo proteico (codificadas por los genes Cry), obtenidas de distintas cepas de *B. thuringiensis* (Mentaberry y Ghio, 2002), convertidas en “plantas insecticidas” generalmente se hace referencia a estos tipos de plantas como “plantas o cultivos Bt” Ej. Maíz Bt y Algodón Bt (Vaeck *et al.*, 1987). La resistencia marca un cambio genético en respuesta a la selección por tóxicos que pueden disminuir el control en el campo (Sawicki, 1987). Dicho de otra manera, es el carácter heredable consistente en la menor susceptibilidad (fenotipo) de un insecto (individuo) a la toxina Bt en relación a individuos de la misma población (Crava *et al.* 2013). Se complementa este concepto refiriendo a la tolerancia como una medida cuantitativa de la resistencia que está distribuida entre los individuos de una población, al definir a la resistencia como un carácter heredable, cabe considerar el genotipo que lo determina y su frecuencia en la población, la que frente a la presión de selección que ejerce el insecticida, crecerá en el tiempo (Caprio *et al.*, 2008). Lo cual es considerado como un proceso inevitable, debido a la presión de selección continua que se sigue ejerciendo con las aplicaciones de insecticidas (Brattsten, 1989).

Los antecedentes sobre el desarrollo de resistencia a insecticidas indican que, si una población de la plaga se expone en forma continua a un insecticida, la plasticidad genética de la población eventualmente permitirá que algunos pocos individuos resistentes se seleccionen a través de las generaciones, para posteriormente conformar una población de individuos resistentes. Por lo tanto, conociendo que las plagas susceptibles a las toxinas Cry tienen el potencial de desarrollar resistencia hacia ellas, y que los cultivos Bt exponen en forma creciente

y continua a las poblaciones plaga a la presión de selección de una o varias proteínas Cry, es lógico prever que se combinan las circunstancias para el desarrollo de la resistencia, como respuesta frente a un peligro, eliminando no solo la posibilidad de seguir utilizando las proteínas Cry como medida de control de plagas, sino también predisponiendo a las plagas al uso de los productos a base de *B. thuringiensis*. El desarrollo de resistencia se produce principalmente por usar siempre el mismo insecticida y a dosis alta. Esta condición la cumplen perfectamente los OGM'S (Tabashnik *et al.*, 2004).

En plagas de lepidóptera, el tipo más común de resistencia a las toxinas Bt se denomina "modo 1." Modo 1 implica un alto nivel de resistencia a por lo menos una toxina Cry, a la herencia recesiva, la reducción de la unión a las membranas del intestino medio de al menos una toxina Cry (Tabashnik *et al.*, 2004). La explicación más simple para el modo 1 de resistencia es, que las modificaciones de los sitios objetivo reducen o eliminan la unión de las toxinas Cry en los individuos homocigotos resistentes, pero tienen poco efecto sobre la susceptibilidad de los individuos heterocigotos a las toxinas (Morín *et al.*, 2003; Soberon y Bravo, 2008).

También existen evidencias de mutaciones que afectan la expresión de los receptores tipo cadherina, que resultan en insectos resistentes a las toxinas Cry, y tienen un costo en el desempeño de los insectos en la naturaleza, evitando que las mutaciones que afectan a esta proteína se fijen en la población de insectos (Soberon y Bravo, 2008).

Con avances de la tecnología, se ha podido desarrollar nuevos métodos para determinar la manifestación de resistencia por parte de un organismo; para el caso de un organismo genéticamente modificado, la resistencia ha sido detectada por medio del ADN basado en alelos de resistencia en heterocigotos, esa selección, sin embargo, requiere del conocimiento de alelos de resistencia en poblaciones de campo que están asociados con la supervivencia en los cultivos Bt (Tabashnik, *et al.*, 2004). Hasta hace algunos años, la detección basada en ADN no podía aplicarse para resistencia a Bt, porque la base genética de la resistencia era desconocida. Actualmente hay pruebas de especies de lepidópteros, donde se reconoce que la resistencia a las toxinas Cry puede ser causado por mutaciones en un gen que codifica para cadherina, proteína expresada en el intestino medio de las larvas. Esta mutación proporciona la oportunidad de desarrollar y probar métodos de diagnóstico basados en el ADN de este gen (Yang *et al.* 2006; Gahan *et al.*, 2007; Yang *et al.* 2007).

1.1- OBJETIVO

Monitorear alelos de resistencia a la toxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* en *Spodoptera frugiperda* de maíz convencional, asociado a algodón genéticamente modificado.

1.2- JUSTIFICACION

El algodón y maíz son cultivos que comparten algunas plagas y que son objetivo de *B. thuringiensis*, como son *H. zea*, *H. virescens* y *S. frugiperda*, esta última con mayor preferencia por el maíz; lo que sugiere un flujo constante de estos insectos entre estos cultivos, y donde el maíz puede ser un reservorio para individuos con características de resistencia a la toxina de Bt; además, de que se predispone la entrada de nuevos cultivos GM, que comparten plagas blanco de Bt, como es el caso del maíz Bt, lo que podría traer consigo falta de eficacia del nuevo cultivo, mucho antes de su establecimiento.

Este cultivo biotecnológico permanece vigente con alta prioridad por las implicaciones que tiene para el país, particularmente por ser este su centro de origen y la importancia económica y social que representa.

1.3- HIPOTESIS

En 22 años de siembra de algodón genéticamente modificado en la comarca lagunera, el flujo de poblaciones de *Spodoptera frugiperda* entre algodón GM-maíz convencional, pudieran escapar al efecto la toxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* resultando en el desarrollo de resistencia a estas toxinas.

2- REVISION DE LITERATURA

2.1. – Resistencia a *Bacillus thuringiensis*

La resistencia es el carácter heredable consistente en la menor susceptibilidad (fenotipo) de un insecto (individuo) a la toxina de *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) en relación a individuos de la misma población (Crava *et al.* 2013). Complementan este concepto refiriendo a la tolerancia como una medida cuantitativa de la resistencia que está distribuida entre los individuos de una población. Al definir a la resistencia como un carácter heredable, cabe considerar el genotipo que lo determina y su frecuencia en la población, la que frente a la presión de selección que ejerce el insecticida, crecerá en el tiempo (Caprio *et al.*, 2008).

La resistencia de campo a una toxina Bt (field-evolved resistance en la literatura internacional vigente) es la menor susceptibilidad de una población de insectos como consecuencia de la exposición a esa toxina a campo, en relación a la línea base de susceptibilidad, a su vez definida como la CL₅₀ (concentración de una toxina que provoca la muerte del 50% de la población) de la toxina Bt en poblaciones de diferentes regiones previa a la introducción de la toxina (Bernardi *et al.*, 2012). Si bien la expresión "línea base de susceptibilidad" es ampliamente utilizada, Tabashnik *et al.* (2014) proponen referirse a susceptibilidad inherente, expresión más acorde al concepto involucrado. Con estas definiciones, para cerrar un grupo básico de términos de referencia sólo resta agregar que la evolución de resistencia de campo a una toxina Bt es el proceso de selección natural (Heckel, 2012) que provoca una disminución de la susceptibilidad (a la toxina Bt) en una población a campo.

2.1.1. - Resistencia cruzada positiva

La resistencia cruzada ocurre cuando la resistencia a un insecticida confiere resistencia a otro insecticida, incluso cuando el insecto no ha sido expuesto a este último producto. Claramente, debido a que la población de insectos plaga suelen ser de gran tamaño y se reproducen rápidamente, siempre existe el riesgo de que la resistencia a los insecticidas pueda evolucionar, especialmente cuando los insecticidas se usan mal o se usan en exceso (IRAC, 2018).

Monge (1986) Indica que la resistencia que se genera en los insectos a un determinado plaguicida y a otros que no se han aplicado, pero que tienen forma de acción o de detoxificación similar, siendo la resistencia cruzada negativa lo contrario cuando al aplicar un plaguicida aumenta la resistencia a esta, pero disminuye en otros.

2.1.2. - Resistencia múltiple

Se da cuando el genotipo confiere resistencia a un amplio rango de grupos plaguicidas (Moberg, 1990)

Georgiou y Lagunes (1991), demuestran que la mayoría de las especies resistentes son dípteros, en orden descendente se ubican los lepidópteros, coleópteros, ácaros, homópteros y heterópteros (Hemiptera). 504 especies de artrópodos resistentes a uno o más plaguicidas hasta 1989. De las especies resistentes 481 son dañinas (283 son de importancia agrícola y el resto de importancia médico-veterinaria) y 23 benéficas. Los mismos autores señalan que en el examen del crecimiento de la resistencia, los datos anteriores no reflejan la acumulación de mecanismos de resistencia que se obtiene al contabilizar el número de productos químicos que cada especie puede resistir. Al calcular este dato se obtiene un total de 1640 casos de la combinación especies/grupos de insecticidas (lo que demuestra un claro aumento del desarrollo de resistencia múltiple) y 4458 casos de la combinación número de especies/insecticidas/país que nos indica la extensión geográfica de la resistencia.

2.2. - Mecanismos de resistencia

Hay varias formas en que los insectos pueden volverse resistentes a la protección de cultivos insecticidas y a los productos de salud pública (IRAC, 2018).

2.2.1.- Resistencia metabólica.

Los insectos resistentes pueden desintoxicar o destruir la toxina más rápido que los insectos susceptibles, o eliminar rápidamente de sus cuerpos las moléculas tóxicas. La resistencia metabólica es el mecanismo más común y, a menudo, presenta el mayor desafío. Los insectos usan sus sistemas de enzimas internas para descomponer los insecticidas. Las cepas resistentes pueden poseer niveles más altos o formas más eficientes de estas enzimas. Además de ser más eficientes, estos sistemas enzimáticos también pueden tener un amplio espectro de actividad (es decir, pueden degradar muchos insecticidas diferentes) (IRAC, 2018).

2.2.2.- Resistencia del sitio objetivo

El sitio objetivo donde el insecticida actúa en el insecto puede modificarse genéticamente para evitar que el insecticida se una o interactúe en su sitio de acción, reduciendo o eliminando el efecto pesticida del insecticida (IRAC, 2018).

2.2.3. - Resistencia a la penetración

Los insectos resistentes pueden absorber la toxina más lentamente que los insectos susceptibles. La resistencia a la penetración ocurre cuando la cutícula externa del insecto desarrolla barreras que pueden retardar la absorción de los químicos en sus cuerpos. Esto puede proteger a los insectos de una amplia gama de insecticidas. La resistencia a la penetración está frecuentemente presente junto con otras formas de resistencia, y la penetración reducida intensifica los efectos de esos otros mecanismos (IRAC, 2018).

2.2.4. - Resistencia por comportamiento

Los insectos resistentes pueden detectar o reconocer un peligro y evitar la toxina. Este mecanismo de resistencia ha sido reportado para varias clases de insecticidas, incluyendo organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides. Los insectos pueden simplemente dejar de alimentarse si se encuentran con ciertos insecticidas, o abandonar el área donde se produjo la fumigación (por ejemplo, pueden moverse hacia la parte inferior de una hoja rociada, moverse más profundo en el dosel del cultivo o volar lejos del área objetivo) (IRAC, 2018).

2.3. - Tipos de resistencia en insectos

Georghiou (1965) clasificó la resistencia en tres tipos: Resistencia por comportamiento, morfológica y fisiológica.

2.3.1 - Resistencia por comportamiento

Es cuando los insectos no entran en contacto con el insecticida debido a un comportamiento de escape (Monge, 1986).

Se refiere a los patrones de comportamiento que contribuyen a la resistencia, estos pueden ser hábitos tales como la preferencia a descansar en áreas no tratadas con insecticidas en lugar de áreas tratadas, o bien la detección del insecticida y la tendencia a evitarlo antes de ponerse en contacto con él (Carrillo, 1984).

La acción irritante que produce un insecticida en algunos miembros de la población, ocasiona que éstos no sean controlados por el agroquímico. Por tanto, cuando dichos individuos se vuelven mayoría en la población, se dice que es resistente, cuando en realidad dichos individuos son más susceptibles que los normales, ya que, si son expuestos forzosamente al tóxico, su DL50 será menor que la de los individuos normales (Lagunés, 1991).

Como ejemplo de la acción repelente, tenemos a las moscas después de un tiempo, ya no se acercan a cebos con azúcar que contienen malatión; ésta es un tipo de resistencia que depende del estímulo. También se ha comprobado que hay moscas que tienen la costumbre de posarse en la parte superior de los establos, característica que las hace eludir el insecticida. Además; en Rhodesia la mayoría de los mosquitos eran endófilos, pero actualmente los mosquitos viven y se alimentan fuera de las casas, después de 14 años de selección con BHC (hexacloruro de benceno) los mosquitos endófilos fueron eliminados (Lagunes, 1991).

2.3.2. - Resistencia morfológica

Se presenta cuando alguna característica morfológica ocasiona la resistencia, por ejemplo, una menor área de exposición al tóxico (Carrillo, 1984). Debido a las características morfológicas de los insectos, éstos no son afectados por los insecticidas (principalmente por impermeabilidad en la cutícula) (Monge, 1986).

2.3.3. - Resistencia fisiológica o bioquímica

Es el tipo de resistencia más importante; los insectos adquieren resistencia de dos formas. Por adición de un mecanismo de protección y por insensibilidad en el sitio de acción. La más frecuente puede ser debido a mecanismos de protección, tal es mayor almacenamiento en tejidos inertes. También se pueden presentar alteraciones en el sitio de acción; con fines de manejo los tipos de resistencia se agrupan en mecanismos de resistencia metabólicos y no metabólicos. Son mecanismos metabólicos cuando involucran cambios enzimáticos, y no metabólicos cuando se refiere a cambios en sensibilidad del sitio activo, en la tasa de penetración, almacenamiento o excreción, así como en el comportamiento o la forma de los insectos (Monge, 1986).

Los principales factores que intervienen en este tipo de resistencia son: (Monge, 1989).

- ✓ Penetración reducida, generalmente en los insectos resistentes se presenta una menor penetración del tóxico, lo que amplifica la acción del mecanismo metabólico que pudiera existir. Solamente se ha registrado el caso de *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) en el cual la penetración reducida es por sí sola, responsable de la resistencia de 5X a malatión.
- ✓ Mayor almacenamiento de tejidos inertes, normalmente en el tejido graso. Al respecto, no hay registros de colonias resistentes solo por este factor.

- ✓ Aumento de la excreción. Por sí solo no produce altos niveles de resistencia; no se tienen evidencias de colonias resistentes por una excreción aumentada.

2.4. - Plantas transgénicas Bt

La ingeniería genética desarrollo varias especies de plantas que expresan genes Cry de *B. thuringiensis* y las ha convertido en “Plantas insecticidas”, generalmente se hace referencia a los tipos de plantas como “plantas o cultivos Bt” Ej. Maíz Bt y Algodón Bt. El primer informe de una planta transgénica con un gen Cry de *B. thuringiensis* data de 1987 (Vaeck *et al.*, 1987).

Se desarrollaron plantas de tabaco *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae) que producían cantidades suficientes de proteína Cry para controlar larvas de primer estadio de *Manduca sexta* L. (Lepidoptera: Sphingidae). Desde entonces diez tipos de genes Cry distintos se introdujeron en 26 especies vegetales: Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ba, Cry1Ca, Cry1H, Cry2Aa, Cry3A, Cry6A y Cry9C (Vaeck *et al.*, 1987).

2.4.1. - Ventajas de las plantas Bt (Hossain y Khetan, 2004).

- ✓ Reducen la necesidad de aplicar insecticidas y de proveer una protección duradera a lo largo del cultivo.
- ✓ Los únicos insectos expuestos a la toxina son aquellos que se encuentran alimentándose de los cultivos y no otros.
- ✓ Brindan a los agricultores una alternativa al uso de pesticidas químicos y tienen una alternativa para el control de plagas de importancia económica que son difíciles de controlar por los primeros.

Estas ventajas se ven reflejadas finalmente en beneficios enormes para la producción de alimentos y en una mejor calidad medio ambiental en todo el mundo (Hossain y Khetan, 2004).

Así como también las plantas Bt poseen la gran desventaja que radica en la posible generación de resistencia en ciertas poblaciones naturales de insectos que se alimentan de ellas. Esto determinaría la inutilización de determinadas proteínas Cry para el control, mediante su empleo en plantas transgénicas o con los bioinsecticidas que los contengan (González-Cabrera, 2001).

El algodón Bt se cultivó por primera vez en Estados Unidos, Australia y México en 1996 y posteriormente, se introdujo comercialmente a otros países: Argentina,

China, y Sudáfrica y más recientemente a países como India y Colombia (James, 2004).

Los modelos actuales sugieren que las plantas que expresan dos genes Cry diferentes (o un gen Cry y otro de distinto tipo, que son reconocidos por un receptor distinto son más efectivos en el control de insectos plaga y tendrían el potencial de demorar la aparición de resistencia (Zhao *et al.*, 2003).

2.5. - Resistencia a las proteínas Cry

2.5.1. – Generalidades

La resistencia se define como “un cambio heredable en la sensibilidad de una población de plagas que se refleja en el fracaso repetido de un producto para alcanzar el nivel de control esperado cuando se usa de acuerdo a la etiqueta para la plaga especializada” (IRAC, 2018).

2.6. - Cultivos genéticamente modificados para resistencia a insectos

Mediante el ADN recombinante se ha revolucionado la producción agrícola, con híbridos genéticamente modificados para diferentes características de importancia. En un principio, las modificaciones genéticas estuvieron regidas por las necesidades en el campo, enfocado a una mayor productividad, en la actualidad presentan distintas características de importancia: mejoramiento de características de interés (contenido nutricional), para la producción farmacéutica (insulina humana en bacterias y levaduras), larga vida de anaquel (tomate flavr sarvr), resistencia a estrés abiótico (sequia, frío), resistencia a herbicidas (glifosato y glufosinato), resistencia a plagas (lepidópteros y coleópteros), entre otras características de importancia (Rodríguez y González, 2007).

El ataque por insectos representa uno de los aspectos importantes del cultivo vegetal. Son numerosas las plagas de todo tipo de plantas producidas por muchos insectos. Su interés es enorme desde el punto de vista económico, incluyendo no solo la pérdida de cosechas sino los gastos necesarios para su control y prevención, por lo general de tipo químico. No puede olvidarse, tampoco su repercusión social, por la merma en el abastecimiento ciudadano de alimentos de primera necesidad, en particular en países subdesarrollados (Rodríguez *et al.*, 2003). Un buen ejemplo de cultivos genéticamente modificados para resistencia a insectos esta mediado por la proteína cristal (Cry) producida por *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bacillales: Bacillaceae). Denominada endotoxina, que resulta toxica, selectivamente, ante el ataque de insectos plaga de importancia económica, principalmente del orden

Lepidóptera y Coleóptera (Silva, 2005a; 2005b). Estos cultivos que producen toxinas de *Bacillus thuringiensis* para el control de insectos representan la primera generación de cultivos transgénicos insecticidas (Sisterson *et al.*, 2007) y tras 22 años de su comercialización, plantados por primera vez en 1996, los considerables beneficios económicos, ambientales y sociales que ofrece este tipo de cultivos, han llevado a millones de agricultores de todo el mundo a seguir aumentando la superficie agro biotecnológica (James, 2014; ISSSA, 2018); motivo por el han sido considerados como una alternativa de manejo de plagas en la agricultura (Fernández *et al.*, 2007).

2.7. - Casos de Resistencia

A inicio de la liberación de organismos genéticamente modificados Bt, ya se habían hecho comparaciones a proteínas insecticidas de *B. thuringiensis* con la palomilla dorso de diamante *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) provenientes de campo y expuestas a ingredientes a base de toxinas Cry, encontrándose una resistencia cruzada de 100 veces a las toxinas Cri1J y H04, un híbrido I y II de Cry1Ab y el dominio III o Cry1C, resistencia cruzada seis veces a Cry1Bb y triple para Cry1D, niveles altos de resistencia a Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac y niveles altos de resistencia cruzada a Cry1F, Cry1J, H04 (Tabashnik *et al.*, 1996), resistencia cruzada debido a un gen autosómico recesivo que le confiere este tipo de resistencia a diferentes toxinas y además este insecto plaga puede desarrollar resistencia a algunos grupos de toxinas mucho más rápido de lo que se esperó (Tabashnik *et al.*, 1997).

A cuatro años de la liberación de cultivos Bt, se reportó la frecuencia de un alelo recesivo de resistencia que confiere la toxina Cry1Ac de Bt en cepas de gusano rosado *Pectinophora gossypiella* Saunders (Lepidoptera: Gelechiidae) de campos de algodón Bt en Arizona en 1997 y estudios realizados no detectaron un aumento en la frecuencia de este alelo de resistencia en 1999, siendo eficaz el algodón Bt para controlar gusano rosado (Tabashnik *et al.*, 2000a).

Se reporta una sustitución en los receptores de la toxina Cry1Ac aminopeptidasa y proteína cadherina en *H. virescens* producto de una mutación, originando la pérdida del sitio de unión de la toxina Cry1Ac, demostrándose que estos receptores han disminuido su vinculación a la toxina, llevando a generar resistencia en los insectos de la Cry1A (Xie *et al.*, 2005).

Se detectan altos niveles de resistencia de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) a la toxina Cry2Ab del algodón Bt debido a un gen autosómico de carácter recesivo en Australia (Mahon *et al.*, 2007).

Primera detección de dos alelos de resistencia de *B. thuringiensis* en *H. armigera* en campos de algodón Bt, demostrando que estos insectos pueden completar su desarrollo en el cultivo Bt (Yang *et al.*, 2007).

Se informa por primera vez de resistencia en campo para el barrenador del tallo *Busseola fusca* (Fuller) (Lepidoptera: Noctuidae) en maíz Bt (MON 810) en África, evaluando la progenie de insectos recogidos en maíz Bt y convencional, infestando artificialmente en invernadero plantas con larvas recién emergidas, con sobrevivencia de las larvas provenientes del maíz Bt, concluyendo el desarrollo de resistencia para este insecto (Van Rensburg, 2007).

Datos de 2002 a 2006 en pruebas de campo para *H. zea*, han reportado el desarrollo de resistencia a Cry1Ac en algodón Bt en 14 poblaciones de Arkansas, Georgia y Mississippi, con coeficientes de resistencias mayores a 100, incluyendo dos poblaciones con tasas de resistencia mayores a 1000 (Tabashnik *et al.*, 2008).

Se presenta informe de resistencia en laboratorio a la toxina Cry1Ac en dos poblaciones de gusano elotero/bellotero (*H. zea*) plaga objetivo del maíz y algodón con una proporción de resistencia con más de 100 veces después de 11 generaciones, manteniéndose en ese nivel durante nueve generaciones para una población, mientras que otra se estancó después de 11 generaciones alcanzando la proporción de resistencia doce años (Anilkumar *et al.*, 2008).

Han surgido brotes de resistencia en campo en respuesta a los cultivos Bt, como es el caso de poblaciones de la Palomilla de la col (*P. xylostella*), otro caso es el gusano falso medidor de la col *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) que ha evolucionado a aerosoles Bt en invernadero y cepas de laboratorio de muchas plagas que se han seleccionado por su resistencia a las toxinas Bt (Tabashnik *et al.*, 2008).

Otra plaga importante, *H. armigera*, ha generado un aumento en la frecuencia de resistencia al gen Bt incorporado en una variedad de algodón sembrada en China (Liu *et al.*, 2008), por otro lado Gao *et al.* (2009) reportan una baja frecuencia de alelos de resistencia debido a un buen control de los refugios.

En estimaciones hechas en E.U. de los alelos de resistencia en el gusano bellotero *H. virescens* a la exposición constante de la toxina Cry1Ac que expresa el algodón Bt, no se reportaron diferencias significativas a las estimaciones hechas en 1993, concluyendo no haber encontrado evidencia de que las poblaciones de *H. virescens* se hayan vuelto más resistentes a la toxina Cry1Ac (Blanco *et al.*, 2009).

Se describe el desarrollo de resistencia del gusano cogollero *S. frugiperda* al maíz Bt evento TC1507 que produce la toxina Cry1F en Puerto Rico (Storer *et al.*, 2010).

De recolectas hechas en la India de 2008-2010 de larvas de gusano rosado *P. gossypiella* en algodón Bt, se presentó la primera evidencia del desarrollo de resistencia en campo del gusano rosado a la toxina Cry1Ac del algodón Bollgard I, no se presentó resistencia cruzada a la toxina Cry2Ab2 del Bollgard II (Dhurua y Gujar, 2011).

Se realiza el primer reporte de desarrollo de resistencia en campo de un coleoptero, en la especie *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte (Coleoptera: Chrysomellidae) al maíz Bt con la toxina Cry3Bb1, principalmente debido a la falta de plantaciones insuficientes de refugios y a la herencia no recesiva de la resistencia (Gassmann *et al.*, 2011).

En China se reporta el desarrollo de resistencia del gusano bellotero del algodón *H. armigera* a la toxina Cry1Ac, aunque no se ha reportado la falta de control en campo (Zhang *et al.*, 2011)

Se publico el desarrollo de resistencia del gusano *S. frugiperda* (recolectados en 2013) al maíz Bt con la toxina Cry1Fa en Brasil con mas de 10 veces (10 X) los niveles de resistencia comparada con una susceptible. La poblacion de campo se mantuvo con alimento sin toxina Bt, manteniendo altos niveles de resistencia a la toxina por 8 generaciones, ademas mostro mayor resistencia cruzada a la toxina Cry1Aa, que a las toxinas Cry1Ab o a Cry1Ac (se insertan en el mismo sitio de unión), situación contraria con las toxinas Cry2A. Sin embargo, el refugio usado fue por debajo del recomendado (10%) o simplemente no se usó (Monnerat *et al.*, 2015).

2.8. - Características generales de *Bacillus thuringiensis*

2.8.1. - *Bacillus thuringiensis*

Es una bacteria del suelo Gram-positiva, aerobio estricto, flagelado, que mide de 3 a 5 µm de largo por 1 a 1,2 µm de ancho y presenta una distribución cosmopolita (Gordon *et al.*, 1973). Reino Eubacteria, Phylum Firmicutes, clase Bacilli, orden Bacillales, familia Bacillaceae, genero *Bacillus*, especie *thuringiensis*; nombre binomial *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1915 (NCBI, 2018), situado dentro del grupo

de Bacilos Gram positivos formadores de una endoespora, dentro de especies con flagelación peritica. *B. thuringiensis* está dentro del grupo I del género, que es donde se encuentran aquellas especies con endoesporas elipsoidal que no provocan hinchamiento del perfil bacilar. La principal diferencia de *B. thuringiensis* con respecto a otros bacilos relacionados, es la formación durante la fase de esporulación, de uno o más cuerpos cristalinos de naturaleza proteica adyacente a la espora, el cual presenta una gran diversidad de formas, dependiendo de la proteína que lo construya, encontrándose cristales bipiramidales, cúbicos, romboidales, esféricos, rectangulares, triangulares e irregulares, y con tamaños variados; además de presentar una naturaleza proteica y propiedades insecticidas altamente específica y de bajo impacto al medio ambiente (Hofte y Whiteley, 1989; Schnepf *et al.*, 1998; Joung y Cote, 2000; Iriarte y Caballero, 2001; Soberon y Bravo, 2008).

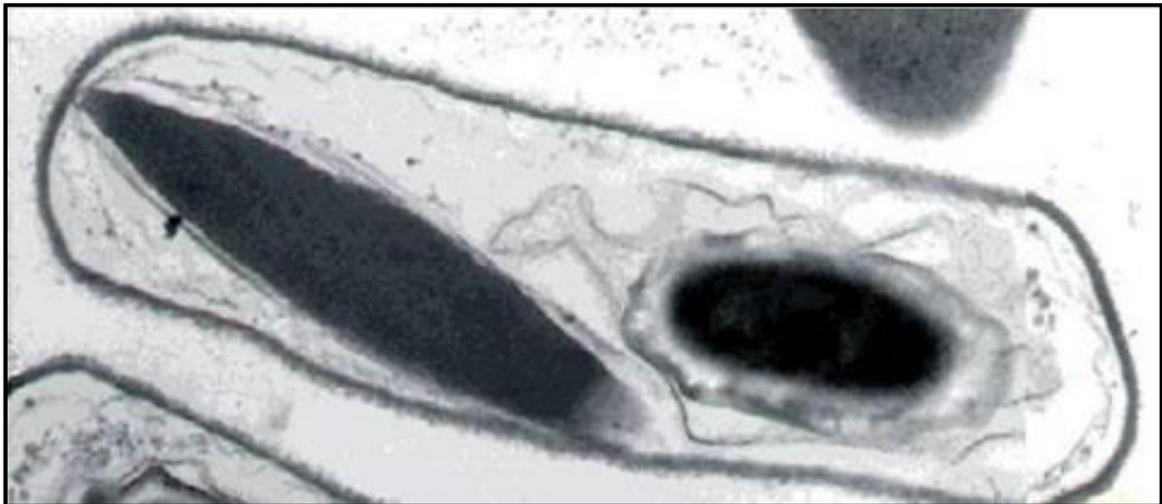


Figura 1.- *Bacillus thuringiensis*. Microfotografía en microscopio electrónico de transmisión, cristal proteínico romboide compuesto de toxinas Cry y una espora en proceso (Soberon y Bravo, 2008).

La bacteria *B. thuringiensis* es el entomopatógeno más conocido, estudiado y extensamente utilizado como agente de control microbiano con más del 90% del mercado en bioinsecticidas (Glare y O' Callaghan, 2000) y su importancia radica en la elaboración de la toxina cristal (Cry) que le da la característica insecticida. La definición de proteínas Cry es cualquier proteína paraesporal de Bt que presente algún efecto toxico hacia algún organismo, verificable experimentalmente por medio de bioensayos o cualquier proteína que muestre similitud con las proteínas Cry (Crickmore *et al.*, 1998; Soberon y Bravo, 2008).

La importancia de la delta endotoxina de *B. thuringiensis* radica en su selectividad toxica contra larvas de insectos plaga de los Órdenes Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Hymenoptera (hormigas), ácaros y también contra otros invertebrados como nematodos, gusanos planos y protozoarios (Soberon y Bravo 2008), importantes en la agricultura y la silvicultura. A raíz de su utilización como bioinsecticidas se realizó la clonación del gen Cry que codifica para proteínas insecticidas (Schnepf y Whiteley, 1981). Desde que ocurrió la primera clonación de un gen Cry se han aislado muchos otros genes, por lo cual se ha establecido una clasificación de las endotoxinas basada exclusivamente en la similitud de la secuencia primaria (aminoácidos), para indicar los grados de divergencia filogenética permitiendo que las toxinas estrechamente relacionadas se clasificaran en conjunto (Crickmore *et al.*, 1998), de acuerdo a la identidad y esta designada por letras y números después de la palabra Cry (cristal) de manera jerárquica ordenadas por filas, la primera fila designada por un número arábigo que corresponde hasta el 45 % de identidad (Cry1, Cry2, etc.), la segunda fila cataloga a las proteínas con una letra mayúscula y corresponde a identidades de 45-78% (Cry1A, Cry1B, etc.), la tercera fila asigna una letra minúscula y corresponde a identidades de 78 % a 95 % (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, etc.), la última fila incluye un número arábigo al final de la nomenclatura indicando más del 95 % de identidad (Cry1Aa1, Cry1Aa2, etc.) (Soberon y Bravo, 2008).

Los genes que especifican una familia de insecticidas relacionados con proteínas (Cry) se dividen en cuatro clases principales, clase I específicamente para Lepidoptera, clase II para Lepidoptera y Diptera, clase III específicamente Coleoptera y clase IV específicamente para Diptera, cada clase con sus respectivas propiedades insecticidas y estructurales (Joung y Cote, 2000).

2.9. - Modo de acción de *B. thuringiensis*

El mecanismo de acción de las proteínas Cry de *B. thuringiensis* se activan cuando las larvas susceptibles ingieren el complejo espora-cristal. La proteína cristalina es altamente insoluble en condiciones neutras y se solubiliza en el ambiente alcalino de PH alto (9.5) del mesenteron (intestino medio) del insecto, una vez disueltas las proteínas del cristal (pro toxinas) sufren proteólisis por enzimas proteasas presentes en el intestino del insecto, una vez solubilizada; la protoxina de 130 kDa se rompe para producir una toxina activa de 55-65 kDa resistente a la proteasa y que comprende la región N terminal. Esta es la toxina activada llamada endotoxina la cual adquiere una conformación tridimensional que le confiere gran especificidad para acoplarse a un componente glicoproteico de la membrana de las células epiteliales comúnmente llamado "receptor" (Gill *et al.* 1992 Escriche y Ferre, 2001;

citados por Ibarra 2007). La unión de la toxina Cry a los receptores (cadherina) del intestino medio tiene como resultado una oligomerización de la toxina (Rausell *et al.*, 2004) para posteriormente unirse al receptor aminopeptidasa y la inserción de la toxina en la membrana apical crea canales iónicos o poros líticos y propicia un desequilibrio de iones resultando en la pérdida de iones K^+ alterando la presión osmótica de las células epiteliales que revisten el intestino medio una vez que las toxinas se insertan en la membrana, seguidos de agua (Fig. 2), El exceso de agua en el citoplasma de las células epiteliales provoca una distensión excesiva de los organelos membranosos y de la propia célula en su totalidad, hasta que esta estalla (Hoffman y Frodsham, 1993; Knowles, 1994; Schnepf *et al.*, 1998; Joung y Cote, 2000; Kati *et al.*, 2007; Soberon y Bravo, 2008).

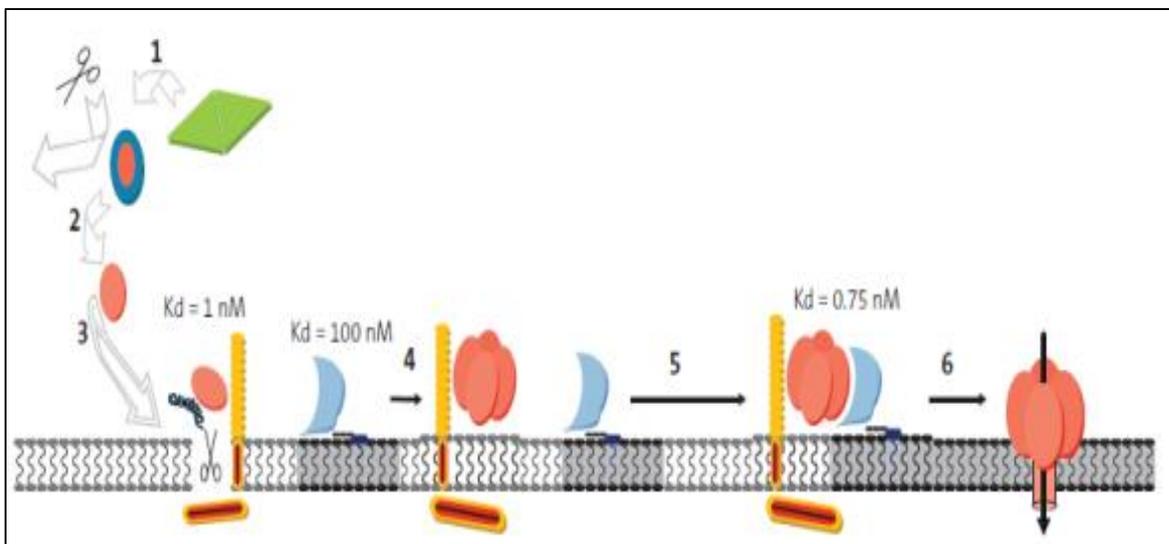


Figura 2.- Modo de Acción de las proteínas Cry. Esquema de los diferentes eventos en el modo de acción de las proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis*. 1. Solubilización, 2. Rompimiento de la protoxina, 3. Unión al receptor cadherina, 4. Formación de Pre-poro, 5. Unión receptor aminopeptidasa, 6. Inserción toxina (Soberon y Bravo, 2008).

Unas pocas células dañadas podrían ser reemplazadas rápidamente por otras nuevas sin que ocurran consecuencias fatales; sin embargo, cantidades suficientes de endotoxina normalmente destruyen amplias áreas del epitelio, las cuales se manifiestan en huecos por donde pasa el contenido altamente alcalino del mesenteron hacia la hemolinfa (que presenta un pH casi neutro) y la hemolinfa hacia el lumen del mesenteron. Estos dos fenómenos traen consigo dos consecuencias dañinas para el insecto. Por otro lado, el pH estomacal baja por compensación al aumentar el pH de la hemolinfa y la conducción nerviosa cesa. Esto implica que cesa la ingesta, el sistema digestivo se paraliza, parálisis total, diarrea, la larva se

vuelve flácida, las células epiteliales se lisan y se detiene el daño a la planta atacada y finalmente la larva muere por septicemia e inanición al cabo de unos días (Fig. 3) (Schnepf *et al.*, 1998; Soberon y Bravo, 2008).

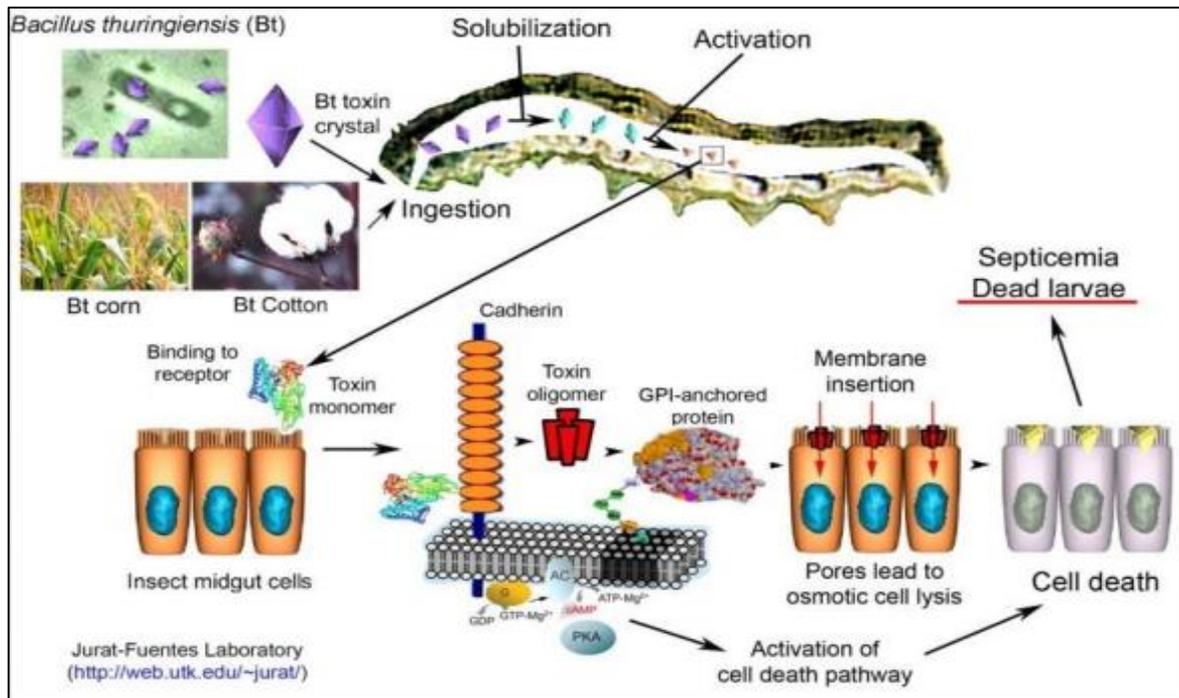


Figura 3.- Modo de Acción de la endotoxina de *Bacillus thuringiensis* (Jurat-Fuentes, 2015).

2.10. - Importancia de *Bacillus thuringiensis*

B. thuringiensis es el insecticida biológico más utilizado comercialmente y tradicionalmente se ha ocupado para el control de insectos plaga en la agricultura (Schnepf *et al.*, 1998; Soberon y Bravo, 2008). Una característica importante de las proteínas Cry producidas por *Bt* es que son altamente específicas hacia los insectos objetivo e inocuos a mamíferos, vertebrados, plantas e inclusive otros insectos benéficos (depredadores y parasitoides) y polinizadores como las abejas (Soberon y Bravo, 2008). Sin embargo, la supervivencia o persistencia de las endosporas y su patogenicidad entre los cultivos es afectada por factores abióticos como la radiación solar, la temperatura de las hojas y el déficit de presión de vapor (Leong *et al.*, 1980), además las esporas de *B. thuringiensis* pueden sobrevivir por algunos años, aunque la población y la toxicidad declina rápidamente se ha observado que la presencia y actividad se mantiene hasta por 3 años en suelos estériles, mientras que en suelos no estériles se pierde hasta el 50 % de actividad en los primeros 7

días (Schnepf *et al.*, 1998) y las endotoxinas pueden sobrevivir en la mayoría de los tipos de suelos, sin embargo en suelos con un PH de 4.8 estas no se desarrollan (Joung y Cote, 2000).

Es por estas características que se desarrollaron plantas transgénicas que producen toxinas Cry que le confieren resistencia al ataque de insectos plaga, sin mostrar toxicidad hacia otros integrantes del ecosistema, con el objetivo de que la planta una vez transformada con el gen de la toxina exprese cantidad constante de esta, que; comparada con la aplicación de plaguicidas y de productos derivados de *B. thuringiensis* no estaría sujeta a distintos condicionamientos como el momento de la aplicación, el lavado del producto por precipitación y la inactivación por exposición a la luz solar, otra ventaja está constituida por la presencia de proteínas Cry en partes de la planta donde los plaguicidas químicos y biológicos no son capaces de llegar, otorgando así un control más efectivo (Permingeat y Margarit, 2005).

2.11. - Situación de cultivos genéticamente modificados

A 22 años de comercialización de cultivos biotecnológicos, plantados por primera vez en 1996, los considerables beneficios económicos, ambientales y sociales que ofrece este tipo de cultivos, han llevado a millones de agricultores de todo el mundo a seguir aumentando la superficie agro biotecnológica, con una superficie acumulada histórica mundial que supera la cifra de 1.7 millones de hectáreas en 1996 a 189.8 millones de hectáreas en 2017, en un total de 67 países usaron cultivos modificados mediante la biotecnología, Esto incluye un total de 24 países que plantaron cultivos modificados mediante la biotecnología, de los cuales 19 son países en desarrollo y 5 son países industrializados, Además otros 43 países que no se dedican a la agricultura regularon formalmente la importación y el uso de cultivos modificados mediante la biotecnología destinados a alimentación, piensos para animales y procesamiento (ISAAA, 2018).

Para el 2017, un record de 189.8 millones de hectáreas de cultivos biotecnológicos fueron sembradas a nivel mundial, a una tasa anual de crecimiento de 3%, lo cual determina que los cultivos biotecnológicos son la tecnología de cultivo con adopción más rápida en tiempos recientes. La tasa impresionante de adopción habla por sí misma, en términos de sustentabilidad, resistencia de la adversidad y beneficios significativos que implica tanto para los pequeños y grandes agricultores como para los consumidores. En 2017, 11 países sembraron más de 1 millón de hectáreas con cultivos agro biotecnológicos, sobresaliendo Estados Unidos con 75.0 millones, seguido de Brasil, Argentina, Canadá, India, Paraguay, Pakistán, China, Sudáfrica

y Bolivia; con cultivos como maíz, soya, algodón, canola, remolacha azucarera, alfalfa, papaya, calabaza, papa, tomate, álamo y pimiento, sobre el resto de naciones que sembraron una superficie menor (James, 2014; ISAAA, 2018).

En términos del área destinada a cultivos individuales en todo el mundo para 2017, el 77% corresponde a la soya, el 80% al algodón, el 32% al maíz y el 30% a la canola.

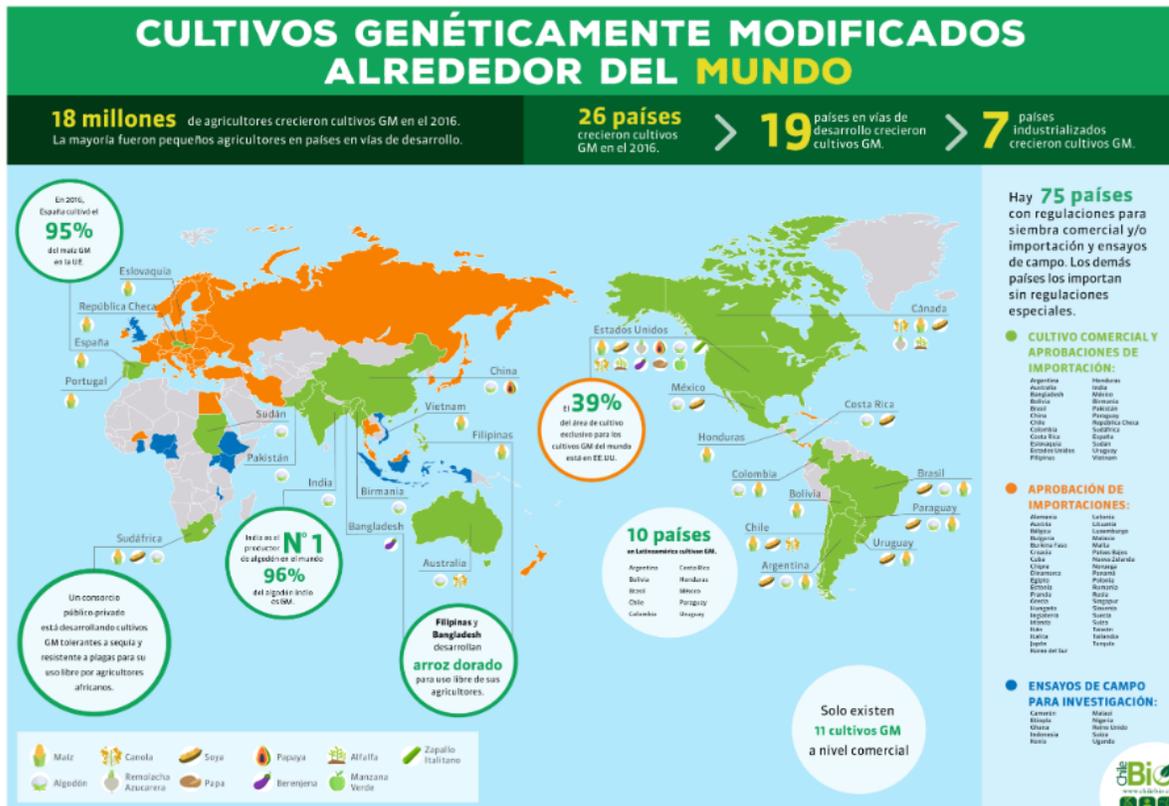


Figura 4.- Cultivos Genéticamente Modificados. Clasificación de cultivos genéticamente modificados en el mundo (ISAAA, 2016).

México en superficie cultivada con cultivos agro biotecnológicos se encuentra en la posición 17 con dos cultivos genéticamente modificados introducidos en fase comercial: soya y algodón tolerante a herbicida y algodón *Bt* resistente a insectos; con aproximadamente 0.1 millones de hectáreas (ISAAA, 2018).

En la actualidad el maíz es el cultivo con mayor adopción. Este cereal cuenta con el número de eventos GM aprobados para su siembra y/o experimentación, con 231 eventos; de estos la característica de resistencia a herbicidas es la que tiene mayor número de eventos con 120, además cuenta con 4 eventos para tolerancia al estrés abiótico, 12 eventos para modificación de la calidad (características agronómicas), 6 eventos con la característica de sistema de control de polinización, 1 evento para

crecimiento alterado/rendimiento y 115 eventos presentan la característica de resistencia a insectos (ISAAA, 2015).

Para resistencia a insectos, hasta el 2014, en el mundo se tiene un registro de 198 eventos distintos con proteínas de *Bacillus thuringiensis*, en 8 cultivos de importancia; destacando el maíz con el mayor número de eventos con 231, seguido de algodón (42), papa (30), soya (4), arroz (3), álamo (2), berenjena y tomate con 1 evento *Bt* cada uno (ISAAA, 2015).

En México, de 2009-2014, se han aprobado para su prueba experimental, piloto y/o comercial, según sea el caso 158 eventos en 9 cultivos diferentes; sobresaliendo el maíz con 68 eventos, seguidos del algodón con 30, soya con 22, canola y papa con 13 eventos cada uno, tomate con 5, arroz y remolacha azucarera con 1 evento cada uno (ISAAA, 2015).

Con respecto al maíz, su homólogo transgénico para tolerancia a herbicidas y resistencia a insectos ha sido motivo de gran debate. En nuestro país, en 2009 se realizó con éxito los primeros ensayos en campo con maíz *Bt*, tras una moratoria que impedía realizar ensayos en campo con maíz biotecnológico, los cuales demostraron la eficacia de la biotecnología para el control de plagas de insectos y malezas, con resultados coherentes con la experiencia internacional de comercialización de maíz biotecnológico en el mundo (James, 2010; Piña y Solleiro, 2013). No obstante, en México, el maíz GM se sembró hasta el 2013 en etapa de experimentación y/o piloto con 68 eventos; de los cuales 55 comparten la característica de resistencia a insectos, 45 para resistencia a lepidópteros y 33 con resistencia a coleópteros (ISAAA, 2015).

2.12. - Algodón Genéticamente Modificado

En México, aunque no se ha aprobado ningún cultivo, se han introducido en programa piloto y en fase comercial solo dos tipos de cultivos genéticamente modificados, con cantidades representativas a nivel mundial de aproximadamente 0.1 millón de hectáreas, una es la soya tolerante a herbicidas y el otro es el algodón tolerante a herbicida y algodón *Bt* resistente a insectos (James, 2010), este último cultivado en un 70% del total en el país (ISSA, 2018).

En México este cultivo que expresa la toxina Cry de *B. thuringiensis*, ha ofrecido un excelente control de importantes insectos que limitan la productividad como el complejo bellotero *H. virescens* y *H. zea* y gusano rosado *P. gossypiella* contribuyendo a alcanzar niveles de competitividad que demandan los mercados internacionales, al tiempo en que se evita la aplicación al ambiente de cantidades

considerables de plaguicidas (www.monsanto.com). Sin embargo, debido al rebrote de estas plagas en el algodón Bollgard, se requiere de la aplicación de insecticidas foliares para mantener estas poblaciones por debajo del nivel de daño económico (Hood 1997, Smith 1997; tomados de Adamczyk *et al.*, 2008); por lo que los avances en el control de plagas con la tecnología transgénica ofrece una opción más eficaz contra muchos lepidópteros plaga, variedades de algodón que contiene las proteínas Cry1Ac y Cry2Ab (Bollgard II) que aumenta el nivel y espectro de control y reducen la probabilidad de desarrollo de resistencia en los insectos blanco, como gusano de la hoja del algodonoero *Alabama argillacea* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), gusanos del complejo bellotero (*H. virescens* y *H. zea*), gusano rosado (*P. gossypiella*) y gusano rosado colombiano *Sacadodes pyralis* Dyar (Lepidoptera: Noctuidae). Además, ofrece alguna protección contra el falso medidor *T. ni* y perforador de la hoja *Bucculatrix sp. Zeller* (Lepidoptera: Bucculatricidae) y control parcial de gusano soldado *Spodoptera exigua* (Hübner) y *Spodoptera ornithogalli* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae), gusano cogollero *S. frugiperda* y gusano defoliador de la hoja *Chrysodeixis includens* Walker (= *Pseudoplusia includens*) (Lepidoptera: Noctuidae) (www.monsanto.com). Sin embargo, la problemática a esta medida es debido a que los cultivos Bt que producen la proteína Cry en todos sus tejidos, difiere en los niveles de expresión a lo largo de su ciclo de crecimiento. Es decir, que los cultivos Bt presentan su máxima expresión durante los primeros treinta días después de la siembra en las hojas terminales y durante la floración del cultivo, para después disminuir significativamente sus niveles de expresión; cuando los tejidos de la planta envejecen, la proteína Cry también se degrada rápidamente, calculada esa degradación, aunque varía para cada cultivo y para cada condición ambiental, desde el 50 a 88 % (Ibarra y Del Rincón s/f.; Oslén *et al.*, 2005, tomado de Zenner de polania *et al.*, 2008).

2.13. - Genes codificantes de proteínas insecticidas Cry

Existen 376 genes Cry distintos que se clasificaron en la base de la similitud de secuencias en 54 grupos divididos en diferentes clases y subclases (Crickmore *et al.*, 1998). Los genes Cry poseen una secuencia codificante de 1900 pares de bases para (Cry2Ab) y 3600 pares de bases para (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac) (Crickmore *et al.*, 1998). Las proteínas que codifican presentan identidad aminoacídica que varía desde más de un 90% hasta menos de un 20%, y el intervalo de masas moleculares oscila de 50 y 140 kDa. Las cepas de *B. thuringiensis* aportan un gen Cry, como ejemplo *B. thuringiensis* svar. Kurstaki HD-73, que posee un gen Cry1Ac (Gómez *et al.*, 2002).

2.14. - Genes Cry que codifican proteínas tóxicas para insectos lepidópteros

2.14.1. - Genes Cry1

Codifica proteínas de aproximadamente 130 kDa y se agrupan durante la esporulación en inclusiones cristalinas bipiramidales. Estas proteínas son sintetizadas como protoxinas que se solubilizan en condiciones alcalinas del intestino medio del insecto y se activan por proteólisis en toxinas aproximadamente a 65 kDa mediante proteasas asociadas al cristal o al intestino medio de la larva utilizando una gran variedad de proteasas (Whiteley *et al.*, 1986).

Los genes Cry que se conocen pertenecen al grupo Cry1, estos son los más estudiados, de los cuales se han detectado 150 genes Cry1 distintos, los que han sido clasificados en 12 clases (A-L) (Crickmore *et al.*, 2008). Estos genes fueron los primeros en ser caracterizados (Schnepf *et al.*, 1985) y ser modificados genéticamente (Nakamura *et al.*, 1990).

2.14.2. - Genes Cry2

Poseen marcos de lectura abiertos de 1900 pares de bases, ya que carecen del fragmento C-terminal presente en otros genes Cry. Codifican proteínas de 65 kDa que se agrupan en inclusiones cuboidales (Crickmore, 2008).

Los genes Cry2 están presentes en cepas de distintos serovares: *B. thuringiensis* svar. Kurstaki HD-1, *B. thuringiensis* svar. *Thuringiensis* Berliner, *B. thuringiensis* svar. Kenyae, *B. thuringiensis* svar. *tolworthi*. Las proteínas codificadas por estos genes fueron designadas como proteínas P2, en oposición a las inclusiones cristalinas P1 de 130 kDa presentes en las mismas cepas (Höfte *et al.*, 1989). Existen descritos 43 genes Cry2 distintos clasificados en solo una clase (A) (Crickmore *et al.*, 2008).

2.14.3. - Genes Cry9

Son los menos estudiados entre los que codifican proteínas tóxicas para lepidópteros, son considerados herramientas promisorias para el control y el manejo de resistencia de varias especies de lepidópteros que son importantes desde el punto de vista agronómico (Jansens *et al.*, 1997). Existen 15 genes Cry9 distintos clasificados en 5 clases (A, B, C, D Y E) (Crickmore *et al.*, 2008) que codifican protoxinas de 130 kDa. Estas proteínas producidas por los genes de las clases Cry9A, Cry9B, Cry9C y Cry9E se agruparían en inclusiones cristalinas

bipiramidales, las inclusiones bipiramidales y cuboidales típicas de cepas de *B. thuringiensis* tóxicas para lepidópteros (Wasano *et al.*, 2001). La subclase Cry9Aa fue el primer gen de este grupo en ser descubierto a partir de una cepa de *B. thuringiensis* (Smulevitch *et al.*, 1991) seguido del gen Cry9Ba y Cry9Aa (Shevelev *et al.*, 1993).

2.14.4. - Genes Cry15

Está formado por un solo integrante, el gen15Aa (Crickmore *et al.*, 2008). Codifica a una protoxina de aproximadamente 40 kDa que se agrupa en una inclusión cristalina cuboidal, la cual resulta tóxica para *M. sexta* (Brown *et al.*, 1992).

2.15. - Toxina Cry

Las toxinas Cry de *B. thuringiensis* son producidas durante la esporulación y tienen actividad insecticida, por lo que son ampliamente utilizadas como alternativa a los insecticidas químicos, ya que son inocuas al ambiente. Formulados a base de Bt se han utilizado como insecticidas durante muchos años. Sin embargo, no fue sino hasta que se logró introducir genes Cry en plantas de algodón (1996) y maíz (1997) que el uso intensivo de esta tecnología se expandió mundialmente (Kumar, 2008).

2.16. - Proteínas Cry y Vip tóxicas para insectos lepidópteros

Las proteínas de la clase Cry1 y las Vip son consideradas tóxicas para las larvas del orden Lepidoptera. Las diferencias aminoácidas que presentan se traducen comúnmente en variaciones de toxicidad y especificidad (Bhalla y Tounsi, 2005). Las proteínas Cry y Vip muestran espectros de actividad reducidos y muchas veces a unas cuantas especies de insectos pertenecientes a un mismo orden, la toxicidad de las proteínas Cry1 no se restringen solo a los lepidópteros.

Cuadro 1. Toxicidad de proteínas Cry y Vip para insectos del Orden Lepidoptera.

Familia	Especie susceptible	Proteínas tóxicas
Arctiidae	<i>Hyphantria cunea</i> <i>Spilosoma virginica</i>	Cry1Aa Cry1Ac
Bombycidae	<i>Bombyx mori</i>	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Da, Cry1Db, Cry1Ea, Cry1Fa, Cry1Ia, Cry2Aa, Cry9Ca, Cry9Ec, Vip3Aa.
Crambidae	<i>Diatraea grandiosella</i> <i>Diatraea saccharalis</i> <i>Marasmia patnalis</i>	Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ca. Cry1Aa, Cry1Ab. Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa.

Nymphalidae: Danainae	<i>Danaus plexippus</i>	Cry1Ab, Cry1Ac, Cry9Ca.
Gelechiidae	<i>Pectinophora gossypiella</i>	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Bb, CryCa, Cry1Da, Cry1Ja, Cry2Aa, Cry2Ab, Cry9Ca.
	<i>Phthorimaea operculella</i>	Cry1Ac, Cry2Aa, Cry9Aa, Vip3Aa.
	<i>Tecia solanivora</i>	Cry1Ac.
Geometridae	<i>Lambida fiscellaria</i>	Cry1Da.
Gracillariidae	<i>Conopomorpha cramerella</i>	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ba, Cry1Ca, Cry1Cb, Cry1Dd, Cry1Ea, Cry1Fa, Cry1Ia.
Hepialidae	<i>Wiseana cervinata</i>	Cry1Ba
	<i>Wiseana copularis</i>	Cry1Ba
	<i>Wiseana jocosa</i>	Cry1Ba
Lasiocampidae	<i>Malacosoma disstria</i>	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ba, Cry1Ca, Cry1Da, Cry1Ea.
Lycaenidae	<i>Cacyreus marshalli</i>	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ba, Cry1Ca, Cry1Da, Cry1Ea, Cry1Fa, Cry1Ja, Cry2Aa, Cry9Ca.
Lymantriidae	<i>Lymantria dispar</i>	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ba, Cry1Bb, Cry1Ca, Cry1Da, Cry1Ja, Cry2Aa, Cry2Ab.
	<i>Orgyia leucostigma</i>	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ca, Cry1Da.
Noctuidae	<i>Actebia fennica</i>	Cry2Aa.
	<i>Agrotis ipsion</i>	Cry1Gc, Cry1Jc, Cry9Ca, Vip3Aa.
	<i>Agrotis segetum</i>	Cry1Ac, Cry9Ca.
	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Cry1Ac, Cry2Aa.
	<i>Busseola fusca</i>	Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa.
	<i>Earias vitella</i>	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Vip3Aa.
	<i>Helicoverpa armígera</i>	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Fa, Cry1Ia, Cry2Aa, Cry2Ab, Cry2Ac, Cry9Aa.
	<i>Helicoverpa punctigera</i>	Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Fa, Cry2Aa, Cry2Ab, Cry9Aa.
	<i>Helicoverpa zea</i>	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Be, Cry1If, Cry1Ja, Cry1Jc, Cry2Aa, Cry2Ab, Cry2Ae, Cry9Aa, Vip3Aa, Vip3Ac.
	<i>Heliiothis virescens</i>	
	<i>Mamestra brassicae</i>	

	<i>Mamestra configurata</i>	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac,
	<i>Pseudoplusia includens</i>	Cry1Ae, Cry1Be, Cry1Ca, Cry1Fa, Cry1If, Cry1Ja, Cry1Jc, Cry2Aa, Cry2Ab, Cry2Ac, Cry2Ae, Cry9A, Cry9Ca, Vip3Aa.
	<i>Rachiplusia un</i>	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry9Ca.
	<i>Sesamia calamistis</i>	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry9Ca.
	<i>Sesamia nonagrioides</i>	Cry1Ab.
	<i>Spodoptera exempta</i>	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ba, Cry1Bb, Cry1Jb, Cry2Aa.
	<i>Spodoptera exigua</i>	Cry1Ac.
	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa. CryAa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ba, Cry1Ca, Cry1Da, Cry1Fa, Cry2Aa.
	<i>Spodoptera littoralis</i>	Cry1Ca, Cry1Ea.
	<i>Spodoptera litura</i>	Cry1Ab, Cry1Ad, Cry1Be, Cry1Ca, Cry1Da, Cry1Fa, Cry1If, Cry1Ja, Cry2Ac, Cry9Ca, Vip3Aa.
	<i>Trichoplusia ni</i>	Cry1Bb, Cry1Be, Cry1Ca, Cry1Da, Cry1Fa, Cry1Ja, Cry2Aa, Vip3Aa, Vip3Ac. Cry1Ca, Cry1Ea, Cry1Fa, Cry9Ca. Cry1Db, Cry1Ia, Cry2Aa, Vip3Aa. Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ad, Cry1Ae, Cry1Ba, Cry1Bb, Cry1Bd, Cry1Be, Cry1Bf, Cry1Ca, Cry1Cb, Cry1Ea, Cry1Eb, Cry1Fa, Cry1Gc, Cry1If, Cry1Jb, Cry2Aa, Cry2Ab, Cry2Ac, Cry2Ae, Cry9Aa, Cry9Ca. Cry1Ba, Cry1Ia, Cry1Ka. Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ba, Cry1Ca, Cry2Ab. Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ad, Cry1Ba, Cry1Bb, Cry1Bd, Cry1Be, Cry1Bf, Cry1Ca, Cry1Da, Cry1Ea, Cry1Eb, Cry1Fa, Cry1Gb, Cry1Gc, Cry1Ia, Cry1Ib, Cry1Id, Cry1Ie, Cry1If,
Pieridae	<i>Artogeia rapae</i>	
	<i>Pieris brassicae</i>	
Plutellidae	<i>Plutella xylostella</i>	

		Cry1Ja, Cry1Jc, Cry9Aa, Cry9Ca, Cry9Ec, Vip3Aa. Vip3Aa.
Pyralidae	<i>Chilo partellus</i>	
	<i>Chilo suppressalis</i>	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ba, Cry1Ca, Cry2Aa, Cry9Ca.
	<i>Cnaphalocrocis medinalis</i>	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa.
	<i>Elasmopalpus lignosellus</i>	Cry2Aa.
	<i>Eldana sacarina</i>	Cry2Aa.
	<i>Ephestia kuehniella</i>	Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa.
	<i>Galleria mellonella</i>	Cry1Ac, Cry2Aa, Vip3Aa.
	<i>Maruca vitrata</i>	Cry9Aa.
	<i>Piodia interpunctella</i>	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ca, Cry2Aa.
	<i>Ostrinia fumacalis</i>	Cry1Ab, Cry1Ca, Cry2Aa, Cry9Ec.
	<i>Ostrinia nubitalis</i>	Cry1e.
		Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ba, Cry1Bb, Cry1Be, Cry1Bf, Cry1Fa, Cry1Gc, Cry1Ja, Cry1Jb, Cry1Jc, Cry2Aa, Cry2Ab, Cry2Ac, Cry2Ae, Cry9Aa, Cry9Ca.
	<i>Sciropophaga incertulas</i>	Cry1Aa, Cry1Ac, Cry1Ca, Cry2Aa.
	<i>Tryporyza incertulas</i>	Cry2Aa.
Sphingidae	<i>Manduca sexta</i>	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ba, Cry1Ca, Cry1Da, Cry1Ea, Cry2Aa, Cry2Ab, Cry2Ac, Cry9Ca, Cry15Aa, Vip3Aa.
Thaumetopoeidae	<i>Thaumetopoea pityocampa</i>	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ba.
	<i>Argyrotaenia citrana</i>	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ad, Cry1Ca, Cry1Ea, Cry1Eb, Cry1Fa.
Tortricidae	<i>Choristoneura fumiferana</i>	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ad, Cry1Ba, Cry1Ca, Cry1Da, CryEa, Cry1Fa, Cry9Ca.
	<i>Choristoneura rosaceana</i>	Cry9Ca.
	<i>Choristoneura Occidentalis</i>	CryAa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ad, Cry1Ca, Cry1Ea,
	<i>Choristoneura pinus pinus</i>	Cry1Eb, Cry1Fa.
	<i>Ctenopsuestis obliquana</i>	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ad, Cry1Ca, Cry1Ea, Cry1Fa.
	<i>Cydia pomonella</i>	Cry1Fa.

<i>Epinotia aporema</i>	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac. Cry1Ac, Cry9Aa.
<i>Ephiphyas postvitta</i>	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ba, Cry1Da, Cry1Fa, Cry1Ia, Cry2Aa, Cry15Aa.
<i>Leguminivora glycinivorella</i>	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ba, Cry1Ca, Cry9Ca.
<i>Pandemis pyrusana</i>	Cry1Ac, Cry9Aa.
<i>Planotortrix octo</i>	Cry1Ie
<i>Platynota stultana</i>	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ad, Cry1Ca, Cry1Ea, Cry1Eb, Cry1Fa. Cry1Ac, Cry9Aa. Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ad, Cry1Ca, Cry1Ea, Cry1Eb, Cry1Fa.

2.17. - Gusano cogollero *Spodoptera frugiperda*

2.17.1. – Generalidades

El Orden Lepidoptera incluye palomillas que causan gran daño a varios cultivos a nivel mundial; algunas de estas son las palomillas de los cereales, barrenadores, gusano elotero, gusano cortador, gusanos soldados y gusano cogollero. Este último, es la plaga de mayor importancia económica en muchos cultivos de nuestro país, pero muestra mayor preferencia por el cultivo de maíz. El “gusano cogollero del maíz” o simplemente *S. frugiperda*, actúa como gusano tierrero, trozador o gusano soldado, elotero y como cogollero que es su hábito más característico (Negrete, 2003).

Las palomillas de color café grisáceo con dibujos más oscuros, ovipositan masas de huevecillos cubiertas por pelos en las hojas. De ahí emergen unas pequeñas larvas grises de cabeza negra que se alimentan en grupo de una hoja y, a medida que crecen se devoran entre sí hasta que solo queda una, son de color café claro con líneas longitudinales café oscuro o casi negro que, con el maíz ya más desarrollado, se refugia en el cogollo, en cuyo interior se alimenta haciendo grandes perjuicios, hasta que la planta alcanza un metro de altura, y en ocasiones ataca también las espigas y las partes tiernas del elote. Sin embargo, el daño más grave por esta plaga, lo resienten las plantas pequeñas que a veces son afectadas en su totalidad. Muchas de ellas mueren o retrasan su crecimiento. La producción de grano disminuye entre 10 y 100%, ya que en ocasiones se pierde todo el cultivo cuando las plantitas mueren (BAYERCROPS SCIENCE, 2010).

2.18. - Clasificación Taxonómica

De acuerdo a Triplehorn y Johnson (2005) se presenta la siguiente ubicación taxonómica para el gusano cogollero.

Reino: Animalia

Phylum: Artrópoda

Clase: Hexápoda

División: Pterigota

Orden: Lepidóptera

Suborden: Frenatae

Superfamilia: Noctuidea

Familia: Noctuidae

Subfamilia: Amphipyirinae

Tribu: Prodeniini

Género: *Spodoptera*

Especie: *frugiperda* (J. E. Smith).

2.19. - Biología y Descripción Taxonómica

Spodoptera frugiperda presenta metamorfosis completa, presentando masas de huevos muy amplificadas, la fase inmadura (larvas) es la que causa el mayor daño, pupa o crisálida y adulto (Ortega, 1987; Montes *et al.*, 2001).

2.19.1. – Huevo

Las hembras ovipositan varias masas de huevos generalmente en el envés de las hojas variando considerablemente, con un máximo de 1550 a 2000 huevos, pero a menudo de 100 a 200 por masa, son esféricos, de color verdoso o pardo, y las masas son cubiertas con las escamas de la palomilla (Capinera, 1999). El huevo

presenta en el exocorion depresiones superficiales, en tanto que el endecorion es liso (Bahena, 1998). Mide 0.45 mm de diámetro por 0.35 mm de alto, son casi blancos con un tinte verdoso y su incubación dura de 4 a 5 días (Peterson, 1962).

2.19.2. – Larva

Las larvas emergen de los huevos todas juntas; para inicialmente alimentarse del corion del huevo; su tasa de mortalidad es en extremo elevada debido a factores como la lluvia, depredadores y parásitos o parasitoides. En estudios realizados para la caracterización de estadios larvales reportan que *S. frugiperda* presenta cinco a seis estadios larvales determinados por diferentes rangos del ancho de la región cefálica (Rodríguez y De León, 2008). Al salir del huevo tienen hábitos gregarios y se alimentan de un área foliar muy reducida; a los pocos días se dispersan a las plantas vecinas en las que se establecen en el cogollo. Durante los 2 primeros estadios los inmaduros son de color verde amarillento con la cabeza oscura. Tiene hábitos canibalísticos, por lo que a partir del tercer estadio larval rara vez se observa más de una larva por cogollo. Las larvas grandes llegan a medir de 3-4.5 cm de largo por 30 mm de ancho (S.A.R.H. 1992, Crumb, 1956; citados por corona, 2008).

Los últimos estadios son de color café oscuro grisáceos o verdoso con 3 bandas longitudinales en el cuerpo y presentan en la cabeza, áreas frontales de color blanco-amarillo, en forma de “Y” invertida. Los segmentos abdominales son de igual ancho hasta el 8° segmento, después se hacen más angostos, vista de forma dorsal, en el octavo segmento abdominal, presenta cuatro puntos negros en forma de cuadro que corresponden a los pináculos setigeros dorsales, prominentes y carecen de micro espinas, el color general varía de rosado a amarillo, oliváceo y gris o casi negro (Frederick, 2005; Bautista, 2006). El dorso es más pálido que el área supraespiracular, la cual posee cintas y adornos castaños o negruzcos; la línea medio-dorsal es ancha, algo tenue, pero firmemente definida. Posee una línea fuerte amarillenta ventralmente al tubérculo setigero II, el área supraespiracular es más oscura dorsalmente, particularmente en una mancha negra marginal anterior en los segmentos abdominales. Espiráculos pálidos en una mancha blanquecina. Una banda subventral bien definida, ancha amarilla o blanquecina, más o menos moteado con ferrugineo. Tubérculos setigeros grandes, casi planos, oscuros. El escudo cervical es castaño-oscuro cortado por una línea media y dos líneas medias claras laterales (Bautista 2006; Crumb, 1956 citado por corona 2008).

2.19.3. – Pupa

La pupación ocurre en el suelo y dura aproximadamente 7 días, siendo las pupas de color café claro a café rojizo o marrón a medida que maduran, más o menos de 1.8 cm de largo, adelgazándose bruscamente hacia la parte posterior y ensanchándose en el extremo de la cabeza, permaneciendo así, para posteriormente emerger los adultos (Metcalf y Flint, 1965). La pupa es de tipo obtecta, desnuda, de 15 mm de largo y 5 mm en su parte más ancha. Tegumento totalmente liso. El ápice de las pterotecas llega a alcanzar el tercio del cuarto segmento abdominal; ápice de la espirotroma un poco antes del término de las pterotecas, quedando un trecho en el cual se logran distinguir parte de las ceratotecas meso torácicas; ápice de las ceratotecas y podototecas meso torácicas ubicados un poco antes de la espirotroma. Los espiráculos van en el ápice de una proyección del segmento que se recurva hacia el extremo posterior, se encuentran desde el II a VII segmento abdominal, el VIII es apenas visible. Borde anterior de IV al VII segmento abdominal con sencillas circulares; borde posterior del IV segmento abdominal con una serie de estrías transversas paralelas. Hembras con los segmentos (X-XI) y VII en contacto; cremaster formado por dos espinas rectas y delgadas (Metcalf y Flint, 1965).

2.19.4. – Adulto

El adulto es una palomilla que tiene aproximadamente 3-3.5 cm de expansión alar, de color café grisáceo con una mancha clara en medio de las alas anteriores (Rodríguez y De León, 2008). En el macho, el área costal de las alas anteriores son de coloración pálida, con una mancha elíptica blanquecina cerca del centro y a un lado de esta, una franja diagonal clara dirigida del margen costal al centro del ala, además de una pequeña mancha blanquecina en el margen apical. La cabeza y tórax son de color amarillo u ocre; el abdomen presenta zonas oscuras y en la parte posterior un penacho o cresta anal (Bahena, 1998, Frederick, 2005; Bautista, 2006). La hembra presenta una mancha elíptica en el margen costal delimitado por una línea clara de color gris, más oscura que el macho, además de carecer de cresta anal y de las manchas blanquecinas (Bahena, 1998). Las hembras ovipositan masas de 40-300 huevecillos, generalmente en el envés de las hojas y ocasionalmente en el haz; al ser ovipositados son cubiertos por pelillos o escamas de la misma palomilla. Se ha observado también que los huevos pueden ser colocados en malezas del cultivo (Corona, 2008).

2.20. - Origen y Distribución

El gusano cogollero, es un insecto nativo de las regiones tropicales y subtropicales del continente americano, en su etapa de larva puede causar un daño significativo a los cultivos si no se controla de forma adecuada, prefiere el maíz, pero puede alimentarse de más de 80 especies de plantas incluyendo el arroz, el sorgo, el mijo, la caña de azúcar, algunos cultivos de vegetales y algodón (Casmuz *et al.*, 2010).

El gusano cogollero se detectó por primera vez en África Central y Occidental a principios del 2016 y se ha extendido rápidamente en toda África Subsahariana, a principios del 2018, todos excepto diez (sobre todo el norte del continente de los países y territorios africanos han señalado infestaciones, y la plaga ha afectado millones de hectáreas de maíz y sorgo. En México, su distribución es muy amplia, estando presente en todas las zonas productoras de maíz. Su presencia y daños han sido consignadas en las siguientes entidades: Michoacán, Guerrero, Morelos, Veracruz, Oaxaca, Quintana Roo, Yucatán, Baja California Sur, Sonora, Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Chihuahua, Durango, San Luis Potosí, Guanajuato, Tamaulipas, Hidalgo, Puebla, México, Chiapas y Campeche (S.A.R.H., 1992).

2.21. – Importancia

S. frugiperda presenta masas de huevecillos muy amplificadas (Ortega, 1987). La fase inmadura (larva) es la que causa mayor daño (Montes *et al.*, 2001). Los daños más serios corresponden a zonas temporales de regiones tropicales y subtropicales (S.A.R.H., 1992). Además de que tiene una amplia cantidad de hospederos, destacándose principalmente el maíz (Angulo *et al.*, 2006). El gusano cogollero es considerado como una de las plagas más importantes del maíz en las regiones tropicales y subtropicales de América por su voracidad y daños ocasionados al cultivo. En diversas entidades del país se han registrado pérdidas causadas por este insecto que va desde 13 hasta 60%. Los daños más serios corresponden a las zonas temporales de regiones tropicales y subtropicales. Además de maíz este insecto puede afectar otras gramíneas como sorgo, arroz, pastos, algunas leguminosas como frijol, soya, cacahuete y cultivos hortícolas como papa, cebolla, pepino, col, y camote (García *et al.*, 1999; Notz, 1973; citado por Jiménez, 2011).

Daños. Los gusanos se localizan en el cogollo de las plantas, en donde se alimentan de las hojas en formación y las cuales al desarrollarse quedan perforadas y rasgadas; el ataque temprano causa muerte de plántulas o el retraso en el desarrollo de la planta (Rodríguez y De León, 2008).

3- MATERIALES Y METODOS

Localización de recolecta de *Spodoptera frugiperda*

Línea de campo. La presente investigación se inició en el cultivo de maíz convencional, aledaño al cultivo de algodón genéticamente modificado, en el estado de Coahuila, recolectando larvas de diferentes estadios principalmente de tercero, en dos localidades bajo los siguientes datos:

Ubicación: González Chávez, Francisco I. Madero, Coahuila, Carretera San Pedro-Torreón.

Posición geográfica: Altitud 1092 msnm, Latitud: 25°45.650' N; Longitud: 103° 16.470' O.

Cultivo hospedero: Follaje de maíz blanco, en etapa V5 (cinco hojas completamente desarrolladas).

Tiempo de sembrado el cultivo hospedero: 2 meses

Distancia a cultivo GM: Algodón a 4 km de distancia.

Especie: Gusano cogollero *Spodoptera frugiperda*

Conservación: Alcohol al 70% (-20°C)

Número de muestras procesadas: 25

Fecha de recolecta: 12 de mayo de 2018.

Ubicación: San Miguel, Matamoros, Coahuila, Carretera Matamoros-Torreón.

Posición geográfica: Altitud 1114 msnm, Latitud: 25°32.865' N; Longitud: 103° 17.403' O.

Cultivo hospedero: Follaje de maíz amarillo, en etapa de panojamiento (hojas con madurez fisiológica, pero sin entrar a Rendimiento-R1).

Tiempo de sembrado el cultivo hospedero: Se desconoce

Distancia a cultivo GM: No se encontró algodón cercano para ese año.

Especie: Gusano cogollero *Spodoptera frugiperda*

Conservación: Alcohol al 70% (-20°C)

Número de muestras procesadas: 25

Fecha de recolecta: 12 de mayo de 2018.

Línea susceptible. Como susceptibles se procesaron 25 larvas de tercer estadio de *S. frugiperda* obtenidas de diferentes estados del país:

Ubicación: La vega, Barranca de Santa Clara, Zacoalco de Torres, Jalisco.

Posición geográfica:

Cultivo hospedero: Follaje de maíz blanco, en etapa V3-V4.

Tiempo de sembrado el cultivo hospedero: 22 días aproximadamente

Distancia a cultivo GM: Sin presencia de cultivos GM.
Especie: Gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (F1).
Conservación: Alcohol al 70% (-20°C)
Número de muestras procesadas: 06
Fecha de recolecta: 20 de julio de 2018
Observaciones: Estas larvas fueron obtenidas del cultivo de maíz y se desarrollaron como línea de laboratorio en el Departamento de Parasitología, bajo condiciones controladas a 25 ± 5 °C, 55 ± 15 % humedad relativa y fotoperiodo 12:12 h luz: obscuridad, en el área de cámaras bioclimáticas.

Ubicación: Tumbadero del Águila, Temapache, Veracruz.
Posición geográfica: Altitud 40 msnm
Cultivo hospedero: Follaje de maíz blanco, en etapa V6 (sin espigar).
Tiempo de sembrado el cultivo hospedero: 40 días aproximadamente.
Distancia a cultivo GM: Sin presencia de cultivos GM.
Especie: Gusano cogollero *Spodoptera frugiperda*
Conservación: Alcohol al 70% (-20°C)
Número de muestras procesadas: 07
Fecha de recolecta: 02 de abril de 2018.

Ubicación: Tepalcingo, Morelos
Posición geográfica:
Cultivo hospedero: Follaje de maíz blanco.
Tiempo de sembrado el cultivo hospedero: Se desconoce
Distancia a cultivo GM: Sin presencia de cultivos GM
Especie: Gusano cogollero *Spodoptera frugiperda*
Conservación: Alcohol al 70% (-20°C).
Número de muestras procesadas: 04
Fecha de recolecta: 09 de febrero de 2018.

Ubicación: UAAAN, Buenavista, Saltillo, Coahuila.
Posición geográfica: Altitud 1610 msnm, Latitud: 25°21'13" N, Longitud: 101°01'56" O.
Cultivo hospedero: Follaje de maíz blanco, en etapa V6
Tiempo de sembrado el cultivo hospedero: Desconocido
Distancia a cultivo GM: Sin presencia de cultivos GM
Especie: Gusano Cogollero *Spodoptera frugiperda* (F2 y F5)
Conservación: Alcohol al 70% (-20°C)
Número de muestras procesadas: 08
Fecha de recolecta: 16 de septiembre de 2017 y 26 de diciembre de 2017 respectivamente.

Observaciones: Estas larvas fueron obtenidas del cultivo de maíz en el campo experimental “El Bajío” en la UAAAN y se desarrollaron como línea de laboratorio en el Departamento de Parasitología, bajo condiciones controladas a 25 ± 5 °C, 55 \pm 15 % humedad relativa y fotoperiodo 12:12 h luz: oscuridad, en el área de cámaras bioclimáticas.

Localización del lugar de procesamiento de *Spodoptera frugiperda*

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Parasitología Molecular del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) en Buenavista, Saltillo, Coahuila, México (25°21'13"N, 101°01'56"O, 1610 msnm).

Monitoreo de alelos del gen de resistencia a la toxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis*

Mediante el avance de la tecnología, se ha podido desarrollar nuevos métodos para determinar la manifestación de resistencia por parte de un organismo; para el caso de un organismo genéticamente modificado, la resistencia ha sido detectada por medio del ADN en poblaciones de campo que están asociados con la supervivencia en los cultivos Bt. Hasta hace algunos años, la detección basada en ADN no podía aplicarse para resistencia a *Bt*, porque la base genética de la resistencia era desconocida. Sin embargo, ahora hay pruebas de especies de lepidópteros, donde se reconoce que la resistencia a las toxinas Cry puede ser causado por mutaciones en un gen que codifica para cadherina, proteína expresada en el intestino medio de las larvas. Esta mutación proporciona la oportunidad de desarrollar y probar métodos de diagnóstico basados en el ADN de este gen (Gahan *et al.*, 2007).

Materiales y Reactivos

- 1- Buffer de extracción
- 2- Morteros y Pistilos
- 3- Cloroformo: Alcohol Isoamilico (24:1) (CEVAG)
- 4- Proteinaza
- 5- Isopropanol
- 6- Etanol 70%
- 7- Agua BID estilada
- 8- Agarosa
- 9- Tae 1x
- 10- Gel red
- 11- Probeta

- 12-Vaso de precipitado
- 13-Espátula
- 14-Sanitas
- 15-Primer's
- 16-Buffer 10x
- 17-Taq 1u
- 18-DNTP's
- 19-Agua inyectable
- 20-SDS
- 21-Marcador de peso molecular (1KB) (Bio Basic Inc.)
- 22-ADN Extraído

Equipos

- 23-Termociclador Select Cyclor II (Selec Bioproducts)
- 24-Fotodocumentador MULTIDOC-IT
- 25-Cámara de electroforesis Horizontal (LABNET)
- 26-Termomix (INCUMIX™)
- 27-Centrífuga (Selec Bioproducts)
- 28-Vortex de Agitación (ULTRACRUZ™)
- 29-Plancha de calor

Preparación de Buffers

Cuadro 2. Buffer 1x de corrida y solución para preparación de agarosa

Preparación de TAE 1 x (Buffer de corrida)	
	25 X - 1000 ml
	1X - X
X = 40 ml de Tae	
+ 960 ml Dh2O = 1000 ml	

Buffer de carga azul de bromophenol

Preparación:

- 1- 25 mg de azul de bromophenol
 - 2- 3 mL de glicerol
 - 3- Aforar a 10 mililitros de dH2O
- Se mantiene a -20° C.

Buffer de lisis (soluciones stock y combinación de buffer de lisis)

Reactivos a utilizar:

- 1- Tris: 1 Molar, 50 mL, PH: 8:0
- 2- EDTA: 1 Molar, 50 mL, PH: 8.5
- 3- NaCl: 0.5 Molar
- 4- SDS: 2 %

Soluciones Stock:

1- Tris:

Peso molecular de Tris: 121.14
Concentración: (1M) (121.14)
1000 ml: 100 %
X: 100 ml
X: 12.114 gr.

2- EDTA:

Peso molecular: 292.25
Concentración: (1M) (292.25)
1000 ml: 100 %
X: 100 ml
X: 29.225 gr.

Este reactivo presenta un pH es muy bajo, por cual se agregó hidróxido de sodio para subir el pH y mantenerlo en 8.5.

3- NaCl:

Peso molecular: 58.44
(0.05) (58.44): 2.922
2.922 - 1000 ml
X: - 100 ml
X: - 0.2922 g

Este reactivo se agregó directamente y no se hizo ninguna dilución.

4- SDS:

Concentración inicial. Volumen inicial
Concentración final. Volumen final
Cl. VI: CF. VF
(10%) . (x): (2 %) (100 mL)
(10%)
X: 20 mL

Este reactivo se agregó directamente y no se realizó ninguna dilución.

Preparación de proteinasa

- 1- 1 mg de proteinasa por mililitro de agua.
- 2- Se preparó un mL y se utilizaban 20 μ L por tubo de eppendorf.
- 3- Se mantiene en congelación a -20°C .

Extracción de ADN

Para esta prueba se mantuvieron larvas de campo y larvas susceptibles de tercer estadio de *S. frugiperda* previamente congeladas a -20°C en tubos tipo eppendorf y conservadas en alcohol al 70%, para su posterior utilización.

El primer paso de esta prueba fue la extracción del ADN del objeto de estudio. Para esta actividad se inició con base en la metodología de Doyle y Doyle (1990) con modificaciones, la cual consistió en lo siguiente:

Se trabajó con larvas completas del insecto, para realizar la maceración en un buffer de lisis a temperatura ambiente (Tris-HCL 1 M pH: 8.0, EDTA 1 M pH: 8.5, NaCl 0.5 M, SDS 2%). Este macerado se agito por 30 segundos en un Vortex de agitación. Se agregaron 500 μ L de cloroformo: alcohol isoamilico (24:1) a temperatura ambiente.

Se agregó proteinasa a una dosis de 20 μ L, posteriormente se pasó al Termomix por 15 min. Y se dejó en reposo 5 minutos. Se centrifugo a 12,000 revoluciones por minuto (rpm) por 15 minutos.

Se recuperó el sobrenadante y se agregó el mismo volumen de isopropanol frio (relación 1:1). Se incubo a -20°C por 1 hora. Posteriormente se centrifugo a 12, 000 rpm por 10 minutos.

Se eliminó el sobrenadante por decantación dejando solo la pastilla de ADN. Esta última se lavó con etanol al 70%, centrifugando a 12,000 rpm por 2 minutos.

Se eliminó el alcohol por decantación y se dejó secar la pastilla de ADN por 30 minutos (se coloca el tubo boca abajo) y se re-suspendió la pastilla con 50 μ L de agua inyectable en el Vortex.

Visualización del ADN en gel de Agarosa al 1%

Para corroborar la extracción de ADN se preparó un gel de agarosa al 1%, donde se cargó con 5 μ L de la extracción de ADN y 5 μ L del buffer de carga (azul de bromo

fenol). Este se corrió a 90 volts por 45 minutos. El resultado se visualizó en el fotodocumentador.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se usó PCR para amplificar el ADN extraído mediante los primer's específicos para alelos de resistencia del gen que codifica para la toxina Cry1Ac de *B. thuringiensis*:

Alelo r1

(1S-R) Anti sentido S-R (5´-CTATGTAGAACGCCTCGTGAG-3´), localizado Exon 9 para Alelo r1 Salvaje o Natural

(r1-R) Antisentido r1-R (5´-CTTCACACATGATGTTCCCTCG-3´), localizado Exon 25 para alelo r1 mutante.

(r1-F) Sentido r1-F (5´-AGACAGGGACACTCTTGAGAAG-3´), localizado Exon 8, Forward para la familia Cadherina.

Programa PCR incluye: Desnaturalización a 95 °C por 3 min, seguido de 30 ciclos (94°C por 30 segundos, 55 ° C por 1 min y 72 °C por 1 min 30 segundos) y una extensión final a 72 °C por 10 min (Yang *et al.*, 2006).

Alelo r2, Alelo r3

(r2r3-F) 15Cad-F Sentido r2, r3-F (5´-AGACAGGGACACTCTTGAGAAG-3´)

(r2r3-R) 15Cad-R, Antisentido (5´-GGCTCGTTCGTTACACTCAGTA-3´)

Programa PCR incluye: Desnaturalización a 95 °C por 3 min, seguido de 30 ciclos (94°C por 30 segundos, 55 °C por 1 min y 72 °C por 2 min) y una extensión final a 72 °C por 10 min (Yang *et al.*, 2007).

Alelo r4

(r4-F) 87SEQ Sentido (5´-ATTGTAGCTACATGGTAGCAATAC-3´)

(r4-R) 2-R Antisentido (5´-CGCTGACTGTATACTTGTCATG-3´)

Programa PCR incluye: Desnaturalización a 95 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos (94°C por 30 segundos, 55°C por 1 min y 72 °C por 1 min 30 segundos) y una extensión final a 72°C por 10 min (Zhao *et al.*, 2010).

Alelo r5

(r5-F) 2.1F Sentido (5´-GATGGGTGGAGATATTTGCTG-3´)

(r5-R) 3-R Antisentido (5´-CTATGTAGAACGCCTCGTGAG-3´)

Programa PCR incluye: Desnaturalización a 95 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos (94 °C por 30 segundos, 55 °C por 1 min y 72 °C por 2 min 30 segundos) y una extensión final a 72 °C por 10 min (Zhao *et al.*, 2010).

Alelo r6

(r6-F) 145F Sentido (5´-ATGGGTAACGCAGTGAGCTACCTGAGGAT-´3)

(r6-R) 145R Antisentido (5´-TAGAGTCAGTATTCCGTCCCTGCTTGGTG-´3)

Programa PCR incluye: Desnaturalización a 95 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos (94°C por 30 segundos, 57°C por 1 min y 72 °C por 3 min) y una extensión final a 72 °C por 10 min (Zhao *et al.*, 2010).

Alelo r7

(r7-F) 151F Sentido (5´-CGAGATCGACTGGGAGAACTCCTATGC-´3)

(r7-R) 151R Antisentido (5´-ACCGCACTTGATTATACAGGGGTCCAT-´3)

Programa PCR incluye: Desnaturalización a 95 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos (94°C por 30 segundos, 57°C por 1 min y 72 °C por 5 min) y una extensión final a 72 °C por 10 min (Zhao *et al.*, 2010).

Alelo r8

(r8-F) 123F Sentido (5´-GAAATGTTTGAGGTGCTGTATCTGACG-´3)

(r8-R) 123R Antisentido (5´-GCGATGACGGTGTAGTACAAGTTCTGT-´3)

Programa PCR incluye: Desnaturalización a 95 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos (94°C por 30 segundos, 56°C por 1 min y 72 °C por 5 min) y una extensión final a 72 °C por 10 min (Zhao *et al.*, 2010).

Alelo r9

(Cad-HaF) Cadherin-F Sentido (5´-AGTCATATGACGATTCGTGCTACGGAC-3´)

(Cad-HaR) Cadherin-R Antisentido (5´-ATACTCGAGTGGCTCGCGCCTGCGCGT-3´) (Liu *et al.*, 2009).

Programa de PCR incluye: Desnaturalización a 94 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos (94 °C por 30 segundos, 54 °C por 30 segundos, 72 °C por 1:30 segundos) y una extensión final a 72 °C por 7 min (Martínez *et al.*, 2013).

Alelo r10

(Cad-HzF) Cadherin-HzF Sentido (5´-AGTCATATGACGATTCGTGCTACGGAC-3´)
(Cad-HzR) Cadherin-HzR Antisentido (5´-CTCTGGCACTTCGAAGTCCAGCAT-3´)
(Gen Bank. AY909578.1).

Programa de PCR incluye: Desnaturalización a 94 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos (94 °C por 30 segundos, 54 °C por 30 segundos, 72 °C por 1 min y 30 segundos) y una extensión final a 72 °C por 7 min (Martínez *et al.*, 2013).

Preparación de Primer´s

Solución stock primer's originales
Primer's – 100 mM (Ci)
Primer's – 400 µl (Vf) (5mM) (Cf)

$$VI: \frac{Cf \times Vf}{Ci} = \frac{(5Mm) (400ml)}{(100 Mm)} = 20 \mu L + 380 \mu L H_2O \text{ (Agua Inyectable)}$$

Preparación de Alicotas de Primer´s

$$\frac{(5mm) (100mm)}{100 mm} = 5 \mu L + 95 H_2O \text{ (Agua Inyectable)}$$

Preparación de dNTP's

10 Mm Concentración dNTP's
300 mL Cantidad total dNTP's

Formula: $CI VI Cf Vf$

$$VI: \frac{Cf \times Vf}{Ci} = \frac{0.2 Mm \times 25 ml}{10Mm} = 0.5 \mu L$$

Preparación de Buffer Amortiguador

10 x Concentración Buffer
1.5 ml Cantidad total Buffer

Formula: $C_i V_i = C_f V_f$

$$V_i = \frac{(1x)(25 \text{ ml})}{10x} = 2.5 \mu\text{L}$$

Preparación de Mixer para PCR

Cuadro 3. Reactivos y orden de agregación para el elaborar el Mixer para PCR.

Reactivos	Reacción		
	1 rx	26 rx	Agregado por reacción
Buffer 10x	2.5 μl	65 μl	2 μl
Taq 1u	0.2 μl	5.2 μl	6 μl
dNTP's 10 mM	0.4 μl	10.4 μl	3 μl
Primer's R 5 mM	3.0 μl	78.0 μl	4 μl
Primer's F 5 mM	3.0 μl	78.0 μl	5 μl
Agua	11.9 μl	309.4 μl	1 μl
ADN	4.0 μl (se agrega hasta el final)		

Volumen final 25 μL - 4 ADN = 21 μL por tubo.

Para esta reacción se preparó un mixer para una reacción (1 rx) que consiste en la utilización de Taq 1u, buffer 10X, dNTP's 10 mM, primer's específicos reverse 5 mM, forward 5 mM, agua y ADN con un volumen total de 25 μL con el programa de temperaturas para cada juego de primer's.

El producto de PCR se corrió en un gel de agarosa al 1% por medio de electroforesis para comparar el tamaño de los fragmentos de ADN con un marcador de peso molecular de 1 KB, para determinar el tamaño en pares de bases, para lo cual en el primer pocillo se agregó 5 μL del marcador de peso molecular y 1 μL de gel red y en el resto de los pocillos se agregaron 5 μL del producto de PCR y 1 μL de gel red. Este se corrió a 95 volts por 1 hora 30 minutos. El resultado se visualizó en un fotodocumentador con apoyo del software MULTIDOC-IT. Si hay una tinción en comparación con el marcador de peso molecular se dice que la muestra amplificó, y de acuerdo a los pares de bases como resultado, se determinó si es positivo o negativo.

4- RESULTADOS Y DISCUSION

Colecta de *Spodoptera frugiperda*

Se llevó a cabo la colecta de al menos 100 larvas de tercer estadio de *S. frugiperda* tanto en el municipio de Matamoros como en Francisco I. Madero, en el cultivo de maíz, asociado a algodón genéticamente modificado-Bollgard II (línea de campo) que codifica para las toxinas Cry1Ac y Cry2Ab, para tener disponibilidad para la extracción de ADN y PCR, además de 50 larvas distribuidas en diferentes localidades de los municipios de Zacoalco de Torres, Jalisco, Temapache, Veracruz, Tepalcingo, Morelos y de Saltillo, Coahuila como línea susceptible.

Extracción de ADN

En la localidad de Matamoros, Coah., se llevó a cabo la extracción de ADN de 62 larvas de tercer estadio de *S. frugiperda*; de las cuales 45 resultaron positivas, lo que significa la presencia de bandas de ADN y 17 muestras dieron negativo no obteniéndose ADN (Cuadro 4).

Cuadro 4. Observación de ADN de *Spodoptera frugiperda* en gel de agarosa al 1% de Matamoros Coahuila.

No. Muestra	Localidad	Nombre muestra	No. Carril	Resultado
01	Matamoros	B1M	1	Positivo
02	Matamoros	B2M	2	Positivo
03	Matamoros	B3M	3	Positivo
04	Matamoros	B4M	4	Positivo
05	Matamoros	B5M	5	Positivo
06	Matamoros	B6M	6	Positivo
07	Matamoros	B7M	7	Positivo
08	Matamoros	B8M	8	Positivo
09	Matamoros	B9M	9	Positivo
10	Matamoros	B10M	10	Positivo
11	Matamoros	B11M	11	Negativo
12	Matamoros	B12M	12	Positivo
13	Matamoros	B13M	13	Positivo
14	Matamoros	B14M	14	Negativo
15	Matamoros	B15M	1	Positivo
16	Matamoros	B16M	2	Positivo
17	Matamoros	B17M	3	Positivo
18	Matamoros	B18M	4	Positivo
19	Matamoros	B19M	5	Negativo
20	Matamoros	B20M	6	Negativo
21	Matamoros	B21M	7	Negativo
22	Matamoros	B22M	8	Negativo

23	Matamoros	B23M	9	Negativo
24	Matamoros	B24M	10	Negativo
25	Matamoros	B25M	11	Negativo
26	Matamoros	B26M	12	Negativo
27	Matamoros	B27M	13	Negativo
28	Matamoros	B28M	14	Negativo
29	Matamoros	B29M	1	Positivo
30	Matamoros	B30M	2	Positivo
31	Matamoros	B31M	3	Positivo
32	Matamoros	B32M	4	Positivo
33	Matamoros	B33M	5	Positivo
34	Matamoros	B34M	6	Positivo
35	Matamoros	B35M	7	Positivo
36	Matamoros	B36M	8	Positivo
37	Matamoros	B37M	9	Positivo
38	Matamoros	B38M	10	Negativo
39	Matamoros	B39M	11	Negativo
40	Matamoros	B40M	12	Negativo
41	Matamoros	B41M	13	Negativo
42	Matamoros	B42M	14	Negativo
43	Matamoros	B43M	1	Positivo
44	Matamoros	B44M	2	Positivo
45	Matamoros	B45M	3	Positivo
46	Matamoros	B46M	4	Positivo
47	Matamoros	B47M	5	Positivo
48	Matamoros	B48M	6	Positivo
49	Matamoros	B49M	7	Positivo
50	Matamoros	B50M	8	Positivo
51	Matamoros	B51M	9	Positivo
52	Matamoros	B52M	10	Positivo
53	Matamoros	B53M	11	Positivo
54	Matamoros	B54M	12	Positivo
55	Matamoros	B55M	13	Positivo
56	Matamoros	B56M	14	Positivo
57	Matamoros	B57M	1	Positivo
58	Matamoros	B58M	2	Positivo
59	Matamoros	B59M	3	Positivo
60	Matamoros	B60M	4	Positivo
61	Matamoros	B61M	5	Positivo
62	Matamoros	B62M	6	Positivo

M= Matamoros, B=Belén

Para las muestras obtenidas en la localidad de Francisco I. Madero, Coahuila, ya se tenía estandarizada la técnica de extracción de ADN, por lo cual se llevó a cabo la extracción de ADN de 25 larvas de tercer estadio de *S. frugiperda*; de las cuales las 25 dieron resultados positivos, lo que significa la presencia de bandas de ADN observadas claramente en el fotodocumentador (Cuadro 5).

Cuadro 5. Observación de ADN de *Spodoptera frugiperda* en gel de agarosa al 1% de Francisco I. Madero, Coahuila.

No. Muestra	Localidad	Nombre muestra	No. Carril	Resultado
01	Fco. I Madero	F 1B	1	Positivo
02	Fco. I Madero	F 2B	2	Positivo
03	Fco. I Madero	F 3B	3	Positivo
04	Fco. I Madero	F 4B	4	Positivo
05	Fco. I Madero	F 5B	5	Positivo
06	Fco. I Madero	F 6B	6	Positivo
07	Fco. I Madero	F 7B	7	Positivo
08	Fco. I Madero	F 8B	8	Positivo
09	Fco. I Madero	F 9B	9	Positivo
10	Fco. I Madero	F 10B	10	Positivo
11	Fco. I Madero	F 11B	11	Positivo
12	Fco. I Madero	F 12B	12	Positivo
13	Fco. I Madero	F 13B	13	Positivo
14	Fco. I Madero	F 14B	14	Positivo
15	Fco. I Madero	F 15B	1	Positivo
16	Fco. I Madero	F 16B	2	Positivo
17	Fco. I Madero	F 17B	3	Positivo
18	Fco. I Madero	F 18B	4	Positivo
19	Fco. I Madero	F 19B	5	Positivo
20	Fco. I Madero	F 20B	6	Positivo
21	Fco. I Madero	F 21B	7	Positivo
22	Fco. I Madero	F 22B	8	Positivo
23	Fco. I Madero	F 23B	9	Positivo
24	Fco. I Madero	F 24B	10	Positivo
25	Fco. I Madero	F 25B	11	Positivo

F= Francisco I. Madero, B= Belén.

Se procesaron 25 larvas de tercer estadio de *S. frugiperda* obtenidas en localidades de Jalisco, Veracruz, Morelos y Coahuila como línea susceptible; de las cuales 25 dieron resultados positivos, lo que indica la presencia de bandas de ADN observadas con el fotodocumentador (Cuadro 6).

Cuadro 6. Observación de ADN de *Spodoptera frugiperda* en gel de agarosa al 1% de la línea susceptible de Jalisco, Veracruz, Morelos y Coahuila.

No. Muestra	Estado Procedencia	Nombre muestra	No. Carril	Resultado
01	Jalisco	J1	1	Positivo
02	Jalisco	J2	2	Positivo
03	Jalisco	J3	3	Positivo
04	Jalisco	J4	4	Positivo
05	Jalisco	J5	5	Positivo
06	Jalisco	J6	6	Positivo
07	Saltillo	S7	7	Positivo
08	Saltillo	S8	8	Positivo
09	Saltillo	S9	9	Positivo
10	Saltillo	S10	10	Positivo
11	Saltillo	S11	11	Positivo
12	Saltillo	S12	12	Positivo
13	Saltillo	S13	13	Positivo
14	Saltillo	S14	14	Positivo
15	Morelos	M15	1	Positivo
16	Morelos	M16	2	Positivo
17	Morelos	M17	3	Positivo
18	Morelos	M18	4	Positivo
19	Veracruz	V19	5	Positivo
20	Veracruz	V20	6	Positivo
21	Veracruz	V21	7	Positivo
22	Veracruz	V22	8	Positivo
23	Veracruz	V23	9	Positivo
24	Veracruz	V24	10	Positivo
25	Veracruz	V25	11	Positivo

J=Jalisco, S=Saltillo, M=Morelos, V=Veracruz.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se procesaron por PCR 75 muestras de ADN de larvas de tercer estadio de *S. frugiperda* para cada uno de los juegos de primer's; 50 muestras de la línea de campo, repartidas en 25 muestras de Matamoros y 25 muestras de Francisco I. Madero y 25 muestras de la línea susceptible obtenidas en localidades de Jalisco,

Veracruz, Morelos y Coahuila. Se procesaron 10 juegos de primer's para las 75 muestras de ADN, dando un total de 750 amplificaciones.

En el Cuadro 7. Se observa la amplificación y visualización de 25 muestras de ADN de larvas de tercer estadio de *S. frugiperda* recolectadas en Matamoros, Coah., con el juego de primer's 1S-R y r1-F, que detecta un alelo salvaje/natural de la familia cadherina, para discriminarlo del alelo mutante de resistencia a la toxina Cry1Ac. Estas muestras de ADN dieron resultado negativo, lo que indica que no hay presencia de la característica del alelo natural de la familia cadherina, por lo cual la plaga sigue siendo susceptible a la toxina Cry1Ac.

Cuadro 7. Amplificación y visualización del producto de PCR de *Spodoptera frugiperda* en gel de agarosa al 1% con el juego de primer's 1S-R y r1-F, de Matamoros, Coahuila.

No. muestra	Nombre muestra	No. Carril	Resultado
01	1M1	2	Negativo
02	2M1	3	Negativo
03	3M1	4	Negativo
04	4M1	5	Negativo
05	5M1	6	Negativo
06	6M1	7	Negativo
07	7M1	8	Negativo
08	8M1	9	Negativo
09	9M1	10	Negativo
10	10M1	11	Negativo
11	11M1	12	Negativo
12	12M1	13	Negativo
13	13M1	14	Negativo
14	14M1	15	Negativo
15	15M1	16	Negativo
16	16M1	17	Negativo
17	17M1	18	Negativo
18	18M1	19	Negativo
19	19M1	20	Negativo
20	20M1	2	Negativo
21	21M1	3	Negativo
22	22M1	4	Negativo
23	23M1	5	Negativo
24	24M1	6	Negativo
25	25M1	7	Negativo

M=Matamoros, Coahuila.

En el Cuadro 8. Se observa la amplificación y visualización de 25 muestras de ADN de larvas de tercer estadio de *S. frugiperda* recolectadas en Francisco I. Madero, Coah., con el juego de primer's 1S-R y r1-F, que detectan un alelo salvaje/natural de la familia cadherina. Estas muestras de ADN dieron resultado negativo, lo que indica que no hay presencia de la característica del alelo natural de la familia cadherina, por lo cual la plaga sigue siendo susceptible a la toxina Cry1Ac.

Cuadro 8. Amplificación y visualización del producto de PCR de *Spodoptera frugiperda* en gel de agarosa al 1% con el juego de primer's 1S-R y r1-F, de Francisco I. Madero, Coahuila.

No. muestra	Nombre muestra	No. Carril	Resultado
01	1F1	8	Negativo
02	2F1	9	Negativo
03	3F1	10	Negativo
04	4F1	11	Negativo
05	5F1	12	Negativo
06	6F1	13	Negativo
07	7F1	14	Negativo
08	8F1	15	Negativo
09	9F1	16	Negativo
10	10F1	17	Negativo
11	11F1	18	Negativo
12	12F1	19	Negativo
13	13F1	20	Negativo
14	14F1	2	Negativo
15	15F1	3	Negativo
16	16F1	4	Negativo
17	17F1	5	Negativo
18	18F1	6	Negativo
19	19F1	7	Negativo
20	20F1	8	Negativo
21	21F1	9	Negativo
22	22F1	10	Negativo
23	23F1	11	Negativo
24	24F1	12	Negativo
25	25F1	13	Negativo

F= Francisco I. Madero, Coahuila.

En el Cuadro 9. Se observa la amplificación y visualización del ADN de larvas de tercer estadio de *S. frugiperda* recolectadas en Matamoros, Coah., con el juego de primer´s r1-R y r1-F, que detectan el alelo mutante de resistencia a la toxina Cry1Ac producto de la presión de selección por tratamientos a base de *B. thuringiensis*, incluidos los cultivos genéticamente modificados Bt. Estas muestras de ADN dieron resultado negativo, lo que indica que no hay presencia del alelo con la característica de resistencia a la toxina Cry1Ac, por lo cual la plaga sigue siendo susceptible a la toxina Cry1Ac.

Cuadro 9. Amplificación y visualización del producto de PCR de *Spodoptera frugiperda* en gel de agarosa al 1% con el juego de primer´s r1-R y r1-F, de Matamoros, Coahuila.

No. muestra	Nombre muestra	No. Carril	Resultado
01	1M2	2	Negativo
02	2M2	3	Negativo
03	3M2	4	Negativo
04	4M2	5	Negativo
05	5M2	6	Negativo
06	6M2	7	Negativo
07	7M2	8	Negativo
08	8M2	9	Negativo
09	9M2	10	Negativo
10	10M2	11	Negativo
11	11M2	12	Negativo
12	12M2	13	Negativo
13	13M2	14	Negativo
14	14M2	15	Negativo
15	15M2	16	Negativo
16	16M2	17	Negativo
17	17M2	18	Negativo
18	18M2	19	Negativo
19	19M2	20	Negativo
20	20M2	2	Negativo
21	21M2	3	Negativo
22	22M2	4	Negativo
23	23M2	5	Negativo
24	24M2	6	Negativo
25	25M2	7	Negativo

M=Matamoros, Coahuila.

En el Cuadro 10. Se observa la amplificación y visualización del ADN de larvas de tercer estadio de *S. frugiperda* recolectadas en Francisco I. Madero, Coah., con el juego de primer's r1-R y r1-F, que detectan el alelo mutante de resistencia a la toxina Cry1Ac producto de la presión de selección por tratamientos a base de *B. thuringiensis*, incluidos los cultivos genéticamente modificados Bt. Estas muestras de ADN dieron resultado negativo, lo que indica que no hay presencia del alelo con la característica de resistencia a la toxina Cry1Ac, por lo cual la plaga sigue siendo susceptible a la toxina Cry1Ac.

Cuadro 10. Amplificación y visualización del producto de PCR de *Spodoptera frugiperda* en gel de agarosa al 1% con el juego de primer's r1-R y r1-F, de Francisco I. Madero, Coahuila.

No. muestra	Nombre muestra	No. Carril	Resultado
01	1F2	8	Negativo
02	2F2	9	Negativo
03	3F2	10	Negativo
04	4F2	11	Negativo
05	5F2	12	Negativo
06	6F2	13	Negativo
07	7F2	14	Negativo
08	8F2	15	Negativo
09	9F2	16	Negativo
10	10F2	17	Negativo
11	11F2	18	Negativo
12	12F2	19	Negativo
13	13F2	20	Negativo
14	14F2	2	Negativo
15	15F2	3	Negativo
16	16F2	4	Negativo
17	17F2	5	Negativo
18	18F2	6	Negativo
19	19F2	7	Negativo
20	20F2	8	Negativo
21	21F2	9	Negativo
22	22F2	10	Negativo
23	23F2	11	Negativo
24	24F2	12	Negativo
25	25F2	13	Negativo

F=Francisco I. Madero, Coahuila.

En el Cuadro 11. Se observa la amplificación y visualización del ADN de larvas de tercer estadio de *S. frugiperda* de Matamoros, Coah., con el juego de primer's r2r3-F y r2r3-R, que detecta dos alelos mutantes en diferentes pares de bases, que confiere resistencia a la toxina Cry1Ac por presión de selección a tratamientos a base de *B. thuringiensis*, incluidos los cultivos genéticamente modificados Bt. Estas muestras de ADN no amplificaron, resultando negativo, lo que indica que no hay presencia de alelos con la característica de resistencia a la toxina Cry1Ac, por lo cual la plaga sigue siendo susceptible a la toxina Cry1Ac.

Cuadro 11. Amplificación y visualización del producto de PCR de *Spodoptera frugiperda* en gel de agarosa al 1% con el juego de primer's r2r3-F y r2r3-R, de Matamoros, Coahuila.

No. muestra	Nombre muestra	No. Carril	Resultado
01	1M3	2	Negativo
02	2M3	3	Negativo
03	3M3	4	Negativo
04	4M3	5	Negativo
05	5M3	6	Negativo
06	6M3	7	Negativo
07	7M3	8	Negativo
08	8M3	9	Negativo
09	9M3	10	Negativo
10	10M3	11	Negativo
11	11M3	12	Negativo
12	12M3	13	Negativo
13	13M3	14	Negativo
14	14M3	15	Negativo
15	15M3	16	Negativo
16	16M3	17	Negativo
17	17M3	18	Negativo
18	18M3	19	Negativo
19	19M3	20	Negativo
20	20M3	2	Negativo
21	21M3	3	Negativo
22	22M3	4	Negativo
23	23M3	5	Negativo
24	24M3	6	Negativo
25	25M3	7	Negativo

M=Matamoros, Coahuila.

En el Cuadro 12. Se observa la amplificación y visualización del ADN de larvas de tercer estadio de *S. frugiperda* de Francisco I. Madero, Coah., con el juego de primer's r2r3-F y r2r3-R, que detecta dos alelos mutantes en diferentes pares de bases, que confiere resistencia a la toxina Cry1Ac por presión de selección a tratamientos a base de *B. thuringiensis*, incluidos los cultivos genéticamente modificados Bt. Estas muestras de ADN dieron resultado negativo, lo que indica que no hay presencia de alelos con la característica de resistencia a la toxina Cry1Ac, por lo cual la plaga sigue siendo susceptible a la toxina Cry1Ac.

Cuadro 12. Amplificación y visualización del producto de PCR de *Spodoptera frugiperda* en gel de agarosa al 1% con el juego de primer's r2r3-F y r2r3-R, de Francisco I. Madero, Coahuila.

No. muestra	Nombre muestra	No. Carril	Resultado
01	1F3	8	Negativo
02	2F3	9	Negativo
03	3F3	10	Negativo
04	4F3	11	Negativo
05	5F3	12	Negativo
06	6F3	13	Negativo
07	7F3	14	Negativo
08	8F3	15	Negativo
09	9F3	16	Negativo
10	10F3	17	Negativo
11	11F3	18	Negativo
12	12F3	19	Negativo
13	13F3	20	Negativo
14	14F3	2	Negativo
15	15F3	3	Negativo
16	16F3	4	Negativo
17	17F3	5	Negativo
18	18F3	6	Negativo
19	19F3	7	Negativo
20	20F3	8	Negativo
21	21F3	9	Negativo
22	22F3	10	Negativo
23	23F3	11	Negativo
24	24F3	12	Negativo
25	25F3	13	Negativo

F=Francisco I. Madero, Coahuila.

En el Cuadro 13. Se observa la amplificación y visualización del ADN de larvas de tercer estadio de *S. frugiperda* de Matamoros, Coah., con el juego de primer´s r4-F y r4-R, que detecta un alelo del gen Bt que confiere resistencia a la toxina Cry1Ac. Estas muestras de ADN dieron resultado negativo, lo que indica que no hay presencia del alelo con la característica de resistencia a la toxina Cry1Ac, por lo cual la plaga sigue siendo susceptible a la toxina Cry1Ac.

Cuadro 13. Amplificación y visualización del producto de PCR de *Spodoptera frugiperda* en gel de agarosa al 1% con el juego de primer´s r4-F y r4-R, de Matamoros, Coahuila.

No. muestra	Nombre muestra	No. Carril	Resultado
01	1M4	2	Negativo
02	2M4	3	Negativo
03	3M4	4	Negativo
04	4M4	5	Negativo
05	5M4	6	Negativo
06	6M4	7	Negativo
07	7M4	8	Negativo
08	8M4	9	Negativo
09	9M4	10	Negativo
10	10M4	11	Negativo
11	11M4	12	Negativo
12	12M4	13	Negativo
13	13M4	14	Negativo
14	14M4	15	Negativo
15	15M4	16	Negativo
16	16M4	17	Negativo
17	17M4	18	Negativo
18	18M4	19	Negativo
19	19M4	20	Negativo
20	20M4	2	Negativo
21	21M4	3	Negativo
22	22M4	4	Negativo
23	23M4	5	Negativo
24	24M4	6	Negativo
25	25M4	7	Negativo

M=Matamoros, Coahuila.

En el Cuadro 14. Se observa la amplificación y visualización del ADN de larvas de tercer estadio de *S. frugiperda* de Francisco I. Madero, Coah., con el juego de primer's r4-F y r4-R, que detecta un alelo del gen Bt que confiere resistencia a la toxina Cry1Ac. Estas muestras de ADN dieron resultado negativo, lo que indica que no hay presencia del alelo con la característica de resistencia a la toxina Cry1Ac, por lo cual la plaga sigue siendo susceptible a la toxina Cry1Ac.

Cuadro 14. Amplificación y visualización del producto de PCR de *Spodoptera frugiperda* en gel de agarosa al 1% con el juego de primer's r4-F y r4-R, de Francisco I. Madero, Coahuila.

No. muestra	Nombre muestra	No. Carril	Resultado
01	1F4	8	Negativo
02	2F4	9	Negativo
03	3F4	10	Negativo
04	4F4	11	Negativo
05	5F4	12	Negativo
06	6F4	13	Negativo
07	7F4	14	Negativo
08	8F4	15	Negativo
09	9F4	16	Negativo
10	10F4	17	Negativo
11	11F4	18	Negativo
12	12F4	19	Negativo
13	13F4	20	Negativo
14	14F4	2	Negativo
15	15F4	3	Negativo
16	16F4	4	Negativo
17	17F4	5	Negativo
18	18F4	6	Negativo
19	19F4	7	Negativo
20	20F4	8	Negativo
21	21F4	9	Negativo
22	22F4	10	Negativo
23	23F4	11	Negativo
24	24F4	12	Negativo
25	25F4	13	Negativo

F=Francisco I. Madero, Coahuila.

En el Cuadro 15. Se muestra el resultado de la amplificación y visualización del ADN de larvas de tercer estadio de *S. frugiperda* de Matamoros, Coah., con el juego de primer's r5-F y r5-R, que detecta un alelo del gen Bt que confiere resistencia a la toxina Cry1Ac. Estas muestras de ADN dieron resultado negativo, lo que indica que no hay presencia del alelo con la característica de resistencia a la toxina Cry1Ac, por lo cual la plaga sigue siendo susceptible a la toxina Cry1Ac.

Cuadro 15. Amplificación y visualización del producto de PCR de *Spodoptera frugiperda* en gel de agarosa al 1% con el juego de primer's r5-F y r5-R, de Matamoros, Coahuila.

No. muestra	Nombre muestra	No. Carril	Resultado
01	1M5	2	Negativo
02	2M5	3	Negativo
03	3M5	4	Negativo
04	4M5	5	Negativo
05	5M5	6	Negativo
06	6M5	7	Negativo
07	7M5	8	Negativo
08	8M5	9	Negativo
09	9M5	10	Negativo
10	10M5	11	Negativo
11	11M5	12	Negativo
12	12M5	13	Negativo
13	13M5	14	Negativo
14	14M5	15	Negativo
15	15M5	16	Negativo
16	16M5	17	Negativo
17	17M5	18	Negativo
18	18M5	19	Negativo
19	19M5	20	Negativo
20	20M5	2	Negativo
21	21M5	3	Negativo
22	22M5	4	Negativo
23	23M5	5	Negativo
24	24M5	6	Negativo
25	25M5	7	Negativo

M=Matamoros, Coahuila.

En el Cuadro 16. Se muestra el resultado de la amplificación y visualización del ADN de larvas de tercer estadio de *S. frugiperda* de Francisco I. Madero, Coah., con el juego de primer's r5-F y r5-R, que detecta un alelo del gen Bt que confiere resistencia a la toxina Cry1Ac. Estas muestras de ADN dieron resultado negativo, lo que indica que no hay presencia del alelo con la característica de resistencia a la toxina Cry1Ac, por lo cual la plaga sigue siendo susceptible a la toxina Cry1Ac.

Cuadro 16. Amplificación y visualización del producto de PCR de *Spodoptera frugiperda* en gel de agarosa al 1% con el juego de primer's r5-F y r5-R, de Francisco I. Madero, Coahuila.

No. muestra	Nombre muestra	No. Carril	Resultado
01	1F5	8	Negativo
02	2F5	9	Negativo
03	3F5	10	Negativo
04	4F5	11	Negativo
05	5F5	12	Negativo
06	6F5	13	Negativo
07	7F5	14	Negativo
08	8F5	15	Negativo
09	9F5	16	Negativo
10	10F5	17	Negativo
11	11F5	18	Negativo
12	12F5	19	Negativo
13	13F5	20	Negativo
14	14F5	2	Negativo
15	15F5	3	Negativo
16	16F5	4	Negativo
17	17F5	5	Negativo
18	18F5	6	Negativo
19	19F5	7	Negativo
20	20F5	8	Negativo
21	21F5	9	Negativo
22	22F5	10	Negativo
23	23F5	11	Negativo
24	24F5	12	Negativo
25	25F5	13	Negativo

F=Francisco I. Madero, Coahuila.

En el Cuadro 17. Se muestra el resultado de la amplificación y visualización del ADN de larvas de tercer estadio de *S. frugiperda* de Matamoros, Coah., con el juego de primer's r6-F y r6-R, que detecta un alelo del gen Bt que confiere resistencia a la toxina Cry1Ac. Estas muestras de ADN resultaron negativas, lo que indica que no hay presencia del alelo con la característica de resistencia a la toxina Cry1Ac, por lo cual la plaga sigue siendo susceptible a la toxina Cry1Ac.

Cuadro 17. Amplificación y visualización del producto de PCR de *Spodoptera frugiperda* en gel de agarosa al 1% con el juego de primer's r6-F y r6-R, de Matamoros, Coahuila.

No. muestra	Nombre muestra	No. Carril	Resultado
01	1M6	2	Negativo
02	2M6	3	Negativo
03	3M6	4	Negativo
04	4M6	5	Negativo
05	5M6	6	Negativo
06	6M6	7	Negativo
07	7M6	8	Negativo
08	8M6	9	Negativo
09	9M6	10	Negativo
10	10M6	11	Negativo
11	11M6	12	Negativo
12	12M6	13	Negativo
13	13M6	14	Negativo
14	14M6	15	Negativo
15	15M6	16	Negativo
16	16M6	17	Negativo
17	17M6	18	Negativo
18	18M6	19	Negativo
19	19M6	20	Negativo
20	20M6	2	Negativo
21	21M6	3	Negativo
22	22M6	4	Negativo
23	23M6	5	Negativo
24	24M6	6	Negativo
25	25M6	7	Negativo

M=Matamoros, Coahuila.

En el Cuadro 18. Se observa la amplificación y visualización del ADN de larvas de tercer estadio de *S. frugiperda* de Francisco I. Madero, Coah., con el juego de primer's r6-F y r6-R, que detecta un alelo del gen Bt que confiere resistencia a la toxina Cry1Ac. Estas muestras de ADN dieron resultado negativo, lo que indica que no hay presencia del alelo con la característica de resistencia a la toxina Cry1Ac, por lo cual la plaga sigue siendo susceptible a la toxina Cry1Ac.

Cuadro 18. Amplificación y visualización del producto de PCR de *Spodoptera frugiperda* en gel de agarosa al 1% con el juego de primer's r6-F y r6-R, de Francisco I. Madero, Coahuila.

No. muestra	Nombre muestra	No. Carril	Resultado
01	1F6	8	Negativo
02	2F6	9	Negativo
03	3F6	10	Negativo
04	4F6	11	Negativo
05	5F6	12	Negativo
06	6F6	13	Negativo
07	7F6	14	Negativo
08	8F6	15	Negativo
09	9F6	16	Negativo
10	10F6	17	Negativo
11	11F6	18	Negativo
12	12F6	19	Negativo
13	13F6	20	Negativo
14	14F6	2	Negativo
15	15F6	3	Negativo
16	16F6	4	Negativo
17	17F6	5	Negativo
18	18F6	6	Negativo
19	19F6	7	Negativo
20	20F6	8	Negativo
21	21F6	9	Negativo
22	22F6	10	Negativo
23	23F6	11	Negativo
24	24F6	12	Negativo
25	25F6	13	Negativo

F=Francisco I. Madero, Coahuila.

En el Cuadro 19. Se muestra la amplificación y visualización del ADN de larvas de tercer estadio de *S. frugiperda* de Matamoros, Coah., con el juego de primer´s r7-F y r7-R, que detecta un alelo del gen Bt que confiere resistencia a la toxina Cry1Ac. Estas muestras de ADN dieron resultado negativo, lo que indica que no hay presencia del alelo con la característica de resistencia a la toxina Cry1Ac, por lo cual la plaga sigue siendo susceptible a la toxina Cry1Ac.

Cuadro 19. Amplificación y visualización del producto de PCR de *Spodoptera frugiperda* en gel de agarosa al 1% con el juego de primer´s r7-F y r7-R, de Matamoros, Coahuila.

No. muestra	Nombre muestra	No. Carril	Resultado
01	1M7	2	Negativo
02	2M7	3	Negativo
03	3M7	4	Negativo
04	4M7	5	Negativo
05	5M7	6	Negativo
06	6M7	7	Negativo
07	7M7	8	Negativo
08	8M7	9	Negativo
09	9M7	10	Negativo
10	10M7	11	Negativo
11	11M7	12	Negativo
12	12M7	13	Negativo
13	13M7	14	Negativo
14	14M7	15	Negativo
15	15M7	16	Negativo
16	16M7	17	Negativo
17	17M7	18	Negativo
18	18M7	19	Negativo
19	19M7	20	Negativo
20	20M7	2	Negativo
21	21M7	3	Negativo
22	22M7	4	Negativo
23	23M7	5	Negativo
24	24M7	6	Negativo
25	25M7	7	Negativo

M=Matamoros, Coahuila.

En el Cuadro 20. Se observa la amplificación y visualización del ADN de larvas de tercer estadio de *S. frugiperda* de Francisco I. Madero, Coah., con el juego de primer's r7-F y r7-R, que detecta un alelo del gen Bt que confiere resistencia a la toxina Cry1Ac. Estas muestras de ADN dieron resultado negativo, lo que indica que no hay presencia del alelo con la característica de resistencia a la toxina Cry1Ac, por lo cual la plaga sigue siendo susceptible a la toxina Cry1Ac.

Cuadro 20. Amplificación y visualización del producto de PCR de *Spodoptera frugiperda* en gel de agarosa al 1% con el juego de primer's r7-F y r7-R, de, Francisco I. Madero, Coahuila.

No. muestra	Nombre muestra	No. Carril	Resultado
01	1F7	8	Negativo
02	2F7	9	Negativo
03	3F7	10	Negativo
04	4F7	11	Negativo
05	5F7	12	Negativo
06	6F7	13	Negativo
07	7F7	14	Negativo
08	8F7	15	Negativo
09	9F7	16	Negativo
10	10F7	17	Negativo
11	11F7	18	Negativo
12	12F7	19	Negativo
13	13F7	20	Negativo
14	14F7	2	Negativo
15	15F7	3	Negativo
16	16F7	4	Negativo
17	17F7	5	Negativo
18	18F7	6	Negativo
19	19F7	7	Negativo
20	20F7	8	Negativo
21	21F7	9	Negativo
22	22F7	10	Negativo
23	23F7	11	Negativo
24	24F7	12	Negativo
25	25F7	13	Negativo

, F=Francisco I. Madero, Coahuila.

En el Cuadro 21. Se observa la amplificación y visualización del ADN de larvas de tercer estadio de *S. frugiperda* de Matamoros, Coah., con el juego de primer´s r8-F y r8-R, que detecta un alelo del gen Bt que confiere resistencia a la toxina Cry1Ac. Estas muestras de ADN resultaron negativas, lo que indica que no hay presencia del alelo con la característica de resistencia a la toxina Cry1Ac, por lo cual la plaga sigue siendo susceptible a la toxina Cry1Ac.

Cuadro 21. Amplificación y visualización del producto de PCR de *Spodoptera frugiperda* en gel de agarosa al 1% con el juego de primer´s r8-F y r8-R, de Matamoros, Coahuila.

No. muestra	Nombre muestra	No. Carril	Resultado
01	1M8	2	Negativo
02	2M8	3	Negativo
03	3M8	4	Negativo
04	4M8	5	Negativo
05	5M8	6	Negativo
06	6M8	7	Negativo
07	7M8	8	Negativo
08	8M8	9	Negativo
09	9M8	10	Negativo
10	10M8	11	Negativo
11	11M8	12	Negativo
12	12M8	13	Negativo
13	13M8	14	Negativo
14	14M8	15	Negativo
15	15M8	16	Negativo
16	16M8	17	Negativo
17	17M8	18	Negativo
18	18M8	19	Negativo
19	19M8	20	Negativo
20	20M8	2	Negativo
21	21M8	3	Negativo
22	22M8	4	Negativo
23	23M8	5	Negativo
24	24M8	6	Negativo
25	25M8	7	Negativo

M=Matamoros, Coahuila.

En el Cuadro 22. Se observa la amplificación y visualización del ADN de larvas de tercer estadio de *S. frugiperda* de Francisco I. Madero, Coah., con el juego de primer's r8-F y r8-R, que detecta un alelo del gen Bt que confiere resistencia a la toxina Cry1Ac. Estas muestras de ADN resultaron negativas, lo que indica que no hay presencia del alelo con la característica de resistencia a la toxina Cry1Ac, por lo cual la plaga sigue siendo susceptible a la toxina Cry1Ac.

Cuadro 22. Amplificación y visualización del producto de PCR de *Spodoptera frugiperda* en gel de agarosa al 1% con el juego de primer's r8-F y r8-R, de Francisco I. Madero, Coahuila.

No. muestra	Nombre muestra	No. Carril	Resultado
01	1F8	8	Negativo
02	2F8	9	Negativo
03	3F8	10	Negativo
04	4F8	11	Negativo
05	5F8	12	Negativo
06	6F8	13	Negativo
07	7F8	14	Negativo
08	8F8	15	Negativo
09	9F8	16	Negativo
10	10F8	17	Negativo
11	11F8	18	Negativo
12	12F8	19	Negativo
13	13F8	20	Negativo
14	14F8	2	Negativo
15	15F8	3	Negativo
16	16F8	4	Negativo
17	17F8	5	Negativo
18	18F8	6	Negativo
19	19F8	7	Negativo
20	20F8	8	Negativo
21	21F8	9	Negativo
22	22F8	10	Negativo
23	23F8	11	Negativo
24	24F8	12	Negativo
25	25F8	13	Negativo

F=Francisco I. Madero, Coahuila.

En el Cuadro 23. Se observa la amplificación y visualización del ADN de larvas de tercer estadio de *S. frugiperda* de Matamoros, Coah., con el juego de primer's Cad-HaF y Cad-HaR, que detecta un alelo para una proteína similar a la cadherina que confiere resistencia a la toxina Cry1Ac de *B. thuringiensis*. Estas muestras de ADN resultaron negativas, lo que indica que no hay presencia del alelo con la característica de resistencia a la toxina Cry1Ac, por lo cual la plaga sigue siendo susceptible a la toxina Cry1Ac.

Cuadro 23. Amplificación y visualización del producto de PCR de *Spodoptera frugiperda* en gel de agarosa al 1% con el juego de primer's Cad-HaF y Cad-HaR, de Matamoros, Coahuila.

No. muestra	Nombre muestra	No. Carril	Resultado
01	1M9	2	Negativo
02	2M9	3	Negativo
03	3M9	4	Negativo
04	4M9	5	Negativo
05	5M9	6	Negativo
06	6M9	7	Negativo
07	7M9	8	Negativo
08	8M9	9	Negativo
09	9M9	10	Negativo
10	10M9	11	Negativo
11	11M9	12	Negativo
12	12M9	13	Negativo
13	13M9	14	Negativo
14	14M9	15	Negativo
15	15M9	16	Negativo
16	16M9	17	Negativo
17	17M9	18	Negativo
18	18M9	19	Negativo
19	19M9	20	Negativo
20	20M9	2	Negativo
21	21M9	3	Negativo
22	22M9	4	Negativo
23	23M9	5	Negativo
24	24M9	6	Negativo
25	25M9	7	Negativo

M=Matamoros, Coahuila.

En el Cuadro 24. Se observa la amplificación y visualización del ADN de larvas de tercer estadio de *S. frugiperda* de Francisco I. Madero, Coah., con el juego de primer's Cad-HaF y Cad-HaR, que detecta un alelo para una proteína similar a la cadherina que confiere resistencia a la toxina Cry1Ac de *B. thuringiensis*. Estas muestras de ADN resultaron negativas, lo que indica que no hay presencia del alelo con la característica de resistencia a la toxina Cry1Ac, por lo cual la plaga sigue siendo susceptible a la toxina Cry1Ac.

Cuadro 24. Amplificación y visualización del producto de PCR de *Spodoptera frugiperda* en gel de agarosa al 1% con el juego de primer's Cad-HaF y Cad-HaR, de Francisco I. Madero, Coahuila.

No. muestra	Nombre muestra	No. Carril	Resultado
01	1F9	8	Negativo
02	2F9	9	Negativo
03	3F9	10	Negativo
04	4F9	11	Negativo
05	5F9	12	Negativo
06	6F9	13	Negativo
07	7F9	14	Negativo
08	8F9	15	Negativo
09	9F9	16	Negativo
10	10F9	17	Negativo
11	11F9	18	Negativo
12	12F9	19	Negativo
13	13F9	20	Negativo
14	14F9	2	Negativo
15	15F9	3	Negativo
16	16F9	4	Negativo
17	17F9	5	Negativo
18	18F9	6	Negativo
19	19F9	7	Negativo
20	20F9	8	Negativo
21	21F9	9	Negativo
22	22F9	10	Negativo
23	23F9	11	Negativo
24	24F9	12	Negativo
25	25F9	13	Negativo

F=Francisco I. Madero, Coahuila.

En el Cuadro 25. Se observa la amplificación y visualización del ADN de larvas de tercer estadio de *S. frugiperda* de Matamoros, Coah., con el juego de primer's Cad-HzF y Cad-HzR, que detecta un alelo que confiere resistencia a la toxina Cry1Ac de *B. thuringiensis*. Estas muestras de ADN resultaron negativas, lo que indica que no hay presencia del alelo con la característica de resistencia a la toxina Cry1Ac, por lo cual la plaga sigue siendo susceptible a la toxina Cry1Ac.

Cuadro 25. Amplificación y visualización del producto de PCR de *Spodoptera frugiperda* en gel de agarosa al 1% con el juego de primer's Cad-HzF y Cad-HzR, de Matamoros, Coahuila.

No. muestra	Nombre muestra	No. Carril	Resultado
01	1M10	2	Negativo
02	2M10	3	Negativo
03	3M10	4	Negativo
04	4M10	5	Negativo
05	5M10	6	Negativo
06	6M10	7	Negativo
07	7M10	8	Negativo
08	8M10	9	Negativo
09	9M10	10	Negativo
10	10M10	11	Negativo
11	11M10	12	Negativo
12	12M10	13	Negativo
13	13M10	14	Negativo
14	14M10	15	Negativo
15	15M10	16	Negativo
16	16M10	17	Negativo
17	17M10	18	Negativo
18	18M10	19	Negativo
19	19M10	20	Negativo
20	20M10	2	Negativo
21	21M10	3	Negativo
22	22M10	4	Negativo
23	23M10	5	Negativo
24	24M10	6	Negativo
25	25M10	7	Negativo

M=Matamoros, Coahuila.

En el Cuadro 26. Se observa la amplificación y visualización del ADN de larvas de tercer estadio de *S. frugiperda* de Francisco I. Madero, Coah., con el juego de primer's Cad-HzF y Cad-HzR, que detecta un alelo que confiere resistencia a la toxina Cry1Ac de *B. thuringiensis*. Estas muestras de ADN resultaron negativas, lo que indica que no hay presencia del alelo con la característica de resistencia a la toxina Cry1Ac, por lo cual la plaga sigue siendo susceptible a la toxina Cry1Ac.

Cuadro 26. Amplificación y visualización del producto de PCR de *Spodoptera frugiperda* en gel de agarosa al 1% con el juego de primer's Cad-HzF y Cad-HzR, de Francisco I. Madero, Coahuila.

No. muestra	Nombre muestra	No. Carril	Resultado
01	1F10	8	Negativo
02	2F10	9	Negativo
03	3F10	10	Negativo
04	4F10	11	Negativo
05	5F10	12	Negativo
06	6F10	13	Negativo
07	7F10	14	Negativo
08	8F10	15	Negativo
09	9F10	16	Negativo
10	10F10	17	Negativo
11	11F10	18	Negativo
12	12F10	19	Negativo
13	13F10	20	Negativo
14	14F10	2	Negativo
15	15F10	3	Negativo
16	16F10	4	Negativo
17	17F10	5	Negativo
18	18F10	6	Negativo
19	19F10	7	Negativo
20	20F10	8	Negativo
21	21F10	9	Negativo
22	22F10	10	Negativo
23	23F10	11	Negativo
24	24F10	12	Negativo
25	25F10	13	Negativo

F=Francisco I. Madero, Coahuila.

En los Cuadros 27 y 28 se observa la amplificación y visualización del ADN de larvas de tercer estadio de *S. frugiperda* de localidades de Jalisco, Veracruz, Morelos y Coahuila (línea susceptible) con los 10 juegos de primer's que detectan alelos de resistencia a la toxina Cry1Ac de *B. thuringiensis*; muestras de ADN que dieron como resultado negativo, no encontrándose resistencia a la toxina Cry1Ac.

Cuadro 27. Amplificación y visualización del producto de PCR de *Spodoptera frugiperda* en gel de agarosa al 1% con 5 juegos de primer's, de localidades de Jalisco, Veracruz, Morelos y Coahuila.

Nombre muestra	No. Carril	Alelo r1 Natural	Alelo r1 Mutante	Alelo r2, r3	Alelo r4	Alelo r5	Resultado
J1	02	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
J2	03	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
J3	04	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
J4	05	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
J5	06	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
J6	07	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
S7	08	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
S8	09	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
S9	10	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
S10	11	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
S11	12	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
S12	13	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
S13	14	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
S14	15	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
M15	16	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
M16	17	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
M17	18	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
M18	19	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
V19	20	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
V20	02	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
V21	03	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
V22	04	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
V23	05	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
V24	06	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
V25	07	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo

J=Jalisco, S=Saltillo, M=Morelos, V=Veracruz

Cuadro 28. Amplificación y visualización del producto de PCR de *Spodoptera frugiperda* en gel de agarosa al 1% con 5 juegos de primer's de localidades de Jalisco, Veracruz, Morelos y Coahuila.

Nombre muestra	No. Carril	Alelo r6	Alelo r7	Alelo r8	Alelo r9	Alelo r10	Resultado
J1	02	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
J2	03	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
J3	04	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
J4	05	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
J5	06	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
J6	07	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
S7	08	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
S8	09	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
S9	10	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
S10	11	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
S11	12	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
S12	13	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
S13	14	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
S14	15	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
M15	16	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
M16	17	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
M17	18	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
M18	19	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
V19	20	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
V20	02	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
V21	03	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
V22	04	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
V23	05	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
V24	06	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
V25	07	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo

J=Jalisco, S=Saltillo, M=Morelos, V=Veracruz

Los antecedentes sobre el desarrollo de resistencia a insecticidas indican que si una población de la plaga se expone en forma continua a un insecticida, la plasticidad genética de la población eventualmente permitirá que algunos pocos individuos resistentes se seleccionen a través de las generaciones, para posteriormente conformar una población de individuos resistentes. Por lo tanto, conociendo que las plagas susceptibles a las toxinas Cry tienen el potencial de desarrollar resistencia hacia ellas, y que los cultivos Bt exponen en forma creciente y continua a las poblaciones plaga a la presión de selección de una o varias proteínas Cry, es lógico prever que se combinen las circunstancias para el desarrollo de la resistencia, como respuesta frente a un peligro, eliminando no solo la posibilidad de seguir utilizando las proteínas Cry como medida de control de plagas, sino también predisponiendo a las plagas al uso de los productos a base de *B. thuringiensis*.

El desarrollo de resistencia se produce principalmente por usar siempre el mismo insecticida y a dosis alta. Esta condición la cumplen perfectamente los OGM'S. En México, desde 1996 se inició con la siembra de algodón Bt con la inserción de la toxina Cry1Ac de *B. thuringiensis* y para el año 2009 se cambiaron a las siembras con algodón Bt de segunda generación llamados "genes-piramidales" con dos toxinas de *B. thuringiensis* (Cry1Ac y Cry2Ab), -algodón Bollgard II- efectivas contra un amplio rango de lepidópteros, lo que ponía de manifiesto una posible rápida adquisición de tolerancia y resistencia a las toxinas incorporadas en el algodón Bt (Greenplate *et al.*, 2003; ISSSA, 2018).

De los mecanismos de resistencia a *B. thuringiensis*, el modo más común es la reducción de la unión a las membranas (receptores) del intestino medio de al menos una toxina Cry (Tabashnik *et al.*, 2004), o dicho de otra manera es cuando surgen modificaciones de los sitios objetivo, reducen o eliminan la unión de las toxinas Cry en los individuos homocigotos resistentes, pero tienen poco efecto sobre la susceptibilidad de los individuos heterocigotos a las toxinas (Morín *et al.*, 2003; Soberon y Bravo, 2008).

Los receptores de la toxina Cry1Ac de *B. thuringiensis* son principalmente dos; el receptor cadherina y el receptor aminopeptidasa; receptores donde se inserta la toxina Cry al intestino medio del insecto (Rausell *et al.*, 2004; Soberon y Bravo, 2008). En este sentido; se reporta una sustitución en estos receptores en *H. virescens* producto de una mutación, originando la pérdida del sitio de unión de la toxina Cry1Ac, demostrándose que estos receptores han disminuido su vinculación a la toxina, llevando a generar resistencia en los insectos a la Cry1A (Xie *et al.*, 2005).

Con avances de la tecnología, se ha podido desarrollar nuevos métodos para determinar la manifestación de resistencia por medio del ADN basado en alelos de resistencia (Tabashnik *et al.*, 2004). Actualmente hay pruebas de especies de lepidópteros, donde se reconoce que la resistencia a las toxinas Cry puede ser causado por mutaciones en un gen que codifica para cadherina, proteína expresada en el intestino medio de las larvas (Yang *et al.*, 2006; Gahan *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2007).

Las cadherinas son una clase de proteínas receptoras para las toxinas Cry1A de *B. thuringiensis*. La interrupción de un gen de la cadherina se asocia con la resistencia a la delta-endotoxina Cry1Ac de *B. thuringiensis* descubierto en gusano del algodón *H. armigera*. Sin embargo, determinación de secuencias de ADN genómico del gen Bt de resistencia, ha mostrado que existe una supresión responsable de una cadherina truncada resistente a Cry1Ac, con dos variantes de transcripción, las cuales producen la misma proteína truncada, con dos alelos, el tipo salvaje o natural y el mutante de resistencia a Cry1Ac (Yang *et al.*, 2006).

En el presente trabajo, en el total de las muestras de ADN, tanto de la línea de campo Francisco I. Madero y Matamoros, Coahuila y la línea susceptible de Jalisco, Saltillo, Morelos y Veracruz ninguna de estas amplificó para los distintos juegos de primers para resistencia a la toxina Cry1Ac de *B. thuringiensis*, mediada por un cambio o mutación en el receptor cadherina, por lo tanto, el producto de PCR no requirió ser purificado y no se realizó ninguna secuenciación

Con base en los resultados no se detectó el gen Bt de resistencia a la toxina Cry1Ac en las poblaciones estudiadas de la comarca lagunera de Coahuila, sugiriendo esto que *S. frugiperda* no ha desarrollado resistencia a la toxina Cry1Ac de algodón Bt, esto probablemente a que el flujo de individuos de maíz convencional-algodón Bt es poco, puesto que *S. frugiperda* tiene preferencia por el maíz.

Por otro lado, el flujo que pudiera existir entre maíz convencional-algodón Bt, permite que individuos susceptibles que copulan con posibles insectos resistentes que sobreviven en el cultivo Bt y producen heterocigotos susceptibles, los cuales mueren al consumir tejido del cultivo Bt y/o poblaciones en maíz se mantienen susceptibles. Esta condición es el equivalente al uso de la condición de refugio (80:20), que implica sembrar el 80% de cultivos transgénicos y un 20% convencional o el refugio (96:4), 96% de cultivos transgénicos y un 4% convencional. El refugio es una condición que provee individuos susceptibles (SS) que copulan con los posibles resistentes (RR) que sobreviven en el cultivo Bt y producen heterocigotos susceptibles (RS), los cuales mueren al consumir tejido del cultivo Bt.

Además, otro factor importante son las mutaciones que afectan la expresión de los receptores tipo cadherina, que resultan en insectos resistentes a las toxinas Cry, y tienen un costo en el desempeño de los insectos en la naturaleza, evitando que las mutaciones que afectan a esta proteína se fijen en la población de insectos (Soberon y Bravo, 2008).

Otra característica importante que no permite el desarrollo de resistencia, o hay poca evidencia de ello, es la utilización de cultivos Bt con 2 o más genes de Bt, lo que permite la eficacia insecticida del cultivo. El número y tipos de proteínas Bt, especialmente aquéllas con diferentes modos de acción, que expresa un cultivo GM; el nivel de consistencia en la expresión y especificidad de cada proteína Bt, afecta significativamente la tasa de selección para resistencia. Es bien sabido que la resistencia evoluciona más lentamente en cultivos Bt que expresan múltiples proteínas, comparado con los cultivos que expresan una sola proteína derivada de Bt. Adicionalmente, se prefiere que cada proteína se exprese durante todo el ciclo del cultivo a niveles suficientemente altos para controlar aquellos insectos objetivo que sean heterocigotos para cualquier gen que confiera resistencia (lo cual se ha denominado “dosis alta de expresión”). Con una expresión de las proteínas en dosis altas hacia estos, se eliminan a todos o a casi todos los que son susceptibles (ss) y heterocigotos (Ss), lo que contribuye a hacer que la resistencia sea funcionalmente recesiva y lenta en su evolución (Burkness *et al.*, 2010; Niu *et al.*, 2013; Yang *et al.* 2013).

La diversidad mutacional del gen Bt puede afectar la detección de ADN para la frecuencia de alelos de resistencia, por lo cual se debe monitorear rutinariamente los alelos de resistencia basados en el receptor cadherina (Zhao *et al.*, 2010).

La presión del algodón Bt para los sitios muestreados no ha desarrollado resistencia en *S. frugiperda*, por lo cual esta tecnología Bt con evento piramidal sigue siendo funcional y la posible entrada de otro cultivo Bt para esta región es una alternativa viable, además de que es indispensable el monitoreo de resistencia constante de esta y otras plagas objetivo de *B. thuringiensis*.

A cuatro años de la liberación de cultivos Bt, se reportó la frecuencia de un alelo recesivo de resistencia que confiere la toxina Cry1Ac de Bt en cepas de gusano rosado *P. gossypiella* de campos de algodón Bt en Arizona en 1997 y estudios realizados no detectaron un aumento en la frecuencia de este alelo de resistencia en 1999, concluyendo la eficacia del algodón Bt para controlar el gusano rosado (Tabashnik *et al.*, 2000a).

Además, se detectan altos niveles de resistencia de *H. armigera* a la toxina Cry2Ab del algodón Bt debido a un gen autosómico de carácter recesivo en Australia (Mahon *et al.*, 2007).

Primera detección de dos alelos de resistencia de *B. thuringiensis* en *H. armigera* en campos de algodón Bt, demostrando que estos insectos pueden completar su desarrollo en el cultivo Bt (Yang, *et al.*, 2007).

Datos de 2002 a 2006 en pruebas de campo para *H. zea*, han reportado el desarrollo de resistencia a Cry1Ac en algodón Bt en 14 poblaciones de Arkansas, Georgia y Mississippi, con coeficientes de resistencia mayores a 100, incluyendo dos poblaciones con tasas de resistencia mayores a 1000 (Tabashnik *et al.*, 2008).

En estimaciones hechas en E.U. de los alelos de resistencia en el gusano belloteo *H. virescens* a la exposición constante de la toxina Cry1Ac que expresa el algodón Bt, no se reportaron diferencias significativas a las estimaciones hechas en 1993, concluyendo no haber encontrado evidencia de que las poblaciones de *H. virescens* se hayan vuelto más resistentes a la toxina Cry1Ac (Blanco *et al.*, 2009).

Se describe el desarrollo de resistencia del gusano cogollero *S. frugiperda* al maíz Bt evento TC1507 que produce la toxina Cry1F en Puerto Rico (Storer *et al.*, 2010)

Se publico el desarrollo de resistencia del gusano *S. frugiperda* (recolectados en 2013) al maiz Bt con la toxina Cry1Fa en Brasil con mas de 10 veces (10 X) los niveles de resistencia comparada con una susceptible. La poblacion de campo se mantuvo con alimento sin toxina Bt, manteniendo altos niveles de resistencia a la toxina por 8 generaciones, ademas mostro mayor resistencia cruzada a la toxina Cry1Aa, que a las toxinas Cry1Ab o a Cry1Ac (se insertan en el mismo sitio de unión), situación contraria con las toxinas Cry2A. Sin embargo, el refugio usado fue por debajo del recomendado (10%) o simplemente no se usó (Monnerat *et al.*, 2015)

5- CONCLUSION

Para las localidades muestreadas en la comarca lagunera, del flujo de poblaciones de *S. frugiperda* entre algodón GM-maíz convencional, no se detectaron alelos del gen Bt que confieren resistencia a la toxina Cry1Ac en *S. frugiperda*.

El uso continuo del cultivo Bt y el cuidado de la tecnología Bt, hace indispensable el monitoreo de resistencia constante de todas las plagas objetivo de *B. thuringiensis*.

6- LITERATURA CITADA

- Abbas, A., R. G. Luttrell, H. N. Pietre and Davis, F. M. 1989. Distribution of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) egg masses on cotton. *Environmental Entomology*. 18 (5): 881-885.
- Adamczyk, J. R., J. Greenberg, J. Armstrong, J. S. Mullins, W. J. Braxton, L. B. Lassiter, R. B. and Siebert, M. W. 2008. Evaluations of Bollgard, Bollgard II, and Widestrike technologies against beet and fall armyworm larvae (Lepidoptera: Noctuidae). *Florida Entomology*. 91(4): 531-536.
- Andrews, K. L. 1988. Latin American research on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Florida Entomology*. 71 (4): 630-653.
- Angulo, A. O., Olivares, T. S. y Weigert, T. H. 2006. Estados inmaduros de Lepidopteros Noctuidos de importancia Económica Agrícola y Forestal en Chile (Lepidoptera: Noctuidae). Universidad de Concepción, Gobierno de Chile. 154 Pp.
- Anilkumar, K. J., Rodrigo-Simón, A., Ferré, J., Pusztai-Carey, M., Sivasupramaniam, S. and Moar, W. J. 2008. Production and Characterization of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac-Resistant Cotton Bollworm *Helicoverpa zea* (Boddie). *Applied and Environmental Microbiology*. 74(2): 462-469.
- Artigas, J. N. 1994. Entomología Económica. Insectos de interés agrícola, forestal, médico y veterinario (nativos, introducidos y susceptibles de ser introducidos). Dos volúmenes (1128+948). Ediciones Universidad de Concepción, Concepción.
- Bahena, J. F. 1998. Enemigos Naturales de Huevecillos y Larvas del Gusano Cogollero del Maiz, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) y Observaciones de Laboratorio en Morelos Mexico. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila; México.
- Banda, T. J. F. 1981. Importancia económica de *Heliothis zea* (Boddie) y determinación del umbral económico, distribución matemática y muestreo de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) en maíz criollo. Tesis (Doctorado en Ciencias), ITESM. Div. Ciencias Agrop. Y Maritimas. Monterrey, Mexico, 55-60 Pp.
- Bautista, M. N. 2006. Insectos plaga Una guía ilustrada para su identificación. Colegio de Postgraduados. 1era ed. Texcoco, Estado de Mexico, Mexico. 3 Pp.
- BAYERCROPSCIENCIE. 2010. http://www.bayercropscience.com.mx/Bayer/cropscience/csmexico.nsf/id/GcogolleroPests_BCS. Fecha de consulta: 05 de septiembre del 2018.
- Bernardi, O.; G. S. Malvestiti, P. M. Dourado, W. S. Oliveira, S. Martinelli, G. U. Berger, G. P. Head and C. Omoto. 2012. Assessment of the high-dose concept and level of control provided by MON 87701 × MON 89788 soybean against *Anticarsia gemmatalis* and *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Pest Management Science* 68:1083-1091.
- Blanco, C. A., D. A. Andow, C. A. Abel, D. V. Sumerford, G. Hernandez, J. D. López Jr., L. Adams, A. Groot, R. Leonard, R. Parker, G. Payne, O. P. Perera, A. P.

- Terán-Vargas and A. Azuara-Domínguez. 2009. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac Resistance Frequency in Tobacco Budworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal Economic Entomology*. 102(1): 381-387.
- Brattsten L. B. 1989. Insecticide resistance: Research and management. *Pesticide Science*. 26(4): 329-332. doi:10.1002/ps.2780260402.
- Brown, K., and Whiteley H. 1992. Molecular characterization of two novel crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. thompsoni. *Journal of Bacteriology*. 174(2): 549-557.
- Burkness, E. C., Dively, G., Paton, T., Morey, A. C., and Hutchison, W. D. 2010. Novel Vip3A *Bacillus thuringiensis* (Bt) maize approaches high-dose efficacy against *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) under field conditions. *GM Crops* 1:337–343
- Capinera, J. L. 1999. Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E Smith) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). EENY-098, University of Florida IFAS Extension. 6 Pp.
- Caprio, M. A., Storer, N. P., Sisterson, S. L., Peck, S. L. and Maia, A. H. N. 2008. Assessing the risk of the evolution of resistance to pesticides using spatially complex simulation models. Pp: 90-117 in: *Global Pesticide Resistance in Arthropods*. M. E. Whalon, D. Mota-Sanchez, and R. M. Hollingworth, (Eds.) CAB International, Wallingford, UK.
- Carrillo, R. H. 1984. Análisis De Acción Conjunta de Insecticidas en Larvas del Gusano Cogollero del Maíz (J.E: Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Entomología y Acarología. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México. 82 Pp.
- Casmuz, A., Juárez, M. L., Socías, M. G., Murúa M. G., Prieto, S., Medina, S., Willink E. y Gastaminza, G. 2010. Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*. 69: 209-231.
- Clavijo, S. y Perez, G. G. 2000. Protección y Sanidad Vegetal (Capítulo 6). En: Fontana Nieves, H. y C. González Narváez (eds.), *Insectos plagas del maíz* (Sección 2). Fundación Polar, Caracas, Venezuela. 345-361 Pp.
- Corona, C. S. 2008. Propuesta de una clave taxonómica con uso del spinneret para identificar larvas de lepidópteros de importancia agrícola. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila; Mexico. 120 Pp.
- Crava. C. M., Farinós, G. P. Bel, Y. Castañera, P. 2013. Quantitative genetic analysis of Cry1Ab tolerance in *Ostrinia nubilalis* Spanish populations. *Journal of Invertebrate Pathology* 113 (3): 220-227. DOI: 10.1016/j.jip.2013.04.004.
- Crickmore, N., Ziegler, D. R. Feitelson, J. Schnepf, E. Van Rie, J. Lereclus, D. Baum J. and Dean, D. H. 1998. Revision of the Nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* Pesticidal Crystal Proteins. *Journals Microbiology* 62(3):807-813.
- Dhurua, S. y Gujar, G. T. 2011. Field-evolved resistance to Bt toxin Cry1Ac in the pink bollworm, *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera: Gelechiidae), from India. *Pest. Management. Science*. 67 (8): 898-903. DOI.org/10.1002/ps.2127.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15. DOI.org/10.1007/978-3-642-83962-7_18.

- Fernandes, O. A., Faria, O. Martinelli, S. Schmidt, F. Ferreira C. V. MORO, G. 2007. Short-term assessment of Bt maize on non-target arthropods in Brazil. *Sci. Sci. Agric. (Piracicaba, Brazil.)*. 64 (3): 249-255.
- Frederick, W. S. 2005. Orden Lepidoptera. En: *Inmature Insects*. Volumen 1, USA: Kendall/Hunt. 288-596 Pp.
- Gahan, L. J., Gould, F., López, J. D. Micinski, S. and Heckel, D. G. 2007. A Polymerase Chain Reaction Screen of Field Populations of *Heliothis virescens* for a Retrotransposon Insertion Conferring Resistance to *Bacillus*
- Garcia, R. F. Mosquera, A. T. Vargas, C. A. Rojas, A. L. 1999. Manejo integrado del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). Boletín informativo Convenio CORPOICA-PRONATTA. Palmira. 19 Pp.
- Gassmann, A. J., Petzold-Maxwell, J. L., Keweshan, R. S. and Dunbar, M. W. 2011. Field-Evolved Resistance to Bt Maize by Western Corn Rootworm. *PLOS ONE* 6 (7): e22629. DOI: 10.1371/journal.pone.0022629.
- Gao, Y., Wu, K. and Gould, F. 2009. Frequency of *Bt* Resistance Alleles in *Helicoverpa armigera* during 2006–2008 in Northern China. *Environmental Entomology*. 38 (4):1336-1342.
- Gen, B. AY909578.1. *Helicoverpa zea* cadherin-like mRNA, partial sequence. Entomology, Kansas State University, 123 Waters Hall, Manhattan, KS 66506, USA. Fecha de consulta: Mayo 2018.
- Georghiou, G. P. 1965. Genetic studies on Insecticide Resistance. *Advances Pest Control Research*. 6:171-230.
- Glare, T. R. and O' Callaghan, M. 2000. *Bacillus thuringiensis*: Biology, Ecology and Saecty. John Wilery & Sons, LTD. New York. 350 Pp.
- Gómez I, Sánchez, J. Miranda, R. Bravo, A. Soberón, M. 2002. Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix alpha-1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Letters*. 513(2-3)242-6.
- González-Cabrera J. 2001. Plantas transgénicas con la capacidad insecticida de *Bacillus thuringiensis*. En: Caballero P, Ferré J, editores. *Bioinsecticidas: fundamentos y aplicaciones de Bacillus thuringiensis en el Control Integrado de Plagas*. 169-87 Pp.
- Gordon, R. E., Haynes, W. C. and Pang, C. H. N. 1973. The genus *Bacillus*. En: U.S. Department of Agriculture. *Agricultural Handbook N° 427* Washington D. C. U.S.D.A.
- Greenplate, J. T. Mullins, J. W. Penn, S. R. Dahm, A. Reich, B. J. Osborn, J. A. Rahn, P. R. Ruschke, L. Shappley, Z. W. (2003). Partial characterization of cotton plants expressing two toxin proteins from *Bacillus thuringiensis*: relative toxin contribution, toxin interaction, and resistance management. *Journals Applied Entomology*.
- Heckel, D.G., 2012. Insecticide resistance after Silent Spring. *Science* 337:1612-1614.
- Hoffmann, M. P. and Frodsham, A. C. 1993. *Frodsham. Natural Enemies of Vegetable Insect Pests*. Cooperative Extension, Cornell University, Ithica, 63 Pp.
- Hofte, H. and Whiteley, H. R. 1989. Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Journals Microbiology* 53(2): 242-255.

- Hossain, F. Pray, C. Lu, Y. Huang, J. Fan, C. Hu, R. 2004. Genetically modified cotton and farmers' health in China. *Int J Occup Environ Health*. 10(3): 296-303.
- IBARRA, J. E. 2007. Uso de bacterias en el control biológico, pp. 144-159. En: Rodríguez-del-Bosque, L. A. y H. C. Arredondo-Bernal (Eds.). *Teoría y Aplicación del Control Biológico*. Sociedad Mexicana de Control Biológico, Mexico. 303 Pp.
- IRAC. 2018. Disponible en: <https://www.iraconline.org/about/resistance/mechanisms/>. Fecha de consulta: 05 de septiembre del 2018.
- Iriarte, J. y Caballero, P. *Biología y Ecología de Bacillus thuringiensis*. En: Caballero, P. y Ferre, J. 2001. *Bioinsecticidas: Fundamentos y aplicaciones de Bacillus thuringiensis en el control integrado de Plagas*. PHITOMA-España, Navarra, España. 15-44 Pp.
- ISAAA. 2015. International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications. Base de datos de aprobación de GM. Disponible en: <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/default.asp>. Fecha de consulta el 20 de octubre del 2018.
- ISAAA. 2018. International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications. GM Approval Database. ISAAA, Ithaca, New York, USA. Disponible en: <http://www.isaaa.org>. Fecha de consulta: 15 de septiembre del 2018.
- James, C. 2010. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications (ISAAA). Brief No. 42. Executive Summary. 2010. ISAAA: Ithaca, NY. Disponible en <http://www.isaaa.org>. Fecha de consulta: 07 de octubre del 2018.
- James, C. 2014. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications (ISAAA). Brief No. 49-2014: Executive Summary. 2014. ISAAA: Ithaca, NY. Disponible en <http://www.isaaa.org>. Fecha de consulta: 10 septiembre 2018.
- Jimenez, L. J. D. 2011. Efectividad biológica de extractos vegetales sobre larvas de *Spodoptera frugiperda*. Tesis de parasitología. Universidad Autonoma Agraria Antonio Narro. 17 Pp.
- Joung, K. B. and Cote, J. C. 2000. A review of the environmental impacts of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Technical Bulletin*. Canada. 29: 1-16.
- Jurat-Fuentes, J. L. 2015. Characterization of Cry toxin mode of action. Department of Entomology and Plant Patología. The University of Tennessee. Knoxville, Tennessee. Disponible en: <http://web.utk.edu/~jurat/Btresearchtable.html>. Fecha de consulta: 10 Octubre 2018.
- Kati, H., Sezen, K. Nalcacioglu, R. and Demirbag, Z. 2007. A Highly Pathogenic Strain of *Bacillus thuringiensis* serovar kurstaki in lepidoptera Pests. *Journals Microbiology* 45(6):553-7.
- Khetan S. 2001. Bacterial Insecticide: *Bacillus thuringiensis*. En: Khetan editor. *Microbial Pest Control*, 14 Pp.

- Knowles, B. H. 1994. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal delta-endotoxins. In *Advances in Insect Physiology*. 24. Ed. PD Evans. Academia Press, London, England. 275-308 Pp.
- Lagunés, T. A. 1991. Notas del Curso de Toxicología y Manejo de Insecticidas (Documentos de Trabajo). Centro de Entomología y Acarología. Colegio de Postgraduados. Montecillo- Chapingo, Méx. Melander, A. L. 1914. Can in. 195 Pp.
- Leong, K. L. H. Cano, R. J. and Kubinski, A. M. 1980. Factors Affecting *Bacillus thuringiensis* Total Field Persistence. *Environmental Entomology* 9(5):593-599. DOI.org/10.1093/ee/9.5.593.
- Liu, C. Wu, K. Wu, Y. Gao, Y. Ning, C. and Oppert, B. 2009. Reduction of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxicity against *Helicoverpa armigera* by a soluble toxin-binding cadherin fragment. *Journal of Insect Physiology* 55(8): 686-693.
- Liu, F. Xu, Z. Chang, J. Chen, J. Meng, F. Zhu, Y. C. and Shen, J. 2008. Resistance allele frequency to Bt cotton in field populations of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in China. *Journals Economic Entomology* 101(3):933-943.
- Mahon, R. J. Olsen, K. M. Garcia, K. A. and Young, S. R. 2007. Resistance to *Bacillus thuringiensis* Toxin Cry2Ab in a Strain of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia. *Journals Economic Entomology* 100(3):894-902.
- Martínez V. M. Tamez, G. P. Gómez, F. R. A. Iracheta, C. M. Mendoza, G. E. Sandoval, C. C. F. Pietrantonio, P. Valadez, L. J. A. 2013. Análisis De La Respuesta Inmunológica De Poblaciones Silvestres De *Helicoverpa Zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae). En Relación Con Su Hospedero (Maestro En Ciencias Con Acentuación En Microbiología). Universidad Autónoma De Nuevo León Facultad De Ciencias Biológicas. Monterrey, N. L.; México.
- Metcalf, C. L. y Flint, W. P. 1965. Insectos destructivos e insectos útiles sus costumbres y su control. 1era Ed. Editorial McGraw-Hill Book Company, Inc. Mexico D.F. 530 Pp.
- Mentaberry, A. y Ghio, S. 2002. Avances biotecnológicos en maíz. En: Vaquero, P. (ed.), Guía Dekalb del cultivo de maíz, Monsanto Argentina S.A., Buenos Aires. 35-41 Pp.
- Moberg, W.K. 1990. Understanding and combating agrochemical resistance. In: *Managing resistance to agrochemicals*; Green, M. N. LeBaron, H. M. y Monnerat, W. K. Martins, R., E. Macedo, C. Queiroz, P. Praça, L. Soares, C. M. Moreira, H. Grisi, I. Silva, J. Soberon, M. and Bravo, A. 2015. Evidence of Field-Evolved Resistance of *Spodoptera frugiperda* to Bt Corn Expressing Cry1F in Brazil That Is Still Sensitive to Modified Bt Toxins. *PLoS ONE* 10(4):1-12.
- Monge, L. A. 1986. Manejo Racional de Insecticidas. Resistencia y rotación. Editorial tecnológica de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. 74 Pp.
- Montes, M. J. A. Espinoza, P. N. Garrido, R. E. y Gutierrez, M. F. A. 2001. Reproducción del gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* L.) del Maiz (*Zea mays* L.) bajo condiciones de laboratorio. IX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. XIII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica. II Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica. Veracruz, Mexico.

- Morin, S. Biggs, R. W. Sisterson, M. S. Shriver, L. Ellers-Kirk, C. Higginson, D. Holley, D. Gahant, L. J. Heckel, D. G. Carriere, Y. Dennehy, T. J. Brown J. K. and Tabashnik, B. E. 2003. Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100(9):5004-5009. DOI: .org/10.1073/pnas.0831036100
- Nakamura, K. Oshie, K. Shimizu, M. Takada, Y. Oeda, K. Ohkawa, H. 1990. Construction of chimeric insecticidal proteins between the 130-kDa and 135-kDa proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. aizawai for analysis of structure-function relationship. Agric Biol Chem. 54(3):715-724.
- NCBI. 2018. National Center for Biotechnology Information Disponible en: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastx&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome. Fecha de consulta: 06 de Agosto de 2018.
- NCBI. 2015. National Center for Biotechnology Information. Disponible en: <Http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=1428>. Fecha de consulta: 10 de agosto del 2018.
- Niu, Y., Meagher, Jr R. L., Yang, F., and Huang, F. 2013. Susceptibility of field populatons of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) from Florida and Puerto Rico to purified Cry1F and corn leaf tissue containing single and pyramided *Bt* genes. Florida Entomologist. 96: 701-713.
- Ortega, C. A. 1987. Insectos nocivos del maíz: una guía para su identificación en el campo. CIMMYT. Mexico, D.F. 106 Pp.
- Permingeat, H. y Margarit, E. 2005. Impacto ambiental de los cultivos genéticamente modificados: El caso de Maiz Bt Revista Investigaciones de la Facultad de Ciencias Agrarias. 7:33-44.
- Peterson, A. L. 1962. Larvae of insects. An introduction to nearctic species. Part-I Lepidoptera an plant infesting Hymenoptera. Columbus, Ohio. 315 Pp.
- Piña, S. y Solleiro, J. L. Mexico. En: Solleiro, R.J L. y Castañón, I. R. 2013. Introducción al ambiente del maíz transgénico: Análisis de ocho casos en Iberoamericana, México: AgroBio Mexico y CambioTec, Mexico. 341-410 Pp.
- Pogue, M. G. 2002. A world revision of the genus *S. frugiperda* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae). Memoirs American Entomological Society. 43: 202 Pp.
- Rausell, C. Muñoz-Garay, C. Miranda-Cassoluengo, R. Gomez, I. Rudino-Pinera, E. Soberon, M. y Bravo, A. 2004. Tryptophan spectroscopy studies and black lipid bilayer analysis indicate that the oligomeric structure of Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* is the membrane-insertion intermediate. *Biochemistry*. 43(1):166-174.
- Rodriguez, F. E. Zumalacarregui, R. J. M. Otero, C. A. Calleja, S. A. y De la Fuente, C. L. F. 2003. Lo que vd. Debe saber sobre los alimentos transgénicos (y organismos manipulados genéticamente). Cartilla de divulgación. Edicion Caja España. (14):68 Pp.
- Rodriguez, M., R. y C. De Leon. 2008. El cultivo del maíz. Temas selectos. 1ra ed. Editorial Colegio de Posgraduados, Mundi-Prensa Mexico. (1):29-45 Pp.
- Rodriguez, R. P. y Gonzalez, R. O. 2007. Plantas transgénicas: una revisión de los principales cultivos básicos en Mexico. e-Gnosis. 5(9):1-22. Disponible en: <http://www.e-gnosis.udg.mx/vol15/art9>.

- S.A.R.H. 1992. Guia fitosanitaria para el cultivo de maíz. Dirección de sanidad vegetal. Mexico.87 Pp.
- Schnepf, E. and Whiteley, H. R. 1981. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in Escherichia coli. Proceedings National Academy Sciences USA. 78 (5):2893-2897.
- Schnepf, E. Crickmore, N. Van Rie, J. Lereclus, D. Baum, J. Feitelson, J. Zeigler, D. R. and Dean, D. H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. Microbiology Molecular Biology Review. 62(3):775-806.
- Schnepf, H. E. Wong, H. C. Whiteley, H. R. 1985. The amino acid sequence of a crystal protein from *Bacillus thuringiensis* deduced from the DNA base sequence. Journal Biological Chemistry. 260(10):6264-6272.
- Shevelev, A. Svarinsky, M. Karasin, A. Kogan, Y. Chestukhina, G. Stepanov, V. 1993. Primary structure of cryX**, the novel delta- endotoxin-related gene from *Bacillus thuringiensis* spp. galleriae. FEBS Letters. 336(1):79-82.
- Silva, C. C. A. 2005a. Algodón genéticamente modificado. Editorial AGRO-BIO. Bogota, Colombia. 47 Pp.
- Silva, C. C. A. 2005b. Maiz genéticamente modificado. Editorial AGRO-BIO. Bogota, Colombia. 60 Pp.
- Sisterson, M. S. Carriere, Y. Dennehy, T. J. and Tabashnik, B. E. 2007. Nontarget Effects of Transgenic Insecticidal Crops: Implications of Source-sink Population Dynamics. Environmental Entomology 36(1):121-127.
- Smulevitch, S. V. Osterman, A. L. Shevelev, A. B. Kaluger, S. V. Karasin, A. L. Kadyrov, R. M. Zagnitko, O. P. Chestukhina, G. G. Stepanov, V. M. 1991. Nucleotide sequence of a novel deltaendotoxin gene crylg of *Bacillus thuringiensis* ssp. galleriae. FEBS Letters. 293(1):25-28.
- Soberon, M. y Bravo, A. 2008. Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación. En: Rebolledo, F y A. Lopez-Munguia (Eds.). 2008. Una ventana al quehacer científico, Instituto de Biotecnología de la UNAM 25 aniversario. Mexico, D.F. UNAM. 303-314 Pp.
- Storer, N. P. Babcock, J. M. Schlenz, M. Meade, T. Thompson, G. D. Bing, J. W. and Huckaba, R. M. 2010. Discovery and Characterization of Field Resistance to Bt Maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. Journals Economyc Entomology. 103(4):1031-1038.
- Tabashnik, B. E. Patin, A. L. Dennehy, T. J. Liu, Y. Carrière, Y. Sims, M. A. and Antilla, L. 2000a. Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* in field populations of pink bollworm. Proceedings National Academy Sciences. 97(24):12980-12984.
- Tabashnik, B.E. Mota-Sánchez, D. Whalon, M.E. Hollingworth R.M. and Carrière, Y. 2014. Defining terms for proactive management of resistance to Bt crops and pesticides. Journal Economic Entomology 107(2):496-507.
- Tabashnik, B. E. Gassmann, J. A. Crowder D. W. and Carrière. Y. 2008. Insect resistance to Bt. crops: evidence versus theory. Nature Biotechnology 26(3): 199-202.
- Tabashnik, B. E. Liu, Y. B. Unnithan, D. C.Carrière, Y. Dennehy T. J. and Morin, S. 2004. Shared genetic basis of resistance to Bt toxin Cry1Ac in independent strains of pink bollworm. Journal of Economic Entomology 97(3):721-726.

- Tabashnik, B. E. Malvar, T. Liu, Y. B. Finson, N. Borthakur, D. Shin, B. S. Park, S. H. Masson, L. De Maagd, R. A. and Bosch, D. 1996. Cross-Resistance of the Diamondback Moth Indicates Altered Interactions with Domain II of *Bacillus thuringiensis* Toxins. *Applied Environmental Microbiology*. 62(8):2839-2844.
- Tabashnik, B. E. Liu, Y. B. Finson, N. Masson L. and Heckel. D. G. 1997. One gene in diamondback moth confers resistance to four *Bacillus thuringiensis* toxins. *Proceedings National Academy Sciences* 94(5):1640–1644.
- Triplehorn, C.A. And Johnson, N.F. 2005. Borrr and DeLong's Introduction to the Study of Insects 7th edition, Thompson Brooks/Cole. USA 865 Pp.
- Vaeck, M. Reynaerts, A. Höfte, H. Jansens, S. De Beuckeleer, M. Dean, D. 1987. Transgenic plants protected from insect attack. *Nature*. 328:33-7.
- Van Rensburg, J. B. J. 2007. First report of field resistance by the stem borer, *Busseola fusca* (Fuller) to Bt-transgenic maize. *S. Afr. J. Plant Soil*. 24(3):147-151.
- Virla, E. G. Colomo, M. V. Berta, C. y Valverde, L. 1999. El complejo de parasitoides del "gusano cogollero" del maíz, *Spodoptera frugiperda*, en la República Argentina. *Neotropica* 45(4):3-12.
- Wasano, N. Ohba, M. Miyamoto, K. 2001. Two delta-endotoxin genes, cry9Da and a novel related gene, commonly occurring in Lepidoptera-specific *Bacillus thuringiensis* Japanese isolates that produce spherical parasporal inclusions. *Current Microbiology*. 42(2):129-33.
- Whiteley, H. Schnepf, H. 1986. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review Microbiology*. 40(1):549-576.
- Willink, E. Osore, V. M. y Costilla, M. A. 1993a. Daños, pérdidas y niveles de daño económico por *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) en maíz. *Revista Industrial y Agrícola De Tucumán*. 70(3):49-52.
- Willink, E. Osore, V. & Costilla, M. 1993b. El gusano "Cogollero": nivel de daño económico. *Avance Agroind*. 12(3):25-26.
- Xie, R. Zhuang, M. Ross, L. S. Gomez, I. Oltean, D. I. Bravo, A. Soberon M. and Gill, S. S. 2005. Single Amino Acid Mutations in the Cadherin Receptor from *Heliothis virescens* Affect Its Toxin Binding Ability to Cry1A Toxins. *Amer. Soc. Biochemistry Molecular Biology*. 280(9):8416-8425.
- Yang, F., Qureshi, J. A., Leonard, B. R., Head, G. P., Niu, Y. and Huang, F. 2013. Susceptibility of Louisiana and Florida populatons of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to pyramided *Bt* corn containing Genuity® VT Double Pro™ and SmartStax™ traits. *Florida Entomologist* 96: 714–723.
- Yang, Y. Chen, H. Wu, S. Yang, Y. Xu, X. Wu, Y. 2006. Identification and molecular detection of a deletion mutation responsible for a truncated cadherin of *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36. 735-740.
- Yang, Y. Chen, H. Yidong, Wu Yang, Y. Shuwen, Wu. 2007. Mutated Cadherin Alleles from a Field Population of *Helicoverpa armigera* Confer Resistance to *Bacillus thuringiensis* Toxin Cry1Ac. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(21): 6939-6944.
- Zenner de Polonia, I. Álvarez, R. J. A. Arévalo, M. H. A. Mejía C. R. y Bayona, R. M. A. 2008. Susceptibilidad de cuatro noctuidos plaga (Lepidoptera) al gene

- Cry1Ac del *Bacillus thuringiensis* incorporado al algodón. Revista Colombiana de Entomología 34(1):41-50.
- Zhang, H. Yin, W. Zhao, J. Jin, L. Yang, Y. Wu, S. Tabashnik B. E. and Wu, Y. 2011. Early Warning of Cotton Bollworm Resistance Associated with Intensive Planting of Bt Cotton in China. PLoS ONE 6(8): e22874. DOI: 10.1371/journal.pone.0022874.
- Zhao, J. Cao, J. Li, Y. Collins, H. Roush, R. Earle, E. 2003. Transgenic plants expressing two *Bacillus thuringiensis* toxins delay insect resistance evolution. National Biotechnology. 21:1493-7.
- Zhao, J. Jin, L. Yang, Y. Wu, Y. 2010. Diverse cadherin mutations conferring resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in *Helicoverpa armigera*. Insect Biochemistry and Molecular Biology 40(2):113-118.