

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA



**Efectividad Biológica de la Toxina Cry1Ac y Cry2Ab en la Madurez
del Algodón Genéticamente Modificado *Bt* Resistente a Insectos**

POR:

AIDEÉ GONZÁLEZ RUÍZ

TESIS

Presentada como requisito para obtener el título de:

INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA

Saltillo, Coahuila; México

Mayo 2012

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA

**Efectividad Biológica de la Toxina Cry1Ac y Cry2Ab en la Madurez
del Algodón Genéticamente Modificado *Bt* Resistente a Insectos**

POR:

AIDEÉ GONZÁLEZ RUÍZ

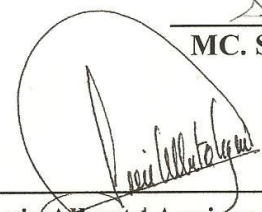
TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

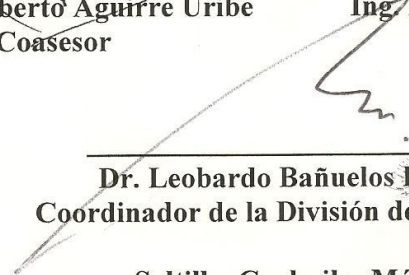
INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA

APROBADO POR:


MC. Sofía Comparán Sánchez
Asesor Principal


Dr. Luis Alberto Aguirre Uribe
Coasesor


Ing. Agustín Hernández Juárez
Coasesor


Dr. Leobardo Bañuelos Herrera
Coordinador de la División de Agronomía

Saltillo, Coahuila; México.
Coordinación
División de Agronomía

Mayo 2012

AGRADECIMIENTOS

A Dios y a toda su corte celestial por darme la vida y la fortaleza para hacer este sueño realidad que sin su ayuda no hubiera sido posible, también le agradezco por todos y cada uno de los obstáculos que me ayudo a pasar a lo largo de mi vida de estudiante y como persona las fuerzas brindadas para seguir adelante y no darme por vencida en ningún momento. Gracias.

A mi Alma Mater la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), en la cual me forme como profesionista, que me ha dado las herramientas necesarias para enfrentarme al campo laboral y/o profesional, con gran orgullo de formar parte de ella, siempre la llevaré muy en alto.

A la MC. Sofía Comparán Sánchez, Dr. Luis Alberto Aguirre Uribe e Ing. Agustín Hernández Juárez por todo su apoyo y amistad en la realización de este trabajo.

A MIS AMIGOS:

Por su gran apoyo moral, con quienes he convivido y disfrutado grandes momentos de mi vida; a ustedes les deseo el mejor de los éxitos donde quieran que se encuentren.

A la MC. Sofía Comparan Sánchez por todo su apoyo moral, económico y por comprenderme en esos momentos difíciles que pase, gracias por apreciarme como una hija.

DEDICATORIA

A mis hermosos hijos **Austin Joseph Hernández González** y **Alessandra Elizabeth Hernández González**, por ser mis dos motorcitos de vida porque son la fuerza que me motiva a seguir luchando en esta vida, los amo mis amores.

A mis Padres, Hermanos y Familiares.

A mi padre el Sr. Alfonso González Simón, por todas sus enseñanzas y apoyo a lo largo de mi vida, por apoyarme y ayudarme a cumplir este sueño en una realidad, por darme tu hombro para apoyarme y por darme tu mano cuando me sentía caer, por todos esos momentos; gracias papi por confiar en mí, te amo mucho.

A mi madre Sra. Onoely Ruíz Natarén, por toda la dedicación, apoyo y enseñanza, por darme tu hombro para apoyarme y por darme tu mano cuando me sentía caer, por todos esos momentos que hemos pasado, que sin tu fortaleza y apoyo nunca lo hubiera logrado; gracias mami por confiar en mí, te amo mucho.

A mis hermanos Alberto González Ruíz y Alfonso González Ruíz por su apoyo y comprensión, y por todas las alegrías y momentos felices y llenos de dicha que me han hecho pasar y por siempre tenerme presente en sus corazoncitos gracias hermanitos.

A mis tíos y tías gracias por su apoyo moral y confianza.

A Agustín Hernández Juárez gracias mi amor por apoyarme y por brindarme tu amor y compañía, y compartir tu vida junto a la mía, así como por compartir tu experiencia profesional y por muchas cosas más. Te amo.

A el Ing. Jesús Reyes Vaquera Chávez (†) por apoyarme y compartir su experiencia de vida y sus consejos, su compañía y por enseñarme y compartirme sus valores morales, gracias y que dios lo tenga en su eterna gloria.

INDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIA	iv
INDICE DE CONTENIDO	v
INDICE DE CUADROS	vii
INDICE DE FIGURAS	viii
RESUMEN	ix
INTRODUCCIÓN	1
Objetivo	2
REVISIÓN DE LITERATURA	3
Clasificación y Descripción del Algodón	3
Clasificación Taxonómica	3
Descripción Botánica	3
Reproducción	4
Importancia Económica	5
Plagas	6
Generalidades de <i>Heliothis virescens</i>	7
Clasificación Taxonómica	7
Biología y Descripción Taxonómica	7
Origen y Distribución	11
Plantas Hospederas	11
Daños e Importancia Económica	11
Generalidades de <i>Spodoptera frugiperda</i>	12
Clasificación Taxonómica	12
Biología y Descripción Taxonómica	12
Origen y Distribución	15
Plantas Hospederas	16
Daños e Importancia Económica	16
Algodón genéticamente modificado	18
Generalidades de <i>Bacillus thuringiensis</i> .	20
Toxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	21
Modo de Acción de <i>Bacillus thuringiensis</i>	23
Importancia de <i>Bacillus thuringiensis</i>	25
MATERIALES Y METODOS	27
Metodología	27
Colonia de Insectos	27
Cría, Reproducción y Mantenimiento	27
Siembra del Algodón	28
Deshidratación y Macerado de Tejido Vegetal	28

Preparación de Concentraciones	28
Bioensayos	28
Evaluación	29
RESULTADOS	30
Susceptibilidad de <i>Heliothis virescens</i> a las Toxinas Cry1Ac y Cry2Ab	30
Susceptibilidad de <i>Spodoptera frugiperda</i> a las Toxinas Cry1Ac y Cry2Ab	31
DISCUSIÓN	32
CONCLUSIONES	37
LITERATURA CITADA	38

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Pag.
1	Porcentaje de mortalidad de larvas neonatas de <i>Heliothis virescens</i> expuestas durante 8 días a la toxina Cry1Ac y Cry2Ab del Algodón <i>Bt</i> .	30
2	Análisis Probit de la mortalidad de larvas neonatas de <i>Heliothis virescens</i> expuestas durante 8 días a la toxina Cry1Ac y Cry2Ab del Algodón <i>Bt</i> .	30
3	Porcentaje de mortalidad de larvas neonatas de <i>Spodoptera frugiperda</i> expuestas durante 8 días a la toxina Cry1Ac y Cry2Ab del Algodón <i>Bt</i> .	31
4	Análisis Probit de la mortalidad de larvas neonatas de <i>Spodoptera frugiperda</i> expuestas durante 8 días a la toxina Cry1Ac y Cry2Ab del Algodón <i>Bt</i> .	31
5	Concentración de proteína tóxica Cry1Ac en estructuras vegetales de algodón durante tres periodos de floración en 2004 y 2005.	34
6	Concentración máxima de proteína tóxica Cry1Ac en tejidos vegetales de Bollgard.	34

INDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
1	Esquema de los diferentes eventos en el modo de acción de las proteína Cry de <i>Bacillus thuringiensis</i> . 1. Solubilización, 2.Rompimiento de protoxina, 3. Unión al receptor cadherina, 4. Formación de Pre-poro, 5.Unión receptor amino peptidasa, 6. Inserción toxina. Fuente Soberón y Bravo, 2007.	24
2	Modo de acción de la δ -endotoxina de <i>Bacillus thuringiensis</i> .	25

RESUMEN

El algodón genéticamente modificado expresa una o mas toxinas de *Bacillus thuringiensis* en todos sus tejidos; en diferentes niveles de expresión a lo largo de su ciclo vegetativo, para el control de lepidópteros plaga, disminuye sus niveles de expresión cuando los tejidos de la planta maduran, es por ello que se evaluó la efectividad de las toxinas en larvas neonatas susceptibles de laboratorio del gusano bellotero *Heliothis virescens* y el gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* e identificar si la toxina mantiene su control sobre estos insectos plaga. Como fuente de toxina se utilizo el tejido deshidratado del algodón *Bt* (100 días después de la siembra). Se expuso las larvas a seis concentraciones de las toxinas en dieta artificial. La mortalidad se registro a los 8 días de expuestos los tratamientos. Los resultados se sometieron a un análisis Probit para obtener las concentraciones letales. El análisis reveló baja susceptibilidad a la toxina Cry1Ac de *S. frugiperda* y en menor grado *H. virescens*, con mortalidades menores al 50 %. Para la toxina Cry2Ab *H. virescens* tuvo buena susceptibilidad con una CL50 de 489.5 ppm, sin embargo *S. frugiperda* no fue susceptible a esta toxina, con una mortalidad en la dosis mas alta del 33.3 %, por lo que no se estimaron las concentraciones letales; estos resultados revelan que la toxina Cry1Ac se degrada con el desarrollo del tejido vegetal; mientras que la Cry2Ab se expresa de igual forma durante la etapa de madurez de la planta.

Palabras clave: Algodón Genéticamente modificado, Cry1Ac, Cry2Ab, *Bacillus thuringiensis*, *Spodoptera frugiperda*, *Heliothis virescens*.

INTRODUCCIÓN

El algodón *Bt* es una tecnología desarrollada para proteger del daño de ciertos insectos, a través de la inserción de un gen o genes de una bacteria natural del suelo, *Bacillus thuringiensis* (Berliner) sub sp. Kurstaki, para producir, durante todo su ciclo de vida, pequeñas cantidades de una proteína Cry- δ -endotoxina (Silva, 2005), con actividad insecticida contra algunos lepidópteros, especialmente belloteros (www. monsanto.com), usado por primera vez en 1996 en Argentina, Australia, China, Estados Unidos y México (James, 2009).

En México la tecnología Bollgard que produce la proteína Cry1Ac ofrece a los productores excelente control de importantes insectos que limitan la productividad del algodón: el complejo bellotero (*Heliothis virescens* y *Helicoverpa zea*) y gusano rosado (*Pectinophora gossypiella*) contribuyendo a alcanzar niveles de competitividad que demandan los mercados internacionales, al tiempo en que se evita la aplicación al ambiente de cantidades considerables de plaguicidas (www. monsanto.com). Sin embargo debido al brote de estas plagas en el algodón Bollgard, se requiere de la aplicación de insecticidas foliares para mantener estas poblaciones por debajo del nivel de daño económico (Hood 1997, Smith 1997; tomados de Adamczyk *et al.*, 2008); por lo que avances en el control de plagas con la tecnología transgénica ofrece una opción mas eficaz contra muchos lepidópteros plaga, variedades de algodón que contienen las proteínas Cry1Ac y Cry2Ab (Bollgard II) que aumentan el nivel y espectro de control y reducen la probabilidad de desarrollo de resistencia en los insectos blanco, como gusano de la hoja del algodón (*Alabama argillacea*), gusanos del complejo bellotero (*Heliothis virescens* y *Helicoverpa zea*), gusano rosado (*Pectinophora gossypiella*) y gusano rosado colombiano (*Sacadodes pyralis*). Además, ofrece alguna protección contra el falso medidor (*Trichoplusia ni*) y perforador de la hoja (*Bucculatrix sp.*) y control parcial de gusano soldado (*Spodoptera exigua* y *Spodoptera ornithogalli*), gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*) y gusano defoliador de la hoja (*Pseudoplusia includens*) (www. monsanto.com). Considerando que hasta la fecha los cultivos *Bt* registrados

producen la proteína Cry en todos sus tejidos, aunque en diferentes niveles de expresión a lo largo de su ciclo de crecimiento. Es decir, que los cultivos *Bt* presentan su máxima expresión durante los primeros treinta días después de la siembra en las hojas terminales y durante la floración del cultivo, para después disminuir significativamente sus niveles de expresión; cuando los tejidos de la planta envejecen, la proteína Cry también se degrada rápidamente. Se ha calculado que esta degradación, aunque varía para cada cultivo y para cada condición ambiental, es del orden de 50 a 88% (Ibarra y Del Rincón s/f; Olsen *et al.*, 2005, tomado de Zenner de Polanía *et al.*, 2008).

Objetivo

Evaluar la efectividad de la toxina Cry1Ac y Cry2Ab del algodón genéticamente modificado para resistencia a insectos a la madurez de las hojas terminales de la planta sobre larvas de primer estadio de *Heliothis virescens* y *Spodoptera frugiperda*.

REVISIÓN DE LITERATURA

Clasificación y Descripción del Algodón

Clasificación Taxonómica

Reino	Plantae
División	Tracheophyta
Sub división	Pteriopsidae
Clase	Angiospermae
Sub-clase	Dicotiledóneas
Orden	Malvales
Familia	Malvaceae
Genero	<i>Gossypium</i>
Especie	<i>Gossypium hirsutum L.</i>

Fuente: (Robles, 1982).

Descripción Botánica

Raíz

El sistema radicular del algodón está integrado por una raíz pivotante y una masa de ramificaciones laterales que constituyen la estructura principal de absorción y anclaje. El desarrollo de este sistema está fuertemente influido por el tipo de suelo en el que crece y la distribución de la humedad en sus distintos horizontes. Con un crecimiento promedio de 2 cm por día en una planta madura, el pivote central puede alcanzar 2.50 a 3 m de profundidad (Arturo, 1984).

Tallo

El tallo principal es erecto, con crecimiento monopodial, integrados por nudos y entre nudos. De un nudo se desarrolla una hoja y en la base del peciolo emergen yemas, una es vegetativa y la otra es fructífera. La corteza, es moderadamente gruesa, dura y encierran a las fibras liberianas con la cara extrema más o menos

suberificado. Los tallos son de color amarillento, sobre las partes jóvenes es de color verdosas y rojizas (Arturo, 1984).

Hojas

Su tamaño, forma, textura y pubescencia varían entre las especies. La mayoría tiene hojas con cinco lóbulos y peciolo largo. Pueden ser de color verde oscuro, verde claro o rojizo. Tiene de tres a cinco nervaduras principales con nectarios en el envés que excretan un fluido dulce (Arturo, 1984).

Flores

Está formada por un verticilo de tres brácteas triangulares verdes, alrededor del cáliz. La corola tiene cinco pétalos, cuyo color varía de acuerdo con las especies y variedades. Pueden ser blancas, crema, amarillas o rojas. El ovario es superior, formado por tres o cinco carpelos unidos, cada uno con varios óvulos. El estilo termina en un estigma lobulado y está encerrado por la columna estaminal (Arturo, 1984).

Fruto

Es una cápsula esférica u ovoide, de color verde claro o verde oscuro, con pocas o muchas glándulas de aceite. Persisten en ella las brácteas. Al tiempo de la madurez se abre por las suturas de los carpelos. De cada una de ellas emerge una pelusa blanca de algodón (Arturo, 1984).

Reproducción

La reproducción en el algodón es de manera sexual tanto por Autogamia (Autofecundación) como por Alogamia (Fecundación cruzada), siendo este último; el mecanismo más común (McGregor, 1976).

Autopolinización: Facultativamente el algodón presenta el mecanismo de autopolinización, este se lleva a cabo cuando no existen los polinizadores adecuados y el polen de la flor llega al pistilo de la misma flor.

Polinización cruzada: Los nectarios de la flor son una atracción olfatoria para los visitantes, debido a ello, el índice de los visitantes en las flores de algodón favorece o sobrestima la polinización cruzada, destacándose a insectos útiles en la polinización principalmente del orden Hymenoptera: *Anthophora spp.*, *Elis thoracica*, *Helictus spp.*, *Megachile spp.*, *Melitoma euglossoides*, *Nomia spp.*, *Apis dorsata*, *A. florea*, *A. indica*, *A. mellifera* *Bombus spp.* y *Melissodes spp.*; estos últimos tres considerados los polinizadores más importantes para el algodón, ya que el movimiento del polen es posible sólo por transporte de insectos, pues este; es muy pesado y largo para ser transportado por el viento, con un índice de polinización entre 2.8 a 18.5%, y dependerá del número de insectos polinizadores y el número de flores presentes en la población (McGregor, 1976).

Importancia económica

El algodón tiene una gran importancia económica ya que de sus frutos se obtiene la fibra de algodón, utilizada universalmente como materia prima de productos textiles. Adicionalmente, del algodón se obtienen otros productos: materias primas para fabricar jabón, celulosa que se utiliza en algunos cosméticos, fibras para prendas de vestir, etc. Incluso, el papel moneda con que se hace el Euro está confeccionado completamente de algodón. También el dólar, en sus versiones más modernas, está elaborado con esta fibra (www.pecaltex.com).

Es un producto básico, importante en la economía mundial. Cultivado en más de 100 países, el algodón es un producto agrícola para el que existe un importante comercio, y son más de 150 los países que exportan o importan algodón, representando la mitad del área total de cultivos no destinados a la alimentación, con 35 millones de hectáreas y es además, la fibra más consumida a nivel mundial (50% del total) (www.pecaltex.com).

En México para el 2010, se sembró una superficie de 120, 117 Hectáreas con una producción de 440,489 toneladas y un valor de 4,098, 733. 52 pesos (SIAP, 2012).

Plagas

Las plagas han sido algunos de los principales problemas que limitan la producción de las variedades de algodón convencional. Entre las principales plagas clave de este cultivo a nivel nacional se encuentran el Picudo del Algodón *Anthonomus grandis* (Coleóptera: Curculionidae), Gusano Rosado *Pectinophora gossypiella* (Lepidóptera: Gelechiidae), la conchuela *Chlorochroa ligata* y *Nezara viridula* (Hemíptera: Pentatomidae), el Gusano Soldado *Spodoptera exigua* (Lepidóptera: Noctuidae) y la Mosquita Blanca *Bemisia argentifolii* (Hemíptera: Aleyrodidae). Destacándose el Complejo Bellotero *Helicoverpa Zea* y *Heliothis virescens* (Lepidóptera: Noctuidae), y el gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Alonso, 1983; Alonso, 1995; Sánchez, 1996; Alonso, 2004; Carrillo, 2005).

Plagas de importancia secundaria se encuentran los Thrips *Thrips tabaci* y *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae), el Pulgón del Algodón (Hemíptera: Aphididae), Araña Roja *Tetranychus urticae* (Acarina: Tetranychidae), Gusano Falso Medidor *Trichoplusia ni* (Lepidóptera: Noctuidae) y Gusano Peludo *Estigmene acrea* (Lepidóptera: Arctiidae) principalmente, existe además un complejo de otros insectos chupadores y gusanos que en ocasiones se pueden convertir en serios problemas para el algodón (Alonso, 1983; Alonso, 1995; Sánchez, 1996; Alonso, 2004; Carrillo, 2005).

Generalidades de *Heliothis virescens*

Los géneros *Heliothis* y *Helicoverpa* comprenden las plagas más graves del algodón en la actualidad a nivel mundial. El gusano de la yema o cogollero del tabaco se ha considerado una plaga polífaga de cultivos importantes tales como el algodón, *Gossypium hirsutum* L.; el garbanzo, *Cicer arietinum* L., y el tabaco, *Nicotiana tabacum* L.; en el sur de EEUU y México por décadas.

Clasificación taxonómica

Phyllum: Artrópoda

Clase: Hexápoda

Orden: Lepidóptera

Familia: Noctuidae

Género: Heliothis

Especie: virescens Fabricius.

Fuente: Borror *et al.* 1989.

Biología y Descripción taxonómica

Las diferentes etapas por las que atraviesa el insecto pueden mostrar algunas diferencias en su duración de acuerdo con el valor nutritivo de la planta en que se alimentó la larva y las sustancias que ingirió el adulto, así como con las condiciones ambientales predominantes, particularmente la temperatura (Wille, 1951; citado por www.bioagro.com).

Huevo

Depositados en forma individual, con frecuencia varios sobre una misma estructura, por lo general en el tercio superior de la planta. En el algodón son colocados preferencialmente sobre el haz de las hojas nuevas terminales y en las brácteas de los botones; en ocasiones se pueden observar en el envés de las hojas, sobre tallos y brotes secundarios (García, 1976; citado por www.bioagro.com).

Miden aproximadamente 0,5 mm de diámetro. Son esféricos, ligeramente aplanados, con la superficie estriada radialmente. En un principio son de color crema brillante, pero luego se van oscureciendo a medida que se aproxima la eclosión. Son depositados en forma individual por las hembras durante la noche y es difícil distinguirlos de los huevos de *H. zea*, y probablemente de otros congéneres, su duración es de 2 a 6 días (Wille, 1951, A. H, 1962, ----, 1979; citados por www.bioagro.com).

Larva

Constituye la única etapa dañina del insecto. Recién emergidas de los huevos se alimentan del tejido foliar y posteriormente van en busca de los órganos fructíferos. En el algodónero inician su daño en los botones pequeños; roen el tejido de éstos y a continuación los perforan consumiendo total o parcialmente su contenido. Más adelante buscan otros botones más desarrollados, flores y cápsulas, las cuales perforan una sola vez, generalmente en la parte media o basal de la estructura, introduciendo sólo una parte del cuerpo. En los botones atacados se produce la apertura de las brácteas, lo que comúnmente se denomina "bandereo" y que los destaca de los normales; estos botones caen al suelo poco tiempo después. Las cápsulas perforadas no caen, pero sufren pudriciones causadas por patógenos, y se pierden. Una larva puede deteriorar aproximadamente seis estructuras fructíferas durante su vida (García, 1976; citados por www.bioagro.com).

Son eruciformes, con tres pares de patas torácicas, cuatro pares de pseudo-patas abdominales y un par anal o telson. Miden 1,0 a 1,5 mm de largo. Poseen color claro y cabeza prominente y negra cuando están recién emergidas del huevo; a medida que crece su coloración adquiere varias tonalidades, entre las cuales son comunes los amarillo pálido, verde claro, verde oscuro con puntos, rojizo y oscuro, casi negra. Este polimorfismo larval, que también ocurre en otras especies de lepidópteros (*Helicoverpa zea*, *Alabama argillacea* y *Anticarsia gemmatalis*), parece ser el resultado de la interacción de varios factores, entre los cuales se destacan el

hacinamiento, la calidad del alimento y algunos estímulos entre las larvas, particularmente el visual (Winder, 1976, --- 1979; citados por www.bioagro.com).

A lo largo del cuerpo, y especialmente en la porción dorsal, se presentan tubérculos levantados en los cuales se insertan pelos o setas de tamaño variable. En algunas larvas se aprecian claramente cuatro tubérculos setíferos negros, dispuestos en forma de trapecio, en el dorso de cada segmento abdominal. Muchas veces se pueden distinguir tres líneas oscuras longitudinales que se extienden a lo largo de todo el cuerpo. Difícilmente pueden separarse con certeza a simple vista las larvas de *H. virescens* y *H. zea*. Normalmente se presentan seis estadios larvales en esta especie. Cuando alcanzan su desarrollo óptimo miden 30 a 45 mm de largo. Después de alcanzar el cuarto estadio, muestran hábitos canibalísticos, con una duración de 14 a 21 días o hasta 40; 18 días en promedio (Wille, 1951, A.H., 1962, --, 1979; citados por www.bioagro.com).

Pupa

En cualquiera de los hospederos afectados, una vez que la larva alcanza su óptimo desarrollo suspende la alimentación, se dirige al suelo y fabrica allí una galería varios centímetros bajo la superficie; luego construye una celda pupal y permanece quiescente; sus segmentos se acortan, muda por última vez y se convierte en pupa (Wille, 1951; A.H., 1962, García, 1976; citados por www.bioagro.com).

Mide 15 a 18 mm de longitud. Son del tipo obtecta, de color café oscuro, liso y brillante. El cremáster está constituido por dos espinas diminutas. Estas pupas son similares a la de *H. zea*, pero un poco más pequeñas y estrechas. El sexo puede determinarse por la posición de la apertura de la genitalia, que en la hembra está localizada en el octavo segmento abdominal y en el macho en el noveno. Al terminar el período de pupa emerge el adulto, generalmente durante la noche, el estado de pre-pupa dura de 1 a 4 días y la pupa de 9 a 28 días (Wille, 1951; A.H., 1962, García, 1976; citados por www.bioagro.com).

Adulto

De hábitos nocturnos, ágiles y buenos voladores. Se alimenta, aparea y oviposita en la oscuridad. Durante el día permanece oculto entre el follaje de las plantas. Demuestra fototropismo positivo, aunque no particularmente marcado. La hembra inicia la oviposición 3 o 4 días después de haber emergido de la pupa; para esta actividad prefiere plantas muy suculentas (García, 1976; citado por www.bioagro.com).

Las polillas miden de 28 a 35 mm de envergadura alar, con antenas filiformes de color verde amarillento en los machos y un poco más oscuro, tendiendo a cobrizo, en las hembras. En las alas anteriores se presentan tres bandas diagonales de color claro, cada una limitando con otra banda más amplia y más oscura, y todas extendiéndose desde la vena costa hasta el margen posterior. En ocasiones se puede observar un punto oscuro en la porción central de cada ala anterior. Las alas posteriores son de color blanco uniforme en los machos y tienen una franja oscura en el margen posterior en las hembras, su longevidad depende de la ingestión de azúcares que obtienen del néctar de las plantas o de excreciones azucaradas de pulgones en el campo. Los adultos en cautiverio, después de su emergencia, viven entre 1 y 10 días; las hembras pueden extenderse de 18 a 27 días. El número de huevos depositado depende del tipo de alimento que consumió la larva, la alimentación del adulto y de la copulación. El número promedio de huevos que deposita cada hembra es de 400-700 huevos (Wille, 1951, A.H., 1962, ---, 1979; citados por www.bioagro.com).

El sexo, puede determinarse al oprimir el abdomen de especímenes vivos y diferenciar la genitalia que emerge. En machos adultos muertos, observados con aumento, se aprecia, en la parte anterior de las antenas, setas rectas, un poco curvadas en su extremo, de una longitud mayor de dos quintos del diámetro de la antena, que no ocurren en las hembras. En ambos sexos se encuentran setas más cortas que las mencionadas, inclinadas 90% con respecto al eje longitudinal de la antena (Wille, 1951; A.H., 1962 citados por www.bioagro.com).

Origen y Distribución

El gusano bellotero del algodón es una especie americana de amplia distribución, desde Canadá hasta Argentina. Es una plaga voraz en cultivos agrícolas en el hemisferio occidental. En México se encuentra ampliamente distribuido y permanece activa todo el año y tiene de cuatro a ocho generaciones por año. El rango geográfico de infestación se incrementa cada primavera y verano asociándose con la dispersión y migración de las palomillas hacia el Norte desde sus regiones sureñas de hibernación.

Plantas hospederas

Esta especie tiene un abundante número de plantas hospederas, tanto cultivadas como herbáceas; evidentemente, el algodón es su preferida y donde causa mayores problemas. Otros cultivos que afecta son: frijol, tomate, ajonjolí, cacahuate, melón, sandía, girasol, geranio, rosas y alfalfa (Vélez, 1961, García, 1976; citados por www.bioagro.com).

Daños e importancia Económica

H. virescens comprende una de las plagas de mayor impacto económico en el mundo, con daños causados en el rendimiento del algodón en más de un 60 %. Las razones que explican el alcance que logró esta plaga son: sus hábitos alimenticios, que afectan detrimentalmente los órganos fructíferos de sus plantas hospedantes; el amplio rango de plantas cultivadas y malezas en que se alberga, lo cual le garantiza una extensa distribución, una abundancia relativa considerable y un sitio adecuado de supervivencia, y los niveles de resistencia o tolerancia, o de ambos, que sus poblaciones han demostrado a varios plaguicidas tradicionalmente utilizados para su control; esta situación ha desembocado finalmente en destrucción del equilibrio biológico, contaminación ambiental y gran demanda de costos para el agricultor (---, 1987; GIMP, 1991; Rendón, *et al.* 1993; Valencia, *et al.* 1993; citados por www.bioagro.com).

Generalidades de *Spodoptera frugiperda*

El gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) constituye la plaga de mayor importancia que afecta a varios cultivos en México (Bahena, 1998), alrededor de 80 especies en 23 familias (Andrews, 1988; Pashey, 1988), registrándose en diversas entidades pérdidas causadas por este insecto que van desde 13% hasta 60 % y en casos extremos pérdida total del cultivo (Silva-Aguayo *et al.*, 2010).

Clasificación Taxonómica

Phyllum: Artrópoda

Clase: Hexápoda

Orden: Lepidóptera

Familia: Noctuidae

Género: Spodoptera

Especie: frugiperda J. E. Smith.

Fuente: Borror *et al.* 1989.

Biología y Descripción Taxonómica

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

Huevo

Las hembras ovipositan varias masas de huevos generalmente en el envés de las hojas variando considerablemente, con un máximo de 1500 a 2000 huevos, pero a menudo de 100 a 200 por masa, son esféricos, de color verdoso o pardo, y las masas son cubiertas con las escamas de la palomilla (Capinera, 1999).

El huevo presenta en el exocorion depresiones superficiales, en tanto que el endecorión es liso (Bahena, 1998). Mide 0.45 mm de diámetro por 0.35 mm de alto,

son casi blancos con un tinte verdoso y su incubación dura de 4 a 5 días (Peterson, 1962).

Larva

Las larvas emergen de los huevos todas juntas; para inicialmente alimentarse del corion del huevo; su tasa de mortalidad es en extremo elevada debido a factores como la lluvia, depredadores y parásitos o parasitoides.

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

Los últimos estadios son de color café oscuro grisáceo o verdoso con 3 bandas longitudinales en el cuerpo y presentan en la cabeza, áreas adfrontales de color blanco-amarillo, en forma de “Y” invertida. Los segmentos abdominales son de igual ancho hasta el 8° segmento, después se hacen más angostos, vista de forma dorsal, en el octavo segmento abdominal, presenta cuatro puntos negros en forma de cuadro que corresponden a los pináculos setígeros dorsales, prominentes y carecen de micro espinas, el color general varía de rosado a amarillo, oliváceo y gris o casi negro (Frederick, 2005; Bautista, 2006). El dorso es más pálido que el área supraespiracular, la cual posee cintas y adornos castaños o negruzcos; la línea medio-dorsal es ancha, algo tenue, pero firmemente definida. Posee una línea fuerte amarillenta ventralmente al tubérculo setígero II, el área supraespiracular es más oscura dorsalmente, particularmente en una mancha negra marginal anterior en los segmentos abdominales. Espiráculos pálidos en una mancha blanquecina. Una

banda subventral bien definida, ancha amarilla o blanquecina, más o menos moteado con ferrugineo. Tubérculos setíferos grandes, casi planos, oscuros. El escudo cervical es castaño-oscuro cortado por una línea media y dos líneas medias claras laterales (Bautista 2006; Crumb, 1956 citado por corona 2008).

Pupa

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

Adulto

El adulto es una palomilla que tiene aproximadamente 3-3.5 cm de expansión alar, de color café grisáceo con una mancha clara en medio de las alas anteriores (Rodríguez y De León, 2008). En el macho, el área costal de las alas anteriores son de coloración pálida, con una mancha elíptica blanquecina cerca del centro y a un lado de esta, una franja diagonal clara dirigida del margen costal al centro del ala, además de una pequeña mancha blanquecina en el margen apical. La cabeza y

tórax son de color amarillo u ocre; el abdomen presenta zonas oscuras y en la parte posterior un penacho o cresta anal (Bahena, 1998, Frederick, 2005; Bautista, 2006).

La hembra presenta una mancha elíptica en el margen costal delimitado por una línea clara de color gris, mas oscura que el macho, además de carece de cresta anal y de la manchas blanquecina (Bahena, 1998). Las hembras ovipositan masas de 40-300 huevecillos, generalmente en el envés de las hojas y ocasionalmente en el haz; al ser ovipositados son cubiertos por pelillos o escamas de la misma palomilla. Se ha observado también que los huevos pueden ser colocados en malezas del cultivo (Corona, 2008).

Origen y Distribución

S. frugiperda es una plaga endémica de regiones agrícolas tropicales y subtropicales del continente americano, carece de mecanismos de diapausa, en el hemisferio occidental se le ha encontrado desde el sur de Canadá hasta Chile y Argentina (Murua y Virla, 2004).

En México se localiza prácticamente en todas las regiones donde se cultiva maíz, aunque sus daños son más severos en el trópico y subtrópico (Rodríguez y De León, 2008). Estudios realizados en México, demuestran que *S. frugiperda*, esta reportada desde el año de 1888 por Smith, en las localidades de Coatepec y Jalapa, Veracruz y Teapa, Tabasco. Actualmente, se localiza en todas las zonas donde se siembra maíz, pero destaca su presencia en Oaxaca, Guerrero, Veracruz, Morelos, Guanajuato, San Jalisco, San Luis Potosí, Tamaulipas, Michoacán, Nuevo León, Nayarit, Estado de México y Colima y de la misma forma, es considerada un serio problema en los estados de Quintana Roo y Yucatán (Gutiérrez, 1984).

Plantas hospederas

El gusano cogollero es un insecto polífago, con una serie muy amplia de hospederos con más de 80 especies de plantas de 23 familias diferentes atacadas por esta plaga, con preferencia por las gramíneas, considerada en muchos aspectos plaga potencial del maíz, provocando pérdidas promedio de 30 a 40% en México (Capinera, 1999; Nagoshi y Meagher, 2008; Rodríguez y De León, 2008).

En México se ha reportado su presencia principalmente sobre el cultivo de maíz, además afecta a otros cultivos de importancia económica, gramíneas como el sorgo, arroz, pastos, caña de azúcar, trigo; leguminosas como alfalfa, frijol, soya, cacahuate y trébol y cultivos hortícolas como la papa, tomate, cebolla, pepino, col y camote, frutales como cítricos, fresa, vid y cultivos industriales como el algodón (Borbolla, 1981; Silva-Aguayo, *et al.*, 2010), causando daños de consideración, siendo estos los de mayor preferencia, y aparte otra gran variedad de cultivos distribuidos en diversas familias, como avena, cebada, sorgo, caña de azúcar, alfalfa, el papiro, berenjena, pimentón o chile, tabaco, Amaranto, espinaca, mango, papaya, higuera, Guayaba, Eucalipto, Gladiola, almendrón, Repollo, Nabo, plátano, Pimienta, manzana, Fresa, melón, Lino, ajonjolí, espárrago, Naranja, limón y la Vid (Luginbill, 1928; Labrador, 1967; García, 1975; Terán, 1980).

Daños e importancia económica

Aun cuando se habla de *S. frugiperda* en zonas tropicales y subtropicales, que causa severos daños; su supervivencia es posible todo el año en áreas con latitudes menores a los 27° N, donde las temperaturas por debajo de 9.9 °C son escasas (Murua y Virla, 2004).

Se presenta de acuerdo a la susceptibilidad de la etapa que atraviese el cultivo y a las condiciones ambientales que prevalezcan. Su radio de acción es muy amplio incluyendo ataques y daño como cortador y tierrero. Además, también puede ser defoliador, cogollero y bellotero. Actúa como plaga generalizada sobre la plántula, al igual que los cortadores; en este estado vive en el suelo y se asocia su

daño con el de los tierreros. Al crecer la planta los hábitos de la plaga cambian a defoliador y consumen los cogollos o partes terminales; en este momento "capa" el cultivo. Sin embargo, el daño más visible lo ocasiona al formarse las estructuras reproductivas: flores, botones y bellotas. Comienzan sus ataques en el tercio inferior de la planta. Los daños que causa pueden llegar a ser muy intensos, especialmente en estado de germinación o fructificación o bien cuando atacan cultivos con plantas que no hayan desarrollado una masa vegetativa abundante. A partir de los 60 días los daños en botones y bellotas son graves, ameritando tomar medidas de combate (Barral y Zago, 1983).

Ambos nóctuidos han sido históricamente manejados con pesticidas químicos, *H. virescens* plaga clave del algodón requirió una gran cantidad de aplicación de insecticidas químicos, alrededor del 25% de los plaguicidas agrícolas en todo el mundo, incluyendo algunos de los mas tóxicos, hidrocarburos clorados (como el DDT), hasta su prohibición por razones sanitarias y ambientales, sustituyéndolo por organofosfatos, muchos de los cuales son también muy tóxicos y en muchas regiones las plagas crearon rápidamente resistencia, lo que provoco el uso de piretroides que son menos tóxicos, las plagas no tardaron en ofrecer resistencia a los piretroides y la resistencia múltiple a los productos químicos llegó a ser un grave problema. En zonas donde se planteo el problema de resistencia a los productos químicos, las variedades de algodón transgénico *Bt* contribuyeron a reducir espectacularmente el empleo de plaguicidas (FAO, 2004), puesto que *H. virescens* es susceptible a la toxina Cry1 de *Bacillus thuringiensis* expresada en variedades de algodón transgénico. Por lo tanto, la adopción diseminada de algodón *Bt* es percibida comúnmente como uno de los factores asociados con las poblaciones decadentes de esta plaga y su reducida importancia como una plaga del algodonoero (Zenner de Polanía *et al.*, 2008, Zenner de Polanía y Álvarez-Alcaráz, 2008). *Spodoptera frugiperda* intrínsecamente ha desarrollado resistencia a un sin número de ingredientes activos, por lo que el desarrollo de híbridos transgénicos que expresan la endotoxina insecticida de *Bacillus thuringiensis*, ofrecen una nueva práctica para controlar este insecto en campos de cultivo.

Algodón Genéticamente Modificado

Las principales características que se introducían a los productos agrícolas están dominadas por las necesidades del productor y del consumidor. En un principio, las modificaciones genéticas estuvieron regidas por las necesidades en el campo, enfocado a una mayor productividad. Posteriormente se comenzó con el mejoramiento de la composición determinada por las distintas necesidades de la industria y de los consumidores, enmarcándose en tres aspectos: Tolerancia a herbicidas, mejora de características de interés (contenido nutricional) y resistencia a plagas (virus e insectos) (Rodríguez y González, 2007).

El ataque por insectos representa uno de los aspectos más importantes del cultivo vegetal. Su interés es enorme desde el punto de vista económico, incluyendo no solo la pérdida de cosechas sino los gastos para su control y prevención, por lo general de tipo químico. No puede olvidarse, su repercusión social, por la merma en la producción del cultivo, en particular en países subdesarrollados (Rodríguez *et al.*, 2003), un buen ejemplo de cultivos modificados genéticamente para resistencia a insectos está mediado por la proteína producida por *Bacillus thuringiensis*, denominada δ -endotoxina, que resulta tóxica, selectivamente, para muchos insectos. De ella se han descrito diferentes variantes cada una de las cuales posee una acción diferente, como la Cry I, tóxica para lepidópteros, la Cry III para coleópteros o la Cry IV para dípteros (Rodríguez *et al.*, 2003).

En 2010 los cultivos con eventos para resistencia a insectos ocuparon el 17% correspondiente a 26.3 millones de hectáreas de 148 millones totales de la superficie mundial de cultivos biotecnológicos. En México, aunque no se ha aprobado ningún cultivo, se han introducido en programa piloto solo dos tipos de cultivos genéticamente modificados, con cantidades representativas a nivel mundial de aproximadamente 1 millón de hectáreas, una es la soya tolerante a herbicida y el otro es el algodón tolerante a herbicida y algodón *Bt* resistente a insectos (James, 2010), este último cultivado en un 60% del total en el país (Soberón y Bravo, 2008).

En México este cultivo que expresa la toxina Cry de *Bacillus thuringiensis*, ha ofrecido un excelente control de importantes insectos que limitan la productividad como el complejo bellotero (*H. virescens* y *H. zea*) y gusano rosado (*Pectinophora gossypiella*) contribuyendo a alcanzar niveles de competitividad que demandan los mercados internacionales, al tiempo en que se evita la aplicación al ambiente de cantidades considerables de plaguicidas (www.monsanto.com). Sin embargo debido al re-brote de estas plagas en el algodón Bollgard, se requiere de la aplicación de insecticidas foliares para mantener estas poblaciones por debajo del nivel de daño económico (Hood 1997, Smith 1997; tomados de Adamczyk *et al.*, 2008); por lo que los avances en el control de plagas con la tecnología transgénica ofrece una opción mas eficaz contra muchos lepidópteros plaga, variedades de algodón que contienen las proteínas Cry1Ac y Cry2Ab (Bollgard II) que aumentan el nivel y espectro de control y reducen la probabilidad de desarrollo de resistencia en los insectos blanco, como gusano de la hoja del algodono (*Alabama argillacea*), gusanos del complejo bellotero (*H. virescens* y *H. zea*), gusano rosado (*Pectinophora gossypiella*) y gusano rosado colombiano (*Sacadodes pyralis*). Además, ofrece alguna protección contra el falso medidor (*Trichoplusia ni*) y perforador de la hoja (*Bucculatrix sp.*) y control parcial de gusano soldado (*Spodoptera exigua* y *Spodoptera ornithogalli*), gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*) y gusano defoliador de la hoja (*Pseudoplusia includens*) (www.monsanto.com). Sin embargo la problemática esta medida debido a que los cultivos *Bt* que producen la proteína Cry en todos sus tejidos, difiere en los niveles de expresión a lo largo de su ciclo de crecimiento. Es decir, que los cultivos *Bt* presentan su máxima expresión durante los primeros treinta días después de la siembra en las hojas terminales y durante la floración del cultivo, para después disminuir significativamente sus niveles de expresión; cuando los tejidos de la planta envejecen, la proteína Cry también se degrada rápidamente, calculada esa degradación, aunque varía para cada cultivo y para cada condición ambiental, desde el 50 a 88% (Ibarra y Del Rincón s/f.; Olsen *et al.*, 2005, tomado de Zenner de Polanía *et al.*, 2008).

Generalidades de *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis Berliner es el entomopatógeno más conocido, estudiado y extensamente utilizado como agente de control microbiano, con mas del 90% del mercado de bioinsecticidas (Glare y O'Callaghan, 2000). Es una bacteria del suelo Gram-positiva, estrictamente aerobio, flagelada, mide de 3 a 5 μm de largo por 1 a 1,2 μm de ancho (Gordon *et al.*, 1973 citado por Sauka y Benintende, 2008) y presenta una distribución cosmopolita. Muestra durante su ciclo de vida dos fases principales: *crecimiento vegetativo*, donde la bacteria se duplica por bipartición, y *esporulación*, un proceso de diferenciación de bacteria a espora. *Bt* es considerada una bacteria ubicua, ya que se ha aislado de todas partes del mundo y de muy diversos sistemas, como suelo, agua, hojas de plantas, insectos muertos, telarañas, etc. A *Bt* se le caracteriza por producir un cuerpo de inclusión generalmente para esporal conocido como cristal, durante su fase de esporulación; el cual es de naturaleza proteica y tiene propiedades insecticidas altamente específicas (Höfte y Whiteley, 1989; Schnepf *et al.*, 1998; Joung y Côté, 2000; Soberón y Bravo, 2008).

Bacillus thuringiensis pertenece al reino Eubacteria, Phylum Firmicutes, clase Bacilli, orden Bacillales, familia Bacillaceae, genero *Bacillus*, especie *thuringiensis*; nombre binomial *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1915 (NCBI, 2011), situado dentro del grupo de Bacilos Gram positivos formadores de una endoespora, dentro de especies con flagelación peritrica. Está dentro del grupo I del género, que es donde se encuentran aquellas especies con espora elipsoidal que no provocan hinchamiento del perfil bacilar. La principal diferencia de *B. thuringiensis* con respecto a otros Bacilos relacionados es la formación durante la fase de esporulación, de uno o más cuerpos cristalinos de naturaleza proteica adyacentes a la espora, y algunos de estos cristales resultan tóxicos para algunas especies de insectos, con alta eficiencia y especificidad y bajo impacto sobre el medio ambiente. El cristal presenta una gran diversidad de formas dependiendo de la proteína que lo constituya, encontrándose cristales bipiramidales, cúbicos, romboidales, esféricos, rectangulares, triangulares e irregulares, y con tamaños variados (Iriarte y Caballero, 2001).

La gran mayoría de los serotipos, variedades y cepas conocidas presentan un cristal bipiramidal, con cierta variación de tamaño y forma. Este cristal normalmente presenta toxicidad a una gran diversidad de larvas de lepidópteros, entre ellos un número significativo de plagas agrícolas. Este es el llamado patotipo I (Federici, 1993). El cuerpo parasporal, sin embargo, varía en su forma, al variar el patotipo. Es decir, las cepas que presentan alta toxicidad hacia mosquitos y jejenes (Delécluse *et al.*, 2000), muestran un cristal irregular en su forma, aunque tiende a la esfericidad. Este es el llamado patotipo II, que fue aislado por primera vez en 1976, en Israel (Federici *et al.*, 1990). Por último, el patotipo III fue descubierto en 1982, en Alemania; su rango de actividad se restringe a unas pocas especies de coleópteros, principalmente crisomélidos. En este patotipo, el cristal muestra una forma cuadrada y aplanada, similar a la de un cojinete delgado (Krieg *et al.*, 1983).*P*

Toxinas de *Bacillus thuringiensis*

La definición de proteína Cry es cualquier proteína para esporal de *Bt* que presente algún efecto tóxico hacia algún organismo, verificable experimentalmente por medio de bioensayos o cualquier proteína que muestre similitud con las proteínas Cry (Crickmore *et al.*, 1998; Soberón y Bravo, 2008).

Existen dos tipos de δ -endotoxinas: las proteínas Cry y las proteínas Cyt (Kati *et al.*, 2007; Soberón y Bravo, 2008) clonados y secuenciados 16 diferentes genes Cyt distribuidos en dos grupos y varios subgrupos, y más de 200 diferentes genes Cry distribuidas en 50 grupos y varios subgrupos, cada grupo con cierta especificidad hacia ciertos tipos de insectos (Soberón y Bravo, 2008).

El cristal se compone de subunidades polipeptídicas (protoxina) con diferente peso molecular que oscilan entre 27 y 140 kilodaltons (kDa), las cuales le dan su forma característica (Hofmann *et al.*, 1988; Höfte y Whiteley, 1989; Schnepf *et al.*, 1998). La fracción tóxica se encuentra en la N-terminal media de la proteína y tiene un peso molecular aproximado de 60 a 68 kDa. La masa molecular de la protoxina y

de la toxina activa varía en función de la cepa y el procedimiento utilizado para la activación proteolítica (Hofmann *et al.*, 1988).

La importancia de la delta endotoxina de *Bacillus thuringiensis* radica en su selectividad toxica contra larvas de insectos plaga de los ordenes lepidóptera (mariposas), coleóptera (escarabajos), díptera (mosquitos), himenóptera (hormigas), ácaros y también contra otros invertebrados como nemátodos, gusanos planos y protozoarios (Soberón y Bravo, 2008), importantes en la agricultura y la silvicultura.

A raíz de su utilización como bioinsecticidas, y desde que ocurrió la primera clonación de un gen Cry, que codifica para proteínas insecticidas en *Bt* (Schnepf y Whiteley, 1981) se han aislado muchos otros genes, por lo cual se ha establecido una clasificación de las δ -endotoxinas basada exclusivamente en la similitud de la secuencia primaria (aminoácidos), para indicar los grados de divergencia filogenética permitiendo que las toxinas estrechamente relacionados se clasificaran en conjunto (Crickmore *et al.*, 1998), de acuerdo a la identidad, se designo por letras y números, después de la palabra Cry (cristal) de manera jerárquica ordenadas por filas, la primera fila designada por un número arábigo que corresponde hasta 45% de identidad (Cry1, Cry2, etc.), la segunda fila cataloga a las proteínas con una letra mayúscula y corresponde a identidades de 45-78% (Cry1A, Cry1B, etc.), la tercera fila asigna una letra minúscula y corresponde a identidades de 78 % a 95% (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, etc.), la última fila incluye un número arábigo al final de la nomenclatura indicando más de 95% de identidad (Cry1Aa1, Cry1Aa2, etc.) (Soberón y Bravo, 2008).

Los genes que especifican una familia de insecticidas relacionados con proteínas (Cry) se dividen en cuatro clases principales, clase I; específicamente para lepidópteros, clase II para lepidóptera y díptera, clase III, específicamente coleóptera y la clase IV específica para díptera, cada clase con sus respectivas propiedades insecticidas y estructurales (Joung y Côté, 2000).

Modo de Acción de *Bacillus thuringiensis*

El mecanismo de acción de las proteínas Cry de *B. thuringiensis* se activan cuando las larvas susceptibles ingieren el complejo espora-cristal. La bacteria sin el cristal no tiene la capacidad de invadir a su huésped. La proteína cristalina es altamente insoluble en condiciones neutras y se solubiliza en el ambiente alcalino de Ph alto (9.5) del mesenteron (intestino medio) del insecto, una vez disueltas, las proteínas del cristal (pro toxinas) sufren proteólisis por enzimas (proteasas) presentes en el intestino, una vez solubilizada; la protoxina de 130 KDa se rompe para producir una toxina activa de 55-65 kDa resistente a la proteasa y que comprende la región N terminal. Esta es la toxina activada llamada δ -endotoxina, la cual adquiere una conformación tridimensional que le confiere gran especificidad para acoplarse a un componente glicoproteico de la membrana de las células epiteliales, comúnmente llamado “receptor” (Gill *et al.*, 1992, Escriche y Ferré 2001; citados por Ibarra, 2007). La unión de la toxina Cry a los receptores (cadherina) del intestino medio, tiene como resultado una oligomerización de la toxina (Rausell *et al.*, 2004), para posteriormente unirse al receptor amino peptidasa y la inserción de la toxina en la membrana apical crea canales iónicos o poros líticos, y propicia un desequilibrio de iones resultando en la pérdida de iones k^+ , alterando la presión osmótica de las células epiteliales que revisten el intestino medio una vez que las toxinas se insertan a la membrana, seguidos de agua (Figura 1), el exceso de agua en el citoplasma de las células epiteliales provoca una distensión excesiva de los organelos membranosos, y de la propia célula en su totalidad, hasta que ésta estalla (Hoffman y Frodsham, 1993; Knowles, 1994; Schnepf *et al.*, 1998; Joung y Côté, 2000; Kati *et al.*, 2007; Soberón y Bravo, 2008). Este procesamiento proteolítico libera fragmentos tóxicos de 55 a 65 kDa que interaccionan con proteínas receptoras presentes en la micro vellosidad de las células intestinales de los insectos blanco (Soberón y Bravo, 2008).

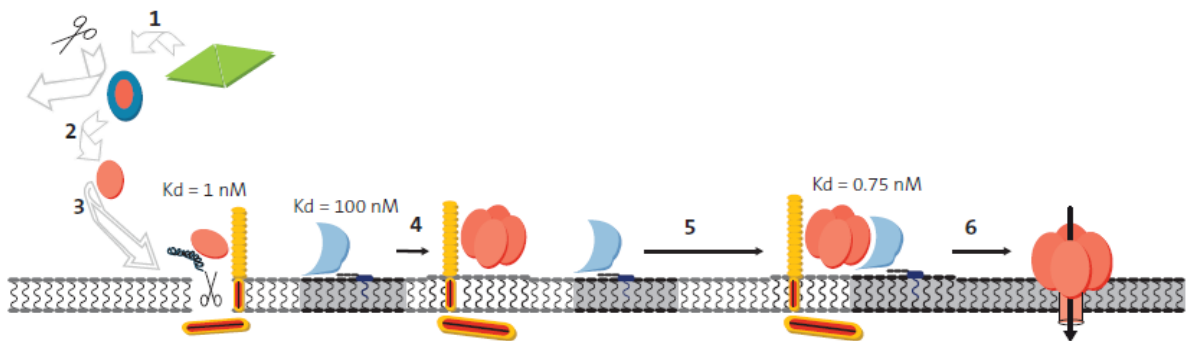


Figura 1. Esquema de los diferentes eventos en el modo de acción de las proteína Cry de *Bacillus thuringiensis*. 1. Solubilización, 2. Rompimiento de protoxina, 3. Unión al receptor cadherina, 4. Formación de Pre-poro, 5. Unión receptor amino peptidasa, 6. Inserción toxina. Fuente Soberón y Bravo, 2008.

Unas pocas células dañadas podrían ser reemplazadas rápidamente por otras nuevas, sin que ocurran consecuencias fatales; sin embargo, cantidades suficientes de δ -endotoxina normalmente destruyen amplias áreas del epitelio, las cuales se manifiestan en huecos por donde pasa el contenido altamente alcalino del mesenterón hacia la hemolinfa (pH casi neutro) y la hemolinfa hacia el lumen del mesenterón (Soberón y Bravo, 2008).

Estos dos fenómenos traen consigo dos consecuencias dañinas para el insecto. Por un lado, el pH estomacal baja por compensación al aumentar el pH de la hemolinfa y la conducción nerviosa cesa. Esto implica que cesa la ingesta, el sistema digestivo se paraliza, parálisis total, diarrea, la larva se vuelve flácida, las células epiteliales se lisan, por lo tanto se detiene el daño a la planta atacada y; por otro lado la disminución en el pH crea un ambiente favorable para la germinación de las esporas ingeridas junto con los cristales, iniciando la proliferación de las bacterias en el individuo paralizado y finalmente la larva muere por septicemia e inanición al cabo de unos días (Figura 2) (Schnepf *et al.*, 1998; Gill *et al.*, 1992, citado por Ibarra, 2007; Soberón y Bravo, 2008).

A pesar de que las larvas muertas contienen algunas esporas y cristales debido a que proliferan en los cadáveres, éstas normalmente no representan focos de infección para otros individuos. Además, en el cadáver se presentan mayormente

otras bacterias saprófitas, presentes en el tracto digestivo, las cuales compiten con *Bt*. Se ha reportado que en realidad son las bacterias propias del tracto digestivo las que provocan la septicemia y finalmente la muerte del insecto (Broderick *et al.*, 2006).

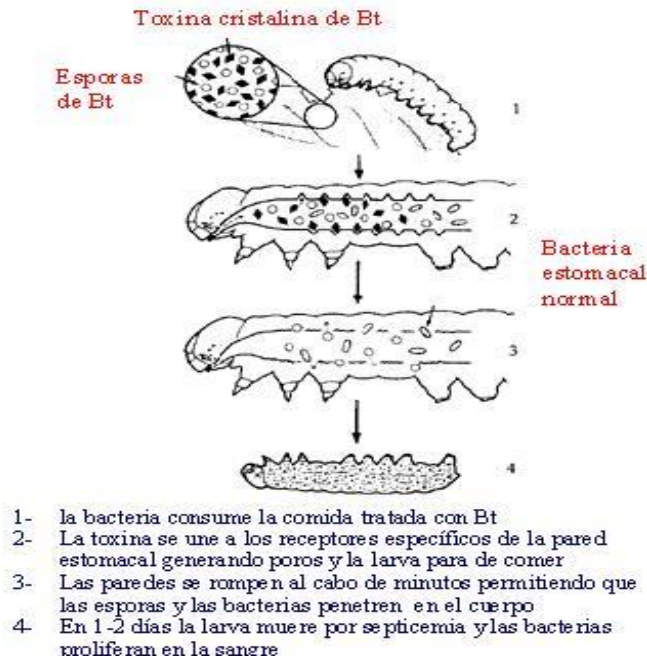


Figura 2. Modo de acción de la δ -endotoxina de *Bacillus thuringiensis*.

Importancia de *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis (Bt) es el insecticida biológico más utilizado comercialmente, y tradicionalmente se ha ocupado para el control de insectos plaga en la agricultura y de mosquitos vectores de enfermedades como la malaria y el dengue (Schnepf *et al.*, 1998; Lambert y Peferoen, 1992, citado por Carmona, 2002; Soberón y Bravo, 2008). Una característica importante de las proteínas Cry producidas por Bt es que son altamente específicas hacia los insectos objetivo e inofensivos a mamíferos, vertebrados, plantas e inclusive otros insectos benéficos (depredadores y parasitoides), así como polinizadores benéficos como las abejas (Soberón y Bravo, 2008; www.cls.casa.colostate.edu). Sin duda las toxinas Cry producidas por Bt se acercan al ideal de un insecticida específico contra su insecto blanco, que no contamina el ambiente y que no genera poblaciones de insectos resistentes (Soberón y Bravo, 2008).

Sin embargo la supervivencia o persistencia de las endosporas y su patogenicidad entre los cultivos es afectada por factores abióticos como la radiación solar, la temperatura de las hojas y el déficit de presión de vapor (Leong *et al.*, 1980), además las esporas de *B. thuringiensis* pueden sobrevivir por algunos años, aunque la población y la toxicidad declina rápidamente, se ha observado que la presencia y actividad se mantiene hasta por 3 años en suelos estériles, mientras que en suelos no estériles se pierde hasta el 50 % de actividad en los primeros 7 días (Schnepf *et al.*, 1998) y las δ -endotoxinas, pueden sobrevivir en la mayoría de los tipos de suelos, sin embargo en suelos con un Ph de 4.8, estas no se desarrollan (Saleh *et al.*, 1970, citado por Joung y Côté, 2000).

Otra característica de las δ -endotoxinas de *B. thuringiensis* es que posee la capacidad de producir otra serie de factores de virulencia como α y β exotoxinas, hemolisinas, inhibidores de inmunidad, flagelos y enzimas quitinasas, fosfolipasas y proteasas (Schnepf *et al.*, 1998).

Es por estas características que se desarrollaron plantas transgénicas que producen toxinas Cry (específicas contra larvas de lepidópteros) que le confieren la característica de resistencia al ataque de insectos plaga, con el objetivo de que la planta, una vez transformada con el gen de la toxina, exprese suficiente una cantidad constante de ésta, que; comparada con la aplicación de plaguicidas y de productos derivados de *B. thuringiensis*, no estaría sujeta a distintos condicionamientos como el momento de la aplicación, el lavado del producto por precipitaciones y la inactivación del mismo por exposición a la luz solar (en el caso de los productos derivados de *B. thuringiensis*). Otra de las ventajas está constituida por la presencia de proteínas Cry en partes de la planta donde los plaguicidas químicos y biológicos no son capaces de llegar, otorgando así un control más efectivo (Permingeat y Margarit, 2005). Además, la especificidad de las toxinas presentes tanto en los productos de *B. thuringiensis* como en las plantas transgénicas, permite el control específico de plagas que afectan el cultivo sin mostrar toxicidad hacia otros integrantes del ecosistema.

MATERIALES Y METODOS

La presente investigación se realizó en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) en el área de cámaras bioclimáticas y laboratorio de Toxicología del Departamento de Parasitología Agrícola, durante el año 2011.

Metodología

Colonia de Insectos

Se trabajó con 2 especies de insectos: El gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) obtenida en campos de maíz en el ejido Benito Juárez en Matamoros; Coahuila y el gusano bellotero *Heliothis virescens* (Fabricius) derivada de una colonia de laboratorio del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), ambas especies establecidas en laboratorio por un periodo de 8 meses, totalmente susceptibles y libre de patógenos.

Cría, reproducción y mantenimiento

Los insectos obtenidos (inmaduros) de laboratorio y campo se llevaron al área de cámaras bioclimáticas, se colocaron en recipientes de plástico de 25 ml a base de dieta artificial (Ali *et al.*, 2006), hasta la fase de pupa, de donde se extrajeron y se colocaron en recipientes de plástico de un litro de capacidad, hasta la emergencia de la fase adulta; posteriormente se trasladaron las palomillas a cilindros mas grandes de pvc recubiertos de tela fina como sustrato para la oviposición de los adultos, de donde se recogieron huevecillos para su eclosión y utilización de las larvas neonatas en los bioensayos. Los adultos se alimentaron con una solución azucarada. Las condiciones en las que se mantuvieron las colonias de insectos fueron de 25-30°C de temperatura, 55-70% de humedad relativa y fotoperiodo de 14 horas día por 10 horas de obscuridad, monitoreadas constantemente (Akhurst *et al.*, 2003; Burd *et al.*, 2003; Ali *et al.*, 2006).

Siembra del algodón

Como fuente de toxina se sembró bajo condiciones de invernadero a 25-40 °C, algodón transgénico (Bollgard I y Bollgard II) que expresan las toxinas Cr1Ac y Cry2Ab, además de algodón convencional sobre camas dispuestas en dicho invernadero, debidamente etiquetadas y monitoreadas hasta la maduración de la planta (100 días después de la emergencia), para su posterior uso.

Deshidratación y macerado de tejido vegetal

Cuando las plantas de algodón transgénico y convencional maduraron, las plantas mejor desarrolladas fueron seleccionadas al azar y se recolectaron hojas terminales en cada una de estas. Se trasladaron al laboratorio y se deshidrataron a temperatura ambiente y eliminar al máximo la humedad. El tejido deshidratado se macero en un mortero y posteriormente se tamizo para obtener un menor tamaño y homogeneidad de partícula.

Preparación de concentraciones

Bajo condiciones de laboratorio se realizó una solución salina a razón de 0.85 grs. de Cloruro de sodio (NaCl) en 100 ml de agua destilada, a la cual se le agregó 0.1 gr. del tejido vegetal de cada algodón previamente deshidratado, a partir de una $CL_{99}=1.0 \mu\text{g/ml}$ (Wu *et al.*, 2006). Bajo esta razón se preparó una solución madre de 2000 ppm de algodón *Bt* y a partir de esta se obtuvieron 6 concentraciones (1500 ppm, 1250 ppm, 1000 ppm, 750 ppm, 500 ppm, 250 ppm).

Bioensayos

Se realizaron pruebas con larvas de *H. virescens* y *S. frugiperda* de primer estadio (Tabashnik *et al.*, 2004; Ali, *et al.*, 2006) de menos de 24 horas de edad sin alimentar. Se utilizó el algodón *Bt* (Bollgard I y Bollgard II) que contienen las toxinas Cry1Ac y Cry2Ab respectivamente, que se derivaron en 6 concentraciones en cada uno, con 3 repeticiones en cada algodón y 10 unidades experimentales por

concentración, manteniendo el mismo número de dietas sin toxina usado como testigo o control algodón convencional. Las larvas se colocaron en recipientes de 25 ml. a base de 3-4 grs. de dieta artificial inoculada con 100 μ l de la toxina Cry1Ac y Cry2Ab (Tabashnik *et al.*, 2005). Se sometieron a este estudio 180 larvas en cada algodón.

Evaluación

Los datos de mortalidad se registraron a los 8 días de establecido el experimento. Para el análisis de datos se uso el análisis Probit utilizando el software SAS (SAS Institute, 2002), para estimar el valor de la CL_{50} y el margen de fiabilidad (límite fiducial) al 95% de significancia. El nivel de mortalidad máxima aceptable en el testigo fue del 10%.

RESULTADOS

Susceptibilidad de *Heliothis virescens* a las toxinas Cry1Ac y Cry2Ab

El cuadro 1 presenta la evaluación de la mortalidad de *H. virescens* a las toxinas Cry1Ac y Cry2Ab. Se observa que la mortalidad de larvas de primer estadio para la toxina Cry1Ac registrada fue menor al 46.7 % en la concentración mas alta (1500 ppm=1.5 µg/ml), lo que significa que hubo 53.3 % de sobrevivencia de larvas expuestas, motivo por el cual no fue posible estimar la concentración que mataría el 50 % de la población (CL50). En el caso de la toxina Cry2Ab el porcentaje de mortalidad en la concentración diagnostico (1000 ppm =1.0 µg/ml) fue de 93.3 %; y la concentración mas alta presento una mortalidad de 96.7 %, mientras que la concentración que mato el 50 % de la población fue estimada en 489.49 ppm; observándose en ambas toxinas una correlación positiva entre las concentraciones y el porcentaje de mortalidad (0.98; 0.87; $p \leq 0.05$, para la toxina Cry1Ac y Cry2Ab respectivamente) (Cuadro 2). El testigo o control no presento mortalidad, agregando confiabilidad al presente estudio al mantenerlo bajo condiciones controladas.

Cuadro 1. Porcentaje de mortalidad de larvas neonatas de *Heliothis virescens* expuestas durante 8 días a la toxina Cry1Ac y Cry2Ab del Algodón Bt.

Concentración (ppm)	Toxina		
	Cry1Ac	Cry2Ab	Testigo
250	10	16.7	0
500	20	53.3	0
750	30	60	0
1000	33.3	93.3	0
1250	40	96.7	0
1500	46.7	96.7	0

ppm=Partes por millón

Cuadro 2. Análisis Probit de la mortalidad de larvas neonatas de *Heliothis virescens* expuestas durante 8 días a la toxina Cry1Ac y Cry2Ab del Algodón Bt.

Toxina Bt	CL50	Límites Fiduciales 95%		R ²	X ²	P($\alpha=0.05$)
		LI	LS			
Cry1Ac	NC	NC	NC	0.98	0.26	≤ 5.99
Cry2Ab	489.49	340.90	620.87	0.87	1.58	≤ 5.99
Control	NC	NC	NC	NC	NC	

LI: Limite inferior. LS: Limite superior. NC: No calculado.

Susceptibilidad de *Spodoptera frugiperda* a las toxinas Cry1Ac y Cry2Ab

El cuadro 3 presenta la evaluación de la mortalidad de *S. frugiperda* a las toxinas Cry1Ac y Cry2Ab. Se observa que la mortalidad registrada de larvas de primer estadio fue menor al 11.1 % y 33.3 % y una sobrevivencia de 88.9 % y 66.7 % en la concentración mas alta (1500 ppm=1.5 µg/ml) en la toxina Cry1Ac y Cry2Ab respectivamente; por lo cual no fue posible estimar la concentración que mataría el 50 % de la población (CL50), observándose en ambas toxinas una correlación positiva entre las concentraciones y el porcentaje de mortalidad (0.77; 0.94; $p \leq 0.05$, para la toxina Cry1Ac y Cry2Ab respectivamente) (Cuadro 4). El testigo o control no presento mortalidad, agregando confiabilidad al presente estudio al mantenerlo bajo condiciones controladas.

Cuadro 3. Porcentaje de mortalidad de larvas neonatas de *Spodoptera frugiperda* expuestas durante 8 días a la toxina Cry1Ac y Cry2Ab del Algodón *Bt*.

Concentración (ppm)	Toxina		
	Cry1Ac	Cry2Ab	Control
250	0	6.7	0
500	0	10	0
750	0	13.3	0
1000	11.1	16.7	0
1250	11.1	23.3	0
1500	11.1	33.3	0

ppm=Partes por millón

Cuadro 4. Análisis Probit de la mortalidad de larvas neonatas de *Spodoptera frugiperda* expuestas durante 8 días a la toxina Cry1Ac y Cry2Ab del Algodón *Bt*.

Toxina <i>Bt</i>	CL50	Limites Fiduciales 95%		R ²	X ²	P($\alpha=0.05$)
		LI	LS			
Cry1Ac	NC	NC	NC	0.77	0.23	≤ 5.99
Cry2Ab	NC	NC	NC	0.94	0.23	≤ 5.99
Control	NC	NC	NC	NC	NC	

LI: Limite inferior. LS: Limite superior. NC: No calculado

DISCUSIÓN

La toxina Cry1Ac del tejido vegetal (hojas terminales) del algodón Bollgard a los 100 días de maduración de la planta tuvo una eficiencia muy baja en el control del gusano bellotero *H. virescens* (Cuadro 1), comparado con la dosis diagnóstico con la cual debería matar el 99% de la población (Wu *et al.*, 2006) y/o detener el desarrollo de las larvas mas allá del primer estadio (Siegfried *et al.*, 2000, tomado de Blanco, *et al.*, 2009), ya que incluso en la dosis mas alta (1500 ppm=1.5µg/ml) solo alcanzo un 33.3 % de mortalidad, estos resultados difieren a lo encontrado por Ali *et al.*, (2006) estudiando la susceptibilidad de poblaciones de *H. virescens* de diversa procedencia, encontrando para una población una CL50 de 1.20 µg/ml; de igual manera Zenner de Polanía *et al.*, (2008) en 2 poblaciones de algodón y maíz no transgénico de Colombia en 2 periodos diferentes, encontraron en el 2005 a los 7 días de evaluación una CL50 de 3.52 µg/ml con un control satisfactorio de la plaga y en el 2006 con otra población encontraron una CL50 de 3.81 µg/ml asegurando un buen control de la población analizada, agregando además que las poblaciones de esta plaga muestran una alta variabilidad y que la susceptibilidad de las diversas poblaciones geográficas a la toxina del *Bt* varían enormemente y depende de los mas diversos factores, entre bióticos y abióticos. En la evaluación de la susceptibilidad del gusano cogollero *S. frugiperda* a la toxina Cry1Ac se observo poco efecto sobre este insecto plaga; o bien se requiere una mayor cantidad de toxina para su control; este resultado fue similar a lo encontrado por Zenner de Polanía *et al.*, (2008), al evaluar a los 8 días la toxina Cry1Ac de algodón Bollgard en cinco poblaciones en el 2005 y 2006 en Colombia; revelando que la toxina Cry1Ac en las concentraciones disponibles en la planta no ejercen un control de *S. frugiperda*. Adamczyk y Sumerford (2001), en una evaluación de la tolerancia del gusano cogollero a la toxina Cry1Ac cuando se les alimenta con algodón transgénico *Bt* y su impacto en el desarrollo de las generaciones siguientes, encontraron una sobrevivencia muy alta (> 85%), sin efecto en la mortalidad para la generación

siguiente en diferentes colonias susceptibles e incluso observaron inducción de resistencia en la generación siguiente a la proteína y sugieren que no todas las plagas de lepidópteros del algodón que son intrínsecamente tolerantes a la proteína Cry1Ac se puede controlar de forma idéntica en algodón transgénico *Bt*, como es el caso del cogollero *S. frugiperda*, una de las especies con menor susceptibilidad a las proteínas *Bt* expresadas en los cultivos que las expresan (Garczynski *et al.*, 1991, Luo *et al.*, 1999, Luttrell *et al.*, 1999; tomados de Blanco *et al.*, 2010).

La evaluación de las toxinas del algodón Bollgard II para el control de *H. virescens*, ejerce un control eficaz sobre este insecto plaga, no así para el cogollero del maíz *S. frugiperda*, donde la evaluación de la susceptibilidad a las toxinas apiladas del Bollgard II Cry1Ac + Cry2Ab revelaron poca susceptibilidad a esta toxina; resultados parcialmente diferentes encontró Stewart *et al.*, (2001) evaluando el impacto del algodón *Bt* expresando una o dos proteínas de *Bt* sobre el crecimiento y supervivencia de larvas de nóctuidos, reportando que las toxinas Cry1Ac y Cry2Ab apiladas son mas toxicas para el gusano bellotero y cogollero, que solo la Cry1Ac, observándose una reducción en el crecimiento del insecto, y con una buena eficiencia en el control de estos insectos.

Nuestros resultados indican que la toxina Cry1Ac que expresa el algodón *Bt* pierde efectividad a la madurez fisiológica de la planta (100 días). Siebert *et al.*, (2009) mencionan que los niveles de expresión de la proteína Cry1Ac del algodón Bollgard, se ven influenciados por un efecto significativo del medio ambiente en los niveles de expresión de la proteína, encontrando que la expresión de la proteína Cry1Ac en las bellotas es menor en comparación con hojas terminales, botones, flores y hojas maduras, observándose una disminución de la concentración de la proteína en hojas terminales y capsulas a medida que la planta madura (Cuadro 5).

Cuadro 5. Concentración de proteína tóxica Cry1Ac en estructuras vegetales de algodón GM durante tres periodos de floración en 2004 y 2005.

Semanas después de iniciada floración	Greenville, MS, 2004			Winnsboro, LA, 2004			Greenville, MS 2005			Jamesville, NC, 2005		
	2	4	6	2	4	6	2	4	6	2	4	6
Estructura vegetal	Concentración Cry1Ac en ppm											
Hojas terminales	2.30	2.10	2.04	1.69	1.68	1.95	2.24	2.98	1.31	2.45	1.96	1.38
Botones florales	2.27	1.91	2.33	2.26	2.69	2.59	2.91	3.10	3.39	2.92	3.63	3.74
Flores	3.08	2.69	2.35	3.44	3.57	3.21	2.16	1.97	2.26	2.10	2.88	2.54
Bellotas	1.13	1.12	1.08	1.60	1.79	1.61	0.89	0.81	0.75	1.99	1.05	0.94
Hojas adultas (quinto nodo)	2.36	2.58	3.06	1.93	2.20	2.78	3.38	3.32	4.37	2.53	3.69	3.30
Hojas adultas (octavo nodo)	2.90	2.71	2.79	1.61	1.82	2.94	Ni	Ni	Ni	Ni	Ni	Ni

Fuente: Siebert, *et. al.*, 2009. Ni=Dato no incluido.

Cuadro 6. Concentración máxima de proteína tóxica Cry1Ac en tejidos vegetales de algodón Bollgard.

Días después de la siembra	30	75	90	105	120
Tejido analizado	Concentración Cry1Ac en ppm				
Hojas terminales	4,42				
Yemas terminales			3,76		
Botón floral					1,67
Flor sin fecundar		0,65			
Flor fecundada		4,39			
Bellotas				1,82	
Semillas					4,75

Fuente: Olsen *et al.*, (2005), tomado de Zenner de Polanía *et al.*, 2008.

Olsen *et al.*, 2005; tomado de Zenner de Polanía *et al.*, (2008) mencionan que a medida que el cultivo se desarrolla, la concentración de la proteína disminuye (Cuadro 6), traducido en una disminución de la eficacia, y añaden que puede deberse a cambios en el nivel de expresión del gen y/o a la constitución fisiológica de la planta y pueden ser inducidos por las condiciones ambientales.

Adamczyk *et al.*, (2001) indican que a diferencia de la Cry1Ac, el Bollgard II que expresa la toxina Cry2Ab en todos los tejidos parece permanecer relativamente constante en el tiempo, demostrando parcialmente en su estudio con hojas terminales, que la toxina Cry2Ab se expresa en un nivel superior que la Cry1Ac durante toda la temporada de crecimiento de la planta; afirman que el aumento de la actividad de Bollgard II en comparación con el algodón Bollgard puede deberse a la mayor potencia de Cry2Ab, el aumento de nivel de la expresión global de Cry2Ab, o posiblemente una combinación sinérgica, ya que observo que la adición de la Cry2Ab no tiene ningún efecto sobre los niveles de Cry1Ac en Bollgard II y que ambas toxinas están presentes durante toda la temporada, de igual manera Greenplate *et al.*, (2003), tomado de Adamczyk y Gore (2004), mencionan que en el Bollgard II, el transgén Cry2Ab se expresa en toda la planta a niveles mucho más altos que Cry1Ac. Stewart *et al.*, (2001) evaluando el impacto del algodón *Bt* expresando una o dos proteínas sobre el crecimiento y supervivencia de larvas de noctuidos, encontraron que estos son más susceptibles a las hojas y rosas de variedades de doble toxina, a diferencia de los de una sola toxina.

El gusano bellotero plaga principal del algodón, importante por alimentarse de botones florales, flores y bellotas; y el gusano cogollero plaga secundaria que actúa en un inicio como cortador para posteriormente atacar la parte media de la planta dañando hojas maduras y bellotas. Las estructuras florales inician su formación a partir de los 30 días después de la siembra y a los 70-100 días la formación de bellotas. La infestación de estas plagas durante el desarrollo del cultivo y ante los cambios en el nivel de expresión del gen que produce la toxina Cry en las diferentes estructuras de la planta, las poblaciones de insectos no son afectadas por esta toxina

debido a que no se expresa en cantidades suficientes para controlar a estos insectos. Soberon y Bravo (2008) mencionan que el insecto objetivo de las proteínas Cry que es dañado en unas pocas células del epitelio del mesenterón pueden ser remplazadas rápidamente por otras nuevas sin que ocurran consecuencias fatales, lo que no sucedería con cantidades suficientes de δ -endotoxina que normalmente destruyen amplias áreas del epitelio y es claro que cuando se emplea constantemente un insecticida en la lucha contra una plaga, es probable la aparición de resistencia genética en una población de insectos, como respuesta frente a un peligro; sumado a esto la constante expresión de la toxina Cry insecticida por la planta y en concentraciones cada vez menores conforme la planta madura fisiológicamente, generando efectos subletales de la proteína hacia el insecto blanco de esta tecnología, dando como resultado un insecticida ineficiente y la inducción de resistencia.

CONCLUSIONES

La toxina Cry1Ac que expresa el algodón genéticamente modificado reduce su efectividad a la madurez fisiológica de la planta (100 días), al degradarse la toxina produce un efecto sub letal, lo que ocasiona que el insecto sobreviva, ocasione daño al cultivo y una posible inducción de resistencia.

La doble toxina del algodón mantiene su expresión en un nivel óptimo para un posible control de este insecto, ejerciendo un buen control sobre *H. virescens*.

La doble toxina del algodón mantiene su expresión en un nivel óptimo para un posible control de este insecto, ejerciendo un control parcial sobre *S. frugiperda*, esta ultima por características intrínsecas propias de esta especie plaga.

Considerando que el algodón *Bt* se comercializa a nivel mundial como resistente a insectos; su uso como bioinsecticida debe ser más estudiado pues su efecto dependiendo de la zona geográfica, es afectado por las condiciones medio ambientales en su expresión de la toxina, generando un efecto subletal y la posible resistencia.

LITERATURA CITADA

- Adamczyk, JR, J. J., and J. Gore. 2004. Laboratory and field performance of cotton containing cry1ac, cry1f, and both cry1ac and cry1f (widestrike®) against beet armyworm and fall armyworm larvae (Lepidoptera: Noctuidae). *Florida Entomologist* 87(4): 427-432.
- Adamczyk, JR, J. J., S. Greenberg, J. S. Armstrong, W. J. Mullins, L. B. Braxton, R. B. Lassiter and M. W. Siebert. 2008. Evaluations of Bollgard®, Bollgard II®, and Widestrike® technologies against beet and fall armyworm larvae (Lepidoptera: Noctuidae). *Florida Entomologist* 91(4): 531-536.
- Adamczyk, JR., J. J and D. V. Sumerford. 2001. Increased tolerance of fall armyworms (Lepidoptera: Noctuidae) to Cry1Ac δ -endotoxin when fed transgenic *Bacillus thuringiensis* cotton: impact on the development of subsequent generations. *Florida Entomologist* 84(1): 1-6.
- Adamczyk, JR., J. J., L. C. Adams, and D. D. Hardee. 2001. Field efficacy and seasonal expression profiles for terminal leaves of single and double *Bacillus thuringiensis* toxin cotton genotypes. *J. Econ. Entomol.* 94 (6): 1589-1593.
- Akhurst, R. J., L. James and C. Beard. 2003. Resistance to the Cry1Ac δ -Endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in the Cotton Bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ Entomol.* 96 (4):1290-1299.
- Ali, M. I., S. Luttrell and III Young. 2006. Susceptibilities of *Helicoverpa zea* and *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) Populations to Cry1Ac Insecticidal Protein. *J. Econ Entomol.* 99(1):164-175.
- Alonso, E. J. 1983. Manual fitosanitario de los principales cultivo en la Región Lagunera, plagas del algodonoero. Patronato para la investigación, Fomento y Sanidad Vegetal de la Comarca Lagunera, Cd. Lerdo, Durango. Pág. 180.
- Alonso, E. J. 1995. Evento Regional de Aprobación en Manejo Fitosanitario del Algodón. UAAAN – UL – SAGDR – DGSV. Torreón, Coahuila. P.p. 27- 61.
- Alonso, E. J. 2004. Manejo Integrado de Plagas insectiles asociados al cultivo del algodonoero (Memorias del V curso de aprobación y actualización en el control de plagas del algodonoero) Torreón, Coahuila, México. Pág. 82.

- Andrews, K. L. 1988. Latin American Research on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Florida Entomol. 71(4):630-53.
- Arturo, J. M. 1984. El algodón. Mejoramiento genético y técnica de su cultivo. P.p. 13 – 16.
- Bahena, J. F. 1998. Enemigos Naturales de Huevecillos y Larvas del Gusano Cogollero del Maíz, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) y Observaciones de Laboratorio en Morelos México. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila; México.
- Barral, J. M. y L. B. Zago. 1983. Programa para el Manejo Integrado de Insectos y Ácaros en Algodón. INTA, EERA Sáenz Peña. Boletín 71: 24-25 Pág.
- Bautista, M. N. 2006. Insectos plaga. Una guía ilustrada para su identificación. Colegio de Postgraduados. 1era ed. Texcoco, Estado de México, México. P.p.3.
- Blanco, C. A., D. A. Andow, C. A. Abel, D. V. Sumerford, G. Hernández, J. D. López, Jr., L. Adams, A. Groot, L. Rogers, R. Parker, G. Payne, O. P. Perera, A. P. Teran-Vargas and A. Azuara-Domínguez. 2009. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac Resistance Frequency in Tobacco Budworm (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol. 102(1): 381-387
- Blanco, C. A., M. Portilla, J. L. Jurat-Fuentes, J. F. Sánchez, D. Viteri, P. Vega-Aquino, A. P. Teran-Vargas, A. Azuara-Domínguez, J. D. López, Jr., R. Arias, Z. Y. Cheng, D. Lugo-Barrera and R. Jackson. 2010. Susceptibility of Isofamilies of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to Cry1Ac and Cry1Fa Proteins of *Bacillus thuringiensis*. Southwestern entomologist. 35(3):409-415.
- Borbolla, I. S. 1981. Estudio comparativo de insecticidas a diferentes dosis y número de aplicaciones para el control de gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) en maíz de temporal. Agronomía en Sinaloa. 1: 21-30.
- Borror, D. J., D. M. De Long and C. A. Triplehorn. 1989. An introduction to the study of insects. 6th. Edition. Saunders College Publ. USA. 827 Pág.

- Broderick, A. N., F. Raffa, K. and J. Handelsman. 2006. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. PNAS. 103: 15196-15199.
- Burd, A. D., F. Gould, J. R. Bradley, D. J. W. Van and W. J. Moar. 2003. Estimated Frequency of Nonrecessive *Bt* Resistance Genes in Bollworm, *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae) in Eastern North Carolina. J. Econ. Entomol. 96(1):137-142.
- Carrillo, M., L. J. 2005. Tendencia del algodonoero en México. INIFAP. Cd. Obregón, Sonora, México.
- Capinera, J. L. 1999. Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Insecta: Lepidóptera: Noctuidae). EENY-098, University of Florida IFAS Extensión. 6 Pp.
- Carmona, A. 2002. Aislamiento y Caracterización parcial de una cepa de *Bacillus thuringiensis* toxica a *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera: Noctuidae). Bioagro. 14(1): 3-10.
- Corona, C. S. 2008. Propuesta de una clave taxonómica con uso del spinneret para identificar larvas de lepidópteros de importancia agrícola. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila; México
- Crickmore, N., R. Zeigler D., J. Feitelson, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, and H. Dean, D. 1998. Revision of the Nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* Pesticidal Crystal Proteins. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62(3): 807-813.
- Delécluse, A., V. Juárez-Pérez, and C. Berry. 2000. Vector-active toxins: structure and diversity. In: Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application (J-F. Charles, A. Delécluse and C. Nielsen-Le Roux, (Eds.) Kluwer Academic Publishers. pp. 101-125.
- Federici, B. A., P. Luthy and E. Ibarra, J. 1990. Parasporal body of *Bacillus thuringiensis israelensis*, structure, protein composition, and toxicity. Chapter 3. In: Bacterial Control of Mosquitoes and Blackflies. H. de Barjac and D.J. Sutherland (eds.) Rutgers University Press. New Brunswick pp. 16-44

Federici, B. A. 1993. Insecticidal bacterial proteins identify the midgut epithelium as a source of novel target sites for insect control. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 22: 357-371.

Frederick, W. S. (ed.) 2005. Orden Lepidoptera. En: *Immature Insects*. Volumen 1, USA: Kendall/Hunt. 288-596 Pág.

García R. J. L. 1975. Revisión bibliográfica de las plagas de maíz, arroz y sorgo en Venezuela. Universidad Nacional Experimental de los Llanos Occidentales Ezequiel Zamora. Sin paginación (multigrafiado).

Glare, T. R. and M. O'Callaghan. 2000. *Bacillus thuringiensis*: Biology, Ecology and Safety. John Wiley & Sons, LTD. New York. 350 Pág.

Gutierrez, M. A. 1984. Factores interferentes en la captura de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) probando dos tipos de trampas de feromonas (Z)-9-DODECEN-1-OL-ACETATO. Tesis profesional de licenciatura. Universidad de Villaflores. Villaflores, Chiapas, México.

Hoffmann, M. P. and A. C. Frodsham. 1993. *Natural Enemies of Vegetable Insect Pests*. Cooperative Extension, Cornell University, Ithaca, NY. 63 Pág.

Hofmann, C., P. Lüthy, R. Hütter, and V. Pliska. 1988. Binding of the delta endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush-border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Eur. J. Biochem.* 173: 85-91.

Höfte, H. and H. R. Whiteley. 1989. Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53(2): 242-255.

<http://www.bioagro.com>

Http://www.cls.casa.colostate.edu/cultivostransgenicos/sp_how.html#DNA

<Http://www.monsanto.com.mx/bollgard.htm>

<http://www.pecaltex.com.mx/SobreelAlgod%C3%B3n/Importanciaeconomica.aspx>

Ibarra, J. E. 2007. Uso de bacterias en el control biológico, pp. 144-159. En: L. A. Rodríguez-del-Bosque y H. C. Arredondo-Bernal (eds.), *Teoría y Aplicación del Control Biológico*. Sociedad Mexicana de Control Biológico, México. 303 Pág.

- Ibarra, J. E. y M. C. Del Rincón C. (Sin fecha). Análisis e integración de la información sobre OGMs con eventos *Bt.*: Reporte final sobre el análisis de riesgo por su liberación. En: www.ine.gob.mx/descargas/bioseguridad/ogm_bt.pdf
- Iriarte, J. y P. Caballero. 2001. Biología y Ecología de *Bacillus thuringiensis*. En: Caballero, P. y J. Ferre (Eds.). Bioinsecticidas: Fundamentos y aplicaciones de *Bacillus thuringiensis* en el Control Integrado de Plagas. PHITOMA-España, Navarra, España, pp. 15-44.
- James, C. 2009. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2009 ISAAA Brief No. 41. ISAAA, Ithaca, NY. In: <http://www.isaaa.org/>
- James, C. 2010. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2010. ISAAA Brief No. 42. ISAAA: Ithaca, NY. In <http://www.isaaa.org>
- Joung, K. B., J. C. Côté. 2000. A review of the environmental impacts of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. Technical Bulletin. Canada. 29: 1-16
- Kati, H., K. Sezen, R. Nalcacioglu and Z. Demirbag. 2007. A Highly Pathogenic Strain of *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* in Lepidoptera Pests. J. Microbiol. 45(6): 553-557.
- Knowles, B.H. 1994. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal delta-endotoxins. In Advances in Insect Physiology. 24. Ed. PD Evans. Academic Press, London, England. 275-308 Pág.
- Krieg, A., A. Huger, G. Langenbruch, and W. Schnetter. 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*: Ein neuer gegenuber larven von coleopteren wirksamer pathotyp. Z. Angew. Entomol. 96: 500-508.
- Labrador., J. 1967. Estudios de biología y combate del gusano cogollero del maíz *Laphygma frugiperda* (S. & A.). Fac. De Agronomía. Universidad del Zulia. (MARACAIBO). 83 Pp.
- Landolt, P. J. 2009. New geographic records for tobacco budworm, *Heliothis virescens* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae), in the pacific Northwest. Pan Pacific Entomol. 84: 246-248.

- Leong, K. L. H., R. J. Cano and A. M. Kubinski. 1980. Factors Affecting *Bacillus thuringiensis* Total Field Persistence. Environ. Entomol. 9(5): 593-599.
- Luginbill, P. 1928. The fall armyworm. USDA. Tech. Bull. 34:92
- McGregor, S. E. (1976). Chapter 9: Crop Plants and Exotic Plants Insect Pollination of Cultivated Crop Plants
- Metcalf, C. L. y W. P. Flint. 1965. Insectos destructivos e insectos útiles sus costumbres y su control. 1era Ed. Editorial McGraw-Hill Book Company, Inc. México D.F. Pp. 530
- Montes, M. J. A., P. N. Espinoza, R. E. Garrido y M. F. A. Gutiérrez. 2001. Reproducción del Gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* L.) del Maíz (*Zea mays* L.) bajo condiciones de Laboratorio. IX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. XIII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica. II Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica. Veracruz, México.
- Murua, M. G. y E. Virla. G. 2004. Presencia Invernal de *Spodoptera frugiperda* (Smith)(Lepidóptera: Noctuidae) en el Área Maicera de la Provincia de Tucumán, Argentina. Revista de la Facultad de Agronomía. 105: 46-52.
- Nagoshi. R. N., y R. L. Meagher. 2008. Review of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) genetic complexity and migration. Florida entomologist. 41: 546-554.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). 2011. In: [Http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=1428](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=1428).
- Organización de las Naciones Unidas Para la Agricultura y la Alimentación (FAO). 2004. La biotecnología agrícola en: El estado mundial de la Agricultura y la Alimentación. 129 pág.
- Ortega, C. A. 1987. Insectos nocivos del maíz: una guía para su identificación en el campo. CIMMYT. México, D.F. 106 Pág.
- Pashey D. P. 1988. Current status of armyworm host strains. Florida Entomol. 71(3):227-34.

- Permingeat, H. y E. Margarit. 2005. Impacto ambiental de los cultivos genéticamente modificados: El caso de Maíz *Bt*. Revista Investigaciones de la Facultad de Ciencias Agrarias. 7:33-44.
- Peterson, A. L. 1962. Larvae of insects. An introduction to nearctic species. Part-I Lepidoptera an plant infesting Hymenoptera. Columbus, Ohio. 315 Pág.
- Rausell, C., C. Muñoz-Garay, R. Miranda-CassoLuengo, I. Gómez, E. Rudino-Pinera, M. Soberon and A. Bravo. 2004. Tryptophan spectroscopy studies and black lipid bilayer analysis indicate that the oligomeric structure of Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* is the membrane-insertion intermediate. Biochemistry 43: 166-74
- Robles, S. R. 1982. Producción de oleaginosas y textiles. Segunda edición, Ed. LIMUSA. P.p. 137 – 140; 165 – 285.
- Rodríguez, M. R. y C. De León. 2008. El cultivo del maíz. Temas selectos. 1era. Ed. Editorial Colegio de Postgraduados, Mundi-Prensa México, Pp. 29-45.
- Rodríguez, F. E., R. Zumalacárregui, J. M., C. A. Otero, S. A. Calleja, C. F. De la Fuente, C. 2003. Lo que vd. debe saber sobre los alimentos transgénicos (y organismos manipulados genéticamente). Cartilla de divulgación. Edición caja España. 69 Pág.
- Rodríguez, R. P. y R. O. González. 2007. Plantas transgénicas: una revisión de los principales cultivos básicos en México. e-Gnosis. 5(9): 1-22. In: <http://www.e-gnosis.udg.mx/vol15/art9>.
- Sanchez, A. J. 1996. Resultados de la problemática fitosanitaria del algodónero en la Región Lagunera de Coahuila y Durango. Sanidad Vegetal, Delegación Comarca Lagunera. México.
- S.A.S. Institute. 2002. The SAS System for Windows, Release 9.0. SAS, Institute, Cary N. C. U.S.A.
- Sauka, D. H. y G. B. Benintende. 2008. *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. Revista Argentina de Microbiología. 40: 124-140

- Schnepf, E. and H. R. Whiteley. 1981. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 78 (5): 2893-2897.
- Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler and D.H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62(3): 775-806.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2012. En: <http://www.siap.gob.mx>. Consulta: 29/Enero/2012.
- Siebert, M. W., T. G. Patterson, G. J. Gilles, S. P. Nolting, L. B. Braxton, B. R. Leonard, J. W. Van Duyn and R. B. Lassiter. 2009. Quantification of Cry1Ac and Cry1F *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Proteins in Selected Transgenic Cotton Plant Tissue Types. *J. Econ. Entomol.* 102(3): 1301-1308.
- Silva-Aguayo, G., J. C. Rodríguez- Maciel, A. Lagunes-Tejeda, C. Landeral-Cázares, R. Alatorre-Rosas, A. M. Shelton and C. A. Blanco. 2010. Bioactivity of Boldo (*Peumus boldus* Molina) (Laurales: Monimiaceae) on *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) and *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae)
- Silva, C. C. A. 2005. Algodón genéticamente modificado. Editorial AGRO-BIO. Bogotá, Colombia. 47 Pág.
- Stewart, S. D., J. J. Adamczyk, JR., K. S. Knighten and M. Davis. 2001. Impact of Bt Cottons Expressing One or Two Insecticidal Proteins of *Bacillus thuringiensis* Berliner on Growth and Survival of Noctuid (Lepidoptera) Larvae. *J. Econ. Entomol.* 94(3): 752-760.
- Soberón, M. y A. Bravo. 2008. Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación. En: Rebolledo, F y A. Lopez-Munguia (Eds.). 2008. Una ventana al quehacer científico. Instituto de Biotecnología de la UNAM 25 aniversario. México, D.F. UNAM. Pág. 303-314.
- Tabashnik, B. E., Y. B. Liu, D. C. Unnithan, Y. Carriere, T. J. Dennehy and S. Morin. 2004. Shared genetic basis of resistance to *Bt* toxin Cry1Ac in independent strains of pink bollworm. *J. Econ. Entomol* 97 (3):721-726.

- Tabashnik, B. E., R. W. Biggs, D. M. Higginson, S. Henderson, D. C. Unnithan, G. C. Unnithan, C. E. Kirk, M. S. Sisterson, T. J. Dennehy, Y. Carriere, and S. Morin. 2005. Association between resistance to *Bt* Cotton and Cadherin Genotype in Pink Bollworm. *J. Econ. Entomol.* 98(3): 635:644.
- Terän, J. 1980. Lista preliminar de Hymenoptera parásitos de otros insectos en Venezuela. *Rev. Fac. Agron. (MARACAY)*, 11 (1-4): 283-389.
- Wu, K., Y. Guo and G. Head. 2006. Resistance Monitoring of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to Bt Insecticidal Protein During 2001–2004 in China. *J. Econ. Entomol.* 99(3): 893-898.
- Zenner de Polanía, I., R. J. A. Álvarez, M. H. A. Arévalo, C. R. Mejía y R. M. A. Bayona. 2008. Susceptibilidad de cuatro nóctuidos plaga (Lepidóptera) al gene Cry1Ac del *Bacillus thuringiensis* incorporado al algodónero. *Revista Colombiana de Entomología* 34(1): 41-50.
- Zenner de Polanía, I. and G. Álvarez -Alcaráz. 2008. Analysis of the influence on the main beneficial fauna by two transgenic cultivars, cotton and corn. El Espinal (Tolima). *Revista U.D.C.A. Actualidad y Divulgación Científica* 11: 133-142.