

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



GENES DE RESISTENCIA A LAS TOXINAS Cry DE *Bt* EN POBLACIONES DE
LEPIDÓPTEROS EN CAMPO, MEDIANTE DETERMINACIÓN MOLECULAR.

Tesis

Que presenta ESMERALDA AMADA HERNÁNDEZ LÓPEZ
como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRICOLA

Saltillo, Coahuila, México

Diciembre, 2024

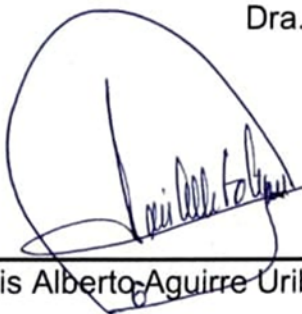
GENES DE RESISTENCIA A LAS TOXINAS Cry DE *Bt* EN POBLACIONES
DE LEPIDÓPTEROS EN CAMPO, MEDIANTE DETERMINACIÓN
MOLECULAR.

Tesis

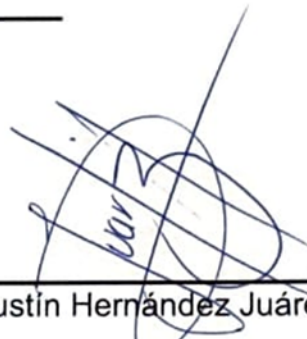
Elaborada por ESMERALDA AMADA HERNÁNDEZ LÓPEZ como requisito
parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias en Parasitología Agrícola
con la supervisión y aprobación del Comité de Asesoría



Dra. Miriam Sánchez Vega
Director de Tesis




Dr. Luis Alberto Aguirre Uribe
Asesor



Dr. Agustín Hernández Juárez
Asesor



Dr. Marco Adán Juárez Verdayes
Asesor



Dr. Antonio Flores Naveda
Subdirector de Postgrado
UAAAN

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a **Dios** por concederme la perseverancia para poder tener este nuevo logro en mi formación profesional y acompañarme en cada momento de mi vida.

Agradezco infinitamente el apoyo de mis padres **Elena y Fernando**, así como el de mis hermanos, **Fernando, Mauricio y Elena**.

A la **Dra. Miriam Sánchez Vega** por ser mi asesor en este proyecto de tesis y su apoyo brindado.

A los doctores **Marco Adán Juárez Verdayes y Javier Israel Montalvo Arredondo** que estuvieron conmigo compartiendo sus conocimientos a lo largo del desarrollo de este proyecto y sobre todo por brindarme su amistad.

A la **Dra. Mona Kassem** por brindarme su apoyo durante mi estancia en CIQA.

A los doctores **Luis Alberto Aguirre Uribe y Agustín Hernández Juárez** por ser parte del comité asesor en este trabajo de tesis.

A los técnicos de campo que me apoyaron en las diferentes zonas productoras en las que se realizaron las colectas de insectos y al **Comité de Sanidad Vegetal del Estado de Baja California**.

A todas aquellas personas que en el transcurso de la maestría me brindaron su apoyo y amistad, especialmente a **Tadeo, Dani Mireles** y a mis compañeros del laboratorio de bioingeniería molecular y bioinformática de la UAAAN.

Al **M.C David** que desde que nos conocimos al entrar a la maestría fue un gran compañero y amigo, gracias por estar y apoyarme en todo momento.

También agradezco al **Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONHACYT)**, por el apoyo de la beca de postgrado brindada; así como al Programa de Investigadores por México (IxM) del mismo **CONHACYT**, debido a que el presente trabajo se derivó del Proyecto 1043 “Monitoreo de la resistencia de insectos a las toxinas Cry de *Bt*”.

DEDICATORIA

A ***Dios***, por siempre estar conmigo y concederme perseverancia a lo largo del emprendimiento de cualquier proyecto en mi vida.

A mis ***padres*** y a mis ***hermanos***, porque este logro también es de ustedes.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|------|
| AGRADECIMIENTOS..... | iii |
| DEDICATORIA | iv |
| ÍNDICE GENERAL..... | v |
| LISTA DE CUADROS | vii |
| LISTA DE FIGURAS | viii |
| RESUMEN..... | ix |
| ABSTRACT..... | xi |
| INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| Objetivos..... | 2 |
| Objetivo general..... | 2 |
| Objetivos específicos..... | 2 |
| Hipótesis | 3 |
| Justificación | 3 |
| REVISIÓN DE LITERATURA | 4 |
| Historia de la Introducción de Cultivos GM | 4 |
| Plantas Transgénicas | 4 |
| <i>Bacillus thuringiensis</i> | 5 |
| Cultivos <i>Bt</i> | 5 |
| Modo de Acción de las Proteínas Cry..... | 6 |
| Resistencia de Insectos a las Toxinas Cry | 6 |
| Estrategias Implementadas Ante la Resistencia a las Toxinas Cry | 8 |
| Cultivos Refugio..... | 9 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 10 |
| Ubicación de la Zona de Estudio | 10 |
| Colecta del Material Biológico | 10 |
| Limpieza de Muestras..... | 11 |
| Identificación morfológica de Insectos | 11 |

| | |
|--|----|
| Diseño de oligos específicos para <i>S. frugiperda</i> y <i>H. zea</i> | 11 |
| Extracción de ADN | 13 |
| Oligos Utilizados para la Detección de la Mutante..... | 14 |
| Reacción en Cadena de Polimerasa | 14 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 16 |
| Identificación Molecular de los Insectos Colectados | 17 |
| Detección del Gen de Resistencia <i>SfABCC2mut</i> (GC)..... | 20 |
| CONCLUSIONES | 25 |
| REFERENCIAS | 26 |

LISTA DE CUADROS

| | |
|---|----|
| Cuadro1. Casos de resistencia a las proteínas <i>Bt</i> en diferentes países productores de cultivos genéticamente modificados con esta tecnología..... | 8 |
| Cuadro 2. Oligos universales y especie específicos diseñados..... | 13 |
| Cuadro 3. Oligos para la identificación de la mutante <i>SfABCC2</i> | 14 |
| Cuadro 4. Muestras de insectos colectadas y procesadas para la detección de resistencia a las toxinas Cry de <i>Bacillus thuringiensis</i> | 16 |
| Cuadro 5. Frecuencia de la secuencia <i>SfABCC2mut</i> (GC) en <i>S. frugiperda</i> , procedentes de cuatro estados de la República Mexicana productores de algodón <i>Bt</i> (2023). | 21 |

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A) Carril 1 marcador de peso molecular 1Kb, carril 2 control negativo, carril 3-8 oligos 28S banda amplificada 500 pb con el ADN de *Spodoptera frugiperda* y carril 9 y 10 con ADN genómico de *Helicoverpa zea*, B) Carril 1 marcador de peso molecular 1 Kb, carril 2 control negativo, carril 3-10 oligos Sfru2 banda amplificada 335 pb específica para *S. frugiperda*. 17

Figura 2. Carril 1 marcador de peso molecular 1 Kb; oligos (HZE1 carriles, 2 y 3), *H. zea* positiva (292 pb) y control negativo, respectivamente con la muestra de ADN de *H. zea*; carriles 4 y 5, ADN de *S. frugiperda* sin amplificar con oligos HZE1 y control negativo, respectivamente; oligos (FSPF2 carriles 6 y 7), *S. frugiperda* positiva (396 pb) y control negativo, respectivamente con la muestra de ADN de *S. frugiperda*; carriles 8 y 9, ADN de *H. zea* sin amplificar con oligos FSPF2 y control negativo..... 18

Figura 3. A) Carril 1 y 3 fragmento de la región donde se localiza la inserción GC, carril 4 marcador de peso molecular 1 Kb. B) Carril 1-3 individuos tipo silvestre amplificación 330 pb, carril 9 marcador de peso molecular 1 Kb..... 21

Figura 4. Carril 1-3 muestras positivas a mutante *SfABC2mut*, colectadas en el estado de Coahuila, carril 4 control negativo y carril 5 marcador de peso molecular 1 Kb. 22

RESUMEN

GENES DE RESISTENCIA A LAS TOXINAS Cry DE *Bt* EN POBLACIONES DE LEPIDÓPTEROS EN CAMPO, MEDIANTE DETERMINACIÓN MOLECULAR.

POR

ESMERALDA AMADA HERNÁNDEZ LÓPEZ
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DRA. MIRIAM SÁNCHEZ VEGA –ASESOR–

Saltillo, Coahuila

Diciembre, 2024

El cultivo de algodón es uno de los más importantes en el mundo debido a su uso en la industria textil, así como para el aprovechamiento de semillas para elaboración de aceite vegetal, a pesar de que en las últimas dos décadas se ha trabajado con materiales genéticamente modificados para la mejora de este cultivo, existen factores que reducen la efectividad de esta tecnología como es el caso de los insectos plaga. En este estudio se realizó identificación de las principales especies de lepidópteros que se hospedan en este cultivo *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) y *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850), utilizando herramientas moleculares, lo cual facilita la identificación en estadios tempranos impidiendo que estas se establezcan en el cultivo y favorecer el control oportuno de éstas; la identificación de las especies se realizó con el diseño de oligos específicos para lepidópteros mediante el programa Not a-like3, resultando favorable para la identificación de especies de este orden. También se hizo el diagnóstico y monitoreo de la presencia del gen ABBC2 del cassette de unión de ATP, que se ha desarrollado en especies de lepidópteros causando resistencia a las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) que contiene el algodón genéticamente modificado, se encontraron individuos positivos al gen mutante responsable de la resistencia a cultivos transgénicos para el control de lepidópteros, en al menos uno de los estados productores de algodón *Bt* de la República Mexicana. Dicho reporte servirá para establecer estrategias que permitan seguir utilizando cultivos transgénicos, como es el caso del algodón en México, sin riesgo al desarrollo de resistencia de los insectos plaga objetivos a la tecnología *Bt* y que éstas se establezcan de manera abundante en nuestro país, causando problemas en el manejo y producción de los cultivos.

Palabras clave: algodón, *Spodoptera frugiperda*, toxinas Cry, gen mutante de resistencia, SfABBC2.

ABSTRACT

**Bt Cry TOXIN RESISTANCE GENES IN FIELD LEPIDOPTER POPULATIONS
BY MOLECULAR DETERMINATION.**

By

**ESMERALDA AMADA HERNÁNDEZ LÓPEZ
MASTER OF SCIENCE IN AGRICULTURAL PARASITOLOGY**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DRA. MIRIAM SÁNCHEZ VEGA –ASESOR–**

Saltillo, Coahuila

Diciembre, 2024

Cotton is one of the most important crops in the world due to its use in the textile industry, as well as for the use of seeds for the production of vegetable oil. Although in the last two decades work has been done with genetically modified materials for the improvement of this crop, there are factors that reduce the effectiveness of this technology, such as insect pests. In this study, the main lepidopteran species that host this crop, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) and *Helicopea frugiperda* (J. E. Smith, 1797), were identified. Smith, 1797) and *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850), using molecular tools, which facilitates the identification in early stages, preventing their establishment in the crop and favoring their opportune control; the identification of the species was carried out with the design of specific oligos for lepidoptera using the Not a-like3 program, resulting favorable for the identification of species of this order. A diagnosis and monitoring of the presence of the ABBC2 gene of the ATP binding cassette, which has developed in lepidopteran species causing resistance to the Cry toxins of *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) contained in genetically modified cotton, was also carried out. Positive individuals of the mutant gene responsible for resistance to transgenic crops for lepidopteran control were found in at least one of the *Bt* cotton producing states in the Mexican Republic. This report will serve to establish strategies that will allow the continued use of transgenic crops, as is the case of cotton in Mexico, without the risk of the development of resistance of target insect pests to *Bt* technology and that these become abundantly established in our country, causing problems in the management and production of crops.

Key words: cotton, *Spodoptera frugiperda*, Cry toxins, resistance mutant gene, SfABBC2.

INTRODUCCIÓN

El algodón *Gossypium hirsutum* L. tiene importancia a nivel mundial en la industria textil, por su fibra natural, es una fuente de proteína vegetal y además tiene otros tipos de aprovechamiento como la obtención de aceites (Márquez-Licona *et al.*, 2023).

En México desde 1996 debido a los daños ocasionados por la plaga *Pectinophora gossypiella* (Saunders, 1843), se introdujo el uso de cultivos Genéticamente Modificados (GM), que contiene genes que expresan las proteínas de *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1915) (*Bt*) las cuales confieren resistencia a plagas de lepidópteros, así mismo se diseñaron cultivos con tolerancia a herbicidas, principalmente para el control de la maleza con el ingrediente activo glifosato (Rocha-Munive *et al.*, 2018).

Las especies *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) y *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) son consideradas las plagas principales en muchos sistemas de producción agrícola, como el cultivo de algodón y maíz, pero gracias al uso de los cultivares con tecnología *Bt* se ha tenido mayor control comparado con el uso de insecticidas sintéticos, los cuales afectan significativamente el ambiente por las grandes cantidades que se aplican, la salud de los humanos y ponen en riesgo la biodiversidad (Trapero *et al.*, 2016).

La evolución de la resistencia a las toxinas Cry de *Bt* en insectos lepidópteros se ha presentado desde hace algunos años en países como Argentina, Puerto Rico, Brasil y Estados Unidos de América, como para citar algunos ejemplos, lo cual pone en riesgo la sustentabilidad de los cultivos transgénicos y amenaza la producción de varios cultivos de importancia mundial (Banerjee *et al.*, 2017).

En los últimos años se han desarrollado estudios basados en colectas de campo de insectos lepidópteros y su cría en laboratorio con alimentación controlada que

contiene toxinas Cry de *Bt*, esto con el fin de realizar evaluaciones para observar los cambios que estos han desarrollado tanto morfológica, molecular y genéticamente, los cuales han hecho posible el desarrollo de resistencia ante estas toxinas y poder determinar estrategias de control que ayuden a retrasar este desarrollo de ésta o bien proponer estrategias que se puedan implementar sin dejar de lado los cultivos transgénicos que son la herramienta más exitosa para control de plagas, así como para reducir la contaminación ambiental.

Objetivos

Objetivo general

Identificar molecularmente poblaciones de lepidópteros colectados en campo y detectar casos de resistencia a las toxinas Cry de *Bt*, en las regiones productoras de algodón transgénico con la tecnología *Bt* y su interacción con el cultivo de maíz.

Objetivos específicos

Muestrear y coleccionar insectos lepidópteros en los estados productores de algodón *Bt*. y en cultivos donde hubo interacción como maíz y sorgo.

Identificar molecularmente poblaciones de lepidópteros colectados en las regiones productoras del cultivo de algodón *Bt*.

Detectar a nivel molecular la presencia de genes relacionados a la resistencia de la toxina Cry1Ac en poblaciones de lepidópteros muestreados en campos con producción de algodón *Bt* y cultivos aledaños.

Hipótesis

Las poblaciones de campo de lepidópteros que atacan algodón y maíz presentan genes relacionados con la resistencia a las toxinas Cry de *Bt*, lo que podría influir en la presencia de la mutante.

Justificación

Las especies de lepidópteros causan daños económicos en diversos cultivos a nivel mundial, aun con la tecnología *Bt*, debido a la presión de selección que se ha ejercido por más de 20 años sobre estos insectos plaga.

Las técnicas moleculares son una herramienta importante utilizada en la identificación de genes de resistencia involucrados a las toxinas Cry de *Bt*, en poblaciones de lepidópteros de campo, así como en la identificación apropiada de éstas especies, ya que facilitan su manejo.

REVISIÓN DE LITERATURA

Historia de la Introducción de Cultivos GM

La siembra de cultivos transgénicos se inició en 1994, y desde entonces el aumento de superficie sembrada en el mundo ha crecido de manera significativa. El ISAAA reporta que aproximadamente 17 millones de agricultores siembran cultivos GM en más de 190 millones de hectáreas, distribuidas en 29 países (Fernandez *et al.*, 2024).

En México se han hecho pruebas en campo de más de 20 especies modificadas genéticamente, como la calabacita, el limón, el clavel, la papaya, la piña, el plátano, el tabaco y el tomate, entre otras. En 1996 inició la producción comercial de algodón transgénico en territorio nacional mexicano y en 2001 la de soya; actualmente alrededor de 200 mil hectáreas son cultivadas con estas plantas (Robledo-Arratia, 2014).

La siembra de algodón anualmente oscila entre 200,000 ha y de estas el 96% de la semilla utilizada en los estados productores en México (Tamaulipas, Coahuila, Baja California, Chihuahua, Durango, Sonora y Sinaloa) es de variedades genéticamente modificadas (GM) (SNICS, 2024).

Plantas Transgénicas

Una planta transgénica (PT) u organismo genéticamente modificado (OGM), es cualquier organismo cuyo material genético ha sido modificado o alterado de manera artificial, para mejorar una o varias de sus características. Toda célula viva, ya sea de una bacteria, de un vegetal o de los mamíferos, contiene su información genética almacenada en el ADN, en unidades llamadas genes (Rodríguez & González, 2007).

Los OGM por medio del desarrollo de la ingeniería genética se le han introducido uno o varios genes de otras especies, no solamente para obtener plantas resistentes a los factores bióticos y abióticos, sino también para la producción de insumos de alto valor económico y ambiental (Fernandez *et al.*, 2024).

Bacillus thuringiensis

Bacillus thuringiensis (*Bt*) es una bacteria Gram-positiva que se encuentra en el suelo, es un bacilo aerobio facultativo, esporulado, cuyo tamaño oscila entre 1.0 a 1.2 micrómetros de ancho y de 3.0 a 5.0 micrómetros de largo, es conocido por ser un agente de control biológico para el control de plagas, debido a la capacidad de producción de una gran variedad de proteínas insecticidas, se considera como una de las herramientas más exitosas y amigable con el medio ambiente para el control de plagas, por esta razón se usa ampliamente en el mundo y se han desarrollado varios productos comerciales, además del desarrollo de cultivos genéticamente modificados que implica el uso de los genes de la toxina *Bt*, con resultados muy eficientes para mejorar la resistencia a los insectos plaga y a algunos herbicidas (Jouzani *et al.*, 2017; Pacheco *et al.*, 2021).

Cultivos *Bt*

Los cultivos conocidos como *Bt*, es una tecnología de la ingeniería genética o modificación más usada a nivel mundial. Expresa proteínas insecticidas derivadas de la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Trumper, 2014).

Como fundamento, la bacteria *Bt* al aislarse produce inclusiones cristalinas en la esporulación. Los cristales contienen un potente insecticida δ -endotoxina, clasificada en: toxina cristal (Cry) y toxina citolítica (Cyt). La toxina es sintetizada como protoxina la cual provoca la muerte de los insectos, especialmente de los órdenes Lepidoptera, Diptera y Coleoptera (Trumper, 2014). Para el caso de

algodón GM ha sido modificado mediante ingeniería genética introduciendo en su genoma el gen de resistencia a plagas de éstos órdenes, así como la generación de variedades con tolerancia a herbicidas como el caso de glifosato y glufosinato de amonio (Fernandez *et al.*, 2024; Jurat-Fuentes *et al.*, 2021).

Modo de Acción de las Proteínas Cry

El principal factor de virulencia de *Bt*, son las proteínas llamadas Cry, estas poseen pesos que oscilan entre ~60 y 140 kDa, y resultan altamente tóxicas contra insectos de los órdenes Lepidoptera, Diptera, Coleoptera Hymenoptera, Homoptera, Ortoptera (Herrero *et al.*, 2016).

El modo de acción comienza cuando el insecto ingiere las toxinas: se realiza la solubilización y activación de la misma, los cristales se solubilizan en el ambiente alcalino del intestino, se libera la toxina activa llamada protoxina de ~120 kDa, donde las proteasas las procesan principalmente de la región N-terminal y en el extremo C-terminal dependiendo de la naturaleza de la proteína Cry, dejando una toxina activa de un peso molecular oscilante de 49 a 70 kDa, la cual se une a unos receptores específicos de las células del intestino medio o conocido como mesenterón (CAD o Cadherina, APN o aminopeptidasas-N, ALP o Fosfatasa Alcalina y ABC o Casete de unión a la ATP) (Park *et al.*, 2014). Lo que resulta en la formación de poros en el epitelio del intestino medio de las larvas, causando lisis osmótica de la célula, una vez destruido el epitelio las esporas de *Bt* se introducen en la hemolinfa donde se difunden generando una septicemia y finalmente la muerte del insecto (Heckel, 2021; Jurat-Fuentes *et al.*, 2021).

Resistencia de Insectos a las Toxinas Cry

La adopción de los cultivos transgénicos ha traído varias ventajas a los grandes y pequeños productores, ya que al ser resistentes al ataque de insectos plaga de diferentes órdenes, ha disminuido el uso de aplicaciones de insecticidas, se

ha logrado aumentar la producción, así como también obtener productos de mejor calidad (Yang *et al.*, 2022).

Sin embargo, la evolución de la resistencia a estas proteínas insecticidas se ha presentado en algunas especies plaga (Cuadro 1), la cual amenaza la sostenibilidad y eficiencia de los cultivos transgénicos (Banerjee *et al.*, 2017). La información actual sobre el desarrollo de la resistencia reporta varias proteínas receptores de las toxinas Cry, entre ellas se incluyen la CAD, la APN, las ALP y los transportadores de casete de unión a ATP (ABC), las cuales han influido en la resistencia a las toxinas Cry1 (Boaventura *et al.*, 2020).

Cuadro1. Casos de resistencia a las proteínas *Bt* en diferentes países productores de cultivos genéticamente modificados con esta tecnología.

| Lugar | Año | Cultivo | Caso | Referencia |
|-------------|-----------------------|---------|---|-------------------------------|
| Sudáfrica | 2005-2006 y 2007-2008 | Maíz | <i>Busseola fusca</i> (Fuller, 1901) (Cry1Ab) con un daño del 2.5% (2005-2006) al 58%(2007-2008). | Kruger <i>et al.</i> (2011) |
| Australia | 2008 | Algodón | <i>Helicoverpa armigera</i> (Hübner, 1808) (Cry1Ac). | Tabashnik & Carrière (2017) |
| Australia | 2010 | Algodón | Incremento en los alelos de resistencia a Cry2Ab, de <i>H. armigera</i> . | Huang <i>et al.</i> (2014) |
| India | 2008 | Algodón | <i>Pectinophora gossypiella</i> (Saunders, 1843) resistencia a la Cry1Ac en Gujarat, India. | Xiao & Wu (2019) |
| Argentina | 2017-2018 | Maíz | Al probarse el híbrido “Piramidado” (Cry1A.105 y Cry2Ab2) se mostró que no limitó el desarrollo de las larvas de <i>Helicoverpa zea</i> (Boddie, 1850). | Franco <i>et al.</i> (2021) |
| Puerto Rico | 2006 | Maíz | Resistencia en el gen ABC, expresado para la toxina Cry1f, en <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. Smith, 1797). | Storer <i>et al.</i> (2010) |
| E.U | 2022 | Maíz | Resistencia a la Cry1f en <i>S. frugiperda</i> . | Banerjee <i>et al.</i> (2022) |

Estrategias Implementadas Ante la Resistencia a las Toxinas Cry

Ante el desarrollo de resistencia se han implementado dos estrategias de Manejo de la Resistencia a los Insectos (MRI), las cuales se basan en la estrategia de dosis alta/refugio la cual se usa en todo el mundo, esta consiste en establecer cultivos *Bt* que producen una alta concentración de proteínas insecticidas efectivas contra las plagas objetivo y establecer refugios (plantas hospedantes

de cultivos no *Bt*) dentro de la misma parcela establecida con cultivos *Bt* (García *et al.*, 2023).

La otra consiste en el uso de cultivos piramidales los cuales producen más de una toxina para control de la misma plaga objetivo y en comparación con los cultivos de contienen una sola proteína *Bt*, se espera que sean más eficaces para retrasar la evolución de la resistencia, ya que cuando una proteína *Bt* en la pirámide es ineficaz, el resto de las proteínas pueden matar al objetivo. El éxito de esta estrategia de pirimidación genética es que no existe resistencia cruzada entre diferentes proteínas *Bt* (Onstad *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2022).

Cultivos Refugio

Los refugios pueden ser áreas naturales, bloques separados del cultivo, franjas dentro del campo o plantas de refugio distribuidas aleatoriamente dentro de un campo producidas mediante la plantación de una mezcla de semillas de refugio e insecticidas (Onstad *et al.*, 2018).

El refugio natural puede estar formado por la misma especie de planta que el cultivo insecticida o puede estar formado por otras plantas (huéspedes alternativos) que sean un hábitat eficaz para la plaga. Este tipo de refugio también se denomina refugio no estructurado porque no se planta como parte de la estructura de la tierra de cultivo insecticida (Murúa *et al.*, 2019).

Reducir la presión de selección por la proteína *Bt* y proporcionar insectos susceptibles es el propósito de los refugios para aparearse con insectos resistentes (Jurat-Fuentes *et al.*, 2021).

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación de la Zona de Estudio

La colecta del material biológico se realizó en cuatro estados productores de algodón *Bt* de la República Mexicana (Coahuila, Chihuahua, Tamaulipas y Baja California) se colectó en campos de producción de los municipios: San Pedro, Coahuila (25°48'24''N y 102°58'19''W); Ojinaga, Chihuahua (28°55'00.06''N y 104°33'01.22''W; 28°54'00.09''N y 104°36'00.77''W); Matamoros y Río Bravo, Tamaulipas (25°47'28''N y 98°00'31''W; 25°45'32''N y 98°05'52''W; 25°45'58''N 98°00'35''W) y en el Valle de Mexicali, Baja California (32°31'55''N y 115°12'23''W; 32°30'24''N y 115°11'58''W; 32°14'31''N y 115°12'27''W). De igual manera se hizo la colecta en cultivos de maíz convencional de las mismas regiones, ya que estos son utilizados como cultivos trampa en muchas ocasiones para que se disminuya el daño y resistencia de las especies de lepidópteros, en el cultivo de algodón.

Colecta del Material Biológico

Las colectas fueron realizadas de manera manual, se muestrearon plantas al azar, buscando en partes de la planta en donde los insectos lepidópteros tienen hábitos hospederos, como son los cuadros florales en el caso de algodón y en maíz se colectó en la parte del cogollo, esto con ayuda de los técnicos de cada región. Cada muestra se colocó en tubos eppendorf de forma individual, se etiquetaron y almacenaron con alcohol al 70% y se transportaron en hileras con bolsas de gel frío, para la conservación del material biológico, se obtuvo un total de 85 muestras en el estado de Coahuila, 13 en Chihuahua, 26 en Tamaulipas y 20 en Baja California, obteniendo un total de 144 muestras.

Limpieza de Muestras

Las muestras fueron trasladadas al Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro para lo cual se procuró tener siempre las muestras en frío en temperaturas de 4 ± 2 °C y para ello se ocupó una hielera y bolsas de gel, sometidas a refrigeración, para la conservación de muestras, posteriormente el material colectado fue seleccionado para evitar procesar insectos contaminados con algún organismo externo como son hongos, o huevecillos de algún parasitoide, con la finalidad de evitar contaminación en la extracción de ADN o alteración de los resultados.

Identificación morfológica de Insectos

La identificación morfológica de los insectos se llevó a cabo con el uso del microscopio estereoscópico. Los artrópodos se colocaron en una caja *Petri* de cristal para ser manipulados con ayuda de pequeños pinceles y agujas de disección, fueron manipulados para tomar fotografías de todas sus partes y se analizaron las características de cada uno para la identificación a nivel especie con ayuda de las claves taxonómicas para insectos inmaduros como son; clave dicotómica reportada por (Triplehorn & Johnson, 2005).

Diseño de oligos específicos para *S. frugiperda* y *H. zea*

Los cebadores específicos de especie se diseñaron empleando la tubería de comandos Not-Alike3 (<https://doi.org/10.5281/zenodo.10557733>) que permite la identificación de regiones únicas o especie-específicas en un genoma de interés. Dichas regiones especie-específicas pueden ser utilizados como blancos genómicos para la identificación molecular de un organismo de interés. Para más información ver el video tutorial en la liga siguiente de YouTube: <https://youtu.be/rwltheAmX0Y?si=HdNAWXzUz8yR4INZ>.

En este caso utilizamos esta tubería de comandos para identificar regiones especie-específicas de dos especies de Lepidópteros, *S. frugiperda* y *H. zea* mediante la comparación iterativa entre sus genomas y una base de datos de genomas de especies cercanas con las cuales se confunden habitualmente sobre todo cuando están en estadios larvarios tempranos, que es cuando más daño hacen a los cultivos. La base de datos estuvo compuesta de los genomas de las siguientes especies: *S. frugiperda*, *Spodoptera exigua* (Hübner, 1808), *Spodoptera litura* (Fabricius, 1775), *Spodoptera littoralis* (Boisduval, 1833), *H. zea*, *Chloridea (Heliiothis) virescens* (Fabricius, 1777), *Chloridea (Heliiothis) subflexa* (Guenée, 1852), *Heliiothis peltigera* (Denis y Schiffermüller, 1775) y *H. armigera* que se descargaron de INCBi datasets (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/>). Cuando diseñamos los cebadores para *S. frugiperda* o *H. zea*, el genoma de cada uno de estos organismos fue excluido de la base de datos.

Los parámetros que utilizamos en el comando “search” de Not-Alike3 para la identificación de regiones especie-específicas fueron los siguientes: tamaño de ventana 1000 nt, tamaño del salto 250 nt, tarea blastn, apertura y extensión de espacios se configuró por defecto, porcentaje de identidad 50%, Cobertura del High-scoring Segment Pair (HSP) 50%. Después de obtener los archivos de salida en formato fasta y gff diseñamos los cebadores con el comando “search-primers” de Not-Alike3 con los siguientes parámetros: %GC óptimo 55-60 %, Tm óptimo 60°C, tamaño óptimo 18-22 nt, tamaño óptimo de la cadena molde 5000–10000 nt y tamaño óptimo del producto de 100-500 nt. Después de diseñar los cebadores estos fueron ordenados del de mejor calidad al de peor calidad. Dos juegos de cebadores de la mejor calidad fueron seleccionados por especie *S. frugiperda* y *H. zea* (Cuadro 2). y como control se usaron los oligos 28S para ambas especies y Sfru2 específicamente para *S. frugiperda* (Cuadro 2), reportados por (Tsai *et al.*, 2020).

Cuadro 2. Oligos universales (controles) y especie-específicos diseñados.

| Oligos | Secuencia | Fragmento esperado |
|-----------------------------------|--|--------------------|
| 28S (Tsai <i>et al.</i> , 2020) | 28Sg-AGTTTGACTGGGGCGGTACA 28Sh- CTTAGAGGCGTTCAGGCATAA | 500 pb |
| Sfru2 (Tsai <i>et al.</i> , 2020) | Sfru2F-TCTCGGACTTTAACACGT Sfru2R-GGTAATAGTTTTAGATTTCGTATC | 335 pb |
| FSPF2 | F- TAGTGGTGCAGCTCTTCGC R- AAACCCGGAGTGCTACAGC | 396 pb |
| HZEA1 | F- ACTTCTTACACGGMCAGCC R- CAATCATGCGCCATCACCG | 292 pb |

Extracción de ADN

La extracción del ADN se realizó utilizando la metodología de (Doyle & Doyle, 1990), con modificaciones: se estandarizó el tamaño de muestra a procesar, larvas completas L2 y L3, y solo fragmentos abdominales de L5. Se comenzó colocando la muestra en un mortero previamente esterilizado y dejando evaporar el alcohol etílico de cada muestra, si la muestra a procesar estaba recién colectada, se utilizaba directamente. Posteriormente se agregaron 600 μL de una solución de CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) al 2% y se maceró la muestra. El producto fue colocado en un tubo de centrifuga previamente etiquetado para centrifugar durante 10 minutos a 10,000 x g . Se recuperó el sobrenadante y se trasladó a un nuevo tubo donde se agregó 400 μL de cloroformo-isopropílico en relación 24:1, luego se agitó por inmersión y se centrifugó durante 10 minutos a 10,000 x g . Se vació el sobrenadante a un tubo nuevo con apoyo de una micro pipeta, sin tocar la capa de la suspensión que se forma en medio, y posteriormente se agregaron 600 μL de etanol. Después de agitar por inmersión, se centrifugó a 10,000 x g , se desechó el flujo y se agregó 900 μL de etanol y 100 μL de agua para obtener la pastilla que contiene el ADN, se centrifugó a 10,000 x g . Se vació el flujo con ayuda de una micro pipeta, se eliminó todo residuo de etanol por decantación y se dejó secar durante unos minutos a temperatura ambiente por evaporación. Después se agregó 120 μL

de agua inyectable para hidratar el ADN. Para verificar la presencia y calidad del ADN se realizó electroforesis con un gel de agarosa al 1% cargando 5 μ L de ADN y 5 μ L del buffer de carga y finalmente se observó el gel en el fotodocumentador (Biotop modelo ESC850).

Oligos Utilizados para la Detección de la Mutante

De acuerdo a la literatura se estableció la importancia de dos principales mutaciones en el gen *SfABCC2* relacionada con resistencia a las toxinas Cry en países de América. En Puerto Rico se detectó resistencia cruzada a las proteínas Cry1F (Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1Aa) (Storer *et al.*, 2010), por lo que para la evaluación en este trabajo se utilizaron los siguientes oligos para la detección de mutación (Cuadro 3):

Cuadro 3. Oligos para la identificación de la mutante *SfABCC2*.

| Oligos | Secuencia |
|--|---|
| <i>SfABCC2</i> (600 pb) | RvCG15'-gtgatggctgatgaccgaatcaaagacc-3' FWCG15'-cgatgctgctctctgaccaagc-3' |
| <i>SfABCC2mut</i> (200 pb) | RvCG15'-gtgatggctgatgaccgaatcaaagacc-3' R2mut5'-catgtacctccaagcacatcg-3' |
| <i>SfABCC2</i> de tipo salvaje (330pb) | RvCG15'-gtgatggctgatgaccgaatcaaagacc-3' R2wtmut5'-gactcatgtacctccaagcacat-3' |

Reacción en Cadena de Polimerasa

Las muestras de ADN genómico se emplearon para identificación molecular, mediante la PCR de punto final, así como también para detectar la mutante. Se utilizaron los oligos antes mencionados (Cuadro 2 y 3). La reacción fue realizada a un volumen final de 25 μ L que contenía: 12.5 μ L de Crystal Taq Master (2x), 1.0 μ L de Oligo Forward, 1.0 μ L de Oligo Reverse, 1.0 μ L de ADN y 9.5 μ L de H₂O. Las muestras se amplificaron en un termociclador (Prime Thermal Cycler,

modelo 3PRIMEG/02) con las siguientes condiciones: un ciclo inicial de 98°C por 2 min, seguido de 35 ciclos a 94°C por 5 min, 60°C por 15 min, 72°C por 15 min y 72°C por 5 min. Al finalizar la reacción, las muestras fueron sometidas a un corrimiento electroforético en geles de agarosa al 2%, los fragmentos fueron teñidos con Diamond™ Nucleic Acid Dye (Promega, NSW, AUS) y visualizados en el fotodocumentador (Biotop modelo ESC850).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se colectaron 144 larvas de *S. frugiperda* y dos de *H. zea* en campos de producción de cultivos de algodón *Bt* y maíz, este último aledaño al cultivo transgénico, las colectas se obtuvieron de cuatro estados de México donde existe interacción con las toxinas Cry de *Bt*. Del total de las larvas colectadas solo se utilizaron 110 para las pruebas moleculares (Cuadro 4), ya que en el resto de las muestras la presencia y calidad del ADN no fue óptima.

Cuadro 4. Muestras de insectos colectadas y procesadas para la detección de resistencia a las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*.

| Estado | N° de individuos totales | N° de individuos ADN | N° de individuos PCR |
|-----------------|--------------------------|----------------------|----------------------|
| Coahuila | 85 | 68 | 68 |
| Tamaulipas | 26 | 21 | 21 |
| Chihuahua | 13 | 10 | 10 |
| Baja california | 20 | 11 | 11 |

La calidad y rendimiento del ADN genómico fue alta y suficiente en cada muestra, estos parámetros son necesarios para realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ya que al tener niveles intrínsecamente bajos de ADN genómico de insectos puede haber fallas en la amplificación en las reacciones de PCR, según lo indicado por Pava-Ripoll *et al.* (2024).

Matheson *et al.* (2008) mencionan que para el desarrollo de la PCR, pueden utilizarse cantidades pequeñas de muestra, debido a que dicha técnica molecular ha dado resultados de bastante especificidad, que son muy útiles al estudiar los hábitos alimentarios de los insectos, detección de genes mutantes, identificación del contenido intestinal de numerosas especies de insectos depredadores, entre otras es por ello que para el desarrollo de esta investigación se realizó esta técnica molecular.

Identificación Molecular de los Insectos Colectados

Se realizó PCR con dos juegos de oligos reportados por Tsai *et al.* (2020), 28S juego de oligos universales y Sfru2 específico para *S. frugiperda*, para fines de esta investigación se trabajó con las dos especies colectadas en campo: *S. frugiperda* y *H. zea*, por lo que se probó el par de oligos 28S y se observó la banda esperada de 500 pb, para las dos especies (Figura 1A); el segundo par de oligos (Sfru2), es específico para *S. frugiperda*, con el que se obtuvo la banda esperada de 335 pb (Figura 1B), tal como lo reportan en su investigación estos autores. Esto con el fin de identificar los individuos correctamente y comparar con los que se diseñaron con el programa Not a-like3, y de esta forma corroborar su especificidad.

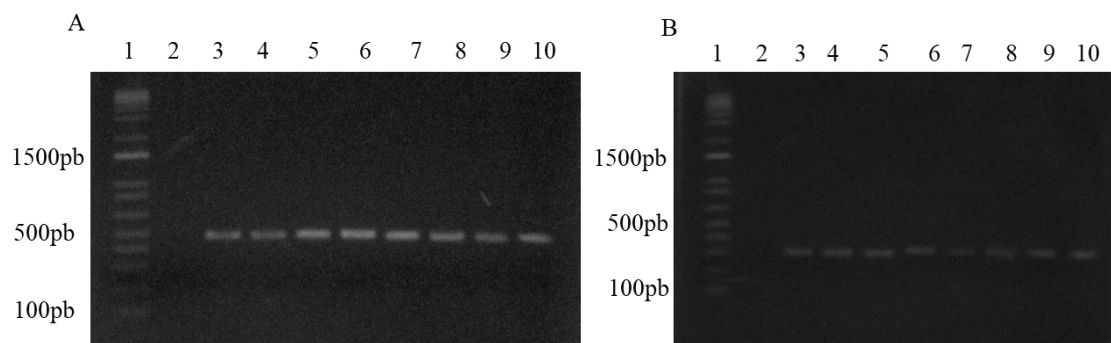


Figura 1. A) Carril 1 marcador de peso molecular 1 Kb, carril 2 control negativo, carril 3-8 oligos 28S banda amplificada 500 pb con el ADN de *Spodoptera frugiperda* y carril 9 y 10 con ADN genómico de *Helicoverpa zea*, **B)** Carril 1 marcador de peso molecular 1 Kb, carril 2 control negativo, carril 3-10 oligos Sfru2 banda amplificada 335 pb específica para *S. frugiperda*.

Los oligos diseñados con el programa Not a-like3, fueron sometidos con el ADN genómico de *H. zea* y *S. frugiperda*, para corroborar su especificidad, para lo cual se realizó PCR de ambas especies con los oligos, HZEA1 y FSPF2 (Cuadro 2). De acuerdo a la PCR, con los oligos HZEA1 específico para la especie *H. zea*, amplificó el fragmento esperado de 292 pb con las muestras de ADN genómico de *H. zea* y con las muestras de ADN genómico de *S. frugiperda* no

se amplificó el fragmento (Figura 2, carril 2 y 4, respectivamente). Para el caso de FSPF2 diseñados específicamente para *S. frugiperda* se visualizó el fragmento esperado de 396 pb con la muestra de ADN genómico de *S. frugiperda* y las muestras de ADN genómico de *H. zea* con este juego de oligos no amplificó (Figura 2, carril 6 y 8, respectivamente).

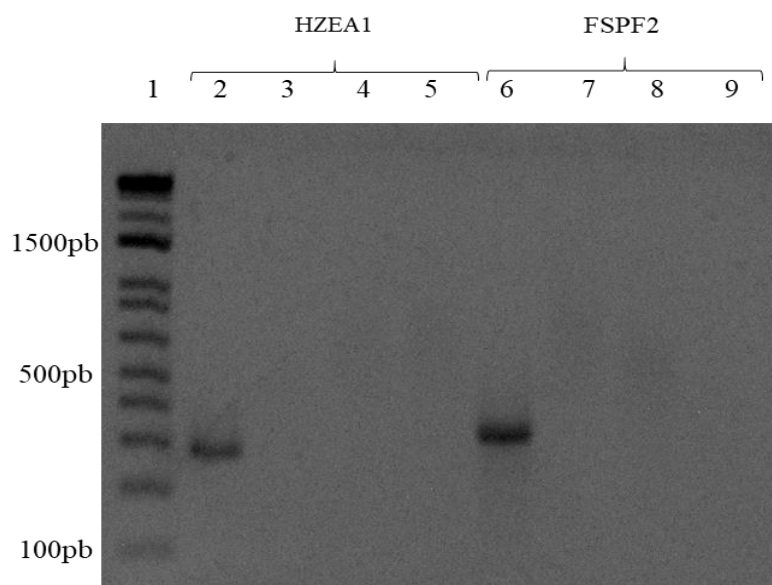


Figura 2. Carril 1 marcador de peso molecular 1 Kb; oligos (HZE1 carriles, 2 y 3), *H. zea* positiva (292 pb) y control negativo, respectivamente con la muestra de ADN de *H. zea*; carriles 4 y 5, ADN de *S. frugiperda* sin amplificar con oligos HZE1 y control negativo, respectivamente; oligos (FSPF2 carriles 6 y 7), *S. frugiperda* positiva (396 pb) y control negativo, respectivamente con la muestra de ADN de *S. frugiperda*; carriles 8 y 9, ADN de *H. zea* sin amplificar con oligos FSPF2 y control negativo.

Perera *et al.* (2015) mencionan la importancia de la identificación de especies de plagas invasoras, recae en el planteamiento de estrategias de un manejo oportuno de manera rápida para evitar que estas se establezcan, como es el caso de estas dos especies de lepidópteros que se trabajaron en esta

investigación, que son plagas de rápido establecimiento en campo su no se reporta su presencia oportunamente.

El gusano cogollero, como comúnmente se conoce a la especie *S. frugiperda*, los autores (Banerjee *et al.*, 2022; Seo *et al.*, 2019) indican que es una plaga en la que se tiene alto índice de reportes de grandes daños y pérdidas económicas y que ha invadido varios países alrededor del mundo, además es considerada altamente polífaga, por alimentarse de alrededor de 350 especies de plantas, entre ellos cultivos básicos de alimentos y fibras, como el maíz, algodón, sorgo, caña, trigo, cultivos de hortalizas, entre otros. Al igual que *H. zea* que se ha extendido de manera muy rápida en los países productores de maíz, ya que este cultivo es su hospedero más importante y se ha reportado como una de las especies de lepidópteros plaga invasora debido al desarrollo de resistencia que ha presentado a las toxinas cry de *Bt* (Bryant *et al.*, 2024; Reay-Jones *et al.*, 2024), por tal motivo se hace indispensable contar con técnicas que faciliten la correcta y rápida identificación, tanto en campo como en laboratorio.

La herramienta actual para la identificación de insectos, es por medio de claves taxonómicas que se basan en características morfológicas, para ello se requiere la etapa adulta en la mayoría de los casos, y para las dos especies que se emplearon en esta investigación no es la excepción, ya que en estadios de huevo y larva las características morfológicas no se aprecian bien por su tamaño muy pequeño y además comparten similitudes con otras especies de lepidópteros, lo que dificulta su correcta identificación, además de que puede ser un proceso tardado y se necesita hacer una revisión minuciosa de las características genitales en adultos y del aparato bucal en estadios larvarios, así como de mucha experiencia en ello. Es imperativo que la detección de estas plagas se realice en forma oportuna en los primeros estadios, por lo que para la comercialización de los productos cultivados, no es conveniente esperar a tener la etapa adulta de dichos insectos, durante el proceso productivo, debido a que

pueden llegar a demeritar la calidad y el rendimiento del cultivo (Van de Vossenbergh & Van der Straten, 2014).

Es por ello que se propone este método de identificación molecular por PCR, como una herramienta rápida y con menor o nulo error de identificación en estadios tempranos de las plagas, y con ello tener una opción robusta que asegure la presencia de las plagas en campo y proponer estrategias de control y manejo de manera temprana en los diferentes cultivos hospederos de *S. frugiperda* y *H. zea*, como se ha planteado en otras investigaciones con lepidópteros de importancia agrícola. Los resultados expresados por Perera *et al.* (2015) proponen una identificación rápida mediante ADN ribosómico de *H. armígera* y *H. zea* para implementar estrategias de manejo y prevenir establecimiento de poblaciones de estas plagas, con resultados similares a los nuestros.

Detección del Gen de Resistencia *SfABCC2mut* (GC)

Los oligos utilizados fueron para amplificar la inserción de dos bases GC detectadas por primera vez en el año 2006 en Puerto Rico para *S. frugiperda* por Storer *et al.* (2010), esto debido a que en las colectas que se realizaron se obtuvo una alta cantidad de individuos de esta especie.

Al visualizarse las reacciones de PCR en el gel de agarosa, se observó la amplificación del fragmento de 600 pb (Figura 3A), en el cual se encuentra la región de importancia en este estudio, ya que dentro de este se localiza la inserción de las bases GC, mientras que para los individuos de tipo silvestre se observó un fragmento de 330 pb (Figura 3B).

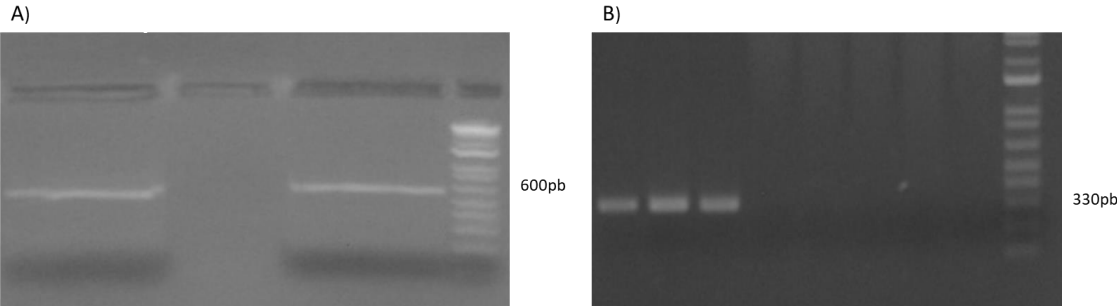


Figura 3. A) Carril 1 y 3 fragmento de la región donde se localiza la inserción GC, carril 4 marcador de peso molecular 1 Kb. **B)** Carril 1-3 individuos tipo silvestre amplificación 330 pb, carril 9 marcador de peso molecular 1 Kb.

Mientras que la inserción GC se observó solamente en la población colectada en el estado de Coahuila, en donde el 2.71% del total de larvas procesadas dieron positivo (Cuadro 5; Figura 4), mientras que para los estados de Tamaulipas, Baja California y Chihuahua en gen no se detectó.

Cuadro 5. Frecuencia de la secuencia *SfABCC2mut* (GC) en *S. frugiperda*, procedentes de cuatro estados de la República Mexicana productores de algodón *Bt* (2023).

| Estado | Muestras procesadas | Muestras <i>SfABCC2mut</i> (GC) | Porcentaje de muestras positivas a mutante | Frecuencia |
|-----------------|---------------------|---------------------------------|--|------------|
| Coahuila | 68 | 3 | 4.41% | 3/68 |
| Tamaulipas | 21 | 0 | 0% | 0/21 |
| Chihuahua | 10 | 0 | 0% | 0/10 |
| Baja California | 11 | 0 | 0% | 0/11 |
| Total | 110 | 3 | 2.71% | 3/110 |

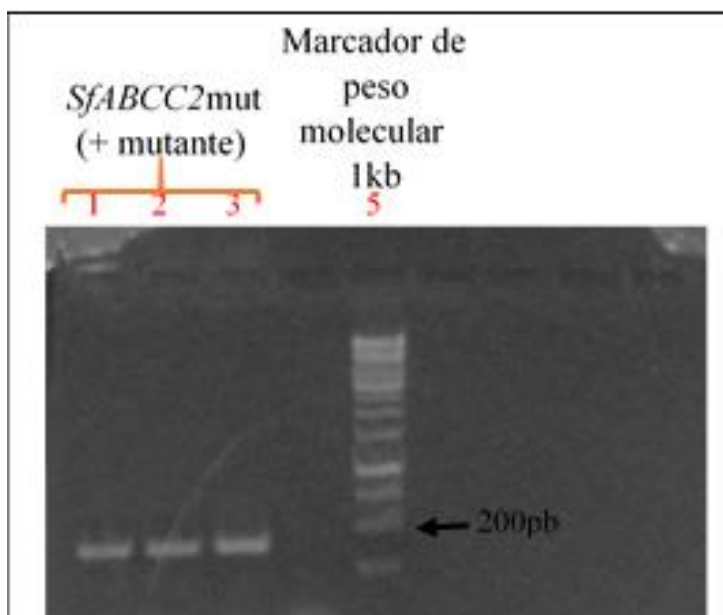


Figura 4. Carril 1-3 muestras positivas a mutante *SfABCC2mut*, colectadas en el estado de Coahuila, carril 4 control negativo y carril 5 marcador de peso molecular 1 Kb.

Blanco *et al.* (2024) indicaron que la variabilidad genética y de poblaciones de las plagas de interés que existe en México y que se trabajaron en este estudio, no ha sido afectada por el uso de cultivares *Bt* de algodón, esto puede deberse a que el país es considerado como centro de origen de uno de los cultivos hospederos de estas plagas como el maíz y por ende la variabilidad de este cultivo, promueve la variabilidad en estas plagas, fungiendo como refugio, a pesar de que ambos cultivos comparten plagas en común.

En México, el principal cultivo *Bt* que se siembra es el algodón y hay reportes que indican baja toxicidad frente a *S. frugiperda* (Sorgatto *et al.*, 2015). De las toxinas Cry con las que más interacción ha tenido *S. frugiperda* en los campos de México es con la Cry1Ac, la cual comparte el receptor *SfABCC2* con Cry1Ab y Cry1F (Banerjee *et al.*, 2017). Esto explica la resistencia cruzada de *S. frugiperda* a todas estas toxinas en Puerto Rico, Estados Unidos de América y Brasil (Jakka *et al.*, 2016). En Puerto Rico, esta resistencia se demostró ligada a

inserción de GC en *SfABCC2* (alelo *SfABCC2mut*), dado que esta mutación resulta en una proteína *SfABCC2* truncada que deja de funcionar como receptor para Cry1F, Cry1Ab o Cry1Ac (Storer *et al.*, 2010). Una delección de 8 Kb se mostró involucrada en la resistencia a Cry1F en *S. frugiperda* en poblaciones de Florida, E.U.A. (Banerjee *et al.*, 2017). Teniendo en cuenta la posibilidad de migración de *S. frugiperda* de Estados Unidos hacia México, a través de las diferentes condiciones climáticas, se tiene un riesgo mínimo debido a que la capacidad de vuelo de los insectos lepidópteros al alimentarse de materiales con tecnología *Bt*, como el maíz y algodón que se cultivan en Estados Unidos, disminuye, debido a que se ha confirmado cambio en su estructura física como el tamaño de los adultos (De Bortoli *et al.*, 2023).

En este estudio con *S. frugiperda* procedente del estado de Coahuila, México encontramos individuos positivos para *SfABCC2mut* en tres de las 110 muestras analizadas. Todos los positivos fueron encontrados en muestras colectadas en el año del 2023, representando un indicio de la posible presencia de genes de resistencia relacionados a esta mutante en poblaciones de *S. frugiperda* para nuestro país. Dado que en México no está autorizada la siembra de variedades que contengan la proteína Cry1F, la presencia de la mutación *SfABCC2mut* en poblaciones de este insecto provenientes directamente de los campos productivos en México, sugiere el flujo de genes y la posible evolución de resistencia a la toxina Cry1Ac. Se han previsto estos acontecimientos debido a que en otros países a pesar del uso de la tecnología *Bt* se ha desarrollado resistencia en campo, por lo que en la actualidad se han implementados dos estrategias para retrasar el desarrollo de resistencia las cuales son el uso de “alta dosis/refugio” y la segunda “genes piramidales” (Huang *et al.*, 2014).

Resultados en este estudio confirman que el alelo *SfABCC2mut* se encuentra en las poblaciones de *S. frugiperda* de la región Lagunera, Coahuila. Las poblaciones heterocigotas no expresan la resistencia en campo (Banerjee *et al.*, 2017); en este sentido, los tres individuos que amplificaron para el alelo

SfABCC2mut en este trabajo se encontraron en condición heterocigota. Las pruebas basadas en bioensayos de las generaciones F₁ o F₂ se han utilizado tradicionalmente para detectar alelos de resistencia en *S. frugiperda* a proteínas insecticidas de *B. thuringiensis* producidas en cultivos transgénicos (Blanco *et al.*, 2024). Como alternativa para monitoreo temprano de los genes de resistencia, los métodos de detección basados en el ADN, proporcionan mayor sensibilidad, son aptos para aplicaciones de alto rendimiento, y pueden reducir considerablemente la mano de obra y los costos generales de este tipo de estudios. Es importante continuar y ser constante en las colectas de campo de estas poblaciones con la finalidad de establecer la frecuencia de mutaciones de resistencia conocidas y detectar otras mutaciones de importancia que se pudieran desarrollar de acuerdo a las proteínas que contiene el cultivo de algodón *Bt* cultivado en nuestro país. Aunque el cultivo de maíz no *Bt* que se cultiva en nuestro país ha ayudado para que las poblaciones de gusano cogollero y gusano elotero del maíz sigan siendo susceptibles a las toxinas de *Bt* (Blanco *et al.*, 2024).

CONCLUSIONES

La identificación de insectos lepidópteros por PCR es una alternativa eficaz debido a la complejidad de identificación en los primeros estadios y a las características similares que poseen.

Se verificó la existencia de la región del gen *SfABCC2* con la inserción GC, en poblaciones de campo de *S. frugiperda* en México, la cual está relacionada a la resistencia cruzada en esta especie con las toxinas Cry1F, Cry1Ab y Cry1Ac.

Las colectas y monitoreo de las poblaciones de lepidópteros deben continuar y ser periódicas para seguir trabajando en la detección de resistencia y evitar el desarrollo y establecimiento de poblaciones resistentes a las toxinas Cry de *Bt* en los campos de México.

REFERENCIAS

- Banerjee, R., De Bortoli, C. P., Huang, F., Lamour, K., Meagher, R., Buntin, D., Ni, X., Reay-Jones, F. P. F., Stewart, S., & Jurat-Fuentes, J. L. (2022). Large genomic deletion linked to field-evolved resistance to Cry1F corn in fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) from Florida. *Scientific Reports*, 12(1), 13580. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-17603-3>
- Banerjee, R., Hasler, J., Meagher, R., Nagoshi, R., Hietala, L., Huang, F., Narva, K., & 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. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09866-y>
- Blanco, C. A., Hernandez, G., Dively, G., Conover, K., Portilla, M., Valentini, G., Fosado, A., Abel, C. A., Guzmán, H., Occelli, L., Knolhoff, L., Corona, M., Blanco, T., Ward, T., Nava-Camberos, U., Di-Bella, V., & Hutchison, W. D. (2024). Functional transgenes in Mexican maize: Benefits and risks for insect pest management in Mexico and the United States. *Annals of the Entomological Society of America*, saae007. <https://doi.org/10.1093/aesa/saae007>
- Boaventura, D., Ulrich, J., Lueke, B., Bolzan, A., Okuma, D., Gutbrod, O., Geibel, S., Zeng, Q., Dourado, P. M., Martinelli, S., Flagel, L., Head, G., & Nauen, R. (2020). Molecular characterization of Cry1F resistance in fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* from Brazil. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 116, 103280. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2019.103280>
- Bryant, T. B., Greene, J. K., Reisig, D., & Reay-Jones, F. P. F. (2024). Continued decline in sublethal effects of Bt toxins on *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in field corn. *Journal of Economic Entomology*, 117(5), 1876-1883. <https://doi.org/10.1093/jee/toae152>
- De Bortoli, C. P., Santos, R. F., Assirati, G. J., Sun, X., Hietala, L., & Jurat-Fuentes, J. L. (2023). Exposure to Cry1 Toxins Increases Long Flight Tendency in Susceptible but Not in Cry1F-Resistant Female *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Insects*, 15(1), 7. <https://doi.org/10.3390/insects15010007>
- Doyle, J., & Doyle, J. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12(1), 13-15.

- Fernandez, S. T., Mora, F. C., Villalva, J. G., & Almeida, I. P. (2024). Perspectivas de los cultivos transgénicos y su aporte en la agricultura. *Journal of Science and Research*, 9(1), Article 1.
- Franco, M. del R., Tulli, M. C., Martiarena, D. A., Divita, I., Mateos Inchauspe, F., & Carmona, D. M. (2021). *Infestación natural y daños ocasionados por la "isoca de la espiga del maíz", en híbridos Bt sembrados en fechas tardías* (0328-7009). Estación Experimental Agropecuaria Balcarce, INTA.
- García, M., García-Benítez, C., Ortego, F., & Farinós, G. P. (2023). Monitoring Insect Resistance to Bt Maize in the European Union: Update, Challenges, and Future Prospects. *Journal of Economic Entomology*, 116(2), 275-288. <https://doi.org/10.1093/jee/toac154>
- Heckel, D. G. (2021). The Essential and Enigmatic Role of ABC Transporters in Bt Resistance of Noctuids and Other Insect Pests of Agriculture. *Insects*, 12(5), 389. <https://doi.org/10.3390/insects12050389>
- Herrero, S., Bel, Y., Hernández-Martínez, P., & Ferré, J. (2016). Susceptibility, mechanisms of response and resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Spodoptera* spp. *Current Opinion in Insect Science*, 15, 89-96. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2016.04.006>
- Huang, F., Qureshi, J. A., Meagher, R. L., Reisig, 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112958>
- Jakka, S. R., Gong, L., Hasler, J., Banerjee, R., Sheets, J. J., Narva, K., Blanco, C. A., & Jurat-Fuentes, J. L. (2016). *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*. 12.
- Jouzani, G. S., Valijanlian, E., & Sharafi, R. (2017). *Bacillus thuringiensis*: A successful insecticide with new environmental features and tidings. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(7), 2691-2711. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8175-y>
- Jurat-Fuentes, J. L., Heckel, D. G., & Ferré, J. (2021). Mechanisms of Resistance to Insecticidal Proteins from *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology*, 66, 121-140. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-052620-073348>

- Kruger, M., Van Rensburg, J., & Van Den Berg, J. (2011). Resistance to Bt maize in *Busseola fusca* (Lepidoptera: Noctuidae) from Vaalharts, South Africa. *Environmental entomology*, 40(2), 477-483.
- Márquez-Licon, G., Tapia-Maruri, D., Camacho-Tapia, M., & Solano-Báez, A. R. (2023). Detection of *Brasiliomyces malachrae* Causing Powdery Mildew on Ornamental Cotton (*Gossypium hirsutum*) plants in Mexico. *Plant Disease*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-23-0417-PDN>
- Matheson, C. D., Muller, G. C., Junnila, A., Vernon, K., Hausmann, A., Miller, M. A., Greenblatt, C., & Schlein, Y. (2008). A PCR method for detection of plant meals from the guts of insects. *Organisms Diversity & Evolution*, 7(4), 294-303. <https://doi.org/10.1016/j.ode.2006.09.002>
- Murúa, M. G., Vera, M. A., Michel, A., Casmuz, A. S., Fatoretto, J., & Gastaminza, G. (2019). Performance of Field-Collected *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Strains Exposed to Different Transgenic and Refuge Maize Hybrids in Argentina. *Journal of Insect Science*, 19(6), 21. <https://doi.org/10.1093/jisesa/iez110>
- Onstad, D. W., Crespo, A. L. B., Pan, Z., Crain, P. R., Thompson, S. D., Pilcher, C. D., & Sethi, A. (2018). Blended Refuge and Insect Resistance Management for Insecticidal Corn. *Environmental Entomology*, 47(1), 210-219. <https://doi.org/10.1093/ee/nvx172>
- Pacheco, S., Gómez, I., Chiñas, M., Sánchez, J., Soberón, M., & Bravo, A. (2021). Whole Genome Sequencing Analysis of *Bacillus thuringiensis* GR007 Reveals Multiple Pesticidal Protein Genes. *Frontiers in Microbiology*, 12, 758314. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.758314>
- Park, Y., González-Martínez, R. M., Navarro-Cerrillo, G., Chakraborty, M., Kim, Y., Ziarolo, P., Blanca, J., Cañizares, J., Ferré, J., & Herrero, S. (2014). ABCC transporters mediate insect resistance to multiple Bt toxins revealed by bulk segregant analysis. *BMC Biology*, 12, 46. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-12-46>
- Pava-Ripoll, M., Miller, A. K., Loechelt-Yoshioka, H. K., Ziobro, G. C., & Ferguson, M. (2024). Detection Limits of Insect Fragments in Spiked Whole Wheat Flour Using Multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR). *Journal of Food Protection*, 87(10), 100348. <https://doi.org/10.1016/j.jfp.2024.100348>

- Perera, O. P., Allen, K. C., Jain, D., Purcell, M., Little, N. S., & Luttrell, R. G. (2015). Rapid Identification of *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) Using Ribosomal RNA Internal Transcribed Spacer 1. *Journal of Insect Science*, 15(1), 155. <https://doi.org/10.1093/jisesa/iev137>
- Reay-Jones, F. P. F., Buntin, G. D., Reisig, D. D., & Bridges, W. C. (2024). Longitudinal trials illustrate interactive effects between declining Bt efficacy against *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) and planting dates of corn. *Journal of Economic Entomology*, 117(5), 1901-1912. <https://doi.org/10.1093/jee/toae160>
- Robledo-Arratia, L. (2014). *La historia de la agricultura y los cultivos transgénicos*.
- Rocha-Munive, M. G., Soberón, M., Castañeda, S., Niaves, E., Scheinvar, E., Eguiarte, L. E., Mota-Sánchez, D., Rosales-Robles, E., Nava-Camberos, U., Martínez-Carrillo, J. L., Blanco, C. A., Bravo, A., & Souza, V. (2018). Evaluation of the Impact of Genetically Modified Cotton After 20 Years of Cultivation in Mexico. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6, 82. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00082>
- Rodríguez, P., & González, O. (2007). Plantas transgénicas: Una revisión de los principales cultivos básicos en México. *e-Gnosis*, 5, 1.
- Seo, B. Y., Lee, G.-S., Park, J., Xi, H., Lee, H., Lee, J., Park, J., & Lee, W. (2019). The complete mitochondrial genome of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* Smith, 1797 (Lepidoptera; Noctuidae), firstly collected in Korea. *Mitochondrial DNA. Part B, Resources*, 4(2), 3918-3920. <https://doi.org/10.1080/23802359.2019.1688119>
- SNICS, S. N. de I. y C. de S. (2024). *PROGRAMA DE ABASTO DE SEMILLA DE ALGODÓN*. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/632083/Programa_de_abasto_de_algodo_n.pdf
- Sorgatto, R., Bernardi, O., & Omoto, C. (2015). Survival and Development of *Spodoptera frugiperda* and *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) on Bt Cotton and Implications for Resistance Management Strategies in Brazil. *Environmental Entomology*, 44, 186-192. <https://doi.org/10.1093/ee/nvu018>
- 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. <https://doi.org/10.1603/ec10040>
- Tabashnik, B. E., & Carrière, Y. (2017). *Surge in insect resistance to transgenic crops and prospects for sustainability*. 35, 926-935.
- Trapero, C., Wilson, I. W., Stiller, W. N., & Wilson, L. J. (2016). Enhancing Integrated Pest Management in GM Cotton Systems Using Host Plant Resistance. *Frontiers in Plant Science*, 7, 500. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00500>
- Triplehorn, C. A., & Johnson, N. F. (2005). *Borror and DeLong's Introduction to the Study of Insects*. (Seventh Edition). Thomson Brooks/Cole, USA, 864pp, ISBN 0-03-096835-6.
- Trumper, E. V. (2014). Resistencia de insectos a cultivos transgénicos con propiedades insecticidas. Teoría, estado del arte y desafíos para la República Argentina. *AgriScientia*, 31(2), Article 2. <https://doi.org/10.31047/1668.298x.v31.n2.16538>
- Tsai, C.-L., Chu, I.-H., Chou, M.-H., Chareonviriyaphap, T., Chiang, M.-Y., Lin, P.-A., Lu, K.-H., & Yeh, W.-B. (2020). Rapid identification of the invasive fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) using species-specific primers in multiplex PCR. *Scientific Reports*, 10(1), 16508. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73786-7>
- Van de Vossenbergh, B. T. L. H., & Van der Straten, M. J. (2014). Development and validation of real-time PCR tests for the identification of four *Spodoptera* species: *Spodoptera eridania*, *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera littoralis*, and *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, 107(4), 1643-1654. <https://doi.org/10.1603/ec14132>
- Xiao, Y., & Wu, K. (2019). Recent progress on the interaction between insects and *Bacillus thuringiensis* crops. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 374(1767), 20180316. <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0316>
- Yang, F., Wang, Z., & Kerns, D. L. (2022). Resistance of *Spodoptera frugiperda* to Cry1, Cry2, and Vip3Aa Proteins in Bt Corn and Cotton in the Americas: Implications for the Rest of the World. *Journal of Economic Entomology*, 115(6), 1752-1760. <https://doi.org/10.1093/jee/toac099>