

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



Evaluación de la Susceptibilidad a Toxinas Cry de Bt de Dos Poblaciones de  
*Spodoptera frugiperda* Provenientes del Estado de Coahuila

Por:

**ALBERTO FRUTOS HUERTA**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO**

Saltillo, Coahuila, México  
Diciembre, 2023

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA  
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

Evaluación de la Susceptibilidad a Toxinas Cry de Bt de Dos Poblaciones de  
*Spodoptera frugiperda* Provenientes del Estado de Coahuila

Por:

**ALBERTO FRUTOS HUERTA**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO**

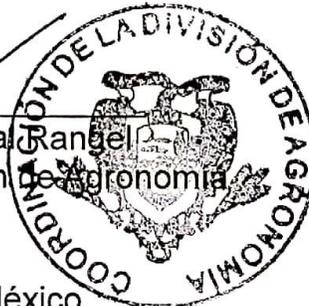
Aprobada por el Comité de Asesoría:

  
Dra. Miriam Sánchez Vega  
Asesor Principal

  
Dr. Agustín Hernández Juárez  
Coasesor

  
Ing. Esmeralda Amada Hernández López  
Coasesor

  
Dr. Alberto Sandoval Gangel  
Coordinador de la División de Agronomía



Saltillo, Coahuila, México  
Diciembre, 2023

## Declaración de no plagio

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

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

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

Pasante

  
\_\_\_\_\_  
**Alberto Frutos Huerta**

Asesor Principal

  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Miriam Sánchez Vega**

## AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por darme la oportunidad de culminar esta importante etapa de mi vida y permitirme cumplir una de mis tantas metas.

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro** por brindarme todos sus servicios y proporcionarme las herramientas necesarias para formarme como persona y profesionista.

**Dra. Miriam Sánchez Vega** por su valioso apoyo en la realización de este trabajo, por sus consejos y asesoría que me ayudaron a culminar esta etapa tan importante de mi carrera.

**Ing. Marcos Librado García Morales** por su valiosa ayuda que me brindo en la realización de este trabajo.

**Ing. Esmeralda Hernández López** por su paciencia y apoyo en la redacción y revisión en esta investigación, motivándome a esforzarme para cumplir mi meta.

A mi tía **Chuy Huerta** por darme ánimos cuando más los necesite y siempre darme su apoyo y su amistad, que junto con su esposo **Víctor** me abrieron las puertas de su casa en donde me dieron la oportunidad de vivir y me hicieron sentir muy cómodo.

A mis amigos con los que inicié este sueño **Fernanda, Pablo y Osvaldo** con los que pase grandes momentos, gracias por su apoyo y su amistad.

A los que fueron mis compañeros de cuarto y grandes amigos **Huevo, Chino, Cristino, Gera, Mario Heredia** gracias por todo su apoyo y los buenos momentos que pasamos juntos, como dijo Cristino “estamos para topar”.

Al **Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnologías** (CONAHCYT), ya que este trabajo forma parte de los resultados obtenidos en el Proyecto 1043: “Monitoreo de la resistencia de insectos a las Toxinas Cry de Bt”, del programa de Investigadoras e Investigadores por México (IxM), antes Cátedras CONACYT.

## DEDICATORIA

Dedico este logro a mis padres **Silvano Frutos Marín** y **Griselda Huerta Armas**, no hay palabras suficientes para agradecerles todo lo que han hecho por mí. Gracias por su amor incondicional, paciencia, apoyo y sacrificio para hacer posible mi educación.

A mi esposa **Isidora Huerta Cabrera** porque a pesar de que la distancia nos ha separado, ese no ha sido impedimento para darme tu apoyo y ánimos. La ayuda que me has brindado ha sido sumamente importante, estuviste a mi lado en los momentos y las situaciones más tormentosas, siempre ayudándome. Me ayudaste hasta donde te era posible, incluso más que eso. *Muchas gracias, Te amo.*

## ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	III
DEDICATORIA.....	IV
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	V
INDICE DE CUADROS .....	VII
INDICE DE FIGURAS.....	VIII
RESUMEN .....	IX
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Objetivos.....	3
1.1.1 Objetivo general.....	3
1.1.2 Objetivos específicos .....	3
1.2 Hipótesis.....	4
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
2.1 Importancia de los cultivos transgénicos .....	5
2.2 Tipos de cultivos transgénicos .....	5
2.3 Cultivos <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	7
2.4 Algodón <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	8
2.5 Características de las variedades de algodón Bollgard .....	8
2.5.1 Bollgard I.....	9
2.5.2 Bollgard II.....	9
2.6 Generalidades de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	10
2.7 Modo de acción de <i>B. thuringiensis</i> .....	10
2.8 Toxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	11
2.8.1 Toxinas Cry .....	11
2.8.2 Proteínas cristalinas Cyt .....	12
2.8.3 Proteínas Vip .....	12
2.8.4 Proteínas vegetativas Sip .....	13
2.9 Importancia de <i>Bacillus thuringiensis</i> en el control biológico....	13
2.10 Gusano cogollero <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	14
2.10.1 Generalidades .....	14
2.10.2 Clasificación taxonómica .....	14
2.10.3 Ciclo biológico .....	15
2.10.4 Hospedantes .....	16
2.11 Daños que ocasiona al algodón.....	16
2.12 Lepidópteros que controla <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	17
2.12.1 <i>Chloridea (=Heliothis) virescens</i> .....	17
2.12.2 <i>Helicoverpa zea</i> .....	17
2.12.3 <i>Pectinophora gossypiella</i> .....	18
2.13 Mecanismos de resistencia a la acción de proteínas Cry.....	19

2.13.1	Resistencia por proteólisis de la toxina .....	20
2.13.2	Resistencia por ausencia de receptor .....	20
2.14	<b>Casos de resistencia de lepidópteros a las toxinas Cry.....</b>	<b>21</b>
<b>III.</b>	<b>MATERLIALES Y METODOS .....</b>	<b>23</b>
3.1	Poblaciones de <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	23
3.2	Población Saltillo (línea susceptible a las toxinas Cry de Bt).....	23
3.3	Población San Pedro (línea presuntamente resistente a las toxinas Cry de Bt).....	24
3.4	Protocolo para las colectas en campo.....	24
3.5	Manejo de insectos en laboratorio .....	25
3.6	Establecimiento del cultivo de algodón.....	27
3.7	Material vegetal .....	28
3.8	Establecimientos de bioensayos.....	28
3.9	Evaluación y toma de datos.....	29
3.10	Análisis estadístico.....	29
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>31</b>
4.1	Análisis de varianza.....	31
4.2	Análisis por población de gusano cogollero.....	31
4.2.1	Población San Pedro .....	31
4.2.2	Población Saltillo .....	33
4.3	Comparación entre las dos poblaciones .....	35
4.4	Análisis por variedad de algodón.....	36
4.5	Análisis por población de <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	38
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIÓN .....</b>	<b>42</b>
<b>VI.</b>	<b>LITERATURA CONSULTADA.....</b>	<b>43</b>

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Colectas de material genético perteneciente a Saltillo, Coahuila, México, 2020.....	23
<b>Cuadro 2.</b> Recolectas de material genético para establecimiento de líneas presuntamente resistentes a las toxinas Cry del Bt, de la región norte del país Coahuila y Chihuahua.....	24
<b>Cuadro 3.</b> Dieta artificial que contiene los requerimientos nutricionales necesarios para el adecuado crecimiento y desarrollo de larvas y adultos de lepidópteros (POPDieta-IMAmt2019). .....	26
<b>Cuadro 4.</b> Características de los bioensayos establecidos para determinar la susceptibilidad a toxinas Cry de <i>Bt</i> en dos poblaciones de <i>S. frugiperda</i> , sometidas a dieta vegetal proveniente de híbridos de algodón GM.....	29

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema del modo de acción de <i>Bacillus thuringiensis</i> (Schünemann et al., 2014). .....	11
<b>Figura 2.</b> Ciclo biológico de <i>Spodoptera frugiperda</i> . Fotografías adjuntas por DGSV-CNRF, (2020). .....	15
<b>Figura 3.</b> Jaula con hule de cristal, tipo cámara climática, para la cría de las poblaciones de <i>S. frugiperda</i> .....	25
<b>Figura 4.</b> Mortalidad de <i>Spodoptera frugiperda</i> , expresada en cada una de las variedades de algodón. Datos con la misma letra no son significativamente diferentes. ....	31
<b>Figura 5.</b> Comportamiento de las cinco variedades de algodón GM en la población de <i>Spodoptera frugiperda</i> proveniente de San Pedro, Coahuila, México.....	32
<b>Figura 6.</b> Comportamiento de las cinco variedades de algodón GM en la población de <i>Spodoptera frugiperda</i> proveniente de Saltillo, Coahuila, México. ....	34
<b>Figura 7.</b> Porcentaje de mortalidad acumulada y por día de las poblaciones de <i>Spodoptera frugiperda</i> de San Pedro y Saltillo, Coahuila, México. ....	36
<b>Figura 8.</b> Expresión de la mortalidad de larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> , en la evaluación de susceptibilidad a variedades de algodón GM en las líneas FiberMax®. ....	37
<b>Figura 9.</b> Expresión de la mortalidad de larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> , en la evaluación de susceptibilidad a variedades de algodón GM en las líneas DeltaPine®.....	37
<b>Figura 10.</b> Comportamiento de <i>Spodoptera frugiperda</i> en cada una de las variedades de algodón GM en la población de San Pedro. ....	39
<b>Figura 11.</b> Comportamiento de <i>Spodoptera frugiperda</i> en cada una de las variedades de algodón GM en la población de Saltillo.....	40
<b>Figura 12.</b> Comparación del efecto de las variedades FiberMax® de algodón GM en dos poblaciones de <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	41
<b>Figura 13.</b> Comparación del efecto de las variedades DeltaPine® de algodón GM en dos poblaciones de <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	41

## RESUMEN

En México se siembran alrededor de 200,000 ha de algodón, en los estados de Chihuahua, Baja California, Coahuila, Tamaulipas, Durango, Sonora y Sinaloa. El 96% de la semilla utilizada se importa y corresponde a variedades genéticamente modificadas (GM). El algodón *Bt* es una variedad de algodón GM que expresa una toxina insecticida producida por la bacteria *Bacillus thuringiensis* y es conocida como toxina Cry, es letal para ciertas plagas de insectos como los lepidópteros que afectan al cultivo de algodón. En el estado de Coahuila se cultiva algodón GM, el cual en su mayoría contiene las toxinas Cry1Ac y Cry2Ab que le transfiere la resistencia a plagas de lepidópteros. En esta investigación se evaluaron dos poblaciones de *Spodoptera frugiperda* provenientes de San Pedro y Saltillo, Coahuila, México, con el objetivo de determinar el efecto de las toxinas Cry, mediante dieta vegetal con algodón *Bt*. Para la disponibilidad del material vegetal, se establecieron en el invernadero cinco híbridos de algodón GM y las colonias del gusano cogollero se incrementaron y criaron hasta la primera generación filial; para después establecer los bioensayos en laboratorio, bajo un diseño experimental completamente al azar con seis repeticiones y como unidad experimental se consideraron cuatro larvas, los bioensayos se establecieron en los meses de julio y agosto del 2020, con un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad y con una temperatura promedio de 24°C ±1, a una humedad relativa de 50%, en promedio; las evaluaciones se realizaron cada 24 horas por siete días y se evaluó el número de larvas muertas. Como parte de los resultados obtenidos en este estudio se encontraron diferencias altamente significativas entre tratamientos y localidades, en la mortalidad total, con una confiabilidad del 99% ( $\alpha \leq 0.01$ ). En cuanto a la variedad de algodón la más efectiva para el control de *S. frugiperda* fue la FM2334. Las variedades de la línea comercial DeltaPine®, no presentaron alto porcentaje de mortalidad, con respecto a la línea FiberMax®, mientras que el híbrido convencional registró el mayor porcentaje de supervivencia aproximadamente de 98%.

**Palabras clave:** *Bacillus thuringiensis*, larvas, gusano cogollero, mortalidad, lepidópteros

## I. INTRODUCCIÓN

En México, en los estados del norte el país, como Baja California, Sonora, Chihuahua, Tamaulipas y especialmente en la región de La Laguna en el estado de Coahuila y Durango, desde hace más de 20 años, se han cultivado diversas variedades de algodón transgénico (*Gossypium hirsutum* L.), las cuales han sido establecidas en tres cuartas partes de lotes comerciales, mientras que en el área restante se siembra algodón no transgénico; esta circunstancia implica sin duda un efecto en la evolución de las poblaciones de insectos plaga específicos y pudiera afectar a la diversidad genética de insectos plaga de otros cultivos (Guzmán-Morales *et al.*, (2018). El algodón genéticamente modificado es el cultivo de mayor expansión en el país y con el que México cuenta con mayor experiencia, ya que es uno de los países pioneros en el uso del cultivo desde el año 1996, cuando se iniciaron las primeras pruebas experimentales con algodón transgénico (Gutiérrez *et al.*, 2015).

En los siguientes años, numerosos cultivos han sido genéticamente modificados y comercializados alrededor del mundo con diferentes características y rasgos genéticos, incluyendo principalmente resistencia a herbicidas y tolerancia a insectos. El control de insectos plaga es muy importante en la agricultura, no sólo por la razón obvia de que los insectos se alimentan de los cultivos, sino además porque son vectores de importantes enfermedades causadas por virus, bacterias, protozoarios y hongos. De manera generalizada, los insectos se controlan con la aplicación de sustancias químicas, potencialmente tóxicas para otros insectos no blanco, animales y humanos (Galeano *et al.*, 2015).

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

La introducción de genes de esta bacteria a plantas es una tecnología muy común empleada para el control de plagas de varios cultivos, entre los que destacan el algodón y maíz, de esta forma las plantas pueden defenderse al producir toxinas de manera natural y efectiva contra el ataque de larvas de lepidópteros (Galeano *et al.*, 2015).

Los lepidópteros son una de las plagas de mayor importancia en la agricultura y son el objetivo principal a la cual se destinó el mejoramiento de cultivos mediante la ingeniería genética; las toxinas Cry en los cultivos *B. thuringiensis*, como el algodón, matan plagas clave del Orden Lepidoptera como *Chloridea (=Heliothis) virescens* (Fabricius), *Pectinophora gossypiella* (Saunders), *Helicoverpa zea* (Boddie) y *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), esta última especie es la principal plaga de maíz en nuestro país, así como en América del Sur y del Norte (Aranda *et al.*, 1996; Blanco *et al.*, 2010).

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

La alta presión de selección a causa de las toxinas Cry de Bt en los campos de México donde hay producción de algodón lleva más de 20 años, interaccionando con los insectos plaga de este cultivo y de los cultivos hospederos o alternos, de acuerdo a lo anterior, se cree que las poblaciones de lepidópteros a las que va destinada los cultivos Bt, han adquirido resistencia, por ello en el presente trabajo, se realizó una evaluación de dos poblaciones de *S. frugiperda*, colectadas en la región norte del país y que fueron sometidas a dieta vegetal de algodón Bt, con la finalidad de determinar si dichas poblaciones aún presentan sensibilidad al algodón transgénico que se produce en la zona Lagunera del estado de Coahuila, México, reconocida, por su alta producción en este cultivo.

## 1.1 Objetivos

### 1.1.1 Objetivo general

Determinar el efecto de las toxinas Cry, mediante dieta vegetal con algodón *Bt* en dos poblaciones de gusano cogollero *Spodoptera frugiperda*, obtenidas en la región norte del país.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Evaluar la susceptibilidad a la dieta vegetal de algodón *Bt* en una población de gusano cogollero *S. frugiperda* obtenida de la región lagunera (San Pedro, Coahuila, México), para determinar si existe efecto de las toxinas Cry sobre dicha población.
- Evaluar la susceptibilidad a la dieta vegetal de algodón *Bt* en una población de gusano cogollero *S. frugiperda* obtenida en la zona sur del estado de Coahuila, México (Saltillo) para determinar si existe efecto de las toxinas Cry sobre dicha población.
- Comparar los efectos de la dieta vegetal de algodón *Bt*, entre las dos poblaciones de cogollero *S. frugiperda* evaluados en condiciones artificiales de laboratorio.
- Evaluar cinco variedades de algodón *Bt*, sobre dos poblaciones de gusano cogollero *S. frugiperda* y definir en qué material existe mayor susceptibilidad en los individuos de las poblaciones de esta plaga.

## **1.2 Hipótesis**

Las poblaciones de gusano cogollero *S. frugiperda*, presentan susceptibilidad a las toxinas Cry, proporcionadas mediante dieta vegetal en condiciones artificiales de laboratorio, por lo que las variedades de algodón *Bt* en campo aún son efectivas.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Importancia de los cultivos transgénicos

Los cultivos transgénicos incrementan el rendimiento (por lo que no es necesario ampliar terreno agrícola), disminuyen el uso de agroquímicos y reducen la pérdida de cosechas. La importancia que tiene la diversidad genética en el mejoramiento de los cultivos, investigadores de todo el mundo comenzaron a plantearse la idea de hacer un uso más amplio de esta diversidad y decidieron incluir en los cultivos genes no sólo de los parientes silvestres, sino de plantas menos cercanas genéticamente, o incluso de organismos no vegetales (Robledo, 2014). También, las nuevas técnicas permiten cosechas tolerantes a sequía y se está avanzando en la investigación que permitirá la resistencia a metales pesados y al aluminio, muy común en suelos ácidos de los trópicos. Esto último dará alimento a zonas donde se concentra pobreza, ecosistemas frágiles. La modificación genética de muchos vegetales para provocar su resistencia a uno o varios órdenes de insectos ha permitido un menor uso de insecticidas en los campos lo que supone una mejora del cultivo y de la salud de los trabajadores que lo manipulan, permitiendo así la vuelta de los insectos beneficiosos para el campo (Pérez, 2016).

### 2.2 Tipos de cultivos transgénicos

Los dos rasgos principales que se han introducido a los cultivos GM liberados comercialmente son resistencia a insectos y tolerancia a herbicidas. Unos pocos cultivos han sido liberados con la característica de resistencia a virus como tal es el caso de papaya, papa y calabaza (CERA, 2010; Chaparro, 2011).

La fuente de toxinas insecticidas producidas por plantas transgénicas comerciales, es la bacteria del suelo *B. thuringiensis*. Las cepas *Bt* muestran diferentes efectos de su actividad insecticida hacia insectos plagas, y constituye una reserva de genes

que codifican para proteínas insecticidas, las cuales son acumuladas en inclusiones cristalinas producidas en la esporulación bacteriana (proteínas Cry o Cyt) o expresadas durante el crecimiento bacteriano (proteínas Vip). Diferentes genes derivados de *Bt* han sido transferidos exitosamente a algodón, maíz, tomate y papa (Gatehouse, 2008; CERA, 2010; Chaparro, 2011).

La enzima 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS) es parte de la vía del shikimato que resulta en la producción de aminoácidos aromáticos y otros compuestos aromáticos en plantas. Cuando las plantas convencionales son tratadas con el herbicida glifosato, éstas no pueden producir los aminoácidos aromáticos que necesitan para sobrevivir. La enzima está presente en todas las plantas, bacterias y hongos, pero no en animales los cuales no sintetizan sus propios aminoácidos aromáticos. Debido a que la vía de biosíntesis de aminoácidos aromáticos no existe en mamíferos, aves y peces, glifosato no causa toxicidad en estos organismos. La enzima EPSPS esta normalmente presente en alimentos derivados de fuentes vegetales y bacterianas. Las variedades GM de soya contienen una forma de EPSPS tolerante a glifosato aislada de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* (Smith & Townsend, 1907) cepa CP4 (cp4 epsps). El gene que codifica para esta enzima fue transferido al genoma de la planta, confiriéndole la característica de tolerancia al herbicida. El mismo gene fue posteriormente introducido a maíz, algodón, remolacha azucarera, colza o canola, nabo, achicoria, clavel, lino, alfalfa, tabaco, arroz y trigo (Williams *et al.*, 2000; CERA, 2010; Chaparro, 2011).

La tolerancia al herbicida glufosinato de amonio (PPT) es otro rasgo GM transferido a cultivos agrícolas, mediante la introducción del gen pat derivado de la bacteria común del suelo *Streptomyces viridochromogenes* y que codifica una enzima PPT-acetiltransferasa. El herbicida PPT normalmente actúa inhibiendo la enzima glutamina sintetasa, lo que causa acumulación anormal de amonio en plantas. La forma acetilada de PPT es inactiva. Este rasgo ha sido transferido exitosamente a varios cultivos: remolacha azucarera, canola, soya, arroz y maíz. La tecnología de

tolerancia a herbicidas proporciona a los agricultores un sistema alternativo que efectivamente controla un espectro amplio de malezas, incluyendo aquellas de difícil control. La tecnología reduce la cantidad de herbicida necesaria para el control de malezas, maximiza la disponibilidad de agua y nutrientes para las plantas de las variedades GM y reduce el consumo de recursos agrícolas en el campo. Todo ello significa menos uso de maquinaria y equipo, así como menos esfuerzo para los agricultores (Oberdoerfer *et al.*, 2005; CERA, 2010; Chaparro, 2011).

### **2.3 Cultivos *Bacillus thuringiensis***

La ingeniería genética desarrolló muchas especies de plantas que expresan genes *cry* de *B. thuringiensis* y las convirtió así en "plantas insecticidas". Comúnmente se hace referencia a este tipo de plantas como "plantas o cultivos *Bt*" por ejemplo, maíz *Bt*, algodón *Bt*, etc. (Vaeck *et al.*, 1987; Sauka & Benintende, 2008).

La compañía Plant Genetic Systems de Bélgica desarrolló en 1985 la primera planta transgénica de tabaco portadora de genes *cry*. La primera plantación con un cultivo transgénico en los Estados Unidos se llevó a cabo en el año de 1994, cuando la agencia para la protección ambiental (EPA) aprobó el cultivo de papa *Bt*, y en 1996 se comenzó la producción a gran escala de este tipo de cultivos. El primer cultivo con genes *cry* que se comercializó fue el maíz, y posteriormente fueron liberadas muchas variedades resistentes a insectos como papa-*Bt*, soya-*Bt* y algodón-*Bt*, entre otros (Portela-Dussán *et al.*, 2013).

En 1995, la Secretaría de Salud en México aprobó la introducción de papa y jitomate genéticamente modificados. En 1996 aprobó la siembra de algodón resistente a insectos en el Norte del país; y a partir del año 2009 se cultiva algodón transgénico sobre una superficie superior a las 100 mil hectáreas y con una producción de unas 500 mil toneladas por cosecha, en los Estados de Chihuahua, Durango y Sonora (Denise, 2014).

México y una veintena de países con economías emergentes se sumaron a esta nueva era agro-biotecnológica, con el objeto de favorecer la producción de granos y semillas de oleaginosas y asegurar la demanda de la población (Reyes & Cantú, 2004; Bravo, 2013; Denise, 2014).

## **2.4 Algodón *Bacillus thuringiensis***

El algodón *Bt* comercial expresa genes de la bacteria *B. thuringiensis* como fuente de toxina insecticida, esta cepa presenta diferentes efectos en su actividad hacia insectos plagas y constituye una reserva de genes que codifican para proteínas insecticidas (Silva, 2005; García *et al.*, 2017).

Los eventos biotecnológicos autorizados para liberación comercial de algodón GM en México confieren resistencia a lepidópteros y tolerancia a herbicidas como glifosato, glufosinato de amonio y dicamba. Estos se comercializan por dos empresas: Bayer®, a través de su marca DeltaPine®, y BASF®, con las marcas FiberMax® y Stoneville®. Estas empresas producen su semilla fuera de México, por lo que se depende de la importación (Herrera & Loza, 2011).

De los tipos de transgénicos actualmente disponibles para producción comercial, dos ofrecen tolerancia a herbicida y uno es resistente a gusanos del orden Lepidoptera (*Bt*). Para que la proteína sea eficaz, el insecto en cuestión debe ingerir la proteína Cry de *Bt*, por lo que las variedades de algodón la expresan como parte de su genoma (De Jesus *et al.*, 2014).

## **2.5 Características de las variedades de algodón Bollgard**

En 1997 se introdujeron variedades con genes "apilados" que ofrecen resistencia a los herbicidas y que incorporan el gen *Bt*, se conocen como Bollgard. La primera generación de algodón *Bt* fue diseñada para disminuir el uso de plaguicidas y

controlar plagas principales de lepidópteros. La segunda generación de tecnología Bollgard tiene la finalidad de prevenir otros daños causados por otras plagas y elimina la necesidad de fumigaciones complementarias, necesarias habitualmente para las variedades de la primera generación (De Jesus *et al.*, 2014).

### **2.5.1 Bollgard I**

Las variedades de algodón Bollgard I, son conocidas como de primera generación e incluyen materiales con resistencia a herbicidas y lepidópteros, tal es el caso de la variedad NuOPAL RR, que expresa tolerancia a herbicidas y una proteína *Bt* Cry1Ac, es decir resistencia a lepidópteros; este tipo de variedades de algodón GM, están disponibles en el mercado y están diseñadas, para disminuir el uso de plaguicidas y controlar gran número de insecto plaga, tales como lepidópteros, entre ellos: gusano rosado *P. gossypiella* (Saunders), gusano cogollero *S. frugiperda* (J.E. Smith), complejo bellotero (*Helicoverpa zea* Boddie, *C. virescens* Fabricius, *Helicoverpa armigera* Hübner), entre otros (Aguilar-Medel *et al.*, 2018).

### **2.5.2 Bollgard II**

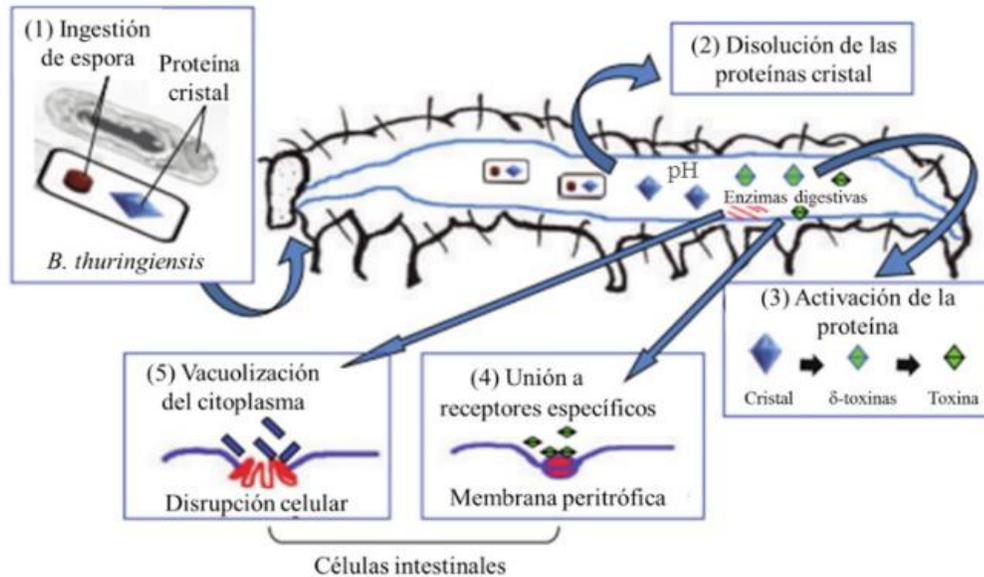
Estas variedades híbridas contienen genes apilados y poseen tolerancia al herbicida glifosato, también resistencia a lepidópteros, la cual esta conferida por la expresión de genes cp4 epsps de *Agrobacterium sp.* Cepa CP4 y para los genes Cry1Ac y Cry2Ab de *B. thuringiensis*. Con respecto al contenido genético de este tipo de híbridos, es decir, que expresan la proteína CP4 EPSPS y las toxinas Cry1Ac y Cry2Ab, no se han demostrado efectos sobre el metabolismo de las plantas y tampoco que las características acumuladas en las variedades hagan algún efecto interactivo o sinérgico sobre las plantas, y de esta forma haya varios mecanismos de acción (Villalba, 2009).

## 2.6 Generalidades de *Bacillus thuringiensis*

La especie *Bacillus thuringiensis* es una bacteria que habita en el suelo y cuando está en la fase de esporulación la proteína produce enormes cantidades hasta formar un cristal geométrico (Ruiz, 2015). Es un bacilo gram positivo, de flagelación peritrica, que mide de 3 a 5  $\mu\text{m}$  de largo por 1 a 1.2  $\mu\text{m}$  de ancho. (Gordon *et al.*, 1973; Sauka & Benintende, 2008). Esta bacteria es utilizada como un insecticida biológico que se aplica en todo el mundo para lepidópteros o vectores, principalmente. Es capaz de fermentar glucosa, fructosa, trealosa, maltosa y ribosa, y de hidrolizar gelatina, almidón, glucógeno, esculina y N-acetil-glucosamina. Su característica principal es la síntesis de proteínas que afectan insectos y que durante la esporulación se producen llamada delta-endotoxina (proteínas Cry) (Suárez-Machín *et al.*, 2016).

## 2.7 Modo de acción de *B. thuringiensis*

Las proteínas son ingeridas por las larvas de los insectos al alimentarse de la planta; estos insectos tienen un intestino medio alcalino, lo que favorece la solubilización del cristal y su procesamiento. Es importante destacar que las proteínas Cry son muy específicas para determinadas especies de insectos, siendo completamente inocuas para otros animales, incluyendo el humano, debido a que nuestro estómago es ácido (contrario al pH alcalino del insecto). Las proteínas Cry se adhieren al epitelio intestinal del insecto de forma cooperativa (Figura 1), de manera que ocho proteínas forman un anillo, creando un poro en el intestino lo que causa la ruptura de la proteína *Bt* en numerosos sitios. El contenido alcalino del intestino se vierte a la hemolinfa del insecto, causando un daño irreversible, llevando a un desbalance de iones y a la parálisis del sistema digestivo. El insecto muere a los pocos días por el cambio brusco de pH en su hemolinfa y por una infección generalizada al reproducirse la bacteria *Bt* y otras bacterias de su flora intestinal que provoca la muerte de la larva en pocos días (Gutiérrez *et al.*, 2015).



**Figura 1.** Esquema del modo de acción de *Bacillus thuringiensis* (Schünemann *et al.*, 2014).

## 2.8 Toxinas de *Bacillus thuringiensis*

La bacteria *B. thuringiensis* produce una gran diversidad de toxinas activas frente a plagas de insectos. Las toxinas producidas por esta especie de bacteria difieren en función de la fase de crecimiento del cultivo; en la fase de crecimiento exponencial, por lo que *B. thuringiensis* produce toxinas que se secretan al medio de cultivo, como son las proteínas Vip1/2, Vip3 y Sip. En cambio, durante la fase de crecimiento estacionario, *B. thuringiensis* produce toxinas en inclusiones parasporales, por ejemplo, las proteínas Cry y Cyt (Gomis, 2019).

### 2.8.1 Toxinas Cry

Cuando la toxina se activa se reconoce por el receptor específico y se introduce a la membrana del sistema digestivo de la larva, es ahí cuando pasa una oligomerización que es en forma de canales catiónicos de 0.5 a 1.0 nm de diámetro. Los poros causan un influjo que no es específico para los iones, principalmente los  $K^+$ , que dispersa los gradientes iónicos y disminuye el pH del insecto, lo que provoca una lisis celular osmótica que evita que la larva se alimente. Por otro lado, cuando

se destruye los tejidos del insecto se mezcla el contenido que está en el tubo digestivo con la hemolinfa, que junto con el pH bajo ayudan a la germinación de las esporas de la bacteria, que conduce a una septicemia y posteriormente la muerte de la larva a pocos días que lo hayan consumido (Castañet-Martínez & Moreno-Reyes, 2016).

### **2.8.2 Proteínas cristalinas Cyt**

Las proteínas Cyt se encuentran en el cristal parasporal producido por *Bt* y son activas contra dípteros. Estas proteínas presentan actividad citolítica en ensayos *in vitro*, de manera que las proteínas Cyt rompen las células del intestino por su actividad citolítica y no formando poros como las proteínas Cry (Chengchen *et al.*, 2014). Hasta el momento, los miembros conocidos de las proteínas Cyt incluyen las familias de proteínas Cyt1, Cyt2 y Cyt3.

### **2.8.3 Proteínas Vip**

Las Vip son proteínas insecticidas no relacionadas con las Cry que no forman inclusiones cristalinas y que se secretan al medio durante el crecimiento vegetativo de la bacteria (Estruch *et al.*, 1996; Sauka & Benintende, 2008). Incluyen la toxina binaria Vip1 y Vip2 con especificidad para coleópteros y la toxina Vip3 con especificidad para lepidópteros (Estruch *et al.*, 1996; Warren, 1997; Warren *et al.*, 1998; Sauka & Benintende, 2008). Existen en la actualidad 40 genes vip3 distintos clasificados en 2 clases (A y B), que codifican para proteínas de aproximadamente 88 kilodalton (kDa) (Estruch *et al.*, 1996; Sauka & Benintende, 2008). Si bien las Vip3 compartirían algunas etapas en el modo de acción con las Cry, utilizarían distintos receptores (Lee *et al.*, 2003; Sauka & Benintende, 2008).

#### **2.8.4 Proteínas vegetativas Sip**

Las proteínas Sip, Sip1Aa y Sip1Ab, muestran toxicidad contra coleópteros. (Donovan *et al.*, 2006; Sha *et al.*, 2018). Las proteínas Sip1Aa y Sip1Ab presentan un tamaño de ~41 kDa. (Sha *et al.*, 2018). Se cree que la toxicidad debida a las proteínas Sip1 puede ser causada por la formación de poros en la membrana celular. No obstante, el modo de acción de las proteínas Sip aún sigue siendo desconocido (Palma *et al.*, 2014).

#### **2.9 Importancia de *Bacillus thuringiensis* en el control biológico**

Entre los microorganismos de importancia biotecnológica, *B. thuringiensis* destaca por ser utilizado en el control biológico de plagas en diversos cultivos agrícolas (maíz, papa, algodón, caña de azúcar, hortalizas, plantas ornamentales, etc.) y es uno de los de los más utilizados debido a su capacidad de control e invasión fitopatógena en larvas de lepidópteros, coleópteros, nematodos, ácaros y protozoos (Portela-Dussán *et al.*, 2013).

La bacteria *B. thuringiensis* presenta propiedades químicas que la convierten en un entomopatógeno ideal para proteger cultivos agrícolas, ya que no tiene impacto negativo sobre el medio ambiente ni la salud humana, al actuar exclusivamente sobre plagas específicas sin producir residuos en cosechas. Gracias a los diversos estudios realizados sobre las proteínas Cry de *Bt* se ha logrado el desarrollo y mantenimiento de plantas transgénicas que expresan naturalmente estos genes, produciendo continuamente toxinas que quedan en el tejido vegetal para ser consumidas por diversas plagas, resultando en altos beneficios porque gracias a ellos es posible reducir los productos químicos, bajando así los costos de producción y obteniendo un modelo agrícola sostenible (Bravo, 2021).

## 2.10 Gusano cogollero *Spodoptera frugiperda*

### 2.10.1 Generalidades

La especie *S. frugiperda* es conocida como “gusano cogollero” (por el daño que causa a la planta de maíz en el cogollo) si sus alimentos se hacen escasos, las larvas se hospedan en otros cultivos desplazándose en masa, como un gran grupo de larvas (Casmuz *et al.*, 2010).

Esta plaga se encuentra distribuida en todas las regiones agrícolas tropicales y subtropicales del continente americano. En México se localiza prácticamente en todas las regiones en donde se cultiva maíz, aunque sus daños son más severos en el trópico y subtrópico (Rodríguez & De León, 2008).

En el cultivo de algodón es considerada una plaga esporádica, pero de gran impacto económico. Generalmente, las poblaciones se originan en el maíz o en algunas pasturas antes de migrar al algodón (Adamczyk *et al.*, 1997).

### 2.10.2 Clasificación taxonómica

La especie *S. frugiperda*, fue citada por (Casmuz *et al.*, 2010).

Reino: Animalia

Phylum: Arthropoda

Clase: Insecta

Orden: Lepidoptera

Familia: Noctuidae

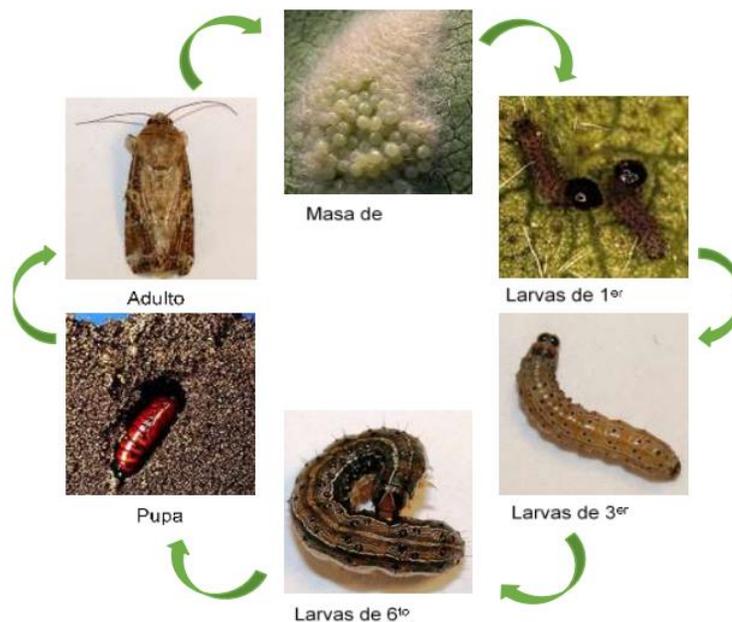
Género: *Spodoptera*

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

### 2.10.3 Ciclo biológico

El gusano cogollero tiene varias generaciones por año, su ciclo biológico consiste en huevo, larva (seis o siete estadios), pupa y adulto (Hardke *et al.*, 2015). El ciclo de vida lo completan en 30 días durante el verano, más de 60 días en primavera y otoño, y de 80 a 90 días durante el invierno (Capinera, 2020).

La duración en el estado de huevo es de dos a tres días en los meses de verano. Una vez que el huevo eclosiona, el número de instares por los que pasa la larva depende de la planta hospedante de la cual se alimenten, por ejemplo, en maíz comúnmente tiene seis instares. En prepupa duran en promedio dos días. Para pupar se entierran en el suelo, donde forman una cámara pupal en la cual permanecen de 10 a 15 días aproximadamente, la profundidad de la pupación depende de factores como la textura, humedad y temperatura del suelo. Posteriormente emergen como adultos (Luginbill, 1928; Hardke *et al.*, 2015). En algodón la etapa larval tarda 22 días para desarrollarse a 25 °C (Pitre & Hogg, 1983; Figura 2).



**Figura 2.** Ciclo biológico de *Spodoptera frugiperda*. Fotografías adjuntas por DGSV-CNRF, (2020).

#### **2.10.4 Hospedantes**

Además de algodón y maíz esta plaga puede afectar otros cultivos como sorgo, arroz, caña de azúcar, pastos, algunas leguminosas como frijol, alfalfa, soya y cacahuete y cultivos hortícolas como chile, papa, jitomate, alcachofa, cebolla, pepino, col y camote (Alonso-Amaro *et al.*, 2019).

#### **2.11 Daños que ocasiona al algodón**

La característica más distintiva de la especie es que puede causar daños en el algodón en todo el ciclo del cultivo. Cuando las plantas emergen, las larvas cortan a la altura del cuello, provocando la muerte. En plantas más desarrolladas y en general de cualquier edad, se alimentan del follaje. Cuando los tallos están más engrosados penetran por el brote terminal y barrenan hacia abajo. Este tipo de daño se manifiesta en los campos por un gran número de tallos marchitos, comenzando por el brote apical. Una vez que aparecen los primeros órganos de fructificación (botones, flores y cápsulas), raspan las brácteas y las marchitan, comen los pistilos, pétalos y polen de las flores. Finalmente perforan y comen el interior de los botones, flores y cápsulas (Bentancourt & Scatoni, 1996; Casmuz *et al.*, 2010).

El umbral económico para emitir estrategias de manejo y control para esta plaga se basa en el número de larvas por superficie o el número de larvas en 100 flores o cápsulas; cuando actúa como cortadora es de dos larvas por metro lineal de surco, mientras que cuando actúa como “capullera” es de 5 a 10% de órganos fructíferos dañados. Para las otras especies de *Spodoptera*, aún no se conoce el umbral económico (Casuso *et al.*, 2016).

## 2.12 Lepidópteros que controla *Bacillus thuringiensis*

### 2.12.1 *Chloridea (=Heliothis) virescens*

El gusano del tabaco o también conocido como gusano bellotero *C. virescens* (Lepidoptera: Noctuidae), es una plaga polífaga que tiene la capacidad de alimentarse de más de 100 especies de plantas (Blanco *et al.*, 2008). *C. virescens* es considerada una de las plagas más importantes del algodón, aunque puede alimentarse de otros cultivos, como garbanzo, tabaco, tomate, soja y girasol (Terán-Vargas *et al.*, 2005).

El insecto *C. virescens*, ha sido responsable de importantes pérdidas económicas, contaminación ambiental y un gran desafío en la economía, para los investigadores y los productores de algodón y tabaco de los Estados Unidos durante la mayor parte de los últimos doscientos años. El algodón *Bt*, transformado para producir proteínas insecticidas a partir de *B. thuringiensis*, es ahora uno de los elementos más importantes de la gestión del *C. virescens* en el algodón estadounidense (Blanco, 2012). Esta plaga es capaz de causar el 100% de pérdida en algodónero al destruir cuadros, flores y bellotas, además puede atacar porciones tiernas de hojas y otras partes vegetativas de crecimiento (Loera *et al.*, 2008).

### 2.12.2 *Helicoverpa zea*

La plaga polífaga *H. zea*, permanece activa todo al año e infesta una gran variedad de cultivos (Blanco *et al.*, 2007). Dada su naturaleza alimenticia puede ser identificada con diferentes nombres comunes; gusano elotero del maíz, gusano bellotero, gusano del tomate, gusano de la vaina de soja, gusano de sorgo, gusano algodónero entre otros. A pesar de la gran cantidad de hospederos silvestres, el gusano elotero es una plaga importante de una gran variedad de plantas cultivadas, especialmente de algodón y maíz (Molina-Ochoa *et al.*, 2010).

En el cultivo de algodón, *H. zea* causa daños al capullo, las flores y las cápsulas jóvenes son atacados, y las larvas excavan el interior. Los brotes y las hojas jóvenes también pueden ser dañadas, especialmente en ausencia de estructuras fructíferas (DGSV-CNRF, 2020).

La devastación de cultivos a causa del lepidóptero *Helicoverpa zea* constituye un problema agrícola ya que causa pérdidas parciales o totales de frutos y semillas de interés comercial, resultando en muchos casos pérdidas económicas importantes (Molina-Ochoa *et al.*, 2010).

En el caso del algodón genéticamente modificado (si autorizado en México bajo las regulaciones oficiales), se ha encontrado que la alimentación con toxinas Cry1A en larvas de primero a cuarto instar de *H. zea* es altamente tóxica, pero no para larvas del quinto instar, por lo que estas últimas larvas pueden provocar daños y lesiones en el algodón *Bt* (DGSV-CNRF, 2020).

En el mercado hay una gran cantidad de proteínas Cry usadas para el control de insectos plaga. Sin embargo, para el control del gusano bellotero *H. zea* los productos transgénicos contienen los genes cry1Ab, cry1Ac, cry2Ab, cry3Bb1, cry1F y cry1Fa (Sauka y Benintende, 2008).

### **2.12.3 *Pectinophora gossypiella***

El gusano rosado *P. gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera: Gelechiidae) se considera una de las plagas más dañinas del algodón, debido a que es difícil de controlar con insecticidas (Lykouressis *et al.*, 2005). Las larvas recién emergidas se encuentran en las flores, unen los pétalos con seda para protegerse formando la llamada “flor resetada”, la cual no abre adecuadamente, siendo esto de gran utilidad para detectar infestaciones en campo. Induce la caída de los botones florales (“papalotes” o “cuadros”), menores de 10 días de desarrollo; sin embargo, la mayoría de los cuadros atacados se desarrollan normalmente en bellotas del ápice,

en un lapso de 20 a 30 minutos. El orificio de entrada no es visible en un principio desde el exterior, pero en la parte interna de la pared de la bellota se desarrolla un callo o verruga. En bellotas muy jóvenes pueden no formarse estas verrugas. Las larvas barrenan la superficie de la pared interna de la bellota antes de entrar a la fibra, dejando una mina característica, que puede ser evidencia del daño de gusano rosado. La larva se alimenta de la fibra para llegar a la semilla ya como larva de segundo instar. Una vez que la larva completa su período de alimentación, deja la bellota mediante un característico orificio de salida en el carpelo de la pared. En promedio, una larva puede destruir de dos a cinco semillas durante su desarrollo y puede afectar por completo el lóculo de la bellota. Dichos daños provocan manchado de la fibra, afectan su longitud y resistencia, bajando por ende su calidad y el precio de venta. También ocasionan pérdidas en la viabilidad, peso de la semilla y calidad del aceite (Pacheco, 1994; Ramírez & Nava, 2000; Carrillo *et al.*, 2010; Urretabizkaya *et al.*, 2010).

La primera generación de algodón transgénico con *Bt* produce una única toxina, Cry1Ac, que es muy eficaz contra las larvas susceptibles del gusano rosado (*P. gossypiella*). Para contrarrestar posibles problemas de resistencia, se utiliza algodón transgénico de segunda generación que produce *B. thuringiensis*. Se ha desarrollado la toxina Cry2Ab sola o en combinación con Cry1Ac (Tabashnik *et al.*, 2002).

### **2.13 Mecanismos de resistencia a la acción de proteínas Cry**

El uso intensivo de *Bt* y sus genes *cry* incrementa la probabilidad de desarrollar resistencia por parte de los insectos a los bioinsecticidas basados en *Bt* y especialmente en plantas transgénicas, en las que la alta presión de selección generada en los insectos puede desencadenar mecanismos de defensa con el fin de eludir la acción tóxica, como el desarrollo de una elevada respuesta inmune del insecto (Hernández-Martínez *et al.*, 2010).

### **2.13.1 Resistencia por proteólisis de la toxina**

En diferentes estudios, se ha comprobado que una de las posibles causas de resistencia implica a las proteasas que interaccionan con las toxinas en el intestino del insecto. Estas investigaciones sugieren que los cambios en la actividad o composición de dichas proteasas están relacionados con la alteración de la susceptibilidad a las toxinas Cry. Así, se ha comprobado que las proteasas de una cepa resistente de *H. virescens* eran capaces de degradar más rápidamente la toxina que las proteasas de la cepa susceptible (Forcada *et al.*, 1996) y en *Spodoptera littoralis* (Boisduval), se ha demostrado que la actividad de las proteasas del intestino se incrementa a lo largo del desarrollo, incremento asociado a una mayor degradación de la toxina y a la pérdida de sensibilidad a ésta (Keller *et al.*, 1996). También se han encontrado dos cepas resistentes de *Plodia interpunctella* (Hübner) que han perdido una proteasa del intestino involucrada en la activación de las toxinas Cry por proteólisis (Oppert *et al.*, 1997).

### **2.13.2 Resistencia por ausencia de receptor**

La ausencia de unión de las toxinas Cry al epitelio intestinal del insecto susceptible ha sido relacionada, en muchos casos, con mutaciones que afectan a sus receptores. Se ha demostrado que la disrupción en el gen de la cadherina conduce a resistencia del insecto a las toxinas Cry (Gahan *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2005; Fabrick *et al.*, 2011), así como de APN (Zhang *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2012). Se han identificado casos en los que se ha detectado unos niveles reducidos de ALP en las cepas resistentes (Jurat-Fuentes *et al.*, 2011). Cambios en los niveles de V-ATPasa y F-ATPasa también se han relacionado con cepas resistentes de *P. interpunctella* (Candas *et al.*, 2003). Además, recientemente, se ha detectado una mutación en el gen ABCC2 codificante de un transportador ABC responsable de la resistencia de *H. virescens* a Cy1Ac y de *B. mori* a Cry1Ab (Gahan *et al.*, 2010; Atsumi *et al.*, 2012). La presencia de mutaciones que afectan a receptores de las toxinas Cry en cepas resistentes refuerza la importancia de la interacción entre la

toxina y su receptor, demostrando la función de los mismos como mediadores de la acción tóxica *in vivo*.

## **2.14 Casos de resistencia de lepidópteros a las toxinas Cry**

De alguna forma u otra la sobreexposición de los insectos a los cultivos *Bt* ha dado como resultado el desarrollo de resistencia a esas toxinas volviendo a las plantas susceptibles a su ataque (Pardo-López *et al.*, 2012; Castillo, 2015).

En 1985 se dio a conocer el primer caso de resistencia contra *Bt* en la especie *Plodia interpunctella* (polilla India de la harina) (Lacey *et al.*, 2015). A partir de ese momento se han informado de más casos de resistencia, tanto contra bioinsecticidas, así como en cultivos basados en *Bt*, en algunos países de Centroamérica, España, Australia y Sudáfrica (Melo *et al.*, 2014).

La elevada presión de selección a la que son sometidos los insectos alimentados con cultivos *Bt* ha generado resistencia en numerosas especies. Se detectó tolerancia de *P. gossypiella* en plantaciones transgénicas de algodón que expresaban Cry1Ac, en India y en China (Bagla, 2010; Wan *et al.*, 2012), *Busseola fusca* en maíz Cry1Ab *Bt* en Sudáfrica (Van Rensburg, 2007), *Helicoverpa zea* en algodón Cry1Ac *Bt* en EE. UU. (Tabashnik *et al.*, 2013) y también se informó sobre larvas de *H. armigera* en algodón *Bt* que expresa Cry1Ac en China (Liu *et al.*, 2010) o Cry2A en Australia (Downes *et al.*, 2010).

Se han encontrado larvas de *S. frugiperda* resistentes a maíz *Bt* que expresa Cry1F, en Puerto Rico (Storer *et al.*, 2010) y larvas de *B. fusca* (Fuller) resistentes a maíz *Bt* que expresa Cry1Ab en Sudáfrica (Kruger *et al.*, 2011).

Se confirmaron altos niveles de resistencia de poblaciones de *S. frugiperda* al maíz Cry1Fa en diferentes regiones de Brasil, incluido el estado de Goiás, en la región del Cerrado. El fenotipo de resistencia en estas poblaciones fue contenido por uno

o más alelos recesivos en el mismo locus y la frecuencia de alelos resistentes aumentó significativamente en el campo (Farias *et al.*, 2014).

Una colonia de *Plutella xylostella* resistente a Cry1Ca se recogió en campos en Carolina del Sur, en la selección en laboratorio se utilizó en primer lugar la protoxina Cry1Ca, y en posteriores generaciones de brócoli transgénico que expresan Cry1Ca, aumentó la resistencia a Cry1Ca a 12400 veces (Zhao *et al.*, 2000).

En la unidad laguna se hicieron estudios de dos poblaciones Chihuahua y Coahuila de (Lepidoptera: Noctuidae), *Helicoverpa zea* y *Heliiothis virescens* que estaban asociadas al cultivo de algodón GM y convencional, en donde los resultados indicaron que *C. virescens* arrojó nula resistencia, pero en caso de *H. zea* fue resultante que presenta resistencia a Bt (Guzmán-Morales *et al.*, 2018).

### III. MATERIALES Y METODOS

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

#### 3.1 Poblaciones de *Spodoptera frugiperda*

Para el desarrollo de esta investigación se evaluaron dos poblaciones de *S. frugiperda*, una población de campo proveniente del bajío de la UAAAN, Saltillo, Coahuila, México y una línea presuntamente resistente con alta presión de selección por toxinas Cry de *Bt*, colectada en la región productora de algodón de La Laguna, en el municipio de San Pedro, Coahuila, México. Las poblaciones fueron recolectadas en el cultivo de maíz.

#### 3.2 Población Saltillo (línea susceptible a las toxinas Cry de Bt)

Se realizaron las colectas de lepidópteros, en el bajío de la UAAAN, Saltillo (Cuadro 1), con la cual se establecieron bioensayos en el laboratorio, para las pruebas de resistencia a las toxinas Cry.

**Cuadro 1.** Colectas de material genético perteneciente a Saltillo, Coahuila, México, 2020.

ID de la población	Localidad	Coordenadas geográficas	Cultivo	Especies	Total de individuos colectados	Mes de recolecta	Colector
COAH-SAL1 (POB4Sf*)	Buenavista, Saltillo, Coahuila	N: 25°21'26" W: 101°02'25"	Maíz	<i>S. frugiperda</i>	200 Larvas	Julio	Ing. Marcos Librado García Morales

\*ID asignado en el informe de actividades del año 2020 en el proyecto 1043 "Monitoreo de insectos a las toxinas Cry de Bt" del Programa de Cátedras CONACYT. Responsable: Dra. Miriam Sánchez Vega (CONACYT-UAAAN, Departamento de Parasitología).

### 3.3 Población San Pedro (línea presuntamente resistente a las toxinas Cry de Bt)

La línea presuntamente resistente a las toxinas Cry de *Bt*, se colectó en la zona productora de algodón *Bt*, conocida como la Región lagunera, ubicada en el norte del país, específicamente en el municipio de San Pedro, Coahuila, México, en un predio a pie de la carretera San Pedro-Cuatrociénegas. Las colectas se realizaron en cultivos de maíz aledaños a parcelas establecidas con algodón GM, que fungían como refugio al cultivo de algodón (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Recolectas de material genético para establecimiento de líneas presuntamente resistentes a las toxinas Cry del *Bt*, de la región norte del país Coahuila y Chihuahua.

ID de la población	Localidad	Coordenadas geográficas	Cultivo	Especies	Total de individuos colectados	Mes de recolecta	Colector
COA-SPE1 (POB3Sf*)	San Pedro de las Colonias, Coahuila	25°47'52.07" N 102°58'48.50" O	Maíz	<i>S. frugiperda</i>	150 larvas	Julio	Ing. Jaime Chávez Márquez

\*ID asignado en el informe de actividades del año 2020 en el proyecto 1043 "Monitoreo de insectos a las toxinas Cry de Bt" del Programa de Cátedras CONACYT. Responsable: Dra. Miriam Sánchez Vega (CONACYT-UAAAN, Departamento de Parasitología).

### 3.4 Protocolo para las colectas en campo

Las colectas se realizaron en estado larval en botes de plástico del no. 00, se mantuvieron con dieta artificial desde el momento de la colecta hasta su traslado al laboratorio. Por lo que, para la recolección de campo, específicamente para la población de San Pedro, se seleccionaron cuatro puntos de muestreo a 20 m de distancia entre ellos. Dentro de cada punto de muestreo se recolectaron larvas en desarrollo del tercer a quinto instar para asegurar que sobrevivan en condiciones de laboratorio. Con la finalidad de reducir la probabilidad de que vinieran de los mismos progenitores, se tuvo que colectar una larva por planta, con mucho cuidado de que las larvas no estuvieran a no menos de dos plantas de distancia. En total, se recolectaron 240 larvas.

En el laboratorio, se hizo la purificación de los individuos, por lo que se eliminaron aquellos que venían parasitados, muertos, con daño mecánico, o en estado de diapausa; al menos un 80% de larvas llegaron al estado adulto. A partir de estas larvas se iniciaron las crías de las poblaciones mediante manejo de crianza para esperar progenie (F1).

### 3.5 Manejo de insectos en laboratorio

Se acondicionó una jaula de 2.0 x 0.60 x 0.40 m, con hule cristal (Figura 3), con la finalidad de tener aisladas las poblaciones de *S. frugiperda* y dar las condiciones adecuadas (tipo cámara climática), para tener control de la temperatura, humedad relativa y fotoperiodo, lo más cercano a los requerimientos para el desarrollo óptimo de esta especie (fotoperiodo 14 h luz y 10 h oscuridad y temperatura 19.5-25°C y humedad relativa del 45 al 60%), por lo que las condiciones a las que se establecieron en el laboratorio fueron: temperatura de 22 a 27°C, con una humedad relativa de 15% a 60% (la cual se regulaba con botes llenos de agua intercalados entre la cámara) y un fotoperiodo de 12:12 luz-oscuridad, esto debido a que no se cuenta con el equipo necesario para tener un control más preciso dichas condiciones.



**Figura 3.** Jaula con hule de cristal, tipo cámara climática, para la cría de las poblaciones de *S. frugiperda*.

Las larvas, ya purificadas, se individualizaron en vasos de plásticos con tapa del número 00 y con dieta artificial, hasta llegar al estado de pupa. Las pupas se retiraron de la dieta artificial (Cuadro 3) y se desinfectaron por 5 min en una solución de hipoclorito al 0.5%, se enjuagaron con agua destilada estéril, se dejaron secar y posteriormente se colocaron en las jaulas de crianza para adultos (tubos PVC de 8”), aproximadamente de 20 a 90 pupas por jaula, tapados con una tela entomológica (organza) para evitar la fuga de los adultos emergidos y así facilitar la manipulación de los insectos y promover la aireación; las jaulas se elaboraron especialmente para mantener los adultos en reproducción. Como fuente de alimentación de los adultos se les colocó en la jaula un vaso con algodón impregnada con una solución de dieta para adultos y otro con agua destilada estéril.

**Cuadro 3.** Dieta artificial que contiene los requerimientos nutricionales necesarios para el adecuado crecimiento y desarrollo de larvas y adultos de lepidópteros (POPDieta-IMAmt2019).

<b>Inmaduros</b>	<b>Adultos</b>
<b>Componente I</b>	
1000 mL de agua destilada estéril	20 g de miel
60 g de frijol blanco	20 g de azúcar
50 g de germen de trigo	6 g de ácido ascórbico
31 g de levadura de cerveza	1 mL de vitaminas
25 g de proteína de soya	1 mL de tetraciclina
25 g de caseína	
3 g de Nipagin	
<b>Componente II</b>	
1.5 g de ácido sórbico	
3.0 g de ácido ascórbico	
7.5 mL de solución vitamínica	
0.25 mL de tetraciclina	
1.5 mL de formaldehído	
<b>Componente III</b>	
15 g de agar	

El interior las jaulas se forraron con papel y se colocaron también hojas de papel dobladas en forma de triángulo, para facilitar la ovoposición de las palomillas y la extracción de las masas de huevecillos o posturas y se colocaban sobre platos con un papel desecante, para poder ser maniobradas. Cuando se empezaron a ver las primeras oviposturas en la tela de la jaula o en el papel, inmediatamente los adultos se cambiaban de jaula, para ello se tuvieron que meter al refrigerador a 4°C por

cinco minutos para que se adormezcan y con las luces apagadas (solo la luz del día) se realizaban los cambios, así se evitaba la fuga de los adultos.

Las oviposturas fueron desinfectadas en una solución de formaldehído al 5% por 5 min, se lavaron en agua estéril por otros 5 min, se pasaron a sulfato de cobre pentahidratado al 1% por 2 min, y un lavado final en cloruro de benzalcónico al 0.2% por 2 min, posteriormente se dejaron secar en una sanita estéril, al aire libre. La masa de huevecillos se colocó en vasos de plásticos de 500 mL con trozos de dieta artificial (Cuadro 3) para esperar su eclosión y crecimiento hasta el tercer estadio y posteriormente fueron utilizadas en el establecimiento de los bioensayos.

El ciclo de los insectos fue controlado, es decir, que las poblaciones se estandarizaron y homogenizaron para que ovipositarán, eclosionaran, puparan y emergieran los adultos en el mismo tiempo, según cada etapa y población, por lo tanto, individuos que se atrasaron o adelantaron en días fueron eliminados.

Todos los materiales y reactivos que se utilizaron para la cría y mantenimiento de los insectos fueron esterilizados principalmente con luz UV y trabajados con las condiciones de asepsia de forma estricta, para evitar contaminación y pérdida de individuos.

### **3.6 Establecimiento del cultivo de algodón**

Se sembraron cuatro variedades híbridas de algodón *Bt* (FM1830 GLT, FM2334 GLT, DP1321 NRB2RF y DP1558 B2RF) y una variedad convencional (FM989), se establecieron en macetas de 10 litros, como sustrato se utilizó una mezcla de humus más suelo de los campos de la Universidad, se establecieron seis repeticiones y como unidad experimental dos plantas por maceta, la siembra se realizó en el invernadero de Parasitología de la UAAAN, desde el 12 de marzo del 2020; el cultivo se manejó con riego por goteo, fertilización orgánica vía foliar y radical, con composta, control de plagas como trips y araña roja, con repelente y extractos

orgánicos. El cultivo se estableció con la finalidad de obtener material vegetal para el establecimiento de bioensayos en laboratorio y ser utilizado como dieta alimenticia para las larvas y como fuentes de toxinas Cry.

### **3.7 Material vegetal**

El material vegetal se utilizó fresco como dieta, para probar susceptibilidad a las toxinas Cry de *Bt* en las dos poblaciones de *S. frugiperda* (Cuadro 1 y 2), se cortaron las hojas o folios de la parte tierna de las plantas (para asegurar la expresión de las toxinas Cry), por cada variedad híbrida de algodón establecida en el invernadero.

Todo el material fue manipulado con condiciones asépticas, por lo que en el laboratorio las hojas o folios se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% y una gota de jabón líquido para romper la tensión superficial, pasando al agua destilada por varias veces para quitar los residuos y evitar que esto afectara los resultados de los bioensayos. Posteriormente se extendieron en papel absorbente para poder secarlas bien.

Cada folio de las plantas por híbrido se dividió en cuatro segmentos, considerados estos como unidad experimental para los bioensayos, y cada cuarta parte de la hoja se colocó de forma individual en una caja Petri de 9.0 cm de diámetro. Para mantener hidratadas las hojas fue necesario colocar una motita de algodón humedecida con agua destilada estéril, dentro de cada caja.

### **3.8 Establecimientos de bioensayos.**

Para el establecimiento de los bioensayos se consideró a una hoja dividida en cuatro segmentos con una larva cada uno, como unidad experimental y como una repetición; en el invernadero, se establecieron seis repeticiones por lo que esto se mantuvo en laboratorio, manteniendo un arreglo experimental completamente al azar (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Características de los bioensayos establecidos para determinar la susceptibilidad a toxinas Cry de *Bt* en dos poblaciones de *S. frugiperda*, sometidas a dieta vegetal proveniente de híbridos de algodón GM.

Componentes del experimento	Numero	Descripción
Poblaciones de <i>S. frugiperda</i>	2	COA-SAL1: Buenavista, Saltillo, Coahuila COA-SPE1: San Pedro, Coahuila
Tratamientos	5	FM1830 GLT (Cry1Ab y Cry2Ae) FM2334 GLT (Cry1Ab y Cry2Ae) DP1558 NRB2RF (Cry1Ac, Cry 2Ab) DP1321 B2RF (Cry1Ac, Cry 2Ab) FM989 convencional (testigo)
Repeticiones	6	Una planta de cada tratamiento por repetición
Unidad experimental	4 larvas por repetición	Se consideró una hoja o folio por planta dividida en cuatro segmentos, cada segmento se instaló en una caja Petri de forma individual con una larva de 2do a 3er instar.

Por cada caja Petri se colocó una larva del 2do al 3er estadio, se consideró que una larva llegó a dicho estadio cuando estaba dentro de las dimensiones de longitud de 0.5 cm. Se puso una larva por caja para evitar el canibalismo y se sellaron las cajas con cinta para que no se fugaran.

### 3.9 Evaluación y toma de datos

Después de la exposición de las larvas a la dieta vegetal, se evaluaron por siete días consecutivos cada 24 horas el porcentaje de mortalidad de las larvas, a las 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h y 168 h y se les considero como muertas aquellas larvas que estaba flácidas o con movimientos anormales cuando se movían con un pincel; se consideró también el número de fugas, para disminuir el error experimental. Las larvas supervivientes de cada tratamiento y repeticiones se pasaron a dieta artificial para seguir su evaluación con otro proyecto.

### 3.10 Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo, con la elaboración de graficas de tendencia con los promedios obtenidos por tratamiento y población de *S. frugiperda*, expresando

el porcentaje de mortandad para cada evaluación, con apoyo de Microsoft Office Excel (2016). Además, se realizó un análisis de varianza, con la finalidad de determinar si los bioensayos presentaron resultados estadísticamente confiables que indique la efectividad de los híbridos para el control de este lepidóptero con algodón *Bt*, para ello se empleó el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System, versión 9.0). Los datos obtenidos se corrigieron por medio de la fórmula de Abbott, (1925) la cual es utilizada en laboratorio con individuos estandarizados, habiendo unidades de muestra. La fórmula de corrección de datos es la siguiente:

$$MC: (Y-X) / (100-X) *100$$

Donde:

MC: Mortalidad corregida

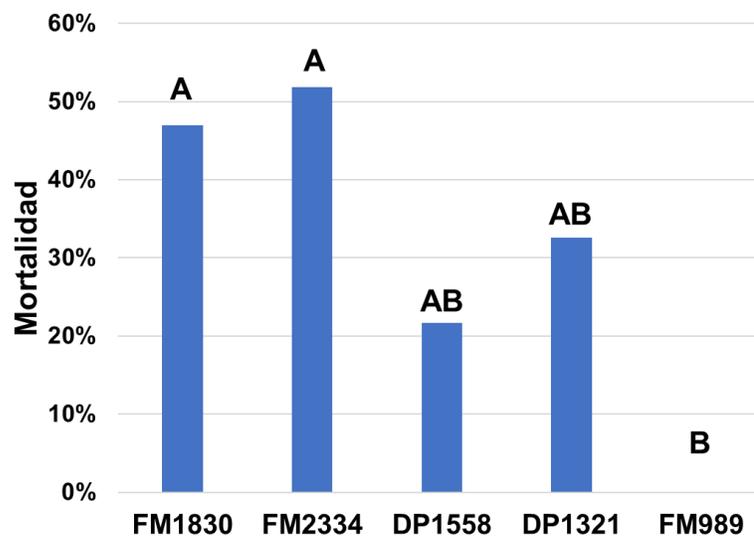
Y: Mortalidad en el tratamiento

X: Mortalidad en el testigo

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Análisis de varianza

Se realizó un análisis de varianza en el que no se expresaron diferencias significativas para cada evaluación de la mortalidad por horas, sin embargo, en la mortalidad total se encontró que hubo diferencias estadísticas altamente significativas entre tratamientos y localidades con una confiabilidad superior al 99% ( $\alpha \leq 0.01$ ) (Figura 4).



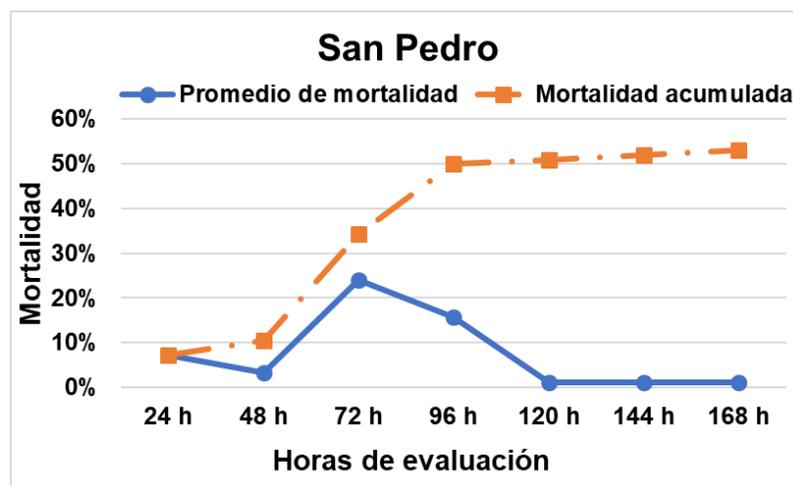
**Figura 4.** Mortalidad de *Spodoptera frugiperda*, expresada en cada una de las variedades de algodón. Datos con la misma letra no son significativamente diferentes.

### 4.2 Análisis por población de gusano cogollero

#### 4.2.1 Población San Pedro

En el análisis descriptivo de la población de San Pedro expuesto a las toxinas Cry de *Bt*, mediante dieta vegetal de cinco variedades de algodón GM, en la mortalidad acumulada el incremento fue de forma paulatina en las primeras horas y hasta a las 72 y 96 horas se obtuvo mayor mortalidad, a las 120 horas la muerte de los individuos disminuyó, y se mantuvo constante hasta las 168 horas. El caso del

promedio de la mortalidad evaluada para todas las variedades de algodón en esta población se puede notar que tiene la misma tendencia, sin embargo, disminuye el número de individuos muertos registrados en cada variedad, esto indica que la presión ejercida sobre esta población es baja, es decir que existió baja susceptibilidad de los individuos a las toxinas Cry contenidas en la dieta vegetal de cada variedad de algodón GM (Figura 5). Esto pudo deberse a que el material vegetal de algodón producido en el invernadero no expuso la cantidad suficiente de toxinas Cry, debido principalmente al manejo que se le dio, ya que el invernadero no cuenta con la suficiente luz para establecer este cultivo, sin embargo, esto no fue evaluado en esta investigación.



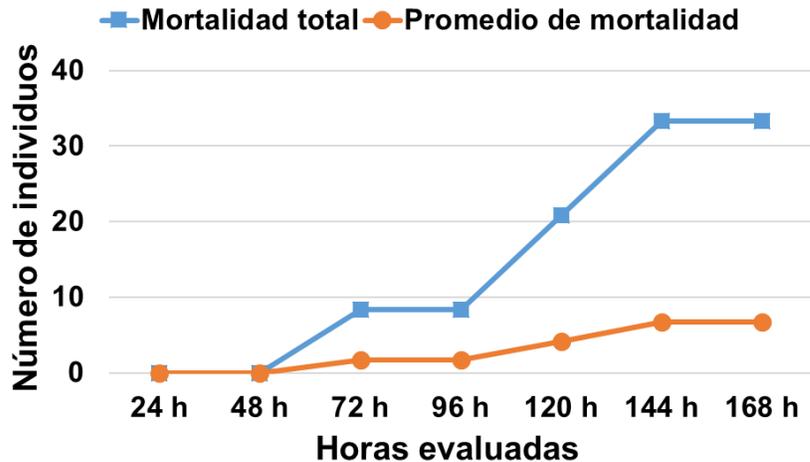
**Figura 5.** Comportamiento de las cinco variedades de algodón GM en la población de *Spodoptera frugiperda* proveniente de San Pedro, Coahuila, México.

Paliwal *et al.* (2001), en un estudio realizado con la fertilización de las plantas nos dicen que, con base a la disponibilidad de nutrientes que se cuente en el suelo para una planta, esta condición puede influir sobre el nivel de susceptibilidad al ataque de *S. frugiperda* y este efecto depende del cultivar. Arévalo *et al.*, (2011) indican que la dieta ideal para poder evaluar la susceptibilidad de la especie a las diferentes toxinas Cry, es aquella en la que el consumo y la presencia de nutrientes sean similares a la planta hospedera y, de la misma forma, que ninguno de los ingredientes altere la activación de la protoxina.

#### 4.2.2 Población Saltillo

Por otro lado, la población colectada en Saltillo expuesta a las toxinas Cry de *Bt* mediante dieta vegetal de cinco variedades de algodón GM, presentó un promedio de mortalidad del 2% a las 72 horas y ésta se mantuvo constante hasta las 96 horas, posteriormente se dio un incremento en la mortalidad a las 144 horas y el valor se mantuvo constante hasta finalizar el experimento. Esta respuesta fue muy diferente a la que se mostró en la población de San Pedro. Esto se pudo deber a que la población de Saltillo, presentó mayor adaptación a las condiciones ambientales de Saltillo, porque a pesar de que hubo control de estas, para evitar su influencia en la respuesta a las toxinas Cry, al parecer si se vieron afectadas, por lo que tuvieron mayor capacidad de sobrevivencia que la población de San Pedro, y la mortandad registra al finalizar la prueba, se pudo haber debido a que las larvas ya no contaban con alimento y humedad, es decir que toda la dieta vegetal suministrada fue agotada por los individuos (Figura 6). Estudios han indicado que la resistencia se puede atribuir a varios factores, como: el clima del sistema de cultivo durante todo el año, poblaciones aisladas, alta presión de plagas, falta de refugio, inmigración de larga distancia, proteínas *Bt* similares utilizadas entre cultivos hospedantes y plagas objetivo de que migraron de otros cultivos, compartidas con el algodón (Huang, 2021).

## Saltillo



**Figura 6.** Comportamiento de las cinco variedades de algodón GM en la población de *Spodoptera frugiperda* proveniente de Saltillo, Coahuila, México.

García (2021) menciona que las pruebas para determinar los efectos de *Bt*, son observables en las primeras 72 horas, por lo que esto justifica la respuesta encontrada en cada una de las dos poblaciones. En el caso del promedio de mortalidad evaluada para todas las variedades de algodón GM en la población de Saltillo, se puede notar la misma tendencia, en donde se muestra mayor número de mortalidad después de las 96 horas, lo cual nos indica que la presión ejercida por la dieta vegetal con toxinas Cry, sobre esta población es baja, es decir, es baja la susceptibilidad cuando la población de lepidópteros está adaptada a ciertas condiciones ambientales (Figura 6). Como ya se mencionó anteriormente, pudo deberse a que la población de larvas obtenida en Saltillo está adaptada a las condiciones climáticas ya que se capturaron en el Campo Experimental conocido como “El Bajío” de la UAAAN, donde se realizó el experimento y esto influyó en la respuesta de dicha población.

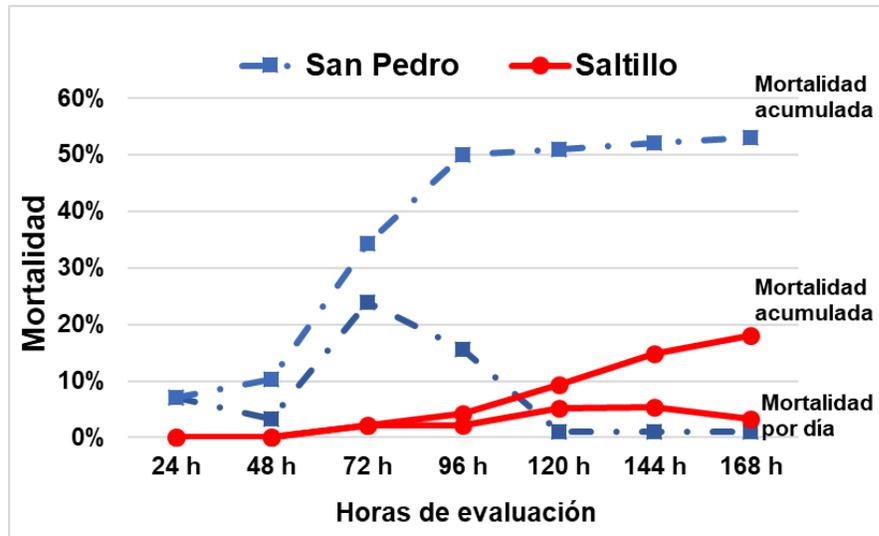
Arévalo *et al.*, (2011) mencionan que a medida que el cultivo se desarrolla, la concentración de la proteína disminuye, por ende, en sus primeros estados fenológicos, la planta expresará la mayor concentración de proteína Cry1Ac, esto que mencionan estos autores también se pudo haber presentado en la respuesta

del experimento establecido para la población de Saltillo, debido a que las hojas que se colectaron para la dieta vegetal en esta población fueron las hojas basales, ya que nos dieron mayor cantidad de alimento.

Por lo general, las condiciones abióticas de cada hábitat varían de forma moderada lo que permite que las poblaciones de muchas especies logren vivir en ese lugar. Pero de vez en cuando algunos factores abióticos varían a tal grado que llegan a causar la muerte de muchos organismos (Carabias *et al.*, 2009). Murúa *et al.* (2003) describen que las condiciones ambientales del laboratorio son prioritarias para el desarrollo de los individuos.

### **4.3 Comparación entre las dos poblaciones**

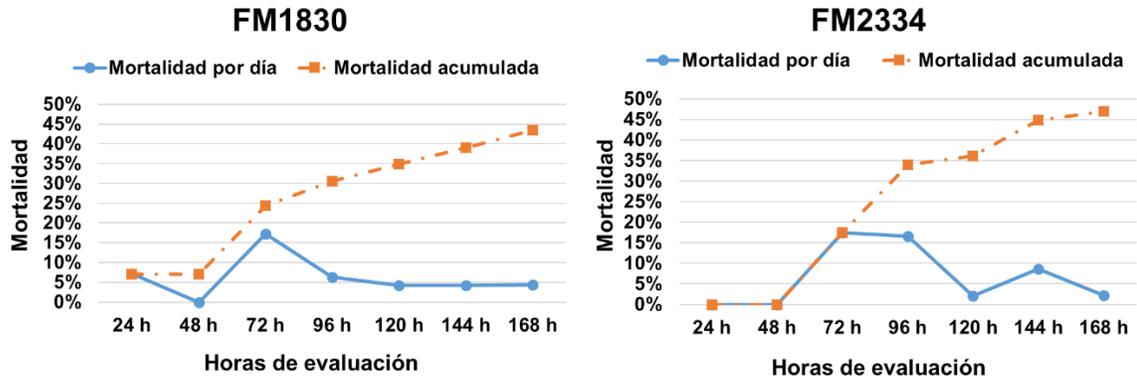
Los resultados del análisis por población nos muestran que la población obtenida de San Pedro presenta mayor porcentaje de mortalidad acumulada del 53% para los siete días de evaluación que duro el experimento, se esperaba que esta población resultara con mayor tolerancia a la dieta proveniente de algodón que la población de Saltillo, la cual presentó una mortalidad acumulada al finalizar el experimento de 18% (Figura 7). Por lo que en forma general se puede decir que la población de San Pedro, aun no presenta ningún grado de resistencia o que las variedades de algodón aún son efectivas, pero esto se logra determinar por el manejo que se le dio a cada población ya que para la selección del alimento en esta población fue de las partes apicales de la planta que expresan mayor cantidad de toxinas (dato no evaluado y referido a la literatura por Arévalo *et al.*, 2011), y considerar además, que las condiciones ambientales que se presentan en Saltillo son diferentes a las de San Pedro, Coahuila; así como las condiciones artificiales a las que fue sometida dicha población en el experimento, que causaron estrés en la población y por ende se favoreció en la susceptibilidad de ésta, caso contrario a lo mostrado en la población que se evaluó de Saltillo.



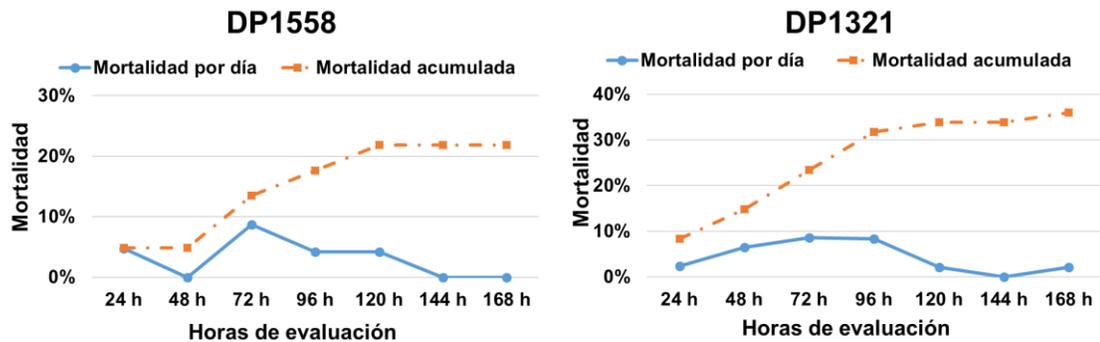
**Figura 7.** Porcentaje de mortalidad acumulada y por día de las poblaciones de *Spodoptera frugiperda* de San Pedro y Saltillo, Coahuila, México.

#### 4.4 Análisis por variedad de algodón

Se realizó un promedio de los valores obtenidos para el porcentaje de mortalidad de las dos poblaciones de *S. frugiperda* y en cada dato obtenido por horas, con la finalidad de identificar cual es la variedad que resulto más efectiva para el control del gusano cogollero, y así mismo se sumaron los datos de cada hora para obtener la tendencia de mortalidad acumulada al finalizar los bioensayos por cada variedad de algodón. En los datos obtenidos en la mortalidad acumulada podemos observar que la variedad FM2334 es la muestra mayor porcentaje de mortalidad 47 % en total de los siete días evaluados (168 horas), con respectos a los híbridos de la línea DeltaPine® (Figuras 8 y 9).



**Figura 8.** Expresión de la mortalidad de larvas de *Spodoptera frugiperda*, en la evaluación de susceptibilidad a variedades de algodón GM en las líneas FiberMax®.



**Figura 9.** Expresión de la mortalidad de larvas de *Spodoptera frugiperda*, en la evaluación de susceptibilidad a variedades de algodón GM en las líneas DeltaPine®.

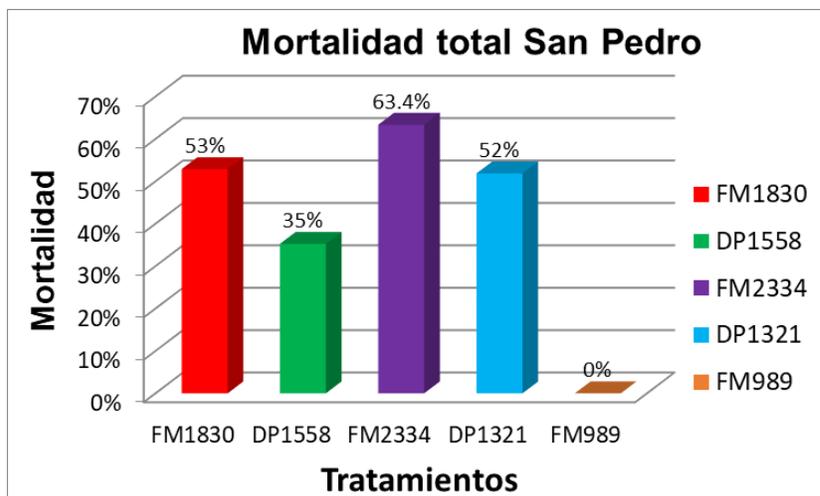
En el caso de la mortalidad por día evaluada para las variedades FiberMax® nos muestra que el mayor porcentaje se obtuvo a las 72 horas con un resultado de 17% el cual fue el mismo para las dos variedades FM1830 y FM2334 en donde si fueron diferentes fue en la mortalidad acumulada ya que resultó ser más eficaz la variedad FM2334 (Figura 8). En un estudio similar que realizó García (2021) obtuvo que la variedad de algodón más efectiva para el control de este lepidóptero fue la FM2334 y esta es una de las variedades que más se siembran en la región Lagunera de Coahuila, México, por lo que con estos estudios se corrobora que aún tiene efectividad este material al menos contra el gusano cogollero.

En las variedades evaluadas de la línea comercial DeltaPine®, obtuvimos que estas cuentan con menor eficacia para el gusano cogollero en comparación con las otras

variedades que se probaron. Comparando estas dos variedades entre sí mismas nos resulta que fue más eficiente la variedad DP1321 ya que esta obtuvo un 30.1% de mortalidad acumulada y con respecto a la variedad DP1558 que solo obtuvo un 21.8% (Figura 9). El SNICS (2020) menciona que se han otorgado 61 Títulos de Obtentor para variedades de algodón GM, de los cuales 27 ya han sido revocados, por lo que quedan 34 títulos vigentes, y estas dos variedades ya no aparecen registradas en el catálogo comercial 2020 de la empresa Bayer, que de acuerdo con datos del SNICS, la semilla de algodón de importación para su siembra en México se comercializa bajo la categoría Declarada, por lo que no existe semilla categoría Certificada disponible, esto indica que dichos materiales han sido retirados definitivamente del mercado. Esto puede deberse probablemente a que los híbridos estén perdiendo efectividad en campo, como lo que se encontró en esta investigación.

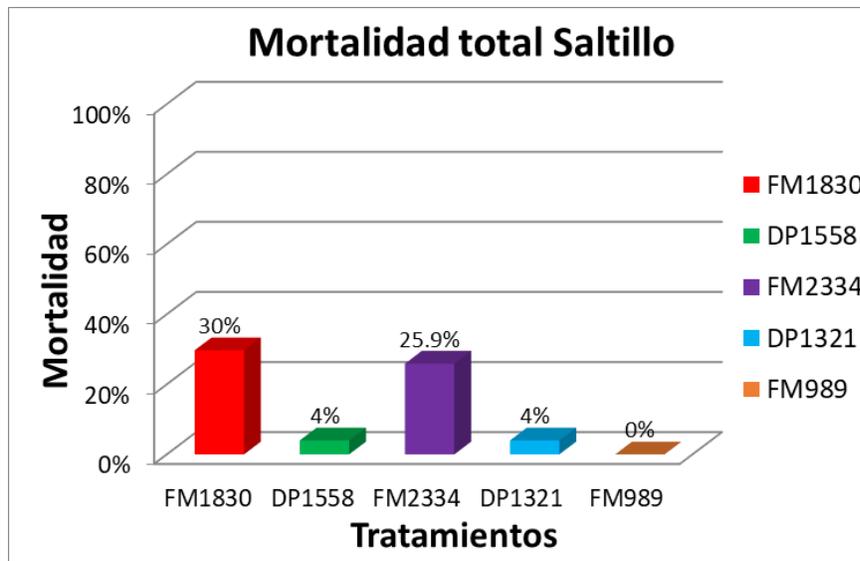
#### **4.5 Análisis por población de *Spodoptera frugiperda***

En cuanto al comportamiento del gusano cogollero en cada una de las variedades de algodón GM, en la población San Pedro ejerció más control la variedad de FM2334 y posteriormente le siguieron las variedades FM1830 y DP1321 seguida de la DP1558 y referente a la variedad convencional FM989 la cual se utilizó como testigo, se muestra en 0% debido a la corrección de datos que se realizó con la fórmula de Abbott, (1925) mencionada anteriormente en la metodología (Figura 10).



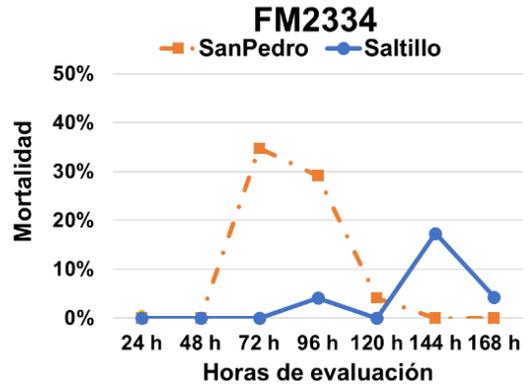
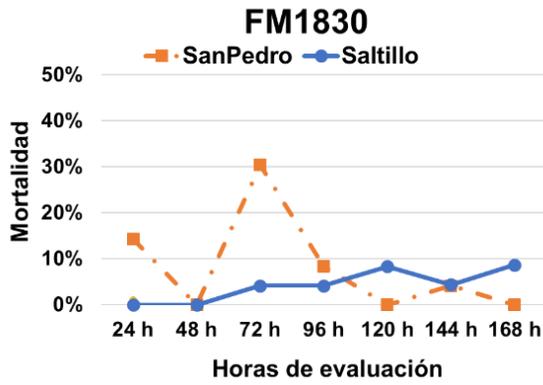
**Figura 10.** Comportamiento de *Spodoptera frugiperda* en cada una de las variedades de algodón GM en la población de San Pedro.

En el caso de la población de *S. frugiperda* proveniente de Saltillo la variedad más eficaz fue la FM1830 y posteriormente le siguió la FM2334, seguido de las dos variedades DeltaPine® que obtuvieron la misma eficacia y por último fue la variedad convencional FM989 que se utilizó como testigo el cual también se corrigió a 0% (Figura 11). Aunque las variedades de FiberMax® hayan obtenido los valores más altos, aun así, estos se consideran bajos, por lo tanto, asumimos que se pudo haber debido a un error de manejo de la población Saltillo y del establecimiento de los bioensayos, el cual pudo estar directamente relacionado al suministro de toxinas Cry en la dieta vegetal y en la adaptación de las larvas.

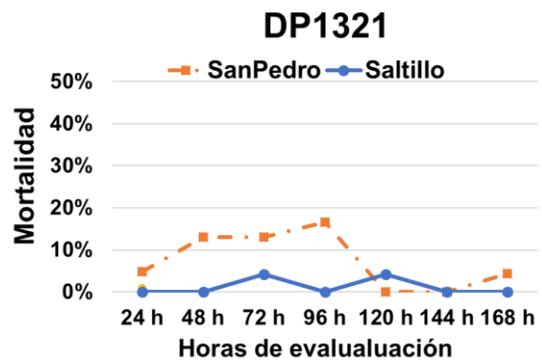
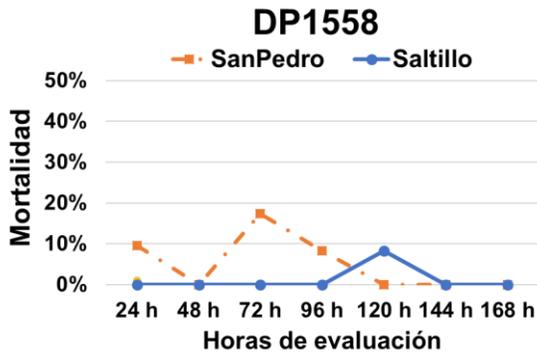


**Figura 11.** Comportamiento de *Spodoptera frugiperda* en cada una de las variedades de algodón GM en la población de Saltillo.

Con respecto al comportamiento que tuvieron las poblaciones de gusano cogollero sobre las variedades de algodón GM evaluadas, podemos observar que la población San Pedro obtuvo un comportamiento similar en todas las variedades, en donde su mayor porcentaje de mortalidad fue a las 72 horas, esto nos indica que si hubo un efecto de las toxinas Cry sobre estas larvas evaluadas. La población Saltillo también nos muestra un comportamiento similar en las variedades de algodón GM evaluadas y su mayor porcentaje de mortalidad se presenta después de las 72 horas de evaluación esto como se comenta anteriormente puede deberse a que las hojas suministradas a las larvas no contenían las suficientes toxinas Cry para matar a las larvas y también pudo haber influido la adaptación a las condiciones ambientales (Figuras 12 y 13). En un estudio realizado por Ibarra *et al.* (2015) se observó que los cultivos *Bt* presentan su máxima expresión durante la floración del cultivo, para después disminuir significativamente sus niveles de expresión. En comparación entre las dos poblaciones de *S. frugiperda* podemos observar que hay mayor porcentaje de mortalidad en las variedades FiberMax® que para las DeltaPine®.



**Figura 12.** Comparación del efecto de las variedades FiberMax® de algodón GM en dos poblaciones de *Spodoptera frugiperda*.



**Figura 13.** Comparación del efecto de las variedades DeltaPine® de algodón GM en dos poblaciones de *Spodoptera frugiperda*.

## V. CONCLUSIÓN

Existe susceptibilidad de la población de *S. frugiperda* proveniente de San Pedro, expuesta al consumo de toxinas Cry de *Bt*, por medio de la dieta vegetal.

La población perteneciente a Saltillo mostro baja mortalidad debido la adaptabilidad al medio en el que se estableció y/o a que el material vegetativo con el que se alimentó esta población no contenía la cantidad suficiente de toxinas Cry.

Las variedades de algodón GM de mayor eficacia fueron las pertenecientes a la línea comercial FiberMax® (FM2334 y FM1830) en cuanto a la línea comercial DeltaPine® fue menos eficiente expresando un menor porcentaje de mortalidad, esto puede inducir niveles de resistencia a través del tiempo.

## VI. LITERATURA CONSULTADA

- Adamczyk Jr, J. J., Holloway, J. W., Leonard, B. R., & Graves, J. B. (1997). Susceptibility of fall armyworm collected from different plant hosts to selected insecticides and transgenic *Bt* cotton. *Journal of Cotton Science*.
- Aguilar-Medel, S., Rodríguez-Maciel, J. C., Mejía-Carranza, J., Luis, J., Martínez-Carrillo, A. R. J., & Mora-Herrera, M. E. (2018). Monitoreo de la susceptibilidad de *Spodoptera exigua* Hübner (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) a proteínas de *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki Berliner.
- Alonso-Amaro, O., Lezcano-Fleires, J. C., & Suris-Campos, M. (2019). Relación ecológica plantas arvenses-entomofauna beneficiosa en sistemas silvopastoriles del occidente de Cuba. *Pastos y Forrajes*, 42(1): 48-56.
- Aranda E, Sanchez J, Perferoen M., Güereca L, & Bravo A. (1996). Interactions of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with the mid-gut epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal Invertebrate Pathology*, 68(39): 203-212.
- Arévalo, H., Zenner, P. I., Romero, L. (2011). Efecto de dietas merídicas en la toxicidad de la Proteína Cristalina (Cry) de *Bacillus thuringiensis* sobre tres plagas del Algodonero (Lepidoptera: Noctuidae). Colombia. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 14(1):29-48.
- Atsumi, S., Miyamoto, K., Yamamoto, K., Narukawa, J., Kawai, S., Sezutsu, H., ... & Noda, H. (2012). Single amino acid mutation in an ATP-binding cassette transporter gene causes resistance to Bt toxin Cry1Ab in the silkworm, *Bombyx mori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(25): E1591-E1598.
- Bagla, P. (2010). Hardy cotton-munching pests are latest blow to GM crops. *Science* 327(5972): 1439.
- Bentancourt, C. M. & Scatoni, I. B. (1996). Lepidópteros de importancia económica. Reconocimiento, biología y daños de las plagas agrícolas y forestales. Hemisferio Sur, Montevideo.

- Blanco, C. A. (2012). *Heliothis virescens* and Bt cotton in the United States. *GM crops & food*, 3(3): 201-212.
- Blanco, C. A., Portilla, M., Jurat-Fuentes, J. L., Sánchez, J. F., Viteri, D., Vega-Aquino, P., Terán-Vargas, A. P., Azuara-Dominguez, A., Lopez JR., J.D.; Arias, R., Zhu, y., Lugobarrera, D., Jackson, R. (2010). Susceptibilidad de las isofamilias de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) a las protefnas Cry1Ac y Cry1Fa de *Bacillus thuringiensis*. Estados Unidos. *Southwestern Entomologist*, 35(3): 409-415.
- Blanco, C. A., Terán-Vargas, A. P., Abel, C. A., Portilla, M., Rojas, M. G., Morales-Ramos, J. A., & Snodgrass, G. L. (2008). Plant host effect on the development of *Heliothis virescens* F. (Lepidoptera: Noctuidae). *Environmental Entomology*, 37(6): 1538-1547.
- Blanco, C. A., Terán-Vargas, A. P., López Jr, J. D., Kauffman, J. V., & Wei, X. (2007). Densities of *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in three plant hosts. *Florida Entomologist*, 742-750.
- Bravo, A. (2013). Biotecnología agrícola y agroecología: ¿complementarias u opuestas? *Revista Ciencia*, 64(1): 68-77.
- Bravo, N. S. (2021) *Bacillus thuringiensis* como controlador biológico en la agricultura. Agroambiental. Universidad Nacional Abierta y a Distancia. Pg. 8.
- Candas, M., Loseva, O., Oppert, B., Kosaraju, P., & Bulla, L. A. (2003). Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*: alterations in the indianmeal moth larval gut proteome. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2(1), 19-28.
- Capinera J. L. (2020). Fall armyworm. *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). Entomology and Nematology. University of Florida. Publication Number: EENY-98. Consulta: septiembre 2023. Disponible en: [https://entnemdept.ufl.edu/creatures/field/fall\\_armyworm.htm](https://entnemdept.ufl.edu/creatures/field/fall_armyworm.htm)
- Carabias, J., Meave, J. A., Valverde, T., & Santana, Z. C. (2009). Ecología y medio ambiente en el siglo XXI. Pearson Educación, México :264.
- Carrillo A. R., Carvajal M. T., Valarezo C. O., Cañarte B. E., Mendoza G. A., Mendoza Z. H., Hinostroza G. F., Motato A. N., Moreira G. P. & Ponce F. J. 2010. Manual de buenas prácticas agrícolas y estimación de costos de producción para

- cultivos de ciclo corto en Manabí. Portoviejo, Ecuador: INIAP, Estación experimental Portoviejo, núcleo de transferencia y comunicación. (Manual No. 84). 139 p.
- Casmuz, A., Juárez, M. L., Socías, M. G., Murúa, M. G., Prieto, S., Medina, S., ... & Gastaminza, G. (2010). Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 69(3-4), 209-231.
- Castañet-Martínez, C. E., & Moreno-Reyes, S. (2016). *Bacillus thuringiensis*: Características y uso en el control de *Aedes aegypti*. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, 50(3): 37-42
- Castillo Ortega, L. S. (2015). Control de plagas de lepidópteros en algodón mediante la expresión del gen híbrido que codifica para una delta-endotoxina de *Bacillus thuringiensis* (Master's thesis, Tesis (MC)-Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN Departamento de Biotecnología y Bioingeniería).
- Casuso, M., Tarragó, J. y Galdeano, M.J. (2016). Producción de algodón: Recomendaciones para el manejo de plagas y de cultivo. INTA-Estación Experimental Agropecuaria Las Breñas, Las Breñas, Chaco, 86.
- CERA. (2010). GM Crop Database. Center for Environmental Risk Assessment (CERA), ILSI Research Foundation, Washington D.C.
- Chang, X., Wu, Q., Wang, S., Wang, R., Yang, Z., Chen, D., ... & Zhang, Y. (2012). Determining the involvement of two aminopeptidase Ns in the resistance of *Plutella xylostella* to the *Bt* toxin Cry1Ac: cloning and study of *in vitro* function. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 26(2): 60-70.
- Chaparro G., A. (2011). Cultivos transgénicos: entre los riesgos biológicos y los beneficios ambientales y económicos. *Acta Biológica Colombiana*, 16(3): 231-252.
- Chengchen X, Bi-Cheng W, Ziniu Y, Ming S. 2014. Structural insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and Parasporin. *Toxins*. 6: 2732–2770.

- De Jesus, F. G., Junior, A. L. B., Alves, G. C. S., Busoli, A. C., & Zanuncio, J. C. (2014). Resistance of cotton varieties to *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) *Revista Colombiana de Entomología*, 40(2): 158.
- Denise, P. B. S. (2014). The safety of Cry proteins in transgenics foods. *Abanico Veterinario*, 4(2): 42-53.
- DGSV-CNRF. 2020. Gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria Dirección General de Sanidad Vegetal- Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria-Grupo Especialista Fitosanitario. Ficha Técnica. Tecámac, México 22 p.
- DGSV-CNRF. 2020. Gusano elotero *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) (Lepidoptera: Noctuidae). Sader-Senasica. Dirección General de Sanidad Vegetal-Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. Ficha técnica. Tecámac, Estado de México, 17 p
- Donovan W.P., Engleman J.T., Donovan J.C., Baum J.A., Bunkers G.J., Chi D.J., Clinton W.P., English L., Heck G.R., Ilagan O.M., Krasomil-Osterfeld K.C., Pitkin J.W., Roberts J.K. & Walters M.R. (2006). Discovery and characterization of Sip1A: A novel secreted protein from *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran larvae. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 72: 713–719.
- Downes, S., Parker, T., & Mahon, R. (2010). Incipient resistance of *Helicoverpa punctigera* to the Cry2Ab Bt toxin in Bollgard II® cotton. *PLoS One*, 5(9): e12567.
- Estruch, J. J., Warren, G. W., Mullins, M. A., Nye, G. J., Craig, J. A., & Koziel, M. G. (1996). Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(11): 5389-5394.
- Fabrick, J. A., Mathew, L. G., Tabashnik, B. E., & Li, X. (2011). Insertion of an intact CR1 retrotransposon in a cadherin gene linked with *Bt* resistance in the pink bollworm, *Pectinophora gossypiella*. *Insect molecular biology*, 20(5): 651-665.

- Farias, J. R., Andow, D. A., Horikoshi, R. J., Sorgatto, R. J., Fresia, P., dos Santos, A. C., & Omoto, C. (2014). Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Crop protection*, *64*, 150-158.
- Forcada, C., Alcácer, E., Garcerá, M. D., & Martínez, R. (1996). Differences in the midgut proteolytic activity of two *Heliothis virescens* strains, one susceptible and one resistant to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, *31*(3): 257-272.
- Gahan, L. J., Gould, F., & Heckel, D. G. (2001). Identification of a gene associated with *Bt* resistance in *Heliothis virescens*. *Science*, *293*(5531): 857-860.
- Gahan, L. J., Pauchet, Y., Vogel, H., & Heckel, D. G. (2010). An ABC transporter mutation is correlated with insect resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *PLoS genetics*, *6*(12): e1001248.
- Galeano, D. F., Medrano, R. R., & Cázares, B. X. (2015). Estado actual de los cultivos genéticamente modificados en México y su contexto internacional. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Mexico pp. 6-72.
- García Morales, M. L. (2021). Confirmación de la Susceptibilidad de Poblaciones de *Spodoptera frugiperda* a las Toxinas Cry de *Bt* Mediante Dieta Vegetal de Cinco Híbridos de Algodón Genéticamente Modificado. (Tesis licenciatura). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila.
- García, G. L., Oyola, V. Y., Fernández, H. C., Pérez, G. K., Correa, A. E. (2017). Diversidad de artrópodos asociados al algodón *Bt* y convencional (*Gossypium hirsutum* L.) en Colombia. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, *8*(4): 905-918.
- Gatehouse J. (2008) Biotechnological Prospects for Engineering Insect-Resistant Plants. *Plant Physiol* *146*(3): 881-887
- Goergen, G., Kumar, P. L., Sankung, S. B., Togola, A., & Tamò, M. (2016). First report of outbreaks of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)

- (Lepidoptera, Noctuidae), a new alien invasive pest in West and Central Africa. *PloS one*, 11(10): e0165632.
- Gomis, C. J. (2019). Diversidad de las proteínas insecticidas producidas por *Bacillus thuringiensis*. Universidad de Valencia, Burjassot, Spain. pag. 9.
- Gordon, R. E., Haynes, W. C., & Pang, C. H. N. (1973). *The genus Bacillus* (No. 427). Agricultural Research Service, US Department of Agriculture.
- Gutiérrez, F., Ruiz, R., & Xoconostle, B. (2015). Estado actual de los cultivos genéticamente modificados en México y su contexto internacional. *Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México*, 194.
- Guzmán-Morales, D. C., Castillo-Reyes, F., González-Vázquez, V. M., García-Martínez, O., Aguirre-Urbe, L. A., Tiscareño-Iracheta, M. A., ... & Herrera, R. R. (2018). Poblaciones de *Heliothis virescens* (Fabricius, 1777) y *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) asociadas a algodón transgénico y no transgénico y su resistencia a la toxina BT. *Revista Bio Ciencias*, 5, 12-pág.
- Guzmán-Morales, D. C., Castillo-Reyes, F., González-Vázquez, V. M., García-Martínez, O., Aguirre-Urbe, L. A., Tiscareño-Iracheta, M. A., & Herrera, R. R. (2018). Poblaciones de *Heliothis virescens* (Fabricius, 1777) y *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) asociadas a algodón transgénico y no transgénico y su resistencia a la toxina BT. *Revista Bio Ciencias*, 5, 12.
- Hardke, J. T., Lorenz III, G. M., & Leonard, B. R. (2015). Fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) ecology in southeastern cotton. *Journal of Integrated Pest Management*, 6(1), 10.
- Herrera, A. J. L. & Loza, V. E. (2011). Variedades de algodónero para el valle de Mexicali, B. C. y San Luis R. C., Son. Mexicali, B.C., México: INIFAP.
- Huang, F. (2021). Resistance of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, to transgenic *Bacillus thuringiensis* Cry1F corn in the Americas: lessons and implications for Bt corn IRM in China. *Insect Science*, 28(3), 574-589

- Ibarra, J. E., & Castro, M. C. (2015). Mitos y realidades sobre las plantas transgénicas resistentes a insectos. México. *Acta Universitaria*, 25:13-23.
- Jurat-Fuentes, J. L., Karumbaiah, L., Jakka, S. R. K., Ning, C., Liu, C., Wu, K., ... & Adang, M. (2011). Reduced levels of membrane-bound alkaline phosphatase are common to lepidopteran strains resistant to Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *PLoS One*, 6(3): e17606.
- Keller, M., Sneh, B., Strizhov, N., Prudovsky, E., Regev, A., Koncz, C., ... & Zilberstein, A. (1996). Digestion of  $\delta$ -endotoxin by gut proteases may explain reduced sensitivity of advanced instar larvae of *Spodoptera littoralis* to CryIC. *Insect biochemistry and molecular biology*, 26(4): 365-373.
- Kruger, M., Van Rensburg, J. B. J., & Van Den Berg, J. (2011). Resistance to *Bt* maize in *Busseola fusca* (Lepidoptera: Noctuidae) from Vaalharts, South Africa. *Environmental entomology*, 40(2), 477-483.
- Lacey, L. A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D. I., Frutos, R., Brownbridge, M., & Goettel, M. S. (2015). Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology*, 132, 1–41.
- Lee, M. K., Walters, F. S., Hart, H., Palekar, N., & Chen, J. S. (2003). The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab  $\delta$ -endotoxin. *Applied and environmental microbiology*, 69(8), 4648-4657.
- Liu, F., Xu, Z., Zhu, Y. C., Huang, F., Wang, Y., Li, H., ... & Shen, J. (2010). Evidence of field-evolved resistance to Cry1Ac-expressing *Bt* cotton in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in northern China. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 66(2), 155-161.
- Loera, G.J., López, A. J. and Reyes, R.M.A. (2008). Complejo *Heliothis virescens* y *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae), en Casos de Control Biológico en México. Arredondo, B.H.C y Rodríguez del Bosque, L.A (Ed). Mundi Prensa México. 57-74.
- Luginbill, P. (1928). The fall armyworm. Technical Bulletin N. 34). *US Department of Agriculture. Washington, DC* <https://doi.org/10.22004/ag.econ.156281>.

- Lykouressis, D., Perdikis, D., Samartzis, D., Fantinou, A., & Toutouzas, S. (2005). Management of the pink bollworm *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera: Gelechiidae) by mating disruption in cotton fields. *Crop protection*, 24(2), 177-183.
- Melo, A. L. A, Soccol, V. T. & Soccol, R. C. (2014) *Bacillus thuringiensis*: mecanismo de acción, resistencia y nuevas aplicaciones: *Revisiones críticas en Biotecnología* 36(2): 317-326.
- Molina-Ochoa, J., Hutchison, W. D., & Blanco, C. A. (2010). Estado actual de *Helicoverpa zea* y *Heliothis virescens* dentro de un panorama cambiante en el sur de los Estados Unidos de Norte América y México. *Southwestern Entomologist*, 35(3): 347-354.
- Murúa, G., Defagó, V. & Virla, E. G. (2003). Evaluación de cuatro dietas artificiales para la cría de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera Noctuidae) destinada a mantener poblaciones experimentales de himenópteros parasitoides: *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas* 29(1): 43-51.
- Oberdoerfer, R. B., Shillito, R. D., de Beuckeleer, M., & Mitten, D. H. (2005). Rice (*Oryza sativa* L.) containing the bar gene is compositionally equivalent to the nontransgenic counterpart. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5), 1457-1465.
- Oppert, B., Kramer, K. J., Beeman, R. W., Johnson, D., & McGaughey, W. H. (1997). Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Journal of Biological Chemistry*, 272(38), 23473-23476.
- Pacheco M. F. 1994. Plagas de los cultivos oleaginosos en México. SAGAR, INIFAP, CIRCO. Cd. Obregón, Son., México, Libro Técnico N°3. 600 p.
- Paliwal, R. L. U. (2001). Introducción al Maíz y su importancia. En: Paliwal, R. L.; Granados, G.; Lafitte, H. R.; Violic, A.,D. y Marathée, J. P. (Eds.). El maíz en los trópicos. Mejoramiento y producción. Colección FAO: Producción y Protección Vegetal 28. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma. pp. 1-3.

- Palma, L., Muñoz, D., Berry, C., Murillo, J., Caballero, P. (2014). *Bacillus thuringiensis* toxins: An overview of their biocidal activity. *Toxins*. 6: 3296–3325.
- Pardo-Lopez L., Soberon M. & Bravo A. 2012. *Bacillus thuringiensis* insecticidal threedomain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiological Reviews* 37: 3-22.
- Pérez, L. M. (2016). Transgénicos. *Obtenido de [http://bioinformatica.uab.cat/base/documents/genetica\\_gen/portfolio/Trasgénicos2016\\_6\\_2P9\\_16\\_15.pdf](http://bioinformatica.uab.cat/base/documents/genetica_gen/portfolio/Trasgénicos2016_6_2P9_16_15.pdf)*.
- Pitre, H. N., & Hogg, D. B. (1983). Development of the fall armyworm on cotton, soybean and corn [*Spodoptera frugiperda*]. *Journal of the Georgia Entomological Society*.
- Portela-Dussán, D. D., Chaparro-Giraldo, A., & López-Pazos, S. A. (2013). La biotecnología de *Bacillus thuringiensis* en la agricultura. *Nova*, 11(20), 87-96.
- Ramírez D. M. & Nava U. C. 2000. Plagas insectiles asociadas al cultivo del algodnero. Memoria del III Curso Regional de Aprobación y Actualización en el control de plagas del Algodonero. UAAAN-UL, Torreón Coach., México. 154-167 p.
- Reyes, C. A., & Cantú, M. A. (2004). H-437, Híbrido de maíz para el noreste de México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 27(3): 289-289.
- Robledo, A. L. (2014). La historia de la agricultura y los cultivos transgénicos. UNAM. México. CIENCIORAMA. Pp.11.
- Rodríguez, M., R. & C. de León. 2008. El cultivo del maíz. Temas selectos. 1a ed. Editorial Colegio de Posgraduados, Mundi-Prensa México. Pp. 29-45
- Ruiz, R. C. (2015). Mecanismo Molecular de Acción del Sistema de Quorum Sensing Nprp-Nprrb en la Esporulación de *Bacillus thuringiensis*.
- Sauka, D. H., & Benintende, G. B. (2008). *Bacillus thuringiensis*: generalidades: Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Revista argentina de microbiología*, 40(2): 124-140.

- Schünemann, R., Knaak, N., & Fiuza, L. M. (2014). Mode of action and specificity of *Bacillus thuringiensis* toxins in the control of caterpillars and stink bugs in soybean culture. *International Scholarly Research Notices*, 2014.
- SENASICA, DGIAAP. SAGARPA, 2012. Estatus de solicitudes de permisos de liberación al ambiente de organismos genéticamente modificados ingresadas 2009, 2010, 2011.
- Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNCS) (2020). Programa de Abasto de Semilla de Algodón. <https://www.gob.mx/snics/acciones-y-programas/programa-de-abasto-de-semilla>
- Sha, J., Zhang, J., Chi, B., Liu, R., Li, H., & Gao, J. (2018). Sip1Ab gene from a native *Bacillus thuringiensis* strain QZL38 and its insecticidal activity against *Colaphellus bowringi* Baly. *Biocontrol Science and Technology*, 28(5), 459-467.
- Silva, C. C. A. (2005). Algodón genéticamente modificado. Editorial AGRO-BIO. Bogotá, Colombia.
- Storer, N. P., Babcock, J. M., Schlenz, M., Meade, T., Thompson, G. D., Bing, J. W., & Huckaba, R. M. (2010). Discovery and characterization of field resistance to *Bt* maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. *Journal of economic entomology*, 103(4), 1031-1038.
- Suárez-Machín, C., Garrido-Carralero, N. A., & Guevara-Rodríguez, C. A. (2016). Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. Revisión bibliográfica. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, 50(1), 20-28.
- Tabashnik, B. E., Brévault, T., & Carrière, Y. (2013). Insect resistance to *Bt* crops: lessons from the first billion acres. *Nature biotechnology*, 31(6), 510-521.
- Tabashnik, B. E., Dennehy, T. J., Sims, M. A., Larkin, K., Head, G. P., Moar, W. J., & Carriere, Y. (2002). Control of resistant pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*) by transgenic cotton that produces *Bacillus thuringiensis* toxin Cry2Ab. *Applied and environmental microbiology*, 68(8), 3790-3794.

- Terán-Vargas, A.P., Rodríguez, J.C., Blanco, C.A., Martínez-Carrillo, J.L., Cibrián-Tovar, J., Sánchez-Arroyo., H., ... & Stanley, D. (2005). Algodón Bollgard y resistencia del gusano del tabaco (Lepidoptera: Noctuidae) a insecticidas convencionales en el sur de Tamaulipas, México. *Revista de Entomología Económica*, 98(6): 2203-2209.
- Urretabizkaya N., Vasicek A. & Saini E. 2010. Insectos perjudiciales de importancia agronómica I. Lepidópteros. *Pectinophora gossypiella* "Lagarta rosada del algodón". Ediciones INTA. Buenos Aires. 77 p.
- Vaeck, M., Reynaerts, A., Höfte, H., Jansens, S., De Beuckeleer, M., Dean, C., ... & Leemans, J. (1987). Transgenic plants protected from insect attack. *Nature*, 328(6125), 33-37.
- Van Rensburg, J. B. J. (2007). First report of field resistance by the stem borer, *Busseola fusca* (Fuller) to Bt-transgenic maize. *South African Journal of Plant and Soil*, 24(3), 147-151.
- Villalba, A. (2009). Ciencia, Docencia y Tecnología. Resistencia a herbicidas. Glifosato, XX, núm. 39, pp. 169-186.
- Wan, P., Huang, Y., Wu, H., Huang, M., Cong, S., Tabashnik, B. E., & Wu, K. (2012). Increased frequency of pink bollworm resistance to *Bt* toxin Cry1Ac in China. *PLoS One*, 7(1): e29975.
- Warren, G. W. (1997). Vegetative insecticidal proteins: novel proteins for control of corn pests. *Advances in insect control: The role of transgenic plants*, 109-121.
- Warren, G. W., Koziel, MG., Mullins, M. A., Nye, G. J., Carr, B., Desai, N. M., ... y Estruch, JJ (1998). *Patente de EE.UU. nº 5.770.696*. Washington, DC: Oficina de Patentes y Marcas de Estados Unidos.
- Williams G.M., Kroes R, Munro I.C. (2000). Safety Evaluation and Risk Assessment of the Herbicide Roundup and its Active Ingredient, Glyphosate, for Humans. *Regulatory Toxicology Pharmacology*. 31(2): 117-165.
- Xu, X., Yu, L., & Wu, Y. (2005). Disruption of a cadherin gene associated with resistance to Cry1Ac  $\delta$ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*. *Applied and environmental microbiology*, 71(2): 948-954.

- Zhang, S., Cheng, H., Gao, Y., Wang, G., Liang, G., & Wu, K. (2009). Mutation of an aminopeptidase N gene is associated with *Helicoverpa armigera* resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Insect biochemistry and molecular biology*, 39(7): 421-429.
- Zhao, J. Z., Collins, H. L., Tang, J. D., Cao, J., Earle, E. D., Roush, R. T., ... & Shelton, A. M. (2000). Development and characterization of diamondback moth resistance to transgenic broccoli expressing high levels of Cry1C. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9): 3784-3789.