

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO



Detección Molecular del Gen de Resistencia a la Toxina Cry1Ac de
Bacillus thuringiensis en *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)
(Lepidoptera: Noctuidae)

Por:

JAQUELINE CORTÉS MEZA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN

Saltillo, Coahuila, México.

Diciembre, 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO

Detección Molecular del Gen de Resistencia a la Toxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* en *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)

Por:

JAQUELINE CORTÉS MEZA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN


Aprobada por el Comité de Asesoría:




Dr. Agustín Hernández Juárez
Asesor Principal Interno



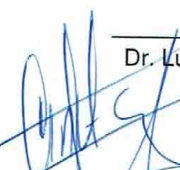
Dra. Miriam Sánchez Vega
Asesor Principal Externo



M.C. Aideé González Ruíz
Coasesor



Dr. Luis Alberto Aguirre Uribe
Coasesor



Dr. José Antonio González Fuentes
Coordinador de la División de Agronomía



Saltillo, Coahuila, México.

Diciembre, 2019

AGRADECIMIENTOS

A Dios por la vida que me regalo, por cuidarme en este trayecto de la carrera fuera de casa y nunca dejarme sola, por cada maravillosa persona que puso en mi camino y por siempre bendecirme.

A mi querida Universidad ¡Mi Alma Mater!, gracias por abrirme las puertas, por acogerme como una madre, por todas las herramientas brindadas para formarme como profesional, por la familia que me permitiste formar; por los maravillosos momentos y buenos recuerdos durante mi estancia, Muchas Gracias.

A la Familia, mi madre Silvia Meza porque siempre he tenido su apoyo en todo, por confiar en mí, por siempre darme ánimos y fuerzas, a Octavio Pérez por todo el apoyo, por los buenos consejos, por ser lo que debe ser un buen padre muchísimas gracias. A mis hermanos Mari, Riky, Pablo, Carlos y Tony, por todo el amor y apoyo brindado, a todos ustedes gracias, los amo infinitamente.

A mis amigos y compañeros Esne, Tere, Ale y Witho por brindarme su amistad, por todo su apoyo y cariño, por los buenos ratos y por estar en los tragos amargos, por las risas y llantos, por ser mi familia de Saltillo, mil gracias, los amo.

A las maravillosas personas que conocí durante el trayecto de la carrera y que se han ganado un lugar en mi corazón y todo mi cariño, Sayo y Paty muchas gracias.

A mis amigos Danny, Sarahí y Frank que a la distancia me echaban porras y me brindaban todo su apoyo y cariño, los amo.

Al Dr. Agustín Hernández Juárez por ser uno de los mejores profesores con quien lleve clases, por la oportunidad de realizar este proyecto, por todo el apoyo brindado, la accesibilidad, dedicación y disposición que siempre mostro, muchas gracias.

A la MC. Aideé González Ruíz por su tiempo, colaboración y apoyo brindado, por su gran ayuda en el tema de extracción de ADN y PCR, muchas gracias.

A la Dra. Miriam Sánchez Vega por su contribución y evaluación de mi proyecto de tesis.

Al Dr. Luis Alberto Aguirre Uribe por contribuir en la participación y evaluación de mi proyecto de tesis.

Al Dr. Alberto Flores Olivas por la facilitación de las instalaciones del Laboratorio de Parasitología Molecular para el desarrollo de la presente investigación.

DEDICATORIA

A mi héroe, a la persona más importante en mi vida, a quien siempre ha estado conmigo, quien más me ama, mi consejera, mi primera y mejor profesora, mi mejor amiga, mi madre Silvia Meza, porque no habría llegado tan lejos sin su apoyo, por la confianza que nos tenemos, por toda su dedicación y entrega como madre y persona, por ser un ejemplo a seguir, por contribuir enormemente en la persona en quien me he convertido, porque este logro también es todo tuya mamá, porque te amo.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIA	v
ÍNDICE GENERAL	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE CUADROS	ix
RESUMEN	x
1.- INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Objetivo	4
1.2 Justificación	4
1.3 Hipótesis	4
2.- REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1. Organismos Genéticamente Modificados (OGM).....	5
2.1.1. Situación de cultivos GM a nivel mundial.....	6
2.1.2. Situación de cultivos GM en México	8
2.2. Transgénicos	9
2.3. Algodón transgénico	10
2.3.1 Algodón Bt resistente a insectos	10
2.4. <i>Bacillus thuringiensis</i>	12
2.4.1. Características de <i>Bacillus thuringiensis</i>	13
2.4.2. Ciclo de vida	14
2.4.3. Proteínas Vip.....	15
2.4.4. Proteínas Cry y Cyt.....	15
2.4.5. Clasificación de las δ -endotoxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	16
2.5 Modo de acción de las toxinas Cry de <i>Bacillus thuringiensis</i>	17
2.6. Estructura de las toxinas Cry	18
2.7. Resistencia a las toxinas Cry de <i>Bacillus thuringiensis</i>	19
2.7.1. La resistencia de plagas	20
2.7.2. Mecanismos involucrados en la resistencia a toxinas Cry.....	21
2.8. Casos de resistencia	23
2.9. Alternativas para demorar o prevenir el desarrollo de resistencia.....	25
2.10. Detección de la resistencia.....	29
2.10.1. Bioensayos	29

2.10.2. Detección molecular	31
2.11. Gusano cogollero <i>Spodoptera frugiperda</i>	32
2.11.1. Generalidades.....	32
2.11.2. Taxonomía	32
2.11.3. Descripción y ciclo de vida.....	33
2.11.4. Origen y distribución de la plaga.....	38
2.11.5. Daño e Importancia.....	38
2.12. ¿Maíz Bt en México?	39
2.13. Experimentaciones con maíz transgénico.....	40
3.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
3.1. Colecta de <i>Spodoptera frugiperda</i>	42
3.1.1. Líneas de campo	42
3.1.2. Línea susceptible.....	42
3.2. Procesamiento de <i>Spodoptera frugiperda</i>	45
3.2.1. Extracción de ADN.....	45
3.2.2. Visualización del ADN en gel de agarosa al 1%	48
3.3. Detección del gen de resistencia.....	49
3.3.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	49
4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
4.1. Colecta de <i>Spodoptera frugiperda</i>	52
4.2. Extracción de ADN.....	52
4.3. Presencia y Ausencia de ADN (Visualización)	56
4.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	56
4.5. Visualización del resultado de PCR.....	63
6.- LITERATURA CITADA.....	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clases de modificación genética dependiendo de la procedencia del gen de interés	16
Figura 2. Países donde se siembran cultivos GM	19
Figura 3. Microfotografía de <i>Bacillus thuringiensis</i> en microscopio electrónico de transmisión. Se muestra el cristal proteínico romboide compuesto de toxinas Cry y una espora en proceso	24
Figura 4. Mecanismo de acción de las toxinas Cry de <i>Bacillus thuringiensis</i>	29
Figura 5. Estructura tridimensional de una toxina Cry	30
Figura 6. Huevos del gusano cogollero, <i>Spodoptera frugiperda</i>	44
Figura 7. Larva de <i>Spodoptera frugiperda</i> en el primer estadio	45
Figura 8. Larva madura de <i>Spodoptera frugiperda</i> , donde se observa la “Y” invertida en la parte frontal de la cabeza	46
Figura 9. Pupa de <i>Spodoptera frugiperda</i>	46
Figura 10. Macho adulto típico de <i>Spodoptera frugiperda</i>	47
Figura 11. Hembra adulta típica de <i>Spodoptera frugiperda</i>	48
Figura 12. Gel de agarosa al 1 % que muestra la presencia de ADN, ausencia de ADN y exceso de proteína	57
Figura 13. Gel de agarosa al 1 % del resultado de PCR.....	64

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Área global de cultivos GM en 2016 y 2017; por país (Millones de hectáreas **)	18
Cuadro 2. Descripción de las recolectas realizadas para las líneas de campo presuntamente resistentes a las toxinas Cry de Bt, con influencia de cultivos GM, en el estado de Coahuila, México, 2018	43
Cuadro 3. Descripción de las recolectas realizadas para las líneas de campo presuntamente resistentes a las toxinas Cry de Bt, con influencia de cultivos GM, en el estado de Coahuila, México, 2018	45
Cuadro 4. Iniciadores específicos que están relacionados con alelos de resistencia del gen que codifica para la toxina Cry1Ac de <i>Bacillus thuringiensis</i> ...	51
Cuadro 5. Reactivos y orden de agregación para elaborar el Mixer para la PCR .	52
Cuadro 6. Visualización de ADN de <i>Spodoptera frugiperda</i> en gel de agarosa al 1% de San Pedro de las Colonias, Coahuila, 2018.....	53
Cuadro 7. Visualización de ADN de <i>Spodoptera frugiperda</i> en gel de agarosa al 1% de Torreón, Coahuila, 2018	55
Cuadro 8. Visualización de ADN de <i>Spodoptera frugiperda</i> en gel de agarosa al 1% de la línea susceptible de Jalisco, Veracruz, Morelos y Coahuila, 2018.....	56
Cuadro 9. Visualización de la amplificación de la PCR en ADN de larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> provenientes de San Pedro de las Colonias, Coah., sometido a cinco juegos de iniciadores (gel de agarosa al 1%).....	58
Cuadro 10. Visualización de la amplificación de la PCR en ADN de larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> provenientes de San Pedro de las Colonias, Coah., sometido a cinco juegos de iniciadores (gel de agarosa al 1%).....	59
Cuadro 11. Visualización de la amplificación de la PCR en ADN de larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> provenientes de Torreón, Coah., sometido a cinco juegos de iniciadores (gel de agarosa al 1%).....	60
Cuadro 12. Visualización de la amplificación de la PCR en ADN de larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> provenientes de Torreón, Coah., sometido a cinco juegos de iniciadores (gel de agarosa al 1%).....	61
Cuadro 13. Visualización de la amplificación de la PCR en ADN de larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> de las líneas susceptibles, sometidas a cinco juegos de iniciadores (gel de agarosa al 1%).....	62
Cuadro 14. Visualización de la amplificación de la PCR en ADN de larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> de las líneas susceptibles, sometidas a cinco juegos de iniciadores (gel de agarosa al 1%).....	63

RESUMEN

Las plantas transgénicas que expresan proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* (Bt) tóxicas para insectos plaga han disminuido el uso de insecticidas químicos, que además de contaminar el ambiente, tienen baja selectividad contra insectos benéficos y suelen ser dañinos para la salud. En México, en la Comarca lagunera en el estado de Coahuila, se tienen plantíos comerciales con algodón genéticamente modificado (GM) Bollgard II que expresa las proteínas Cry1Ac y Cry2Ab que son tóxicas para insectos lepidópteros; como el complejo de gusanos belloteros (*Heliothis virescens* y *Helicoverpa zea*), gusano rosado *Pectinophora gossypiella* y gusano cogollero *Spodoptera frugiperda*, que son plagas importantes del algodón. Los cultivos Bt exponen en forma creciente y continua a las poblaciones plaga a la presión de selección y por un mal manejo se pueden desarrollar plagas resistentes. En la presente investigación se llevó a cabo la detección del gen de resistencia del gusano cogollero a la toxina Cry1Ac de Bt mediante pruebas moleculares en larvas de tercer estadio de *S. frugiperda* recolectados en cultivos de maíz convencional asociado a plantaciones de algodón GM en localidades de San Pedro de las Colonias y Torreón, Coahuila y se compararon con larvas susceptibles de los estados de Veracruz, Morelos, Jalisco y Coahuila (Saltillo de laboratorio), libres de presión de selección por cultivos Bt. Se llevó a cabo la extracción de ADN y amplificación por PCR, con 10 pares de oligonucleótidos específicos para la detección de alelos del gen de resistencia a la toxina Cry1Ac de Bt. La amplificación de la PCR para los cebadores en estudio resultó negativa en todas las muestras procesadas de las poblaciones de *S. frugiperda*, por lo que se expresó ausencia de los alelos de resistencia relacionados a la toxina Cry1Ac en larvas, lo que confirma que las poblaciones de esta especie presentan susceptibilidad genética a dicha toxina, esto indica que la tecnología Bt con la toxina Cry1Ac es efectiva para el control de este lepidóptero.

Palabras clave: algodón genéticamente modificado, alelos de resistencia, cultivo transgénico, gen Bt, gusano cogollero.

1.- INTRODUCCIÓN

En la actualidad y alrededor del mundo la adopción de cultivos genéticamente modificados (GM) se han extendido enormemente, tan solo en Estados Unidos se siembran 750 000 000 ha con cultivos GM. Nuestro país ocupa la posición número 17 entre los países que siembran cultivos con esta tecnología (ISAAA, 2018). En México no se permite la liberación comercial del maíz GM debido a que el país es considerado centro de origen del maíz, y se cree que los transgenes eventualmente pudiesen introducirse en las plantas nativas, lo que hace necesario evaluar tal impacto del maíz GM sobre las poblaciones de sus ancestros. La introducción de este tipo de cultivos está estrictamente regulada, donde solo se permite algodón y soya GM para siembra comercial. El 60% del algodón sembrado en México es GM, y los estados productores son Baja California, Sonora, Durango, Chihuahua y Coahuila (Jame, 2010; Gutiérrez *et al.*, 2015).

El algodón GM ha sido modificado mediante ingeniería genética para que la planta desarrolle la capacidad de tolerar aplicaciones de herbicidas y exprese toxicidad para matar insectos plagas. Entre las principales plagas del algodón se encuentra el complejo de gusanos belloteros (*Heliothis virescens*, *Helicoverpa zea*) el gusano rosado *Pectinophora gossypiella* y el gusano cogollero *Spodoptera frugiperda*; este último con mayor preferencia por el maíz; que son controlados por la tecnología que ofrece el algodón transgénico que expresa toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* (Monsanto, 2002; Silva, 2005).

Se les considera a las plantas transgénicas una de las herramientas de control de plagas que más presión de selección ejercen (Trumper, 2014). Al paso del tiempo la plaga genera resistencia a la toxina, con base en ensayos para determinar el mecanismo de resistencia de la plaga a las toxinas Cry de Bt, se ha demostrado que se debe a una modificación en el sitio de acción en el intestino medio de la larva, además de un herencia recesiva donde el insecto que ha generado resistencia confiere esta característica a su progenie (Tabashnik *et al.*, 1998; Ferré y Van Rie, 2002; Heckel *et al.*, 2007; George y Clickmore, 2012; Tabashnik *et al.*, 2014; Jakka *et al.*, 2015). Estudios han revelado que la resistencia en lepidópteros

a la toxina Cry1Ac está estrechamente relacionada con mutaciones en el gen que codifica para cadherina donde actúa la toxina Cry1Ac en el intestino medio larval (Morin *et al.*, 2003).

En diferentes estudios alrededor del mundo y en diversas plagas importantes de cultivos Bt, se han registrado casos de desarrollo de resistencia, como el barrenador del tallo *Busseola fusca* Fuller (Lepidoptera: Noctuidae) en Sudáfrica, que mostro ser resistente a maíz transgénico (Rensburg, 2007), *S. frugiperda* con resistencia a la toxina Cry1F del maíz en Puerto Rico (Store *et al.*, 2010) o *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) resistente a formulaciones producidas por *B. thuringiensis* subsp. *Kurstaki*, que además mostró resistencia cruzada a formulaciones de Bt. var. *aizawai* que contiene Cry1C y Cry1A (Tabashnik *et al.*, 1993).

Existen estrategias que retrasan la aparición de resistencia a partir de refugios donde del área sembrada con cultivos Bt se destine un porcentaje a cultivos hospederos no Bt, la idea es que la poca población resistente se cruce con población (que no han sido sujetas a ninguna presión de selección) susceptible y que el resultado (progenie) sea susceptible y muera ante la toxicidad de Bt (Andow, 2008; Tabashnik, 2008; Tabashnik *et al.*, 2013). Ahora también se cuenta con la segunda generación de cultivos que expresan dos o más toxinas Cry, que son más efectivos y disminuyen la probabilidad de resistencia cruzada (Ives *et al.*, 2011; Trumper, 2014). Tabashnik *et al.* (2008) realizaron un ensayo con poblaciones de *H. zea* muestreados durante 2003-2004 y 2005-2006 en algodón Bt (Cry1Ac), los resultaron mostraron menor resistencia en poblaciones de Carolina del Norte debido al uso de refugios en comparación de Arkansas y Mississippi donde no implementaron el uso de refugios.

Se espera que la estrategia de refugios resulte efectiva para el manejo de resistencia. Sin embargo, al parecer esta estrategia ha tendido problemas debido a la dificultad de monitorear la resistencia en campo, especialmente cuando la resistencia es recesiva y rara. El uso de bioensayos para estimar la frecuencia de alelos de resistencia no ha sido suficiente debido a su incapacidad para distinguir entre heterocigotos y homocigotos susceptibles (Gould *et al.*, 1997; Tabashnik *et*

al., 1997). Se han propuesto diagnósticos de ADN capaces de detectar heterocigotos como una metodología más factible para detectar alelos de resistencia a bajas frecuencias (Gahan *et al.*, 2007). La detección basada en ADN de alelos de resistencia podría aumentar la eficiencia 1000 veces en comparación con los bioensayos (Tabashnik *et al.*, 1997).

Anteriormente la detección basada en ADN no era aplicable a la resistencia Bt porque se desconocía la base genética de la resistencia a las toxinas Bt (Gahan *et al.*, 2007). En la actualidad se cuenta con la afirmación de diversos estudios que demuestran que la base de la resistencia es causada por alteraciones o mutaciones en cadherina, esto al menos en lepidópteros (Morin *et al.*, 2003).

1.1 Objetivo

Detectar molecularmente el gen de resistencia a la toxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* en *Spodoptera frugiperda*.

1.2 Justificación

El algodón y maíz son cultivos que comparten algunas plagas y que son objetivo de la tecnología Bt, como: *H. zea*, *H. virescens* y *S. frugiperda*, esta última con mayor preferencia por el maíz; lo que sugiere un flujo constante de estos insectos entre estos cultivos, y donde el maíz puede ser un reservorio para individuos con características de resistencia a la toxina de Bt. Se predispone la entrada de nuevos cultivos GM que comparten plagas blanco a esta tecnología tal es el caso del maíz Bt que podría implicar la falta de eficacia de las toxinas Cry del Bt, debido a la condición de resistencia a causa de la alta presión de selección que se tenga en las poblaciones de insectos plagas, mucho antes del establecimiento de este cultivo. El ingreso del maíz Bt a México, aún está restringido y permanece vigente con alta prioridad por las implicaciones que tiene para el país, particularmente por ser este su centro de origen y la importancia económica y social que representa.

1.3 Hipótesis

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

2.- REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Organismos Genéticamente Modificados (OGM)

Los OGM, y en particular los cultivos genéticamente modificados, son especies vegetales que han sido sometidas a la incorporación o modificación de genes mediante el uso de herramientas de ingeniería genética. La modificación genética de plantas es por lo tanto definida como la manipulación del desarrollo, estructura o composición de una planta por medio de la inserción de secuencias de ADN específicas. Estas secuencias pueden ser derivadas de la misma planta produciendo organismos intragénicos; pueden también ser generados por la inserción de un gen proveniente de otra planta, produciendo organismos cisgénicos, o bien organismos transgénicos si la fuente del gen proviene de una especie diferente (Fig. 1). La manipulación genética persigue diferentes objetivos, entre ellos se destacan la alteración de los niveles o patrones de expresión de genes endógenos específicos, aumentándolos o disminuyéndolos; el cambio de las propiedades biológicas de las proteínas que ellos codifican o la introducción de nuevas propiedades o actividades biológicas, las cuales conferirán una capacidad adicional al bagaje genético del organismo en cuestión (Halford y Shewry, 2000, Gutiérrez *et al.*, 2015).

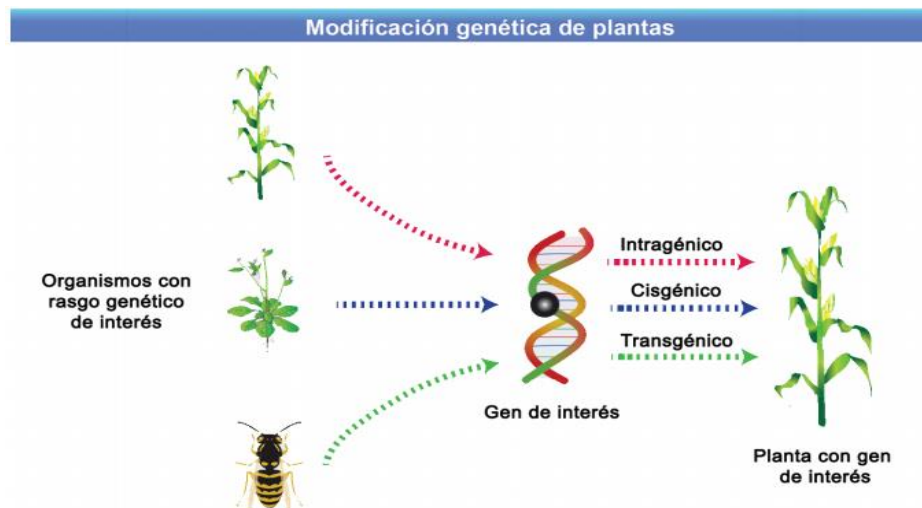


Figura 1. Clases de modificación genética dependiendo de la procedencia del gen de interés.

El objetivo de construir OGM es el de ayudar en la solución de problemas en diferentes sectores, con la certeza de que estos organismos son seres vivos naturales y por ello, tienen un menor impacto en el medio ambiente, biodiversidad y en la salud humana y animal, que muchas otras tecnologías basadas en productos químicos (Watson *et al.*, 1996, Bolívar *et al.*, 2002, Daar *et al.*, 2002, Bolívar *et al.*, 2004 citados por CONACYT, 2017).

En los últimos años un número importante de cultivos agrícolas han sido genéticamente modificados y comercializados alrededor del mundo, cultivos como maíz, algodón, soya, canola, papa, tomate, lechuga, entre otros, y los principales logros han sido alcanzados con un limitado número de rasgos y modificaciones genéticas, entre ellas la tolerancia a herbicidas, insectos y enfermedades (Gutiérrez *et al.*, 2015).

2.1.1. Situación de cultivos GM a nivel mundial

ISAAA (2018) reporta que un total de 24 países, 19 en desarrollo y 5 industrializados, sembraron cultivos genéticamente modificados en 2017. Los diez países principales, cada uno de los cuales crecieron más de 1 millón de hectáreas en 2017, fueron liderados por EE. UU. que creció 75 millones de hectáreas (40% del total mundial, con un incremento del 1% al 2016), Brasil con 50.2 millones de hectáreas (26%), Argentina con 23.6 millones de hectáreas (12%), Canadá con 13.1 millones de hectáreas (7%), India con 11.4 millones de hectáreas (6%), Paraguay con 3.0 millones de hectáreas (2%), Pakistán con 3 millones de hectáreas (2%), China con 2.8 millones de hectáreas (1%), Sudáfrica con 2.7 millones de hectáreas (1%) y Bolivia con 1.3 millones hectáreas (1%). Otros 14 países aumentaron un total de aproximadamente 3.7 millones de hectáreas en 2017 (Cuadro 1 y Fig. 2). En América Latina 10 países se beneficiaron de la extensa adopción de cultivos biotecnológicos; enumerados en orden descendente de superficie biotecnológica, fueron Brasil, Argentina, Paraguay, Bolivia, Uruguay, México, Colombia, Honduras, Chile y Costa Rica.

Cuadro 1. Área global de cultivos GM en 2016 y 2017; por país (Millones de hectáreas **).

NO.	País	2016	2017
1	USA*	72.9	75.0
2	Brasil*	49.1	50.2
3	Argentina*	23.8	23.6
4	Canadá*	11.1	13.1
5	India*	10.8	11.4
6	Paraguay*	3.6	3.0
7	Pakistán*	2.9	3.0
8	China*	2.8	2.8
9	Sudáfrica*	2.7	2.7
10	Bolivia*	1.2	1.3
11	Uruguay*	1.3	1.1
12	Australia*	0.9	0.9
13	Filipinas*	0.8	0.6
14	Birmania*	0.3	0.3
15	Sudan*	0.1	0.2
16	España*	0.1	0.1
17	México*	0.1	0.1
18	Colombia*	0.1	0.1
19	Vietnam	<0.1	<0.1
20	Honduras	<0.1	<0.1
21	Chile	<0.1	<0.1
22	Portugal	<0.1	<0.1
23	Bangladés	<0.1	<0.1
24	Costa Rica	<0.1	<0.1
25	Eslovaquia	<0.1	<0.1
26	Republica Checa	<0.1	<0.1
	Total	185.1	189.8

Fuente: ISAAA, 2017.

* Mega países biotecnológicos con un crecimiento de 50,000 hectáreas o más.

** Redondeado a los cien mil o más cercanos.

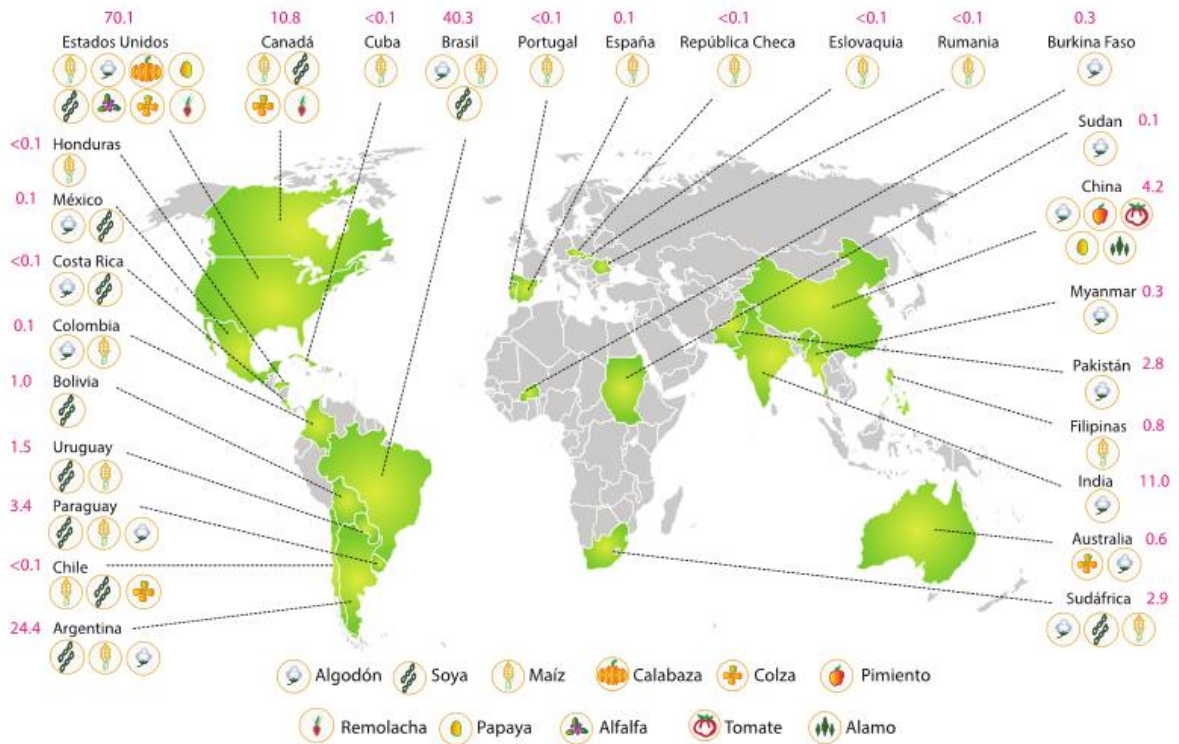


Figura 2. Países donde se siembran cultivos GM (Fuente: ISAAA, 2016).

2.1.2. Situación de cultivos GM en México

México ha estado sembrando cultivos genéticamente modificados desde 1996, el algodón GM con tolerancia a herbicidas y resistencia a insectos fue el primer cultivo autorizado para siembra comercial desde el año 2010, y es uno de los seis países pioneros en el uso de este cultivo (Gutiérrez *et al.*, 2015; ISAAA, 2018).

Desde 1996, México ha aprobado 170 eventos para alimentación y cultivo: alfalfa (5), canola (13), algodón (31), maíz (75), papa (13), arroz (1), soya (26), remolacha azucarera (1) y tomate (5). En 2017, México aceptó los siguientes eventos biotecnológicos para aprobaciones de alimentos: cinco eventos de maíz y dos eventos de soya. En 2017, el algodón GM fue el único cultivo sembrado en el país en 110 000 hectáreas por unos 8 000 agricultores, del cual todo fue cultivo GM, comparado con 2016, cuando México sembró 101 000 hectáreas de cultivos GM (97 000 hectáreas de algodón GM y 4 000 hectáreas de soya biotecnológica) (ISAAA, 2018).

Los estados en donde se ha autorizado el algodón GM con tolerancia a herbicidas y resistencia a insectos para siembra comercial y ha sido aprobado para su cultivo es Baja California, Sonora, Durango, Chihuahua y Coahuila (Jame, 2010; Gutiérrez *et al.*, 2015).

2.2. Transgénicos

Los OGMs también conocidos como transgénicos son organismos usados en la agricultura, medicina o industria, mejorados genéticamente para conferirles tanto a plantas como a animales, habilidades novedosas que no hubiesen podido adquirir en condiciones naturales, y han sido el resultado de la investigación científica, principalmente en la Ingeniería Genética, la Biotecnología Molecular y la Agronomía (Villalobos, 2007).

Las plantas transgénicas se comercializan desde 1996, y años después se siguen usando sin que hayan ocasionado algún efecto nocivo a la salud humana o animal ni a la biodiversidad. Por el contrario, han permitido reducir el uso de pesticidas, lo que se ha traducido en un menor impacto en el ambiente, a diferencia de lo que ha sucedido con la aplicación de productos químicos, algunos de los cuales tienen efectos carcinogénicos (Potrikus, 1989; Ye *et al.*, 2000; Purohit, 2003; Green *et al.*, 2004; Herrera-Estrella y Martínez, 2004; Trigo y Capp, 2007).

Villalobos (2007) señala esta tecnología como una forma novedosa de producción de granos y oleaginosas, más eficiente, con menor impacto negativo al ambiente, y con ahorros económicos directos para más diez millones de agricultores que los cultivan en 22 países. Tan solo el uso de *Bacillus thuringiensis* (Bt) en algodón, ha disminuido el uso de insecticidas en más de 30 000 toneladas al año y evitando que miles de productores, así como incontable número de especies, sean víctima del envenenamiento.

2.3. Algodón transgénico

El algodón pertenece a la primera generación de cultivos modificados genéticamente que ha dado como resultado el desarrollo de cultivares con un potencial importante para aumentar la productividad del cultivo y mejorar la calidad del producto a través de la ingeniería genética, también llamada tecnología del ADN recombinante; se está aplicando para obtener plantas de algodón resistentes a insectos y tolerantes a herbicidas (o una combinación de estas dos características en una misma variedad) existiendo un gran potencial para introducir otras características deseables en la planta. Esta nueva tecnología es considerada como un instrumento alternativo para modificar y mejorar los cultivos, particularmente en el caso del algodón donde las pérdidas por insectos y malezas son altamente significativas. El alto costo del control químico de los insectos y las malezas, justifica el desarrollo de plantas genéticamente modificadas, no solo para reducir el costo de producción, sino también el deterioro del medio ambiente (Silva, 2005).

El método de transformación comúnmente utilizado en algodón, es a través de la bacteria del suelo *Agrobacterium tumefaciens* (Smith y Townsend) Conn (Rhizobiaceae), el cual utiliza las propiedades biológicas de dicha bacteria para introducir el gen correspondiente al rasgo o característica deseada. Tal método, es bien conocido y ha sido empleado en la modificación genética de diversas plantas dicotiledóneas (Monsanto, 2002; Silva, 2005).

2.3.1 Algodón Bt resistente a insectos

Los cultivos resistentes a insectos han sido uno de los mayores éxitos de la aplicación de la tecnología de ingeniería genética de plantas a la agricultura (Gatehouse, 2008). El algodón resistente a insectos es una tecnología desarrollada para proteger las plantas de algodón del daño de ciertos insectos, a través de un gen o genes de la bacteria *B. thuringiensis* comúnmente conocido

como Bt, que produce una proteína Cry que es tóxica para ciertos insectos (Haile *et al.*, 2004; Blanco *et al.*, 2008; Torres y Ruberson, 2008).

Una vez insertado el gen de Bt en el genoma de la planta de algodón, las características de la proteína Cry son transferidas a variedades de algodón de alto rendimiento. Propiedades agrícolas como mayor rendimiento, mejor calidad de fibra y otras características importantes son preservadas, al mismo tiempo que el gen de la proteína Cry se agrega a las variedades comerciales (Silva, 2005).

Las plagas de este cultivo contra las que la tecnología Bt ofrece una protección eficaz son el complejo bellotero *H. virescens* y *H. zea*, el gusano rosado colombiano *Sacadodes pyralis* Dyar (Lepidoptera: Noctuidae), el gusano rosado del algodnero de la India *P. gossypiella* Saunders (Lepidoptera: Gelechiidae), el gusano de la hoja del algodón *Alabama argillacea* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) y parcialmente eficaz para combatir el gusano cogollero *S. frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), consideradas plagas de gran importancia económica para el algodón (Monsanto, 2002; Silva, 2005).

Las primeras variedades Bt que se introdujeron comercialmente contenían la proteína Cry1Ac, derivada de la bacteria *B. thuringiensis* subsp. Kurstaki (B.t.k.) y se comercializan con el nombre de Bollgard® (Ellsworth *et al.*, 1995; Edge *et al.*, 2001; Perlak *et al.*, 2001).

La toxina Bt que produce el algodón es la Cry1Ac (Tabashnik, 2008). Es conocido que la toxina Cry1Ac no actúa contra todas las plagas de lepidópteros de las plantas cultivadas a las cuales ha sido incorporada. Por la adquisición de resistencia de determinadas plagas a la toxina Cry1Ac y con el fin de ampliar el espectro de control contra otros lepidópteros, actualmente ya se cuenta con la segunda generación de plantas transgénicas, las cuales estas constituidas por varias toxinas Cry (Zenner *et al.*, 2007), es el caso de la variedad de algodón Bollgard II que además de la toxina Cry1Ac, expresa la proteína Cry2Ab (Greenplate *et al.*, 2005).

2.4. *Bacillus thuringiensis*

El control de insectos plaga en la agricultura y de vectores de enfermedades humanas se ha realizado principalmente con la aplicación de insecticidas químicos. Estos insecticidas han generado problemas de contaminación ambiental, de toxicidad a insectos no blancos y, de manera más importante, a los agricultores que los aplican. Estos insecticidas químicos han perdido eficacia en el control de insectos, ya que su aplicación ha generado la aparición de poblaciones de insectos resistentes (Soberón y Bravo, 2007).

Hoy en día existe una necesidad crítica de contar con herramientas seguras y efectivas para el control de plagas, lo ideal es un insecticida que sea tóxico sólo para el insecto blanco, que no sea recalcitrante, que no contamine el ambiente y que no genere la aparición de insectos resistentes. Existen herramientas de control biológico donde se usan patógenos como agentes de biocontrol (Soberón y Bravo, 2007).

Hasta ahora *B. 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. Esta posee una toxicidad selectiva alta debido a su estrecho rango de especificidad y gracias a ello genera un bajo impacto ambiental. Además de su alta especificidad es inocuo para vertebrados y otros insectos no blanco (Soberón y Bravo, 2007; Sauka y Benintende, 2008).

Las cepas Bt muestran diferentes efectos de su actividad insecticida hacia insectos plagas, y constituye una reserva de genes que codifican para proteínas insecticidas, las cuales son acumuladas en inclusiones cristalinas producidas en la esporulación bacteriana (proteínas Cry y Cyt) o expresadas durante su crecimiento bacteriano, las proteínas Vip (Gatehouse, 2008). Diferentes genes derivados de Bt han sido transferidos exitosamente a algodón, maíz, tomate y papa (CERA, 2010). Sin embargo, esta tecnología corre el riesgo de que aparezcan poblaciones de

insectos resistentes a las toxinas Cry (Haile *et al.*, 2004; Soberón y Bravo, 2007; Blanco *et al.*, 2008; Torres y Ruberson, 2008).

En la actualidad existe diversidad de productos a base de *B. thuringiensis* para control de insectos plagas, hasta ahora se han registrado más de 400 formulaciones basadas en Bt en el mercado y la mayoría contiene proteínas insecticidas y esporas visibles. Estos productos se aplican directamente en forma de aerosoles. Pero hasta ahora uno de los métodos más exitosos ha sido el de expresar los genes que codifican las toxinas en plantas “transgénicas” para atacar al insecto objetivo (George y Clickmore, 2012).

2.4.1. Características de *Bacillus thuringiensis*

Pertenece al reino Eubacteria, a la familia Bacillaceae y al género *Bacillus* (Schnepf *et al.*, 1998; Porcar y Juárez, 2004; Portela-Dussán *et al.*, 2013). Es una bacteria Gram-positiva, de flagelación peritrica, que mide de 3 a 5 μm de largo por 1 a 1,2 μm de ancho, aerobia estricta (Soberón y Bravo, 2007), nativo del suelo y catalogado como cosmopolita (Ruiz *et al.*, 2004; Balaraman, 2005; Portela-Dussan *et al.*, 2013) la cual se ha aislado de ecosistemas como bosques tropicales, zonas desérticas, sabanas, archipiélagos, frutales, suelos agrícolas, arena y cuevana en los cinco continentes (Maduell *et al.*, 2002; Ruiz *et al.*, 2004; Portela-Dussan *et al.*, 2013). 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 e incluso de telarañas (Soberón y Bravo, 2007).

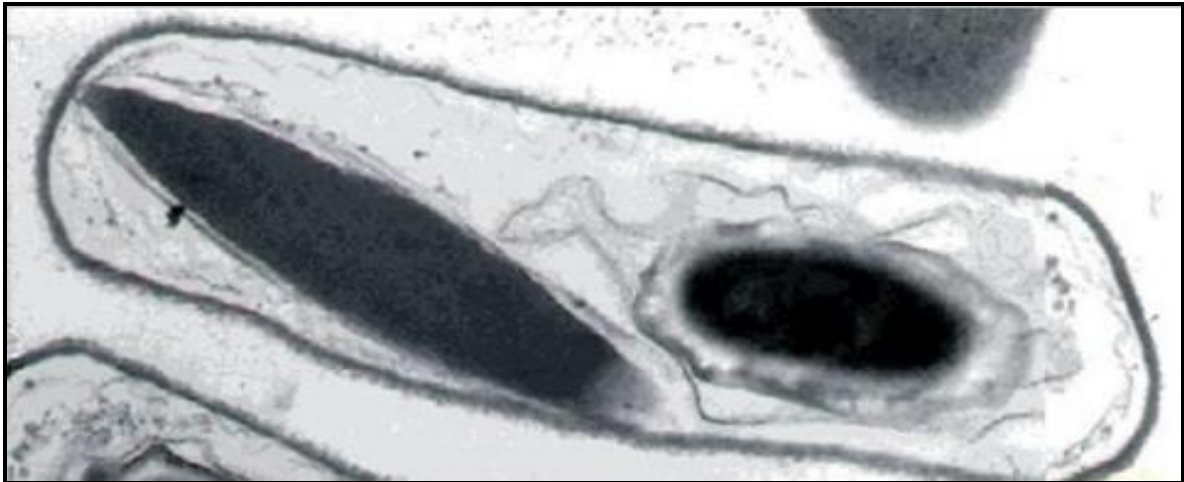


Figura 3. Microfotografía de *Bacillus thuringiensis* en microscopio electrónico de transmisión. Se muestra el cristal proteínico romboide compuesto de toxinas Cry y una espora en proceso (Soberón y Bravo, 2007).

2.4.2. Ciclo de vida

El ciclo de vida de Bt presenta dos fases principales: crecimiento vegetativo, donde las bacterias se duplican por bipartición, y esporulación, un programa de diferenciación de bacteria a espora (Soberón y Bravo, 2007).

Específicamente George y Crickmore (2012) señalan que *B. thuringiensis* divide su ciclo de vida en cuatro fases. En la primera, llamada fase vegetativa, ocurre crecimiento y división cuando las condiciones ambientales son favorables. La fase II es de transición a la esporulación; la fase III es de esporulación propiamente dicha y por último la fase IV implica la maduración de las esporas y la lisis celular. Durante la fase vegetativa. Bt produce y secreta las proteínas Vip, que expresan actividad insecticida contra lepidópteros, coleópteros y algunas especies de insectos picadores-chupadores (Palma *et al.*, 2012; Trumper, 2014). Por otro lado cuando *B. thuringiensis* ingresa a su fase de esporulación, la bacteria produce esporas y grandes inclusiones cristalinas cuyo principal componente son las proteínas Cry dichas proteínas comprenden una amplia familia de toxinas con diversas especificidades, la mayoría son tóxicas para lepidópteros, dípteros y

coleópteros, pero algunas han evidenciado efectos sobre himenópteros y nematodos (Pigott *et al.*, 2007; Trumper, 2014).

2.4.3. Proteínas Vip

Las proteínas vegetativas (Vip) son proteínas producidas por *B. thuringiensis* (Estruch *et al.*, 1996; Palma *et al.*, 2012) que como las proteínas Cry muestran actividad insecticida contra una amplia variedad de lepidópteros, pero que no comparten la homología de secuencia (Palma *et al.*, 2012).

De este tipo de proteínas se han identificado aproximadamente 82 tipos de genes con propiedades insecticidas. Estos genes se pueden clasificar en tres grupos, ocho subgrupos y 82 subclases según la similitud de secuencia de aminoácidos. Estos grupos o familias están determinados por Vip1, Vip2 y Vip3. Las proteínas Vip1 y Vip2 actúan en forma combinada como toxinas binarias que tienen especificidad en larvas de coleópteros, mientras que la clase Vip3 muestra actividad de amplio espectro sobre larvas de lepidópteros, y ha sido dividida en dos subfamilias, Vip3A y Vip3B (Yu *et al.*, 2011; Trumper, 2014). Las proteínas Vip3A se dirigen a receptores en el intestino medio del insecto blanco diferentes a los utilizados por las proteínas Cry, lo que hace de este tipo de proteínas una buena alternativa o complemento de las proteínas Cry en estrategias de manejo de resistencia de plagas (Palma *et al.*, 2012; Ruíz *et al.*, 2014; Trumper, 2014).

2.4.4. Proteínas Cry y Cyt

A *B. thuringiensis* se le caracteriza por producir un cuerpo paraesporal conocido como cristal, esta inclusión puede ocupar hasta el 30% de la célula y es producida durante la fase de esporulación, la cual es de naturaleza proteínica y tiene propiedades insecticidas. Dicho cristal proteínico está constituido por proteínas denominadas δ -endotoxinas también conocidas como proteínas Cry o Cyt (Soberón y Bravo, 2007; Portela-Dussán *et al.*, 2013).

Las proteínas Cry son el principal factor de virulencia de Bt las cuales poseen pesos que oscilan entre ~60 y 140 kDa, y que al estar en presencia de un ambiente reductor modifican su estructura volviéndose altamente tóxicas (Portela-Dussán *et al.*, 2013). Se han encontrado δ -endotoxinas activas contra insectos lepidópteros (mariposas), coleópteros (escarabajos), dípteros (mosquitos), himenópteros (hormigas), ácaros y también contra otros invertebrados como nematodos, gusanos planos y protozoarios (Soberón y Bravo, 2007; Pigott *et al.*, 2007; Trumper, 2014).

2.4.5. Clasificación de las δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*

Existen dos tipos de δ -endotoxinas: las proteínas Cry y las proteínas Cyt. Se han clonado y secuenciado más de 200 diferentes genes Cry y 16 diferentes genes Cyt. Las toxinas Cry adquirieron el Cry mnemónico por el hecho de que se encuentran en el cristal, mientras que Cyt adquirieron el Cyt mnemotécnico debido a su actividad citolítica *in vitro* (Crickmore *et al.*, 1998). La nomenclatura de la δ -endotoxina está basada exclusivamente en la similitud de la secuencia primaria. La definición de proteínas Cry es cualquier proteína paraesporal de Bt que muestre un efecto tóxico hacia algún organismo, verificable por medio de bioensayos o cualquier proteína que muestre similitud con las proteínas Cry. Actualmente se han encontrado toxinas Cry en otras especies de bacterias como *Clostridium bifermentans* (Weinberg y Séguin) Bergey (Clostridiaceae) (clasificadas como Cry16A y Cry17A) con actividad hacia mosquitos. Las proteínas Cyt denotan a las proteínas paraesporales de Bt que muestren actividad hemolítica o tengan similitud a la secuencia de las toxinas Cyt. A la fecha, las proteínas Cry están distribuidas en 50 grupos y varios subgrupos, y las proteínas Cyt en dos grandes grupos y varios subgrupos. Cada grupo muestra una especificidad muy grande hacia ciertos tipos de insectos (Soberón y Bravo, 2007, George y Clickmore, 2012).

2.5 Modo de acción de las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*

El modo de acción inicia con la ingestión de los cristales de *B. thuringiensis* por la larva, esta proteína cristalina es altamente insoluble en condiciones neutras y se solubiliza en el intestino medio del insecto (mesenterón) debido a su pH alcalino, tras cual son liberadas las proteínas cristalinas en forma de pro-toxinas. La pro-toxina soluble es activada mediante digestión proteolítica por proteasas presentes en el intestino de insectos susceptibles. Este procesamiento proteolítico libera fragmentos tóxicos de 55 a 65 kDa que se unen a receptores localizados en las microvellosidades de las células del epitelio intestinal (Soberón y Bravo, 2007). Posteriormente, la toxina o parte de ella se inserta en la membrana celular (formando poros iónicos, llevando eventualmente a la lisis celular) teniendo como soporte principal a las cadherinas; estas cumplen un papel muy importante ya que interactuara con la toxina induciendo cambios conformacionales en la estructura de la toxina. Se induce un corte que elimina la hélice α -1, este procesamiento expone residuos hidrofóbicos del dominio I formando un oligómero de cuatro subunidades (Gómez *et al.*, 2002; Ibarra *et al.*, 2006) este proceso lleva el nombre de oligomerización. El oligómero incrementa 200 veces su afinidad hacia el segundo receptor, la aminopetidasa N, la cual se encuentra y/o se moviliza hacia microdominios de membrana (rafts) donde la composición lipídica de la membrana es favorable para la inserción del oligómero y formación del poro (Bravo *et al.*, 2004; Ibarra *et al.*, 2006) (Fig. 4). Dicho poro es poco selectivo permitiendo el paso de diversos cationes monovalentes hacia el interior de las células columnares provocando la despolarización de la membrana plasmática y la entrada de agua hasta la lisis celular. El tejido intestinal resulta gravemente dañado, lo que impide la asimilación y retención de compuestos vitales para la larva y lleva a la muerte del insecto. La muerte puede acelerarse al germinar las esporas y proliferar las células vegetativas en el hemocele del insecto (Schnepf *et al.*, 1998; De Maagd *et al.*, 2001; Sauka y Benintende, 2008). Broderick *et al.* (2006) descartaron estas posibilidades y demostraron que la mortalidad inducida por *B. thuringiensis* dependería en esencia de ciertas bacterias entéricas que son parte de la

microbiota normal del intestino del insecto susceptible, ya que sólo *B. thuringiensis* no sería suficiente. Estas bacterias serían responsables de causar la septicemia en el insecto luego que Bt les permite alcanzar el hemocele tras dañar el epitelio intestinal (Sauka y Benintende, 2008).

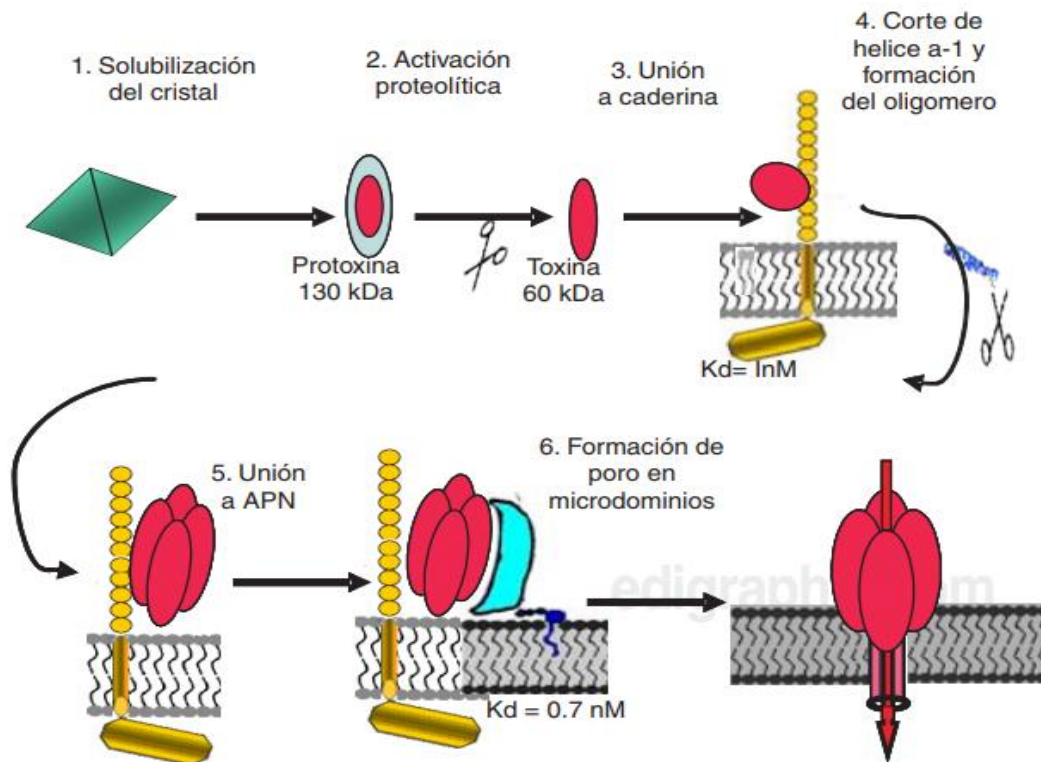


Figura 4. Mecanismo de acción de las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* (Ibarra *et al.*, 2006).

2.6. Estructura de las toxinas Cry

Las proteínas Cry se han estudiado intensamente por su elevada potencia insecticida contra varias plagas del Orden Coleoptera, Lepidoptera, Diptera y una con actividad dual. Se han estudiado las estructuras tridimensionales de varias toxinas Cry y pesar de que la identidad entre estas toxinas es baja (en algunos casos menores al 25%), muestra una estructura similar compuesta por tres dominios estructurales que participan de manera diferente durante la ruta toxica (Fig. 5) (Soberón y Bravo, 2007; Valencia, 2013). El dominio I está constituido por

siete hélices α antiparalelas y anfipáticas, este dominio es el que forma el poro iónico. El dominio II está formado por tres láminas plegadas β y por tres asas, este dominio juega un papel fundamental en la especificidad de la toxina donde las asas interactúan con el receptor localizado en las microvellosidades de las células epiteliales del intestino medio. El dominio III está formado por dos láminas plegadas β antiparalelas formando un sándwich. También involucrado en la interacción con receptores (Soberón y Bravo, 2007).

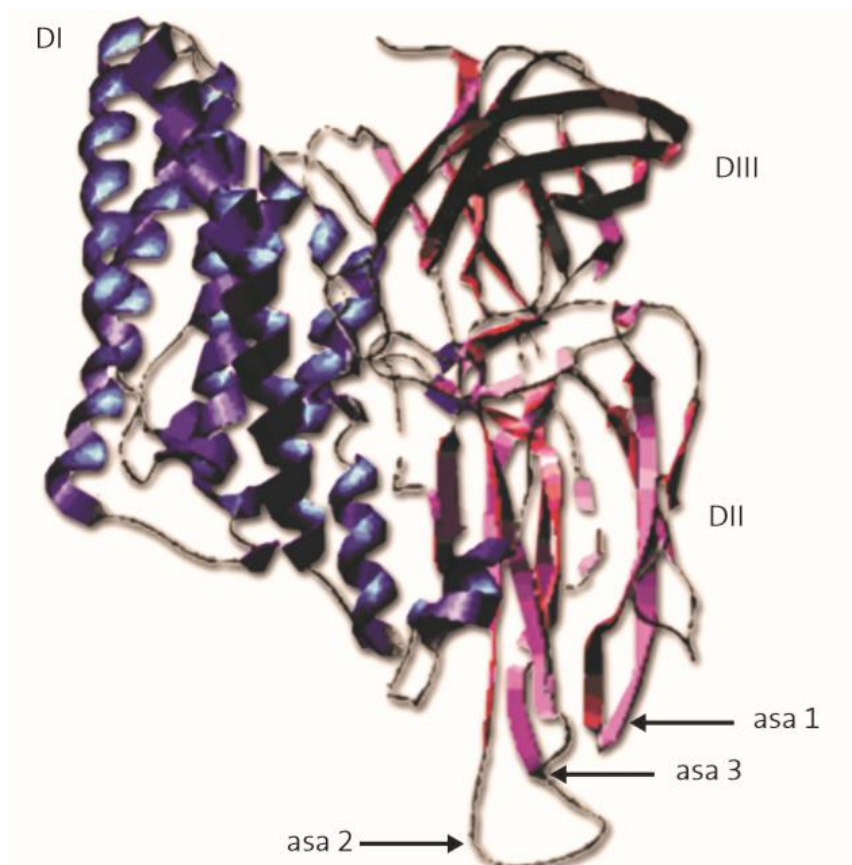


Figura 5. Estructura tridimensional de una toxina Cry (Soberón y Bravo, 2007).

2.7. Resistencia a las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*

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 (Soberón y

Bravo, 2007) y su falta de toxicidad a organismos no objetivos (Jurat-Fuentes, 2015). Sin embargo, a pesar de las bondades y la eficacia de esta proteína insecticida, también presenta algunas limitaciones. La amenaza más importante para la sostenibilidad de la tecnología Bt es el riesgo de desarrollo de la resistencia de las plagas objetivo por el incremento en el uso de dicha bacteria en forma de aspersiones de cristales y sobre todo en plantas transgénicas que expresen constitutivamente una o varias toxinas (Soberón y Bravo, 2007; Jurat-Fuentes, 2015). La exposición de un insecto a una toxina, conocida como presión selectiva, induce la potencial generación de resistencia en la plaga (Gutiérrez *et al.*, 2015).

2.7.1. La resistencia de plagas

A lo largo de la historia mundial de la agricultura, los insectos plagas han demostrado su capacidad para vencer los obstáculos que les impone casi todo tipo de táctica de manejo, tarde o temprano pueden desarrollar a través de un proceso micro-evolutivo, la capacidad para tolerar las restricciones biológicas de todo tipo de manejo que les imponga una presión selectiva elevada y uniforme por periodos de tiempo. Un clásico ejemplo de esto es la generación de resistencia a insecticidas (Trumper, 2014).

Distintos autores han definido la resistencia como el desarrollo de la habilidad en una raza de insectos para tolerar dosis de tóxicos que han probado para ser letales a la mayoría de los individuos en una población normal de la misma especie (Brown y Pal, 1971). Otra definición la menciona el IRAC (Comité de Acción contra la Resistencia a los Insecticidas) que indica a la resistencia como “un cambio hereditario en la sensibilidad de una población de plagas que se refleja en la falla repetida de un producto para lograr el nivel de control esperado cuando se usa de acuerdo con la recomendación de la etiqueta para esa especie de plaga” (Tabashnik *et al.*, 2013).

En este caso y por el contexto de la investigación, la resistencia estará definida como el carácter heredable consistente en la menor susceptibilidad (fenotipo) de un insecto (individuo) a la toxina Bt en relación a individuos de la misma población (Crava *et al.*, 2013; Trumper, 2014).

2.7.2. Mecanismos involucrados en la resistencia a toxinas Cry

Se han propuesto varios modos de resistencia de plagas de insectos a las toxinas Bt, incluida la reducción de la unión de toxinas a los receptores en el intestino medio de los insectos, la solubilización reducida de las protoxinas, la alteración del procesamiento proteolítico de las protoxinas y la degradación de la toxina y la precipitación por proteasas (Tabashnik *et al.*, 2007 citado por George y Clickmore, 2012).

Lo que es seguro es que cualquier alteración de los pasos del modo de acción de las proteínas Cry de *B. thuringiensis* puede llevar a un caso de resistencia (Banerjee *et al.*, 2017). El mecanismo de resistencia más comúnmente descrito para las proteínas Cry en experimentos de selección de laboratorio es la alteración de la unión de la toxina a los receptores del intestino medio (Ferré y Van Rie, 2002). Si bien varias proteínas y glicolípidos se han descrito como receptores de toxina Cry en insectos, la resistencia se ha asociado a mutaciones en los genes de cadherina y sitio de unión a ATP, así como a la expresión reducida de genes aminopeptidasa (APN) o fosfatasa alcalina (ALP) (Adang *et al.*, 2014). Bulla y Candas (2001) mencionan que en lepidópteros aminopeptidasa y cadherina son los principales candidatos para sitios de unión de las toxinas Cry1A, lo que conlleva al siguiente ejemplo donde en lepidópteros, la resistencia a Cry1Ac está asociada a una mutación de un gen que codifica una proteína de Cadherina (Tay *et al.*, 2015). Por otro lado la fosfatasa alcalina (ALP) del intestino medio se ha informado como receptor para las toxinas Cry1Ab en especies de lepidópteros (Arenas *et al.*, 2010; Jakka *et al.*, 2015) pero más importante aún, la regulación a la baja expresión de este gen (ALP) así como su liberación incrementada desde el

epitelio del intestino medio hacia fluidos intestinales (Caccia *et al.*, 2012) se ha propuesto como mecanismo de resistencia contra Cry1Ac en cepas de insectos lepidópteros seleccionados en laboratorio (Jakka *et al.*, 2015).

Ciertamente la evolución de la resistencia se trata de una disminución hereditaria en la susceptibilidad de una población a una toxina (Tabashnik *et al.*, 2014). Hasta ahora, la resistencia es debida a la reducción de la unión de la toxina Cry y se ha relacionado con alelos recesivos en genes autosómicos (Jakka *et al.*, 2015).

Por otro lado, entre la diversidad de toxinas Cry existentes, hay toxinas que comparten el mismo sitio de unión en la membrana del intestino medio del insecto, lo que conlleva a que el insecto resistente a una toxina en particular muestre resistencia a otras toxinas sin haber estado expuesto anteriormente, un término conocido como “resistencia cruzada” (Pereira *et al.*, 2008; Sayyed *et al.*, 2008; Gong *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2010; George y Clickmore, 2012). Cabe mencionar que el nivel de resistencia cruzada o el que se dé o no, estará determinado por los sitios de unión que compartan entre toxinas y la importancia del sitio donde es llevado el proceso de toxicidad, en un caso para evaluar los niveles de resistencia cruzada, se obtuvo alta resistencia cruzada en Cry1Fa y Cry1A debido a que comparten al menos un sitio de unión importante involucrado en la toxicidad, en comparación con Cry1Ab y CryAc donde Cry1Fa comparten un sitio adicional que es menos importante para la toxicidad (Monnerat *et al.*, 2015).

El “modo 1” es el tipo de resistencia más común en lepidópteros caracterizado por una herencia recesiva, una unión reducida por al menos una toxina Cry1A y una resistencia cruzada (insignificante) a Cry1C (Tabashnik *et al.*, 1998; Heckel *et al.*, 2007; George y Clickmore, 2012). La explicación más simple descrito por Morin *et al.* (2003) para la resistencia del modo 1, es que las modificaciones de los sitios objetivos reducen o eliminan la unión de las toxinas Cry1A en individuos homocigotos resistentes, pero tienen poco efecto sobre la susceptibilidad de los individuos heterocigotos a las toxinas Cry1A. Dichas modificaciones también tendrían poco efecto sobre la susceptibilidad de los homocigotos resistentes a

toxinas como Cry1C que atacan sitios objetivos independientes de los receptores Cry1A.

Se demostró que el gusano rosado (*Pectinophora gossypiella*) alberga tres alelos mutantes de un gen que codifica para cadherina relacionado con la resistencia a las toxinas Cry1Ac, cada uno de dichos alelos tiene una delección donde puede eliminar al menos ocho aminoácidos de la supuesta región de unión de toxinas. Se confirma que la base principal de resistencia del modo 1 está estrechamente relacionada a mutaciones en los genes de cadherina (Morin *et al.*, 2003).

2.8. Casos de resistencia

La palomilla dorso de diamante *P. xylostella* L. resistente a formulaciones producidas por *B. thuringiensis* subsp. *Kurstaki*, mostró resistencia cruzada a formulaciones de Bt var. *Aizawai* que contiene las toxinas Cry1C y Cry1A (Tabashnik *et al.*, 1993).

En Sudáfrica el barrenador del tallo *B. fusca* Fuller, se identificó resistente por el daño ocasionado en maíz transgénico Bt (Mon810), donde al parecer puede sobrevivir en presencia de la toxina Bt pero no sin algún daño perjudicial sobre la tasa de crecimiento de las larvas (Van Rensburg, 2007).

Lepidópteros de *Spodoptera* spp., pueden sobrevivir alimentándose de algodón Bt que expresa la toxina Cry1Ac, aunque expresan efectos perjudiciales (tamaño y supervivencia reducidos, y un desarrollo larvario más largo) (Adamczyk *et al.*, 1998; Torres y Ruberson, 2007).

Tabashnik *et al.* (2008) realizaron un ensayo con poblaciones de *H. zea* muestreados durante 2003-2004 y 2005-2006 en algodón Bt (Cry1Ac), los resultados mostraron mayor resistencia de *H. zea* a Cry1Ac en Arkansas y Mississippi que en Carolina del Norte, debido al uso de refugios en este último.

En poblaciones de *S. frugiperda* en Puerto Rico, se mostró que la resistencia a Cry1F es altamente recesiva. No hubo indicación de niveles fuertes de resistencia cruzada (o resistencia múltiple) a Cry1Ab y Cry1Ac (Storer *et al.*, 2010).

En Amreli, India, un estudio realizado de recolectas hechas en 2008-2010 en una población de *P. gossypiella* reporta resistencia a Cry1Ac, sin embargo; para Bollgard II que contiene principalmente Cry2Ab2 no se presentó resistencia cruzada (Dhurua y Gujar, 2011).

Se registra resistencia en Brasil en poblaciones de *S. frugiperda* a maíz Bt (TC1507) que expresa la toxina Cry1F. Dicha población mostro una herencia autosómica recesiva para los alelos implicados en la resistencia a la proteína Cry1F. Además, las poblaciones que mostraron resistencia en diferentes estados de Brasil comparten el mismo locus resistente (Farías *et al.*, 2014).

Se presentan pruebas de resistencia de *S. frugiperda* al maíz CryF1 (TC 3507) en la región sureste de EE.UU. El gusano cogollero *S. frugiperda* mostró también un bajo nivel de resistencia cruzada a Cry1A pero no a Cry2Ab2 o Vip3A (Huang *et al.*, 2014).

De una colecta de insectos blanco en 2013 en plantas de maíz Bt Cry1Fa se estableció una población de *S. frugiperda* en Brasil donde se detectó niveles altos de resistencia a Cry1Fa, también mostró alta resistencia cruzada a Cry1Aa y baja resistencia cruzada a toxinas Cry1Ab y Cry1Ac (Monnerat *et al.*, 2015).

Resultados de un estudio en *H. armigera* indican resistencia a la toxina Cry2Ab que expresa el cultivo de algodón en China. La resistencia a Cry2Ab produjo fuerte resistencia cruzada a Cry2Aa y una resistencia cruzada más débil pero significativa a las toxinas Cry1A (Liu *et al.*, 2016).

Fue identificada una mutación estrechamente vinculada a la resistencia de campo al evento TC1507 que produce la toxina Cry1Fa (Herculex I®) en *S. frugiperda* en poblaciones de Puerto Rico (Banerjee *et al.*, 2017).

2.9. Alternativas para demorar o prevenir el desarrollo de resistencia

Entre las herramientas de control disponibles para diseñar estrategias de manejo de plagas, los cultivos Bt son uno de los que ejercen mayor presión de selección y, por lo tanto, se encuentra entre los insumos que mayor posibilidad tienen de generar resistencia (Trumper, 2014).

Se considera que la evolución de resistencia a cultivos Bt no se puede impedir, sino tan solo demorar. La estrategia mundialmente aceptada para disminuir la tasa de evolución de resistencia de plagas a cultivos Bt se conoce como Alta Dosis-Refugio (AD-R) (Andow, 2008; Huang *et al.*, 2011; Siegfried *et al.*, 2014).

Para mitigar la evolución de resistencia, la estrategia (AD-R) requiere:

- a) una concentración de toxina en la planta suficientemente elevada para provocar que los alelos resistentes sean funcionalmente recesivos.
- b) baja frecuencia inicial del alelo resistente.
- c) refugios con plantas no Bt.

Alta dosis

Se considera que el evento Bt es de alta dosis cuando el cultivo expresa una concentración de toxina que elimine el 99.99% de la fracción homocigota de las plagas objetivo respecto al carácter de susceptibilidad de la toxina, y a la vez provoca la mortalidad de un muy elevado porcentaje ($\geq 95\%$) (Huang *et al.*, 2011)

de la fracción heterocigota para el mismo carácter. El objetivo es que la planta, una vez transformada con el gen de la toxina, exprese suficiente cantidad de ésta como para aniquilar a las plagas susceptibles que las consumen (Soberón y Bravo, 2007).

Existe un caso donde hubo resistencia en algodón Bt debido a que la concentración Cry1Ac no es lo suficientemente alta como para matar a las crías híbridas por los apareamientos entre *H. zea* susceptible y resistente, por lo tanto, el llamado requisito de “alta dosis” no se cumple (Tabashnik, 2008).

Baja frecuencia inicial de alelos resistentes

Antes de introducir un cultivo Bt se requiere baja población resistente (con genotipo resistente). Al cumplirse este requisito, la mayor parte de la descendencia será heterocigota, y en consecuencia frente a un evento que cumpla con el requisito “alta dosis” un gran número elevado de estos será eliminado (Huang *et al.*, 2011).

Refugios

La estrategia de refugio ha sido el enfoque primario utilizado en todo el mundo para retrasar la resistencia de plagas a los cultivos Bt (Tabashnik *et al.*, 2013). La intención de disminuir la probabilidad de generación heterocigotas en la F1, es preciso minimizar la probabilidad de cruzamiento entre heterocigotas. Para lograrlo surge la necesidad de ofrecer una “fuente” de generación de individuos homocigotos susceptibles. Esto consiste en la implementación espacial de cultivo convencional y/o hospedadores alternativos sin el gen Bt, lo que disminuirá la probabilidad de apareamiento de adultos portadores del alelo resistente. De este modo la descendencia mayoritariamente heterocigota (portadora de una sola copia del gen resistente) es eliminada por la toxina Bt (Andow, 2008).

La teoría subyace a la estrategia refugio para retrasar la resistencia a los insectos es que la mayoría de las plagas raras resistentes que sobreviven en los cultivos Bt se aparearán con abundantes plagas susceptibles provenientes de los refugios de plantas huésped sin toxinas Bt. Si la herencia de la resistencia es recesiva, los cultivos Bt matarán a la descendencia híbrida producida por tales apareamientos, lo que ralentizará notablemente la evolución de la resistencia. Los resultados resumidos aquí sugieren que la estrategia de refugio puede retrasar la resistencia a los cultivos Bt, especialmente cuando la resistencia es recesiva y los refugios son abundantes (Tabashnik, 2008). Países como Estados Unidos, exige el uso de refugios en los campos transgénicos en un área entre el 5-20% del área total cultivada, dependiendo de la especie (Cerde y Wright, 2004; Chaparro, 2011).

En un estudio, la resistencia de *H. zea* a Cry1Ac desarrollada en el campo ocurrió más rápido en Arkansas y Mississippi que en Carolina del Norte, debido a que en Arkansas y Mississippi se destinó el 39% a refugios y en Carolina del Norte el refugio fue del 82% del área total sembrada (Tabashnik, 2008).

Si bien, un manejo responsable de esta tecnología donde se incluya el uso de refugios para insectos, los cuales no estén sujetos a la presión y que contribuya a diluir sus genes no expuestos con la toxina con las poblaciones en contacto a la presión de selección, de esta manera sus beneficios serán aprovechados al máximo (Gutiérrez *et al.*, 2015).

Eventos piramidales

Para reforzar la estrategia AD-R, se propone la acumulación de dos o más toxinas en una planta (genes “piramidales”), desde la perspectiva del manejo de la resistencia de insectos plaga a cultivos Bt, cada una confiriendo alta toxicidad con diferentes sitios de acción para una misma plaga blanco, a fin de evitar la resistencia cruzada a las distintas toxinas (Ives *et al.*, 2011; Trumper, 2014). El supuesto subyacente de esta táctica es que los diferentes modos de acción implican receptores diferentes en la membrana celular del epitelio intestinal de las

larvas (Ferré *et al.*, 2008) y que los genes de resistencia segregan independientemente.

Además de las toxinas Cry, *B. thuringiensis* produce toxinas Cyt. En un estudio se demostró la no aparición de insectos resistentes debido a la presencia de la toxina Cyt1Aa, de echo Cyt1Aa sinergiza la actividad insecticida de las toxinas Cry, es decir, la actividad tóxica de la mezcla de toxinas Cry y Cyt es mucho mayor que la suma de sus actividades individuales. Ambas toxinas son formadoras de poro en la membrana de las células apicales del intestino medio, sin embargo, tienen mecanismos diferentes para actuar; se mostró que la toxina Cyt1Aa se inserta a la membrana y funciona como receptor proteínico de las toxinas Cry (Soberón y Bravo, 2007).

Durante su fase vegetativa Bt secreta proteínas Vip que como Cry y Cyt tiene propiedades insecticidas, lo que hace interesantes estas proteínas son los receptores en la membrana donde actúa, diferentes a los de toxinas Cry. Esto las convierte en una buena opción para complementar a las proteínas Cry en estrategias de manejo de resistencia (Palma *et al.*, 2012; Ruiz *et al.*, 2014; Trumper, 2014).

La estrategia de acumular toxinas Bt ofrece sus mejores perspectivas si se la implementa en forma proactiva, pero si se la aplica cuando la resistencia a una de las toxinas ya ha surgido, parece perder sus mejores beneficios. El uso de variedades con genes piramidados no evita aplicar la estrategia AD-R. Sin embargo, correctamente empleada, esta herramienta permitir flexibilizar ciertos aspectos cuantitativos de la estrategia AD-R, por ejemplo, la reducción del porcentaje de los lotes destinada a la siembra de refugios (Trumper, 2014).

2.10. Detección de la resistencia

El uso de refugios para retardar la aparición de resistencia en plagas parece ser una buena alternativa, sin embargo, se requiere monitorear la frecuencia de los alelos de resistencia en las poblaciones de campo (Gould *et al.*, 2007). El problema radica en la dificultad en el monitoreo, especialmente cuando se trata de una resistencia recesiva y rara.

2.10.1. Bioensayos

Los bioensayos han sido utilizados para estimar la frecuencia de los alelos de resistencia (Gould *et al.*, 1997). Los bioensayos solo logran detectar individuos homocigotos resistentes. Una desventaja es su incapacidad para distinguir entre los heterocigotos y homocigotos susceptibles (Morin *et al.*, 2003).

Para realizar bioensayos se debe contar con dos poblaciones, una que ha estado expuesta a cultivo Bt (línea de campo) y otra que nunca haya estado en contacto con este tipo de cultivos (línea de laboratorio/susceptible). Por lo regular las larvas de campo son criadas individualmente en vasos de plástico de 30 mL que contiene una dieta artificial, para después los adultos que emerjan sean colocados en contenedores y se crucen (Gould *et al.*, 1995) para obtener la primera generación (F1) con la que se trabajara.

Los bioensayos consisten en colocar una larva del segundo instar de las dos poblaciones (línea de campo y laboratorio) en un vaso de plástico que contiene una dieta artificial con determinada dosis de toxina Cry (Monnerat *et al.*, 2015). Las larvas de laboratorio son utilizadas como punto de referencia, también llamado "control" o testigo, a la hora de tomar resultados. Se establece cierto tiempo para las lecturas de mortalidad, Monnerat *et al.* (2015) realizó lecturas de esta variable la primera a las 48 horas después del inicio de la prueba, la segunda y última lectura fue tomada al séptimo día.

Lo que se tendrá como resultado es que las larvas de la línea de laboratorio morirán a pequeñas dosis de la toxina Cry en comparación con las larvas recolectadas en campos con cultivo Bt, si es que son homocigotas resistentes, sobrevivirían a estas dietas.

Sin embargo, se han hecho modificaciones e implementado nuevas técnicas en los bioensayos, que depende mucho del tipo de investigación y de lo que se esté buscando.

Morin *et al.* (2003) por ejemplo probó dos tipos de bioensayos, uno de supervivencia y otro de crecimiento. El de supervivencia donde las larvas fueron alimentadas con 10 μL de Cry1Ac por mL de dieta durante 21 días, la supervivencia ajustada se calculó como la supervivencia de larvas de campo dividida por la supervivencia de larvas de laboratorio por 100%. El bioensayo de crecimiento consistió en alimentar las larvas con un μL de Cry1Ac por mL de dieta durante 11 días, estas larvas se pesaron. El bioensayo de supervivencia estimo que tan alto es el nivel de resistencia de la población de larvas de campo, mientras que el de crecimiento fue utilizado por una parte para determinar la diferencia de crecimiento (en peso) entre heterocigotos y homocigotos resistentes al alimentarse con la toxina.

Se han realizado también bioensayos con hoja de maíz Bt y no Bt. Estas hojas son colocadas en cajas de Petri con papel húmedo para evitar la deshidratación temprana de la hoja. En cada caja Petri es colocada una larva del segundo instar de las poblaciones Bt y no Bt y la mortalidad fue medida al séptimo día (Monnerat *et al.*, 2015).

2.10.2. Detección molecular

Debido a que la herencia de resistencia a las toxinas Bt en cultivos transgénicos es típicamente recesiva, la detección basada en ADN de alelos de resistencia en heterocigotos es mucho más eficiente que la detección de homocigotos resistentes con bioensayos (Morin *et al.*, 2003).

Tabashnik *et al.* (1997) afirma que la detección mediante ADN de alelos heterocigotos resistentes podría aumentar la eficiencia 1 000 veces en comparación con los bioensayos.

Como se mencionó anteriormente, es muy difícil estimar la frecuencia de alelos de resistencia recesivos por medio de bioensayos donde solo se logra detectar homocigotos resistentes, si la fracción de estos últimos es lo suficientemente alta como para ser detectada por bioensayos, quiere decir que la estrategia refugio podría dejar de ser eficaz para controlar la resistencia.

Se han propuesto diagnósticos de ADN con la capacidad de detectar heterocigotos como una metodología para detectar alelos de resistencia a bajas frecuencias (Gahan *et al.*, 2007).

Ciertamente los diagnósticos a base de ADN tienen varias ventajas en comparación con los bioensayos (Gahan *et al.*, 2007):

- La detección puede realizarse en cualquier etapa del ciclo del insecto.
- No se requiere material vivo, siempre y cuando se haya preservado ADN de calidad suficiente.
- Los alelos de resistencia se pueden detectar en heterocigotos.

Hasta hace poco, la detección basada en el ADN no podía aplicarse a la resistencia Bt porque se desconocía la base genética de la resistencia (Gahan *et*

al., 2007). Sin embargo después de la realización de pruebas se ha identificado el gen de cadherina como un objetivo principal para la detección basada en ADN de la resistencia a los cultivos Bt en plagas de lepidópteros. Es una gran oportunidad ahora que se conoce la base principal de la resistencia, enfocarse en estos genes podría acelerar el progreso en el monitoreo y manejo de resistencia (Morin *et al.*, 2003).

2.11. Gusano cogollero *Spodoptera frugiperda*

2.11.1. Generalidades

El gusano cogollero del maíz *S. frugiperda* es una especie de lepidóptero de la familia Noctuidae (Capinera, 1999). Muy conocida en el ámbito agrícola por ser una plaga de insectos que puede alimentarse de más de 80 especies de cultivos y que, no controlarse puede causar reducciones significativas en el rendimiento de importantes cereales como: maíz, arroz y sorgo, y también a leguminosas, algunas hortalizas y algodón. Es una especie polifitófaga, nativa de las regiones tropicales de las Américas, con amplia distribución geográfica; se ha establecido en muchos países de África desde que se detectó por primera vez en 2016 (FAO, 2017).

2.11.2. Taxonomía

Clasificación taxonómica por Triplehorn y Johnson (2005)

Reino: Animalia

Phylum: Arthropoda

Clase: Hexapoda

División: Pterigota

Orden: Lepidoptera

Suborden: Frenatae

Superfamilia: Noctuoidea

Familia: Noctuidae

Subfamilia: Amphipyirinae

Tribu: Prodeniini

Género: *Spodoptera*

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

2.11.3. Descripción y ciclo de vida

El gusano cogollero presenta cuatro fases en su ciclo de vida.

Huevo. Son puestos en grupos o masas, protegidos por una telilla transparente. Son de forma globosa, estriados radialmente, de un color rosa pálido que se torna gris a medida que se aproxima la eclosión a los dos o tres días de la oviposición. El huevo mide unos 0,4 mm de diámetro y 0,3 mm de altura (Capinera, 1999). Son depositados por las hembras durante las primeras horas de la noche, tanto en el haz como en el envés de las hojas (Fig. 6) (Ángulo, 2000).



Figura 6. Huevos del gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda*. Fotografía de James Castner, Universidad de Florida.

Larva. Las larvas al emerger se alimentan del corion, más tardes se trasladan a diferentes partes de la planta o a las plantas vecinas, evitando así la competencia por alimento y el canibalismo (Ángulo, 2000). Por lo general el gusano cogollero tiene seis estadios. Los anchos de la capsula de la cabeza son de aproximadamente 0,35, 0,45, 0,75, 1,3, 2,0 y 2,6 mm, respectivamente, para los estadios 1-6. En cuanto a longitudes alcanzan aproximadamente 1.7, 3.5, 6.4, 10.0, 17.2 y 34.2 mm, respectivamente, durante estos estadios. Las larvas jóvenes son verdosas con una cabeza negra (Fig. 7), la cabeza se vuelve naranja en el segundo estadio. En el segundo, pero particularmente en el tercer estadio, la superficie dorsal del cuerpo se vuelve marrón, y comienzan a formarse líneas blancas laterales. En los estadios cuartos a sexto, la cabeza es de color marrón rojizo, moteada de blanco, y el cuerpo pardo tiene líneas subdorsales y laterales blancas. Las manchas elevadas se producen dorsalmente en el cuerpo; por lo general son de color oscuro, y llevan espinas. La cabeza de la larva presenta una sutura epicraneal bien marcada y en forma de Y invertida de color blanco en la parte frontal de la cabeza (Fig. 8). Las larvas tienden a ocultarse durante las horas más brillantes del día. La duración de la etapa larvaria tiende a ser de aproximadamente 14 días durante el verano y 30 días durante el clima frío. Se determinó que el tiempo medio de desarrollo es de 3.3, 1.7, 1.5, 1.5, 2.0 y 3.7 días para los estadios 1 a 6, respectivamente, cuando las larvas se desarrollan a 25 °C (Pitre y Hogg, 1983). A partir del tercer estadio se introducen en el cogollo haciendo perforaciones que se aprecian cuando la hoja se abre o desenvuelve (Ángulo, 2000).



Figura 7. Larva de *Spodoptera frugiperda* en el primer estadio. Fotografía de Lyle J. Buss, Universidad de Florida.



Figura 8. Larva madura de *Spodoptera frugiperda*, donde se observa la “Y” invertida en la parte frontal de la cabeza. Fotografía de Lyle J. Buss , Universidad de Florida.

Pupa. La pupación normalmente tiene lugar en el suelo, a unos 2 a 8 cm de profundidad. La larva construye un capullo suelto, de forma ovalada y de 20 a 30

mm de longitud, al unir partículas de tierra con seda. Las larvas pueden juntar restos de hojas y otros materiales para formar un capullo si el suelo es demasiado duro (Capinera, 1999). La pupa es de color marrón rojizo y mide de 14 a 18 mm de longitud y unos 4,5 mm de ancho, con su extremo abdominal terminando en 2 espinas o ganchos en forma de “U” invertida (Fig. 9). La duración de esta fase es de 8 a 10 días (Ángulo, 2000).



Figura 9. Pupa de *Spodoptera frugiperda*.

Adulto. Las palomillas tienen una envergadura de 32 a 40 mm. En la palomilla macho, el ala anterior generalmente está sombreada en gris y marrón, con manchas blancas triangulares en la punta y cerca del centro del ala (Fig. 10). Las alas anteriores de las hembras están marcadas menos claramente, desde un marrón grisáceo uniforme hasta un moteado fino de gris y marrón. El alerón trasero es blanco plateado iridiscente con un borde oscuro y estrecho en ambos sexos (Fig. 11). Los adultos son nocturnos y son más activos durante las noches cálidas y húmedas (Capinera, 1999). La copula se realiza uno a dos días después de la emergencia, las hembras comienzan a poner huevos después de unos tres días, alcanzan una longevidad promedio de 12 días y alcanzan a ovipositar un promedio de 1 000 huevos (Ángulo, 2000). La duración de la vida adulta se estima en un promedio de aproximadamente 10 días, con un rango de alrededor de siete a 21 días (Capinera, 1999).



Figura 10. Macho adulto típico de *Spodoptera frugiperda*. Fotografía de Lyle J. Buss , Universidad de Florida.



Figura 11. Hembra adulta típica de *Spodoptera frugiperda*. Fotografía de Lyle J. Buss , Universidad de Florida.

2.11.4. Origen y distribución de la plaga

El gusano cogollero es originario de las regiones tropicales del hemisferio occidental, desde Estados Unidos hasta Argentina. El gusano cogollero es un volador fuerte y se dispersa largas distancias anualmente durante meses de verano (ICA, 2004).

Distribución mundial

Se distribuye principalmente en el continente americano. La distribución de esta plaga va desde el sur de Canadá hasta el norte de Argentina e incluye el Caribe, consideradas la región Norte y Centroamericana las más afectadas por esta plaga (Sena *et al.*, 2003; Casmuz *et al.*, 2010). Se distribuye en Argentina, Bahamas, Barbados, Belice, Bermuda, Bolivia, Brasil, Canadá, Colombia, Costa Rica, Cuba, Chile (distribución restringida), Ecuador, El Salvador, Estados Unidos, Granada, Guadalupe, Guatemala, Guyana, Guyana Francesa, Haití (distribución restringida), Honduras, Jamaica, Martinica, México, Monserrate, Nicaragua, Panamá, Paraguay, Perú y Puerto Rico (Akhurst *et al.*, 2003; ICA, 2004).

Distribución nacional

En México, su distribución es muy amplia, se encuentra presente en todas las zonas productoras de maíz. Su presencia y daños han sido consignadas en las siguientes entidades: Michoacán, Guerrero, Morelos, Veracruz, Oaxaca, Quintana Roo, Yucatán, Baja California Norte, Baja California Sur, Sonora, Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Chihuahua, Durango, San Luis Potosí, Guanajuato, Tamaulipas, Hidalgo, Puebla, México, Chiapas y Campeche (S.A.R.H., 1992).

2.11.5. Daño e Importancia

De acuerdo a Pashley *et al.* (1985; 2004) existen dos razas de cogollero del maíz genéticamente diferentes, la raza de maíz que ocurre a maíz y algodón, y la raza

de arroz, asociada con esta planta y el pasto Bermuda *Cynodon dactylon* (L.) Pers. (Poaceae).

El cogollero del maíz es una de las plagas polífagas más importantes desde el punto de vista económico, aún no existen estadísticas sobre las pérdidas causadas por el insecto, pero en el caso del cultivo de maíz tecnificado se estima que entre 5 y 10% de los costos de producción corresponden al control químico de esta plaga (Zenner *et al.*, 2007). Se destaca el daño que ocasiona en los cultivos de maíz y algodón, durante toda la etapa del cultivo (Vélez, 1997; Zenner *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2009; Valencia *et al.*, 2014).

La larva del insecto es quien causa el daño. En algodón se puede presentar el ataque durante todas las etapas del cultivo, en forma de trozador o tierrero hasta la lignificación de los tallos, posteriormente, alimentarse de follaje; en la época de formación de botones las larvas atacan las estructuras desde la base hasta el ápice (Murillo, 1991).

2.12. ¿Maíz Bt en México?

Mucho se dice sobre las consecuencias ecológicas, agronómicas, socioeconómicas y culturales que conlleva la liberación comercial de maíz transgénico. Uno de los aspectos que sobresalen es el normativo y legal en la materia, que profundizan el grado de concentración y privatización, tanto de la investigación agrícola como de la producción y comercialización de semillas, generando dependencia tecnológica y económica hacia unas pocas empresas transnacionales (Luna y Altamirano, 2015).

Si bien, la situación de introducción de cultivos transgénicos en el país está estrictamente regulada, sin embargo, el caso de maíz transgénico reviste singular importancia ya que se le considera a México centro de origen del *Zea mays* (Soberón y Bravo, 2007), domesticado del teocintle hace 7 000 años. Este cultivo es considerado patrimonio biocultural, para comunidades campesinas e indígenas,

el maíz es considerado uno de los principales cultivos de autoconsumo. Se cuenta con 64-69 razas nativas y miles de variedades adaptadas a diversas condiciones de cultivo y usos en toda la República Mexicana. Ahora, teniendo en cuenta que el maíz es un cultivo de polinización cruzada (CEDRSSA, 2019), donde si se llegara a sembrar maíces transgénicos en México, al paso del tiempo los maíces nativos serían contaminados por diversos transgenes donde no habría ninguna posibilidad de volver a la situación original de las poblaciones nativas, por lo que es necesario evaluar el impacto del maíz transgénico sobre las poblaciones de maíz nativo (Soberón y Bravo, 2007), antes de tomar la decisión de permitir o no la liberación del primero.

2.13. Experimentaciones con maíz transgénico

Con fundamento en la prevención y precaución de Organismos Genéticamente Modificados (OGM), entre 1995 a 1999, el Comité Nacional de Bioseguridad Agrícola (CNBA) fue el encargado de la bioseguridad en México, así, al solicitar permisos para pruebas de campo con OGM se tenía que demostrar que los ecosistemas no se alterarían y con ello, la biodiversidad no sufriría efectos negativos (CEDRSSA, 2019).

El primer permiso para llevar a cabo una prueba de campo fue en 1996 al Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). Entre 1995 a 1999 se hizo uso de métodos y técnicas que permitieron el manejo básico del maíz transgénico en etapa experimental; se adecuaron laboratorios, así como la creación del Comité de Bioseguridad interno donde se implementó reglas de manejo de OGM, en laboratorio e invernadero. La ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados clasifica en tres etapas los permisos de liberación de maíz GM: Experimental, piloto y etapa comercial. De 2009 a 2012 fueron solicitados 248 (33 en 2009; 68 en 2010; 61 en 2011 y 33 en 2012) permisos de liberación al ambiente del maíz GM con tolerancia a herbicidas y resistencia a insectos, donde solamente se aprobaron 195 permisos; 168 en etapa

experimental; 26 en etapa piloto y cero en etapa comercial, en total se sembraron 3 457 hectáreas de maíz GM en los Estados de Baja California, Sonora, Sinaloa, Chihuahua, Coahuila, Durango, Nayarit y Tamaulipas (CEDRSSA, 2019). De 2013 a la fecha no se ha aceptado ninguna solicitud.

Los ensayos realizados con maíz transgénico que expresa proteínas Bt, resultaron altamente efectivos a comparación de híbridos donde se aplicó insecticida para combatir al gusano cogollero *S. frugiperda*; en Tamaulipas, México los híbridos de maíz GM que mostraron mayor resistencia fueron Agrisure Viptera 3110 que expresa las proteínas Cr1Ab y Vip3Aa20 y Agrisure Viptera 3111 que expresa Cry1Ab, Vip3Aa20 y mCry3A (Aguirre *et al.*, 2015). Otro caso similar fue realizado en cuatro localidades del estado de Sinaloa, donde se evaluó durante tres años, el daño foliar causado por *S. frugiperda* en maíz, con los híbridos GM Agrisure 3000 GT, Agrisure Viptera 3110 y Agrisure Viptera 3111 los cuales demostraron menos daños significativos en comparación con sus respectivos híbridos convencionales (Aguirre *et al.*, 2016).

En dos localidades de Culiacán, Sinaloa en cultivo de maíz GM con el evento Agrisure® Viptera™ 3111 se demostró una notable disminución de incidencia y severidad ante la producción de mazorca *Fusarium* sp., en comparación con el híbrido convencional con control de la plaga. Con base en el resultado, el maíz Agrisure® Viptera™ 3111 de forma indirecta brinda un beneficio adicional, ayuda a prevenir puntos de entrada a fitopatógenos, evitando la pudrición de mazorca (Hernández-Juárez *et al.*, 2016). Una de las propiedades más valoradas de la tecnología Bt es su especificidad a los insectos plaga, dicha bondad fue comprobada con poblaciones de insectos no blanco como *Chaetocnema pulicaria* F. E. Melsheimer (Coleoptera: Chrysomelidae), *Orius insidiosus* (Say) (Hemiptera: Anthocoridae), *Coleomegilla maculata* (De Geer) (Coleoptera: Coccinellidae) y *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae), que estuvieron en contacto con maíz genéticamente modificado que expresa proteínas de *B. thuringiensis* y las poblaciones no fueron afectadas negativamente (Hernández-Juárez *et al.*, 2018; Hernández-Juárez *et al.*, 2019).

3.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Colecta de *Spodoptera frugiperda*

En la presente investigación se realizaron colectas en el año 2018, de especímenes en estado inmaduro (larval) de *S. frugiperda*, con la finalidad de obtener poblaciones de diferentes zonas de producción aledañas a los cultivos Bt y generar líneas presuntamente resistentes a las toxinas Cry del Bt, a las cuales se les denominara como líneas de campo y por otro lado se recolectarán líneas susceptibles, en las cuales se realizó las pruebas moleculares de determinación de resistencia. Todas las muestras fueron conservadas en alcohol al 70% y almacenadas a -20 °C.

3.1.1. Líneas de campo

Se consideró como línea de campo a las poblaciones de *S. frugiperda*, presuntamente resistentes a las toxinas Cry del Bt, debido y que se colectaron de áreas con influencia de cultivos GM con la tecnología Bt, en este sentido, los individuos se obtuvieron del cultivo de maíz convencional, aledaño al cultivo de algodón genéticamente modificado, en el estado de Coahuila, recolectando larvas de diferentes estadios principalmente de tercero (Cuadro 2).

3.1.2. Línea susceptible

Se consideró como línea susceptible a las poblaciones de *S. frugiperda*, que provienen de regiones en las que no hay interacción con cultivos GM con la tecnología Bt, en este sentido, los individuos se obtuvieron del cultivo de maíz convencional, sin influencia del cultivo de algodón Bt, obtenidas de diferentes estados del país; en total se muestrearon cuatro localidades (Cuadro 3).

Cuadro 2. Descripción de las recolectas realizadas para las líneas de campo presuntamente resistentes a las toxinas Cry de Bt, con influencia de cultivos GM, en el estado de Coahuila, México, 2018.

No	Ubicación	Posición geográfica	Cultivo hospedero	Edad del cultivo hospedero:	Influencia con cultivos GM	Especie:	Muestras procesadas:	Fecha de recolecta
1	Los Girasoles, San Pedro de las Colonias, Coahuila, carretera Concordia-San Rafael	Altitud 1 099 msnm, latitud: 25°47.908´ N; longitud: 103° 7.078´ O	Follaje y cogollo de maíz blanco, en etapa R5 (elote completo)	Se desconoce	Algodón a 350 m de distancia	Gusano cogollero <i>S. frugiperda</i>	25	19 de junio de 2018.
2	Ejido Albia, Torreón, Coahuila, carretera San Pedro-Torreón	Altitud 1100 msnm, latitud: 25°40.294´ N; longitud: 103° 21.671´ O	Maíz blanco (elote) etapa R6, etapa avanzada	Se desconoce	No había presencia de algodón cercano	Gusano cogollero <i>S. frugiperda</i>	25	19 de junio de 2018

Cuadro 3. Descripción de las recolectas realizadas para las líneas de campo presuntamente resistentes a las toxinas Cry de Bt, con influencia de cultivos GM, en el estado de Coahuila, México, 2018.

No	Ubicación	Posición geográfica	Cultivo hospedero	Edad del cultivo hospedero:	Influencia con cultivos GM	Especie:	Muestras procesadas:	Fecha de recolecta
1 [£]	La vega, Barranca de Santa Clara, Zacoalco de Torres, Jalisco	Altitud 1840 msnm, latitud: 20 °18'09" N, longitud: 103 °39'37" O.	Follaje de maíz blanco, en etapa V3-V4	22 días aprox.	Sin presencia de cultivos GM	Gusano cogollero S. <i>frugiperda</i> (F1)	06	20 de julio de 2017 y F1: 09 de septiembre de 2017
2	Tumbadero del Águila, Temapache, Veracruz	Altitud 40 msnm	Follaje de maíz blanco, en etapa V6 (sin espigar)	40 días aprox.	Sin presencia de cultivos GM	Gusano cogollero S. <i>frugiperda</i>	07	02 de abril de 2018
3	Tepalcingo, Morelos	Altitud 1160 msnm, latitud: 18 °26' N, longitud: 98 °18' O.	Follaje de maíz blanco	Se desconoce	Sin presencia de cultivos GM	Gusano cogollero S. <i>frugiperda</i>	04	09 de febrero de 2018
4 [£]	Campo experimental "El Bajío", UAAAN, Buenavista, Saltillo, Coahuila	Altitud 1610 msnm, latitud: 25°21'13" N, longitud: 101°01'56" O.	Follaje de maíz blanco, en etapa V6	Desconocido	Sin presencia de cultivos GM	Gusano cogollero S. <i>frugiperda</i> (F2 y F5)	08	Julio de 2017, F2: 16 de septiembre de 2017 y F5: 26 de diciembre de 2017

[£]Estas larvas fueron obtenidas del cultivo de maíz y se desarrollaron como línea de laboratorio en el Departamento de Parasitología, bajo condiciones controladas a 25 ±5 °C, 55 ±15 % humedad relativa y fotoperiodo 12:12 h luz: oscuridad, en el área de cámaras bioclimáticas.

3.2. Procesamiento de *Spodoptera frugiperda*

Las muestras de *S. frugiperda* recolectadas, fueron procesadas para la extracción de ADN y PCR (Polymerase Chain Reaction, por sus siglas en inglés) en el Laboratorio de Parasitología Molecular del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) en Buenavista, Saltillo, Coahuila, México (25°21'13"N, 101°01'56"O, 1610 msnm).

3.2.1. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se utilizaron larvas del tercer estadio de *S. frugiperda* tanto las líneas de campo como susceptibles, previamente conservadas a -20 °C en tubos tipo eppendorf y en alcohol al 70%. La extracción se llevó a cabo con base en la metodología de Doyle y Doyle (1990) con algunas modificaciones, las cuales consistieron en lo siguiente:

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

Se agregó 20 μ L de proteinasa, posteriormente se pasó al Thermomix a 37°C por 15 min y se dejó en reposo cinco minutos. Se centrifugo a 12 000 revoluciones por minuto (rpm) por 15 min.

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

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

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

Buffer de carga azul de bromophenol

Preparación:

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

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

Reactivos a utilizar:

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

Soluciones Stock:

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

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

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

3- **NaCl:**

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

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

4- **SDS:**

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

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

Preparación de proteinaza

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

Extracción de ADN

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

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

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

Se agregó proteinaza a una dosis de 20 μL , posteriormente se pasó al Termomix a 37°C por 15 min. Y se dejó en reposo 5 minutos. Se centrifugo a 12,000 revoluciones por minuto (rpm) por 15 minutos.

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

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

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

3.2.2. Visualización del ADN en gel de agarosa al 1%

Para corroborar la extracción de ADN se preparó un gel de agarosa al 1%, donde se cargó con 5.0 μL de la extracción de ADN y 5.0 μL del buffer de carga (azul de bromo fenol). Este se corrió a 90 volts por 45 min. El resultado se visualizó en el fotodocumentador.

3.3. Detección del gen de resistencia

Las pruebas para determinar resistencia a las toxinas Cry1Ac, se realizaron con el ADN de las poblaciones recolectadas de campo y las líneas susceptibles, y se trabajó con genes que han mutado y que codifica para cadherina, proteína expresada en el intestino medio de las larvas (para ello se realizó una revisión extensa de literatura), ya que proporcionan la oportunidad de desarrollar y probar excelentes métodos de diagnóstico de niveles de resistencia.

3.3.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la determinación de los genes de resistencia se llevaron a cabo reacciones de PCR, con la finalidad de amplificar el ADN extraído mediante cebadores específicos que están relacionados con alelos de resistencia del gen que codifica para la toxina Cry1Ac de *B. thuringiensis* (Cuadro 4).

Cuadro 4. Iniciadores específicos que están relacionados con alelos de resistencia del gen que codifica para la toxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* (Bt).

Nombre	Descripción	Secuencia	Condiciones de termociclaje
Alelo r1	(1S-R) Anti sentido S-R. Salvaje o Natural. Localizado en el Exón 9	5'-CTATGTAGAACGCCTCGTGAG-3'	Desnaturalización a 95 °C por 3 min, seguido de 30 ciclos (94°C por 30 segundos, 55 °C por 1 min y 72 °C por 1 min 30 segundos) y una extensión final a 72 °C por 10 min (Yang <i>et al.</i> , 2006).
	(r1-R) Antisentido r1-R. Mutante. Localizado en el Exón 25	5'-CTTACACATGATGTTCTCG-3'	
	(r1-F) Sentido r1-F. para la familia Cadherina. Localizado en el Exon 8	5'-AGACAGGGGACACTCTTGAGAAG-3'	
Alelo r2, Alelo r3	(r2r3-F) 15Cad-F Sentido r2, r3-Foward	5'-AGACAGGGGACACTCTTGAGAAG-3'	Desnaturalización a 95 °C por 3 min, seguido de 30 ciclos (94°C por 30 segundos, 55 °C por 1 min y 72 °C por 2 min) y una extensión final a 72 °C por 10 min (Yang <i>et al.</i> , 2007).
	(r2r3-R) 15Cad-R.	5'-GGCTCGTTCGTTACTACTCAGTA-3'	
Alelo r4	(r4-F) 87SEQ-F	5'-ATTGTAGCTACATGGTAGCAATAC-3'	Desnaturalización a 95 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos (94°C por 30 segundos, 55°C por 1 min y 72 °C por 1 min 30 segundos) y una extensión final a 72°C por 10 min (Zhao <i>et al.</i> , 2010).
	(r4-R) 2-R	5'-CGCTGACTGTATACTTGCATG-3'	
Alelo r5	(r5-F) 2.1F	5'-GATGGGTGGAGATATTTGCTG-3'	Desnaturalización a 95 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos (94 °C por 30 segundos, 55 °C por 1 min y 72 °C por 2 min 30 segundos) y una extensión final a 72 °C por 10 min (Zhao <i>et al.</i> , 2010).
	(r5-R) 3-R	5'-CTATGTAGAACGCCTCGTGAG-3'	
Alelo r6	(r6-F) 145-F	5'-ATGGGTAACGCAGTGAGCTACCTGAGGAT-3'	Desnaturalización a 95 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos (94°C por 30 segundos, 57°C por 1 min y 72 °C por 3 min) y una extensión final a 72 °C por 10 min (Zhao <i>et al.</i> , 2010).
	(r6-R) 145-R	5'-TAGAGTCAGTATTCCGTCCTGCTTGGTG-3'	
Alelo r7	(r7-F) 151-F	(5'-CGAGATCGACTGGGAGAACTCCTATGC-3'	Desnaturalización a 95 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos (94°C por 30 segundos, 57°C por 1 min y 72 °C por 5 min) y una extensión final a 72 °C por 10 min (Zhao <i>et al.</i> , 2010).
	(r7-R) 151-R	5'-ACCGCACTTGATTATACAGGGTCCAT-3'	
Alelo r8	(r8-F) 123F	5'-GAAATGTTTGAGGTGCTGTATCTGACG-3'	Desnaturalización a 95 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos (94°C por 30 segundos, 56°C por 1 min y 72 °C por 5 min) y una extensión final a 72 °C por 10 min (Zhao <i>et al.</i> , 2010).
	(r8-R) 123R	5'-GCGATGACGGTGTAGTACAAGTTCTGT-3'	
Alelo r9	(Cad-HaF) Cadherin-F	5'-AGTCATATGACGATTCGTGCTACGGAC-3'	Desnaturalización a 94 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos (94 °C por 30 segundos, 54 °C por 30 segundos, 72 °C por 1:30 segundos) y una extensión final a 72 °C por 7 min (Martínez <i>et al.</i> , 2013).
	(Cad-HaR) Cadherin-R	5'-ATACTCGAGTGGCTCGCGCCTGCGCGT-3' (Liu <i>et al.</i> , 2009).	
Alelo r10	(Cad-HzF) Cadherin-HzF	5'-AGTCATATGACGATTCGTGCTACGGAC-3'	Desnaturalización a 94 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos (94 °C por 30 segundos, 54 °C por 30 segundos, 72 °C por 1 min y 30 segundos) y una extensión final a 72 °C por 7 min (Martínez <i>et al.</i> , 2013).
	(Cad-HzR) Cadherin-HzR	5'-CTCTGGCACTTCCAAGTCCAGCAT-3' (Gen Bank. AY909578.1).	

Para la PCR, se preparó un mixer para una reacción (1 rx) que consistió de un volumen final de 25 μL , que contenía amortiguador o buffer 10X, dNTPs 10 mM, Taq ADN polimerasa 1U, iniciadores específicos 5 mM, de cada uno (Forward y Reverse), agua de calidad inyectable y ADN molde (Cuadro 5). El programa de termociclaje fue específico para cada juego de primers (Cuadro 4).

Cuadro 5. Reactivos y orden de agregación para elaborar el Mixer para la PCR.

Reactivos	Reacción*		
	1 rx	26 rx	Agregado por reacción
Buffer 10X	2.5 μL	65 μL	2 μL
Taq 1U	0.2 μL	5.2 μL	6 μL
dNTPs 10 mM	0.4 μL	10.4 μL	3 μL
Primers R 5 mM	3.0 μL	78.0 μL	4 μL
Primers F 5 mM	3.0 μL	78.0 μL	5 μL
Agua	11.9 μL	309.4 μL	1 μL
ADN		4.0 μL (se agrega hasta el final)	

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

El producto de PCR se corrió en un gel de agarosa al 1% por medio de electroforesis para comparar el tamaño de los fragmentos de ADN con un marcador de peso molecular de 1 Kpb, para determinar el tamaño en pares de bases, para lo cual en el primer pocillo del gel se agregó 5.0 μL del marcador de peso molecular y 1.0 μL de gel red y en el resto de los pocillos se agregaron 5 μL del producto de PCR y 1 μL de gel red. Este se corrió a 95 volts por una hora 30 min. El resultado se visualizó en un fotodocumentador con apoyo del software MULTIDOC-IT. Si hubo tinción de alguna banda, en comparación con el marcador de peso molecular entonces se consideró como amplificación, y de acuerdo a los pares de bases obtenidos, se determinó si es positivo o negativo al gen de resistencia probado.

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Colecta de *Spodoptera frugiperda*

De la línea de campo, se recolectaron 198 larvas de tercer estadio de *S. frugiperda* en cultivos de maíz, asociado a algodón genéticamente modificado Bollgard II (que expresa las toxinas Cry1Ac y Cry2Ab) en localidades de los municipios de San Pedro y Torreón, Coahuila, para la extracción de ADN y PCR. Mientras que de la línea susceptible se recolectaron en total 50 larvas procedentes de distintas localidades de los municipios de Zacoalco de Torres, Jalisco, Tepalcingo, Morelos, Temapache, Veracruz y Saltillo, Coahuila.

4.2. Extracción de ADN

Se realizó la extracción de ADN de 57 larvas de tercer estadio de *S. frugiperda* de la localidad de los Girasoles, San Pedro de las Casas, de las cuales se obtuvo presencia de bandas de buena calidad del ADN. Sólo de 27 muestras fue posible visualizar el ADN, mientras que en los 30 restantes no hubo presencia de ADN, con un resultado negativo (Cuadro 6).

Cuadro 6. Visualización de ADN de *Spodoptera frugiperda* en gel de agarosa al 1% de San Pedro de las Colonias, Coahuila, 2018.

No. Muestra	Localidad	Nombre muestra	No. Carril	Resultado
01	San Pedro	J1P	1	Positivo
02	San Pedro	J2P	2	Positivo
03	San Pedro	J3P	3	Positivo
04	San Pedro	J4P	4	Positivo
05	San Pedro	J5P	5	Positivo
06	San Pedro	J6P	6	Positivo
07	San Pedro	J7P	7	Negativo
08	San Pedro	J8P	8	Positivo
09	San Pedro	J9P	9	Positivo
10	San Pedro	J10P	10	Positivo
11	San Pedro	J11P	11	Positivo

Cuadro 6. Continuación...

12	San Pedro	J12P	12	Negativo
13	San Pedro	J13P	13	Positivo
14	San Pedro	J14P	14	Negativo
15	San Pedro	J15P	1	Positivo
16	San Pedro	J16P	2	Positivo
17	San Pedro	J17P	3	Negativo
18	San Pedro	J18P	4	Positivo
19	San Pedro	J19P	5	Positivo
20	San Pedro	J20P	6	Negativo
21	San Pedro	J21P	7	Negativo
22	San Pedro	J22P	8	Positivo
23	San Pedro	J23P	9	Negativo
24	San Pedro	J24P	10	Negativo
25	San Pedro	J25P	11	Negativo
26	San Pedro	J26P	12	Positivo
27	San Pedro	J27P	13	Positivo
28	San Pedro	J28P	14	Negativo
29	San Pedro	J29P	1	Positivo
30	San Pedro	J30P	2	Positivo
31	San Pedro	J31P	3	Negativo
32	San Pedro	J32P	4	Negativo
33	San Pedro	J33P	5	Positivo
34	San Pedro	J34P	6	Negativo
35	San Pedro	J35P	7	Negativo
36	San Pedro	J36P	8	Positivo
37	San Pedro	J37P	9	Negativo
38	San Pedro	J38P	10	Negativo
39	San Pedro	J39P	11	Negativo
40	San Pedro	J40P	12	Negativo
41	San Pedro	J41P	13	Negativo
42	San Pedro	J42P	14	Positivo
43	San Pedro	J43P	1	Positivo
44	San Pedro	J44P	2	Negativo
45	San Pedro	J45P	3	Negativo
46	San Pedro	J46P	4	Negativo
47	San Pedro	J47P	5	Negativo
48	San Pedro	J48P	6	Negativo
49	San Pedro	J49P	7	Positivo
50	San Pedro	J50P	8	Negativo
51	San Pedro	J51P	9	Positivo
52	San Pedro	J52P	10	Positivo
53	San Pedro	J53P	11	Negativo
54	San Pedro	J54P	12	Negativo
55	San Pedro	J55P	13	Negativo
56	San Pedro	J56P	14	Negativo
57	San Pedro	J57P	1	Negativo

J= Jaqueline, P= San Pedro, Coahuila.

Se realizó la extracción de ADN de 35 larvas de tercer estadio de *S. frugiperda* del Ejido Albia perteneciente al municipio de Torreón, se obtuvieron 25 con resultado positivo, es decir que hubo presencia de bandas de ADN; en las 10 larvas restantes no hubo presencia, resultando negativo (Cuadro 7).

Cuadro 7. Visualización de ADN de *Spodoptera frugiperda* en gel de agarosa al 1% de Torreón, Coahuila, 2018.

No. Muestra	Localidad	Nombre muestra	No. Carril	Resultado
01	Torreón	J1T	1	Positivo
02	Torreón	J2T	2	Positivo
03	Torreón	J3T	3	Positivo
04	Torreón	J4T	4	Positivo
05	Torreón	J5T	5	Positivo
06	Torreón	J6T	6	Positivo
07	Torreón	J7T	7	Positivo
08	Torreón	J8T	8	Positivo
09	Torreón	J9T	9	Positivo
10	Torreón	J10T	10	Positivo
11	Torreón	J11T	11	Positivo
12	Torreón	J12T	12	Positivo
13	Torreón	J13T	13	Positivo
14	Torreón	J14T	14	Negativo
15	Torreón	J15T	1	Positivo
16	Torreón	J16T	2	Positivo
17	Torreón	J17T	3	Negativo
18	Torreón	J18T	4	Positivo
19	Torreón	J19T	5	Positivo
20	Torreón	J20T	6	Positivo
21	Torreón	J21T	7	Negativo
22	Torreón	J22T	8	Positivo
23	Torreón	J23T	9	Negativo
24	Torreón	J24T	11	Positivo
25	Torreón	J25T	12	Positivo
26	Torreón	J26T	13	Negativo
27	Torreón	J27T	14	Negativo
28	Torreón	J28T	1	Positivo
29	Torreón	J29T	2	Positivo
30	Torreón	J30T	3	Positivo
31	Torreón	J31T	4	Positivo
32	Torreón	J32T	5	Negativo
33	Torreón	J33T	6	Negativo
34	Torreón	J34T	7	Negativo
35	Torreón	J35T	8	Negativo

J= Jaqueline, T= Torreón, Coahuila.

De las localidades de Jalisco, Veracruz, Morelos y Coahuila se procesaron un total de 25 larvas de tercer estadio de *S. frugiperda* como línea susceptible, de las cuales, en todas se tuvo éxito en la extracción del ADN, al visualizarse bandas nítidas en el gel de agarosa, las cuales correspondieron al ADN, por el peso molecular al que se observaron (Cuadro 8).

Cuadro 8. Visualización de ADN de *Spodoptera frugiperda* en gel de agarosa al 1% de la línea susceptible de Jalisco, Veracruz, Morelos y Coahuila, 2018.

No. Muestra	Estado Procedencia	Nombre muestra	No. Carril	Resultado
01	Jalisco	J1	1	Positivo
02	Jalisco	J2	2	Positivo
03	Jalisco	J3	3	Positivo
04	Jalisco	J4	4	Positivo
05	Jalisco	J5	5	Positivo
06	Jalisco	J6	6	Positivo
07	Coahuila	C7	7	Positivo
08	Coahuila	C8	8	Positivo
09	Coahuila	C9	9	Positivo
10	Coahuila	C10	10	Positivo
11	Coahuila	C11	11	Positivo
12	Coahuila	C12	12	Positivo
13	Coahuila	C13	13	Positivo
14	Coahuila	C14	14	Positivo
15	Morelos	M15	1	Positivo
16	Morelos	M16	2	Positivo
17	Morelos	M17	3	Positivo
18	Morelos	M18	4	Positivo
19	Veracruz	V19	5	Positivo
20	Veracruz	V20	6	Positivo
21	Veracruz	V21	7	Positivo
22	Veracruz	V22	8	Positivo
23	Veracruz	V23	9	Positivo
24	Veracruz	V24	10	Positivo
25	Veracruz	V25	11	Positivo

J=Jalisco, C=Coahuila, M=Morelos, V=Veracruz.

4.3. Presencia y Ausencia de ADN (Visualización)

Existe presencia de ADN cuando se puede apreciar una banda nítida y bien marcada al final de la corrida, en algunos casos, como se puede observar en la imagen, se aprecia dicha banda, pero además se ve un “barrido” que no es nada más que proteína, si se da este caso se lleva a cabo un procedimiento de limpieza con proteinasa para eliminar ese exceso de proteína y quedarnos solo con el ADN. Por el contrario, si no existe una banda visible o es muy tenue, quiere decir que no hay presencia de ADN.

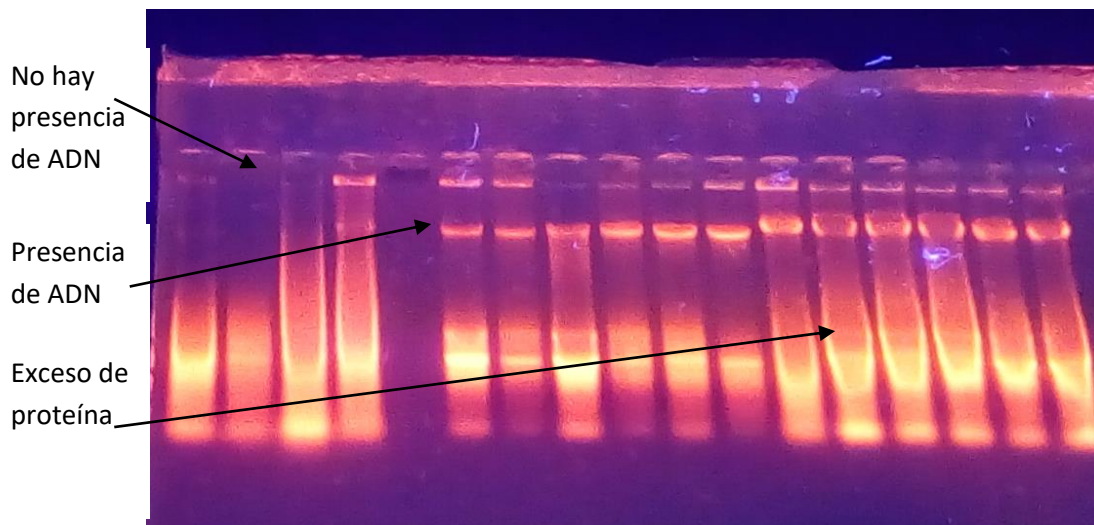


Figura 12. Gel de agarosa al 1%, que muestra la presencia de ADN, ausencia de ADN y exceso de proteína.

4.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Fueron procesadas para la PCR 75 muestras de ADN de larvas de tercer estadio de *S. frugiperda* para cada uno de los juegos de iniciadores; 50 muestras de la línea de campo que consisten en 25 muestras de San Pedro y 25 muestras de Torreón, y 25 muestras de la línea susceptible obtenidas en localidades de Jalisco, Veracruz, Morelos y Coahuila. Se procesaron un total de 10 juegos de iniciadores, lo que dio un total de 750 amplificaciones.

El primer juego de iniciadores 1S-R y r1-F, fue utilizado para detectar un alelo salvaje o natural para la familia cadherina, para discriminarlo del alelo mutante de resistencia a la toxina Cry1Ac (r1-R y r1-F), producto de la presión de selección por tratamientos a base de *B. thuringiensis*, incluidos los cultivos genéticamente modificados Bt. Mientras que los iniciadores r2r3-F y r2r3-R, r4-F y r4-R, r5-F y r5-R, r6-F y r6-R, r7-F y r7-R, r8-F y r8-R, Cad-HzF y Cad-HzR, detectan alelos que confiere resistencia a la toxina Cry1Ac por presión de selección a cultivos genéticamente modificados Bt y el par Cad-HaF y Cad-HaR, detecta un alelo para una proteína similar a la cadherina que confiere resistencia a la toxina Cry1Ac de *B. thuringiensis*.

La amplificación y visualización de la PCR en las 25 muestras recolectadas en San Pedro de las Colonias, Coah., fueron corridas con cada uno de los 10 juegos de primers, los resultados fueron negativos (Cuadro 8 y 10), lo que indica que no existe presencia de alelos para el gen de resistencia a la toxina Cry1Ac, por lo cual la plaga es susceptible a la toxina Cry1Ac.

Cuadro 9. Visualización de la amplificación de la PCR en ADN de larvas de *Spodoptera frugiperda* provenientes de San Pedro de las Colonias, Coah., sometido a cinco juegos de iniciadores (gel de agarosa al 1%).

Nombre muestra	No. Carril	Alelo r1 Natural	Alelo r1 Mutante	Alelo r2, r3	Alelo r4	Alelo r5	Resultado
P1	02	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
P2	03	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
P3	04	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
P4	05	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
P5	06	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
P6	07	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
P7	08	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
P8	09	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
P9	10	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
P10	11	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
P11	12	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
P12	13	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
P13	14	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
P14	15	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
P15	16	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
P16	17	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
P17	18	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo

Cuadro 9. Continuación...

P18	19	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
P19	20	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
P20	02	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
P21	03	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
P22	04	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
P23	05	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
P24	06	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
P25	07	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo

P= San Pedro, Coah.

Cuadro 10. Visualización de la amplificación de la PCR en ADN de larvas de *Spodoptera frugiperda* provenientes de San Pedro de las Colonias, Coah., sometido a cinco juegos de iniciadores (gel de agarosa al 1%).

Nombre muestra	No. Carril	Alelo r6	Alelo r7	Alelo r8	Alelo r9	Alelo r10	Resultado
P1	02	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
P2	03	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
P3	04	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
P4	05	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
P5	06	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
P6	07	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
P7	08	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
P8	09	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
P9	10	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
P10	11	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
P11	12	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
P12	13	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
P13	14	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
P14	15	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
P15	16	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
P16	17	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
P17	18	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
P18	19	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
P19	20	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo

Cuadro 10. Continuación...

P20	02	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
P21	03	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
P22	04	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
P23	05	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
P24	06	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
P25	07	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo

P= San Pedro, Coah.

Para el caso de las 25 muestras de Torreón, Coah., que se sometieron a la PCR, fue posible visualizar que no se presentó amplificación en ninguno de los 10 juegos de iniciadores que detectan alelos de resistencia a la toxina Cry1Ac de *B. thuringiensis*, lo que indica que los resultados de dichas muestras fueron negativos; por tanto, la población de *S. frugiperda* es susceptible a la toxina Cry1Ac (Cuadro 11 y 12).

Cuadro 11. Visualización de la amplificación de la PCR en ADN de larvas de *Spodoptera frugiperda* provenientes de Torreón, Coah., sometido a cinco juegos de iniciadores (gel de agarosa al 1%).

Nombre muestra	No. Carril	Alelo r1 Natural	Alelo r1 Mutante	Alelo r2, r3	Alelo r4	Alelo r5	Resultado
T1	02	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
T2	03	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
T3	04	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
T4	05	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
T5	06	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
T6	07	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
T7	08	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
T8	09	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
T9	10	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
T10	11	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
T11	12	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
T12	13	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
T13	14	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
T14	15	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
T15	16	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
T16	17	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
T17	18	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
T18	19	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
T19	20	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
T20	02	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
T21	03	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo

Cuadro 11. Continuación...

T22	04	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
T23	05	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
T24	06	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
T25	07	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo

T= Torreón, Coah.

Cuadro 12. Visualización de la amplificación de la PCR en ADN de larvas de *Spodoptera frugiperda* provenientes de Torreón, Coah., sometido a cinco juegos de iniciadores (gel de agarosa al 1%).

Nombre muestra	No. Carril	Alelo r6	Alelo r7	Alelo r8	Alelo r9	Alelo r10	Resultado
T1	02	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
T2	03	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
T3	04	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
T4	05	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
T5	06	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
T6	07	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
T7	08	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
T8	09	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
T9	10	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
T10	11	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
T11	12	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
T12	13	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
T13	14	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
T14	15	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
T15	16	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
T16	17	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
T17	18	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
T18	19	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
T19	20	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
T20	02	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
T21	03	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
T22	04	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
T23	05	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y	Cad-HzF y	Negativo

Cuadro 12. Continuación...					Cad-HaR	Cad-HzR	
T24	06	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
T25	07	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo

T= Torreón, Coah.

En los cuadros 13 y 14, se observan los resultados obtenidos de la amplificación de la PCR de las 25 muestras de larvas del tercer estadio de *S. frugiperda* de la línea susceptible, recolectadas en localidades de Jalisco, Veracruz, Morelos y Coahuila. Los resultados de las muestras fueron negativos para los iniciadores a prueba, al expresarse nula amplificación, lo que indica que no hay presencia de alelos con la característica de resistencia a la toxina Cry1Ac, por lo cual la plaga es susceptible a la toxina Cry1Ac.

Cuadro 13. Visualización de la amplificación de la PCR en ADN de larvas de *Spodoptera frugiperda* de las líneas susceptibles, sometidas a cinco juegos de iniciadores (gel de agarosa al 1%).

Nombre muestra	No. Carril	Alelo r1 Natural	Alelo r1 Mutante	Alelo r2, r3	Alelo r4	Alelo r5	Resultado
J1	02	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
J2	03	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
J3	04	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
J4	05	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
J5	06	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
J6	07	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
C7	08	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
C8	09	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
C9	10	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
C10	11	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
C11	12	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
C12	13	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
C13	14	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
C14	15	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
M15	16	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
M16	17	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
M17	18	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
M18	19	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
V19	20	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
V20	02	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
V21	03	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
V22	04	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
V23	05	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
V24	06	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo
V25	07	1S-R y r1-F	r1-R y r1-F	r2r3-F y r2r3-R	r4-F y r4-R	r5-F y r5-R	Negativo

J= Jalisco, C= Coahuila, M= Morelos, V= Veracruz.

Cuadro 14. Visualización de la amplificación de la PCR en ADN de larvas de *Spodoptera frugiperda* de las líneas susceptibles, sometidas a cinco juegos de iniciadores (gel de agarosa al 1%).

Nombre muestra	No. Carril	Alelo r6	Alelo r7	Alelo r8	Alelo r9	Alelo r10	Resultado
J1	02	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
J2	03	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
J3	04	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
J4	05	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
J5	06	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
J6	07	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
C7	08	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
C8	09	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
C9	10	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
C10	11	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
C11	12	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
C12	13	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
C13	14	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
C14	15	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
M15	16	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
M16	17	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
M17	18	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
M18	19	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
V19	20	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
V20	02	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
V21	03	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
V22	04	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
V23	05	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
V24	06	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo
V25	07	r6-F y r6-R	r7-F y r7-R	r8-F y r8-R	Cad-HaF y Cad-HaR	Cad-HzF y Cad-HzR	Negativo

J= Jalisco, C= Coahuila, M= Morelos, V= Veracruz.

4.5. Visualización del resultado de PCR

No se obtuvo amplificación en ninguna de las muestras con ninguno de los 10 juegos de primers. La siguiente figura muestra que no hubo amplificación, además puede apreciarse claramente el marcador de peso molecular.

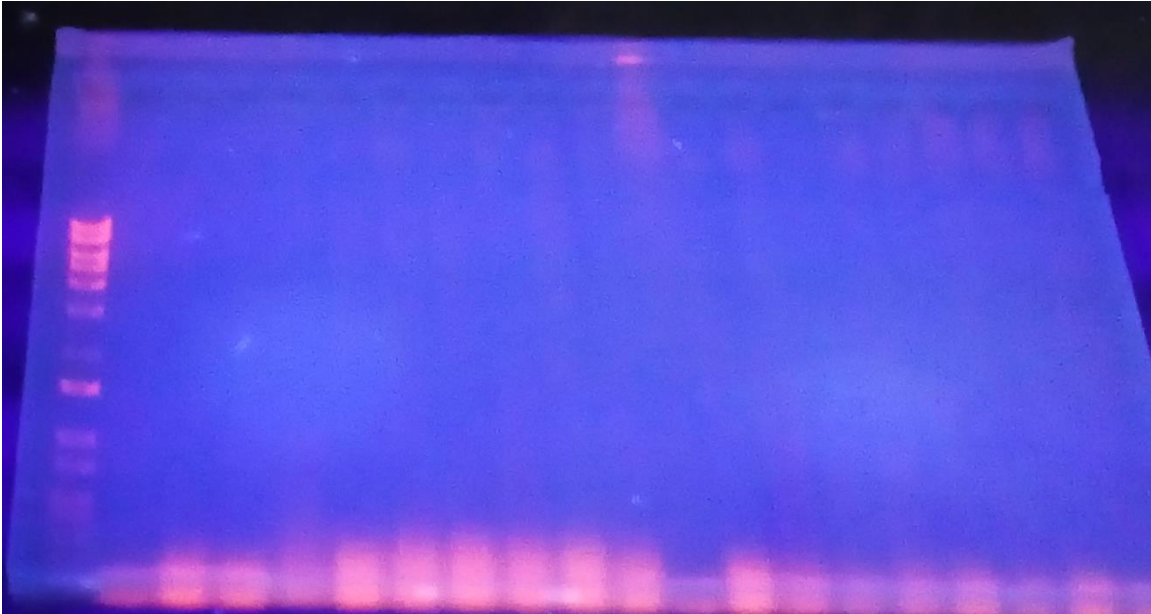


Figura 13. Gel de agarosa al 1% del resultado de PCR.

Villalobos (2007) menciona que la tecnología a base de organismos transgénicos que expresan proteínas de *B. thuringiensis* tóxicas para plagas blancas ha venido a disminuir el gran número de insecticidas químicos, tan solo el uso de Bt en algodón disminuyó el uso de 30,000 toneladas de insecticidas al año; cabe destacar que algunos otros autores, citan que esta bacteria posee toxicidad selectiva alta debido a su estrecho rango de especificidad, principalmente de los Ordenes Lepidoptera, Coleoptera y Diptera que al contrario de los insecticidas químicos, genera bajo impacto ambiental, es inocuo para vertebrados y otros insectos no blancos (Soberón y Bravo, 2007; Sauka y Benintende, 2008; Trumper, 2014).

George y Clickmore (2012) señalan que uno de los métodos con mayor éxito, para el control de plagas es el uso de plantas “transgénicas” que expresan toxinas Cry

para atacar a insectos objetivo; más eficientes aún que la diversidad que existe de productos a base de Bt. Estos mismos autores reportan que se han registrado más de 400 formulaciones basadas en Bt en el mercado, la mayoría de los productos contienen proteínas insecticidas y esporas visibles y son aplicados directamente en forma de aerosoles.

Soberón y Bravo (2007) reportan que, en México, el único cultivo genéticamente modificado permitido para siembra comercial es el algodón Bt, con el 60% del área cultivada. El algodón Bollgard II que expresa las toxinas Cry1Ac y Cry2Ab (Greenplate *et al.*, 2005) es sembrado en el norte del país, en los estados de Durango, Sonora, Baja California, Chihuahua y Coahuila (ISAAA, 2017). Las plagas de este cultivo contra las que la tecnología Bt ofrece protección son *H. virescens*, *H. zea*, *S. pyralis*, *P. gossypiella*, *A. argillacea* y *S. frugiperda* (Monsanto, 2002; Silva, 2005).

Como con cualquier otro insecticida, un insecto al exponerse continuamente a una toxina, conocida como presión selectiva, induce el potencial desarrollo de resistencia en la plaga, según Gutiérrez *et al.* (2015). En este mismo sentido, Trumper (2014) indica que entre todas las herramientas/métodos existentes para control de plagas, el Bt es de los que mayor presión de selección ejerce sobre las plagas. Por otro lado, Ferré y Van Rie (2002) explican que el mecanismo de resistencia a las toxinas Cry corresponde a una alteración de la unión de la toxina a los receptores del intestino medio; específicamente, la resistencia de lepidópteros a la toxina Cry1Ac está asociada a una mutación de un gen que codifica una proteína de cadherina (Tay *et al.*, 2015) siendo cadherina y aminopeptidasa los principales sitios de unión de las toxinas Cry1Ac en lepidópteros (Bullas y Candas, 2004). Algunos autores, por otro lado hacen mención que hay toxinas que comparten el mismo sitio de unión en la membrana del intestino medio del insecto, lo que conlleva a que el insecto resistente a una toxina en particular muestre resistencia a otras toxinas sin haber estado expuesto anteriormente, un término conocido como “resistencia cruzada” (Pereira *et al.*,

2008; Sayyed *et al.*, 2008; Gong *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2010; George y Clickmore, 2012).

Tabashnik *et al.* (1998) y otros autores indicaron que el modo de resistencia más estudiado y verificado experimentalmente es el modo 1, que se caracteriza por una herencia recesiva, una unión reducida por al menos una toxina CryA y una resistencia cruzada (insignificante) a Cry1C (Heckel *et al.*, 2007; George y Clickmore, 2012). En plagas de lepidópteros, el tipo de resistencia más común a las toxinas de Bt es el modo 1 (Tabashnik *et al.*, (2004). Gahan *et al.* (2007) han reportado que hay varios métodos que permiten detectar la manifestación de resistencia por parte de un organismo; en caso de tratarse de un organismo genéticamente modificado, la resistencia ha sido detectada por medio del ADN en poblaciones de campo que están asociados con la supervivencia en los cultivos Bt ellos mismos hacen mención que hasta hace un tiempo, la detección mediante ADN no era aplicable en cultivos Bt, debido a que se desconocía la base genética de la resistencia. Ahora que se conoce que las mutaciones en los genes de cadherina son la base principal de la resistencia, estos genes podrían proporcionar un mayor progreso en el monitoreo y manejo de la resistencia (Gould *et al.*, 1997). En la presente investigación, el propósito fue detectar molecularmente alelos del gen Bt que codifica para resistencia a la toxina Cry1Ac en *S. frugiperda* bajo los supuestos de:

- La colecta de la línea de campo se llevó a cabo en localidades de la comarca lagunera en el cultivo de maíz, sembrado cerca de algodón genéticamente modificado.
- El algodón y maíz comparten a *S. frugiperda* como plaga en común. Esta plaga tiene mayor afinidad al maíz y es plaga principal de este.
- La existencia de flujo de poblaciones de *S. frugiperda* entre algodón GM y maíz convencional.
- El maíz por ser preferente para *S. frugiperda* puede ser reservorio para individuos que hayan podido adquirir resistencia a la toxina Bt.

La detección de resistencia de las poblaciones de *S. frugiperda*, en este trabajo fue negativa de acuerdo con el producto resultado de la PCR, en donde ninguna de las muestras amplificó para los diferentes juegos de iniciadores específicos para alelos del gen de resistencia hacia la toxina Cry1Ac de *B. thuringiensis* y que es mediada por una mutación en el receptor cadherina. Al obtener un resultado negativo no hubo necesidad de purificar el producto de PCR y realizar una secuenciación.

Existen investigaciones donde se ha llevado a cabo ensayos para detectar si una plaga ha generado resistencia a las toxinas Cry, con resultados que muestran que la plaga estudiada es resistente. Se tienen informes de resistencia en países como Puerto Rico (Storer *et al.*, 2010), Brasil (Farías *et al.*, 2014, Monnerat *et al.*, 2015) y Estados Unidos, en donde *S. frugiperda* desarrollo resistencia a maíz Bt que expresa la toxina Cry1F.

Siegfried *et al.* (2014), junto con otros autores hacen mención que la resistencia es algo que no puede evitarse, sin embargo; se cuenta con estrategias para retrasar su aparición y que permita que esta tecnología siga siendo funcional. Alta Dosis-Refugio (AD-R) es la estrategia aceptada mundialmente para disminuir la tasa de evolución de resistencia de plagas a cultivos Bt (Andow, 2008). Huang *et al.* (2011) explicaron que la tecnología Bt en plantas, consiste en que el cultivo exprese una concentración de toxina que elimine el 99.99% de la fracción homocigota de las plagas respecto al carácter de susceptibilidad de la toxina, y a la vez provoque la mortalidad de un muy elevado porcentaje ($\geq 95\%$) de la fracción heterocigota para el mismo carácter. El objetivo es que la planta una vez transformada con el gen de la toxina, exprese suficiente cantidad de ésta, como para aniquilar a las plagas susceptibles que la consumen (Soberón y Bravo, 2007). Para el caso de los refugios, Trumper (2014) señala que estos consisten en un área total sembrada con cultivo Bt, un cierto porcentaje sea destinado a plantas no Bt. La idea es que la población resistente (que se espera que sea poca) se cruce con individuos susceptibles pertenecientes al cultivo no Bt que no han sido

sometidos a una presión de selección para que la progenie sea susceptible y sea aniquilada por la planta Bt.

Tabashnik *et al.* (2008) demostraron que el uso de refugios disminuye la aparición de resistencia, esto lo realizaron en ensayos con poblaciones de *H. zea* muestreadas durante 2003-2004 y 2005-2006 en algodón Bt que expresa la toxina Cry1Ac.

Trumper (2014) indica que hay cultivos Bt que se han diseñado para que expresen más de una toxina Cry. Este tipo de cultivos son conocidos como “piramidales”, algunos materiales son conocidos como Bollgard II. En la comarca lagunera se siembra algodón Bollgard II, que además de la toxina Cry1Ac, expresa la proteína Cry2Ab (Greenplate *et al.*, 2005), esto proporciona mayor efectividad y contrarresta la posibilidad de que la plaga genere resistencia. Para esto Ferré *et al.* (2008) explican que el supuesto subyacente de esta táctica es que los diferentes modos de acción implican receptores diferentes en la membrana celular del epitelio intestinal. Por lo que se espera que para la plaga sea mucho más difícil modificar dos sitios de unión. Esta estrategia también ayuda a contrarrestar la posible aparición de resistencia cruzada.

Además de las proteínas Cry, *B. thuringiensis* produce toxinas Cyt (Soberón y Bravo, 2007; Portela-Dussán *et al.*, 2013) y proteínas vegetativas Vip (Estruch *et al.*, 1996; Gatehouse, 2008; Palma *et al.*, 2012; Trumper, 2014), ambos tipos con propiedades insecticidas. Lo interesante de estas proteínas es que difieren a las toxinas Cry en el sitio de unión donde se forma el poro en la membrana del intestino de la larva (Soberón y Bravo, 2007; Trumper, 2014).

Soberón y Bravo (2007) demostraron la no aparición de insectos resistentes debido a la presencia de la toxina Cyt1Aa, ya que al parecer esta toxina sinergiza la actividad insecticida de las toxinas Cry; es decir, la actividad tóxica de la mezcla de toxinas Cry y Cyt es mucho mayor que la suma de sus actividades individuales. Así mismo mostraron que la toxina Cyt1Aa se inserta a la membrana y funciona como receptor proteínico de las toxinas Cry.

Ambos tipos de proteínas (Cyt y Vip) muestran potencial que las convierten en una buena opción para complementar a las proteínas Cry en estrategias de manejo de resistencia (Palma *et al.*, 2012; Ruiz *et al.*, 2014; Trumper, 2014).

La estrategia de acumular toxinas Bt ofrece sus mejores perspectivas, según Trumper (2014), pues se implementan en forma proactiva, pero si se llega a aplicar cuando ya surgió la resistencia a una de las toxinas, entonces parece que pierde sus beneficios.

Gutiérrez *et al.* (2015) explican que los beneficios de la tecnología Bt, serán aprovechados al máximo, cuando se hace un manejo responsable de esta tecnología donde se incluya serán el uso de refugios para insectos, los cuales no estén sujetos a la presión de selección, es decir que sean homocigotos susceptibles que ayuden a disminuir posibles genes resistentes al cruzarse con poblaciones en contacto con la presión de selección (homocigotos y heterocigotos resistentes).

5.- CONCLUSIÓN

Las poblaciones de *S. frugiperda* de San Pedro de las Colonias y Torreón, Coah., de maíz convencional asociado al algodón GM, no presentaron el gen que confieren resistencia a la toxina Cry1Ac producida por *B. thuringiensis*.

El gusano cogollero *S. frugiperda* no ha desarrollado resistencia a la toxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* en el algodón GM, lo que indica que este sigue siendo efectivo para el control de esta plaga.

La introducción de algún otro cultivo Bt, por ejemplo, el maíz GM en esta área productiva, puede ser efectiva para el control de gusano cogollero *S. frugiperda*.

El uso constante de esta tecnología y dada las características para el desarrollo de resistencia, hacen necesario el muestreo periódico y su detección, para este cultivo y sus principales plagas blanco.

6.- LITERATURA CITADA

- Adamczyk** J. J., Holloway J. W., Church G. E., Leonard B. R. & Graves J.B. 1998 Larval survival and development of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) on normal and transgenic cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac –endotoxin. *Journal of Economic Entomology*. 91: 539-545.
- Adang**, M., Crickmore, N. & Jurat-Fuentes, J. L. in *Advances in Insect Physiology* Vol. 47: Insect Midgut and Insecticidal Proteins (Eds. T. S. Dhadialla & S. Gill) 39-87 (Academic Press, 2014).
- Aguirre**, L. A., Hernández, A., Flores, M., Cerna, E., Landeros, J., Frías, G. A. y Harris, M. K. 2016. Evaluation of Foliar Damage by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to Genetically Modified Corn (Poales: Poaceae) in Mexico. *Florida Entomologist*. 99(2):276-280.
- Aguirre**, L. A., Hernández, A., Flores, M., Pérez, R., Cerna, E., Landeros, J. y Frías, G. A. 2015. Comparación del Nivel de Daño de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) en Plantas de Maíz Genéticamente Modificado y Convencional en el Norte de México. *Southwestern Entomologist*, 40(1):171-178.
- Akhurst**, R. J., James, L. and Beard C. 2003. Resistance to the Cry1Ac δ -Endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in the Cotton Bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*. 96 (4):1290-1299.
- Andow**, D. A., 2008. The risk of resistance evolution in insects to transgenic insecticidal crops. *Collection of Biosafety Reviews* 4:142–99.
- Ángulo**, J. M. 2000. Manejo del Gusano cogollero del maíz utilizando extractos de plantas. Disponible en: www.turipana.org. Fecha de consulta: 29 de enero de 2019.
- Arenas**, I., Bravo, A., Soberón, M. and Gómez, I. 2010. Role of alkaline phosphatase from *Manduca sexta* in the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *The Journal of Biological Chemistry*. 285:12497–12503.

- Balaraman**, K. 2005. Occurrence and diversity of mosquitocidal strains of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Vector Borne Diseases*. 42:8186.
- Banerjee**, R., Hasler, J., Meagher, R., Nagoshi, R., Hietala, L., Huang, F., Narva, K. and Jurat-Fuentes, J. L. 2017. "Mechanism and DNA-based detection of field-evolved resistance to transgenic Bt corn in fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*". *Scientific Reports* 7(1): 10877.
- Blanco**, C. A., Storer, N. P., Abel, C. A., Jackson, R., Leonard, R., López, J., D., Payne, G., Siegfried, B. D., Spencer, T. & Teranvargas, A. P. 2008. Baseline susceptibility of tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) to Cry1F toxin from *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Economic Entomology*. 101: 168-173.
- Bolívar**, F. G., Arias, C. F., Ascacio, J. A., Barrera, H. A., Bosch, P., Cárdenas, H. M., et al. 2004. Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna. 2ª Ed. El Colegio Nacional. México. Págs. 85-116.
- Bravo**, A., Gómez, I., Conde, J., Muñoz, C., Sánchez, S., Miranda, R., Zhuang, M., Gill, S. S. & Soberón, M. 2004. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1667:38-46.
- Broderick**, N. A., Kenneth, F. R. & Handelsman, J. 2006. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *Proceedings of the National of Academy of Sciences of the USA*. 15196-15199.
- Brown**, A. W.A. & Pal, R. 1971. Insecticide resistance in arthropods. In World Health Organization. Monograph Series N°. 38. Geneva. P. 491.
- Bulla**, L. A., Jr., & Candas, M. 2004. *Pectinophora gossypiella* (Pink Bollworm) *Bacillus thuringiensis* Toxin Receptor BT-R2.
- Caccia**, S., Moar W. J., Chandrashekhar, J., Oppert, C., Anilkumar, K. J., Jurat-Fuentes J. L. & Ferré, J. 2012. Association of Cry1Ac toxin resistance in *Helicoverpa zea* (Boddie) with increased alkaline phosphatase levels in the midgut lumen. *Applied and Environmental Microbiology*. 78 (16): 5690-5698.

- Capinera**, J. L. 1999. Beet Armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). University of Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, EDIS.
- Casmuz**, A., Juárez, M. L., Socías, M. G., Murúa, M. G., Prieto, S., Medina, S., Willink, E, y Gastaminza, G. 2010. Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*. 69 (3-4): 209-231.
- CEDRSSA**. 2019. Maíz Transgénico en México. Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria. CEDRSSA. Ciudad de México. 9 p.
- CERA**. 2010. The Center for Environmental Risk Assessment. Disponible en <http://cera-gmc.org/>. Fecha de consulta: 21 de enero de 2019.
- Cerda**, H. & Wright, D. J. 2004. Modeling the Spatial and Temporal Location of Refugia to Manage Resistance in Bt Transgenic Crops. *Agriculture, Ecosystems Environment*. 102:163-174.
- Chaparro**, A. 2011. Cultivos transgénicos: entre los riesgos biológicos y los beneficios ambientales y económicos. *Acta biológica Colombiana*. Volumen (16). p. 231-252. Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co>. Fecha de consulta: 12 de enero de 2019.
- CONACYT**. 2017. Por un uso responsable de los organismos genéticamente modificados. Disponible en: www.conacyt.gob.mx/cibiogem/images/cibiogem/comunicacion/publicaciones/Por_un_uso_responsable_OGMs.pdf. Fecha de consulta: 08 de enero de 2019.
- Crava**, C. M., Farinós, G. P., Bel, Y., Castañera, P. and Escriche, B. 2013. Quantitative genetic analysis of Cry1Ab tolerance in *Ostrinia nubilalis* Spanish populations. *Journal of Invertebrate Pathology*. 113:220-227.
- Crickmore**, N., Zeigler, D. R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J. & Dean, DH. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62(3):807-813.

- Daar, A., Martin, D., Nast, S., Smith, A., Singer, P. & Thorsdottir, H.** 2002. Top ten biotechnologies for improving health in developing countries, *Nature Genetics* 32, 229-232.
- De Maagd, R., Bravo, A. & Crickmore, N.** 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genet.* 17: 193-199.
- Dhurua, S. & Gujar, T. G.** 2011. Field-evolved resistance to Bt toxin Cry1Ac in the pink bollworm, *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera: Gelechiidae), from India. *Pest management Science.* 67(8):898-903.
- Doyle, J. & Doyle, J.** 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus.* 12(1), 13-15.
- Estruch, J. J., Warren, G. W., Mullins, M. A., Craig, J. A. & Koziel, M. G.** 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the U. S. A.* 93:5389-5394.
- FAO.** 2017. Ciclo biológico del gusano cogollero del maíz (en América Latina). Disponible en: <http://www.fao.org>. Fecha de consulta: 29 de enero de 2019.
- Fariás, J. R., Andow, D. A., Horikoshi, R. J., Sorgatto, R. J., Fresia, P., dos Santos, A. C. & Omoto, C.** 2014. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Crop Protection.* 64:150–158.
- Ferré, J. y Van Rie, J.** 2002. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review Entomology.* 47: 501-533.
- Ferré, J., Van Rie, J. and Macintosh, SC.** 2008. Insecticidal genetically modified crops and insect resistance management (IRM). Integration of insect-resistant genetically modified crops within IPM Programs. Springer, pp. 41-85.
- Gahan, L. J., Gould, F., López, J. D., Micinski, S. & Heckel, D. G.** 2007. A Polymerase Chain Reaction Screen of Field Populations of *Heliothis virescens* for a Retrotransposon Insertion Conferring Resistance to *Bacillus thuringiensis* *Journal of Economic Entomology.* 100(1): 187-194.
- Gatehouse, J. A.** 2008. Biotechnological Prospects for Engineering Insect-Resistant Plants. *Plant Physiology.* 146 (3): 881-887.

- George, Z.** & Crickmore, N. 2012. *Bacillus thuringiensis* Applications in Agriculture. En E. Sansinenea (Ed.): *Bacillus thuringiensis* Biotechnology. Springer, pp. 19-39.
- Gómez, I.,** Sánchez, J., Miranda, R., Bravo, A. & Soberón, M. 2002. Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix alpha-1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Letters*. 513 (2-3): 242-246.
- Gong, Y. J.,** Wang, C. L., Yang, Y. H., Wu S. W., & Wu Y. D. 2010. Characterization of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in *Plutella xylostella* from China. *Journal of Invertebrate Pathology*. 104(2):90-96.
- Gould, F.,** Anderson, A., Jones, A., Sumerford, D., Heckel, D. G., Lopez, J., Micinski, S., Leonard, R. and Laster, M. 1997. Initial frequency of alleles for resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in populations of *Heliothis virescens*. *Proceedings of National Academy of Sciences of the U.S.A.* 94: 3519-3523.
- Gould, F.,** Anderson, A., Reynolds, A., Bumgarner, L. & Moar, W. 1995. Selection and genetic analysis of a *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) strain with high levels of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Journal Economic Entomology*. 88: 1545-1559.
- Green, J.,** Aschengrau, A., McKelvey, W., Rudel, R. A., Swartz, C. H. & Kennedy, T. 2004. Breast cancer risk and historical exposure to pesticides from wide-area applications assessed with GIS. *Environmental Health Perspectives*. 112(8), 889-897.
- Greenplate, J. T.** Mullins, J. W. Penn, S. R. Dahm, A. Reich, B. J. Osborn, J. A. Rahn, P. R. Ruschke, L. & Shappley, Z. W. 2003. Partial characterization of cotton plants expressing two toxin proteins from *Bacillus thuringiensis*: relative toxin contribution, toxin interaction, and resistance management. *Journal of Applied Entomology*. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1439-041.2003.00766.x>
- Gutiérrez, D.,** Ruíz, R. y Xoconostle, B. 2015. Estado Actual de los Cultivos Genéticamente Modificados en México y su Contexto Internacional. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. México, DF. 1ª. Edición. México. 194 p.

- Haile**, F. J., Braxton, L., Flora, E. A., Haygood, B., Huckaba, R. M., Pellow, J. W., Langston, V. B., Lassiter, R. B., Richardson, J. M. & Richburg, J. S. 2004. Efficacy of Widestrike cotton against non-heliothine Lepidopteran insects. Proceedings of the 2004 Beltwide Cotton Conference, 2004. 5-9 p.
- Halford**, N. G. & Shewry, P. R. 2000. Genetically Modified Crops: Methodology, Benefits, Regulation and Public Concerns. *British Medical Bulletin*. 56 (1): 62-73.
- Heckel**, D. G, Gahan, L. J., Baxter, S. W., Zhao J. Z., Shelton, A. M., Gould, F. & Tabashnik, B. E. 2007. The diversity of Bt resistance genes in species of Lepidoptera. *Journal of Invertebrate Pathology*. 95(3):192-197.
- Hernández**, A., Aguirre, L. A., Flores, M., Cerna, E., Landeros, J., Ochoa, Y. M. y Frías, G. 2016. Incidencia y severidad de pudrición de mazorcas de maíz genéticamente modificado y convencional en Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 7: 1477-1484.
- Hernández-Juárez**, A., Aguirre, L. A., Cerna, E., Flores, M., Frías, G. A., Landeros, J. y Ochoa, Y. M. 2019. Abundance of non-target predators in genetically modified corn. *Florida Entomologist*. 102(1): 96-100.
- Hernández-Juárez**, A., Aguirre, L. A., Cerna, E., Landeros, J., Frías, G., Flores, M. y Ochoa, Y. M. 2018. Effect of Transgenic Maize on Abundance of the Corn Flea Beetle, *Chaetocnema pulicaria* Melsheimer, as a Non-Target Pest. *Southwestern Entomologist*. 43 (4): 841-846.
- Herrera-Estrella**, L. y Martínez, M. 2004. Plantas Transgénicas, En: Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna, Francisco G. Bolívar Zapata Comp. y Ed., El Colegio Nacional, México. Págs. 167-194.
- Huang**, F., Andow, D. and Buschman, L. L. 2011. Success of the high-dose/refuge resistance management strategy after 15 years of Bt crop use in North America. *Entomologia Experimentalis et Applicta*. 140:1-16.
- Huang**, F., Qureshi, J. A., Meagher Jr, R. L., Reising, D. D., Head, G. P., Andow, D. A., Ni, X., Kerns, D., Buntin, G. D., Niu, Y., Yang, F. & Dangal, V. 2014. Cry1F resistance in fall armyworm *Spodoptera frugiperda*: single gene versus

pyramided Bt maize. *PLoS One* 9 (11): e112958. DOI: 10.1371/journal.pone.0112958.

Ibarra, E., Del Rincón, M., Galindo, E., Patiño, M., Leobardo, S., García, R., Carrillo, J., Pereyra, B., Alcázar, A., Luna, Hugo., Galán, L., Pardo, L., Muñoz, C., Gómez, I., Soberón, M. y Bravo, A. 2006. Los microorganismos en el control biológico de insectos y fitopatógenos. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 48 (2): 113-120.

ICA. 2004. Boletín de epidemiología 2003. Instituto Colombiano Agropecuario. Subgerencia de Protección y Regulación Agrícola. Bogotá DC, Colombia. Pp 19-26.

ISAAA. 2018. International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications. GM Approval Database. ISAAA, Ithaca, New York, USA. Disponible en: www.isaaa.org. Fecha de consulta: 10 de enero de 2019.

Ives, A. R., Glaum, P. R., Ziebarth, N. L. & Andow, D. A. 2011. The evolution of resistance to two-toxin pyramid transgenic crops. *Ecological Applications*. 21:503–515.

Jakka, S. R., Gong, L., Hasler, J., Banerjee, R., Sheets, J., Narva, K., Blanco, C. & Jurat-Fuentes, J. L. 2015. Field-evolved Mode 1 resistance of the fall armyworm to transgenic Cry1Fa-expressing corn associated with reduced Cry1Fa toxin binding and midgut alkaline phosphatase expression. *Applied and Environmental Microbiology*. 82:1023-1034.

James, C. 2010. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications (ISAAA). Brief No. 42. Executive Summary. 2010. ISAAA: Ithaca, NY. Disponible en <http://www.isaaa.org>

Jurat-Fuentes, J. L. 2015. Characterization of Cry toxin mode of action. Department of Entomology and Plant Patología. The University of Tennessee. Knoxville, Tennessee. Disponible en: <http://web.utk.edu/~jurat/Btresearchtable.html>. Fecha de consulta: 21 de enero de 2019.

Liu, L., Gao, M., Yang, S., Liu, S., Wu, Y., Carrière, Y., & Yang, Y. 2016. Resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry2Ab and survival on single- toxin and

pyramided cotton in cotton bollworm from China. *Evolutionary Applications*. 10 (2):170-179.

- Luna, M.** y Altamirano, J. 2015. Maíz transgénico: ¿Beneficio para quién? Estudios sociales (Hermosillo, Son.). 23(45): 141-161.
- Maduell, P.,** Callejas, R., Cabrera, K.R., Armengol G. & Orduz S. 2002. Distribution and characterization of *Bacillus thuringiensis* on the phylloplane of species of Piper (Piperaceae) in three altitudinal levels. *Microbial Ecology*. 44: 144-153.
- Monnerat, R.,** Martis, E., Mancedo, C., Queiroz, P., Praca, L., Marcelo, C., Moreira, H., Grisi, I., Silva, J., Soberon, M. & Bravo, A. 2015. Evidence of Field-Evolved Resistance of *Spodoptera frugiperda* to Bt Corn Expressing Cry1F in Brazil That Is Still Sensitive to Modified Bt Toxins. PLoS ONE 10(4). DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119544>.
- Monsanto** Agricultura España. 2002. Seguridad del algodón Bollgard® evento 531, genéticamente protegido contra las orugas de las cápsulas. Cuaderno Técnico Nº 4. Madrid. 44 p.
- Morin, S.,** Biggs, R. W., Sisterson, M. S., Shriver, L., Ellers-Kirk, C., Higginson, D., Holley, D., Gahant, L. J., Heckel, D. G., Carriere, Y., Dennehy, T. J., Brown, J. K. and Tabashnik, B. E. 2003. Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 100(9):5004-5009.
- Palma, L.,** Hernández-Rodríguez, S. C., Maeztu, M., Hernández-Martínez, P., Ruiz de Escudero, I., Escriche, B., Muñoz, D., Van Rie, J. Ferré, J. and Caballero, P. 2012. Vip3C, a novel class of vegetative insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 78:7163-7165.
- Pashley, D. P.,** Johnson, S. J., & Sparks. A. N. 1985. Genetic population structure of migratory moths: the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 78: 756-762.
- Pashley, D. P.,** McMichael M., & Silvain, J. F. 2004. Multilocus genetic analysis of host use, introgression, and speciation in host strains of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) *Annals of the Entomological Society of America*. 97 (5): 1034-1044.

- Pereira, J. G., Lang, B. A., Storer, N. P., Siegfried, B. D.** 2008. Selection for Cry1F resistance in the European corn borer and cross-resistance to other Cry toxins. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 126(2):115-121.
- Perlak, F. J., Oppenhuizen, M., Gustafson, K., Voth, R., Sivasupramaniam, S., Heering, D., Carey, B., Ihrig, R. A. & Roberts, J. K.** 2001. Development and commercial use of Bollgard® cotton in the USA-early promises versus today's reality. *The Plant Journal*. 27(6):489-501.
- Pigott, C. R. and Ellar, D.** 2007. Role of Receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 71:255-281.
- Pitre, H. N., Hogg, D. B.** 1983. Desarrollo del gusano ejército de otoño sobre algodón, soja y maíz. *Revista de la Sociedad Entomológica de Georgia* 18: 187-194.
- Porcar, M. y Juárez-Pérez, V.** 2004. Aislamiento y establecimiento de una colección de *Bacillus thuringiensis*. En *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. Bravo, A. y Cerón, J. Eds. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. pp. 69-100.
- Portela-Dussán, D. D., Chaparro-Giraldo, A. y López-Pazos, S. A.** 2013. La biotecnología de *Bacillus thuringiensis* en la agricultura. Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C., Colombia. Pp 85-96.
- Potrikus, I.** 1989, Gene transfers to cereals: an assessment. *Trends in Biotechnology* 7: 269-273.
- Purohit, S.** 2003. Agricultural biotechnology, Agrobios. 1030 Pp.
- Ruiz de Escudero, I., Banyuls, N., Bel, Y., Maeztu, M., Escriche, B., Muñoz, D., Caballero, P. and Ferré, J.** 2014. A screening of five *Bacillus thuringiensis* Vip3A proteins for their activity against lepidopteran pests. *Journal of Invertebrate Pathology*. 117: 51-55.
- Ruiz de Escudero, I., Ibañez I., Padilla M., Carnero A. y Caballero P.** 2004. Aislamiento y caracterización de nuevas cepas de *Bacillus thuringiensis* procedentes de tierras canarias. *Bol. San. Veg. Plagas*. 30: 703-712.
- S.A.R.H.** 1992. Guía fitosanitaria para el cultivo de maíz. Dirección de sanidad vegetal. Mexico.87 Pp.

- Santos**, A. O., Restrepo, O. D., Argüelles, J., y Aguilera, E. A. 2009. Evaluación del comportamiento del complejo *Spodoptera* con la introducción de algodón transgénico al Tolima, Colombia. *Rev. Corpoica, Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 10(1):24-32.
- Sauka**, D. H., y Benintende, G. B. 2008. *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Revista Argentina de Microbiología*. Volumen (40): 124-140. Disponible en: <http://www.scielo.org.ar/pdf/ram/v40n2/v40n2a13.pdf>
- Sayed**, A. H., Moores, G., Crickmore, N. & Wright, D. J. 2008. Cross-resistance between a *Bacillus thuringiensis* Cry toxin and non-Bt insecticides in the diamondback moth. *Pest Management Science*. 64(8):813–819
- Schnepf**, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. R. & Dean, D. H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62: 775-806.
- Siegfried**, B. D., Rangasamy, M., Wang, H., Spencer, T., Haridas, C. V., Tenhumberg, B., Sumerford, D. V. & Storer, N. P. 2014. Estimating the frequency of Cry1F resistance in field populations of the European corn borer (Lepidoptera: Crambidae). *Pest Management Science*. 70:725–33.
- Silva**, C. A. 2005. Algodón Genéticamente Modificado. AGRO-BIO. 1ª. Edición. Bogotá, D.C., Colombia. 49p.
- Soberon**, M. y Bravo, A. 2007. Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación. Pp 303-313.
- Storer**, N. P. Babcock, J. M. Schlenz, M. Meade, T. Thompson, G. D. Bing, J. W. & Huckaba, R. M. 2010. Discovery and Characterization of Field Resistance to Bt Maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. *Journal of Economic Entomology*. 103(4):1031-1038.
- Tabashnik**, B. E., Liu, Y. B., Unnithan, D. C., Carrière, Y., Dennehy T. J. and Morin, S. 2004. Shared genetic basis of resistance to Bt toxin Cry1Ac in independent strains of pink bollworm. *Journal of Economic Entomology* 97(3):721-726.
- Tabashnik**, B. E., Brévault, T. and Carrière, Y. 2013. Insect resistance to Bt crops: Lessons from the first billion acres. *Nature Biotechnology*. 31:510-521.

- Tabashnik**, B. E., Finson, N., Johnson, M. and Moar, W. 1993. Resistance to Toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* Causes Minimal Cross-Resistance to *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* in the Diamondback Moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Applied and Environmental Microbiology*. 59 (5): 1332-1335.
- Tabashnik**, B. E., Gassmann, A., Crowder, D. & Carrère, Y. 2008. Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory. *Nature Biotechnology*. 26 (2): 199-202.
- Tabashnik**, B. E., Mota-Sanchez, D., Whalon, M. E., Hollingworth, R. M. & Carrière, Y. 2014. Defining terms for proactive management of resistance to Bt crops and pesticides. *Journal of Economic Entomology*. 107:496–507.
- Tay**, W. T., Mahon, R. J., Heckel, D. G., Walsh, T. K., Downes, S., James, W.J., Lee, S., Reineke, A., Williams, A. K. & Gordon, K. H. J. 2015. Insect Resistance to *Bacillus thuringiensis* Toxin Cry2Ab Is Conferred by Mutations in an ABC Transporter Subfamily A Protein. *PLoS Genetics*. 11(11). DOI: e1005534. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005534>.
- Torres**, J. B. y Ruberson, J. R. 2008. Interactions of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in genetically engineered cotton with predatory heteropterans. *Transgenic Research*. 17: 345-354.
- Trigo**, E. J. y Capp, E. J. 2006. Ten years of genetically modified crops in argentine agriculture. Disponible en: https://inta.gob.ar/sites/default/files/scriptmpten_years_gm_crops_argentine_agriculture.pdf . Fecha de consulta: 15 de enero de 2019.
- Trumper**, E. V. 2014. Resistencia de insectos a cultivos transgénicos con propiedades insecticidas. Teoría, estado del arte y desafíos para la República Argentina. *AGRISCIENTI*. 31(2): 109-126.
- Valencia**, S. J. 2013. Efecto de las tecnologías Bollgard® y Bollgard II® de variedades genéticamente modificadas (GM) de algodón sobre larvas y adultos del falso bellotero *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae). Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia. Palmira, Colombia. 69 p.

- Valencia**, S., Rodríguez, J. y Mesa, N. 2014. Efecto de variedades de algodón genéticamente modificadas sobre larvas de *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Agronomica*. 63 (1): 63-70.
- Van Rensburg**, J. B. J., 2007. First report of field resistance by stem borer, *Busseola fusca* (Fuller) to Bt-transgenic maize. *South African Journal of Plant and Soil*. 24:147–151.
- Vélez**, A. R. 1997. Plagas agrícolas de impacto económico en Colombia: bionomía y manejo integrado. Editorial Universidad de Antioquia.
- Villalobos**, V. M. 2007. Los transgénicos: Oportunidades y amenazas. Mundi-Prensa, México, S.A de C.V. 1ª. Edición. México. 107p.
- Watson**, J., Gilman, M., Witkowski, J. & Zoller, M. 1996, Recombinant DNA. W.H. Freeman & Co, USA.
- Xu**, L., Wang, Z., Zhang, J., He, K., Ferry, N. & Gatehouse, A. M. R. 2010. Cross-resistance of Cry1Ab selected Asian corn borer to other Cry toxins. *Journal of Applied Entomology*. 134(5):429-438.
- Yang**, Y., Chen, H., Yidong, W., Yang, Y., Shuwen, W. 2007. Mutated Cadherin Alleles from a Field Population of *Helicoverpa armigera* Confer Resistance to *Bacillus thuringiensis* Toxin Cry1Ac. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(21): 6939-6944.
- Ye**, X., Al-babili, S., Klotti, A., Zhang, J., Lucca, P. Beyer, & Potrykus, I. 2000. Engineering the provitamin A biosynthetic pathway into rice endosperm. *Science*. 287: 303-305.
- Yu**, X., Zheng, A., Wang, S., Li, S., Zhu, J., Wang, L., Liu, H., Deng, Q. and Li, P. 2011. Characterization of vegetative insecticidal protein Vip genes of *Bacillus thuringiensis* from Sichuan Basin in China. *Current Microbiology* 62: 752-757.
- Zenner**, D. P., Álvarez, R. J., Mejía, C. R., y Bayona, R. M. 2005. Influencia de la toxina Cry1Ac del *Bacillus thuringiensis* sobre el desarrollo del cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). *Rev. U.D.C.A Acta División de Ciencias*. 8 (2):129-139.

Zenner, D. P., Arévalo, M. H., y Mejía, C. R. 2007. El gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) y algunas plantas transgénicas. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*. 1:103-113.