

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



CONTROL DEL INSECTO PLAGA DE MAÍZ POSTCOSECHA *Sitophilus zeamais* M. (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) CON TOXINAS Cry DE *Bacillus thuringiensis*.

Tesis

Que presenta MARCOS LIBRADO GARCÍA MORALES

como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

Saltillo, Coahuila

Marzo, 2025

CONTROL DEL INSECTO PLAGA DE MAÍZ POSTCOSECHA *Sitophilus zeamais* M. (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) CON TOXINAS Cry DE *Bacillus thuringiensis*.

Tesis

Elaborada por MARCOS LIBRADO GARCÍA MORALES como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA con la supervisión y aprobación del Comité de Asesoría

~~var~~
Dr. Agustín Hernández Juárez

Director de Tesis

Dra. Miriam Sánchez Vega

Asesor

Dr. Luis Alberto Aguirre Uribe

Asesor

Dr. Antonio Flores Naveda

Subdirector de Postgrado

UAAAAN

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONHACYT)**, por el apoyo de la beca y así poder cumplir con la investigación y obtención del examen de grado.

A mi **Alma Mater:**

Mi querida **Universidad** que abrió sus puertas para mi formación, por convertirse en mi segunda casa de formación, por todas las herramientas que me brindo para esta educación profesional y cumplir mis sueños, por todos aquellos buenos momentos que compartí con mis compañeros y maestros de clase.

A mi **Comité de Asesoría:**

Dra. Miriam Sánchez Vega, por todo el apoyo que me brindó, por sus consejos y regaños que me sirvieron para mi formación, por su paciencia y motivarme para cumplir mi proyecto de vida y también por ser una gran persona.

Dr. Agustín Hernández Juárez, por ser mi asesor, compartirme un poco de su gran experiencia, por el apoyo, confianza y ayuda en esta investigación.

Dr. Luis Alberto Aguirre Uribe, por el apoyo que me brindó durante la maestría y así llevar a cabo este proyecto.

Dra. María Alejandra Bravo de la Parra del IBT-UNAM, por proporcionarnos las toxinas y asesoría, llevar a cabo este trabajo de investigación.

M. C. Maribel Rivero Borja del Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo, por la capacitación brindada de soluciones de las toxinas y por el apoyo para realizar los experimentos.

Dr. Marco Juárez Verdayes, por el apoyo en la capacitación de soluciones y viabilidad de las toxinas.

Al **Departamento de Parasitología**, por abrirme las puertas y prestarme sus instalaciones para realizar mis experimentos.

A mis **compañer@s y amig@s:**

Al M.C. Joel, M.C. Fátima, Ing. Esmeralda, Ing. Carmen, Ing. Miguel, Ing. Ireni, Ing. Nancy, Ing. Gary, Ing. Juan Medina, Fredy, Ing. Caty, Ing. Javier (Chipi), Ing. Maricruz, Iván, Pablo, Sandra y Nati, por el apoyo, amistad, motivación y palabras de aliento durante este proyecto.

DEDICATORIA

A Dios:

Por haberme regalado la vida y la capacidad para poder desarrollar este trabajo, y formarme profesionalmente, gracias, señor por estar siempre cuando más lo necesito y orientarme por el buen camino; te ofrezco este proyecto de mi vida, gracias por darme esa fortaleza de levantarme tras varios tropiezos.

A mis padres:

Librado García Velázquez

y

Ernestina Morales Velázquez:

Me siento privilegiado por tener unos buenos padres, que hasta la fecha me siguen apoyando y cuidando de mí, por sus consejos, sus regaños, pero más por su amor incondicional, ya que ambos hacen todo con tal de verme feliz. Son los mejores papás, por lo que volvería a elegirlos en otra vida. Los amos infinitamente.

A mis herman@s:

Pina, Blanqui, Maydi, Damaris, Deysi, Luis, Isaías, Dali, Dani, Bale.

Por ayudarme en este proceso y por motivarme en los momentos difíciles. Sé que no son difíciles de amar, desde que me enseñaron que no importa lo que vivamos, siempre fuimos, somos y seremos nosotros contra el mundo ☺. Los quiero mucho.

A mi compañera de vida:

Ing. Sandra Pérez Godínez.

Darte las gracias por llegar a mi vida, por ayudarme, escucharme, motivarme, por aguantar todas mis tonterías, enojos, simplemente gracias por existir y decidir estar junto a mí. **Te amo.**

A toda mi familia:

Sobrin@s, tí@s, prim@s, cuñad@s y suegros por los buenos deseos, motivación y palabras de aliento para seguir adelante con este proyecto de vida, **Gracias.**

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	III
DEDICATORIA	V
ÍNDICE GENERAL	VII
LISTA DE CUADROS	X
LISTA DE FIGURAS	XI
RESUMEN.....	XIII
ABSTRACT	XV
INTRODUCCIÓN.....	1
Objetivos.....	4
Objetivo general	4
Objetivos específicos	4
Hipótesis.....	4
REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
Importancia del maíz	5
Importancia de los granos almacenados	5
Factores bióticos y abióticos que afectan a los granos almacenados	6
Importancia de las plagas de granos almacenados.....	8
Daños por las plagas insectiles de almacén.....	9
□ Daños directos.....	9
□ Daños indirectos	9
Tipos de insectos plaga en granos y productos almacenados	9
□ Plagas primarias	10
□ Plagas secundarias	10
□ Plagas terciarias	10
El gorgojo del maíz <i>Sitophilus zeamais</i> (Motschulsky)	11
Clasificación taxonómica	11
Origen y distribución de <i>Sitophilus zeamais</i>	11
Importancia de <i>Sitophilus zeamais</i>	12
Hábitos y alimentación de <i>Sitophilus zeamais</i>	12
Ciclo de vida de <i>Sitophilus zeamais</i>	13
Rango de hospederos de <i>Sitophilus zeamais</i>	16

Métodos de control de las plagas de almacén.....	16
Control químico	16
Control físico	17
Resistencia física de los granos hacia <i>Sitophilus zeamais</i>	17
Control cultural	18
Control biológico.....	19
Características generales de <i>Bacillus thuringiensis (Bt)</i>	21
Importancia de <i>Bacillus thuringiensis</i> en coleópteros.....	21
Proteínas cristales con actividad para coleópteros	23
Proteínas Cry, Cyt, Vip y Sip	24
Modo de acción de <i>Bacillus thuringiensis</i>	27
Cultivos <i>Bt</i>	28
Descripción de toxinas Cry de <i>Bacillus thuringiensis</i>	34
Morfología y composición del grano de maíz	35
Germinación de semillas y sus fases	37
Osmoacondicionamiento de semilla.....	39
MATERIALES Y MÉTODOS	41
Localización de la investigación	41
Obtención de insectos y establecimiento de colonia para bioensayos	41
Cría de la población de <i>S. zeamais</i>	41
Proteínas Cry de <i>Bt</i> para cada tratamiento.....	42
Descripción de los tratamientos.....	43
Metodología de establecimiento de los bioensayos	45
Variables evaluadas	46
Diseño experimental y análisis estadístico	49
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
Análisis general de las toxinas Cry de <i>Bt</i> sobre la supresión de <i>Sitophilus zeamais</i>	51
Análisis por toxina Cry de <i>Bt</i> sobre la supresión de <i>Sitophilus zeamais</i>	58
Toxina Cry8C de <i>Bt</i>	59
Toxina Cry7A de <i>Bt</i>	63
Toxina Cry3Aa de <i>Bt</i>	67
Toxina Cry3Bb de <i>Bt</i>	72

Toxina Cry3C de <i>Bt</i>	76
CONCLUSIONES	80
REFERENCIAS	81
ANEXOS.....	94
Artículo enviado a Acta agronómica titulado “Eficacia de la toxina Cry3Aa para la supresión de <i>Sitophilus zeamais</i> Motschulsky en granos de maíz osmoacondicionados”.....	94
Artículo enviado a Acta agronómica titulado “Efecto de toxinas Cry de <i>Bacillus thuringiensis</i> Berliner sobre <i>Sitophilus zeamaiz</i> M. (Coleoptera: Curculionidae) en semillas de maíz”.....	95

LISTA DE CUADROS

Cuadro 2. Toxinas Cry de <i>Bacillus thuringiensis</i> específicas para coleópteros, proporcionadas por el Instituto de Biotecnología de la UNAM, México.....	42
Cuadro 3. Concentraciones de los tratamientos de las toxinas Cry + CAPS al 1.0 %, probadas en bioensayos con <i>Sitophilus zeamais</i>	43
Cuadro 4. Formulas empleadas en la transformación de datos de los valores de las variables que no cumplen con los supuestos de normalidad para el análisis de varianza.	50
Cuadro 5. Comparación de medias entre concentraciones por toxinas Cry de Bt, para estudiar el efecto de supresión sobre <i>Sitophilus zeamais</i> , en granos de maíz osmoacondicionados.	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principales factores abióticos y bióticos que causan pérdidas durante la producción y almacenamiento de maíz a nivel mundial	7
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Sitophilus zeamais</i>	14
Figura 3. Dimorfismo sexual con base al áreacefálica de <i>Sithopilus zeamais</i>	15
Figura 4. Número de insectos coleópteros susceptibles a Bt (<i>Bacillus thuringiensis</i>), agrupados en familias de proteínas.....	23
Figura 5. Representación esquemática del mecanismo de acción de las proteínas cristalinas en coleópteros.....	28
Figura 6. Estructura del grano o semilla de maíz.....	36
Figura 7. Fases de la germinación de semillas	39
Figura 8. Viabilidad de las toxinas con gel de acrilamida para el establecimiento de los bioensayos	44
Figura 9. Comparación de los pesos de grano antes y después del tratamiento de osmoacondicionamiento con toxinas Cry de Bt.	55
Figura 10. Tasa de absorción (%) de las toxinas Cry de Bt, después de un tratamiento de osmoacondicionamiento en semillas de maíz.	56
Figura 11. Comparación del consumo de grano con respecto a la descendencia de <i>Sitophilus zeamais</i> , por toxina Cry de Bt.	58
Figura 13. Porcentaje de larvas vivas y muertas de la descendencia de <i>Sitophilus zeamais</i> expuesta a la toxina Cry8C de Bt.	61
Figura 14. Porcentaje de adultos del gorgojo del maíz <i>Sitophilus zeamais</i> comparado con el porcentaje de la descendencia total obtenida con la toxina Cry8C de Bt.	63
Figura 15. Relación entre la tasa de absorción de la toxina Cry7A, por granos de maíz osmoacondicionados y el porcentaje del consumo de grano por el gorgojo del maíz <i>Sitophilus zeamais</i>	64

Figura 16. Porcentaje de larvas vivas y muertas de la descendencia de <i>Sitophilus zeamais</i> expuesta a la toxina Cry7A de Bt	66
Figura 17. Porcentaje de adultos del gorgojo del maíz <i>Sitophilus zeamais</i> comparado con el porcentaje de la descendencia total obtenida con la toxina Cry7A de Bt.....	67
Figura 18. Relación entre la tasa de absorción de la toxina Cry3Aa, por granos de maíz osmoacondicionados y el porcentaje del consumo de grano por el gorgojo del maíz <i>Sitophilus zeamais</i>	69
Figura 19. Porcentaje de larvas vivas y muertas de la descendencia de <i>Sitophilus zeamais</i> expuesta a la toxina Cry3Aa de Bt	70
Figura 20. Porcentaje de adultos del gorgojo del maíz <i>Sitophilus zeamais</i> comparado con el porcentaje de la descendencia total obtenida con la toxina Cry3Aa de Bt.....	71
Figura 21. Relación entre la tasa de absorción de la toxina Cry3Bb, por granos de maíz osmoacondicionados y el porcentaje del consumo de grano por el gorgojo del maíz <i>Sitophilus zeamais</i>	73
Figura 22. Porcentaje de larvas vivas y muertas de la descendencia de <i>Sitophilus zeamais</i> expuesta a la toxina Cry3Bb de Bt	74
Figura 23. Porcentaje de adultos del gorgojo del maíz <i>Sitophilus zeamais</i> comparado con el porcentaje de la descendencia total obtenida con la toxina Cry3Bb de Bt.....	75
Figura 24. Relación entre la tasa de absorción de la toxina Cry3C, por granos de maíz osmoacondicionados y el porcentaje del consumo de grano por el gorgojo del maíz <i>Sitophilus zeamais</i>	76
Figura 25. Porcentaje de larvas vivas y muertas de la descendencia de <i>Sitophilus zeamais</i> expuesta a la toxina Cry3C de Bt	78
Figura 26. Porcentaje de adultos del gorgojo del maíz <i>Sitophilus zeamais</i> comparado con el porcentaje de la descendencia total obtenida con la toxina Cry3C de Bt	79

RESUMEN

SUPRESIÓN DEL INSECTO PLAGA *Sitophilus zeamais* M. (COLEOPTERA:
CURCULIONIDAE) CON TOXINAS Cry DE *Bacillus thuringiensis*, EN MAÍZ
POSCOSECHA

POR

MARCOS LIBRADO GARCÍA MORALES

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DR. AGUSTÍN HERNÁNDEZ JUÁREZ
(DIRECTOR DE TESIS)

Saltillo, Coahuila

Marzo, 2025

Durante el almacenamiento de los granos de maíz, estos enfrentan graves pérdidas debido al ataque de plagas, siendo *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) una de las principales amenazas, por la perforación que le hace al grano para alimentarse, lo que resulta en una disminución del peso de grano, reducción de la calidad nutricional y proliferación de microorganismos. En el presente estudio se evaluó el efecto de las toxinas Cry3Bb, Cry3C, Cry3Aa, Cry7A y Cry8C derivadas de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) (Bacillaceae) como agentes biotecnológicos para el control del gorgojo del maíz *S. zeamais*, mediante el consumo de granos de maíz osmoacondicionados con toxinas Cry, en condiciones de laboratorio. Los tratamientos evaluados consistieron en ocho concentraciones por toxina Cry, con cuatro repeticiones, con un total de 160 unidades experimentales. En cada cavidad (repetición) de las placas se agregaron dos granos de maíz y se imbibieron con 1200 μL de toxina Cry modificada y CAPS® >99%. Este bioensayo se estableció en condiciones de laboratorio, donde se agregaron un par de insectos, en proporción 1♂:1♀ (macho: hembra), incubados a una temperatura de 25 ± 3 °C y una humedad relativa de $60 \pm 5\%$. Los resultados muestran diferencias significativas en las variables de estudio, donde destaca la Cry3Aa a una concentración de 0.1 mg·mL⁻¹ con una alta mortalidad de 30.63%, con el 4.58% de sobrevivencia de larvas, también se observó que, en la mayoría de las variables a mayor absorción de la toxina, menor el consumo del insecto, valores que resaltan en la Cry3Aa con una tasa de absorción de 34.4% y un porcentaje de consumo de 30.43% con respecto a las demás toxinas. Esta investigación resalta la actividad que tienen estas toxinas hacia los coleópteros, afectando su desarrollo, ciclo de vida, mortalidad, entre otras. Con estos datos se ve la necesidad de implementar estrategias efectivas, sostenibles y específicas para el manejo de plagas en granos almacenados, contribuyendo a la seguridad alimentaria y a la preservación de los recursos agrícolas.

Palabras clave: mortalidad, estrategias, concentraciones, imbibición, absorción.

ABSTRACT

SUPPRESSION OF INSECT PEST *Sitophilus zeamais* M. (COLEOPTERA:
CURCULIONIDAE) WITH Cry TOXINS OF *Bacillus thuringiensis*, IN POST-
HARVEST CORN

BY

MARCOS LIBRADO GARCÍA MORALES

MASTER OF SCIENCE DEGREE IN AGRICULTURAL PARASITOLOGY
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DR. AGUSTÍN HERNÁNDEZ JUÁREZ
(DISSERTATION ADVISOR)

Saltillo, Coahuila

March, 2025

During storage, corn kernels face great losses due to pest attacks; being *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) one of the biggest threats due to the piercing damage caused by feeding on corn, resulting in a decrease in grain weight, lower nutritional quality and proliferation of microorganisms. In this study the effect of toxins Cry3Bb, Cry3C, Cry3Aa, Cry7A and Cry8C from *Bacillus thuringiensis* (Berliner) (Bacillaceae) as biotechnology agents for the control of corn weevils was assessed, by feeding on corn kernels that were osmoconditioned with Cry toxins under laboratory conditions. The assessed treatments included eight concentrations per Cry toxin, with four repetitions and a total of 160 experimental units. In each plate cavity (repetition) two corn grains were added and imbibed with 1200 µL of modified Cry toxin and CAPS® >99%. This bioassay was established under laboratory conditions, where a couple of insects were added, in a ratio of 1♂:1♀ (male: female), to be incubated at a temperature of 25 ± 3 °C and a relative humidity of 60 ± 5%. The results show significant differences in the trial variables, where Cry3Aa stands out with a concentration of 0.1 mg·mL⁻¹ a high mortality rate of 30.63% and 4.58% of larval survival. It was also observed that, in most of the variables, the higher the absorption of the toxin, the lower the consumption rate of the insect. Such values stand out in Cry3Aa with an absorption rate of 34.4% and a consumption percentage of 30.43% versus other toxins. This research work highlights the activity that these toxins have towards coleopterans, affecting their development, life cycle and mortality, among other aspects. These data show the necessity of implementing effective, sustainable and specific strategies for pest management in stored grains, contributing to food security and the preservation of agricultural resources.

Key words: mortality, strategies, concentrations, imbibition, and absorption.

INTRODUCCIÓN

El grano de maíz es de suma importancia como cereal a nivel mundial y nacional por los usos que se le dan, por su producción extendida y el consumo humano o para alimentación de animales, ya que es un cereal que contiene alta concentración de nutrientes, también se considera importante por su rápida adaptabilidad a diferentes ambientes y condiciones socioeconómicas. Este cereal está posicionado en el número tres en importancia en cuanto a superficie sembrada solo después de los cultivos de trigo y el arroz. Este cereal se incluye dentro de la dieta básica en varios países, principalmente en México (SIAP, 2022).

La mayoría de los productores de maíz, mantienen sus cosechas en los terrenos como estrategia de conservación, sin embargo, se presenta con frecuencia pérdidas por ataque de pájaros, roedores y el gorgojo *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855 (Coleoptera: Curculionidae), principal plaga del grano o semilla de maíz en poscosecha. Esta plaga se ve favorecida con altas temperaturas y humedades donde puede causar hasta un 80% de pérdida de la cosecha, muchas de estas afectaciones vienen desde el campo y son llevadas al almacén, donde puede perderse por completo la cosecha en seis meses si no se le da un manejo adecuado (Cerna *et al.*, 2010).

Algunas características morfológicas de los granos del maíz pueden atribuir a la tolerancia o susceptibilidad al ataque de las plagas (García-Lara *et al.*, 2003), éstas son empleadas por *S. zeamais* para poder definir sus hábitos de oviposición y así asegurar su especie, estos hábitos del gorgojo de maíz, dificultan el control y manejo; además el uso constante de insecticidas químicos ha permitido la generación de poblaciones de insectos resistentes a los mismos y con efectos indeseables sobre la salud humana, toxicidad para los mamíferos y la contaminación ambiental (Cano *et al.*, 2024). Se ha informado que los gorgojos

del género *Sitophilus* presentan una resistencia moderada y robusta a los insecticidas a base de piretroides (Singh *et al.*, 2021).

Es conveniente generar nuevas alternativas de control con el fin de reducir el uso de productos químicos como el control cultural, físico y biológico que son consideradas una de las alternativas más eficientes (Ángel *et al.*, 2015), como parte importante de un programa de manejo integrado de plagas (Armak *et al.*, 2024).

Existen pocos estudios relacionados al uso de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1915) (Bacillaceae), para el control de *S. zeamais*; esta bacteria es considerada como parte del control biológico de plagas, como una alternativa que no causa daño al ambiente ni a la salud del hombre e incluso a diversos organismos vivos, debido a su especificidad (Cano *et al.*, 2004; González *et al.*, 2015). *B. thuringiensis* (*Bt*) está utilizada para el control de ciertas plagas tales como: lepidópteros, dípteros y coleópteros, con una característica muy distintiva para causar efecto, debido a la producción de toxinas cristal (Cry), que, al ser ingeridas por el estadio larval de los insectos, se activa en el intestino medio (mesenterón) y provoca una parálisis intestinal, lo que impide a la plaga, que se siga alimentando y muere (Bravo & González, 2011).

El osmoacondicionamiento consiste en la imbibición controlada de la semilla en soluciones osmóticas o agua, interrumpiéndose dicho proceso antes de la protrusión de la radícula. Las semillas tratadas incrementan su porcentaje de germinación, así como el crecimiento de las plántulas, mejorando la calidad nutrimental de los cultivos como el maíz. Con la imbibición de la semilla y la activación de enzimas debida al efecto de las giberelinas, se activan glucanasas que degradan el endospermo almidonoso, cuyos productos son absorbidos por el escutelo (Preston *et al.*, 2009). Durante la germinación hay una absorción pasiva de agua que se divide en tres fases, la tercera fase no ocurre en semillas latentes (Méndez *et al.*, 2008). Poco después de la imbibición hay una

disminución en el contenido de ácido abscísico (ABA). La inmersión previa de la semilla en soluciones osmóticas, incluso en agua, puede mejorar el comportamiento de la semilla durante la germinación. Diversos resultados muestran que las semillas osmoacondicionadas mejoran su tasa de germinación, así como el comportamiento de la plántula, incluso bajo condiciones de estrés, se recomienda para situaciones de escasez de agua, para acelerar el crecimiento en plántulas de transplante e incluso para mejorar la calidad nutrimental de los cultivos como el maíz (Finch-Savage *et al.*, 2004; Harris *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2015). En esta investigación se plantea el osmoacondicionamiento como una técnica que funcione como vehículo para ingresar toxinas Cry de *Bt* al interior de la semilla de maíz y favorecer la alimentación de *S. zeamais*, debido a los hábitos alimenticios que tiene este insecto, y de esta forma proponer una alternativa biológica para la supresión en el desarrollo de esta plaga y minimizar sus efectos en el almacenamiento de semillas y granos.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto de *Bacillus thuringiensis* sobre la supresión del gorgojo del maíz *Sitophilus zeamais* plaga de almacén, mediante el consumo de granos de maíz osmoacondicionados con toxinas Cry, en condiciones de laboratorio.

Objetivos específicos

Comparar el efecto de las toxinas Cry de *Bt* sobre la supresión de la progenie de *S. zeamais in vitro*, alimentadas con granos de maíz osmoacondicionadas.

Determinar las variaciones provocadas por la influencia de las toxinas Cry de *Bt*, sobre los estadios de *S. zeamais* y su progenie.

Hipótesis

Se espera la supresión y control de *S. zeamais* en el desarrollo de la plaga, por al menos una toxina Cry de *Bt*, suministradas al insecto en granos de maíz osmoacondicionados con éstas.

REVISIÓN DE LITERATURA

Importancia del maíz

El maíz a nivel mundial es una de las especies con mayor diversidad biológica que permite seleccionar los mejores maíces para los diferentes ambientes y condiciones socioeconómicas, ocupando el tercer lugar en importancia en cuanto a superficie sembrada solo después de los cultivos de trigo y el arroz (SAGARPA-SIAP, 2014).

Este cereal forma parte de la dieta básica en varios países, principalmente en México, durante 2020 la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER) reportó siembras por 7 472 257 ha con una producción de 27 424 528 ton, donde el 79% corresponden a siembras que dependen del régimen de lluvias (temporal). México está catalogado como el séptimo productor de maíz del mundo y produce 27 600 000 millones de toneladas de granos de esta especie, que equivalente a 3% de la producción mundial, según la Producción Agrícola Mundial (SADER, 2021).

Importancia de los granos almacenados

Los granos básicos son considerados los alimentos indispensables para garantizar la seguridad alimentaria. El desarrollo industrial del país demanda materias primas más diversificadas y en cantidades crecientes, entonces la producción de granos básicos se considera muy importante para la industria, ya sea utilizada para fabricar alimentos, transformarlos en productos no alimenticios o para ser usados como sitios agrícolas en el mercado de valores. Para garantizar la conservación de la calidad de los granos, estos deben mantenerse con cuidados especiales en el almacén, durante el tiempo que permanecerán en resguardo hasta el momento en que serán utilizados (García-Lara *et al.*, 2007).

El almacenamiento es la fase del sistema de operaciones poscosecha durante la cual los productos se conservan de manera apropiada para garantizar la seguridad alimentaria de las poblaciones fuera de los periodos de producción agrícola. Sin embargo, durante el almacenamiento pueden presentarse diversos factores que deterioran la calidad de los granos (García-Lara y Bergvinson, 2007).

Una de las principales amenazas de los granos almacenados son los insectos-plaga, que ocupan el primer lugar en importancia. El monitoreo de la humedad del grano almacenado, temperatura ambiental y humedad relativa es de suma importancia, ya que de estos factores depende el posible daño final de estos insectos, sumado a ello, efectos secundarios, como la presencia de patógenos y ácaros (García-Lara *et al.*, 2007).

Factores bióticos y abióticos que afectan a los granos almacenados

Se han identificado diversos factores, bióticos y abióticos (Figura 1), causantes de pérdidas en la producción y almacenamiento de maíz a nivel mundial. El factor abiótico es, principalmente, la infertilidad del suelo y como factor biótico, los insectos poscosecha; en conjunto estos factores son responsables de pérdidas entre 70 a 95% de la cosecha cuando las condiciones de cultivo y almacenamiento son deficientes (Pingali y Pandey, 2001).

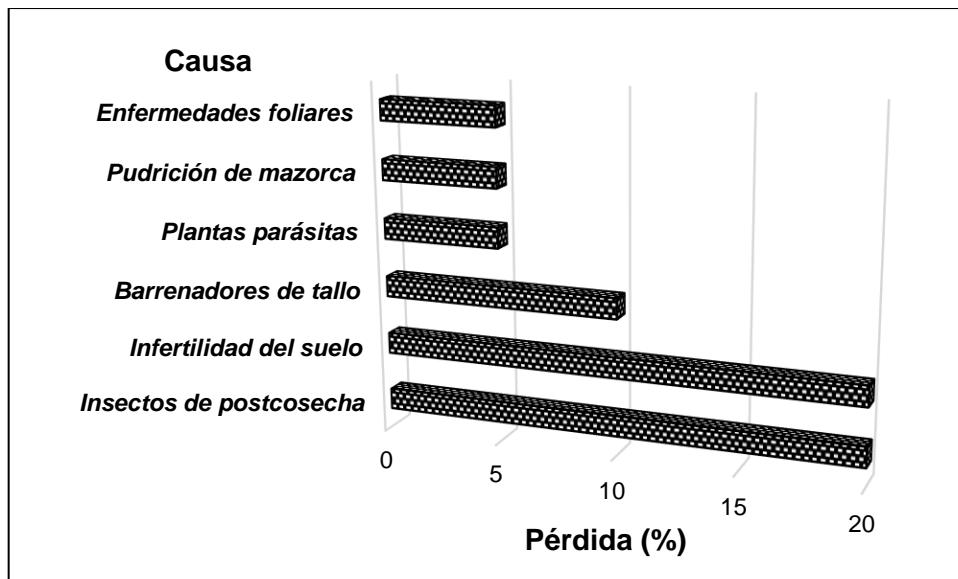


Figura 1. Principales factores abióticos y bióticos que causan pérdidas durante la producción y almacenamiento de maíz a nivel mundial (Pingali y Pandey, 2001).

Las plagas causan pérdidas superiores al 10% durante la producción y de 10 a 20% en poscosecha. El grano es resultado del esfuerzo de la producción; cualquier pérdida durante el período de almacenamiento se considera como absoluta. En México, la mayoría de los pequeños productores tienen problemas con el almacenamiento (García-Lara y Bergvinson, 2007).

Otro aspecto importante está relacionado con los huéspedes que atacan estas plagas de poscosecha; hay especies que son polífagas y se alimentan y multiplican en una gran variedad de hospederos, otras son específicas y sólo pueden reproducirse en un determinado grano o producto. Algunos insectos son específicos en cuanto a los requerimientos de humedad y temperatura; otros no sobreviven en granos secos, y otros lo hacen solamente si las temperaturas son relativamente altas. También es importante conocer la forma de desplazamiento; existen especies que tienen capacidad de vuelo, otras solo caminan y hay algunas que son sedentarias. Los insectos desarrollan hábitos propios. Cada generación responde al medio de manera similar a sus ancestros, la ovoposición,

alimentación, migración y respuesta al medio, generalmente siguen un patrón determinado. Sin embargo, no todos los insectos de una sola especie son iguales. La influencia del medio puede inducir cambios para su mejor adaptación y sobrevivencia, por ello, aunque las especies de insectos que atacan los productos almacenados tienen varias características en común, otras son completamente diferentes. Para prevenir y controlar la presencia de insectos que están dañando un producto durante su almacenamiento es indispensable identificarlos, así como conocer las condiciones ecológicas para su reproducción (Rodríguez y Iannacone, 2012).

Importancia de las plagas de granos almacenados

Las plagas de granos almacenados son de gran importancia económica y sanitaria, ya que afectan la calidad, cantidad y seguridad de los alimentos. Entre las plagas más comunes se encuentran gorgojos, palomillas y ácaros, que pueden causar pérdidas significativas en los almacenes (Gestor, 2019). La importancia de las plagas de los granos almacenados, se clasifican en:

Pérdidas económicas. Las infestaciones pueden resultar en pérdidas de hasta un 30% de la producción almacenada, lo que impacta directamente en los ingresos de los agricultores y comerciantes (Khalil *et al.*, 2021).

Calidad de los alimentos. Las plagas pueden contaminar los granos con excrementos, restos corporales y otros desechos, lo que disminuye la calidad del producto y lo hace menos atractivo para los consumidores (Bali *et al.*, 2020).

Seguridad alimentaria. Algunas plagas pueden actuar como vectores de patógenos, afectando la salud humana. Esto es especialmente crítico en regiones donde la seguridad alimentaria ya es un desafío (Zelaya *et al.*, 2022).

Desafíos en el almacenamiento. La presencia de plagas requiere de medidas de control que pueden incluir el uso de insecticidas y otras prácticas, lo que incrementa los costos y puede tener implicaciones ambientales (González y Rodríguez, 2022).

Daños por las plagas insectiles de almacén

Aproximadamente 250 especies de insectos atacan los granos y sus productos durante el almacenamiento y de ellos, alrededor de 20, son los de mayor importancia (Gestor, 2019). Los daños causados a los granos por las plagas se pueden clasificar en directos e indirectos:

- **Daños directos.** Implican pérdida de peso del grano, pérdida de capacidad germinativa (daños a embriones), bajo valor nutricional y mal olor. También se produce un aumento en el contenido de ácidos grasos, que en conjunto con ácido úrico causan la acidez de los granos conocida como rancidez o enranciamiento.
- **Daños indirectos.** La actividad metabólica que tienen los insectos que actúan sobre el grano eleva aún más la temperatura y la humedad, hasta generar condiciones óptimas para la proliferación de hongos, bacterias y ácaros.

Tipos de insectos plaga en granos y productos almacenados

La clasificación de las plagas cuando se trata de granos y productos almacenados es diferente a la manejada para los cultivos. En este caso se relaciona con el ataque al grano, si es inicial o como consecuencia de un ataque previo (Gutiérrez, 2023). Con base al daño que ocasionan los insectos se han agrupado en:

- **Plagas primarias:** las cuales son capaces de dañar granos enteros y tienen gran importancia económica. Y esta puede distinguirse en:
 - **Plagas primarias internas:** las cuales completan su ciclo en el interior del grano, por ejemplo, *Sitophilus spp.* (Motsch.) y *Araecerus fasciculatus* (Geer), estos coleópteros rompen el grano colocan los huevos dentro y las larvas se desarrollan internamente. La palomilla *Sitotroga cerealella* (Olivier) y los gorgojos *Callosobruchus spp.* depositan los huevos sobre el grano, al eclosionar la larva rompe y penetra, manteniéndose hasta la fase de adulto en que salen de éste.
 - **Plagas primarias externas:** se alimentan de la parte externa del grano y atacan la parte interna también. Aquí pueden citarse las especies de lepidópteros *Plodia interpunctella* (Hubner) y *Corcyra cephalonica* (Stainton), y los coleópteros *Lasioderma serricorne* (Fabricius) y *Tenebroides mauritanicus* (Linneo).
- **Plagas secundarias:** son las que se alimentan de los granos partidos, o que previamente han sido dañados por las primarias y se multiplican con facilidad con los restos harinosos dejados por las plagas primarias y de harinas o cereales de los granos procesados. Algunas de ellas son *Cryptolestes spp.* (Ganglbauer), *Oryzaephilus surinamensis* (Linneo), *Lasioderma serricorne* (Fabricius), *Stegobium paniceum* (Linneo) y *Tribolium spp* (Desvaux) (Oona, 2016).
- **Plagas terciarias:** se multiplican en granos y productos que presentan características de deterioro, ya sea causada por otros insectos o por microorganismos. Esta agrupación es arbitraria, pues algunas especies pueden ser secundarias para granos enteros y sanos, porque biológicamente no están capacitadas para dañarlos y necesitan que otros

insectos inicien el daño, pero pueden ser primarios para los productos de la molienda (Gestor, 2019).

El gorgojo del maíz *Sitophilus zeamais* (Motschulsky)

Clasificación taxonómica

Reino: Animal

Phylum: Arthropoda.

Clase: Insecta

Subclase: Pterigota

Orden: Coleoptera

Suborden: Polyphaga

Superfamilia: Curculionidea

Familia: Curculionidae

Subfamilia: Rhynchophorinae

Género: *Sitophilus*

Especie: *S. zeamais* M.

(Borror *et al.*, 1981; Ojo y Omoloye, 2016).

Origen y distribución de *Sitophilus zeamais*

El gorgojo del maíz *S. zeamais* es originario de la India, lugar en el cual se fue distribuyendo a todo el mundo, convirtiéndose en un insecto cosmopolita, se ha registrado su presencia en Asia Oriental, península Arábica y en las zonas productoras de maíz en África. También se ha registrado su presencia en Argentina, en los estados del sur de Estados Unidos, Australia y Japón (Benavente, 2018).

En México la presencia de *S. zeamais* se tiene en los estados de Aguascalientes, Campeche, Coahuila, Edo de México, Guerrero, Michoacán, Morelos, Oaxaca,

Puebla, Quintana Roo, Tabasco, Veracruz y Yucatán, por lo que reviste de gran importancia, debido a que se encuentra diseminado en los estados de mayor producción de maíz (Benavente, 2018).

Importancia de *Sitophilus zeamais*

El insecto plaga *S. zeamais* es de gran importancia en granos almacenados porque se considerada una plaga primaria, donde el adulto es capaz de dañar granos sanos para alimentarse y ovipositar, además las larvas una vez que eclosionan se alimentan del endospermo, generan abundante polvo dejando solamente la cubierta (Burgos *et al.*, 2019). Se ha documentado que esta plaga ya está presente desde el momento de la cosecha o antes, con porcentajes de infestación en el grano aún en la mazorca de hasta el 10% (Cerna *et al.*, 2010). En estas circunstancias, si la infestación no se controla durante el almacenaje, el daño en los granos puede alcanzar hasta el 50 o 70% a los seis meses de almacenaje. Además, si las temperaturas son altas, como en las regiones tropicales, la actividad de los insectos se incrementa (Palafox-Caballero *et al.*, 2008).

Hábitos y alimentación de *Sitophilus zeamais*

Los insectos desarrollan hábitos propios. Cada generación responde al medio de manera similar a sus ancestros, así la ovoposición, alimentación, migración y respuesta al medio, generalmente siguen un determinado patrón. Sin embargo, no todos los insectos son iguales. La influencia del medio puede inducir cambios para su mejor adaptación y sobrevivencia. Estos insectos se encuentran en condiciones propicias para alimentarse y multiplicarse en las bodegas y lugares de almacenamiento, si la humedad y temperatura son favorables tienen a su disposición gran cantidad de alimento que asegura su multiplicación y sobrevivencia. Su actividad metabólica aumenta la humedad y temperatura del medio en que se desarrollan creando las condiciones para que otras especies de

insectos de granos almacenados se multipliquen; el fenómeno aumenta hasta que la humedad es propicia para la proliferación de hongos y ácaros que elevan aún más la temperatura, haciéndola intolerable para los insectos que emigran hacia otras fuentes de alimento. El grano queda destruido, disminuyendo la disponibilidad de alimentos y causando graves pérdidas. Algunas especies son capaces de sobrevivir por largos períodos de tiempo en estado de reposo, cuando no disponen de suficiente alimento, o las condiciones del medio le son desfavorables; cuando las condiciones mejoran o con el advenimiento de nuevas cosechas, dejan su estado de reposo para multiplicarse activamente (García-Lara *et al.*, 2007).

Una de las características del maíz es que los granos pequeños que son más duros y compactos (cristalinos) conducen a una resistencia a la infestación por *S. zeamais*, mientras que granos dulces y harinosos son más susceptible al ataque de este insecto (Skendžić *et al.*, 2021). La identificación de las características que pueden conferir tolerancia o susceptibilidad al ataque de plagas pueden facilitar las detecciones tempranas de infestaciones y reducir pérdidas económicas (García-Lara *et al.*, 2003).

Ciclo de vida de *Sitophilus zeamais*

S. zeamais es de los únicos insectos plaga de almacén, que desarrollan todo su ciclo biológico (Figura 2) dentro del grano (huevo, pupa, larva y adulto), ya que la hembra abre un pequeño orificio con su aparato bucal, colocando un solo huevo sellando la cavidad con una sustancia gelatinosa que no es perceptible a simple vista, la larva es apoda, esta característica hace que no tenga la habilidad de caminar y desplazarse fuera del grano (Martínez *et al.*, 2011).

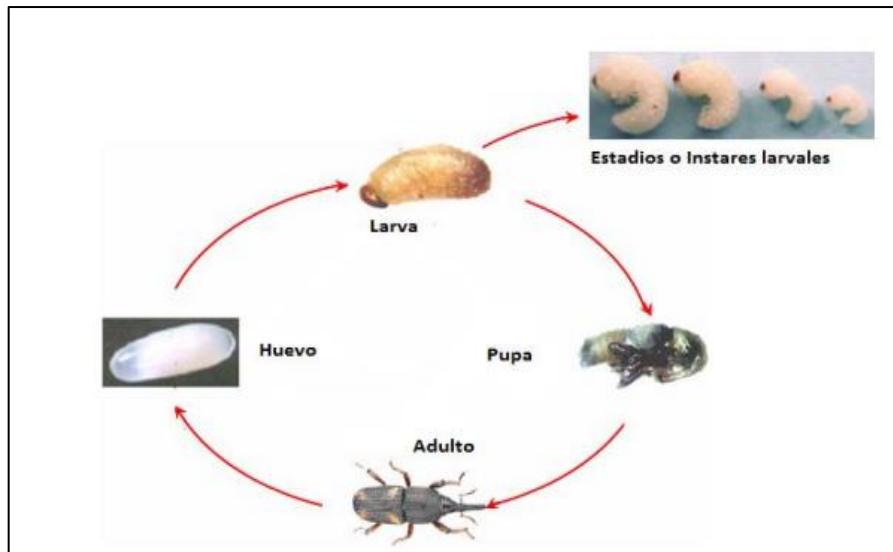


Figura 2. Ciclo de vida de *Sitophilus zeamais* (Meikle, 1999; García-Lara y Bergvinson, 2007).

Las características de los estadios de *S. zeamais* (Martínez *et al.*, 2011) son:

Huevo: el huevecillo rara vez se observa, ya que se desarrolla en el interior del grano infestado del cual se alimentó la hembra, es en forma de pera u ovoide de un color blanco opaco, ensanchado de la parte media hacia abajo y con extremos redondeados, mide aproximadamente 0.7 mm de largo y 0.3 mm de ancho. La incubación de huevecillos dura aproximadamente dos semanas (García-Lara y Bergvinson, 2007).

Larva: es un gusano pequeño de 2.50 a 2.75 mm de largo, blanco aperlado; de cuerpo grueso y apodo, con cabeza pequeña de color café claro, más larga que ancha y cuneiforme; centralmente casi recta y dorsalmente muy convexa. Pasa por cuatro estadios larvales, cada estadio larvario dura aproximadamente cinco semanas (García, 2004).

Pupa: es de color blanco pálido al inicio hasta tornarse a color café claro al final de su madurez, mide de 2.75 a 3.00 mm, presenta probóscide larga dirigida hacia

la parte anterior y las patas dobladas hacia la parte anterior, es decir hacia el cuerpo (Benavente, 2018).

Adulto: este mide de 2.50 a 4.50 mm de longitud, es de color café oscuro, cuerpo cilíndrico y alargado, cabeza prolongada en un pico o probóscide curva y delgada, antenas acodadas y de ocho segmentos, alas funcionales, el protórax densamente marcado con punturas del pronoto y son más de 20 a lo largo de la línea media del cuello al escutelo. El adulto es muy semejante en forma al gorgojo de los graneros, pero difieren en color y marcas, además de que este tiene bien desarrolladas el segundo para de alas (Benavente, 2018).

La hembra se diferencia del macho por sus genitales, que son más grandes y el pico o rostrum es más largo y rugoso que el del macho (Figura 3) (Reddy, 1951; Rodríguez y Iannaccone, 2012).

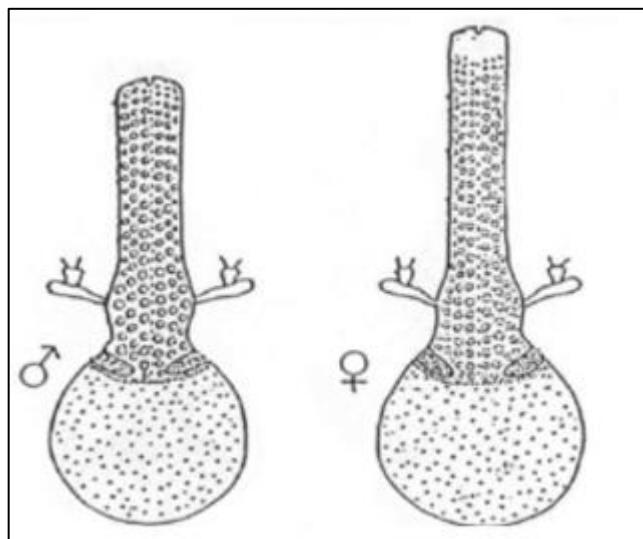


Figura 3. Dimorfismo sexual con base al áreacefálica de *Sitophilus zeamais*, de acuerdo con Reddy (1951) y Rodríguez y Iannaccone (2012).

Rango de hospederos de *Sitophilus zeamais*

Estos atacan cultivos en crecimiento, así como granos almacenados entre los que se encuentran trigo, arroz, sorgo, avena, cebada, centeno, chícharo, frijol y semillas de algodón. También infesta otros tipos de productos de cereales almacenados y procesados, como la pasta, la yuca y varios granos gruesos y molidos. Incluso se sabe que ataca algunas frutas durante el almacenamiento, como las manzanas (Patiño *et al.*, 2019).

Métodos de control de las plagas de almacén

Control químico

En 1958 en los EE. UU. por primera vez es utilizado el malatión para controlar plagas de productos almacenados iniciándose así, una era de combate efectivo contra estas plagas y aún en nuestros días el malatión es uno de los productos más utilizados. Otros insecticidas comúnmente utilizados, son: el fosfuro de aluminio, bromuro de metilo y cloropicrina, los cuales son de uso restringido debido principalmente a sus características altamente tóxicas, y deben ser manejados con medidas de seguridad adecuadas. La aplicación de gases se debe conducir solamente por personal experimentado debidamente entrenado. Si los insectos se encuentran sobre los umbrales económicos, se sugiere la fumigación. Sin embargo, en ningún momento debe abusarse irracionalmente. (García-Lara y Bergvinson, 2007).

La resistencia de insectos a insecticidas sintéticos ha proliferado exponencialmente, para ser considerados hoy en día, indispensable en los programas de control de plagas (Martínez *et al.*, 2011).

Control físico

Cualquier parámetro, proceso o propiedad que provee la física como disciplina y aplicados al manejo de las plagas como métodos físicos de control es aceptado. Parámetros tales como la temperatura, humedad, presión, luz ultravioleta, coloración, ultrasonido, entre otros, son elementos utilizados en el manejo de las plagas de almacén (Meza *et al.*, 2008).

Las temperaturas extremas son usualmente las más utilizadas como método de control físico ya que los insectos no pueden desarrollarse y reproducirse bajo los 13 °C, ni sobre los 35 °C. Así mismo se han utilizado radiaciones de varios tipos con la finalidad de evitar o reducir las infestaciones de insectos plaga de los granos almacenados. La radiación gamma con cobalto 60 como fuente radiactiva es el método más común para irradiar alimentos pudiendo penetrar alimentos sólidos entre 25 a 50 mm (Cristóbal *et al.*, 2013).

Entre otros métodos físicos de combate de insectos plaga de los granos almacenados se encuentran algunas prácticas de la agricultura poco tecnificada que aprovechan los recursos disponibles del medio como herramientas de control. Así es como una gran cantidad de polvos inertes, cenizas y arenas finas, se han mezclado con el grano de manera tradicional como barrera física contra el daño por insectos (Patiño *et al.*, 2019).

Resistencia física de los granos hacia *Sitophilus zeamais*

La resistencia de las plantas, en especial en el grano de maíz, pueden expresar resistencia a las plagas de almacén, desde el nivel anatómico o morfológico hasta el químico, pasando por combinaciones estructurales particulares que en conjunto se complementan para evitar el daño causado por el insecto (Bustamante y Patiño, 2001; Burgos, *et al.*, 2019). Visto así, la resistencia a plagas es heredable y repetible siempre y cuando las condiciones ambientales

sean las mismas. En su mayoría, esta resistencia es específica; es decir, puede ser resistente a una variante del insecto, pero susceptible a otra variante (Vallejo y Estrada, 2002).

Existen tres tipos de resistencia reconocidas al ataque de los insectos: antixenosis o no preferencia, antibiosis y tolerancia (López-López *et al.*, 2023). La antixenosis se refiere cuando una variedad es menos preferida por un insecto para sus procesos de copulación, ovoposición y alimentación; en este sentido, un insecto prefiere o no seleccionar a una planta, con la habilidad de percibir con sus sentidos de olfato, vista, tacto y gusto. La antibiosis es cuando el insecto utiliza una variedad o especie de planta hospedante para su alimentación y esta planta tiene efectos adversos en la vida de los insectos, como fecundidad reducida, menor tamaño, vida anormal, niveles bajos de fecundación e incremento de la mortalidad. Mientras que la tolerancia, se entiende cuando un insecto ataca a una planta y la planta tiene la capacidad de sobreponerse con la recuperación de tejidos o creación de nuevos tejidos. Es común que la tolerancia actué en combinación con otros mecanismos de resistencia.

Control cultural

Dentro de las acciones de control cultural se hace el uso de varios métodos tradicionales como la aplicación de mezclas de agentes protectores, entre los más usados se encuentra la cal y tierra diatomea o tizate, entre capa y capa del grano, o vaciar los agentes y mezclarlos con el grano. En pruebas de laboratorio y campo se ha demostrado que evitan el libre movimiento de los insectos, ya que las sustancias se adhieren a su cutícula, causándoles serios daños y en algunos casos la muerte. Se recomienda, además el uso de las siguientes plantas como agentes repelentes: epazote común, harina de chicharo, hojas de eucalipto, hojas del árbol Neem u hoja de maravilla, que pueden reducir hasta en un 25% la presencia del gorgojo (Cristóbal *et al.*, 2013). Así también se recomienda:

- Evitar daños en el campo por gusanos eloteros y pájaros, ya que retarda la entrada del picudo.
- Las cosechas tempranas disminuyen el tiempo de exposición al ataque de *S. zeamais* en zonas de alta incidencia.
- Limpiar los lugares de almacenamiento, los que deben estar libres de gorgojos y derrame de granos antes de almacenar el producto.
- Evitar colocar sacos con grano directamente en el piso; usar tarimas.
- Evitar almacenar en sacos viejos y rotos.

Control biológico

Insectos: existen parasitoides que atacan al género *Sitophilus*, entre ellos se encuentran algunas especies pertenecientes a la familia Pteromalidae (Orden: Hymenoptera) como son: *Anisopteromalus calandrae* Howard, *Chaetespila elegans* Westwood y *Lariphagus distinquendus* Foerster. Sin embargo, no son agentes de control biológico efectivo, ya que su ciclo de vida es más corto que el de sus hospedantes y tienen baja capacidad reproductiva (Pradera, 2014).

Hongos: para la producción de hongos entomopatógenos se requiere de un proceso que se lleva a cabo en laboratorio, el cual cumpla con los requisitos sanitarios establecidos, la elaboración que consiste en la multiplicación masiva del hongo y sus estructuras reproductivas (conidias) en un sustrato natural. A la fecha se han evaluado diferentes sustratos como arroz, trigo, cebada, maíz, frijol y soya, siendo los que más se utilizan el arroz y el maíz (Gómez *et al.*, 2014).

Como controladores de insectos están los bioplaguicidas entre los cuales se destacan los hongos entomopatógenos, a este grupo pertenece *Beauveria bassiana* (Bals.) que tiene la particularidad de penetrar al hospedante, a través de su cutícula, característica muy común en hongos entomopatógenos, siendo uno de los hongos más utilizados y que ha demostrado su potencial capacidad insecticida sobre diferentes coleópteros (Pedrini *et al.*, 2011). Otro de los principales hongos entomopatógenos involucrados en control de insectos de almacén es *Isaria fumosorosea* (Wize) Brown y Smith, anteriormente denominado *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown y Smith el cual es un agente de control biológico prometedor, con capacidad de parasitar insectos de más de 25 familias diferentes, incluyendo trips, moscas blancas, pulgones, coleópteros y lepidópteros (Piedra-Buena *et al.*, 2019).

Nematodos: los nematodos entomopatógenos (Nematoda: Heterorhabditidae y Steinernematidae) conocidos como organismos pluricelulares capaces de matar a un variado número de insectos plaga pueden aplicarse a granos y semillas en proceso de almacenamiento. Trabajos recientes consideran nematodos del género *Steinernema* (*S. feltiae* Filipjev, *S. carpocapsae* Weiser y *S. riobrave* Poinar y Raulston), donde se ha demostrado su eficacia. Por ejemplo, *S. riobrave* ha sido evaluada contra insectos plaga de granos almacenados tales como larvas de *P. interpunctella*, *Ephestia kuehniella* Zeller, *O. surinamensis*, *Tenebrio molitor* L., *Tribolium castaneum* Herbst, y *Trogoderma variabile* Ballion y adultos de *Sitophilus oryzae* L. y *Rhyzopertha dominica* Fabricius (Ramos *et al.*, 2007).

Bacterias: para el caso de bacterias, se han conducido para determinar la eficacia del gen de *Bt* bajo condiciones de almacenaje para lepidópteros, pero no se dispone de información al alcance de *Bt* que controle biológicamente a gorgojos o al resto de coleópteros que afectan como plagas de almacén. Sin embargo, sería sobresaliente promover investigaciones para la incorporar nuevos biotipos de *Bt* que ataquen a coleópteros plagas de granos almacenados (Meza *et al.*, 2008).

Características generales de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*)

Algunas características que tiene *Bt*, es un microorganismo específico, inocuo para el ser humano, los animales y plantas. Esto permite visualizar con un mayor enfoque y razonamiento al tipo de insecticida, químico o biológico, más conveniente a aplicar en un cultivo determinado. La bacteria es un bacilo Gram positivo, aerobio facultativo, esporulador, cuyo tamaño oscila entre 1.0 a 1.2 μm de ancho y de 3.0 a 5.0 μm de largo, nativo del suelo y catalogado como cosmopolita, se ha aislado de ecosistemas como bosques tropicales y templados, zonas desérticas, sabanas, archipiélagos, frutales, suelos agrícolas, arena y cuevas en los cinco continentes (Rosas, 2014).

Pertenece al reino Eubacteria, a la familia Bacillaceae y al género *Bacillus* junto con *Bacillus cereus* (Frankland y Frankland) y *Bacillus anthracis* (Cohn), de los cuales se diferencia por la formación de una inclusión parasporal refringente al microscopio de contraste de fases. La inclusión parasporal, puede ocupar hasta el 30% de la célula y se produce en la fase estacionaria de crecimiento de la bacteria. Esta inclusión está conformada por diversas estructuras proteicas, denominadas Cry y Cyt (Layton *et al.*, 2011). 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 contra insectos de los órdenes Lepidoptera, Diptera y Coleoptera (Ruiz, 2015).

Importancia de *Bacillus thuringiensis* en coleópteros

Debido a sus hábitos alimenticios, muchas especies de coleópteros causan graves daños tanto a las plantas cultivadas como a los productos almacenados, lo que lleva a pérdidas económicas significativas en todas las regiones del mundo (Oppert *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2016). Tanto las larvas como los adultos tienen mandíbulas fuertes, lo que les permite alimentarse de una amplia variedad de

sustratos vegetales, como raíces, tallos, hojas, granos o madera (Domínguez et al., 2020).

Hernández-Trejo et al. (2019) mencionan cinco puntos importantes de *Bt* para el control de coleópteros, los cuales son:

1. Insecticidas biológicos: *Bt* es conocido por su capacidad para producir proteínas que son tóxicas para ciertas plagas de insectos, incluidos coleópteros como *Diabrotica virgifera zea* (Krysan y Smith), conocido como el escarabajo del maíz y *Sitophilus spp.* Estas proteínas son una alternativa ecológica a los insecticidas químicos.
2. Especificidad: *Bt* ofrece una alta especificidad en su acción, lo que significa que puede controlar plagas específicas sin afectar a organismos no objetivo, lo que es beneficioso para la biodiversidad.
3. Interacción con el ecosistema: la aplicación de *Bt* puede influir en el ciclo de vida de los coleópteros, afectando tanto a larvas como a adultos. Esto se traduce en un manejo eficaz de las poblaciones de plagas.
4. Formulaciones avanzadas: la investigación reciente se centra en mejorar las formulaciones de *Bt* para aumentar su estabilidad y eficacia. Esto incluye el uso de tecnologías de microencapsulación y formulaciones líquidas que permiten una mejor aplicación y una mayor persistencia en el campo.
5. Integración en el manejo de plagas: el *Bt* se está integrando en programas de manejo integrado de plagas (MIP), combinándose con otros métodos de control biológico y cultural. Esto ha demostrado ser eficaz en la reducción de la dependencia de productos químicos.

Proteínas cristales con actividad para coleópteros

Las proteínas Cry, codificadas por genes *cry3*, fueron descubiertas por primera vez en las subespecies *tenebrionis* (Krieg *et al.*, 2009).

Los escarabajos representan el orden de la clase insecta que incluye el mayor número de especies. Sin embargo, los estudios realizados para identificar toxinas de *Bt* activas contra los escarabajos están lejos de ser iguales a los realizados en el orden Lepidoptera. A la fecha, se han reportado 45 proteínas Cry, 2 proteínas Cyt, 11 proteínas Vip y 2 proteínas Sip, con actividad contra insectos coleópteros, provenientes de *Bt*, de las cuales las toxinas de las familias Cry3 y Cry8 tienen el espectro de huéspedes más grande (Figura 4).

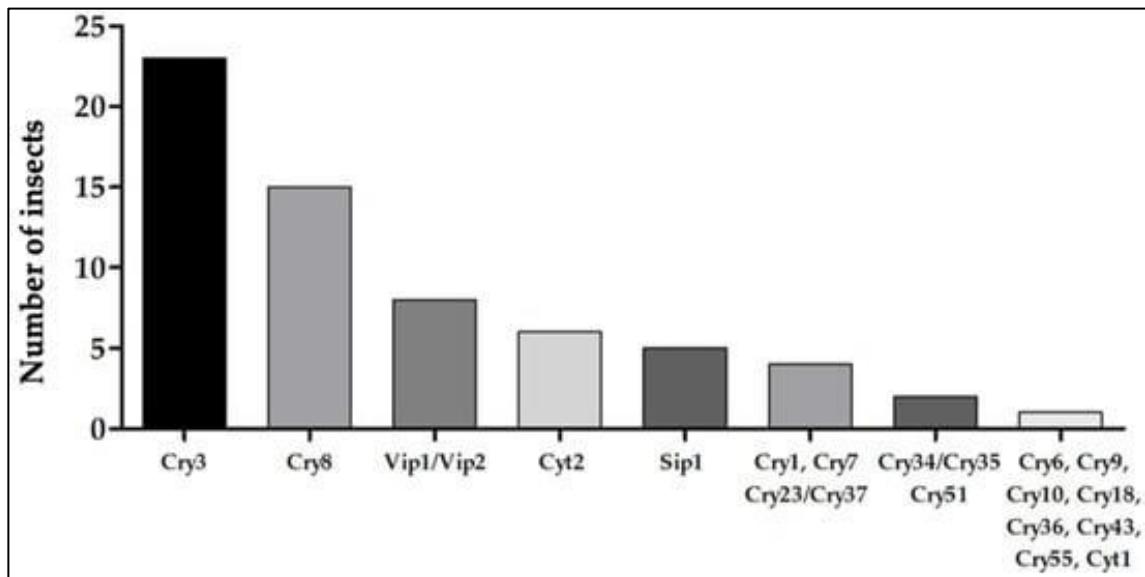


Figura 4. Número de insectos coleópteros susceptibles a *Bt* (*Bacillus thuringiensis*), agrupados en familias de proteínas (Domínguez *et al.*, 2020).

Debido a la conocida actividad en importantes plagas de coleópteros, como *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae) o *Diabrotica spp.* (Coleoptera: Chrysomelidae), algunos de estos aislados se han desarrollado como bioinsecticidas para el control de escarabajos (Park *et al.*, 2006). Las

proteínas Cry3Aa, Cry3Ba, Cry3Bb y Cry3Ca han mostrado actividad contra la mayoría de las principales familias de coleópteros, incluyendo Chrysomelidae, Curculionidae, Scarabaeidae y Tenebrionidae, entre otras.

Los grupos Cry7 y Cry8 son comparativamente menos activos en crisomélidos, pero representan una alternativa seria las proteínas Cry3. La Cry7Aa, anteriormente conocida como CryIIIC, es muy tóxica para las especies del género *Cylas* (Coleoptera: Brentidae) (Ekobu *et al.*, 2010) incluso más que la proteína Cry3, pero no tiene efectos negativos contra *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae) o *Diabrotica undecimpunctata* Mannerheim (Coleoptera: Chrysomelidae). Un informe reciente indica que una protoxina tipo Cry7Aa es activa contra *L. decemlineata* sin ningún paso previo de solubilización (Domínguez-Arrizabalaga *et al.*, 2019). La toxina Cry7Ab solubilizada es activa contra *Henosepilachna vigintiomaculata* Motch (Fabricius) (Coleoptera: Coccinellidae) y *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleoptera: Chrysomelidae), pero no contra *Anomala corpulenta* Motschulsky (Coleoptera: Scarabaeidae) o *Pyrrhalta aenescens* Fairmaire (Coleoptera: Chrysomelidae) (Canción *et al.*, 2012).

Las proteínas de tipo Cry8 son tóxicas para un gran número de plagas de coleópteros, particularmente contra especies de la familia Scarabaeidae (Gindin *et al.*, 2014). Además, las proteínas Cry8A y Cry8B han mostrado actividad contra los crisomélidos *L. decemlineata* y *Diabrotica spp.*, Cry8Ca contra el tenebriónido *Alphitobius diaperinus* Pancet (Coleoptera: Tenebrionidae) y Cry8Ka contra el curculiónido *A. grandis* (Oliveira *et al.*, 2011).

Proteínas Cry, Cyt, Vip y Sip

Las proteínas *Bt* cristal (δ -endotoxinas) se producen durante la fase de crecimiento estacionario y se han aislado de una amplia gama de plagas de insectos. Estas inclusiones cristalinas están formadas principalmente por

proteínas Cry y Cyt que son tóxicas para una amplia variedad de especies de insectos. La mayor parte de la información sobre las propiedades insecticidas se ha obtenido para la familia Cry3, y solo unos pocos datos provienen de otras familias Cry.

Proteínas Cry. Las proteínas *Bt* Cry se pueden subdividir básicamente en tres grupos diferentes según su homología y estructura molecular: el grupo de tres dominios (3D), se compone de las proteínas Etx_Mtx2, las proteínas Toxin_10 y las toxinas α -helicoidales (Soberón *et al.*, 2013).

Las proteínas Cry de 3D constituyen el grupo más grande y mejor estudiado. Estas se producen como protoxinas de dos tamaños principales, una protoxina de ~130 kDa y otra más corta de ~70 kDa (Pardo-López *et al.*, 2013). Las proteínas de 130 kDa comparten un extremo C altamente conservado que contiene 15 - 17 residuos de cisteína, que es prescindible por toxicidad, pero necesario para la formación de enlaces disulfuro intermoleculares durante la formación de cristales (Bravo *et al.*, 2011). Este grupo se ha estudiado principalmente con toxinas de lepidópteros como Cry1A, pero también incluye algunas toxinas activas de coleópteros como Cry7A y Cry8.

Proteínas Cyt. Las proteínas Cyt constituyen un grupo pequeño, estas proteínas aumentan el potencial de ciertas toxinas Cry y tienen un parecido a las Cry. Cada vez son más estudiadas, se producen como protoxinas con un tamaño activado proteolíticamente de alrededor de 25 kDa (Soberón *et al.*, 2013). Al igual que con algunas proteínas Cry, la estructura terciaria de algunas proteínas Cyt ya ha sido resuelta. Cyt1Aa, Cyt2Aa y Cyt2Ba muestran una estructura similar compuesta por un solo dominio α - β , con dos capas externas de α -hélice envueltas alrededor de una β hoja. Se han registrado algunos estudios con péptidos de Cyt1A, que muestran los péptidos de la α -hélice, que son elementos estructurales importantes involucrados en la interacción de la membrana y también en el

proceso de oligomerización, mientras que la hebra β forma un poro oligomérico con una estructura de β barril en la membrana (Cohen *et al.*, 2011).

Las proteínas Cyt de *B. thuringiensis* tienen una actividad citolítica (hemolítica) *in vitro*, por esa razón fue nombrado de esa manera, y muestran una especificidad predominante en dípteros (De Maagd *et al.*, 2003). Sin embargo, algunas de estas proteínas también son tóxicas para plagas de coleópteros, como Cyt1Aa a *Chrysomela scripta* Fabricius o Cyt2Ca a los crisomélidos *L. decemlineata* y *Diabrotica spp.* y a los curculiónidos *Diaprepes abbreviatus* L. (Mahmoud *et al.*, 2017).

Además, las proteínas Cyt mejoran la actividad de las proteínas Cry. Por ejemplo, Cyt1Aa es capaz de superar altos niveles de resistencia a Cry3Aa por *C. scripta*, desempeñando un papel importante en el manejo de la resistencia (Soberón *et al.*, 2013).

Proteínas Vip. Dentro de la familia Vip, los genes *vip1* y *vip2* son co-transcriptores en un solo operón de 4 kpb, que producen proteínas de ~100 kDa (Vip1) y 50 kDa (Vip2) (Zúñiga-Navarrete *et al.*, 2013). La ausencia de toxicidad de las proteínas por sí sola, sugiere que se trata de una toxina binaria, considerado para algunos miembros de los órdenes de los coleópteros y hemípteros (Sattar y Maiti, 2011). Si bien *Bt* es una buena fuente de proteínas Vip, estas proteínas también se han encontrado en otras bacterias estrechamente relacionadas, como *B. cereus*, *Lysinibacillus sphaericus* Neide o *Brevibacillus laterosporus* Laubach.

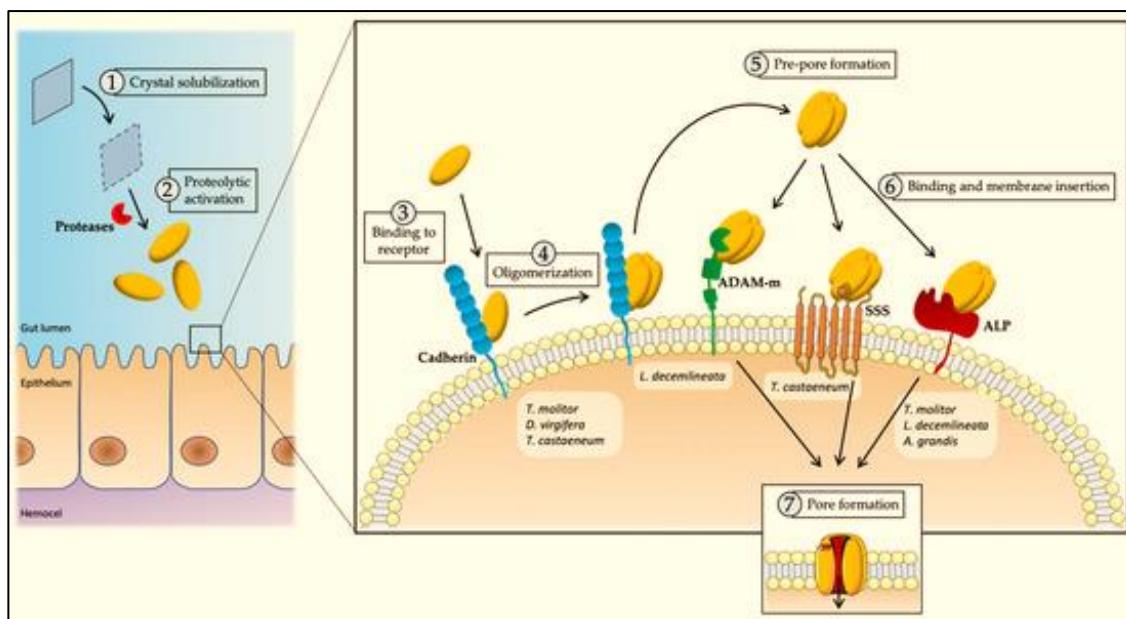
Proteínas Sip. Actualmente, se han descrito dos proteínas Sip, ambas activas contra varias plagas de coleópteros. El hecho de que las cepas que albergan los genes *sip1Aa* y *sip1Ab* también contengan los genes *cry3* y *cry8*, respectivamente, sugiere que las proteínas Sip1 pueden tener un papel en el mecanismo insecticida contra los insectos coleópteros (Sha *et al.*, 2018). La

proteína Sip1Aa activa de coleópteros contiene una señal de secreción de consenso Gram-positiva predicha y exhibe una similitud del 46% con la toxina mosquitocida Mtx3 de *L. sphaericus*. Esta similitud también indica que la toxicidad de Sip1Aa debe ser causada por la formación de poros (Palma *et al.*, 2014).

Modo de acción de *Bacillus thuringiensis*

El modo de acción se ha visto por estudios realizados en insectos lepidópteros, aunque se cree que es similar entre diferentes órdenes como Coleoptera y Diptera, con algunas peculiaridades (Bravo *et al.*, 2011). El proceso comienza una vez que el insecto objetivo ingiere la proteína y llega al intestino medio del insecto, donde se solubiliza y se activa proteolíticamente. Tal activación permite que las toxinas se unan primero a sus receptores específicos en la membrana de la célula huésped, luego a su oligomerización y, finalmente, a la formación de poros en la membrana celular (Figura 5), en este modo de acción de varios pasos, varios factores pueden contribuir a la especificidad de la proteína (Jurat-Fuentes y Crickmore, 2017; Domínguez *et al.*, 2020).

Es bien aceptado que los procesos de solubilización se deben a las condiciones ambientales en el intestino medio del insecto susceptible, principalmente a los valores de pH. Cabe destacar que, a diferencia del intestino medio alcalino de los insectos lepidópteros y dípteros, por otro lado, los escarabajos tienen un intestino medio ácido, lo que sugiere que se necesitan diferentes condiciones de solubilización para cada proteína. Por ejemplo, los fluidos del intestino medio de las larvas de *L. decemlineata* y *D. virgifera zea* no parecen solubilizar Cry1B y Cry7Aa1, y solo después de una solubilización previa *in vitro*, estas proteínas se activan (Domínguez *et al.*, 2020). Sin embargo, informes recientes muestran que las proteínas Cry7Ab2 y Cry7Aa2 se solubilizan en los fluidos del intestino medio de las larvas de *Henosepilachna vigintioctomaculata* (Motsch.) y *L. decemlineata*, respectivamente, lo que sugiere que la falta de solubilización involucra más factores que el pH (Domínguez-Arrizabalaga *et al.*, 2019).



(1) El cristal se disuelve bajo las condiciones ácidas del lumen del intestino medio de los coleópteros. (2) Las enzimas digestivas específicas, como las cisteínas y las proteasas aspárticas, procesan la protoxina, activándola como toxina. (3) La toxina activa se une inicialmente a un receptor primario (CADR). (4) Posteriormente, las toxinas oligomerizan, formando estructuras de pre-poro. (5) Estas estructuras oligoméricas interactúan con un receptor secundario específico, que puede incluir metaloproteasas ADAM, fosfatases alcalinas ancladas a GPI o simportadores de soluto de sodio. (6) Esta interacción provoca la inserción de la estructura en la membrana celular. (7) Finalmente, se forman poros en la membrana, lo que culmina en la lisis de la célula. (Jurat & Crickmore, 2017; Domínguez *et al.*, 2020).

Figura 5. Representación esquemática del mecanismo de acción de las proteínas cristalinas en coleópteros:

Cultivos *Bt*

Se han creado plantas *Bt* para el control de varias plagas de insectos, entre ellas, para el manejo del escarabajo de la papa *L. decemlineata* y los gusanos de la raíz del maíz *Diabrotica spp.* El primer cultivo modificado por el hombre fue la papa, que expresó el gen *cry3A* de *Bt* subsp. *tenebrionis* en sus hojas (Perlak *et al.*, 1993; Domínguez *et al.*, 2020). La expresión transgénica confiere protección a las plantas de papa contra el escarabajo y a si permite reducir las aplicaciones de insecticidas (Duncan *et al.*, 2002). Sin embargo, las papas genéticamente modificadas se comercializaron de 1995 a 2001, y finalmente se retiraron del

mercado debido a la preocupación social por este tipo de cultivos (Thornton, 2004).

Se diseñó un maíz *Bt* activo para coleópteros para el control de gusanos de la raíz del maíz, expresando una variante del gen *cry3Bb1* de tipo salvaje de *Bt* subsp. *kumamotoensis* en el tejido de la raíz (Vaughn *et al.*, 2005). Actualmente, los híbridos de maíz *Bt* expresan cuatro proteínas cristalinas diferentes (Cry3Bb, mCry3A, Cry34Ab/35Ab y eCry3.1Ab), individualmente o coexpresando dos toxinas (Gassmann *et al.*, 2016). La oportunidad de expresar la toxina en un tejido específico permite minimizar la exposición de la plaga que no es objetivo, al tiempo que aumenta el control de los insectos en los tallos y raíces, ya que de otro modo serían difíciles de manejar. Sin embargo, el gusano de la raíz del maíz occidental ha desarrollado resistencia de campo a las cuatro toxinas *Bt* disponibles (Zukoff *et al.*, 2016).

Estos hechos muestran que, aunque los cultivos *Bt* tienen el potencial de aumentar la productividad al tiempo que conservan la biodiversidad, los programas de manejo de resistencia y el mejor uso del manejo integrado de plagas son necesarios para retrasar el desarrollo de resistencia tanto como sea posible (Shrestha *et al.*, 2018).

Hasta la fecha, la extensión de los cultivos *Bt* ha aumentado en todo el mundo, particularmente, de algodón *Bt*, arroz *Bt* y maíz *Bt* (James, 2017). Se están llevando a cabo nuevas estrategias para tratar de retrasar la resistencia, incluido el uso combinado de varias proteínas en la misma planta *Bt* y ampliando el espectro de control con toxinas para otros ordenes, como es el caso de las específicas para coleópteros (Cuadro 1).

Cuadro 1. Estudios para el control de coleópteros con toxinas de *Bt*.

Toxinas y Cepa	Cultivo	Plaga	Autor y año de estudio/país
ET33/34 (Cry23Aa1/Cry37Aa1), ET70 (Cry22Ab1), Cry3Aa3, Cry3Ba2, Cry3Bb3, Cry3Ca1, y Cry7Aa1: cepa <i>Bt</i> <i>thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> .	Camote <i>Ipomoea batatas</i> L.	<i>Cylas puncticollis</i> Boh. y <i>Cylas brunneus</i> Fabricius (Coleoptera: Brentidae)	Ekobu <i>et al.</i> , 2010/África
Cry 3Bb1	Maíz <i>Zea mayz</i> L.	<i>Diabrotica virgifera zea</i> Krysan y Smith (Coleoptera: Chrysomelidae).	Timothy <i>et al.</i> , 2006/USA
eCry3.1Ab, mCry3A, Cry3Bb1 y Cry34/35Ab1: cepa NCR de laboratorio a las proteínas <i>Bt</i>	Maíz	<i>Diabrotica barberi</i> R.F.Smith & Lawrence (Coleoptera: Chrysomelidae)	Pereira <i>et al.</i> , 2020/USA
Cry1B, Cry1I, Cry3A, Cry7A y Cry23/37	Vid <i>Vitis vinifera</i> L.	<i>Xylotrechus arvicola</i> Olivier (Coleoptera: Cerambycidae)	Rodríguez <i>et al.</i> , 2021/España
Cepa <i>Bt</i> WZ-9 que contiene una sola toxina Cry7Ab3	Papa <i>Solanum tuberosum</i> L.	<i>Henosepilachna vigintioctomaculata</i> Motch (Fabricius) (Coleoptera: Coccinellidae)	Canción <i>et al.</i> , 2012/China
Cepa <i>Bt</i> HBF-18 que contiene Cry8-like	Soya <i>Glycine max</i> L.	<i>Holotrichia parallela</i> Motschulsky (Coleoptera: Scarabaeoidae)	Di <i>et al.</i> , 2019/China
Cepa <i>Bt</i> Q52-7 que contiene Cry8Na1	Muestra de suelo	<i>H. parallela</i> , <i>Anomala corpulenta</i> Motschulsky y <i>Holotrichia oblita</i> Faldermann (Coleoptera: Scarabaeidae)	Li <i>et al.</i> , 2014/China
Cry3Aa y Cry3Bb	Papa	<i>Diabrotica virgifera virgifera</i> LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae)	Park <i>et al.</i> , 2009/USA
Toxina Cry8Db	Pasto (césped)	<i>Popillia japonica</i> Newman (Coleoptera: Scarabaeidae)	Yamaguchi <i>et al.</i> , 2008 /EUA
Toxina Cry8Ka	Algodón <i>Gossypium hirsutum</i> L.	<i>Anthonomus grandis</i> Boheman (Coleoptera: Curculionidae)	Oliveira <i>et al.</i> , 2011/ Brasil

Dentro de los estudios realizados con toxinas Cry de *Bt* para coleópteros, algunos investigadores trabajaron en la evaluación de siete proteínas activas para este orden, en insectos de la familia Brentidae (*C. puncticollis* y *C. brunneus*), se probaron con cinco dietas artificiales que variaron en su composición y de las cuales todas las proteínas tuvieron una toxicidad mayor que el control no tratado.

De las siete toxinas, la Cry7Aa1, ET33/34 y Cry3Ca1 tuvieron valores de CL₅₀ por debajo de la concentración de 1.0 µg·g⁻¹ en la dieta frente a las especies en estudio (Ekobu *et al.*, 2010; Cuadro 1).

En un estudio para investigar el efecto de la proteína Cry3Bb1 en combinación con un cebo de cucurbitacina en la alimentación de adultos y la longevidad de gusanos occidentales de la raíz del maíz *D. virgifera virgifera*, tanto para poblaciones resistentes a los organofosforados como para poblaciones susceptibles a estos insecticidas. Se realizaron pruebas de elección y no elección, donde se cuantificó la posible repelencia a la proteína *Bt*, comparando el consumo de discos de celulosa tratados con tres concentraciones de *Bt* en combinación con un estimulante de la alimentación y sin el estimulante. En ese mismo estudio se llevó a cabo un ensayo de tiempo letal para examinar la supervivencia de los escarabajos expuestos a la proteína *Bt* en su dieta. Se encontró que los gusanos adultos de la raíz no se ven significativamente disuadidos por la presencia de Cry3Bb1 en los discos tratados y que la ingestión de las toxinas no afecta negativamente a la longevidad adulta del insecto (Timothy *et al.*, 2006; Cuadro 1).

Para determinar la susceptibilidad basal de una cepa NCR de laboratorio a las proteínas *Bt*: eCry3.1Ab, mCry3A, Cry3Bb1 y Cry34/35Ab1 utilizando ensayos de toxicidad para el insecto *D. barberi*, en plántulas de maíz y plantas adultas, así como dieta artificial, se realizó un estudio donde se llevaron a cabo ensayos de toxicidad, que consistieron en superponer las toxinas Cry a la dieta artificial. En los ensayos, un número significativamente mayor de larvas sobrevivieron al maíz que expresa Cry34/35Ab1 en comparación con las larvas que sobrevivieron al maíz que expresa eCry3.1Ab, que éstas presentaron anchos de la cápsula de la cabeza significativamente más pequeños (Pereira *et al.*, 2020; Cuadro 1).

Se evaluó la susceptibilidad de larvas de *X. arvicoloides* con cinco proteínas Cry tóxicas para coleópteros (Cry1B, Cry1I, Cry3A, Cry7A y Cry23/37) en condiciones

de laboratorio. Las proteínas Cry ensayadas pudieron aplicarse para el control de larvas de este coleóptero, ya que fueron capaces de matarlas y causar graves alteraciones en el estadio larvario durante los meses restantes de desarrollo que siguieron. Los resultados sugieren que estas proteínas Cry pueden ser utilizadas como bioinsecticidas contra las larvas de este insecto. Esta investigación se llevó a cabo en el cultivo de la vid, con la finalidad de dar alternativas en la protección de la madera de este cultivo, con la finalidad de romper la rápida evolución de los insectos al control químico (Rodríguez *et al.*, 2021; Cuadro 1).

Se identificó la cepa *Bt* WZ-9, que contiene una sola toxina Cry7Ab3, con actividad insecticida efectiva contra las larvas de *H. vigintioctomaculata*. Se realizó una incubación mediante un homogeneizado de intestino medio de larvas y tripsina *in vitro*, la protoxina Cry7Ab3 de 130 kDa se degradó en los fragmentos resistentes a la proteinasa de ~75 kDa. Las observaciones histopatológicas de este estudio indicaron que la ingestión de Cry7Ab3 por parte de las larvas del insecto, provoca una aceleración en la formación de las células del epitelio del intestino medio en la luz intestinal y, finalmente, la lisis de las células del epitelio, lo que provocó la muerte de las larvas (Canción *et al.*, 2012; Cuadro 1).

Se evaluaron plantas de soya que expresan el gen *Bt cry8* y que muestran resistencia a *H. parallelia*, el estudio lo realizaron con ocho líneas transgénicas independientes con las que fueron alimentadas larvas de *H. parallelia*. Donde se mostró que bajo estrés alimentario por *H. parallelia*, las tasas de supervivencia de las plantas no transgénicas fueron 92% más bajas que las de las plantas transgénicas. Y así también se reportó que la tasa de mortalidad de *H. parallelia* aumentó cuando las larvas se alimentaron de las raíces de las plantas de soya transgénica. Además, las larvas supervivientes estaban deformadas y su crecimiento estaba inhibido. Por lo tanto, los eventos generados en este estudio podrían ser utilizados en programas de mejoramiento en el cultivo de la soya (Di *et al.*, 2019; Cuadro 1).

La cepa *Bt* Q52-7 que contiene el gen para la expresión de la toxina Cry8Na1 recolectada de una muestra de suelo en el distrito de Qian Shan, provincia de Liao Ning, China, se evaluó con insectos coleópteros *H. parallela*, *A. corpulenta* y *H. oblita*, por lo que se diseñaron cebadores específicos para que el fragmento amplificado clonara la región de codificación de longitud completa. Los resultados mostraron que el gen para la toxina Cry8Na1 se expresó con éxito en el mutante acristalífero HD-73-acristalino de *Bt* subsp. *kurstaki* HD-73. También mostraron que la cepa *Bt* Q52-7 tuvo una alta toxicidad contra el escarabajo asiático *H. parallela*, exhibiendo una CL₅₀ de 3.80×10^9 ufc·g⁻¹, pero no es tóxico para *A. corpulenta* y *H. oblita* (Li *et al.*, 2014; Cuadro 1).

Se realizó un estudio con las proteínas insecticidas Cry3Aa y Cry3Bb de *Bt* que se utilizan en bioplaguicidas y cultivos transgénicos para controlar larvas de escarabajos que se alimentan de hojas y gusanos de la raíz de la especie *D. virginifera virginifera*. Las larvas de coleópteros que se alimentaron de las inclusiones de CR8-10 tuvieron una mayor susceptibilidad a la toxina Cry3Aa o Cry3Bb. Por otro lado, los bioplaguicidas que contienen Cry3 y que incluyen un fragmento de cadherina pueden llegar a ser más eficaces (Park *et al.*, 2009; Cuadro 1).

La toxina Cry8Db es altamente tóxica contra el escarabajo del césped, esta toxina fue clonada a partir de un aislado de *Bt*, BBT2-5 y sus características son típicas de *Bt*, como las secuencias conservadas de ocho bloques y la estructura de la toxina de 3D, tal como se define con la toxina Cry3Aa. La actividad de las proteínas Cry8D está codificada en el dominio dos (2D) y pruebas de esta toxina Cry contra otras especies de escarabajos mostraron diferencias significativas entre Cry8D y Cry8Ca, pero ninguna diferencia entre Cry8Da y Cry8Db (Yamaguchi *et al.*, 2008; Cuadro 1).

Se han identificado nuevas moléculas de toxinas Cry de *Bt* que muestran una toxicidad alta contra el picudo del algodonero. Mediante estudios de evolución molecular dirigida *in vitro*, a través de la mezcla de ADN y el cribado de

visualización de fagos para mejorar la actividad insecticida de las variantes de la proteína Cry8Ka1. Estos estudios mostraron que la CL₅₀ de la toxina Cry8Ka5 mutante cribada fue 3.15 veces mayor que la toxina Cry8Ka1 de tipo salvaje. El modelado de homología de Cry8Ka1 y el mutante Cry8Ka5 sugirió que ambas proteínas conservaban la estructura típica de la familia Cry de 3D (Oliveira *et al.*, 2011; Cuadro 1).

Descripción de toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*

Cry3Aa. Esta toxina pertenece al grupo de 3D, la cual se utiliza en todo el mundo para el control de insectos plaga, específica para el orden Coleoptera. Es formadora de poros (PFT) que afectan a los insectos, las toxinas Cry interactúan con receptores específicos ubicados en la superficie de la célula huésped y son activadas por proteasas del huésped después de la unión del receptor, lo que da como resultado la formación de una estructura oligomérica previa al poro que es competente en inserción (Bravo *et al.*, 2007).

Cry3Bb. El gen *cry3Bb* de *Bt* se introdujo con éxito en el genoma del plastidio del álamo *Populus alba* L., lo que dio lugar a un álamo transplastómico con alta mortalidad para *Plagiodera versicolora* Laicharting (Xu *et al.*, 2020).

Cry8C. El gen de tipo *cry8C* designado *cry8Ca2*, que fue clonado y secuenciado a partir de un aislado de *Bt* HBF-1 en China, consistió en un marco de lectura abierto de 3483 pb que codificaba una proteína de 1160 residuos de aminoácidos. El análisis de secuencia mostró que la protoxina Cry8Ca2 de 130.5 kDa tenía una homología de secuencia del 99.9% con la proteína Cry8Ca1 previamente informada, con un desajuste entre las dos secuencias de aminoácidos. Cuando la toxina Cry8Ca2 se expresó en una cepa cristalina negativa de *Bt* (HD-73(-)), se produjeron cristales elípticos (Shu *et al.*, 2007).

Cry3C. Esta toxina se codificó de proteínas insecticidas, en un sistema de expresión de *Escherichia coli* (Migula) Castellani y Chalmers, son codificadas por la clase de genes *cry3*, presentes en las subespecies de *Bt tenebrionis*, *san diego*, *morrisoni*, *tolworthi* y *galleriae*, muestran actividad específica contra coleópteros (Sick *et al.*, 1990; Ochoa, 2011).

Cry7A. La toxina Cry7Aa, anteriormente conocida como CryIIIC, es muy tóxica para las especies de *Cylas* (Domínguez-Arrizabalaga *et al.*, 2019), incluso más que la proteína Cry3, pero no tiene efectos negativos contra *A. grandis* o *D. undecimpunctata* (Lambert *et al.*, 1992; Domínguez *et al.*, 2020).

Estas cepas muestran actividad tóxica contra ciertos coleópteros, aunque son limitadas y pueden codificar Cry7 de 3D, esta toxina ha mostrado una actividad distinta contra escarabajos especialmente la toxina Cry7A, y contra lepidópteros la toxina Cry7B (Van-Frankenhuyzen, 2009). En la mayor parte de los estudios realizados en la especie *H. vigintioctomaculata* se ha identificado una cadherina que se une con Cry7Ab3 (Song *et al.*, 2012). También se ha evaluado la susceptibilidad de larvas de *X. arvicola* a cinco proteínas Cry tóxicas para coleópteros, entre ellas la Cry7A (Cry1B, Cry1I, Cry3A y Cry23/37) en condiciones de laboratorio (Rodríguez-González *et al.*, 2021).

Morfología y composición del grano de maíz

Un grano de maíz está compuesto por aproximadamente 72% de almidón, 10% de proteína, 4% de grasas, 6% de fibra, 5.5% de minerales, 2% de otros azúcares y 0.5% de vitaminas, supliendo una densidad energética de alrededor de 365 Kcal·100 g⁻¹ (Ranum *et al.*, 2014); las partes que constituyen el grano o semilla de maíz son las siguientes:

- **Pericarpio.** Constituye la parte externa del grano, que corresponde del 5 al 6% del total del peso del grano; es resistente al agua y al vapor. No es

un alimento deseado por los insectos y los microrganismos. Está dividido en cuatro capas delgadas (Figura 6).

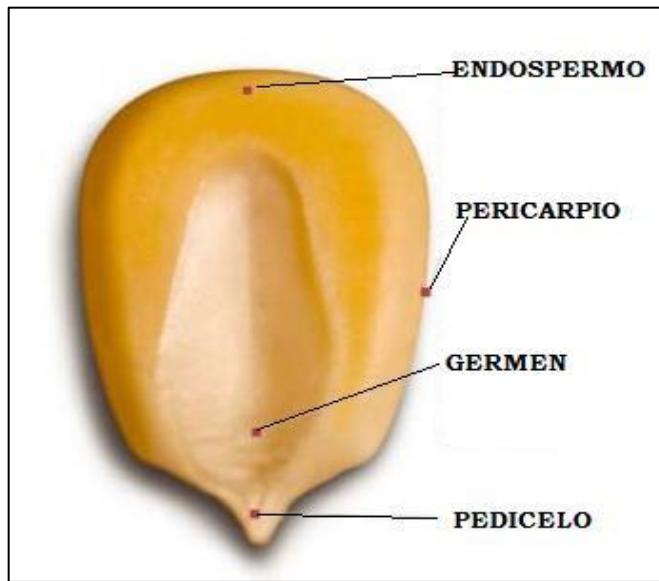


Figura 6. Estructura del grano o semilla de maíz (Orchardson, 2020).

- **Endospermo.** En la mayoría de las variedades del maíz representa aproximadamente entre el 80 y 82% del total del peso del grano seco y es la fuente de almidón y proteína para la semilla que va a germinar. El almidón es usado en comidas (como combustible fundamental) para preparar edulcorantes, bioplásticos y otros productos.
- **Embrión/Germen.** Representa entre el 8 al 12% del peso del grano. Está conformado por:

Escutelo: órgano encargado de la alimentación del embrión en el momento de su germinación.

Eje embrionario: conformado por una plúmula, que posee de cinco a seis hojas y una radícula.

Germinación de semillas y sus fases

La germinación se inicia con la imbibición y termina con la emergencia. La imbibición es la absorción de agua por parte de la semilla seca, sin importar si ésta se encuentra viable o no, y la emergencia es el proceso por el cual el eje embrionario en especies dicotiledóneas o radícula en monocotiledóneas crece, se extiende y atraviesa las estructuras que lo rodean (Azcón-Bieto y Talon, 2003).

Las semillas son elementos indispensables para la humanidad, así como muy esenciales para el buen desarrollo de la agricultura. Algunos factores que influyen en la calidad de la semilla incluyen los aspectos de germinación, pureza y sanidad; son los tres criterios de la calidad bien establecidos y los cuales son determinados por pruebas estandarizadas. La germinación y el establecimiento de las plántulas en el campo son fases críticas en el ciclo de vida de las plantas y son influenciadas por la cantidad de reservas acumuladas en la semilla durante su formación y la eficiencia de estas para emplearlas durante el proceso de desarrollo (Raya *et al.*, 2020).

Las semillas sienten y responden a estímulos ambientales como la luz, temperatura, nutrientes y humedad. Las señales ambientales pueden regular el metabolismo hormonal, así como el nivel de respuesta de la semilla a las hormonas. Se sabe que el endospermo de las semillas dormantes imbibidas responden al NO (óxido nítrico) y a las giberelinas. El embrión segregá señales al endospermo para inducir la degradación de la reserva de las semillas y promueve el debilitamiento del endospermo durante la germinación. Los avances recientes en biología de semillas han demostrado que el endospermo es capaz de detectar señales ambientales y puede producir y secretar señales para regular el crecimiento del embrión (Yan *et al.*, 2014).

La germinación se ha dividido en tres fases (Méndez *et al.*, 2008):

Fase 1: la absorción de agua al inicio del proceso, conocida como imbibición, es el resultado de las fuerzas mátricas (ψ_m) presentes en las paredes celulares y el contenido interno de las células de la semilla. Este fenómeno ocurre independientemente de si la semilla está en estado de latencia o no, así como de su viabilidad.

Fase II: es el periodo de retraso de absorción de agua, cuando el potencial mátrico es alto (menos negativo), como es el potencial osmótico o de soluto (ψ_p), en esta fase se da el desdoblamiento de sustancias de reserva y enzimas para preparar al embrión para la emergencia y protuberancia de la radícula o eje embrionario.

Fase III: semillas muertas y latentes mantienen este nivel de típica hidratación de la fase II, pero al contrario de semillas viables ellas no entran a la fase III, la cual está asociado con la protrusión de la radícula o emergencia.

El tiempo de cada una de las fases (Figura 7) dependerá de específicas propiedades inherentes de las semillas tales como: contenido de substratos hidratables, permeabilidad de la cubierta de las semillas, absorción de oxígeno, tamaño de la semilla, entre otras, y de las condiciones durante la exposición al agua, por ejemplo: niveles de humedad, composición del substrato, temperatura, etc. (Bewley y Black, 1983; Méndez *et al.*, 2008).

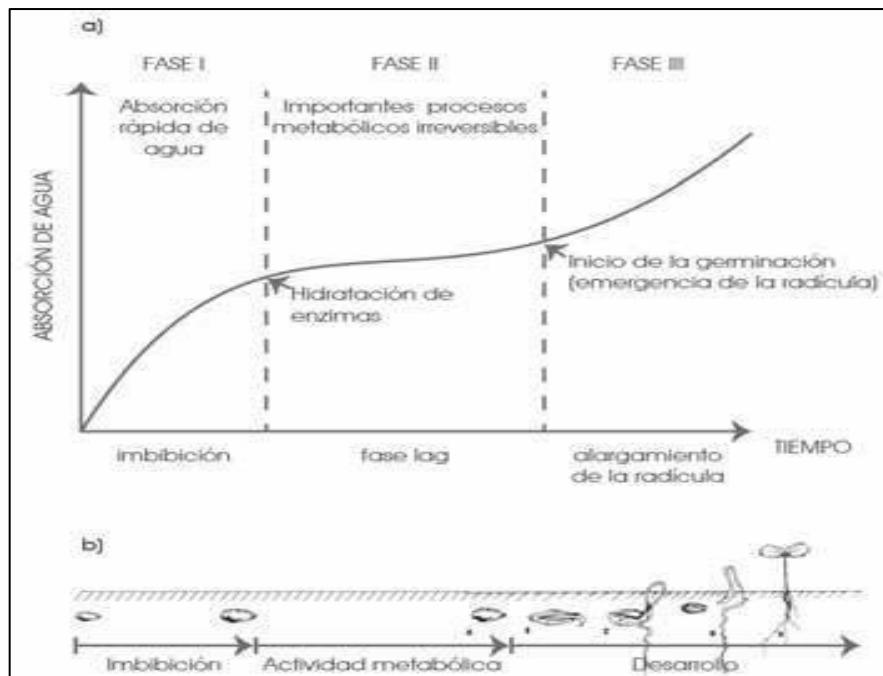


Figura 7. Fases de la germinación de semillas (Martínez et al., 2015).

Osmocondicionamiento de semilla

El osmocondicionamiento consiste en la imbibición controlada de la semilla en soluciones osmóticas o agua, interrumpeándose dicho proceso antes de la protrusión de la radícula. Las semillas tratadas incrementan su porcentaje de germinación, así como el crecimiento de las plántulas, mejorando la calidad nutrimental de los cultivos como el maíz. Con la imbibición de la semilla y la activación de enzimas debido al efecto de las giberelinas, se movilizan glucanasas que degradan el endospermo almidonoso, cuyos productos son absorbidos por el escutelo. Poco después de la imbibición hay una disminución en el contenido de ácido abscísico (ABA) (Preston et al., 2009).

El objetivo de la técnica de inmersión previa de la semilla en soluciones osmóticas, incluso en agua, puede mejorar el comportamiento de la semilla durante la germinación. Diversos resultados muestran que las semillas osmocondicionadas mejoran su tasa de germinación, así como el

comportamiento de la plántula, incluso bajo condiciones de estrés, se recomienda para situaciones de escasez de agua, para acelerar el crecimiento en plántulas de transplante e incluso para mejorar la calidad nutrimental de los cultivos como el maíz (Harris *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2015; Valle-Moysén *et al.*, 2017a).

El embrión del maíz se hidrata a las 15 h, el endospermo a 48 h, la mayor imbibición podría mejorar el establecimiento en campo (Finch-Savage *et al.*, 2004). Se ha tratado de controlar la cantidad de agua embebida por la semilla, pero es difícil de lograr, además de que el comportamiento de ésta, dependerá de la especie, el lote y las condiciones bajo las cuales se lleve a cabo el tratamiento (Sánchez *et al.*, 2001).

El cambio climático y la escasez de agua obligan a buscar alternativas como el osmoacondicionamiento, para tratar de mejorar la emergencia y establecimiento de las plántulas en el campo. El remojo previo de la semilla permite que ésta recupere su peso original al secarla en condiciones de sombra, acelera la velocidad de germinación y mejora el establecimiento en campo (Méndez *et al.*, 2008).

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización de la investigación

El experimento se llevó a cabo en las instalaciones del Departamento de Parasitología en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAAN), ubicado en las coordenadas de 25° 21' 18" O y 101° 01' 59" W, a 1743 m.s.n.m.

Obtención de insectos y establecimiento de colonia para bioensayos

Se utilizaron poblaciones de campo de *S. zeamais* provenientes de: Tlacuilotepec, Puebla, México, ubicado en la latitud 20° 19' 32.66" N y la longitud 98° 4' 7.21" O, del cultivo de maíz. Las poblaciones de insectos fueron colectadas en sacos con maíz almacenado, infectados con diferentes plagas insectiles. El maíz se trasladó al laboratorio de Entomología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, donde se purificaron y separaron de otras plagas, se criaron y mantuvieron para obtener nuevas generaciones filiales de *S. zeamais*, las cuales se usaron para hacer los bioensayos en condiciones de laboratorio.

Cría de la población de *S. zeamais*

La cría se estableció en grano de maíz comercial libre de plaguicidas y alguna otra plaga, se establecieron colonias de laboratorio con insectos de *S. zeamais*, para ello se inocularon los granos con adultos del gorgojo obtenidos de la purificación. Las colonias se mantuvieron en una cámara de cría en condiciones controladas: temperatura de 25 ± 2 °C, humedad relativa de 75 ± 5 % y un fotoperiodo de 12:12 h luz: oscuridad y se alimentaron de forma constante con maíz puro, hasta obtener nuevas generaciones. Estas condiciones fueron solo para el mantenimiento e incremento de las colonias de los insectos.

Proteínas Cry de *Bt* para cada tratamiento

Las proteínas de *Bt* fueron proporcionadas por la Dra. Alejandra Bravo del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBT-UNAM) (Cuadro 2). La presentación de las proteínas fue en estado líquido, y se mantuvieron a temperatura de 4 ± 2 °C, antes de ser utilizadas para los bioensayos que se establecieron, para esta investigación.

Cuadro 1. Toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* específicas para coleópteros, proporcionadas por el Instituto de Biotecnología de la UNAM, México.

	Modificadas	Concentración* (mg·mL ⁻¹)
1	Cry3Aa	1.5
2	Cry3Bb	2.5
3	Cry3C	1.27
4	Cry7A	1.18
5	Cry8C	0.5

*Las toxinas fueron sintetizadas por el grupo de trabajo de la Dra. Alejandra Bravo, el valor de la concentración corresponde a las que fueron enviadas a Saltillo, Coahuila, México, para ser trabajadas en el Departamento de Parasitología, UAAAN.

Para obtener las concentraciones requeridas para los bioensayos, las proteínas de *Bt* se diluyeron en un solvente al 1.0% (agua destilada + CAPS) y previo a su utilización, la solución se agitó durante 20 segundos mediante el uso de un agitador Vortex (Vortex T-Genie2, Scientific industries).

El CAPS® (>99%), es un buffer o tampón biológico que se utiliza en bioquímica y biología molecular, y uno de sus usos es para la solubilización de proteínas, en este caso para los bioensayos se empleó con este fin, su nombre químico es ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propanosulfónico y su fórmula química es C9H19NO3S, con un peso molecular de 221.32 g·mol⁻¹.

Descripción de los tratamientos

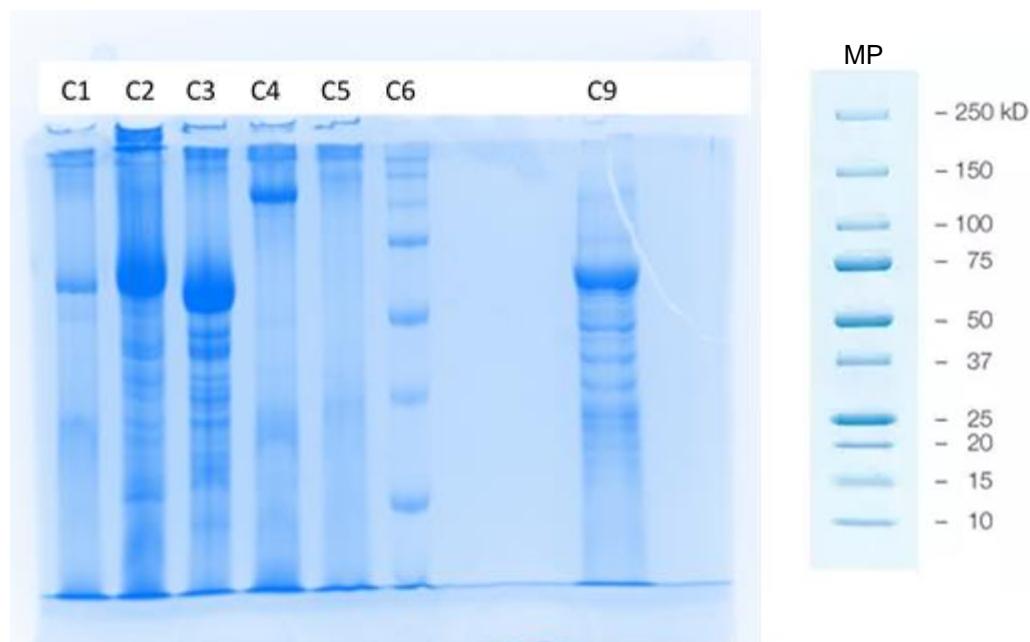
Los tratamientos se definieron con base en las toxinas Cry de *Bt* (Cuadro 2) las cuales se prepararon a siete concentraciones diferentes más un testigo, por cada tratamiento se establecieron cuatro repeticiones (Cuadro 3). Previo al establecimiento de los tratamientos, fue necesario como parte del protocolo abrir una ventana biológica, para comprobar las concentraciones a emplear para cada toxina, además con la finalidad de comprobar si estás ocasionaban efecto en la población de picudos de *S. zeamais* a una dosis alta (estos datos no se muestran en esta investigación).

Cuadro 2. Concentraciones de los tratamientos de las toxinas Cry + CAPS al 1.0%, probadas en bioensayos con *Sitophilus zeamais*.

		Toxinas	Concentración (mg·mL ⁻¹)												
1	Cry3Aa	1000													
		100													
		10													
		1													
		0.1													
		0.01													
		0.001													
2	Cry3Bb	TESTIGO													
		1000													
		100													
		10													
		1													
		0.1													
		0.01													
3	Cry3C	0.001													
		TESTIGO													
		1500													
		1000													
		100													
		10													
		1													
4	Cry7A	0.1													
		0.01													
		TESTIGO													
		1500													
		1000													
		100													
		10													
5	Cry8C	1		0.1		0.01		TESTIGO		1500		1000		100	
		1													
		0.1													
		0.01													
		TESTIGO													
		1500													
		1000													
		100													

Previo al uso de las toxinas antes del establecimiento de la ventana biológica y al establecimiento de los bioensayos, se corroboró la viabilidad de las toxinas Cry de *Bt*. Para eso se trasladaron las toxinas al Laboratorio de Bioingeniería Molecular y Bioinformática del Departamento de Ciencias Básicas de la UAAAAN, con la colaboración del Dr. Marco Adán Juárez Verdayes.

Las toxinas se corrieron en gel separador de acrilamida al 12% y con un gel concentrador al 4% (Figura 8).



C1: carril 1, con la toxina Cry3Aa; C2: carril 2, con la toxina Cry3Bb; C3: carril 3, con la toxina Cry3C; C4: carril 4, con la toxina Cry7A; C5: carril 5, con la toxina Cry8C; C6: carril 6, con el marcador de peso molecular (BIO-RAD- Catálogo: 161-0373); C9: carril 9, se cargó un extracto como control. MP: referencia del marcador de peso molecular de BIO-RAD (Catálogo: 161-0373).

Figura 8. Viabilidad de las toxinas con gel de acrilamida para el establecimiento de los bioensayos

En la Figura 8, se muestra la viabilidad de las toxinas Cry7A, Cry3Aa y Cry8C aún siguen siendo viables, mientras que las toxinas Cry3Bb y Cry3C mostraron un poco de degradación, sin embargo, a pesar de ello se utilizaron para el establecimiento de los bioensayos, por lo que en los resultados se consideró está

condición para la interpretación, análisis y discusión, del efecto de estas dos toxinas sobre la actividad y supresión de los coleópteros a evaluar en este estudio.

Metodología de establecimiento de los bioensayos

Para el establecimiento de los bioensayos y como alimento y fuente de toxinas Cry en los insectos, se utilizó el método de osmoacondicionamiento de semillas en la cual se colocaron dos granos de maíz (harinoso, constituido por almidón blando) y 1 200 μL de solución de las toxinas + un tampón biológico que se utiliza para ensayos de diagnóstico (CAPS® >99%) por cada cavidad en las placas para bioensayos con presentación de 24 pozos (Bio-Assay Tray Bio-BA-24). Cuando los granos se imbibieron con la solución de las toxinas por 24 h, se procedió a retirar el resto de la solución no aprovechada por los granos y se pusieron a secar sobre sanitas de papel previamente esterilizadas a temperatura ambiente esto con el fin de no exponer las toxinas a altas temperaturas que pudiera degradarlas, transcurridas 12 h se volvieron a colocar los granos en las placas, con una humedad del 13%, cuidando de que cada grano no estuviera con humedad mayor a ésta, para evitar contaminación y que esto afectara a los insectos y los bioensayos, por cada cavidad de la placa se colocó un par de adultos de *S. zeamais* sexados 1♂:1♀ (macho: hembra) con la finalidad de asegurar la ovoposición en los granos de maíz, posteriormente se incubaron a $27 \pm 3^\circ\text{C}$ y 60 \pm 5% de humedad relativa y sin intensidad lumínica, esto con base en los requerimientos del insecto y promover su actividad, por lo que estas condiciones fueron a las que se mantuvieron todos los bioensayos.

Las unidades experimentales se confinaron con un plástico transparente auto adherible, por lo que se realizaron micro perforaciones que permitieran el intercambio de oxígeno. Se incubaron por 40 días (que es el tiempo aproximado para que el insecto cumpla su ciclo de vida), para posteriormente evaluar.

Variables evaluadas

Se evaluaron los siguientes parámetros:

Peso del grano seco (PGS, g): se tomaron los pesos de los granos colocados por cada repetición antes del osmoacondicionamiento con las toxinas Cry, con apoyo de una báscula electrónica (TL-series homgeek®).

Peso del grano húmedo (PGH, g): para medir este parámetro se utilizó la misma báscula electrónica de la variable anterior, y el peso de los granos se obtuvo después del osmoacondicionamiento de las semillas.

Tasa de absorción de toxinas Cry (TA, %): se consideró esta variable para evaluar la capacidad que presentaron las semillas de maíz para absorber las toxinas Cry de *Bt*, a través de la imbibición de las semillas en el proceso de osmoacondicionamiento. Para ello, se tomó en cuenta el PGS y el PGH, por lo que se empleó la siguiente formula:

$$\text{TA (\%)} = [(\text{PGH}-\text{PGS})/\text{PGH}]*100$$

Peso final del grano (PFG, g): esta variable se midió después de la imbibición de las semillas de maíz con las toxinas Cry (osmoacondicionamiento) y una vez alcanzado el 13% de humedad en éstas. La cual se midió con un determinador de humedad de granos (modelo: LSD-1G, marca: Goyojo®) y para el peso se utilizó la báscula electrónica.

Peso del grano después de la exposición de los insectos (PGDEI, g): una vez expuestos los granos de maíz a los insectos y después de 40 días del establecimiento e incubación de los bioensayos, se procedió a obtener el peso de los granos, con la misma báscula electrónica utilizada en variables anteriores y se registraron los datos.

Porcentaje del consumo del grano (%CG): para la obtención de esta variable, se utilizaron los datos de las variables PFG y PGDEI, y fue necesario aplicar la siguiente formula:

$$\%CG = [(PFG - PGDEI) / PFG] * 100$$

Número de insectos adultos (NA): transcurridos los 40 días de incubación de los bioensayos, se realizó un conteo de los gorgojos de *S. zeamais*, en estado adulto, por lo que se tomó en cuenta el número total de adultos en cada repetición por tratamiento, y para esta variable se consideraron en el total los individuos progenitores ($P = 2$) ($1\delta:1\varphi$), que se colocaron en cada repetición. Además, se calculó el porcentaje de adultos (%A) obtenidos en los bioensayos, con la fórmula:

$$\%A = [(NA - P) * 100] / NTI$$

Donde:

NTI = número total de individuos

P = Progenitores, que para el desarrollo de los bioensayos se mantuvo el valor constante de 2, en cada repetición.

Número de larvas vivas (NLV): esta variable se determinó haciendo un conteo del número de larvas vivas después de transcurridos los días de evaluación. Se verificó cuando el estadio inmaduro se moviera punzando con un alfiler, para la obtención de las variables de larvas fue necesario hacer un muestreo destructivo de las semillas de maíz para poder extraer los individuos del interior. Además, esta variable se transformó también a porcentaje (%LV), con base en la siguiente formula:

$$\%LV = (NLV + 100) / (NTI - P)$$

Donde:

NTI = número total de individuos

P = Progenitores, que para el desarrollo de los bioensayos se mantuvo el valor constante de 2, en cada repetición.

Número de larvas muertas (NLM): esta variable se determinó haciendo un conteo del número de larvas muertas después de haber transcurrido los días de evaluación. Se verificó cuando el estadio inmaduro no se moviera punzando con un alfiler o que tuviera una coloración café oscura a negro y sin turgencia, que son síntomas que ocasiona *Bt* en las larvas. Esta variable se obtuvo a la par que la variable anterior, ya que fue necesario hacer un muestreo destructivo de las semillas de maíz para poder extraer los individuos del interior. Además, esta variable se transformó también a porcentaje de mortalidad de las larvas (%ML), con base en la siguiente formula:

$$\%ML = (NLM+100)/(NTI-P)$$

Donde:

NTI = número total de individuos

P = Progenitores, que para el desarrollo de los bioensayos se mantuvo el valor constante de 2, en cada repetición.

Número total de individuos (NTI): al finalizar la prueba se contaron todos los individuos obtenidos en cada repetición, tanto NA, NLV y NLM. Para ello se utilizó la siguiente formula:

$$NTI = NA + NLV + NLM$$

Descendencia de la población (D): se evaluó la progenie de los progenitores después de los 40 días de haber estado expuesta la población de insectos de *S. zeamais* a las toxinas Cry de *Bt*, por lo que se tomaron en cuenta los adultos,

larvas vivas y larvas muertas, sin los progenitores. También para esta variable los valores se transformaron a porcentajes (%D), con las fórmulas:

$$D = NTI - P$$

$$\%D = (D+100)/NTI$$

Donde:

P = Progenitores, que para el desarrollo de los bioensayos se mantuvo el valor constante de 2, en cada repetición.

Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar. Donde cada tratamiento consistió en ocho concentraciones diferentes por toxina Cry, además cada concentración con cuatro repeticiones, lo que dio un total de 160 unidades experimentales. Las variables fueron analizadas bajo un análisis de varianza (SAS Institute, 2002) y una comparación de medias con la prueba de la diferencia mínima significativa (DMS) y una $t \leq 0.05$, entre tratamientos y entre toxinas. Con las variables que no presentaron diferencias estadísticas se procedió a explicarlas mediante análisis descriptivo, por medio de gráficas donde se empleó la media de cada variable y se generaron gráficos de tendencia o barras.

Para verificar los supuestos que exige la estadística para el análisis de varianza y normalizar los datos, así como para evitar la incidencia de valores atípicos, se transformaron aquellas variables obtenidas en número dígitos que indicaban conteos y las que estaban expresadas en valores porcentuales, que no se ajustaban a una curva de normalidad, con la finalidad de que los valores no se alejen de manera considerable de la media y desviación estándar. Las fórmulas empleadas, se describen en el Cuadro 4.

Cuadro 3. Formulas empleadas en la transformación de datos de los valores de las variables que no cumplen con los supuestos de normalidad para el análisis de varianza.

Transformaciones para números Dígitos	Transformaciones para porcentajes
$X' = \sqrt{X}$ (sin valores cero)	$X' = 2 \operatorname{arcsen} \sqrt{P}$ P=%
$X' = \sqrt{0.5 + X}$ (con valores cero)	

Fuente: Transformación de dato. <https://www.youtube.com/watch?v=tzbVSgynGBM>

Los datos de mortalidad en el caso de los testigos se corrigieron por medio de la fórmula de Henderson y Tilton (1955) debido a la falta de homogeneidad en los valores evaluados en los individuos para cada variable. La fórmula de corrección de datos utilizada es la siguiente:

$$\%E: 1 - [(Y_2)(X_1) / (Y_1)(X_2)] * 100$$

Donde:

E: Eficiencia

Y1: tratamiento antes de la aplicación

Y2: tratamiento después de la aplicación

X1: Testigo antes de la aplicación

X2 Testigo después de la aplicación

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis general de las toxinas Cry de *Bt* sobre la supresión de *Sitophilus zeamais*

Los análisis estadísticos realizados entre todos los tratamientos (concentraciones y toxinas) de forma global, para todas las variables, indicaron que se presentaron diferencias estadísticas altamente significativas con una confiabilidad del 99% ($\alpha \leq 0.01$) en tres variables, las cuales fueron: Peso de grano húmedo (PGH), Número de larvas muertas (NLM) y Número de adultos (NA). Las toxinas Cry3Bb, Cry3C y Cry8C fueron las que presentaron los valores medios más altos en la variable PGH, con 1.13 g a una concentración de $100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, para la toxina Cry3Bb; mientras que, para las otras dos toxinas, se tuvo un peso de 1.12 g, en cada una a las concentraciones de 1500 y $100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectivamente (Cuadro 5). Esto indica que la capacidad de imbibición de las semillas, así como penetración de las toxinas Cry, durante el proceso de osmoacondicionamiento fue mayor en los tratamientos con las concentraciones de $100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, con respecto al resto de los tratamientos.

Cuadro 4. Comparación de medias entre concentraciones por toxinas Cry de *Bt*, para estudiar el efecto de supresión sobre *Sitophilus zeamais*, en granos de maíz osmoacondicionados.

Toxina	Dosis (mg·mL ⁻¹)	PGH (g)	NLM	NA
Cry8C	1500	1.04	abcdefg	0.25
	1000	1.08	abcdef	1.00
	100	1.12	ab	0.50
	10	1.09	abcdef	0.50
	1	1.11	abcd	0.75
	0.1	1.08	abcdef	0.25
	0.01	1.10	abcde	0.50
	Testigo	1.07	abcdef	0.00
Cry7A	1500	0.99	bcd ^{efg}	0.50
	1000	1.01	abcdefg	0.25
	100	1.12	abc	0.00
	10	0.98	defg	0.25
	1	1.01	abcdefg	0.00
	0.1	1.09	abcdef	0.25
	0.01	1.04	abcdefg	0.25
	Testigo	1.11	abcd	0.00
Cry3Aa	1000	1.01	abcdefg	1.50
	100	1.08	abcdef	1.00
	10	1.02	abcdefg	1.75
	1	1.04	abcdefg	0.50
	0.1	1.09	abcdef	1.00
	0.01	1.07	abcdef	1.75
	0.001	0.97	efg	0.50
	Testigo	0.78	h	0.00
Cry3Bb	1000	1.10	abcd	1.00
	100	1.13	a	0.00
	10	1.09	abcdef	1.25
	1	1.05	abcdefg	1.00
	0.1	0.93	g	0.50
	0.01	1.10	abcde	0.50
	0.001	1.01	abcdefg	0.75
	Testigo	0.98	cdefg	0.00
Cry3C	1500	1.12	ab	0.75
	1000	1.04	abcdefg	1.00
	100	1.11	abcd	1.25
	10	1.06	abcdef	0.75
	1	1.10	abcde	1.75
	0.1	1.08	abcdef	1.75
	0.01	0.97	fg	1.25
	Testigo	1.11	abcd	0.25

PGH: Peso del grano húmedo, NML: Número de larvas muertas, NA: Número de adultos. Todas las concentraciones se aplicaron en mg·mL⁻¹. Valores con la misma letra en cada columna son iguales estadísticamente ($p \leq 0.05$).

En el caso de la variable de NLM, como se mencionó, también se presentaron diferencias significativas altas, los datos medios más altos de la mortalidad de

larvas de *S. zeamais* fueron de 1.75 individuos, expresados en las toxinas: Cry3Aa [10 y 0.01 mg·mL⁻¹] y Cry3C [1.0 y 0.10 mg·mL⁻¹]; seguidos de 1.50 individuos, obtenido en la toxina Cry 3Aa [1000 mg·mL⁻¹], y por último el valor de 1.25 individuos en las toxinas Cry3Bb [10 mg·mL⁻¹] y Cry3C [100 y 0.01 mg·mL⁻¹] (estos datos se analizan posteriormente por cada toxina y en porcentajes), el resto de las concentraciones en cada toxina, no superaron valores del NLM mayores a un individuo (Cuadro 5).

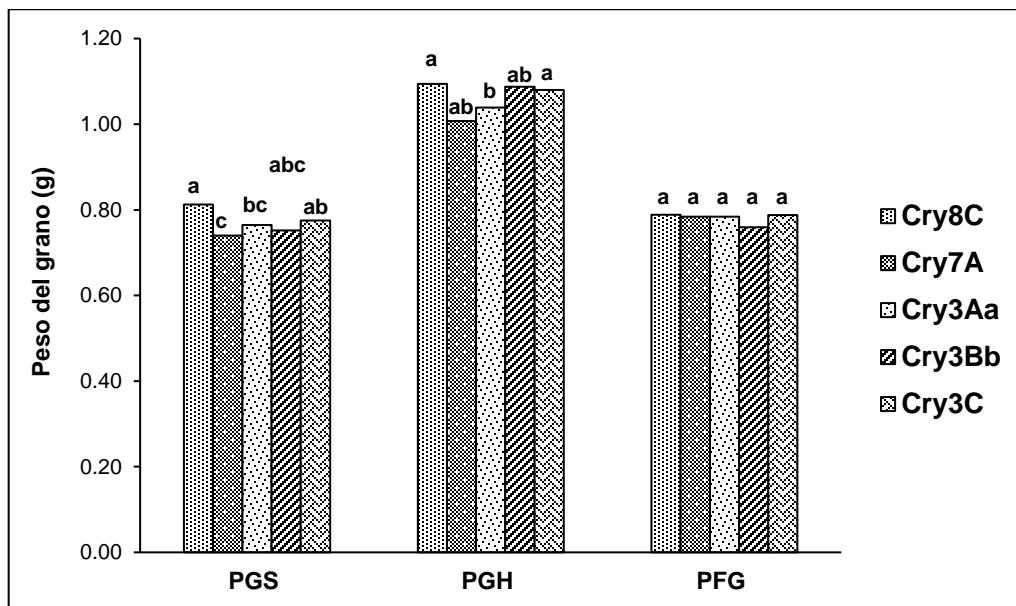
Para la variable de NA, se encontró que los valores medios más altos fueron en los tratamientos testigos de las toxinas Cry3Bb y Cry3C, con 14.25 y 14.75 individuos de *S. zeamais*, por otro lado, los valores más bajos en esta variable se encontraron entre los rangos de 5.75 a 7.75 individuos adultos del gorgojo por tratamiento, las toxinas y concentraciones donde se expresaron estos valores fueron las siguientes: Cry8C con 7.50 y 7.75 individuos en las [1500 y 1.0 mg·mL⁻¹], respectivamente; Cry7A con 7.50, 7.75 y 5.75 individuos en las [100 y 0.01 mg·mL⁻¹] y en testigo, respectivamente; Cry3Aa con 7.75 individuos en la [100 mg·mL⁻¹], y en la Cry3Bb con 6.50 y 7.75 individuos en las [1000 y 10 mg·mL⁻¹], respectivamente. Estos valores indican que la exposición de los insectos a las toxinas, permitieron retrasar el ciclo de vida de *S. zeamais* y esto se mostró en el número de adultos evaluados a los 40 días después de haberse establecido los bioensayos (Cuadro 5).

En los estudios reportados por Rodríguez y Iannacone (2012) indican que la mezcla de alguna composición química con los granos y el contenido de humedad del grano podrían ser un factor clave en la resistencia genética a los gorgojos de granos almacenados. Con el osmoacondicionamiento que se les dio a las semillas de maíz para evaluar el efecto de toxinas Cry de *Bt* sobre la supresión de *S. zeamais*, se corrobora lo mencionado por estos autores, donde hubo variación en la mortalidad de larvas y en el número de adultos del gorgojo, presentes en las diferentes toxinas y concentraciones evaluadas de cada una de estas.

Por otro lado, Ekobu *et al.* (2010) mencionan que las toxinas Cry3Aa, Cry7A, Cry3Bb y Cry1Ca provocan alta mortalidad de larvas del gorgojo del camote *C. puncticollis* con dieta artificial a una concentración de $5.0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ a los cinco días después de la exposición de los insectos, en este mismo estudio se menciona que la mortalidad aumentó a medida que la duración de los bioensayos aumentaron. En los bioensayos realizados en nuestra investigación se trabajó con tres de estas toxinas (Cry3Aa, Cry7A y Cry3Bb) que utilizaron Ekobu *et al.* (2010) y reflejaron también valores altos en el NLM y bajos en el NA, con base a los 40 días que duraron los bioensayos establecidos, lo que se concuerda con lo indicado por estos autores. Como parte del análisis general realizado en las variables promediando los tratamientos por toxina, no se encontraron diferencias estadísticas con el análisis de varianza, sin embargo, con la prueba de medias de la diferencia mínima significativa (DMS) fue posible diferenciar el comportamiento de las variables en cada toxina ($t \leq 0.05$), ya que es una prueba sensible para detectar diferencias entre pares (Montgomery, 2013).

En este estudio fue imprescindible considerar las variables de peso de los granos, tanto antes como después del osmoacondicionamiento, esto con la finalidad de considerar la homogeneidad de las condiciones para el establecimiento de los bioensayos, por tal motivo en la Figura 9, se aprecia la respuesta de las variables de peso de los granos, es fácil observar que el PGS mantuvo la misma tendencia una vez que se sometieron a imbibición las semillas de maíz y esto se refleja en la variable PGH, una de las ventajas que se tiene en el osmoacondicionamiento de semillas es que esta prueba homogeniza de forma interna la semilla, es decir que puede mejorar el comportamiento de la semilla durante la germinación e incluso puede mejorar la calidad nutrimental de los cultivos como el maíz (Valle-Moysén *et al.*, 2017a). Como parte de la finalidad de este trabajo no fue la germinación de las semillas, si no buscar un vehículo que permitiera el ingreso de las toxinas Cry de *Bt* al interior del grano, debido a los hábitos alimenticios que tiene *S. zeamais*, en este sentido, al menos la variable PFG, fue homogénea para todas las toxinas, lo que asegura como lo mencionan Sánchez *et al.* (2001), que

el osmoacondicionamiento controla la cantidad de agua embebida por la semilla, y su comportamiento después de que se lleve a cabo el tratamiento, además Méndez *et al.* (2008) indican que el remojo previo de la semilla permite que ésta recupere su peso original al secarla en condiciones de sombra y mejora la calidad de ésta.



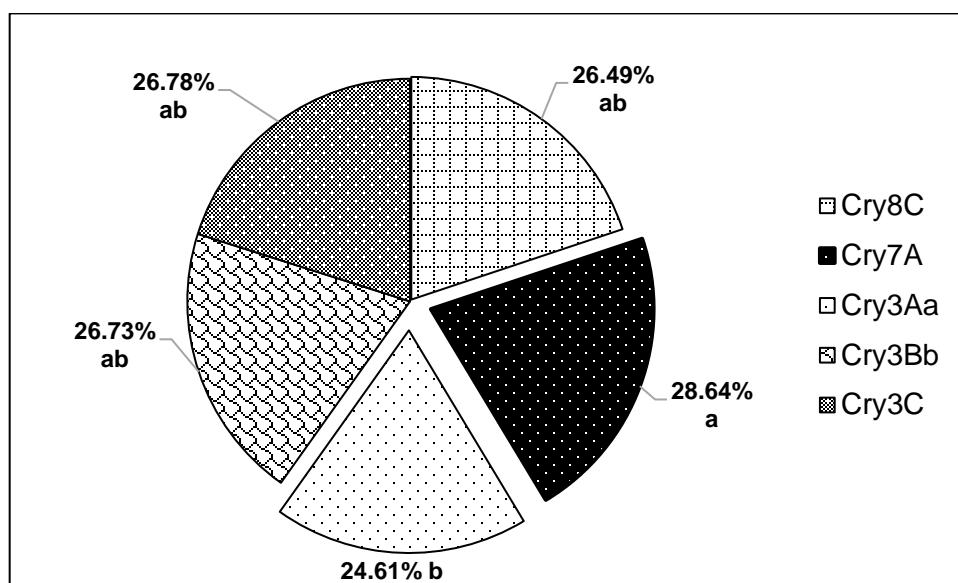
PGS: Peso de grano seco, PGH: Peso de grano húmedo, PFG: Peso final de grano. Valores con la misma letra en cada columna son iguales, significa que no hubo diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($t \leq 0.05$).

Figura 9. Comparación de los pesos de grano antes y después del tratamiento de osmoacondicionamiento con toxinas Cry de *Bt*.

Valle-Moysén *et al.* (2017b) mencionan que el proceso de osmoacondicionamiento no afecta el peso total de semillas de maíz palomero ni la calidad de la semilla durante el proceso de secado, después del tratamiento. el secado de los granos. Por otro lado, Zhang *et al.* (2015) demostraron que los compuestos empleados para el osmoacondicionamiento son el polietilenglicol, el cual no altera directamente la composición lipídica de la membrana celular, pero provoca menores índices de absorción de agua y de pérdida de solutos a través de la membrana, en este sentido, se requiere de estudios de calidad de semillas

posteriores al osmoacondicionamiento con toxinas Cry de *Bt*, lo cual se considerará en posteriores trabajos.

En la variable de tasa de absorción (TA) de las toxinas Cry de *Bt* en la semilla sometida a un tratamiento de osmoacondicionamiento con diferentes concentraciones de éstas, resultó que la toxina Cry7A mostró la mayor tasa de absorción, esto indica que, a mayor valor en esta variable, se tiene mayor cantidad de toxina Cry dentro de la semilla; por otro lado, el valor más bajo expresado en la tasa de absorción fue para la toxina Cry3Aa. En el resto de las toxinas Cry, los valores no presentaron diferencias significativas ($t \leq 0.05$) (Figura 10).



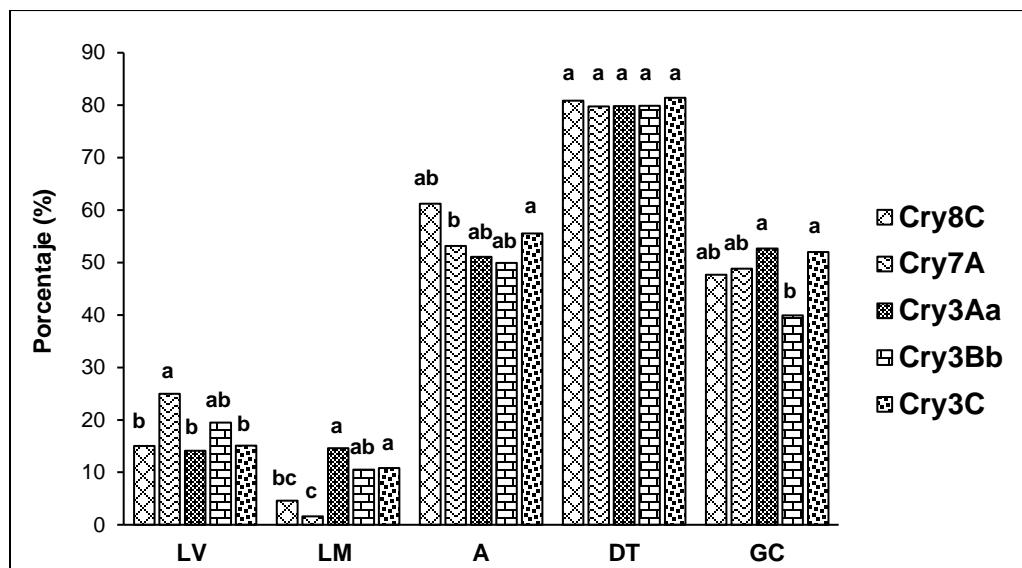
Valores con la misma letra son iguales, significa que no hubo diferencias estadísticas significativas ($t \leq 0.05$).

Figura 10. Tasa de absorción (%) de las toxinas Cry de *Bt*, después de un tratamiento de osmoacondicionamiento en semillas de maíz.

Méndez *et al.* (2008) realizaron un estudio sobre la tasa de imbibición de las semillas de maíz, frijol y chícharo, por lo que las semillas tratadas con Vitavax® (carboxin) tuvieron una mayor tasa de absorción a las 8, 10 y 10 horas

respectivamente. En este mismo estudio encontraron que la semilla de maíz tratado tuvo bajo porcentaje de germinación, menor al 12%, pero indican los autores que no hubo coincidencias entre la velocidad de imbibición y los porcentajes de germinación en ninguno de los cultivos analizados. En nuestros bioensayos con las diferentes concentraciones cada toxina Cry de *Bt*, encontramos que en la [100 mg·mL⁻¹], hubo mayor PGH, sin embargo, no hubo relación de que en alguna concentración se presentara mayor o menor valor en las variables NLM y NA; pero en la toxina Cry7A se presentó el mayor número de concentraciones con el menor NA, siendo esta toxina, la que tuvo mayor tasa de absorción de las toxinas Cry en el tratamiento de osmoacondicionamiento de semillas (Cuadro 5 y Figura 10).

Los datos presentados en la Figura 11 muestran la descendencia total por toxina Cry de *Bt* (%LV, %ML, NA y %D), con respecto al consumo del grano (%CG) osmoacondicionado expuesto a *S. zeamais*; donde la toxina Cry3Aa mostró el mayor %ML, así como el mayor %CG, y también menor valor de %LV y dentro de los valores más bajos para el NA, lo que indica que los valores medios para esta toxina Cry, indican que fue la que tuvo mayor supresión sobre la población del gorgojo del maíz en los bioensayos. Estos valores fueron secundados por la toxina Cry3C. También se puede observar en estos resultados que la descendencia fue homogénea para todas las toxinas, sin embargo, el ciclo de vida se retrasó, al evidenciar los valores obtenidos para cada toxina en cada uno de los estadios del insecto, por lo que es posible apreciar que hay un efecto positivo sobre la supresión del insecto con las diferentes toxinas, por lo es importante mencionar que todas las toxinas Cry de *Bt* tienen actividad insecticida contra este coleóptero, aunque sea exprese en baja toxicidad.



LV: larvas muertas; LM: larvas muertas; A: adultos; DT: descendencia total; GC: grano consumido. Valores con la misma letra entre variables son iguales, significa que no hubo diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($t \leq 0.05$).

Figura 11. Comparación del consumo de grano con respecto a la descendencia de *Sitophilus zeamais*, por toxina Cry de *Bt*.

En los resultados obtenidos por García (1998) demostró que la toxina Cry3C, seguida por la toxina Cry3Bb presentaron los mayores porcentajes de mortalidad en larvas neonatas de *L. decemlineata*, las toxinas fueron marcadas con biotina, para utilizarlas en ensayos de unión con BBMVs (tejido intestinal y preparación de vesículas de membrana de intestino medio).

Análisis por toxina Cry de *Bt* sobre la supresión de *Sitophilus zeamais*

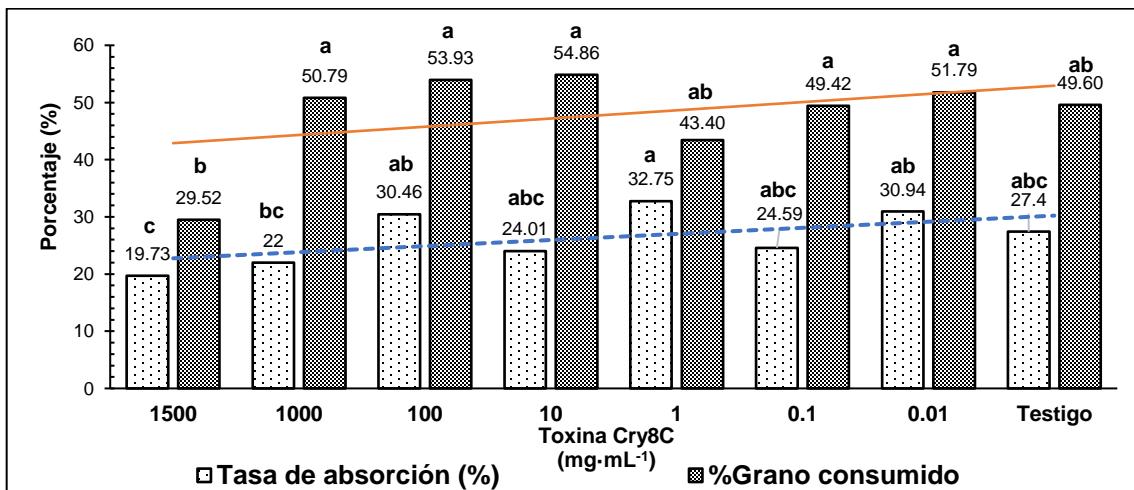
De los análisis estadísticos realizados de forma independiente por cada toxina Cry de *Bt* se encontraron diferencias estadísticas significativas en el análisis de varianza en algunas de las variables en estudio por toxina: Cry7A en las variables, PGDEI y %CG. En la toxina Cry3Aa, para las variables PGH, NLM y %ML; Cry3Bb, para las variables PGH, NA, %LV, NLM, %ML, NTI y D. Para la toxina Cry3C, solo en la variable %ML. Las diferencias estadísticas se encontraron entre los niveles de confianza del 90, 95 y 99% ($\alpha \leq 0.10$, $\alpha \leq 0.05$ y

$\alpha \leq 0.01$, respectivamente). Mientras que para la toxina Cry8C, no se encontraron diferencias significativas en ningún nivel de confianza. Con estos resultados es fácil notar que la toxina Cry3Bb, fue la que presentó mayor número de variables con diferencias estadísticas evaluadas sobre la población de *S. zeamais* en estudio; así mismo es notorio que las variables relacionadas con la evaluación de los diferentes estadios del insecto fueron afectadas por los tratamientos. A continuación, se describen los análisis realizados para cada una de las toxinas Cry de *Bt*, de forma independiente, sobre la supresión de la descendencia de *S. zeamais*.

Toxina Cry8C de *Bt*

El análisis de varianza para la toxina Cry8C de *Bt*, no arrojó diferencias significativas, como se mencionó anteriormente, sin embargo, con la prueba de medias de la DMS ($t \leq 0.05$), fue posible observar agrupaciones entre los tratamientos. De las variables consideradas para este análisis se reportan las medias para la tasa de absorción de las toxinas por el grano de maíz, expresado en porcentaje (TA) y las medias para el porcentaje de grano consumido por los insectos (%GC), entre las dos variables y para las ocho concentraciones probadas de esta toxina, se observa una ligera tendencia de que la TA está relacionada con el %CG, lo que indica que a mayor imbibición en el tratamiento de osmoacondicionamiento hubo mayor cantidad de toxinas Cry consumidas por los insectos. Se tuvo una TA media de 26.50 %, mientras que el %CG, fluctuó alrededor del 47.91%, entre todos los tratamientos; también se pudo observar que el consumo de grano fue alto para las [10, 100, 1000, 0.01 y 0.1 mg·mL⁻¹], con valores que superan el 50%, lo que indica que el daño en el grano fue alto para esos tratamientos y que los insectos consumieron la misma cantidad de grano al momento de la evaluación fue a los 40 días después de haber establecido los bioensayos. Por otro lado, el menor consumo de grano se dio en 1500 mg·mL⁻¹, lo que da un indicio de que, en posteriores trabajos, se puede probar tratamientos por arriba de este valor. En el caso del tratamiento testigo

donde no hubo interacción entre la toxina Cry8C con *S. zeamais*, la media del %CG fluctúo alrededor de la media general para todos los tratamientos (49.60%).

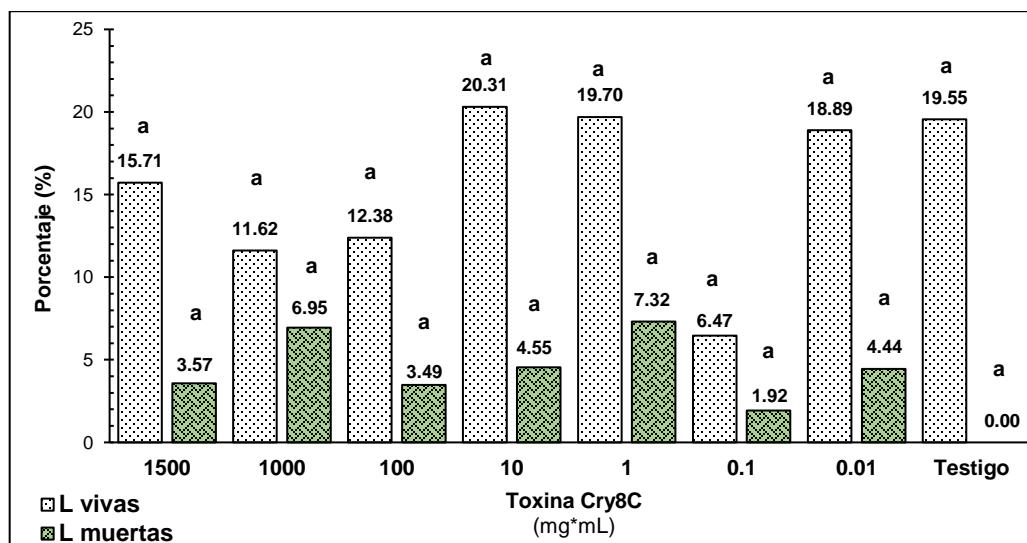


Valores con la misma letra son iguales o que no hubo diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($t \leq 0.05$).

Figura 12. Relación entre la tasa de absorción de la toxina Cry8C, por granos de maíz osmoacondicionados y el porcentaje del consumo de grano por el gorgojo del maíz *Sitophylus zeamais*.

Otras variables que expresan la influencia de las toxinas Cry en insectos son las que se evalúan sobre los estadios de larva, debido al modo de acción que presenta *Bt* (Domínguez *et al.*, 2020), por lo que se analizó el %LV y %ML que se obtuvo con la toxina Cry8C; estas variables no presentaron diferencias estadísticas ni en el análisis de varianza, ni en la prueba de medias (DMS), entre las concentraciones evaluadas para esta toxina, sin embargo, en forma general, las medias para estas dos variables fluctuaron entre 15.58 y 4.03% para el %LV y %ML, respectivamente. Es importante indicar, que en los resultados obtenidos para esta toxina no fue necesario realizar corrección o ajustes de datos por mortalidad en el tratamiento testigo (sin influencia de toxinas), debido a que no la hubo, por lo tanto, el %ML expresado en estos bioensayos se debe a la influencia de la toxina Cry8C o efecto de ésta, y que no hubo otros factores que afectarán el experimento. Se encontró que las concentraciones de 10 y 1.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ fueron las que presentaron el mayor %LV (20.31 y 19.70%, respectivamente), incluso

superando al testigo (19.55%). Por otro lado, fueron notorias las concentraciones donde se presentó mayor %ML, que fueron en 1.0 y 1000 mg·mL⁻¹, y que presentaron medias de 7.32 y 6.95% de mortalidad en larvas, respectivamente. Estos resultados expresan que entre menor sea el %LV, es probable que en el %ML las larvas muertas aumente, según las tendencias expresadas en los resultados (Figura 13). Esto se pudiera comprobar si se consideran más evaluaciones con menos días de incubación, es decir menos tiempo con relación a los 40 días en que se evalúo en estos bioensayos y también realizar evaluaciones posteriores a este tiempo (lo cual no fue objetivo para esta investigación).



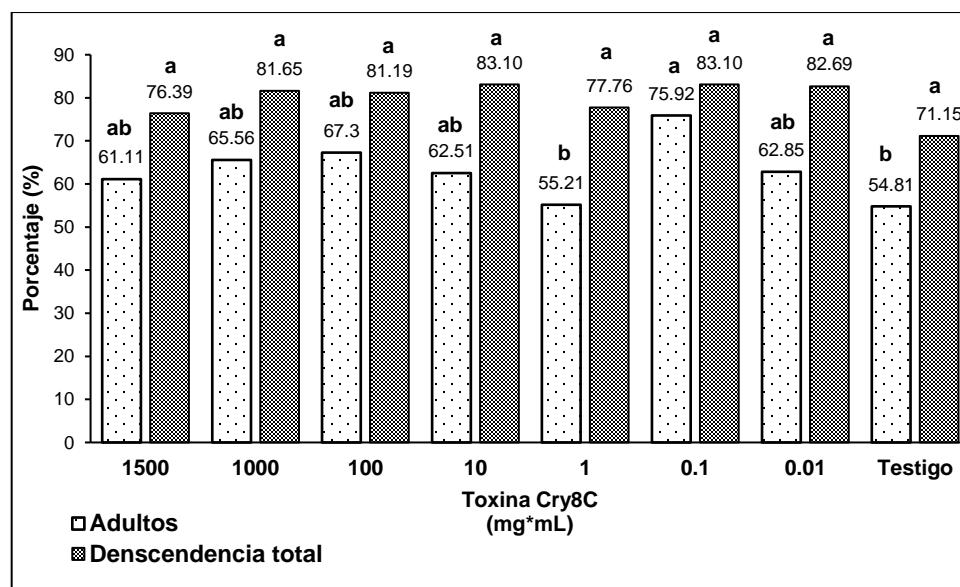
Valores con la misma letra son iguales o expresan que no hubo diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($t \leq 0.05$).

Figura 12. Porcentaje de larvas vivas y muertas de la descendencia de *Sitophilus zeamais* expuesta a la toxina Cry8C de *Bt*.

Li *et al.* (2014) mostraron que la toxina Cry8 es débilmente tóxica para *H. parallelus* lo que sugieren la participación de otras toxinas adicionales en la cepa nativa. Por otro lado, Jia *et al.* (2013) hicieron una recombinación homóloga con la toxina Cry8Ca para ampliar aún más el espectro con plásmidos recombinantes pSTK-8G con la toxina Cry8Ga1 en estos estudios realizados indicaron que la cepa

recombinante amplió su espectro contra el coleóptero *H. parallela* susceptible a la toxina Cry8E y *A. corpulenta* susceptible a la toxina Cry8C, además mostró efecto positivo contra *H. oblitera* que es susceptible a la proteína Cry8G. Los resultados obtenidos en nuestra investigación respaldan la toxicidad de la Cry8C de *Bt*, para coleópteros, específicamente para *S. zeamais*, debido a que en todos los tratamientos evaluados o concentraciones a las que se expusieron los insectos se presentó un rango del %ML entre el 1.92 y 7.32%, es decir que al menos, más de una larva murió en cada dosis.

En cuanto a las variables, porcentaje de individuos adultos (%A) y porcentaje total de la descendencia (%D) o progenie obtenida en los bioensayos, no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos, para la toxina Cry8C, sin embargo, con la comparación de medias por la DMS, solo se detectaron diferencias significativas ($t \leq 0.05$) en la variable %A. En el análisis descriptivo de estas dos variables, en el %D se observó que a $1500 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, presentó el menor número de individuos totales de la progenie del gorgojo del maíz con 76.39%, esto involucra, larvas vivas, larvas muertas y adultos, exceptuando los progenitores. Las dosis que mostraron una mayor población transcurridos los días de incubación fueron: 0.1, 1.0, 100 y $1000 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, comparadas con el testigo, que solo obtuvo un 71.15% de descendencia. Por otro lado, en la variable %A, todas las medias superaron al testigo (Figura 14), estos resultados indican que la toxina Cry8C, puede interferir con el desarrollo normal de los insectos y retrasar su ciclo o incluso acelerarlo, ya que las toxinas Cry de *Bt*, puede afectar las hormonas que regulan el desarrollo de los insectos, así mismo la exposición de los insectos a estas toxinas, puede tener efectos subletales que afectan su desarrollo y supervivencia (Bi et al., 2015).



Valores con la misma letra son iguales y expresan que no hubo diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($t \leq 0.05$).

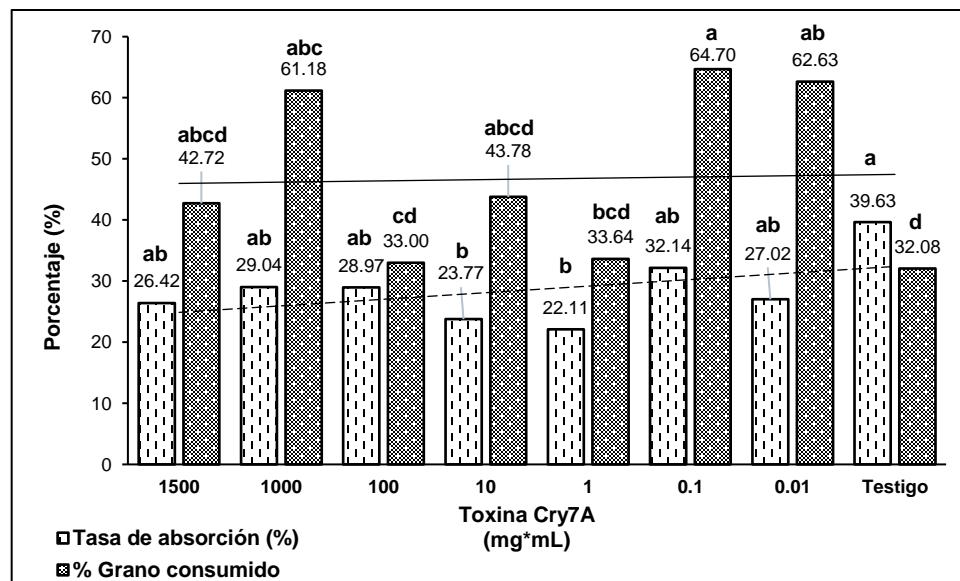
Figura 13. Porcentaje de adultos del gorgojo del maíz *Sitophilus zeamais* comparado con el porcentaje de la descendencia total obtenida con la toxina Cry8C de *Bt*.

Datos reportados por Shu *et al.* (2009) mencionan que la toxina Cry8 fue clonada y secuenciada con tres cebadores universales con la identidad más alta (58%) de la toxina Cry8Ba, con el fin de amplificar la toxicidad de la proteína hacia *H. obliqua* y *H. parallela*, aunque su efecto tóxico fue significativamente menor que la de la cepa parental, lo que sugieren estos estudios es que la cepa parental contiene toxinas adicionales o algún factor de virulencia, que por sí sola la toxina Cry8Ba hace que no sea tan eficaz sobre los insectos en estudio.

Toxina Cry7A de *Bt*

Dentro del análisis de la toxina Cry7A de *Bt*, con las semillas de maíz osmoacondicionadas, para las variables TA y %CG, se observaron diferencias estadísticas con la prueba de DMS entre tratamientos o concentraciones a las que se sometieron individuos del gorgojo del maíz *S. zeamais*, para evaluar su descendencia. El efecto en la variable TA mostró los valores más bajos de

absorción de las toxinas en 1.0 y 10 mg·mL⁻¹ con porcentajes de 22.11 y 23.77%, estos valores fueron incluso más bajos a los que se presentaron en el testigo donde no hubo tratamiento con la toxina (39.63%), los valores de las medias entre tratamientos para esta variable fluctuaron alrededor del 28.64%. Con estos resultados se entiende que hubo limitación en el ingreso de esta toxina a las semillas de maíz, lo que puede deberse a la estructura y peso molecular de dicha toxina. Según Ruiz (2015), menciona que las proteínas Cry 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 contra insectos, en este sentido, cuando se verificó la viabilidad de esta toxina (Figura 8), previo al tratamiento de osmoacondicionamiento de las semillas y establecimiento de los bioensayos se encontró un peso alrededor de los 150 kDa, lo que indica que es una toxina de estructura y peso molecular alto, esto pudo haber influenciado en lo observado en el comportamiento de la variable TA.



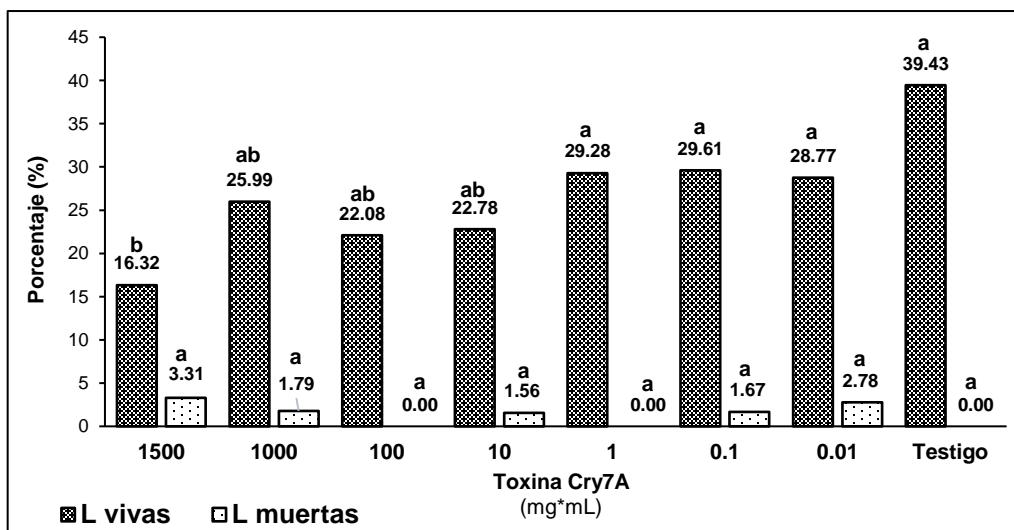
Valores con la misma letra son iguales y expresan que no hubo diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($t \leq 0.05$).

Figura 14. Relación entre la tasa de absorción de la toxina Cry7A, por granos de maíz osmoacondicionados y el porcentaje del consumo de grano por el gorgojo del maíz *Sitophilus zeamais*.

El consumo de grano osmoacondicionado con la toxina Cry7A de *Bt*, presentó una media entre los tratamientos del 46.72%, con respecto al peso final de grano con 13% de humedad. Se encontró que en los tratamientos con 1.0, 10, 100 y 1500 mg·mL⁻¹, la alimentación de los insectos, tanto en estadios larvarios como adultos fueron menores con respecto a las otras concentraciones (Figura 15), eso indica que hubo algún efecto de repelencia de la población de *S. zeamais* hacia la composición de los granos o probablemente al tratamiento de osmoacondicionamiento de las semillas, ya que esto se pudo apreciar también en el testigo (sin toxina), este comportamiento no fue similar al de otras toxinas Cry de *Bt*, probadas en nuestra investigación. Estos resultados concuerdan con otros estudios como los realizados por Rodríguez-Cobos *et al.* (1990) en pruebas de resistencia con granos de 10 variedades de trigo expuestos al ataque de *S. granarius*.

En el caso de las variables % LV y %ML, la media general entre los tratamientos fluctúo alrededor del 26.78% y 1.39%, respectivamente. En el %LV, se apreciaron diferencias significativas gracias a prueba de comparación de medias por medio de la DMS; mientras que en la variable del %ML, no se expresaron diferencias entre las dosis o concentraciones probadas para la toxina Cry7A; sin embargo, destaca la de 1500 mg·mL⁻¹ con el dato más bajos para el %LV, que fue de 16.32% y el valor más para el %ML, que fue de 3.31% de larvas muertas, con estos resultados se pueden considerar para posteriores estudios concentraciones más altas que favorezcan en la mortalidad de larvas de *S. zeamais*. En forma general los tratamientos evaluados reflejan baja toxicidad de la proteína Cry7A, pero no se descarta que el consumo de las larvas retrase el ciclo de vida del insecto todo esto se compara con el testigo que no estuvo expuesto a alguna toxina y fue el que mostro mayor porcentaje de larvas vivas con 39.43%. Por tanto, Rodríguez *et al.* (2021) compararon la efectividad de cinco proteínas Cry y obtuvieron resultados positivos para Cry7A que mostró más efectividad para el control de *X. arvicola* junto con la toxina Cry1Ba debido a la reducción de supervivencia de las larvas de este escarabajo, los datos

presentados en este estudio sugieren que estas proteínas pueden ser utilizados para el control de dicha plaga, sin embargo, se tiene que aplicar solo en el momento en que las larvas eclosionan del huevo para alcanzar la mayor susceptibilidad.

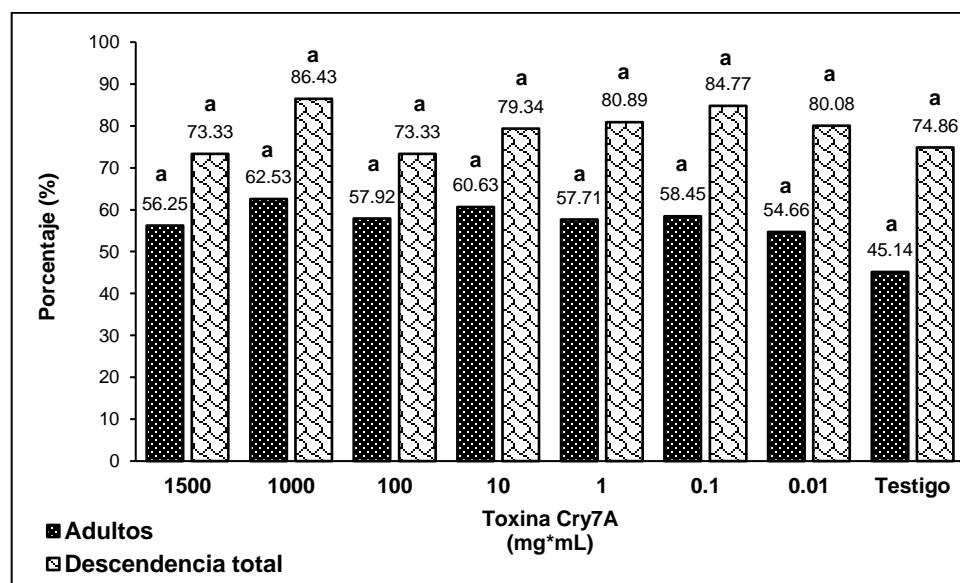


Valores con la misma letra son iguales y expresan que no hubo diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($t \leq 0.05$).

Figura 15. Porcentaje de larvas vivas y muertas de la descendencia de *Sitophilus zeamais* expuesta a la toxina Cry7A de *Bt*.

Los resultados obtenidos para las diferentes concentraciones probadas de la toxina Cry7A, demostraron que esta toxina tiene bajo efecto sobre poblaciones de *S. zeamais*, las medias obtenidas en las variables %A y %D, para los diferentes tratamientos, no presentaron diferencias estadísticas con un comportamiento igual al testigo (%A = 45.14% y %D = 74.86%). Las medias generales fluctuaron entre el 56.66 y 79.13%, tanto para %A y %D, respectivamente. El mayor %D se obtuvo en 1000 mg·mL⁻¹, con 86.43% y el menor valor en 1500 y 100 mg·mL⁻¹, con 73.33%. Para la variable %A, el valor más alto se presentó en 1000 mg·mL⁻¹ con 62.53% y el más bajo en 0.01 mg·mL⁻¹ con 54.66% (Figura 17). Debido a que no se expresó efecto en la supresión de la población de *S. zeamais* con esta toxina, tampoco fue notorio apreciar afectación en el ciclo de vida del insecto. Estos resultados no concuerdan con los

reportados por Delanthabettu *et al.* (2022), quienes demostraron que existe toxicidad hacia el picudo *Myllocerus subfasciatus* Guérin-Méneville, 1843 (Coleoptera: Curculionidae) con cepas nativas de *Bt* y mencionaron que las toxinas Cry1I, Cry3, Cry7, Cry8, Cry14, Cry26 y Cry55, aisladas de estas cepas, son letales con patogenicidad que osciló entre el 93 y 100% sobre el insecto; por lo que en nuestros resultados, al menos para la Cry7A, no se presentó efecto sobre la supresión en la descendencia de los insectos del gorgojo del maíz *S. zeamais*.



Valores con la misma letra son iguales y expresan que no hubo diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($t \leq 0.05$).

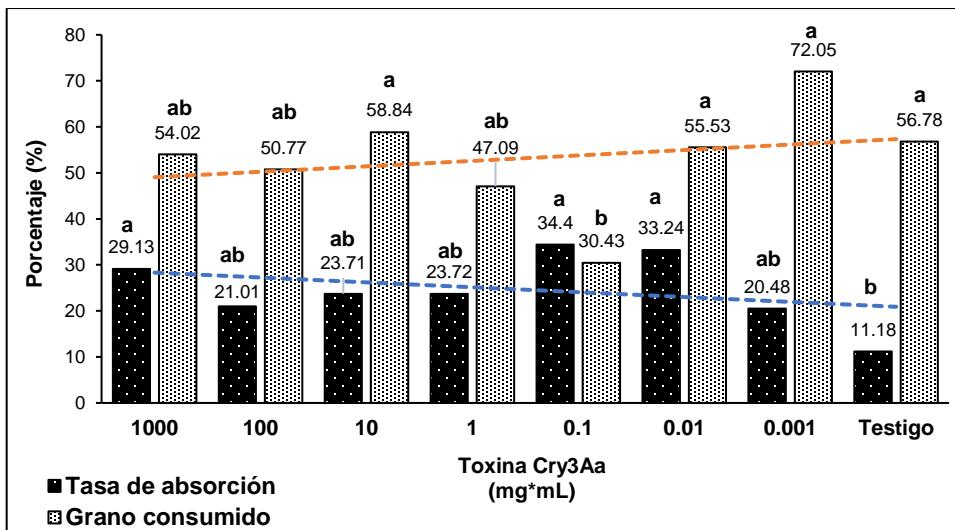
Figura 16. Porcentaje de adultos del gorgojo del maíz *Sitophilus zeamais* comparado con el porcentaje de la descendencia total obtenida con la toxina Cry7A de *Bt*.

Toxina Cry3Aa de *Bt*

En la toxina Cry3Aa de *Bt*, en las variables de TA, %CG, %LV, %ML, %A y %D no se presentaron diferencias significativas por el análisis de varianza, sin embargo, con la prueba de medias de DMS, si se lograron apreciar diferencias entre tratamientos para estas variables. Esto se debe a que el poder estadístico

del análisis de varianza puede ser insuficiente para detectar dichas diferencias entre grupos, especialmente si el tamaño de la muestra es pequeño o la variabilidad entre los grupos es alta, según Montgomery (2013). Por otro lado, este mismo autor indica que la prueba de medias de la DMS es más sensible para detectar diferencias entre pares y más robusta, ya que pueden detectar diferencias significativas a niveles de confianza más bajos.

En la Figura 18 se pueden observar las medias que presentaron los tratamientos analizados para la toxina Cry3Aa, específicamente para las variables TA y %CG, por lo que se encontró que existe una tendencia en la que a mayor concentración de la toxina absorbida por los granos de maíz y expuesta a los insectos de *S. zeamais*, se encontró que el %CG por los insectos se reduce; por otra parte también se encontró que a mayor concentración de la toxina se presentó mayor tasa de absorción, estos resultados difieren completamente a los que se reportan en las toxinas Cry8C y Cry7A. En la variable de TA, se encontraron los mayores valores en las concentraciones bajas [0.1, 0.01 y 1000 mg·mL⁻¹], con 34.40, 33.24 y 29.13% de TA de la toxina Cry3Aa, mientras que, en el testigo, se reportó la TA más baja de 11.18%, eso puede dar referencia a que las concentraciones bajas de las toxinas pueden facilitar el proceso de imbibición en el tratamiento de osmoacondicionamiento. Las medias para esta variable fluctuaron alrededor del 59.34%. Para la variable %CG, los insectos del gorgojo del maíz consumieron más en 0.001 mg·mL⁻¹ con un promedio de 72.05%, esto indica que, a dosis más altas de la toxina, la plaga se alimentará menos, es decir que la toxina Cry3Aa demuestra un efecto hacia el consumo de los granos de maíz sobre las larvas de *S. zeamais*. En la dosis de 0.1 mg·mL⁻¹ el porcentaje de consumo por el insecto fue menor (30.43%), con respecto al resto de las concentraciones evaluadas. La media para esta variable fue de 80.16%, lo que indica que los insectos causaron más del 80% de daño en la semilla de maíz que fue osmoacondicionada con la toxina Cry3Aa (Figura 18).



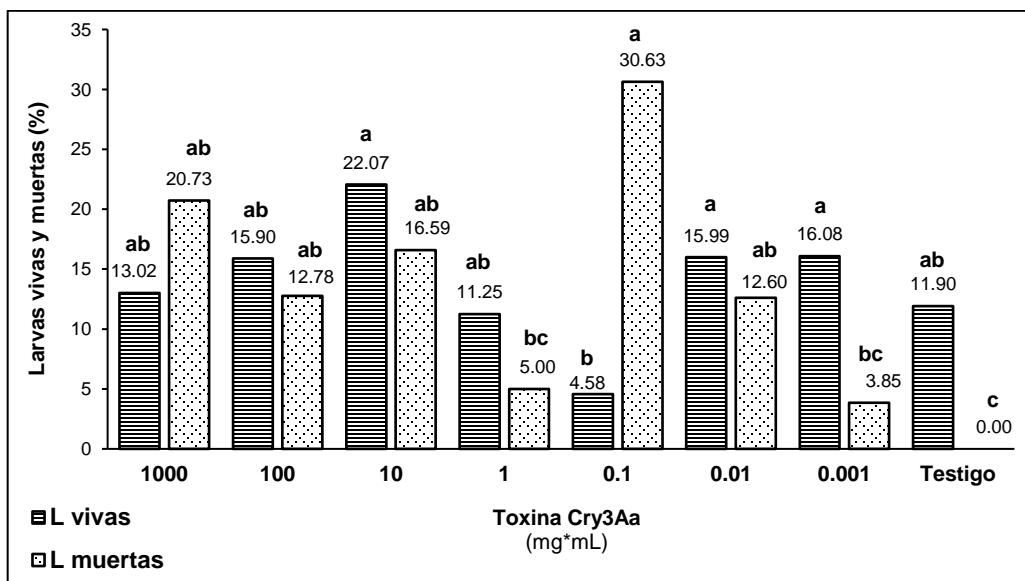
Valores con la misma letra son iguales y expresan que no hubo diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($t \leq 0.05$).

Figura 17. Relación entre la tasa de absorción de la toxina Cry3Aa, por granos de maíz osmoacondicionados y el porcentaje del consumo de grano por el gorgojo del maíz *Sitophilus zeamais*.

Al respecto, Nwosu *et al.* (2016) mencionan que hay diferentes factores por lo que el grano es susceptible al ataque de los gorgojos de granos almacenados y se debe al aumento de almidón y proteínas que están disponibles para el consumo de las plagas, se entiende que con el osmoacondicionamiento, al momento de suspender el agua y desecar la semilla, según Preston *et al.* (2009), se da la activación enzimática y desdoblamiento de sustancias de reserva que degradan el endospermo almidonoso y preparar al embrión para la emergencia y protuberancia de la radícula o eje embrionario, por tal motivo, es probable que el alto porcentaje de consumo del grano en este experimento se deba a la facilidad que tuvo *S. zeamais* para perforar los granos para consumo y ovipositar. Astuti *et al.* (2019) observaron en varios híbridos de maíz la repelencia de *S. zeamais* esto por el contenido alto de fibra, ácidos fenólicos e inhibición de la tripsina aun así aplicándole algún tratamiento previo.

Las variables %LV y %ML, analizadas para los tratamientos establecidos con la toxina Cry3Aa, obtuvieron una media general de 13.85 y 12.77%,

respectivamente entre el total de los tratamientos. Dentro de estas variables resalta la concentración a $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ con valor de 4.58% larvas vivas y el incremento del porcentaje de mortalidad a 30.63% sobre las demás dosis evaluadas, seguidas por 1000, 100, 10 y $0.01 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, con %ML de 20.73, 12.78, 16.56 y 12.60%, respectivamente; estos resultados indican que esta toxina fue la que mostró mayor efecto hacia el control de *S. zeamais* comparado con las otras cuatro evaluadas, ya que se obtuvo el mayor porcentaje de mortalidad en la mayoría de las concentraciones evaluadas con respecto al testigo (Figura 19).

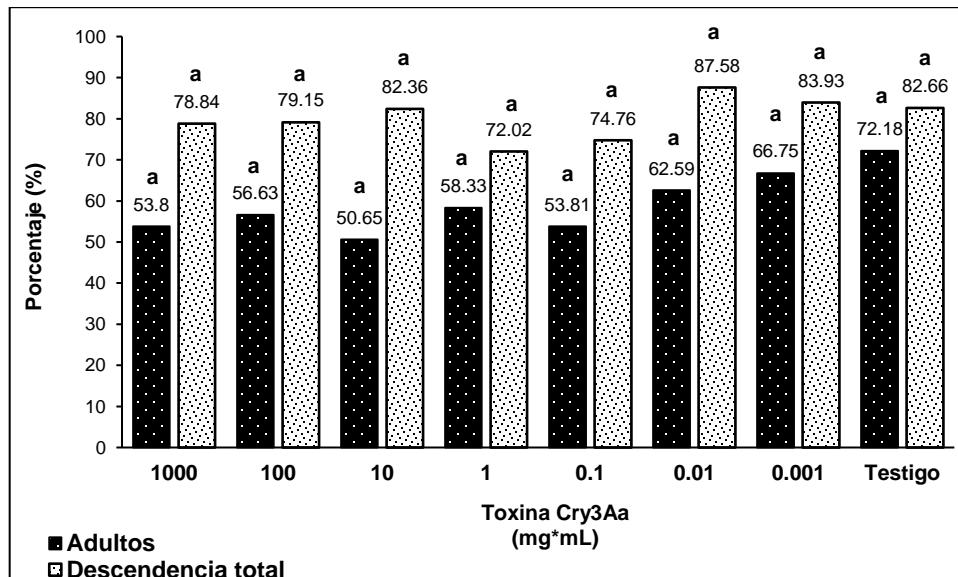


Valores con la misma letra son iguales y expresan que no hubo diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($t \leq 0.05$).

Figura 18. Porcentaje de larvas vivas y muertas de la descendencia de *Sitophilus zeamais* expuesta a la toxina Cry3Aa de *Bt*.

Datos presentados por Skoková *et al.* (2022) señalan que esta toxina en el cultivo de la papa genéticamente modificada tiene efectos altos contra el escarabajo *L. decemlineata*. En relación con los datos presentados por Guo *et al.* (2021), estos autores demuestran que la Cry3Aa tiene poco efecto para el picudo rojo de las palmeras *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier, 1790 (Coleoptera: Curculionidae), los ensayos mostrados en este estudio indican que la activación proteolítica de esta proteína se digiere en fragmentos más pequeños que los fragmentos

activados de 55 kDa en diferentes condiciones. En nuestra investigación para verificar la viabilidad de las toxinas, esta toxina presentó un peso de 75 kDa, por lo que se puede llegar a mayor toxicidad con fragmentos más pequeños de ésta. Para las variables %A y %D, como se mencionó anteriormente, no se reportaron diferencias estadísticas, la media general fue de 59.34 y 80.16%, respectivamente. En %A se aprecia una tendencia en el incremento de esta variable, conforme disminuye la concentración de la toxina en los tratamientos y se expresó el valor más alto en el tratamiento testigo (sin toxina), esto indica que hay reducción en el número de adultos conforme se incrementa la concentración y con ello un retraso en el ciclo de vida de los insectos (Figura 20).



Valores con la misma letra son iguales y expresan que no hubo diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($t \leq 0.05$).

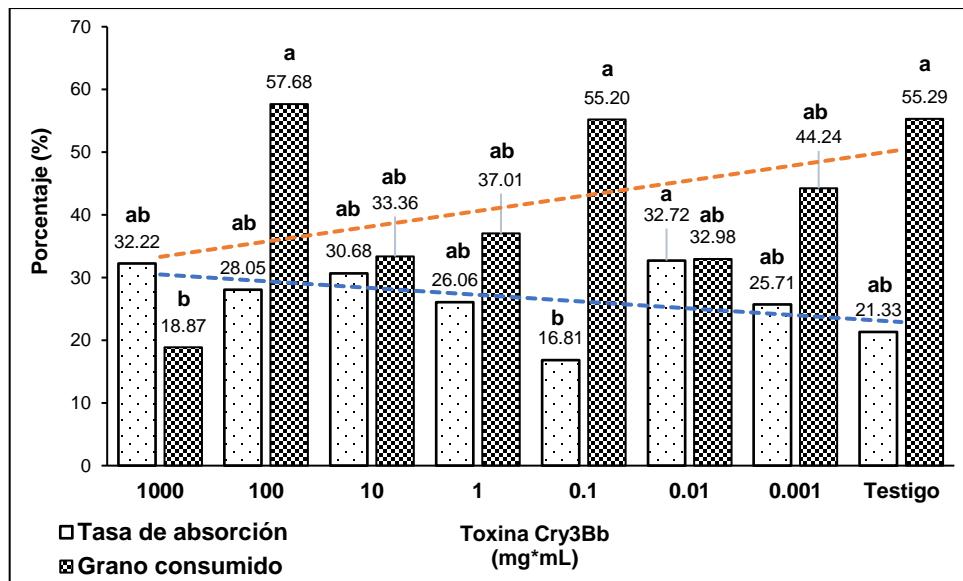
Figura 19. Porcentaje de adultos del gorgojo del maíz *Sitophilus zeamais* comparado con el porcentaje de la descendencia total obtenida con la toxina Cry3Aa de *Bt*.

En cuanto al %D, los insectos fueron influenciados por los efectos de la toxina Cry3Aa, se muestran datos con las dosis de 1.0 y 0.1 mg·mL⁻¹, con valores del 72.02 y 74.76%, respectivamente. Esto indica que a pesar de que son dosis bajas en la concentración de la toxina, se presenta un efecto positivo hacia la supresión

de la plaga, mientras los estadios del insecto se alimentan en este caso con la toxina Cry3Aa, esto comparado con el testigo que obtuvo uno de los valores más altos con 82.66%, teniendo en cuenta que no tiene ninguna toxina dentro del grano embebido (Figura 20). Estudios realizados por Hussein *et al.* (2005) donde evaluaron al escarabajo colorado de la papa *L. decemlineata* demuestran reducciones de peso corporal de los insectos con 11 y 5%, a causa de una concentración de $1.4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de la toxina Cry3Aa en tejido vegetal de papa y $3.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ en dieta artificial, respectivamente; estos experimentos también demostraron la reducción en el porcentaje de descendientes (74 y 65%). Estos mismos autores evaluaron también el efecto en *Spodoptera littoralis* Boisduval, 1833 (Lepidoptera: Noctuidae) con una dieta artificial que contenía $9.1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de Cry3Aa, donde también hubo una reducción del 10% en su tamaño y no generó descendencia viable. Estos datos indican que la disminución en la reproducción no fue resultado de una falta general de reservas nutricionales, sino de un efecto directo de la toxina Cry3Aa sobre el proceso reproductivo de los insectos.

Toxina Cry3Bb de *Bt*

Los análisis estadísticos para los tratamientos establecidos con la toxina Cry3Bb, mostraron el mayor número de variables con diferencias estadísticas en el análisis de varianza. Como parte de los análisis descriptivos, en las variables de la TA y %CG, se encontró que presentaron tendencias similares a las encontradas con la toxina Cry3Aa, donde a medida que disminuye la TA, el consumo del grano por el insecto aumenta, en la concentración de $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ se aprecia claramente este fenómeno, donde con bajo valor de TA (16.81%) el %CG aumento a 55.20% y a $1000 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, la TA fue de 32.22% y el %CG fue bajo alcanzando un 18.87%. La media de la TA fue de 26.69%, mientras que para %CG, fue de 41.83% (Figura 21).

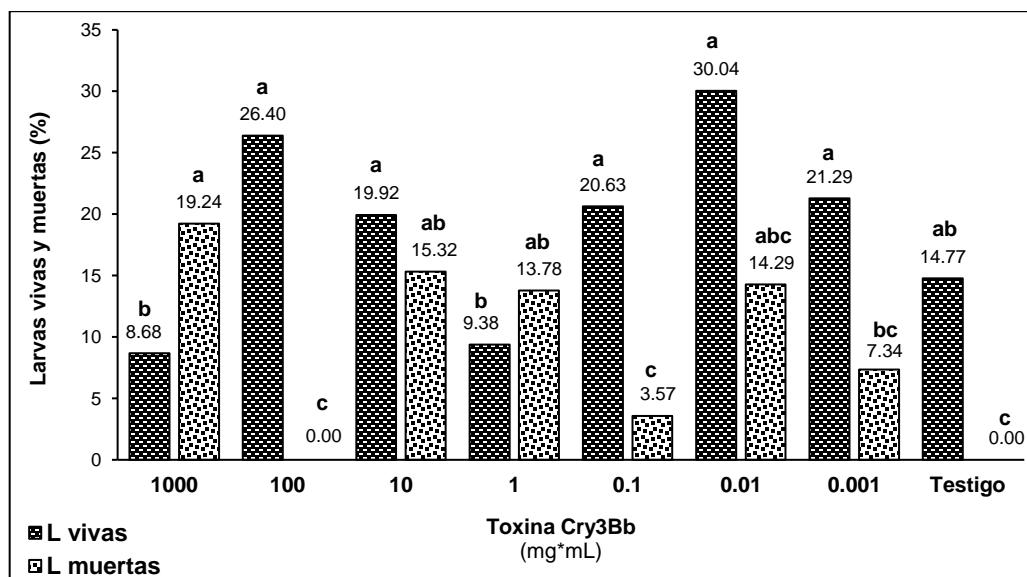


Valores con la misma letra son iguales y expresan que no hubo diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($t \leq 0.05$).

Figura 20. Relación entre la tasa de absorción de la toxina Cry3Bb, por granos de maíz osmoacondicionados y el porcentaje del consumo de grano por el gorgojo del maíz *Sitophilus zeamais*.

El valor del %CG se redujo en algunos tratamientos, lo que indica que hubo un efecto por la toxina Cry3Bb, en comparación con el testigo que presentó un %CG de 55.29% (Figura 21). Varios estudios mencionan que el aumento de proteínas, almidón, zinc, hierro, magnesio, manganeso, sodio, calcio, fósforo y cobalto dentro de los granos de maíz hacen que sea muy susceptible al daño e infestación por la plaga; Khakata *et al.* (2018) reportaron que la línea endogámica 'DUMA 41 (S)' de maíz blanco es demasiado susceptible ante el ataque de *S. zeamais*, aumentando el porcentaje de consumo del grano hasta los 120 días después de la exposición de los insectos por ser un grano semi-cristalino. Con respecto a los resultados, puede ser que esta condición del tipo de grano de maíz intervino en el consumo de los insectos, debido a que se utilizó para los bioensayos maíz del tipo harinoso que en su constitución predomina el alto contenido de almidón y carbohidratos.

En la Figura 22, los datos muestran el %LV y %ML, las medias totales entre los diferentes tratamientos tuvieron un valor de 18.89 y 9.19%, respectivamente; la concentración de $1000 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ mostró el mayor %ML con 8.68 y en el %LV, se tuvo un 19.24%, seguidas por 10 y $0.01 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, con valores de 19.92 y 15.32% y 30.04 y 14.29%, respectivamente para cada concentración y variable. Resultados similares son reportados por Xu *et al.* (2020) donde evaluaron la toxicidad de Cry3Bb introducida al genoma del plásmido del álamo *P. alba* contra el escarabajo *P. versicolora*, estos autores indicaron que la proteína causó una mortalidad de 100% en el primer estadio larval a los tres días de su alimentación con hojas jóvenes que tenía $16.8 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$.

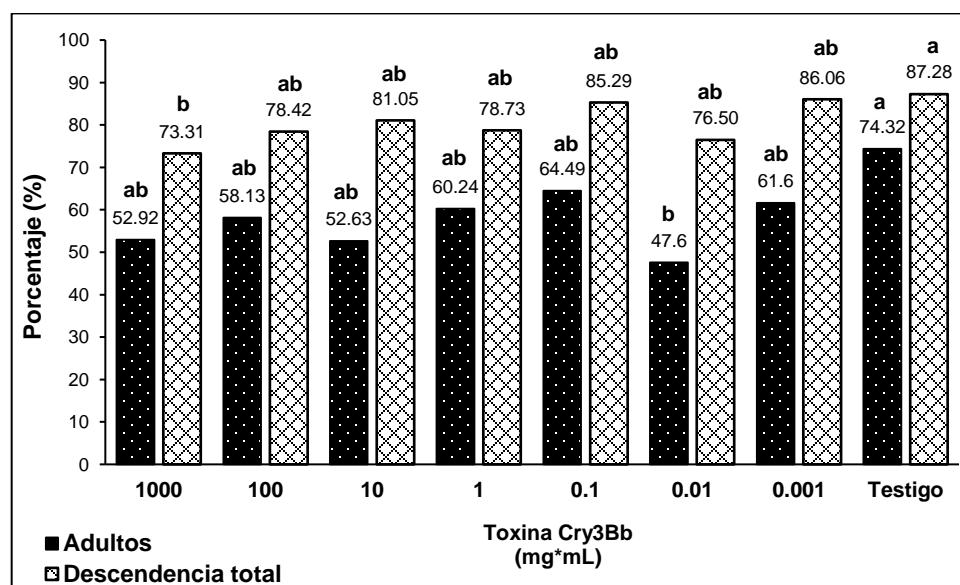


Valores con la misma letra son iguales y expresan que no hubo diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($t \leq 0.05$).

Figura 21. Porcentaje de larvas vivas y muertas de la descendencia de *Sitophilus zeamais* expuesta a la toxina Cry3Bb de *Bt*.

En los resultados para la variable %A se presentaron valores menores al testigo (74.32%), en todas las concentraciones evaluadas para la toxina Cry3Bb, lo que indica que hubo supresión por parte de la toxina sobre el insecto lo que impactó el %A presentes en cada tratamiento. Por otro lado, el %D también expresó la misma tendencia que la variable %A, con valores menores al testigo (87.28%) en

todas las concentraciones, principalmente en 1000 y 0.01 mg·mL⁻¹ con un promedio de 73.31 y 76.50%, respectivamente. Por lo tanto, la dosis más alta [1000 mg·mL⁻¹] afectó la descendencia total de la plaga *S. zeamais*, asumiendo que fue debido al consumo del grano de maíz con la toxina Cry3Bb, por lo que se reflejó el efecto en el desarrollo de cada estadio del insecto (Figura 23). Lei *et al.* (2023) reportaron que las hojas del sauce *Salix alba* L. que expresan la toxina Cry3Bb son altamente letales para el escarabajo *P. versicolora*, en este estudio demostraron que los insectos alimentados sufren una baja en la descendencia de la población, con una mortalidad significativamente acelerada por el consumo del transgénico, también mencionan que pueden causar una lisis de las células intestinales en el coleóptero.

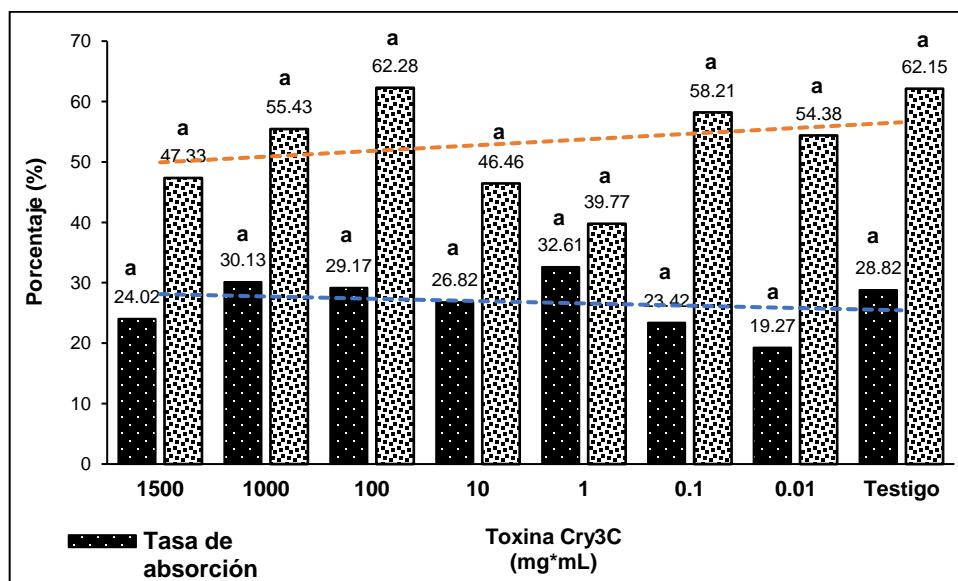


Valores con la misma letra son iguales y expresan que no hubo diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($t \leq 0.05$).

Figura 22. Porcentaje de adultos del gorgojo del maíz *Sitophilus zeamais* comparado con el porcentaje de la descendencia total obtenida con la toxina Cry3Bb de *Bt*.

Toxina Cry3C de *Bt*

Con la toxina Cry3C, se presentó el mayor daño al grano, con respecto al resto de las toxinas evaluadas, ya que hubo un alto %CG, en los diferentes tratamientos para esta toxina, estos resultados se reflejaron en las 100 y 0.1 mg·mL⁻¹, con 62.28 y 58.21%, respectivamente, comparando éstos con el testigo (sin toxina); por otro lado, los resultados también mostraron que en las concentraciones 1.0, 10 y 1500 mg·mL⁻¹, se presentaron los más bajos %CG, con 39.77, 46.46 y 47.33%, respectivamente. Los valores para la variable TA, se encontraron alrededor del valor de la media de 26.78%, en este sentido, no hubo una correspondencia entre la capacidad de absorción de la toxina por el grano, con respecto a la preferencia del insecto para consumir el grano y desarrollar su ciclo de vida (Figura 24).

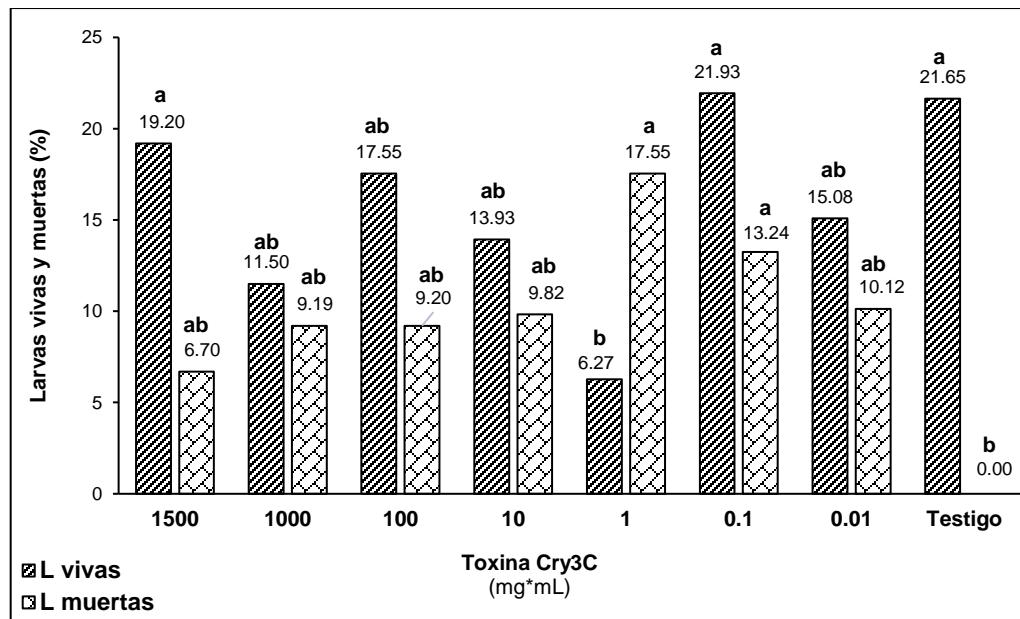


Valores con la misma letra son iguales y expresan que no hubo diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($t \leq 0.05$).

Figura 23. Relación entre la tasa de absorción de la toxina Cry3C, por granos de maíz osmoacondicionados y el porcentaje del consumo de grano por el gorgojo del maíz *Sitophilus zeamais*.

Acheampong *et al.* (2019) demostraron que la variedad de maíz 'Aseda' inhibió el ataque de *S. zeamais* con menor pérdida de peso, daño y alta germinación del grano, esto indica que las características del grano de maíz determinan la susceptibilidad del insecto, por otro lado, en nuestro estudio, algunas de las toxinas Cry de *Bt*, favorecieron la reducción del consumo del grano por preferencia y retrasaron el ciclo de vida del insecto, esto fue notorio ya que no se reportó el estadio de pupa en ninguno de los resultados de los bioensayos, para ninguna de las toxinas Cry.

En la toxina Cry3C los resultados que se obtuvieron en las variables %LV y %ML, tuvieron una media general de 15.89 y 9.48%, respectivamente. Donde destacó la concentración de $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ con el valor más alto del %ML, con 6.27% y el valor más bajo en %LV de 17.55%, con respecto al resto de las concentraciones. En esta misma variable se muestra que a concentraciones bajas la toxina tiene efecto positivo para la supresión del curculiónido, sin embargo, no alcanzan valores tan altos como los encontrados con $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ y, además, presentan valores altos del %LV. En el testigo, no se observó mortalidad de larvas, esto indica que la mortalidad que se presentó en los estadios larvarios fue por la influencia de la toxina Cry3C, más que por otros factores como el manejo (Figura 25).



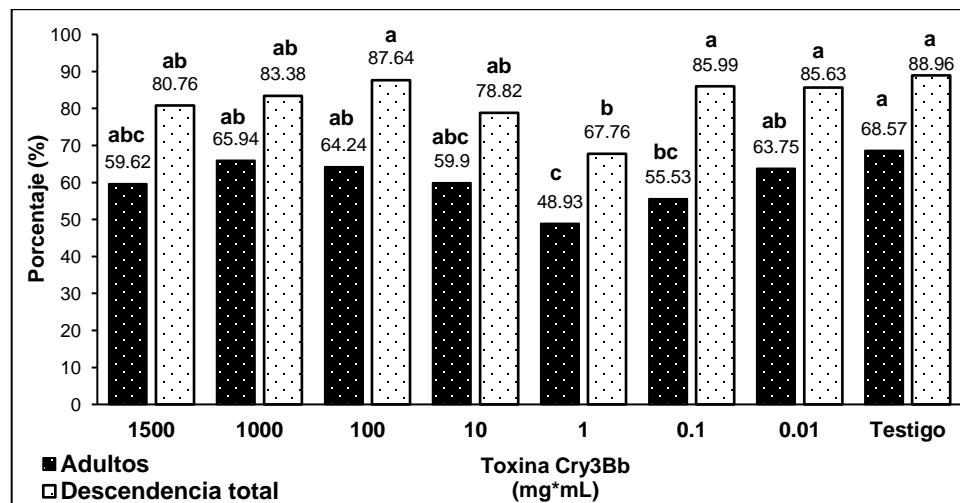
Valores con la misma letra son iguales y expresan que no hubo diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($t \leq 0.05$).

Figura 24. Porcentaje de larvas vivas y muertas de la descendencia de *Sitophilus zeamais* expuesta a la toxina Cry3C de *Bt*.

Por otro lado, en los resultados reportados por Rausell *et al.* (2004) demostraron que hubo alta formación de poros en las epicutículas del intestino de *L. decemlineata* obtenidas por activación proteolítica en contraste con las toxinas activadas con proteasas de tripsina o quimotripsina. Esto indica que hay actividad insecticida contra la plaga por el porcentaje de mortalidad que en este estudio resultó. Los porcentajes de mortalidad que se presentaron en las larvas dan referencia de que la toxina Cry3C, pueden concordar con los resultados encontrados por Rausell *et al.* (2004), sin embargo, se requiere de hacer estudios más específicos para detectar el efecto en los órganos del insecto.

En el caso de las variables %A y %D, se encontró la misma tendencia que la que se reporta en los resultados anteriores para los valores en larvas vivas y muertas. La concentración de $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, presentó el menor valor para estas dos variables y la respuesta de las otras concentraciones mostró también resultados similares. Para futuros trabajos se requiere tomar esta concentración como

referencia. Para ser más específicos, todos los tratamientos muestran valores menores a los obtenidos en el testigo (88.96%), en el caso del %D e incluso para %A (68.57%), respectivamente. Por tanto, los resultados indican que hubo poco efecto para la descendencia, sin embargo, no se descarta el consumo de la toxina por parte del insecto (Figura 26). García (1998) realizó un estudio con el crisomélido *L. decemlineata* donde evaluaron las toxinas Cry3A, Cry3Bb y Cry3C, y reportó que la Cry3C mostró la mayor actividad sobre el coleóptero. En ese mismo estudio, pero con el insecto *T. molitor*, la toxina Cry3C no pareció mostrar una unión específica en el intestino medio, puesto que no fue desplazada en competencia homologa, esto a una CL₅₀ entre 3.0 y 18.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.



Valores con la misma letra son iguales y expresan que no hubo diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($t \leq 0.05$).

Figura 25. Porcentaje de adultos del gorgojo del maíz *Sitophilus zeamais* comparado con el porcentaje de la descendencia total obtenida con la toxina Cry3C de *Bt*.

CONCLUSIONES

Las cinco toxinas Cry de *Bt* (Cry8C, Cry7A, Cry3Aa, Cry3Bb y Cry3C) tuvieron actividad insecticida específica para *S. zeamais*, demostrando efectos significativos sobre la supresión de la progenie de este insecto, retrasando su ciclo de vida y reduciendo la cantidad de adultos y larvas.

El tratamiento de osmoacondicionamiento de las semillas con las toxinas Cry de *Bt*, permitió el ingreso de las toxinas al interior de la semilla y que el insecto se encontrara en interacción con éstas en el estadio larvario donde actúa *Bt*.

REFERENCIAS

- Acheampong, A., Ayertey, J. N., Eziah, V. Y. & Ifie, B. E. (2019). Susceptibility of selected maize seed genotypes to *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research* 81: 62-68.
- Ángel R., M. D., Pérez S., J. & Morales F. J. (2015). Toxicidad de extractos vegetales y hongos entomopatógenos en el gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae), del maíz en el estado de Guerrero. *Entomología Mexicana*, 2: 260-265.
- Armak, A., Saber, M., Arzanlou, M. & Sohrabi, F. (2024). Lethal effects of entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* in combination with phosalone and lambda-cyhalothrin on the wheat weevil, *Sitophilus granarius*. *Journal of Applied Research in Plant Protection*, 13(1): 111-121.
- Astuti, L. P., Yahya, S. M. & Hadi, M. S. (2019). Susceptibility of six corn varieties (*Zea mays* L.) to *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). *International Journal of Plant Biology* 10: 9-13.
- Azcón-Bieto, J. & Talón, M. (2003). Fundamentos de Fisiología Vegetal. McGrawHill/Interamericana. Barcelona, España. 522 p.
- Bali, M. P., Prasad, B. & Kumar, A. (2020). Impact of stored grain pests on grain quality and quantity. *Journal of Stored Products Research*, 87: 101629.
- Benavente M., Q. (2018). Evaluación de la actividad biocida del aceite esencial de hojas de muña (*Minthostachys mollis*) en el gorgojo de maíz (*Sitophilus zeamais*).
- Bewley, J. D. & Black, M. (1983). Physiology and Biocemistry of Seeds in Relation to Germination. Volume 1: Development, germination, and growth. Second edition. Berlin, Germany. Springer-Verlag. 306 p.
- Bi, Y., Zhang, Y., Shu, C., Crickmore, N., Wang, Q., Du, L., Song, F. & Zhang, J. (2015). Genomic sequencing identifies novel *Bacillus thuringiensis* Vip1/Vip2 binary and Cry8 toxins that have high toxicity to Scarabaeoidea larvae. *Applied microbiology and biotechnology*, 99: 753-760.
- Borror, D. J., de Long, D. M. & Triplehorn, C. A. (1981). Introduction to the Study of Insect. 5a. Ed. New York. 928 p.
- Bravo, A., Gill, S. S. & Soberón, M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49(4): 423-435.

- Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S. S., & Soberón, M. (2011). *Bacillus thuringiensis*: una historia de un bioinsecticida exitoso. *Bioquímica de insectos y biología molecular*, 41(7): 423-431.
- Bravo C., J. J. & González C., S. (2011). Evaluación *In vitro* de insecticidas biorracionales para el control de *Agrotis ipsilon* Hüfnagel. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 28(1): 53-63.
- Burgos D., J. A., Benítez R., I., García Z., J. J. & Rangel F., M. A. (2019). Mecanismos de tolerancia al ataque de *Sitophilus zeamais* Motschulsky en poblaciones de maíz nativo del Estado de Yucatán. Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas. Postgrado de Recursos Genéticos y Productividad. Tesis de maestría. p 18.
- Bustamante, R. & Patiño, L. (2001). En búsqueda de un sistema de resistencia estable en plantas cultivadas. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*. 60: 3-14.
- Canción, P., Wang, Q., Nangong, Z., Su, J. & Ge, D. (2012). Identificación del receptor putativo del intestino medio de *Henosepilachna vigintioctomaculata* (Coleoptera: Coccinellidae) para la toxina Cry7Ab3 del insecticida *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 109: 318–322.
- Cano, M. C., Beato, M., Usseglio, V. L., Merlo, C. & Zunino, M. P. (2024). Bioactive paints with volatile organic alcohols for the control of *Sitophilus zeamais*. *Journal of Stored Products Research*, 109: 102423.
- Cerna C., E., Guevara A., L., Landeros F., J., Ochoa F., Y., Badii Z., M. H. & Olalde P., V. (2010). Evaluación de aceites y extractos vegetales para el control de *Sitophilus zeamais* y su efecto en la calidad de semilla de maíz. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo, Argentina*, 42(1):135-145.
- Cohen, S., Albeck, S., Ben-Dov, E., Cahan, R., Firer, M., Zaritsky, A. & Dym, O. (2011). Cyt1Aa toxin: crystal structure reveals implications for its membrane-perforating function. *Journal of Molecular Biology*, 413(4): 804-814.
- Cristóbal H., C., Facio P., F., Valdez O., A., Torres T., M. A., González V., R. (2013). Control de *Sitophilus zeamais*, utilizando mezclas de timol y carvacrol en diferentes dosis en semilla de maíz almacenada y su efecto en la calidad fisiológica. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Tesis de maestría. 85 pág.
- Delanthabettu, A., Narasimhappa, N. S., Ramaswamy, A., Mallesh, M. H., Nagarajappa, N. & Govind, G. (2022). Molecular characterization of native

- Bacillus thuringiensis* strains from root nodules with toxicity against the fall armyworm (FAW, *Spodoptera frugiperda*) and brinjal ash weevil (*Mylolocerus subfasciatus*). *Current Microbiology*, 79(9): 274.
- De Maagd, R. A., Bravo, A., Berry, C., Crickmore, N. & Schnepf, H. E. (2003). Structure, diversity and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annual Review of Genetics*, 37: 409–433.
- Domínguez A., M., Villanueva, M., Escriche, B., Anzin, A. C. & Caballero, P. (2020). Actividad insecticida de las proteínas de *Bacillus thuringiensis* contra las plagas de coleópteros. Instituto de Investigación Multidisciplinar en Biología Aplicada-IMAB, Universidad Pública de Navarra, 31192 Mutilva, Navarra, España.
- Domínguez-Arrizabalaga, M., Villanueva, M., Fernandez, A. B. & Caballero, P. (2019). A strain of *Bacillus thuringiensis* containing a novel *cry7Aa2* gene that is toxic to *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Insects*, 10(9): 259.
- Duncan, D. R., Hammond, D., Zalewski, J., Cudnochufsky, J., Kaniewski, W., Thornton, M., Bookout, J. T., Lavrik, P., Rogan, G. J. & Feldman-Riebe, J. (2002). Field performance of transgenic potato, with resistance to colorado potato beetle and viruses. *HortScience*, 37(2): (275–276).
- Ekobu, M., Solera, M., Kyamanywa, S., Mwanga, R. O., Odongo, B., Ghislain, M. & Moar, W. J. (2010). Toxicity of seven *Bacillus thuringiensis* Cry proteins against *Cylas puncticollis* and *Cylas brunneus* (Coleoptera: Brentidae) using a novel artificial diet. *Journal of economic entomology*, 103(4): 1493-1502.
- Finch, S. W. E., Dent, K. C. & Clark, L. J. (2004). Soak conditions and temperature following sowing influence the response of maize (*Zea mays* L.) seeds to on-farm priming (pre-sowing seed soak). *Fields Crops Research*, 90: 361-374.
- Finch-Savage, W. E., Dent, K. C., & Clark, L. J. (2004). Soak conditions and temperature following sowing influence the response of maize (*Zea mays* L.) seeds to on-farm priming (pre-sowing seed soak). *Fields Crops Research*, 90(2-3): 361-374.
- García L., S. (2004). Mapa genético de las características del maíz tropical (*Zea mays* L.) asociadas con la resistencia a la plaga de almacenamiento, *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae). Tesis Doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa, México, D. F. 116 p.

- García-Lara, S. & Bergvinson, D. J. (2007). Programa integral para reducir pérdidas poscosecha en maíz. *Agricultura técnica en México*, 33(2): 181-189.
- García-Lara, S., Burt, J. A., Serratos A., J., Díaz P., D., Arnason, J. T. & Bergvinson D. (2003). Defensas naturales en el grano de maíz, al ataque de *Sitophilus zeamais* (Motsch, Coleoptera: Curculionidae) Mecanismos y bases de la resistencia. *REB. Revista de Educación Bioquímica* 22: 138-145.
- García-Lara, S., Espinosa C., C. & Bergvinson, D. J. (2007). Manual de plagas en granos almacenados y tecnologías alternas para su manejo y control. Centro Internacional para el Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). El Batán, Estado de México, México. 56 p.
- García R., I. (1998). Modo de acción de las proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis* activas contra plagas de himenópteros, coleópteros y lepidópteros. Ciencias químicas. Universidad de Valencia. Tesis doctoral.
- Gassmann, A. J., Shrestha, R. B., Jakka, S. R. K., Dunbar, M. W., Clifton, E. H., Paolino, A. R., Ingber, D. A., Frances, B. W., Masloski, K. E. & Dounda, J. W. (2016). Evidence of resistance to Cry34/35Ab1 corn by western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae): root injury in the field and larval survival in plant-based bioassays. *Journal of economic entomology*, 109(4): 1872-1880.
- Gestor. (2019). Plagas en granos almacenados: tipos y tratamiento. Servicios agrícolas de Silos del Cinca. <https://www.silosdelcinca.com/abonos/consejos-efectivos-para-minimizar-la-perdida-de-fertilizantes-en-frutales/#respond>.
- Gindin, G., Mendel, Z., Levitin, B., Kumar, P., Leví, T., Shahi, P., Khasdan, V., Weinthal, D., Kuznetsova, T. & Einav, M. (2014). The basis for rootstock resilient to *Capnodis* species: screening for genes encoding δ-endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. *Pest management science*, 70(8): 1283-1290.
- Gómez, H., Zapata, A., Torres, E. & Tenorio, M. (2014). Manual de producción y uso de hongos entomopatógenos. Servicio Nacional de Sanidad Agrícola (SENASA), 37. <https://www.senasa.gob.pe/senasa/wp-content/uploads/2017/09/Manual-de-Producci%C3%83%C2%B3n-y-Uso-de-Hongos-Entomopat%C3%83%C2%B3genos.pdf>.
- González M., B., Gurrola R., J. N. & Chaires H., I. (2015). Productos biológicos para el control de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 41(2): 200-204.

- González, M. & Rodríguez, J. (2022). Control strategies for stored grain pests: A review. *Food Control*, 132: 108492.
- Guo, Y., Sun, Y., Liao, Q., Carballar-Lejarazú, R., Sheng, L., Wang, S., Zhou, J., Zhang, F. & Wu, S. (2021). Proteolytic activation of *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa toxin in the red palm weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Economic Entomology*, 114(6): 2406-2411.
- Gutiérrez E., V. H. (2023). Evaluación del efecto de dos insecticidas sobre el control de gorgojo del maíz (*Sitophilus zeamais* M.). Instituto Tecnológico de Tlajomulco, Jalisco. pp. 8-9.
- Harris, D., Rashid, A., Miraj, G., Arif, M. & Shah, H. (2007). On-farm seed priming with zinc-sulphate solution. A cost-effective way to increase the maize yields of resource-poor farmers. *Fields Crops Research* 102: 119-127.
- Henderson, C. F. & Tilton, E. W. (1955). Tests with acaricides against the brown wheat mite. *Journal of Economic Entomology*, 48(2): 157-161.
- Hernández-Trejo, A., Estrada-Drouaillet, B., Rodríguez-Herrera, R., García-Giron, J. M., Patiño-Arellano, S. A. & Osorio-Hernández, E. (2019). Importancia del control biológico de plagas en maíz (*Zea mays* L.). *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 10(4): 803-813.
- Hussein, H. M., Habustová, O. & Sehnal, F. (2005). La toxina Cry3Aa de *Bacillus thuringiensis*, específica del escarabajo, reduce el crecimiento de las larvas y frena la reproducción en *Spodoptera littoralis* (Boisd.). *Ciencia del manejo de plagas*, 61(12): 1186–1192.
- James, C. (2017). Estado mundial de los cultivos biotecnológicos/transgénicos comercializados en 2017: la adopción de cultivos biotecnológicos aumenta a medida que se acumulan los beneficios económicos en 22 años; ISAAA Brief Nº 53; ISAAA: Ithaca, NY, EE.UU.
- Jia, Y., Zhao, C., Wang, Q., Shu, C., Feng, X., Song, F. & Zhang, J. (2014). A genetically modified broad-spectrum strain of *Bacillus thuringiensis* is toxic against *Holotrichia parallela*, *Anomala corpulenta* and *Holotrichia oblita*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30: 595-603.
- Jurat-Fuentes, J. L. & Crickmore, N. (2017). Specificity determinants for Cry insecticidal proteins: insights from their mode of action. *Journal of invertebrate pathology*, 142, 5-10.
- Khalil, A., Ghanem, S. & Al-Shahrani, S. (2021). Economic impacts of stored grain pests on the cereal industry. *Agricultural Economics*, 52(4): 505-517.

- Khakata, S., Mbute, F. N., Chemining'Wa, G. N., Mwimali, M., Karanja, J., Harvey, J. & Mwololo, J. K. (2018). Post-harvest evaluation of selected inbred lines to maize weevil *Sitophilus zeamais* resistance. *Journal of Plant Breeding and Crop Science* 10: 105-114.
- Krieg, A., Huger, A. M., Langenbruch, G. A. & Schnetter, W. *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*: Ein neuer, gegenüber Larven von Coleopteren wirksamer Pathotyp. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, 96: 500–508.
- Lambert, B., Höfte, H., Annys, K., Jansens, S., Soetaert, P. & Peferoen, M. (1992). Novel *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a silent activity against coleopteran larvae. *Applied and environmental Microbiology*, 58(8): 2536-2542.
- Layton, C., Maldonado, E., Monroy, L., Corrales L., C. & Sánchez L., C. (2011). *Bacillus* spp.; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. *Revista NOVA Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, 9: 177-187.
- Lei, X., Zhang, F. & Zhang, J. (2023). Gut microbiota accelerates the insecticidal activity of plastid-expressed *Bacillus thuringiensis* Cry3Bb to a leaf beetle, *Plagiodesma versicolora*. *Microbiology Spectrum*, 11(2), e05049-22.
- Li, H., Liu, R., Shu, C., Zhang, Q., Zhao, S., Shao, G., Zhang, X. & Gao, J. (2014). Characterization of one novel cry8 gene from *Bacillus thuringiensis* strain Q52-7. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30, 3075-3080.
- López-López, H., De Santiago-Meza, J., Hernández-Alonso, E., Delgado-Ortiz, J. C., Castro-del Ángel, E. & Hernández-Juárez, A. (2023). Mecanismos de resistencia de poblaciones de maíz originarias de México al ataque del picudo *Sitophilus zeamais*. *Información Técnica Económica Agraria*, 119(3).
- Mahmoud, S. B., Ramos, J. E., Shatters Jr., R. G., Hall, D. G., Lapointe, S. L., Niedz, R. P., ... & Borovsky, D. (2017). Expression of *Bacillus thuringiensis* cytoytic toxin (Cyt2Ca1) in citrus roots to control *Diaprepes abbreviatus* larvae. *Pesticide biochemistry and physiology*, 136: 1-11.
- Martínez M., Y. M., Cerna C., E., González V., R., Facio P., F. & Morales A., D. (2011). Evaluación toxicológica de extractos vegetales sobre *Sitophilus zeamais* (Motschulsky) en laboratorio. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. p 20.
- Martínez P., A., Morales G., J. L. & Rodríguez G., S. (2015). Efecto de la temperatura y la humedad en el almacenamiento y la germinación de semillas de *Agave cupreata* y *A. ilnaequidens*. En: Martínez et al. Aspectos sobre manejo y conservación de agaves mezcaleros en Michoacán.

- Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. pp. 128-140.
- Meikle M. (1999). Potencial de extractos fraccionados de *Ocimum canum* (Lamiaceae) y *Laggera pterodonta* (Compositae) para la protección del maíz contra la infestación de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). Recuperado de: <https://www.researchgate.net/Life-cycle-of-Sitophilus-zeamais-Meikle-et-al-1999>.
- Méndez N., J. R., Merazo P., J. F. & Montaño M., N. J. (2008). Relación entre la tasa de imbibición y el porcentaje de germinación en semillas de maíz (*Zea mays L.*), caraota (*Phaseoulus vulgaris L.*) y quinchoncho (*Cajanum cajan* (L.) Mill.). *Revista UDO*. 8(1): 61.
- Meza G., J. L., Camacho B., J. R. & Cortes M., E. (2008). Principales plagas de granos almacenados. Laboratorio de Bioinsecticidas Departamento Agropecuario. CIIDIR IPN Unidad Sinaloa. pp. 128-129.
- Montgomery, D. C. (2013). Diseño y análisis de experimentos. México: Limusa.
- Nwosu, L. C. (2016). Chemical bases for maize grain resistance to infestation and damage by the maize weevil, *Sitophilus zeamais* Motschulsky. *Journal of Stored Products Research* 69: 41-50.
- Ochoa C., C. (2011). Análisis de las interacciones moleculares de la toxina Cry3Aa de *Bacillus thuringiensis* en la membrana del epitelio intestinal de *Leptinotarsa decemlineata* (escarabajo de la patata). Departamento de Genética. Universidad de Valencia. Tesis Doctoral. 205 págs.
- Ojo, J. A. & Omoloye, A. A. (2016). Desarrollo e historia de vida de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) en cultivos de cereales. *Avances en Agricultura*, 1–8.
- Oliveira, G. R., Silva, M. C., Lucena, W. A., Nakasu, E. Y., Firmino, A. A., Beneventi, M. A., Souza, D. S., Gomes, J. E., de Souza, J. D. & Rigden, D. J. (2011). Improving Cry8Ka toxin activity towards the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). *BMC Biotechnology*, 11: 85.
- Oona, D. (2016). Insectos en granos y productos almacenados. Universidad central de Venezuela. Facultad de agronomía. Departamento de zoología agrícola. p. 6.
- Oppert, B., Ellis, R. T. & Babcock, J. (2010). Effects of Cry1F and Cry34Ab1/35Ab1 on storage pests. *Journal of Stored Products Research*, 46(3): 143-148.

- Orchardson E. (2020). Granos enteros. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). <https://www.cimmyt.org/es/noticias/granos-enteros/>.
- Palafox-Caballero, A., Sierra-Macías, M., Espinosa-Calderón, A., Rodríguez-Montalvo, F. & Becerra-León, F. (2008). Tolerancia a infestación por gorgojos (*Sitophilus spp.*) en genotipos de maíz comunes y de alta calidad proteínica. *Agronomía Mesoamericana* 19: 39-46.
- Palma, L., Muñoz, D., Baya, C., Murillo, J. & Caballero, P. (2014) Toxinas de *Bacillus thuringiensis*: una visión general de su actividad biocida. *Toxinas*, 6: 3296–3325.
- Pardo-López, L., Soberón, M. & Bravo, A. (2013). *Bacillus thuringiensis* insecticida de tres dominios Cry toxinas: modo de acción, resistencia a insectos y consecuencias para la protección de cultivos. *FEMS Microbiology Reviews*, 37: 3–22.
- Park, H. W., Federici, B. A. & Sakano, Y. (2006). Inclusion proteins from other insecticidal bacteria. *Inclusions in prokaryotes*, Springer: Berlín/Heidelberg, Alemania. pp 321-330.
- Park, Y., Abdullah, M. A. F., Taylor, M. D., Rahman, K. & Adang, M. J. (2009). Enhancement of *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa and Cry3Bb toxicities to coleopteran larvae by a toxin-binding fragment of an insect cadherin. *Applied and environmental microbiology*, 75(10): 3086-3092.
- Patiño R., A. D., Sinuco L., D. C. & Prieto R., J. A. (2019). Control de insectos de granos almacenados mediante volátiles provenientes de bacterias marinas del caribe colombiano. Universidad Nacional de Colombia. p 28.
- Pedrini, N., Dall B., G. M., Padín S., B. & Juarez M., P. (2011). Capacidad insecticida de *Beauveria bassiana* cultivada en hidrocarburos para control de coleópteros en granos almacenados. *Agrociencia - Uruguay*, 15(1), 64–69.
- Pereira, A. E., Huynh, M. P., Sethi, A., Miles, A. L., Wade F., B., Ellersieck, M. R., Coudron, A., Shelby, K. S. & Hibbard, B. E. (2020). Baseline susceptibility of a laboratory strain of northern corn rootworm, *Diabrotica barberi* (Coleoptera: Chrysomelidae) to *Bacillus thuringiensis* traits in seedling, single plant, and diet-toxicity assays. *Journal of Economic Entomology*, 113(4), 1955-1962.
- Perlak, F., Piedra, T., Muskopf, Y., Petersen, L., Parker, G., McPherson, S., Wyman, J., Amor, S., Caña, G. & Biever, D. (1993). Papas mejoradas genéticamente: protección contra el daño causado por los escarabajos de la papa de Colorado. *Plant Molecular Biology*, 22: 313–321.

- Piedra-Buena D., A., Parrilla-González, M. & Perera-González, S. (2019). Evaluación de la eficacia de productos comerciales en base a hongos entomopatógenos para el control de la cochinilla del aguacate (*Nipaecoccus nipae* Maskell) en condiciones de semicampo. Informe Técnico Nº 6. Instituto Canario de Investigaciones Agrarias. 15 p.
- Pingali, P. L. & Pandey, S. (2001). World maize needs meeting: Technological opportunities and priorities for the public sector. In: Pingali, P. L. (ed.). CIMMYT 1999-2000. World maize facts and trends. meeting world maize needs: Technological opportunities and priorities for the public sector. Centro Internacional para el Mejoramiento de Maíz y Trigo. El Batán, Estado de México, México.
- Pradera, C. (2014). El desinsectador y desratizador. In <https://desinsectador.com/2014/03/01/avispilla-parasita-anisopteromalus-calandrae-hyennoptera-pteromalidae/> [Consultado agosto, 2023].
- Preston, J., Tatematsu, K., Kanno, Y., Hobo, T., Kimura, M. & Jikumaru, Y. (2009). Temporal expression patterns of hormone metabolism genes during imbibition of *Arabidopsis thaliana* seeds: a comparative study on dormant and non-dormant accessions. *Plant and Cell Physiology*, 50: 1786-1800.
- Ramos R., O., Campbell J., F. & Ramaswamy S., B. (2007). Efficacy of the entomopathogenic nematode *Steinernema riobrave* against the stored product insect pests *Tribolium castaneum* and *Plodia interpunctella*. *Biological Control*, 40: 15–21.
- Ranum, P., Peña-Rosas, J. P. & Garcia-Casal, M. N. (2014). Global maize production, utilization, and consumption. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1312: 105–112.
- Rausell, C., García-Robles, I., Sánchez, J., Muñoz-Garay, C., Martínez-Ramírez, A. C., Real, M. D. & Bravo, A. (2004). Role of toxin activation on binding and pore formation activity of the *Bacillus thuringiensis* Cry3 toxins in membranes of *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1660(1-2): 99-105.
- Raya P., J. C., Aguirre M., C. L., Covarrubias P., J., Ramírez P., J. G. & Iturriaga G. (2020). El osmoacondicionamiento de las semillas agrícolas. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 8(1): 1-8.
- Reddy, D. B. (1951). Determination of sex in adult rice and granary weevils (Coleoptera: Curculionidae). *The Pan-Pacific Entomologist* 27: 113-116.
- Rodríguez, C. A. & Iannacone, J. (2012). Resistencia de granos almacenados de cultivares de maíz amarillo duro a *Sitophilus zeamais* Mostchulsky, 1855

- (Coleoptera: Curculionidae) en el Perú. *Revista Peruana de Entomología*. 47: 1.
- Rodríguez-Cobos, C., Haubrige, E., Gaspar, C. (1990). Sensibilité des grains de plusieurs variétés de blé, *Triticum aestivum* L. vis-à-vis du charançon du blé, *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Belgique: Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen, Rijksuniversiteit Gent*, 55(2a).
- Rodríguez-González, A., Porteous-Álvarez, A. J., Guerra, M., González-López, O., Casquero, P. A. & Escriche, B. (2021). Effect of Cry toxins on *Xylotrechus arvicola* (Coleoptera: Cerambycidae) larvae. *Insects*, 13(1): 27.
- Rosas G., N. M. (2014). *Bacillus thuringiensis*: una aplicación de la ciencia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, XVI (2): 5-6.
- Ruiz R., C. (2015). Mecanismo Molecular de Acción del Sistema de Quorum Sensing NprR-NprB en la Esporulación de *Bacillus thuringiensis*.
- SADER, Secretaría de Desarrollo Rural. (2021). Producción de maíz en México. <https://www.gob.mx/agricultura/prensa/estima-agricultura-crecimiento-de-2-6-por-ciento-en-la-produccion-de-maiz-grano-en-ano-agricola-2021>.
- SAGARPA-SIAP. (2014). Situación actual del maíz al 31 de marzo de 2014. http://www_siap.gob.mx/agrresumen-nacional-por-cultivo.
- Sánchez, J. A., Orta, R. & Muñoz, B. C. (2001). Tratamientos pregerminativos de hidratación-deshidratación de las semillas y sus efectos en plantas de interés agrícola. *Agronomía Costarricense*, 25(1): 67-91.
- SAS, Institute (2002). The SAS® System for Windows® (Version 9.3). Statistical Analysis System Institute Inc. Cary, N.C., U.S.A. 4424 p.
- Sattar, S. & Maiti, M. K. (2011). Molecular characterization of a novel vegetative insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis* effective against sap-sucking insect pest. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(9): 937-946.
- SIAP, (2022). Maíz, frijol, arroz y trigo, los granos básicos de México. Los granos básicos están considerados como alimentos indispensables para garantizar la seguridad alimentaria. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/maiz-frijol-arroz-y-trigo-los-granos-basicos-de-mexico>.
- Sha, J., Zhang, J., Chi, B., Liu, R., Li, H. & Gao, J. (2018). Gen *sip1Ab* de una cepa nativa de *Bacillus thuringiensis* QZL38 y su actividad insecticida

- contra *Colaphellus bowringi* Baly. *Biocontrol Science and Technology* 28: 459–467.
- Shrestha, R. B., Dunbar, M. W., French, B. W. & Gassmann, A. J. (2018). Effects of field history on resistance to Bt maize by western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae). *PLoS One*, 13(7): e0200156.
- Shu, C., Liu, R., Wang, R., Zhang, J., Feng, S., Huang, D. & Song, F. (2007). Improving toxicity of *Bacillus thuringiensis* strain contains the *cry8Ca* gene specific to *Anomala corpulenta* larvae. *Current Microbiology*, 55(6): 492-496.
- Shu C., Yan G., Wang R., Zhang J., Feng S., Huang D. & Song F. (2009). Characterization of a novel *cry8* gene specific to Melolonthidae pests: *Holotrichia oblita* and *Holotrichia parallela*. *Applied microbiology and biotechnology*, 84: 701-7.
- Sick, A. J., Gaerter, F. & Wong, A. (1990). Nucleotide sequence of a coleopteran active toxin gene from a new isolate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tolworthi*. *Nucleic Acids Research*, 18(5): 1305.
- Singh, S. K., Jagadeesan, R., Thangaraj, S. R., Selvapandian, U., Nayak, M. K. & Subbarayalu, M. (2021). Phenotypic and molecular analyses in rice weevil, *Sitophilus oryzae* (Linnaeus) (Coleoptera: Curculionidae): identification of a super kdr mutation, T929I, conferring resistance to deltamethrin. *Pest Management Science*, 77(7): 3289-3299.
- Skendžić, S., Zovko, M., Živković, I. P., Lešić, V. & Lemić, D. (2021). The impact of climate change on agricultural insect pests. *Insects*, 12(5): 440.
- Skoková Habuštová, O., Svobodová, Z., Kodrík, D., & Sehnal, F. (2022). Cry3Aa toxin is not suitable to control Lepidopteran pest *Spodoptera littoralis* (Boisd.). *Plants*, 11(10): 1312.
- Soberón, M., López-Díaz, J. A. & Bravo, A. (2013). Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*: a protein fold conserved in several pathogenic microorganisms. *Peptides*, 41: 87-93.
- Song, P., Wang, Q., Nangong, Z., Su, J. & Ge, D. (2012). Identification of *Henosepilachna vigintioctomaculata* (Coleoptera: Coccinellidae) midgut putative receptor for *Bacillus thuringiensis* insecticidal Cry7Ab3 toxin. *Journal of Invertebrate Pathology*, 109(3): 318-322.
- Thornton, M. (2004). El auge y la caída de las papas. New Leaf. *Representación NABC*, 15: 235–243.

- Timothy, M. N., Xuguo, Z., Lance, J. M., Ty, V. & Blair, D. S. (2006). Efecto de la proteína *Bacillus thuringiensis* Cry3Bb1 en el comportamiento alimentario y la longevidad de los gusanos adultos de la raíz del maíz occidental (Coleoptera: Chrysomelidae), *Revista de Entomología Económica*, 99, (3): 927-930.
- Vallejo, F. & Estrada, E. (2002) Mejoramiento genético de plantas. Universidad Nacional de Colombia. DIPAL. Palmira, Colombia. 404 p.
- Valle-Moysén, R., Covarrubias-Prieto, J., Ramírez-Pimentel, J. G., Aguirre-Mancilla, C. L., Iturriaga de la Fuente, G. & Raya-Pérez, J. C. (2017a). Osmocondicionamiento de semilla de maíz pigmentado (*Zea mays* L.) Bofo y Celaya. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 8(5): 1073-1086.
- Valle-Moysén, R., Covarrubias-Prieto, J., Ramírez-Pimentel, J. G., Aguirre-Mancilla, C. L., Iturriaga de la Fuente, G. & Raya-Pérez, J. C. (2017b). Efecto del osmocondicionamiento sobre la germinación del maíz tipo Palomero. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 8(2): 307-319.
- Van-Frankenhuyzen, K. (2009.). Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *Journal Invertebrate Pathology*, 101: 1–16.
- Vaughn, T., Cavato, T., Brar, G., Coombe, T., DeGooyer, T., Ford, S., Groth, M., Howe, A., Johnson, S. & Kolacz, K. (2005). A method of controlling corn rootworm feeding using a *Bacillus thuringiensis* protein expressed in transgenic maize. *Crop Science*, 45(3): 931-938.
- Xu, S., Zhang, Y., Li, S., Chang, L., Wu, Y. & Zhang, J. (2020). Plastid-expressed *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) cry3Bb confers high mortality to a leaf eating beetle in poplar. *Plant cell reports*, 39: 317-323.
- Yamaguchi, T., Sahara, K., Bando, H. & Asano, S. (2008). Discovery of a novel *Bacillus thuringiensis* Cry8D protein and the unique toxicity of the Cry8D-class proteins against scarab beetles. *Journal of invertebrate pathology*, 99(3): 257-262.
- Yan, D., Duermeyer, L., Leoveanu, C. & Nambara, E. (2014). Functions of endosperm during seed germination. *Plant Cell Physiology*, 55(9): 1521-1533.
- Yu, Y., Yuan, Y. & Gao, M. (2016). Construction of an environmental safe *Bacillus thuringiensis* engineered strain against Coleoptera. *Applied microbiology and biotechnology*, 100: 4027-4034.
- Zelaya M., L. X., Chávez D., I. F., De los Santos V., S., Cruz C., C. I., Ruíz R., S. & Rojas A., E. (2022). Control biológico de plagas en la agricultura mexicana. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 13: 69-79.

- Zhang, F., Yu, J., Johnston, C. R., Wang, Y., Zhu, K., Lu, F., Zhang, Z. & Zhou, J. (2015). Seed priming with polyethylene glycol induces physiological changes in sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) seedlings under suboptimal soil moisture environments. *PLoS ONE* 10(10).
- Zukoff, S. N., Ostlie, K. R., Alfarero, B., Meihls, L. N., Zukoff, A. L., Francés, L., Ellersieck, M. R., Francés, B. W. & Hibbard B. E. (2016). Múltiples ensayos indican diferentes niveles de resistencia cruzada en poblaciones de campo seleccionadas por Cry3Bb1 del gusano de la raíz del maíz occidental a mCry3A, eCry3.1Ab y Cry34/35Ab1. *Journal of Economic Entomology*, 109, 1387-1398.
- Zukoff, S. N., Ostlie, K. R., Potter, B., Meihls, L. N., Zukoff, A. L., French, L., ... & Hibbard, B. E. (2016). Multiple assays indicate varying levels of cross resistance in Cry3Bb1-selected field populations of the western corn rootworm to mCry3A, eCry3. 1Ab, and Cry34/35Ab1. *Journal of economic entomology*, 109(3): 1387-1398.
- Zúñiga-Navarrete, F., Gómez, I., Peña, G., Bravo, A., & Soberón, M. (2013). A *Tenebrio molitor* GPI-anchored alkaline phosphatase is involved in binding of *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa to brush border membrane vesicles. *Peptides*, 41: 81-86.

ANEXOS

Artículo enviado a Acta agronómica titulado “Eficacia de la toxina Cry3Aa para la supresión de *Sitophilus zeamais* Motschulsky en granos de maíz osmoacondicionados”.

[ACAG] Acuse de recibo del envío

JT

Joel Tupac Otero Ospina vía Por... Ayer
Para Tú, Hernández-Juárez, A., + 3

⋮

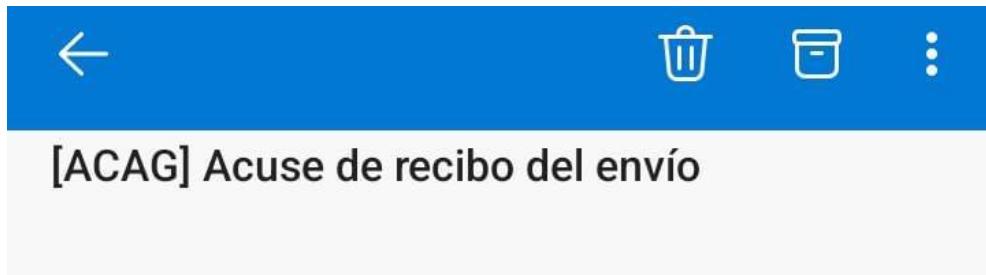
Hola,

miriam sanchez-vega ha enviado el manuscrito "Eficacia de la toxina Cry3Aa para la supresión de *Sitophilus zeamais* Motschulsky en granos de maíz osmoacondicionados." a Acta Agronómica.

Si tiene cualquier pregunta no dude en contactarme. Le agradecemos que haya elegido esta revista para dar a conocer su obra.

Joel Tupac Otero Ospina
Acta Agronómica

Artículo enviado a Acta agronómica titulado “Efecto de toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* Berliner sobre *Sitophilus zeamaiz* M. (Coleoptera: Curculionidae) en semillas de maíz”



Hola,

miriam sanchez-vega ha enviado el manuscrito "Efecto de toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* Berliner sobre *Sitophilus zeamaiz* M. (Coleoptera: Curculionidae) en semillas de maíz" a Acta Agronómica.

Si tiene cualquier pregunta no dude en contactarme. Le agradecemos que haya elegido esta revista para dar a conocer su obra.

Joel Tupac Otero Ospina
Acta Agronómica