



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN FITOSANIDAD

ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

LÍNEA BASE DE SUSCEPTIBILIDAD DE LARVAS DE *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) A FORMULACIONES COMERCIALES DE *Bacillus thuringiensis* (Berliner)

MARIA DEL CARMEN LARA BECERRA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2017

La presente tesis titulada: **LÍNEA BASE DE SUSCEPTIBILIDAD DE LARVAS DE *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) A FORMULACIONES COMERCIALES DE *Bacillus thuringiensis* (Berliner)**, realizada por la alumna: **María del Carmen Lara Becerra**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

FITOSANIDAD

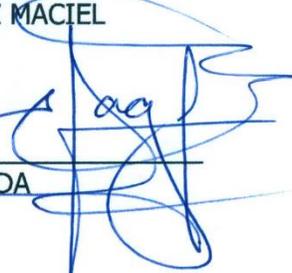
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

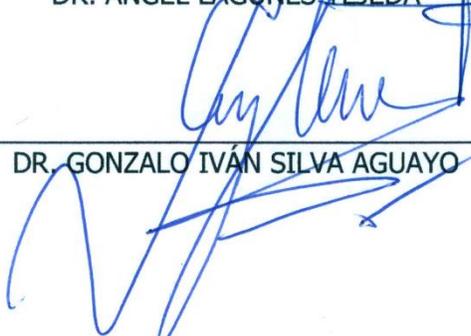
CONSEJERO:


DR. J. CONCEPCIÓN RODRÍGUEZ MACIEL

ASESOR:


DR. ÁNGEL LAGUNES TEJEDA

ASESOR:


DR. GONZALO IVÁN SILVA AGUAYO

Montecillo, Texcoco, Estado de México, junio de 2017.

LÍNEA BASE DE SUSCEPTIBILIDAD DE LARVAS DE *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) A FORMULACIONES COMERCIALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER)

María del Carmen Lara Becerra, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2017

RESUMEN

Spodoptera frugiperda (J. E. Smith) es una de las plagas más importantes del maíz en México, debido a las pérdidas económicas que ocasiona. Su combate se realiza con insecticidas convencionales cuyas desventajas están orientando esfuerzos al uso de insecticidas con menos impacto al ambiente y a la salud humana, tal es el caso de *Bacillus thuringiensis*. En el presente trabajo se determinó la susceptibilidad de poblaciones de *S. frugiperda* procedentes de Chihuahua, Coahuila, Durango, Sinaloa, Sonora y Tamaulipas a las formulaciones comerciales de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) XenTari[®] DF y Dipel[®] DF. Se realizaron bioensayos de capa y a los siete días de exposición se evaluó el porcentaje de mortalidad, porcentaje de inhibición de peso (PIP) y porcentaje de larvas que llegaron al tercer instar (PLTI). Los valores de la CL₅₀ para XenTari[®] DF variaron de 82.5 a 246.1 ng.cm⁻² y la CL₉₅ varió de 975.4 a 4,024 ng.cm⁻². Para Dipel[®] DF, la CL₅₀ estuvo entre 50.8 y 857.2 ng.cm⁻² y la CL₉₅ entre 2,973 y 31,944 ng.cm⁻². El PIP con XenTari[®] DF varió de 9.4 a 99.9 % y de 14.6 a 99.9 % con Dipel[®] DF. El PLTI tanto con XenTari[®] DF como Dipel[®] DF varió de cero a 100 % a la dosis de 2,487.37 a 0.25 ng.cm⁻², respectivamente. Se considera que las poblaciones de *S. frugiperda* evaluadas son susceptibles a las dos formulaciones de *Bt*.

Palabras clave: Bioinsecticidas, bioensayo, CL₅₀, CL₉₅, susceptibilidad.

**BASELINE SUSCEPTIBILITY OF LARVAS OF *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH)
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) TO COMMERCIAL FORMULATIONS OF *Bacillus
thuringiensis* (BERLINER)**

María del Carmen Lara Becerra, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2017

ABSTRACT

Spodoptera frugiperda (J. E. Smith) is one of the most important pests of maize in Mexico, due to the economic losses it causes. Its combat is carried out with conventional insecticides whose disadvantages are directing efforts to the use of insecticides with less impact to the environment and to human health, such as *Bacillus thuringiensis*. In the present work the susceptibility of *S. frugiperda* populations from the states of Chihuahua, Coahuila, Durango, Sinaloa, Sonora and Tamaulipas to the commercial formulations of *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) XenTari® DF and Dipel® DF were determined. Layer bioassays were performed and at seven days of exposure the percentage of mortality, percentage of inhibition of weight (PIP) and percent of larvae that reached the third instar (PLTI) were evaluated. LC₅₀ values for XenTari® DF ranged from 82.5 to 246.1 ng.cm⁻² and LC₉₅ ranged from 975.4 to 4.024 ng.cm⁻². For Dipel® DF, the LC₅₀ was between 50.8 and 857.2 ng.cm⁻² and the LC₉₅ was between 2,973 and 31,944 ng.cm⁻². PIP with XenTari® DF ranged from 9.4 to 99.9 % and from 14.6 to 99.9 % with Dipel® DF. PLTI with both XenTari® DF and Dipel® DF ranged from zero to 100 % at the dose of 2,487.37 to 0.25 ng.cm⁻², respectively. The populations of *S. frugiperda* evaluated are considered susceptible to the two formulations of *Bt*.

Key words: bioinsecticides, bioassay, LC₅₀, LC₉₅, susceptibility.

DEDICATORIA

A mis padres, Rubén Lara García y Elia Becerra Hernández por su apoyo incondicional.

A mis hermanos Rubén, Laura, Rosa, Juana, Miguel, Jorge Luis y Manuel por su apoyo y motivación.

A Vicente por su cariño, apoyo incondicional, confianza, paciencia y motivación.

A mis amigos.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme permitido llegar hasta este momento y realizar una meta más en mi vida.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento otorgado para la realización de mis estudios de maestría.

Al Colegio de Postgraduados por haberme brindado la oportunidad de pertenecer a dicha institución y seguir con mi desarrollo profesional.

Al Dr. J. Concepción Rodríguez Maciel, por su contribución en mi formación profesional, por su valioso apoyo y tiempo brindado, sus consejos y la confianza para la realización de este trabajo.

Al Dr. Ángel Lagunes Tejeda y al Dr. Gonzalo Iván Silva Aguayo por formar parte de mi consejo particular, a quienes agradezco su apoyo y colaboración para la realización de este trabajo.

Al Dr. Néstor Bautista Martínez por formar parte de mi jurado examinador.

Al personal del laboratorio de Toxicología de Insecticidas, a quienes agradezco su apoyo brindado.

A todas aquellas personas que de alguna manera contribuyeron para la realización de este trabajo.

GRACIAS

CONTENIDO

RESUMEN.....	iii
ABSTRACT.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE CUADROS.....	x
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
2.1. Objetivo general.....	4
2.2. Objetivo particular.....	4
3. HIPÓTESIS.....	4
4. REVISION DE LITERATURA.....	5
4.1. Importancia del cultivo de maíz en México.....	5
4.2. Gusano cogollero, <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. Smith).....	6
4.2.1. Posición taxonómica.....	6
4.2.2. Origen y distribución geográfica.....	6
4.2.3. Hospederos.....	7
4.2.4. Importancia y daños que ocasiona.....	7
4.2.5. Descripción y ciclo de vida.....	8
4.2.5.1. Huevo.....	8
4.2.5.2. Larva.....	9
4.2.5.3. Pupa.....	9
4.2.5.4. Adulto.....	10
4.3. <i>Bacillus thuringiensis</i> (Berliner).....	11
4.3.1. Historia de <i>Bacillus thuringiensis</i>	11
4.3.2. Descripción de <i>Bacillus thuringiensis</i>	12
4.3.3. Taxonomía y clasificación de <i>Bacillus thuringiensis</i>	13
4.3.4. Toxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	14
4.3.5. Clasificación de las δ -endotoxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	16
4.3.6. Mecanismo de acción de las δ -endotoxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	19
4.3.7. Desarrollo de resistencia de los insectos a <i>Bacillus thuringiensis</i>	20
4.3.7.1. Resistencia cruzada de los insectos a <i>Bacillus thuringiensis</i>	22

4.3.8. Formulaciones de <i>Bacillus thuringiensis</i>	24
4.3.9. Ventajas y limitaciones del uso de <i>Bacillus thuringiensis</i>	25
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
5.1. Ubicación del experimento.....	27
5.2. Poblaciones	27
5.3. Cría.....	29
5.4. Formulaciones comerciales de <i>Bacillus thuringiensis</i>	30
5.5. Bioensayos	31
5.6. Análisis estadístico.....	32
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
6.1. Mortalidad.....	34
6.2 Inhibición del peso.....	43
6.3. Larvas que llegaron al tercer instar	48
7. CONCLUSIONES.....	51
8. LITERATURA CITADA	52

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Mapa de distribución de *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith.....7
- Figura 2. Filograma de las proteínas Cry y Cyt de *Bacillus thuringiensis*.....18

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Procedencia de las poblaciones de <i>Spodoptera frugiperda</i> J. E. Smith evaluadas.	28
Cuadro 2. Formulaciones comerciales de <i>Bacillus thuringiensis</i>	30
Cuadro 3. Mortalidad de larvas neonatas de <i>Spodoptera frugiperda</i> J. E. Smith procedentes de Chihuahua, Coahuila, Durango, Sinaloa, Sonora y Tamaulipas, expuestas durante siete días a XenTari® DF.	35
Cuadro 4. Mortalidad de larvas neonatas de <i>Spodoptera frugiperda</i> J. E. Smith procedentes de Chihuahua, Coahuila, Durango, Sinaloa, Sonora y Tamaulipas, expuestas durante siete días a Dipel® DF.	37
Cuadro 5. Porcentaje de inhibición de peso respecto al testigo sin tratar de larvas neonatas de <i>Spodoptera frugiperda</i> J. E. Smith procedentes de Chihuahua, Coahuila, Durango, Sinaloa, Sonora y Tamaulipas, expuestas durante siete días a XenTari® DF.	45
Cuadro 6. Porcentaje de inhibición de peso respecto al testigo sin tratar de larvas neonatas de <i>Spodoptera frugiperda</i> J. E. Smith procedentes de Chihuahua, Coahuila, Durango, Sinaloa, Sonora y Tamaulipas, expuestas durante siete días a Dipel® DF.	46
Cuadro 7. Porcentaje de larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> J. E. Smith que llegaron al tercer instar procedentes de Chihuahua, Coahuila, Durango, Sinaloa, Sonora y Tamaulipas, expuestas durante siete días a Xentari® DF.	49
Cuadro 8. Porcentaje de larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> J. E. Smith que llegaron al tercer instar procedentes de Chihuahua, Coahuila, Durango, Sinaloa, Sonora y Tamaulipas, expuestas durante siete días a Dipel® DF.	50

1. INTRODUCCIÓN

En México, el maíz (*Zea mays* L.), es el cultivo más importante, tanto por superficie sembrada como por volumen de producción (SAGARPA, 2013). La superficie sembrada de maíz para grano de temporal como de riego en 2016 fue de 7.7 millones de hectáreas, con una producción de 28.2 millones de toneladas y un valor de 99.7 millones de pesos (SIAP, 2017). El gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) se considera la plaga más severa de este cultivo (SAGARPA-SENASICA-SEDEREC, 2009; Blanco *et al.*, 2014), debido a que ocasiona pérdidas económicas que van del 13 al 60 % (SAGARPA-SENASICA-SEDEREC, 2009).

Los insecticidas químicos convencionales representan la principal alternativa para el control de esta plaga en campo (Del Rincón *et al.*, 2006; Blanco *et al.*, 2010), se estima que, en nuestro país, anualmente se aplican aproximadamente 3,000 toneladas de ingrediente activo en dos a tres aplicaciones que se realizan por ciclo de cultivo (Blanco *et al.*, 2014). Sin embargo, debido el desarrollo de la resistencia, alto costo de estos insumos y sus efectos adversos al ambiente han llevado a la búsqueda de nuevas alternativas de control de la plaga (Orduz, 1992; Sauka y Benintende, 2008).

Una alternativa a los insecticidas sintéticos son los bioinsecticidas a base de proteínas de *Bt* (Nava *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2015; Herrero *et al.*, 2016), los cuales se han utilizado con éxito durante muchos años (Raymond *et al.*, 2010).

Bacillus thuringiensis es una bacteria habitante del suelo que se caracteriza por producir un cuerpo paraesporal conocido como cristal durante su fase de esporulación y contiene una o más

proteínas (también conocidas como δ -endotoxinas) con actividad insecticida (Fernández y Vega, 2002; Soberón y Bravo, 2007; Sanahuja *et al.*, 2011). Desde su descubrimiento ha sido ampliamente utilizada para el control de insectos plaga importantes en la agricultura, la silvicultura y la medicina (Nava *et al.*, 2012). Esta bacteria produce una amplia gama de proteínas activas contra una variedad de especies plagas de los órdenes Lepidoptera (incluyendo *Spodoptera* spp.), Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Hemiptera y Blattaria (Herrero *et al.*, 2016).

Sin embargo, existen nuevas tecnologías como el uso de cultivos transgénicos (cultivos *Bt*), que expresan las proteínas insecticidas de *Bt*, los cuales han sido una herramienta útil en el manejo de plagas durante los últimos 20 años (Blanco *et al.*, 2016). Existen plantas transgénicas de maíz que expresan los genes de *Bt*, que codifican para algunas endotoxinas con actividad hacia *S. frugiperda* (Del Rincón *et al.*, 2006). Aunque, durante las primeras etapas de la comercialización de los cultivos *Bt* se reconoció que, dado que los cultivos *Bt* y los plaguicidas *Bt* pueden contener las mismas proteínas o que estas comparten los mismos sitios de unión en el intestino del insecto, existe la posibilidad de resistencia cruzada a los insecticidas *Bt* en insectos que desarrollen resistencia a los cultivos *Bt* (Federici, 1998), eliminando no sólo la posibilidad de seguir utilizando a estos como medidas de control de plagas, sino también predisponiendo a las plagas al uso de los productos a base de *Bt* (Ibarra y Del Rincón, 2015). La resistencia cruzada a los plaguicidas *Bt* reduce las opciones de control de *S. frugiperda*, especialmente para la agricultura orgánica que dependen en gran medida de los plaguicidas *Bt* para su control (Jakka *et al.*, 2014).

Actualmente el uso de formulaciones comerciales a base de proteínas de *Bt* contra el gusano cogollero es bajo debido al costo que se tiene al usuario y al moderado nivel de control en campo. Sin embargo, se espera que con el tiempo este escenario cambie. En México, las estrategias en

campo se están orientando hacia el combate de larvas neonatas mucho antes de que lleguen al cogollo de la planta de maíz. Este criterio permitirá incrementar sustancialmente la eficacia biológica de las formulaciones de *Bt*. Por tanto, se espera que su uso aumente y por ende también el riesgo de resistencia. Además, en los lugares de procedencia de las poblaciones evaluadas, es probable que en el futuro cercano se autorice el cultivo de maíz *Bt* que expresa una o varias proteínas de *Bt* efectivas contra el gusano cogollero. Algunas de esas proteínas también son componentes importantes de las formulaciones comerciales. Por tanto, el objetivo de la presente investigación consistió en determinar la variación actual de la respuesta a dos formulaciones comerciales de *Bt* (XenTari[®] DF y Dipel[®] DF) en poblaciones de *S. frugiperda* procedentes de los estados de Chihuahua, Coahuila, Durango, Sinaloa, Sonora y Tamaulipas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

- ❖ Determinar la variación actual de la respuesta a las formulaciones comerciales de *Bt* XenTari[®] DF y Dipel[®] DF en poblaciones de *Spodoptera frugiperda* procedentes de los estados de Chihuahua, Coahuila, Durango, Sinaloa, Sonora y Tamaulipas.

2.2. Objetivo particular

- ❖ Evaluar la susceptibilidad de diferentes poblaciones de *Spodoptera frugiperda* a las formulaciones comerciales de *Bt* XenTari[®] DF y Dipel[®] DF.

3. HIPÓTESIS

- ❖ Las poblaciones de *Spodoptera frugiperda* son susceptibles a las formulaciones comerciales de *Bt* XenTari[®] DF y Dipel[®] DF.

4. REVISION DE LITERATURA

4.1. Importancia del cultivo de maíz en México

México es el centro de origen y domesticación del maíz y el quinto mayor productor de este grano en el mundo, ocupando más del 6 % de su superficie arable, lo que representa una tercera parte de la producción agrícola interna (Blanco *et al.*, 2014). A nivel nacional es el principal cultivo, tanto por superficie sembrada como por volumen de producción (SAGARPA, 2013), además de la importancia alimentaria, social y cultural (González y Ávila, 2014). Es un cultivo que se siembra en todos los estados y en casi todos los climas y altitudes. Se siembran diversas variedades y se consume de distintas formas. Desde la perspectiva productiva se ubica como el principal cultivo en comparación con el sorgo, trigo, cebada, arroz y avena, los cereales más cultivados en el territorio mexicano. El maíz grano representa el 85 % del volumen nacional de cereales y el 2.8 % de la producción mundial (SAGARPA, 2013). La superficie sembrada de maíz grano tanto de temporal como de riego en 2016 fue de 7.7 millones de hectáreas, con una producción de 28.2 millones de toneladas y un valor de 99.7 millones de pesos. (SIAP, 2017).

4.2. Gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)

4.2.1. Posición taxonómica

Reino.....Animalia
Phylum.....Arthropoda
Subphylum...Hexapoda
Clase.....Insecta
Orden.....Lepidoptera
Familia.....Noctuidae
Género.....Spodoptera
Especie.....*Spodoptera frugiperda*

(McLeod *et al.*, 2017)

4.2.2. Origen y distribución geográfica

Spodoptera frugiperda es una especie nativa de las regiones tropicales y subtropicales de América. Se encuentra distribuida en América del Norte: Canadá, Estados Unidos y México; América Central y el Caribe: Antigua y Barbuda, Bahamas, Barbados, Belice, Costa Rica, Cuba, El Salvador, Islas Caimán, Granada, Guatemala, Haití, Honduras, Jamaica, Martiniqués, Nicaragua, Panamá, República Dominicana, Puerto Rico, Santa Lucía y Trinidad y Tobago; América del Sur: Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Colombia, Ecuador, Guyana, Paraguay, Perú, Suriname, Uruguay y Venezuela y Europa: Alemania (sólo se ha reportado ocasionalmente). En 2016 se documentó por primera vez en el continente Africano en Benín, Nigeria y Sao Tomé, donde está causando daños significativos a los cultivos de maíz y tiene un gran potencial de dispersarse y causar daños económicos. A la fecha se ha confirmado en Ghana, Kenia, República Democrática del Congo, Suazilandia, Zambia y Zimbabwe y hay informes preliminares de la plaga en Malawi, Mozambique, Namibia y Sudáfrica (CABI, 2017).

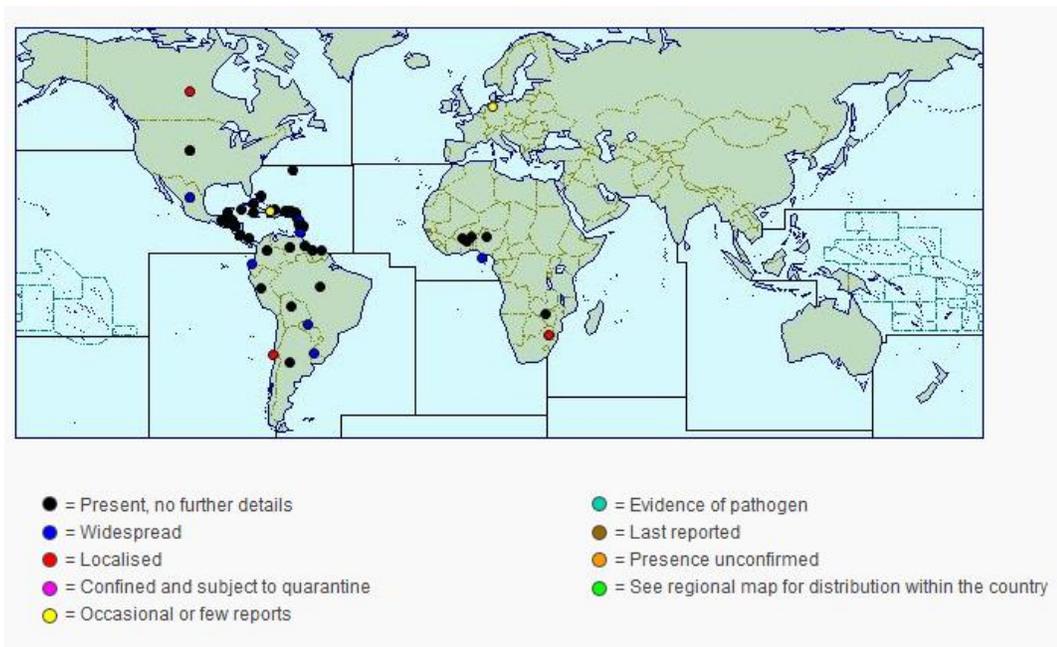


Figura 1. Mapa de distribución de *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith. Tomado de: CABI, 2017.

4.2.3. Hospederos

Spodoptera frugiperda es un insecto polífago (CABI, 2017), que ataca un total de 186 especies de 42 familias, con una clara preferencia por especies de la familia Poaceae (Casmuz *et al.*, 2010), principalmente maíz, arroz (*Oryza sativa* L.), sorgo (*Sorghum vulgare* Pers.) y caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) (CABI, 2017).

4.2.4. Importancia y daños que ocasiona

En México, *S. frugiperda* es considerada una de las plagas más severa del maíz, debido a los daños que ocasiona. En diversas entidades del país se registran pérdidas económicas que van del 13 hasta el 60 % (SAGARPA-SENASICA-SEDEREC, 2009; SAGARPA, 2012). Los daños

más severos corresponden a las zonas de temporal de regiones tropicales y subtropicales, pero su distribución es muy amplia, ocurriendo daños en todas las zonas productoras de maíz en el país (SAGARPA-SENASICA-SEDEREC, 2009).

Cuando las plantas de maíz son pequeñas un ataque severo de las larvas *de S. frugiperda* puede defoliarlas completamente (Casmuz *et al.*, 2010; SAGARPA, 2012) y/o destruir los puntos de crecimiento. Cuando las larvas migran hacia el cogollo el canibalismo a menudo las reduce a una o dos por planta (Saunders *et al.*, 1998). La zona del cogollo presenta excrementos, las hojas emergen desgarradas y, en algunos casos llegan a presentar trozos de tejido colgantes (SAGARPA, 2012). Las larvas más grandes también pueden actuar como cortadores y destruir las plantas hasta de un mes, debido a que realizan túneles en la parte interna del tallo (Saunders *et al.*, 1998). Sin embargo, si las plantas son atacadas en estados fenológicos avanzados pueden recuperarse de la defoliación llegando a una producción normal (Casmuz *et al.*, 2010; SAGARPA, 2012).

4.2.5. Descripción y ciclo de vida

4.2.5.1. Huevo

El huevo tiene forma de domo, la base es aplanada y curvado a ampliamente redondeado en el ápice; mide aproximadamente 0.4 mm de diámetro y 0.3 mm de longitud (Capinera, 2014). Los huevos son ovipositados en grupos de hasta 300 en ambos lados de la hoja y son cubiertos con escamas de color gris rosáceo del abdomen de la hembra (Saunders *et al.*, 1998). La producción total de huevos por hembra en promedio es de 1,500 y el número por masa varía considerablemente,

pero a menudo es de 100 a 200. La duración de esta etapa es de 2 a 3 días durante los meses de verano (Capinera, 2014).

4.2.5.2. Larva

La larva pasa por 5 a 6 instares, dependiendo de la temperatura y el tipo de alimento (Saunders *et al.*, 1998). La cápsula cefálica mide aproximadamente 0.35, 0.45, 0.75, 1.3, 2.0 y 2.6 mm, respectivamente para cada instar y una longitud de aproximadamente 1.7, 3.5, 6.4, 10.0, 17.2 y 34.2 mm, respectivamente. Las larvas son de color verde con la cabeza color negro y en el segundo instar se torna de color naranja. En el segundo, pero particularmente en el tercer instar la parte dorsal del cuerpo es marrón y comienzan a formarse líneas blancas en la parte lateral. Del cuarto al sexto instar la cabeza es de color marrón rojizo, moteada de blanco y el cuerpo marrón con líneas subdorsales y laterales blancas. Presenta manchas dorsales en el cuerpo, por lo general de color oscuro y con espinas (Capinera, 2014), pináculos dorsales negros y cuatro puntos negros en forma de cuadrado sobre el octavo segmento abdominal (Saunders *et al.*, 1998).

La duración de esta etapa es de aproximadamente 14 días en verano y 30 días en invierno. El tiempo promedio de desarrollo para cada instar es de 3.3, 1.7, 1.5, 1.5, 2.0 y 3.7 días, respectivamente a una temperatura de 25 °C (Capinera, 2014).

4.2.5.3. Pupa

Es de color café rojizo y mide 14 a 18 mm de longitud y aproximadamente 4.5 mm de ancho. Esta etapa normalmente se lleva a cabo en el suelo a una profundidad de 2 a 8 cm (Capinera,

2014), rara vez entre las hojas de la planta hospedera (Saunders *et al.*, 1998). La larva construye un cocón uniendo partículas de suelo con seda, donde se lleva a cabo la pupa (Capinera, 2014).

4.2.5.4. Adulto

El adulto tiene una expansión alar de 32 a 40 mm. En el macho, el ala anterior generalmente esta sombreada de color gris y marrón, con manchas blancas triangulares en la punta y cerca del centro. Las alas anteriores de la hembra tienen menos marcas distintivas, varían desde un color marrón grisáceo uniforme a un fino moteado de color gris y marrón. El ala posterior en ambos sexos es de color blanco plateada con un borde oscuro. Los adultos son de hábitos nocturnos. Después de un período de preoviposición de 3 a 4 días, la hembra normalmente deposita la mayor parte de los huevos durante los primeros 4 a 5 días de vida, pero la ovoposición puede ocurrir durante un máximo de 3 semanas. La duración de vida del adulto se estima que en promedio es de 10 días, con un rango de 7 a 21 días (Capinera, 2014).

El ciclo de vida completo tiene una duración de aproximadamente 30 días en verano, 60 días en primavera y otoño y 80 a 90 días en invierno. No presenta diapausa y el número de generaciones varía dependiendo del área (Capinera, 2014).

4.3. *Bacillus thuringiensis* (Berliner)

4.3.1. Historia de *Bacillus thuringiensis*

Fue descubierta en 1901 por el investigador japonés Shigetane Ishiwata, causando mortalidad a las colonias del gusano de seda (Ibarra y Del Rincón, 2015). Diez años más tarde en 1911, el científico alemán Ernst Berliner, redescubrió el agente causal de la muerte de las larvas de *Anagasta kuehniella* (Zeller), aquel mismo descrito por Ishiwata y lo nombró *Bacillus thuringiensis* por haberlo encontrado en Turingia, Alemania (Fernández y Vega, 2002; Rosas, 2014).

Bacillus thuringiensis es ahora el nombre aceptado para una serie de bacterias aeróbicas formadoras de esporas que producen un cristal tóxico contra insectos durante la fase de esporulación. Sin embargo, muchos bacteriólogos consideran que *B. thuringiensis* es una variante de *Bacillus cereus*, una bacteria ubicua del suelo (Milner, 1994).

Los agricultores comenzaron a utilizar esta bacteria a finales de 1920 y principios de 1930, pero se utilizó en forma limitada como agente de control de plagas, ésta fue relegada, primero por el surgimiento de la segunda guerra mundial y luego por los insecticidas sintéticos que eran altamente eficaces (Sanchis, 2011; Ibarra y Del Rincón, 2015). No fue sino hasta 1950 que Edward Steinhaus reinició su estudio, comprobando su gran potencial como agente de control de plagas y promoviendo su desarrollo industrial y comercial como bioinsecticida (Ibarra y Del Rincón, 2015) y, a mediados de los años 50's, Hannay y Fitz-James redescubrieron la inclusión paraesporal y demostraron que el cristal estaba compuesto de proteínas. Poco después Thomas Angus demostró que la actividad insecticida es causada por la inclusión paraesporal (Feitelson, 1993).

El primer insecticida a base de *Bt* surgió en Francia en 1938 con el nombre comercial de “Sporeine” (Ibrahim *et al.*, 2010; Rosas, 2014) y se usó principalmente para controlar la polilla de la harina (Ibrahim *et al.*, 2010). Sin embargo, a gran escala el primer producto fue puesto en venta en 1957 por la compañía Sandoz. Se trataba de una cepa de *Bt* var. *kurstaki* comercializada como Thuricide. Hasta ese momento, los investigadores generalmente pensaban que *Bt* comprendía un grupo muy limitado de microorganismos con un estrecho espectro de actividad contra algunas especies de lepidópteros (Feitelson, 1993). Sin embargo, con el tiempo muchos otros insecticidas surgieron para el control no sólo de lepidópteros, sino también de dípteros, coleópteros (Bravo *et al.*, 2007; Rosas, 2014), himenópteros y otros invertebrados como los nematodos (Bravo *et al.*, 2007).

Como la aplicación de los insecticidas sintéticos resultó en daños al ambiente y la resistencia de las plagas, el uso de los productos de *Bt* aumentó en los años 1960 y 1970 y, finalmente surgió como una alternativa altamente valiosa para el control de plagas (Sanchis, 2011).

4.3.2. Descripción de *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis es considerada una bacteria ubicua, se ha aislado de todas partes del mundo y de diversos hábitats, incluyendo suelo (Soberón y Bravo, 2007; Ansari *et al.*, 2013), agua, hojas e insectos muertos (Soberón y Bravo, 2007). Presenta células vegetativas en forma de bastoncillos agrupados en cadenas de 2 a 3 (Fernández y Vega, 2002). Es una bacteria gram-positiva, aerobia estricta, que durante su ciclo de vida presenta dos fases principales: crecimiento vegetativo, donde las bacterias se duplican por bipartición y esporulación, que es la diferenciación de bacteria a espora (Soberón y Bravo, 2007). Se le caracteriza por producir cuerpos paraesporales

en forma de cristales durante su fase de esporulación. Estos son de naturaleza proteica y tiene propiedades insecticidas (Fernández y Vega, 2002; Soberón y Bravo, 2007), pueden ser de forma bipyramidal, romboide, cuadrada o amorfa y su toxicidad es muy variada y depende del tipo de cristal (Fernández y Vega, 2002).

4.3.3. Taxonomía y clasificación de *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis pertenece a la familia Bacillaceae y se ubica dentro del grupo del género *Bacillus*, forma parte del grupo de *B. cereus*, el que incluye a *B. anthracis* y *B. mycoides*, así como también a *B. pseudomycoides* y *B. weihenstephanensis* (Sauka y Benintende, 2008).

Para la clasificación de *B. thuringiensis* se han usado varios métodos. Los primeros se basaron en la caracterización morfológica y bioquímica, utilizando técnicas convencionales. Más tarde se desarrollaron esquemas de clasificación basados en el análisis serológico de antígenos flagelares (antígeno H) de células vegetativas. Se introdujo además el criterio de patrones electroforéticos de esterasas y de patrones plasmídicos dada la presencia de plásmidos como portadores de los genes que codifican para las toxinas cristalíferas. El análisis de ácidos grasos se ha utilizado para la separación de cepas. Al final, la genética molecular permitió la clasificación de *B. thuringiensis*, ya que se demostró que los genes que codifican para la toxina cristal, los cuales están localizados en plásmidos, tienen una correlación estrecha con la toxicidad fenotípica. La clasificación por antígenos flagelares aún es un método útil (Fernández y Vega, 2002), ya que proporciona una herramienta sencilla y eficiente para clasificar a *B. thuringiensis*. En base a los antígenos flagelares se han identificado 69 serotipos y 13 subgrupos antigénicos, dando un total de 82 serovares entre los 3,500 aislamientos de *B. thuringiensis* de la colección IEBC (Unité des

Bactéries Entomopathogenes at Institut Pasteur, France). El número de serovares ha aumentado gradualmente con el número total de cepas (Lecadet *et al.*, 1999). Sin embargo, esta clasificación no permite correlacionar la cepa con la actividad patogénica, la cual está determinada por el tipo de δ -endotoxina (Fernández y Vega, 2002).

4.3.4. Toxinas de *Bacillus thuringiensis*

Heimpel en 1967, considero tres exotoxinas y una endotoxina, esta última es la principal responsable del efecto insecticida. Entre las exotoxinas la más importante es la beta, seguida en importancia por la alfa y gama (Fernández y Vega, 2002).

Las δ -endotoxinas se dividen en dos grupos principales: las proteínas cristalinas conocidas como Cry y las citotóxicas conocidas como Cyt (Federici, 1998; Soberón y Bravo, 2007). Las proteínas Cry son tóxicas específicamente para los órdenes Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, Diptera y otros invertebrados como los nematodos. En contraste, las proteínas Cyt se encuentran principalmente en cepas de *Bt* activas contra Diptera (Bravo *et al.*, 2007).

Crickmore *et al.* (1998) definen a una proteína Cry como una inclusión paraesporal (cristal) de *Bt* que exhibe algún efecto tóxico a un organismo blanco o cualquier proteína que tenga una secuencia similar a una proteína Cry conocida. De forma similar una proteína Cyt se define como una inclusión paraesporal (cristal) de *Bt* que exhibe actividad hemolítica o cualquier proteína que tenga una secuencia similar con una proteína Cyt conocida.

Existen otras proteínas que no presentan homología con las proteínas Cry y Cyt, estas son conocidas como proteínas Vip. Las proteínas Vip descritas por Estruch *et al.* (1996) se producen durante la fase vegetativa de crecimiento, a partir de la segunda mitad de la fase logarítmica de crecimiento, así como durante la fase de esporulación por algunas cepas de *Bt*. Estas proteínas son activas contra una amplia variedad de lepidópteros, entre los que se encuentran *Agrotis ipsilon* (Hufnagel), *S. frugiperda*, *S. exigua* (Hübner), *Heliothis virescens* (Fabricius) y *Helicoverpa zea* (Boddie).

Las β -exotoxinas se forma durante la fase de crecimiento vegetativo (Carballo *et al.*, 2004). Estas son solubles en agua, termoestables y dializables; su estructura química es un derivado fosforilado del nucleótido de adenina. Se han encontrado varios tipos de β -exotoxinas y, a diferencia de las δ -endotoxinas, éstas no son producidas por todas las cepas de *Bt*. Su producción se asocia con algunos serotipos como H1, H4, H8, H9 y H10 (Fernández y Vega, 2002). Entre los órdenes de insectos susceptibles a esta exotoxina se encuentran: Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera, Isoptera, Lepidoptera, Neuroptera y Ortoptera. En *Agrotis*, *Spodoptera* y *Ostrinia* actúa como un fagodisuasivo, mientras que en mosquitos actúan como larvicida y adulticida (Carballo *et al.*, 2004).

Las exotoxinas alfa y gamma se consideran fosfolipasas C y lecitinasa, respectivamente (Fernández y Vega, 2002).

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

Hofte y Whiteley (1989), propusieron una nomenclatura y clasificación para las proteínas Cry y sus genes basada en el rango de especificidad y la estructura primaria de las proteínas. Clasificaron a los genes *cry* en cuatro principales grupos, asignando números romanos para diferenciarlos: Los genes *cryI* específicos para Lepidoptera; los genes *cryII* específicos para Lepidoptera y Diptera; los genes *cryIII* específicos para Coleoptera y los genes *cryIV* específicos para Diptera. Adicionalmente un gen no relacionado estructuralmente con los genes *cry*, el cual denominaron *cytA* y se colocó en una clase por separado (Hofte y Whiteley, 1989). Este sistema proporcionó un esquema útil para clasificar el conjunto de genes cada vez mayor. Sin embargo, existían inconsistencias, debido a intentos de acomodar genes que eran altamente homólogos a genes conocidos, pero que no codificaban una proteína con espectro insecticida similar, este y otros inconvenientes surgieron después de la nomenclatura establecida (Crickmore *et al.*, 1998).

Posteriormente Crickmore *et al.* (1998), propusieron una nueva clasificación para actualizar la nomenclatura originalmente diseñada por Hofte y Whiteley (1989). Esta nueva clasificación se basa en la similitud de la secuencia de aminoácidos. En esta propuesta los números romanos se sustituyeron por números arábigos en el primer rango de separación (por ejemplo: Cry1Aa) para acomodar mejor el gran número de proteínas nuevas.

Se construyó un árbol filogenético (Figura 2), donde las líneas verticales representan los límites que definen los distintos rangos en la nomenclatura. El nombre dado a cualquier proteína en particular depende de su ubicación en el árbol filogenético. Con el primer rango o fila se asigna el número arábigo, el segundo rango asigna a las proteínas una letra mayúscula y el tercer rango

asigna una letra minúscula. Los límites entre el primero, segundo y tercer rango representan aproximadamente el 45, 45 a 78 % y 78 a 95 % de identidad de secuencia, respectivamente. Por último, un cuarto rango asigna otro número arábigo al final e indica más de un 95 % de identidad. Mediante este método se asigna a cada proteína un nombre único. Las proteínas con el mismo rango primario a menudo afectan el mismo orden de insectos; aquellas con diferente rango, secundario y terciario, pueden tener distinta potencia y especificidad dentro de un orden. En el tercer rango las diferencias pueden deberse a la acumulación de mutaciones. El cuarto rango se estableció para agrupar “alelos” de genes que codifican proteínas que difieren sólo ligeramente, ya sea debido a unos pocos cambios mutacionales o una imprecisión en la secuenciación (Crickmore *et al.*, 1998).

Los límites mostrados en la Figura 2 permiten que la mayoría de los genes *cry* conserven los nombres que recibieron en el sistema de clasificación de Hofte y Whiteley (1989), después de una sustitución del número romano por arábigo. Aunque, hay algunas excepciones: *cryIG* se convirtió en *Cry9A*, *cryIIIC* en *cry7Aa*, *cryIIID* en *cry3C*, *cryIVC* en *cry10A*, *cryIVD* en *cry11A*, *cytA* en *cyt1A* y *cytB* en *cyt2A* (Crickmore *et al.*, 1998).

Al 2016 se habían reportado 307 diferentes genes *cry* clasificados en 74 grupos y 11 diferentes genes *cyt* clasificados en 3 grupos (Crickmore *et al.*, 2016), esta lista se encuentra disponible en una base de datos que constantemente se está actualizando y va aumentando ya que se van incluyendo nuevos genes.

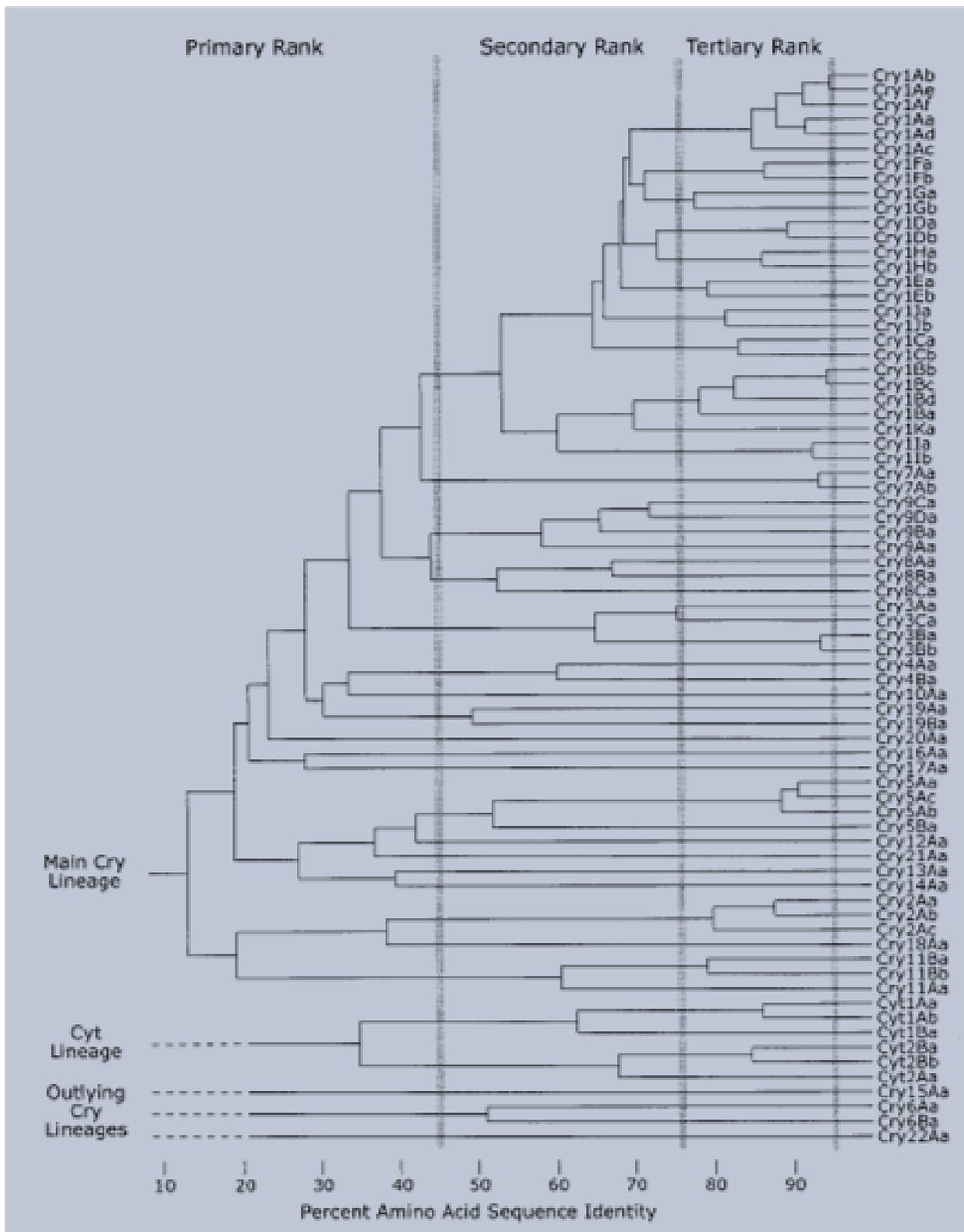


Figura 2. Filograma de las proteínas Cry y Cyt de *Bacillus thuringiensis*. Tomado de: Crickmore *et al.* (1998).

4.3.6. Mecanismo de acción de las δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*

Las toxinas de *Bt* deben ser ingeridas por el insecto sensible (Fernández y Vega, 2002) y activadas en el intestino (Sanahuja *et al.*, 2011), el cual tiene un pH elevado, que es esencial para la disolución de muchas protoxinas de *Bt*. Estas son solubles solamente en pH superiores a 9.5 (Fernández y Vega, 2002). La mayoría de las toxinas son producidas como protoxinas y requieren ser procesadas proteolíticamente por proteasas presentes en el intestino del insecto (Gill *et al.*, 1992; Fernández y Vega, 2002; Soberón y Bravo, 2007). Este procesamiento proteolítico libera fragmentos tóxicos de 55 a 65 kDa (Fernández y Vega, 2002; Soberón y Bravo, 2007), que interaccionan con proteínas receptoras presentes en las microvellosidades de las células intestinales de los insectos blanco (Soberón y Bravo, 2007). La especificidad de las δ -endotoxinas a un tipo de insecto en particular implica la presencia de receptores específicos (Fernández y Vega, 2002). Las toxinas se insertan en la membrana plasmática de las células intestinales formando un poro lítico o lesión (Fernández y Vega, 2002; Soberón y Bravo, 2007), que conduce a una variación en la permeabilidad, alterando el transporte de los iones de potasio, lo cual trae como consecuencia la lisis celular, disrupción de la integridad del intestino y la muerte del insecto. Por otra parte, las esporas bacterianas se multiplican en la hemolinfa y provocan una septicemia que incrementa el efecto de las toxinas (Fernández y Vega, 2002).

Los síntomas que se observan a partir de que las larvas susceptibles ingieren los cristales y esporas de *Bt* son cese de la ingestión, parálisis del intestino, parálisis total y finalmente la muerte (Soberón y Bravo, 2007).

4.3.7. Desarrollo de resistencia de los insectos a *Bacillus thuringiensis*

Dado el amplio uso de la tecnología *Bt* en la agricultura convencional y orgánica, el desarrollo de resistencia a las proteínas Cry entre las poblaciones blanco se considera una seria amenaza para el uso a largo plazo de los productos de *Bt* (Sanchis, 2011).

En condiciones de laboratorio se ha demostrado que los insectos pueden desarrollar altos niveles de resistencia debido al uso continuo de *Bt*, sobre todo a las δ -endotoxinas (Federici, 1998; Fernández y Vega, 2002).

McGaughey (1985), reportó por primera vez el desarrollo de resistencia de un insecto a *Bt* en condiciones de laboratorio. Se trataba de *Plodia interpunctella* (Hübner), la cual desarrollo resistencia en pocas generaciones. La resistencia aumentó casi 30 veces en 2 generaciones y 100 veces después de 15 generaciones y se heredó como un carácter recesivo. Posteriormente, McGaughey y Beeman (1988), reportan el desarrollo de resistencia de *P. interpunctella* y *Cadra cautella* (Walker) en laboratorio a la formulación comercial Dipel. La resistencia de *C. cautella* aumento 7 veces en 21 generaciones de selección intensa. Desde entonces se ha reportado el desarrollo de resistencia de diversas plagas hacia una variedad de proteínas de *Bt* en condiciones de laboratorio (Ibarra y Del Rincón, 2015).

Huang *et al.* (1999) documentan el desarrollo de resistencia del barrenador europeo del maíz, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) a la formulación comercial Dipel y Li *et al.* (2005) a cuatro de las proteínas que contiene dicha formulación. La proporción de resistencia para las proteínas

Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac y Cry2Aa fue de 170, 205, 524 y 640 veces, respectivamente, considerablemente más altas que la resistencia de 47 veces a Dipel.

Otros casos de resistencia en laboratorio son el de *S. exigua* (Moar *et al.*, 1995) y *Helicoverpa armigera* (Hübner) a la proteína Cry1C (Akhurst *et al.*, 2003).

En campo se ha reportado el desarrollo de resistencia de *Plutella xylostella* (Linnaeus) a *Bt* var. *kurstaki*. La CL₅₀ y CL₉₅ para la población de campo tratada repetidamente con *Bt* fue 25 a 33 veces mayor que las respectivas CL₅₀ y CL₉₅ para dos colonias susceptibles de laboratorio. El porcentaje de mortalidad de la población de campo resistente fue de 34 a 35 % en comparación con la población susceptible que fue de 90 a 100 % (Tabashnik *et al.*, 1990). Zago *et al.* (2014) también reportan el desarrollo de resistencia de *P. xylostella* en Brasil, debido a que los productos a base de *Bt* han sido utilizados intensivamente para el control de dicha plaga, lo que ha ocasionado resistencia de 2 a 54 veces a Xentari.

Más importante aún es la resistencia desarrollada en campo a los transgénicos comerciales como el caso de *Busseola fusca* (Fuller) resistente a Cry1Ab en maíz en Sudáfrica (Van Rensburg, 2007). La resistencia de varias plagas de algodón *Bt* a Cry1Ac como *H. zea* en Estados Unidos (Anilkumar *et al.*, 2008), *H. armigera* en China (Liu *et al.*, 2010) y *Pectinophora gossypiella* (Saunders) en la India (Dhurua y Gujar, 2011). También se ha reportado la resistencia de *Diabrotica virgifera virgifera* (LeConte) a Cry3Bb1 en maíz en Estados Unidos (Gassmann *et al.*, 2011) y *S. frugiperda* resistente a Cry1F en maíz *Bt* en Puerto Rico (Storer *et al.*, 2010), Estados Unidos (Huang *et al.*, 2014) y Brasil (Monnerat *et al.*, 2015).

4.3.7.1. Resistencia cruzada de los insectos a *Bacillus thuringiensis*

La mayoría de las proteínas de *Bt* tiene un modo de acción similar, una vez que se desarrolla resistencia a una proteína se puede conferir resistencia a otras proteínas relacionadas. Esto se conoce como resistencia cruzada y se ha demostrado en estudios de laboratorio con las proteínas Cry (Federici, 1998).

Durante las primeras etapas de comercialización de los cultivos *Bt* se reconoció que, dado que los cultivos *Bt* y los plaguicidas *Bt* pueden contener las mismas proteínas o que estas comparten los mismos sitios de unión en el intestino del insecto, existe la posibilidad de resistencia cruzada a los plaguicidas *Bt* en insectos que desarrollen resistencia a los cultivos *Bt* (Federici, 1998).

Tabashnik *et al.* (1994) reportan el desarrollo de resistencia cruzada mayor a 200 veces entre las proteínas CryIA (ahora Cry1A) y CryII (ahora Cry2) de *Bt* var. *kurstaki* y la proteína Cry1F de *Bt* subsp. *aizawai* en *P. xylostella*. Li *et al.* (2005) documentan la resistencia cruzada entre el insecticida Dipel y las proteínas Cry1Ba y Cry1Ca en *O. nubilalis*, las cuales no se encuentran presentes en dicho insecticida. La población resistente a Dipel fue 36 veces resistente a Cry1Ba y Cry1Ca no causó mortalidad significativa a dosis altas (1.0 mg.ml⁻¹) tanto a las larvas de una población susceptible como a las de una población resistente. Hernández *et al.* (2013) encontraron resistencia cruzada entre las proteínas Cry1A.105, Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1Fa en *O. nubilalis* y *S. frugiperda*. Ellos mencionan que se debe a que compiten por los mismos sitios de unión en ambos insectos. Jakka *et al.* (2014) reportan resistencia cruzada entre las proteínas Cry1Fa y Cry1A en *S. frugiperda*. Las larvas de una población resistente mostraron resistencia cruzada a las proteínas Cry1Ab y Cry1Ac. Sin embargo, no se detectaron diferencias en la susceptibilidad a

las formulaciones comerciales XenTari WG y Dipel ES. Los patrones de resistencia cruzada observados en el estudio proporcionan evidencia de que la resistencia a Cry1Fa está relacionada con la alteración de los sitio de unión compartidos con la proteína Cry1A. Resultados similares encontraron Monnerat *et al.* (2015) quienes también documentan resistencia cruzada entre la proteína Cry1Fa y Cry1Aa en *S. frugiperda*. La resistencia a Cry1Aa fue de 34 veces en comparación con la colonia susceptible de laboratorio.

Wei *et al.* (2015) reportan el desarrollo de resistencia cruzada entre las proteínas Cry1Ac y Cry2Ab en *H. armigera*. La selección con Cry1Ac durante 125 generaciones produjo una resistencia de 1,000 veces a Cry1Ac y 6.8 veces a Cry2Ab. La selección con Cry2Ab durante 29 generaciones causó una resistencia de 5.6 veces a Cry2Ab y 61 veces a Cry1Ac y Welch *et al.* (2015) documentan la resistencia cruzada entre las proteínas Cry1A.105, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Fa, Cry2Ab y Vip3Aa y tres formulaciones comerciales MVP II, Agree WG y DiPel ES en *H. zea*. La selección en laboratorio de *H. zea* con Cry1Ac seguida por la selección con MVP II (formulación que contiene una protoxina híbrida idéntica a Cry1Ac) causó resistencia a Cry1Ac y MVP II, así como resistencia cruzada de 51.3 veces a Cry1A.105 y de 22.4 veces a Cry1Ab y baja resistencia a Cry1Fa, Cry2Ab y Vip3Aa de 1.8, 3.3 y 1.6, respectivamente. Para las formulaciones comerciales la resistencia fue de 2.9 para Dipel ES y 2.0 para Agree VG, esto debido a que ambas formulaciones contienen la proteína Cry1Ac, la resistencia a esta contribuyó a la resistencia a las formulaciones. La resistencia relativamente baja a las formulaciones se debe a que contienen otras proteínas de *Bt* que reducen el desarrollo de resistencia. Los resultados sugieren que la evolución de la resistencia a las proteínas de *Bt* en cultivos transgénicos podría reducir la eficacia de las formulaciones comerciales de *Bt*.

4.3.8. Formulaciones de *Bacillus thuringiensis*

Los bioinsecticidas a base de *Bt* constituyen el ejemplo más importante de este tipo de productos (Fernandez y Vega, 2002), abarcando cerca del 74 % del mercado de los bioinsecticidas (Nava *et al.*, 2012) y aproximadamente el 5 % del consumo de insecticidas en el mundo (Ibarra y Del Rincón, 2015).

Los bioinsecticidas desarrollados en los inicios y muchos otros usados en la actualidad incluyen en su formulación como ingrediente activo una mezcla de cristales y esporas de *Bt*. A partir de la entrada al mercado en 1938 del primer producto comercial a base de *Bt* llamado “Sporeine”, existió un interés creciente en desarrollar productos más avanzados (Sauka y Benintende, 2008).

Bt var. *kurstaki* HD-1 es por excelencia la cepa utilizada para el control de insectos lepidópteros, plagas agrícolas y forestales. Esta cepa fue aislada originalmente por Dulmage en 1970, lo que constituye un hito en la historia del uso de *Bt* como larvicida, ya que fue la responsable de que los productos a base de *Bt* puedan competir con los insecticidas químicos en términos de eficiencia. Esta cepa resultó ser hasta 200 veces más tóxica para algunas especies de lepidópteros que las otras cepas utilizadas en los productos de aquella época (Sauka y Benintende, 2008).

Las primeras formulaciones de *Bt* comercializadas hace más de 30 años, como Dipel y Thuricide son utilizadas aún hoy en día, estas formulaciones están basadas en la cepa HD1 de *Bt* var. *kurstaki*. El cuerpo paraesporal de la cepa HD1 consta de cuatro proteínas Cry: Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac y Cry2A. Estas varían en su espectro de acción y toxicidad específica y en

combinación dan a este aislado un amplio espectro de actividad contra una amplia gama de insectos (Federici, 1998).

Los tipos de formulaciones son polvos humectables, polvos secos, granulados o emulsiones. Las formas secas son más estables durante su almacenamiento, mientras que las líquidas resultan más económicas (Fernández y Vega, 2002). Sin embargo, estas formulaciones han sido sustituidas por microencapsulados y microgránulos para mejorar la toxicidad residual (Brar *et al.*, 2006).

La formulación es crucial entre la producción y la aplicación, una vida útil más larga, la facilidad de aplicación y la eficacia en campo. Hay varios factores ambientales como la radiación ultravioleta, lluvia, pH, temperatura y fisiología del follaje que impiden la eficacia de las formulaciones de *Bt*. Sin embargo, se han desarrollado varias formulaciones dependiendo del objetivo de la aplicación y para superar los efectos ambientales adversos (Brar *et al.*, 2006).

4.3.9. Ventajas y limitaciones del uso de *Bacillus thuringiensis*

Varios factores han hecho posible el éxito de *Bt* en la agricultura y el control de mosquitos transmisores de enfermedades. El más importante es su especificidad hacia el insecto blanco (Soberón y Bravo, 2007), por lo que se considera seguro para los mamíferos y las aves (Sanchis, 2011). La mayoría de las proteínas de *Bt* son específicas de los insectos y sólo se activan en el intestino de estos, que en la mayoría de los insectos blanco es alcalino a diferencia de muchos de los vertebrados, incluyendo los seres humanos que es ácido (Federici, 1998). Además, se pueden aplicar el día de la cosecha y son de baja propensión a adquirir resistencia (Lagunes y Villanueva, 2009).

Sin embargo, también presentan algunas limitaciones como especificidad restringida a ciertos órdenes de insectos (Fernández y Vega, 2002; Sauka y Benintende, 2008; Sanchis, 2011), lo que ocasiona que no se cuente con proteínas para todas las plagas (Fernández y Vega, 2002; Sauka y Benintende, 2008), toxicidad residual corta (Tamez *et al.*, 2000; Fernández y Vega, 2002; Sauka y Benintende, 2008), ya que son afectados por las condiciones ambientales (Lagunes y Villanueva, 2009), tales como la luz solar que inactiva las esporas y cristales y que pueden ser lavados por la lluvia (Tamez *et al.*, 2000; Sanchis, 2011). Además, las formulaciones de *Bt* son más costosas en comparación con los insecticidas convencionales, son más difíciles de aplicar, no siempre están disponibles (Gujar *et al.*, 2007; Lagunes y Villanueva, 2009) y no son eficaces contra plagas que se alimentan de los tejidos internos de la planta (Sanchis, 2011). No obstante, algunos de estos problemas se pueden solucionarse mediante el aislamiento de nuevas cepas con actividad insecticida superior y un amplio rango de actividad contra insectos plaga, la clonación de genes *cry* que codifican nuevas proteínas insecticidas, aumentando la persistencia en campo mediante la encapsulación para proteger contra la degradación UV (Sanchis, 2011) o la adición de protectores solares o agentes resistentes a la lluvia (Tamez *et al.*, 2000) y mejorar las estrategias de aplicación (Fernández y Vega, 2002).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Ubicación del experimento

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en la cámara de cría y el laboratorio de Toxicología de Insecticidas del Posgrado de Entomología y Acarología del Colegio de Postgraduados, ubicado en Montecillo, Texcoco, Estado de México.

5.2. Poblaciones

Se recolectaron en campo poblaciones de *S. frugiperda* procedentes de los estados de Chihuahua, Coahuila, Durango, Sinaloa, Sonora y Tamaulipas (Cuadro 1). Todas ellas se recolectaron en maíz, a excepción de una población (La Guamuchilera, Culiacán, Sinaloa) que se recolectó en sorgo.

Para las recolectas de campo se seleccionaron, por población, cinco puntos de muestreo alejados al menos 15 km entre ellos. Dentro de cada punto de muestreo se recolectaron larvas desarrolladas (\geq tercer instar) dado que tienen mayor probabilidad de llegar a adulto en condiciones de laboratorio. Con la finalidad de reducir la probabilidad de que los individuos provinieran de los mismos progenitores, se recolectó no más de una larva por planta, cuidando de que las larvas provinieran de plantas distanciadas a más de dos metros.

Cuadro 1. Procedencia de las poblaciones de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) evaluadas.

Código Población	Lugar de recolecta	Fecha de recolecta	Coordenadas geográficas
Estado de Chihuahua			
CHI-AHU1	Colonia Moctezuma, Municipio Ahumada, Chihuahua.	12-jul-16	N: 30° 05' 01.7'' W: 106° 17' 31.3''
CHI-AHU2	Colonia Valle Esperanza, Municipio Ahumada, Chihuahua.	12-jul-16	N: 29° 58' 14.3'' W: 106° 09' 48.1''
CHI-CUA1	Colonia Los Cienes, Municipio Cuauhtémoc, Chihuahua.	18 y 19-jul-16	N: 28° 43' 33.5'' W: 107° 02' 06.4''
CHI-CUA2	Colonia Manitoba, Cuauhtémoc, Chihuahua.	18 y 19-jul-16	N: 28° 28' 06.4'' W: 106° 53' 01.9''
CHI-DEL1	Ciudad Delicias, Chihuahua.	18 y 19-jul-16	N: 28° 09' 30.2'' W: 105° 26' 46.0''
Estado de Coahuila			
COA-FIM1	Ejido Jaboncillo, Francisco I. Madero, Coahuila.	31-may-16	N: 25° 45' 37.2'' W: 103° 14' 50.9''
COA-MAT1	Ejido Benito Juárez, Matamoros, Coahuila.	31-may-16	N: 25° 36' 16.6'' W: 103° 13' 07.1''
Estado de Durango			
DUR-GPA1	California, Gómez Palacio, Durango.	31-may-16	N: 25° 45' 17.6'' W: 103° 22' 28.8''
Estado de Sinaloa			
SIN-CUL1	La Guamuchilera, Culiacán, Sinaloa.	06-sep-16	N: 24° 41' 20.1'' W: 107° 13' 44.5''
Estado de Sonora			
SON-NAV1	Navojoa, Sonora.	29-jul-16	N: 27° 06' 60.0'' W: 109° 50' 21.2''
SON-OBR1	Obregón, Sonora.	29-jul-16	N: 27° 24' 35.0'' W: 110° 08' 23.5''
Estado de Tamaulipas			
TAM-DIO1	Díaz Ordaz, Tamaulipas.	28 al 30-mar-16	N: 26° 11' 01.7'' W: 98° 27' 57.2''
TAM-DIO2	Camargo, Díaz Ordaz, Tamaulipas.	13 al 17-abril-16	N: 26° 17' 30.2'' W: 98° 49' 0.3''
TAM-DIO3	Ciudad Gustavo Díaz Ordaz, Tamaulipas.	18 al 20-abril-16	N: 26° 13' 28.45'' W: 98° 43' 59.16''
TAM-RIO1	Rio Bravo, Tamaulipas.	28 al 30-mar-16	N: 25° 51' 52.3'' W: 97° 58' 09.7''
TAM-VAH1	Valle Hermoso, Tamaulipas.	13 al 15-abril-16	N 25° 40' 07.8'' W 97° 54' 37.3''

Nota: Los valores de las coordenadas geográficas corresponden a un punto intermedio de los cinco sitios de recolecta por población.

En total, por población, se recolectaron 340 larvas, y una vez que se recibieron en el laboratorio, se eliminaron aquellas que estaban muertas, enfermas o parasitadas. Al menos el 85 %

de larvas por recolecta llegaron al estado adulto. A partir de estos individuos se inició la cría masiva de las poblaciones hasta obtener larvas neonatas para la realización de los bioensayos.

Como población susceptible de referencia se utilizó una colonia de *S. frugiperda* que se ha mantenido en condiciones de laboratorio por más de 10 años y se encuentra libre de presión de selección de insecticidas. A esta población se le han incorporado ocasionalmente larvas recolectadas del cultivo de maíz de Montecillo, Texcoco, Estado de México, donde dicha especie aunque está presente no es plaga y no se realizan acciones de combate químico, ni de otra índole.

5.3. Cría

Las larvas sanas provenientes de las recolectas de campo se colocaron individualmente en vasos de plástico que contenían ocho mL de dieta merídica (Fall Armyworm, Southland Products Incorporated®) para que llegaran al estado de pupa.

Una vez en estado de pupa se procedió a colectarlas de los vasos y se colocaron en una caja Petri dentro de una jaula entomológica (25 x 25 x 35 cm), para esperar la emergencia de los adultos. Como fuente de alimentación, a los adultos se les proporcionó una esponja impregnada con una solución de miel de maíz al 10 % diluida en agua destilada.

Cuando se observaron las primeras oviposuras en la tela de la jaula, los adultos y las pupas que aún quedaban se pasaron a una bolsa de papel estraza del número 8, en grupos de 30 a 40 para que se llevara a cabo el apareamiento y la ovoposición. Dentro de la bolsa se colocó una esponja con la solución de miel en una caja Petri. La bolsa que contenía los adultos se cambió cada tercer

día y se recolectaron las masas de huevos. Para realizar el cambio de bolsa, esta se metió al congelador por aproximadamente un minuto para adormecer a los adultos y, así poder manipularlos más fácilmente y realizar el cambio. Las masas de huevos se colocan en un recipiente de plástico al cual se le adiciono con un rociador un poco de agua destilada y se introdujo en una bolsa de plástico para mantener la humedad.

Los diferentes estados de *S. frugiperda* se mantuvieron en una cámara de cría bajo condiciones controladas a $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, humedad relativa de $70 \pm 10\%$ y un fotoperiodo de 12:12 luz-oscuridad.

5.4. Formulaciones comerciales de *Bacillus thuringiensis*

Se utilizaron dos formulaciones comerciales de *Bacillus thuringiensis*: *Bt* subsp. *aizawai*, XenTari[®] DF y *Bt* var. *kurstaki*, DiPel[®] DF (Valent de México S.A. de C.V.). En el Cuadro 2 se da más información acerca de las formulaciones.

Cuadro 2. Formulaciones comerciales de *Bacillus thuringiensis*.

Nombre comercial del insecticida	Ingrediente activo	Formulación	Concentración	UIT/mg	Proteínas insecticidas que contiene
	<i>Bacillus</i>				
XenTari [®] DF	<i>thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i>	Floable seco	103 g. de i.a./ Kg.	15,000	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1C y Cry1D
	<i>Bacillus</i>				
DiPel [®] DF	<i>thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>	Floable seco	103 g. de i.a./ Kg.	32,000	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac y Cry2A

5.5. Bioensayos

Los bioensayos se realizaron utilizando el método de capa, que consiste en depositar un mililitro de dieta merídica por cavidad de una charola para bioensayo (Bio-Assay Tray Bio-BA-128; C-D International, Incorporated®). Una vez que la dieta solidificó y estuvo a temperatura ambiente (aproximadamente una hora después), se depositaron 50 μ L de la concentración requerida de las formulaciones y como diluyente se utilizó agua destilada que contenía Tritón X-100 al 0.1%, para obtener una distribución más uniforme sobre la superficie de la dieta.

Después de una hora de haber aplicado las concentraciones de las formulaciones, con la ayuda de un pincel fino (No. 0), se introdujo por pozo una larva neonata que no había sido alimentada con dieta merídica y que tenía menos de 24 horas de emergencia. Posteriormente, los pozos se cubrieron con etiquetas de plástico auto adheribles (Pull N' Peel Tab Bio-Cv-16; C-D International, Inc.), las cuales tienen perforaciones que permiten el intercambio gaseoso e impiden el escape de las larvas. Las charolas con las larvas tratadas se transfirieron a la cámara de cría con las condiciones ambientales ya mencionadas.

A los siete días después de la exposición de las larvas neonatas a los tratamientos, se evaluaron las variables porcentaje de mortalidad, porcentaje de larvas que alcanzaron el tercer instar y porcentaje de inhibición de peso respecto al testigo sin tratar. Se consideró como muertas aquellas larvas flácidas o que presentaban movimientos anormales cuando se les estimulaba con un pincel. El tercer instar se determinó de manera visual y se consideró que una larva llegó a esta condición cuando lograba estar dentro de las dimensiones de longitud (1 a 2 cm) y peso (20 a 40 mg) de un tercer instar sano bajo las condiciones normales de cría. Las larvas supervivientes de

cada tratamiento se pesaron en conjunto y se obtuvo el peso promedio, con estos valores se estimó el porcentaje de reducción de peso respecto a las larvas no tratadas.

Por concentración/repetición se utilizaron 16 larvas, haciendo un total de 128 larvas por repetición, incluyendo al testigo. En total se hicieron de 3 a 5 repeticiones en días diferentes y cada repetición incluyó un testigo al cual sólo se le agregaron 50 μ L de diluyente por pozo.

Inicialmente se evaluó el efecto de varias concentraciones para obtener dónde se encontraba el cero y el 100 % de mortalidad. Posteriormente se introdujeron al menos cinco concentraciones que cubrieran de manera equidistante dicho rango de respuesta.

5.6. Análisis estadístico

Los datos de mortalidad se sometieron a un análisis Probit, mediante el procedimiento Proc Probit del paquete estadístico SAS (SAS Institute, 2002), para estimar los valores de la CL_{50} y CL_{95} , la pendiente y el error estándar. Se consideró que las poblaciones no fueron estadísticamente diferentes si los límites fiduciales al 95 %, a determinado nivel de mortalidad se traslaparon (Robertson y Preisler, 1992). El máximo nivel de mortalidad aceptada para el testigo fue del 10 % y la mortalidad en los tratamientos se corrigió mediante el empleo de la fórmula de Abbott (1925). Una vez determinada la CL_{50} y CL_{95} para las poblaciones de campo y la población susceptible de referencia, se obtuvo la respuesta relativa (RR) dividiendo los valores de la CL_{50} y CL_{95} de las poblaciones de campo entre los valores de la población susceptible (Dhingra y Sarup, 1990).

Previo al análisis, para lograr normalidad, el porcentaje de larvas que llegaron al tercer instar y el porcentaje de inhibición de peso respecto al testigo, se transformaron a la función arcoseno de la raíz cuadrada del porcentaje de respuesta/100. Posteriormente, se realizó un análisis de varianza, mediante el procedimiento PROC ANOVA y una prueba de comparación de medias (Tukey, $\alpha = 0.05$) utilizando el paquete estadístico SAS (SAS Institute, 2002) para determinar si había diferencias estadísticas dentro de cada población.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Mortalidad

La susceptibilidad de las larvas neonatas de *S. frugiperda* expuestas durante siete días a las formulaciones comerciales de *Bt* XenTari® DF y Dipel® DF se presenta en el Cuadro 3 y 4, respectivamente.

La variación en respuesta fue mayor en Dipel® DF que en XenTari® DF. Los valores estimados de la CL₅₀ de las 14 poblaciones de campo expuestas a XenTari® DF variaron de 82.5 (SIN-CUL1) a 246.1 ng.cm⁻² (TAM-DIO1) y los valores de la CL₉₅ de 975.4 (SON-OBR1) a 4,024 ng.cm⁻² (COA-MAT1). A nivel de CL₅₀ la variación mayor fue de 3.1× y a nivel de CL₉₅ de 1.9× (Cuadro 3).

Los valores estimados de la CL₅₀ de las 16 poblaciones de campo expuestas a Dipel® DF variaron de 50.8 (CHI-DEL1) a 857.2 ng.cm⁻² (TAM-DIO2) y la CL₉₅ de 2,973 (SON-OBR1) a 31,944 ng.cm⁻² (TAM-DIO3). A nivel de CL₅₀ se detectó una variación de 4.7× y a nivel de CL₉₅ de 5.0×. A nivel de CL₅₀ varias poblaciones de campo (CHI-AHU1, CHI-DEL1, COA-FIM1, COA-MAT1, DUR-GPA1, SIN-CUL1 y SON-NAV1) fueron más susceptibles que la población de referencia (Cuadro 4).

Situación similar la documentó Aguilar *et al.* (2007) en estudios que hicieron sobre la susceptibilidad de *H. zea* a la proteína Cry2Ab y Albernaz *et al.* (2013) al evaluar la susceptibilidad de *H. virescens* a Cry1Ac.

Cuadro 3. Mortalidad de larvas neonatas de *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith procedentes de Chihuahua, Coahuila, Durango, Sinaloa, Sonora y Tamaulipas, expuestas durante siete días a XenTari® DF.

Población	n	G.L.	b ± E.E.	CL ₅₀ (ng.cm ⁻²) (L.F. al 95%)	CL ₉₅ (ng.cm ⁻²) (L.F. al 95%)	P≥X ²	RR ₅₀	RR ₉₅
Susceptible								
SUS-LAB	512	2	1.16 ± 0.16	80.3 (52.5 - 113.2)	2,125 (1,104 - 6,260)	0.5541	1.0	1.0
Chihuahua								
CHI-AHU1	510	3	1.79 ± 0.27	192.5 (92.9 - 378.4)	1,598 (690.7 - 12,467)	0.0524	2.4	0.8
CHI-AHU2	510	2	1.99 ± 0.22	211.5 (169.0 - 266.5)	1,412 (943.0 - 2,563)	0.6625	2.6	0.7
CHI-CUA1	512	1	1.30 ± 0.23	91.1 (63.4 - 129.1)	1,693 (757.3 - 8,636)	0.8845	1.1	0.8
CHI-CUA2	512	3	1.71 ± 0.17	143.2 (111.2 - 181.7)	1,308 (887.4 - 2,239)	0.1279	1.8	0.6
CHI-DEL1	512	4	1.28 ± 0.23	138.6 (47.7 - 305.4)	2,699 (923.6 - 45,071)	0.0066	1.7	1.3
Coahuila								
COA-FIM1	512	2	1.46 ± 0.17	230.4 (174.6 - 310.2)	3,067 (1,729 - 7,377)	0.1803	2.9	1.4
COA-MAT1	512	5	1.00 ± 0.22	92.0 (13.2 - 300.5)	4,024 (934.4 - 332,633)	0.0003	1.1	1.9
Durango								
DUR-GPA1	512	3	1.61 ± 0.16	133.1 (101.5 - 170.8)	1,396 (935.8 - 2,427)	0.9014	1.7	0.7
Sinaloa								
SIN-CUL1	640	5	1.36 ± 0.35	82.5 (11.4 - 234.7)	1,338 (402.1 - 154,141)	0.1004	1.0	0.6

n= tamaño de muestra, G.L.= Grados de Libertad, b ± E.E.= pendiente ± error estándar de la media, CL₅₀= concentración letal estimada que mata al 50 % de las larvas expuestas, CL₉₅= concentración letal estimada que mata al 95 % de las larvas expuestas, L.F.= Límites Fiduciales a una confiabilidad del 95 %, P≥X²= Probabilidad de que los datos modelen una línea recta. RR₅₀= respuesta relativa al 50 % de mortalidad (CL₅₀ de la población de campo entre CL₅₀ de la población susceptible) y RR₉₅= respuesta relativa al 95 % de mortalidad (CL₉₅ de la población de campo entre CL₉₅ de la población susceptible).

Cuadro 3. Continuación

Población	n	G.L.	b ± E.E.	CL₅₀ (ng.cm⁻²) (L.F. al 95%)	CL₉₅ (ng.cm⁻²) (L.F. al 95%)	P≥X²	RR₅₀	RR₉₅
Sonora								
SON-NAV1	512	2	2.20 ± 0.25	183.4 (148.7- 226.9)	1,026 (710.8 - 1,767)	0.5787	2.3	0.5
SON-OBR1	512	1	2.22 ± 0.35	177.6 (143.0 - 231.5)	975.4 (595.3 - 2,397)	0.7412	2.2	0.5
Tamaulipas								
TAM-DIO1	378	3	2.36 ± 0.42	246.1 (124.9 - 517.4)	1,222 (563.5 - 13,137)	0.1384	3.1	0.6
TAM-DIO2	512	2	1.65 ± 0.19	141.0 (108.6 - 182.0)	1,398 (879.6 - 2,790)	0.1959	1.8	0.7
TAM-DIO3	512	3	1.68 ± 0.16	179.7 (139.6 - 228.2)	1,706 (1,159 - 2,891)	0.8964	2.2	0.8

n= tamaño de muestra, G.L.= Grados de Libertad, b ± E.E.= pendiente ± error estándar de la media, CL₅₀= concentración letal estimada que mata al 50 % de las larvas expuestas, CL₉₅= concentración letal estimada que mata al 95 % de las larvas expuestas, L.F.= Límites Fiduciales a una confiabilidad del 95 %, P≥X²= Probabilidad de que los datos modelen una línea recta. RR₅₀= respuesta relativa al 50 % de mortalidad (CL₅₀ de la población de campo entre CL₅₀ de la población susceptible) y RR₉₅= respuesta relativa al 95 % de mortalidad (CL₉₅ de la población de campo entre CL₉₅ de la población susceptible).

Cuadro 4. Mortalidad de larvas neonatas de *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith procedentes de Chihuahua, Coahuila, Durango, Sinaloa, Sonora y Tamaulipas, expuestas durante siete días a Dipel[®] DF.

Población	n	G.L.	b ± E.E.	CL ₅₀ (ng.cm ⁻²) (L.F. al 95%)	CL ₉₅ (ng.cm ⁻²) (L.F. al 95%)	P≥X ²	RR ₅₀	RR ₉₅
Susceptible								
SUS-LAB	512	5	1.06 ± 0.19	182.7 (60.2 - 434.6)	6,428 (1,912 - 113,279)	0.0705	1.0	1.0
Chihuahua								
CHI-AHU1	512	4	0.97 ± 0.20	66.8 (9.8 - 214.2)	3,280 (739.7 - 349,290)	0.0041	0.4	0.5
CHI-AHU2	511	4	1.07 ± 0.10	298.8 (213.8 - 411.3)	10,183 (5,649 - 23,040)	0.2896	1.6	1.6
CHI-CUA1	512	3	1.02 ± 0.12	189.8 (130.5 - 267.0)	7,719 (3,870 - 21,916)	0.5957	1.0	1.2
CHI-CUA2	512	4	1.16 ± 0.11	220.5 (159.0 - 298.7)	5,761 (3,362 - 12,179)	0.1377	1.2	0.9
CHI-DEL1	512	5	0.77 ± 0.07	50.8 (30.2 - 79.6)	6,797 (3,417 - 17,131)	0.8388	0.3	1.1
Coahuila								
COA-FIM1	512	5	0.91 ± 0.11	145.7 (64.2 - 284.5)	9,567 (3,354 - 62,411)	0.1115	0.8	1.5
COA-MAT1	384	4	0.84 ± 0.10	91.5 (53.0 - 146.5)	8,303 (3,595 - 29,599)	0.9355	0.5	1.3
Durango								
DUR-GPA1	509	3	1.21 ± 0.13	141.6 (100.6 - 191.8)	3,216 (1,885 - 6,947)	0.1632	0.8	0.5
Sinaloa								
SIN-CUL1	640	4	1.06 ± 0.18	125.1 (43.0 - 273.6)	4,412 (1,378 - 74,388)	0.0251	0.7	0.7

n= tamaño de muestra, G.L.= Grados de Libertad, b ± E.E.= pendiente ± error estándar de la media, CL₅₀= concentración letal estimada que mata al 50 % de las larvas expuestas, CL₉₅= concentración letal estimada que mata al 95 % de las larvas expuestas, L.F.= Límites Fiduciales a una confiabilidad del 95 %, P≥X²= Probabilidad de que los datos modelen una línea recta. RR₅₀= respuesta relativa al 50 % de mortalidad (CL₅₀ de la población de campo entre CL₅₀ de la población susceptible) y RR₉₅= respuesta relativa al 95 % de mortalidad (CL₉₅ de la población de campo entre CL₉₅ de la población susceptible).

Cuadro 4. Continuación

Población	n	G.L.	b ± E.E.	CL ₅₀ (ng.cm ⁻²) (L.F. al 95%)	CL ₉₅ (ng.cm ⁻²) (L.F. al 95%)	P≥X ²	RR ₅₀	RR ₉₅
Sonora								
SON-NAV1	512	3	0.88 ± 0.12	80.8 (46.3 - 123.2)	5,848 (2,723 - 19,997)	0.7869	0.4	0.9
SON-OBR1	512	3	1.55 ± 0.14	259.3 (200.7 - 332.9)	2,973 (1,937 - 5,357)	0.6278	1.4	0.5
Tamaulipas								
TAM-DIO1	381	4	1.15 ± 0.12	421.8 (294.3 - 600.1)	11,296 (5,957 - 28,730)	0.0949	2.3	1.8
TAM-DIO2	512	4	1.18 ± 0.11	857.2 (636.5 - 1,172)	20,977 (11,739 - 46,501)	0.8855	4.7	3.3
TAM-DIO3	512	3	0.90 ± 0.11	470.9 (322.0 - 716.9)	31,944 (12,266 - 149,071)	0.7015	2.6	5.0
TAM-RIO1	384	4	1.02 ± 0.11	569.5 (387.9 - 843.4)	22,985 (10,960 - 68,005)	0.3394	3.1	3.6
TAM-VAH1	456	3	1.33 ± 0.23	292.4 (106.3 - 739.9)	5,095 (1,568 - 160,451)	0.0381	1.6	0.8

n= tamaño de muestra, G.L.= Grados de Libertad, b ± E.E.= pendiente ± error estándar de la media, CL₅₀= concentración letal estimada que mata al 50 % de las larvas expuestas, CL₉₅= concentración letal estimada que mata al 95 % de las larvas expuestas, L.F.= Límites Fiduciales a una confiabilidad del 95 %, P≥X²= Probabilidad de que los datos modelen una línea recta. RR₅₀= respuesta relativa al 50 % de mortalidad (CL₅₀ de la población de campo entre CL₅₀ de la población susceptible) y RR₉₅= respuesta relativa al 95 % de mortalidad (CL₉₅ de la población de campo entre CL₉₅ de la población susceptible).

Es posible que algunas poblaciones de campo sufran más estrés que otras en su adaptación a las condiciones de laboratorio (Aguilar, 2006). Entre poblaciones susceptibles se pueden encontrar variaciones en respuesta a insecticidas (Robertson *et al.*, 1995), incluso mayores a las observadas en el presente estudio. Consideramos que en la variación observada a las dos formulaciones de *Bt* no tienen contribución los alelos de resistencia dado que el uso actual de estos productos para el combate de *S. frugiperda* es escaso por su precio al usuario y eficacia moderada.

Estas variaciones naturales o diferencias regionales en la susceptibilidad de *S. frugiperda* a las proteínas de *Bt* también las ha documentado Bohorova *et al.* (1997) y Blanco *et al.* (2016). En otras especies también se han documentado variaciones en la respuesta a las proteínas de *Bt* en poblaciones susceptibles. Marcon *et al.* (1999), reportan una variación de 4× y 6× en la susceptibilidad de *O. nubilalis* a Cry1Ab a nivel de CL₅₀ y CL₉₅, respectivamente, y de 4× a Cry1Ac a nivel de CL₅₀ y CL₉₅. Lozzia y Manachini (2003), encontraron 14.7× de variación en la susceptibilidad de *O. nubilalis* a *Bt* var. *kurstaki* a nivel de CL₅₀. Stone y Sims (1993), indican una variación en susceptibilidad a nivel de CL₅₀ de 3.6 y 8× en *H. virescens* y de 13 y 16× en *H. zea* a Dipel y Cry1Ac, respectivamente. Albernaz *et al.* (2013) observaron una variación de 3.7× en *H. virescens* a Cry1Ac a nivel de CL₅₀ y Chandrashekar *et al.* (2005) documentaron que *H. armigera* mostró diferencias en la susceptibilidad a nivel de CL₅₀ de 10.5× a Cry1Aa, 12.8× a Cry1Ab, 16.2× a Cry1Ac y de 14.1 y 5.7× a *Bt*. var. *kurstaki* HD-1 y HD-73, respectivamente.

Sin embargo, a pesar de que las diferencias en la susceptibilidad entre las poblaciones de ensayo a *Bt* pueden ser significativas, no necesariamente se atribuyen a la expresión de alelos de resistencia (Stone y Sims, 1993). Por tanto, tampoco se pueden asociar directamente a problemas de control en campo (Robertson *et al.*, 1995).

Los bioinsecticidas a base de *Bt* se han utilizado durante muchos años como una alternativa a los insecticidas sintéticos para el control de insectos plaga (Herrero *et al.*, 2016), como el caso de *S. frugiperda* (Silva *et al.*, 2015). Dos de las cepas de *Bt* importantes en el control de plagas de lepidópteros son *Bt* subesp. *aizawai* y *Bt* var. *kurstaki* (Mashtoly *et al.*, 2011).

La cepa de *Bt aizawai* presente en XenTari® DF contiene una mezcla de proteínas Cry1: Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1C y Cry1D y la cepa de *Bt kurstaki* de Dipel® DF contiene una mezcla de proteínas Cry1 y Cry2: Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac y Cry2A (Valent Biosciences, 2009).

Las proteínas Cry1 y Cry2 son dos de las principales familias de proteínas Cry de *Bt* activas contra lepidópteros. Las proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1D y Cry2A son activas contra *Spodoptera* spp. y Cry1C es altamente activa (Valent Biosciences, 2009).

Las proteínas Cry1Ca y Cry1Da tienen actividad contra *S. frugiperda* (Aranda *et al.*, 1996; Porcar *et al.*, 2000; Monnerat *et al.*, 2006; Van Frankenhuyzen, 2009). Sin embargo, Aranda *et al.* (1996), Sena *et al.* (2009) y Van Frankenhuyzen (2009), documentan baja actividad de la proteína Cry1Ab contra *S. frugiperda*. En contraste, Dos Santos *et al.* (2009) mencionan que un estudio realizado en Brasil, la proteína Cry1Ab resultó ser altamente tóxica contra *S. frugiperda*. Van Frankenhuyzen (2009) también indican baja actividad de las proteínas Cry1Aa, Cry1Ac y Cry2Aa y Hernández *et al.* (2013) sostienen lo mismo para las proteínas Cry1Ac y Cry2Ab.

Aranda *et al.* (1996), sostienen que los lepidópteros de la familia Noctuidae son poco susceptibles a la mayoría de las δ -endotoxinas de *Bt*. Blanco *et al.* (2016) hacen la observación de que *S. frugiperda* presenta tolerancia natural a las proteínas Cry. Los productores de la región del

Distrito Federal en Brasil han descrito una eficiencia variable (a veces alta a veces baja) de los productos de *Bt. var. kurstaki* contra *S. frugiperda* y una buena eficiencia de *Bt. subsp. aizawai* (Dos Santos *et al.*, 2009), mientras que Knaak *et al.* (2010) afirman que las proteínas de *Bt. var. kurstaki* son eficaces en el control de *S. frugiperda*.

En este estudio, las larvas neonatas de *S. frugiperda* fueron más susceptibles a XenTari® DF (*Bt. subsp. aizawai*) que a Dipel® DF (*Bt. var. kurstaki*). En general los valores de la CL₅₀ y CL₉₅ de XenTari® DF fueron más bajos que los de Dipel® DF (Cuadro 3 y 4, respectivamente), esto podría explicarse debido a la mayor eficacia de las proteínas que contiene XenTari® DF en comparación con Dipel® DF.

Los resultados obtenidos coinciden con los observados por Martínez *et al.* (2004) quienes detectaron mayor toxicidad de XenTari que de Dipel en *Spodoptera* spp., situación similar documentó Jakka *et al.* (2014) en *S. frugiperda*.

La respuesta de las poblaciones tratadas con XenTari® DF también fue más homogénea, ya que los valores de la pendiente fueron más grandes que los de las poblaciones tratadas con Dipel® DF (Cuadro 3 y 4, respectivamente).

La pendiente indica la homogeneidad o heterogeneidad de la población en su respuesta al insecticida. A mayor pendiente, más homogeneidad y a menor pendiente, más heterogeneidad (Lagunés y Villanueva, 2009).

El método utilizado para los bioensayos fue el de capa y se usaron larvas neonatas. Este método es el más empleado para obtener la estimación de la CL_{50} en bioensayos con lepidópteros (Van Frankenhuyzen, 2009), y el estado de desarrollo más recomendado y utilizado son larvas neonatas (Navon y Klein, 1990; Van Frankenhuyzen, 2009), porque es el estado más susceptible del insecto, el período de bioensayo es más corto y la precisión es mayor debido a que la mortalidad es más uniforme y los intervalos de confianza de la CL_{50} son más pequeños (Navon, 2000).

El método de capa tiene la ventaja de requerir pequeñas cantidades de las proteínas o formulaciones y se obtienen resultados consistentes. Además, este método puede ser utilizado tanto en la búsqueda de nuevos productos como en el monitoreo de las poblaciones de campo para el manejo de la resistencia de las plagas objetivo (Waquil *et al.*, 2004).

Los investigadores a menudo realizan la evaluación a los 7 días después del tratamiento, porque este intervalo de tiempo es suficiente para la ingesta y el efecto de *Bt*. También se ha convertido en un estándar debido a las ventajas logísticas en la programación del trabajo en la semana. Aunque, esto puede no tener una razón biológica (Ali y Luttrell, 2009).

Los estudios sobre la susceptibilidad de *S. frugiperda* a las formulaciones comerciales de *Bt* XenTari[®] DF y Dipel[®] DF son limitados y la mayoría de ellos se han realizado con las proteínas individuales que contienen dichas formulaciones.

Aranda *et al.* (1996), evaluaron proteínas Cry en larvas neonatas de *S. frugiperda*. Las proteínas Cry1C y Cry1D resultaron ser altamente tóxicas, con una CL_{50} de 31 y 77 ng.cm⁻², respectivamente; para las proteínas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac, la CL_{50} fue mayor a los 2000

ng.cm⁻². Sena *et al.* (2009), mencionan también la baja susceptibilidad de las larvas neonatas de *S. frugiperda* a la proteína Cry1Ab con una CL₅₀ de 867 ng.cm⁻² y Waquil *et al.* (2004) de la proteína Cry1Ab con una CL₅₀ estimada de 689.81 ng.cm⁻². Al igual que Aranda *et al.* (1996) Luo *et al.* (1999), encontraron que la proteína Cry1Ac es de baja toxicidad para *S. exigua* y *S. frugiperda* (CL₅₀ > 2,000 ng.cm⁻²), mientras que Cry1Ca fue altamente tóxica para *S. exigua* (CL₅₀ = 127 ng.cm⁻²) y, a diferencia ellos encontraron que Cry1Ca era poco tóxica para *S. frugiperda* (CL₅₀ = 1,144 ng.cm⁻²). Monnerat *et al.* (2006), determinaron la susceptibilidad de poblaciones de *S. frugiperda* de México, Colombia y Brasil a Cry1Ca y Cry1Da, en donde la población de México fue susceptible a ambas proteínas con una CL₅₀ de 42 y 80 ng.cm⁻², respectivamente. La población de Brasil mostró susceptibilidad a Cry1Ca con una CL₅₀ de 84 ng.cm⁻², pero no a Cry1Da (CL₅₀ > 2,000 ng.cm⁻²) y, finalmente la población de Colombia mostró alta susceptibilidad a Cry1Ca y Cry1Da con una CL₅₀ de 21 y 7 ng.cm⁻², respectivamente.

6.2 Inhibición del peso

Se observa claramente el efecto de la exposición de las larvas neonatas de *S. frugiperda* durante siete días a las formulaciones de *Bt* XenTari[®] DF y Dipel[®] DF (Cuadro 5 y 6, respectivamente) sobre la inhibición del peso de las larvas sobrevivientes. Estos resultados muestran la susceptibilidad de *S. frugiperda* a las formulaciones de *Bt* evaluadas.

El porcentaje de inhibición de peso de las larvas neonatas tratadas con XenTari[®] DF varió de 9.4 a 99.9 % y para Dipel[®] DF de 14.6 a 99.9 % (Cuadro 5 y 6, respectivamente). En el caso de Dipel[®] DF con la dosis más alta (24, 873.73 ng.cm⁻²) hubo larvas sobrevivientes en siete

poblaciones (CHI-AHU2, CHI-CUA2, CHI-DEL1, COA-FIM1, TAM-DIO1, TAM-DIO2 y TAM-RIO1), aunque la inhibición de peso de las larvas fue cercana al 100 % (Cuadro 6).

La inhibición del peso se ha usado como respuesta para determinar la susceptibilidad de las proteínas individuales y productos comerciales de *Bt* en *S. frugiperda* (Waquil *et al.*, 2004), *S. exigua* (Tamez *et al.*, 1998; Hernández *et al.*, 2008), *H. virescens* (Sims *et al.*, 1996; Tamez *et al.*, 1998; Ali y Luttrell, 2009; Albernaz *et al.*, 2013), *H. zea* (Sims *et al.*, 1996; Ali y Luttrell, 2009), *H. armigera* (Li y Bouwer, 2012), *Trichoplusia ni* (Hübner) (Tamez *et al.*, 1998) y *O. nubilalis* (Marcon *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2005).

Ali y Luttrell (2009), sugieren la inclusión de la estimación de la inhibición del crecimiento larval como un criterio de respuesta adicional a la mortalidad, debido a que es una variable importante para medir la susceptibilidad de los insectos a *Bt*.

La inhibición de peso fue significativa incluso a dosis bajas, lo que concuerda con Macintosh *et al.* (1990), Sims *et al.* (1996) y Albernaz *et al.* (2013), quienes sostienen que la inhibición del crecimiento larval es un parámetro extremadamente sensible para detectar cambios en la susceptibilidad de los insectos a *Bt*.

Marcon *et al.* (1999), señalan que los datos de inhibición del crecimiento de *O. nubilalis* con las proteínas de *Bt* fueron más sensibles que los datos de mortalidad para detectar los efectos subletales de las proteínas de *Bt*.

Cuadro 5. Porcentaje de inhibición de peso respecto al testigo sin tratar de larvas neonatas de *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith procedentes de Chihuahua, Coahuila, Durango, Sinaloa, Sonora y Tamaulipas, expuestas durante siete días a XenTari® DF.

Dosis (ng.cm ⁻²)	Población								
	Susceptible	Chihuahua			Coahuila			Durango	
	SUS-LAB	CHI-AHU1	CHI-AHU2	CHI-CUA1	CHI-CUA2	CHI-DEL1	COA-FIM1	COA-MAT1	DUR-GPA1
24,873.73									
2,487.37		99.9 ± 0.0 a			99.8 ± 0.0 a				99.8 ± 0.0 a
1,243.69	99.4 ± 0.0 a	99.7 ± 0.1 a	99.7 ± 0.2 a		99.6 ± 0.0 a	99.6 ± 0.1 a	99.2 ± 0.3 a	99.7 ± 0.0 a	98.2 ± 0.0 a
248.74	93.5 ± 1.4 a	95.1 ± 2.2 ab	95.9 ± 0.3 a	97.5 ± 0.9 a	95.6 ± 1.4 a	97.3 ± 0.7 a	91.5 ± 3.3 a	98.3 ± 0.6 a	97.9 ± 0.9 a
124.37	92.9 ± 1.7 a	91.2 ± 1.5 ab	91.0 ± 2.4 ab	96.3 ± 0.8 a	93.5 ± 2.6 a	89.3 ± 2.7 ab	89.9 ± 2.0 a	89.8 ± 1.2 ab	94.1 ± 1.5 a
24.87	63.9 ± 7.0 ab	66.9 ± 8.6 b	75.8 ± 1.7 b	86.6 ± 2.5 a	74.9 ± 2.9 b	72.5 ± 5.8 b	62.1 ± 7.2 b	74.2 ± 5.3 b	71.6 ± 4.1 b
0.25	29.9 ± 10.9b	26.3 ± 11.3c	18.1 ± 5.9 c	37.1 ± 7.5 b	15.0 ± 1.5 c	27.4 ± 9.1 c	34.9 ± 14.9c	17.3 ± 2.1 c	12.5 ± 2.4 c

Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $\alpha=0.05$).

Cuadro 5. Continuación.

Dosis (ng.cm ⁻²)	Población					
	Sinaloa	Sonora		Tamaulipas		
	SIN-CUL1	SON-NAV1	SON-OBR1	TAM-DIO1	TAM-DIO2	TAM-DIO3
24,873.73						
2,487.37						99.8 ± 0.0 a
1,243.69		99.5 ± 0.0 a		99.6 ± 0.0 a	98.9 ± 0.0 a	99.5 ± 0.2 a
248.74	96.9 ± 1.4 a	97.3 ± 0.9 a	98.6 ± 0.5 a	95.2 ± 1.2 a	96.4 ± 0.8 a	96.7 ± 1.5 a
124.37	92.0 ± 1.7 a	94.1 ± 1.0 a	96.4 ± 0.4 a	92.1 ± 2.6 a	89.2 ± 1.7 ab	89.4 ± 4.0 ab
24.87	70.2 ± 5.5 b	69.9 ± 4.6 b	80.5 ± 2.0 b	76.9 ± 0.4 b	59.0 ± 10.4b	66.8 ± 7.6 b
0.25	18.0 ± 6.4 c	33.0 ± 13.1c	24.0 ± 5.1 c	37.6 ± 3.0 c	16.8 ± 21.6c	9.4 ± 5.1 c

Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $\alpha=0.05$).

Cuadro 6. Porcentaje de inhibición de peso respecto al testigo sin tratar de larvas neonatas de *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith procedentes de Chihuahua, Coahuila, Durango, Sinaloa, Sonora y Tamaulipas, expuestas durante siete días a Dipel® DF.

Dosis (ng.cm ⁻²)	Población								
	Susceptible	Chihuahua			Coahuila			Durango	
	SUS-LAB	CHI-AHU1	CHI-AHU2	CHI-CUA1	CHI-CUA2	CHI-DEL1	COA-FIM1	COA-MAT1	DUR-GPA1
24,873.73			99.5 ± 0.0 a		99.7 ± 0.0 ab	99.5 ± 0.0 a	99.5 ± 0.0 a		
2,487.37	99.1 ± 0.2 a	99.5 ± 0.0 a	98.8 ± 0.5 a	99.3 ± 0.5 a	99.8 ± 0.0 a	99.2 ± 0.1 a	99.5 ± 0.2 a	99.3 ± 0.2 a	99.8 ± 0.1 a
1,243.69	99.3 ± 0.1 a	99.9 ± 0.0 a	98.6 ± 0.7 a	99.4 ± 0.2 a	99.2 ± 0.3 ab	99.6 ± 0.2 a	99.0 ± 0.2 a	99.6 ± 0.1 a	99.7 ± 0.1 a
248.74	93.2 ± 3.4 a	97.8 ± 0.7 a	94.7 ± 1.6 a	96.8 ± 0.8 a	97.3 ± 0.7 ab	95.9 ± 2.1 a	96.9 ± 0.7 a	98.3 ± 0.7 a	98.7 ± 0.5 a
124.37	89.6 ± 2.7 ab	95.3 ± 1.5 a	92.0 ± 1.5 ab	94.6 ± 1.3 a	95.8 ± 1.0 ab	95.0 ± 1.6 a	94.8 ± 2.4 a	98.4 ± 0.6 a	93.8 ± 0.6 a
24.87	70.3 ± 4.9 b	86.3 ± 5.1 a	80.7 ± 3.8 b	82.2 ± 1.9 b	88.5 ± 2.7 b	88.1 ± 2.5 a	65.5 ± 11.8ab	83.2 ± 3.5 a	88.0 ± 2.1 a
0.25	29.7 ± 10.3c	25.9 ± 7.5 b	34.8 ± 9.2 c	14.6 ± 10.9c	35.9 ± 3.3 c	32.7 ± 10.6b	47.0 ± 35.3b	33.5 ± 18.6 b	29.1 ± 6.8 b

Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $\alpha=0.05$).

Cuadro 6. Continuación.

Dosis (ng.cm ⁻²)	Población							
	Sinaloa	Sonora			Tamaulipas			
	SIN-CUL1	SON-NAV1	SON-OBR1	TAM-DIO1	TAM-DIO2	TAM-DIO3	TAM-RIO1	TAM-VAH1
24,873.73				99.8 ± 0.0 a	99.6 ± 0.0 a		99.9 ± 0.0 a	
2,487.37	99.5 ± 0.1 a	99.8 ± 0.0 a	99.5 ± 0.0 a	99.4 ± 0.2 a	99.4 ± 0.3 a	98.9 ± 0.7 a	99.4 ± 0.4 a	99.3 ± 0.3 ab
1,243.69	98.7 ± 0.5 a	99.3 ± 0.3 a	99.6 ± 0.0 a	98.8 ± 0.4 a	98.8 ± 0.3 a	99.0 ± 0.2 a	98.9 ± 0.5 a	99.4 ± 0.2 a
248.74	97.9 ± 0.5 a	98.9 ± 0.3 a	97.5 ± 0.5 ab	98.2 ± 0.2 a	96.4 ± 0.5 a	95.8 ± 0.5 a	96.8 ± 0.7 a	96.8 ± 0.8 ab
124.37	95.7 ± 1.1 a	97.5 ± 0.4 a	94.2 ± 1.7 ab	96.4 ± 1.4 a	92.1 ± 1.9 a	94.0 ± 2.6 a	91.8 ± 0.9 a	93.2 ± 2.0 ab
24.87	80.4 ± 2.7 b	92.6 ± 0.7 a	86.5 ± 2.0 b	82.4 ± 2.4 b	80.9 ± 3.6 a	74.4 ± 2.7 b	77.9 ± 7.3 a	84.5 ± 3.7 b
0.25	25.4 ± 4.8 c	30.9 ± 5.0 b	35.4 ± 4.2 c	46.0 ± 1.9 c	28.0 ± 11.5b	19.9 ± 8.2 c	45.8 ± 18.2b	30.7 ± 9.7 c

Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $\alpha=0.05$).

Existen estudios donde estiman la concentración que se requiere para reducir el 50 % del peso de larvas en comparación con el testigo (CE₅₀) (Macintosh *et al.*, 1990; Marcon *et al.*, 1999; Hernández *et al.*, 2008; Albernaz *et al.*, 2013), indicando que el análisis Probit puede ser apropiado para evaluar dicha respuesta. Sin embargo, en este estudio se realizó una prueba de comparación de medias para dicha variable, dado que se consideró a la mortalidad como el principal criterio de respuesta y las dosis intermedias se ajustaron a dicho criterio.

Waquil *et al.* (2004) obtuvieron una variación de 32 a 96 % en la inhibición del crecimiento larval de *S. frugiperda* con la proteína Cry1Ab y aplicando el valor de la CL₅₀ (689.81 ng.cm⁻²) obtuvieron una inhibición del 91.61 %. Hernández *et al.* (2008) evaluaron la actividad de proteínas Cry contra larvas de *S. exigua*. Los resultados que obtuvieron difieren de los observados en los ensayos de mortalidad. Las proteínas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac produjeron una inhibición del crecimiento similar (los valores de la CE₅₀ oscilaron entre 40 a 75 ng.cm⁻²) a los de las proteínas Cry1Ca y Cry1Da (los valores de la CE₅₀ estuvieron entre 14 a 88 ng.cm⁻²) que se encontraron más eficaces en las pruebas de mortalidad. Cry2Aa que fue clasificada como no tóxica en los bioensayos de mortalidad (CL₅₀ > 5,000 ng.cm⁻²) tuvo un efecto más bajo, pero claro sobre la inhibición del crecimiento larval con un valor de la CE₅₀ de 200 ng.cm⁻² y Albernaz *et al.* (2013) evaluaron la susceptibilidad de *H. virescens* a la proteína Cry1Ac, los valores de la CE₅₀ fueron inferiores a los valores de la CL₅₀. La inhibición del crecimiento larval se detectó incluso cuando las larvas neonatas fueron expuestas a concentraciones muy bajas de la proteína.

6.3. Larvas que llegaron al tercer instar

El porcentaje de larvas que llegaron al tercer instar después de haber sido expuestas durante siete días a las formulaciones de *Bt* XenTari[®] DF y Dipel[®] DF se presenta en el Cuadro 7 y 8, respectivamente.

En el caso de XenTari[®] DF con las dosis de 2,487.37 a 0.25 ng.cm⁻², el porcentaje de larvas que llegaron al tercer instar varió de cero hasta 100 %. En el testigo del 76.56 al 100 % de las larvas alcanzaron el tercer instar (Cuadro 7).

En el caso de Dipel[®] DF con la dosis más alta (24,873.73 ng.cm⁻²) hubo larvas del tercer instar en tres poblaciones (CHI-AHU2, TAM-DIO2 y TAM-RIO1). Aunque, el porcentaje fue muy bajo, en todos los casos del 6.25 %. Con las dosis de 2,487.37 a 0.25 ng.cm⁻² el porcentaje de larvas en tercer instar varió de cero a 100 %. En el testigo este porcentaje estuvo entre 78.13 a 100 % (Cuadro 8).

Huang *et al.* (2005) mencionan que el desarrollo larvario de *O. nubilalis* se retrasó significativamente cuando las larvas se alimentaron con dieta que contenía dosis bajas de Dipel. Ali y Luttrell (2009) documentan que el crecimiento de las larvas de *H. zea* y *H. virescens* que sobrevivieron después de siete días a la exposición de la proteína Cry1Ac fue significativamente afectado. Muchas de las larvas atrofiadas sufren efectos crónicos debido a la exposición inicial a *Bt* y no logran llegar a pupa.

Cuadro 7. Porcentaje de larvas de *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith que llegaron al tercer instar procedentes de Chihuahua, Coahuila, Durango, Sinaloa, Sonora y Tamaulipas, expuestas durante siete días a Xentari[®] DF.

Dosis (ng.cm ⁻²)	Población							
	Susceptible	Chihuahua			Coahuila			
	SUS-LAB	CHI-AHU1	CHI-AHU2	CHI-CUA1	CHI-CUA2	CHI-DEL1	COA-FIM1	COA-MAT1
24,873.73								
2,487.37		0.00 ± 0.0 a			0.00 ± 0.0 a			
1,243.69	0.00 ± 0.0 a	2.08 ± 2.1 a	3.13 ± 3.1 a		6.25 ± 0.0 a	0.00 ± 0.0 a	0.00 ± 0.0 a	0.00 ± 0.0 a
248.74	17.19 ± 3.9 ab	27.23 ± 6.7 b	33.33 ± 3.9 b	17.19 ± 7.8 a	28.13 ± 6.0 a	9.38 ± 1.8 ab	34.38 ± 7.4 b	10.94 ± 3.9 ab
124.37	20.31 ± 3.9 ab	39.06 ± 3.0 b	44.06 ± 10.3 b	25.00 ± 2.6 a	37.50 ± 10.8 a	29.69 ± 5.3 b	42.19 ± 7.4 b	35.94 ± 3.9 bc
24.87	46.88 ± 10.7 bc	81.25 ± 6.8 c	87.50 ± 5.7 c	53.13 ± 5.4 b	82.81 ± 5.3 b	54.69 ± 7.8 c	75.00 ± 3.6 c	56.25 ± 5.7 cd
0.25	70.31 ± 6.4 c	92.19 ± 1.6 c	98.44 ± 1.6 c	92.19 ± 3.0 c	100.00 ± 0.0 b	95.31 ± 3.0 d	87.50 ± 4.4 c	78.13 ± 5.4 de
Testigo	76.56 ± 1.6 c	98.44 ± 1.6 c	98.44 ± 1.6 c	98.44 ± 1.6 c	100.00 ± 0.0 b	96.88 ± 1.8 d	90.63 ± 6.0 c	84.38 ± 4.0 e

Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $\alpha=0.05$).

Cuadro 7. Continuación.

Dosis (ng.cm ⁻²)	Población						
	Durango	Sinaloa	Sonora		Tamaulipas		
	DUR-GPA1	SIN-CUL1	SON-NAV1	SON-OBR1	TAM-DIO1	TAM-DIO2	TAM-DIO3
24,873.73							
2,487.37	0.00 ± 0.0 a						6.25 ± 0.0 a
1,243.69	6.25 ± 0.0 a		0.00 ± 0.0 a		6.25 ± 0.0 a	6.25 ± 0.0 a	9.38 ± 3.1 a
248.74	7.81 ± 3.9 a	6.25 ± 3.4 a	6.25 ± 2.6 a	9.38 ± 4.0 a	35.42 ± 8.3 ab	25.00 ± 4.4 ab	29.69 ± 11.8 a
124.37	21.88 ± 6.0 a	16.25 ± 1.5 a	14.06 ± 3.0 a	31.25 ± 2.6 b	54.17 ± 11.6 bc	46.88 ± 8.3 b	50.00 ± 12.2 ab
24.87	71.88 ± 6.0 b	50.00 ± 7.1 b	79.69 ± 9.0 b	87.50 ± 8.8 c	91.67 ± 5.5 cd	76.56 ± 1.6 c	85.94 ± 3.9 b
0.25	98.44 ± 1.6 b	95.00 ± 3.6 c	98.44 ± 1.6 b	100.00 ± 0.0 c	100.00 ± 0.0 d	89.06 ± 3.0 c	93.75 ± 2.6 b
Testigo	95.31 ± 3.0 b	97.50 ± 2.5 c	96.88 ± 3.1 b	96.88 ± 1.8 c	100.00 ± 0.0 d	95.31 ± 3.0 c	93.75 ± 2.6 b

Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $\alpha=0.05$).

Cuadro 8. Porcentaje de larvas de *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith que llegaron al tercer instar procedentes de Chihuahua, Coahuila, Durango, Sinaloa, Sonora y Tamaulipas, expuestas durante siete días a Dipel® DF.

Dosis (ng.cm ⁻²)	Población							
	Susceptible	Chihuahua			Coahuila			
	SUS-LAB	CHI-AHU1	CHI-AHU2	CHI-CUA1	CHI-CUA2	CHI-DEL1	COA-FIM1	COA-MAT1
24,873.73			6.25 ± 0.0 a		0.00 ± 0.0 a	0.00 ± 0.0 a	0.00 ± 0.0 a	
2,487.37	0.00 ± 0.0 a	0.00 ± 0.0 a	4.17 ± 2.1 a	8.33 ± 8.3 a	3.13 ± 3.1 ab	0.00 ± 0.0 a	3.13 ± 3.1 a	3.13 ± 3.1 a
1,243.69	0.00 ± 0.0 a	0.00 ± 0.0 a	8.33 ± 5.5 a	6.25 ± 0.0 a	7.81 ± 1.6 ab	0.00 ± 0.0 a	0.00 ± 0.0 a	3.13 ± 3.1 a
248.74	9.38 ± 4.0 a	12.50 ± 3.6 ab	26.56 ± 7.8 ab	17.19 ± 5.3 a	20.31 ± 3.0 bc	14.06 ± 5.9 ab	21.88 ± 5.4 a	10.42 ± 5.5 a
124.37	18.75 ± 4.4 a	20.31 ± 5.3 ab	40.63 ± 7.9 ab	31.25 ± 8.5 a	34.38 ± 4.0 c	15.63 ± 4.0 ab	28.13 ± 6.0 a	20.83 ± 7.5 ab
24.87	54.69 ± 3.9 b	53.13 ± 14.1 bc	62.50 ± 9.2 bc	65.63 ± 11.6 b	64.06 ± 6.4 d	31.25 ± 9.2 b	64.06 ± 4.7 b	47.92 ± 4.2 bc
0.25	79.69 ± 1.6 c	87.50 ± 4.4 c	87.50 ± 4.4 c	96.88 ± 1.8 b	100.00 ± 0.0 e	79.69 ± 3.0 c	82.81 ± 5.3 b	81.25 ± 12.5 c
Testigo	84.38 ± 6.5 c	96.88 ± 1.8 c	95.31 ± 3.0 c	95.31 ± 1.6 b	98.44 ± 1.6 e	93.75 ± 2.6 c	78.13 ± 7.4 b	83.33 ± 2.1 c

Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $\alpha=0.05$).

Cuadro 8. Continuación.

Dosis (ng.cm ⁻²)	Población								
	Durango	Sinaloa	Sonora		Tamaulipas				
	DUR-GPA1	SIN-CUL1	SON-NAV1	SON-OBR1	TAM-DIO1	TAM-DIO2	TAM-DIO3	TAM-RIO1	TAM-VAH1
24,873.73					0.00 ± 0.0a	6.25 ± 0.0a		6.25 ± 0.0a	
2,487.37	0.00 ± 0.0a	0.00 ± 0.0a	0.00 ± 0.0a	3.13 ± 3.1a	16.67 ± 5.5ab	15.63 ± 8.3a	12.50 ± 3.6a	29.17 ± 8.3a	8.93 ± 2.7a
1,243.69	0.00 ± 0.0a	0.00 ± 0.0a	6.25 ± 6.3a	2.08 ± 2.1a	25.00 ± 3.6ab	26.56 ± 5.3ab	12.50 ± 3.6a	27.08 ± 5.5a	14.84 ± 3.3a
248.74	9.38 ± 5.4ab	1.25 ± 1.3a	9.38 ± 4.0a	17.19 ± 6.9ab	25.00 ± 7.2ab	56.25 ± 6.8bc	39.06 ± 6.9a	68.75 ± 6.3b	41.90 ± 4.8b
124.37	29.69 ± 3.9bc	2.50 ± 1.5a	28.13 ± 4.0b	39.06 ± 10.3bc	44.03 ± 16.3b	67.19 ± 10.3cd	39.06 ± 6.9a	75.00 ± 7.2b	80.33 ± 3.6c
24.87	50.00 ± 9.2c	43.75 ± 8.4b	48.44 ± 3.0c	67.19 ± 4.7c	93.75 ± 0.0 c	89.06 ± 6.9cd	70.31 ± 9.3b	83.33 ± 4.2b	80.82 ± 6.3cd
0.25	96.88 ± 1.8d	91.25 ± 3.2c	98.44 ± 1.6d	98.44 ± 1.6d	100.00 ± 0.0c	95.31 ± 1.6d	92.19 ± 4.7b	89.58 ± 2.1b	98.44 ± 1.6de
Testigo	98.44 ± 1.6d	96.25 ± 2.5c	100.00 ± 0.0d	100.00 ± 0.0d	100.00 ± 0.0c	93.75 ± 2.6d	93.75 ± 2.6b	97.92 ± 2.1b	100.00 ± 0.0e

Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $\alpha=0.05$).

7. CONCLUSIONES

1. En el seguimiento de los cambios en la susceptibilidad de *S. frugiperda* a *Bt*, además de la evaluación de la mortalidad se recomienda incluir como criterios de respuesta adicionales la evaluación de la inhibición peso de las larvas sobrevivientes y larvas que llegan a desarrollarse al tercer instar.
2. Los datos de variación en susceptibilidad que se observaron con XenTari[®] DF y Dipel[®] DF se pueden considerar como variación natural dado que las poblaciones evaluadas no están sometidas a presión de selección con proteínas de *Bt*.
3. Las larvas neonatas de *S. frugiperda* fueron más susceptibles a XenTari[®] DF (*Bt* subsp. *aizawai*) que a Dipel[®] DF (*Bt* var. *kurstaki*).
4. Es posible que, en el futuro, cuando se utilicen más las formulaciones comerciales a base de *Bt*, aunado al posible uso de cultivos transgénicos con resistencia cruzada, las poblaciones de *S. frugiperda* sean seleccionadas de manera intensa sobre superficies extensas. De ocurrir este escenario, los valores documentados en el presente estudios servirán de referente de susceptibilidad.

8. LITERATURA CITADA

- Abbott, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18(2): 265-267.
- Aguilar, M. S. 2006. Susceptibilidad de poblaciones mexicanas de *Helicoverpa zea* (Boddie) a las δ -endotoxinas Cry1Ac y Cry2Ab de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Berliner), y acción conjunta de ambas δ -endotoxinas en *H. zea*, *Heliothis virescens* (Fabricius), y *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Tesis de Doctorado. Montecillo, Texcoco, Estado de México. 99p.
- Aguilar, M. S., M. J. C. Rodríguez, G. O. Díaz, C. J. L. Martínez, C. J. López, C. A. Blanco, y T. A. Lagunes. 2007. Susceptibilidad de *Helicoverpa zea* (Boddie) a la δ -endotoxina Cry2Ab de *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Agrociencia*, 41(6): 653-662.
- Akhurst, R. J., W. James, L. J. Bird, and C. Beard. 2003. Resistance to the Cry1Ac delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, 96(4): 1290-1299.
- Albernaz, K. C., B. L. Merlin, S. Martinelli, G. P. Head, and C. Omoto. 2013. Baseline susceptibility to Cry1Ac insecticidal protein in *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Brazil. *Journal of Economic Entomology*, 106 (4): 1819-1824.
- Ali, M. I., and R. G. Luttrell. 2009. Response estimates for assessing Heliothine susceptibility to Bt toxins. *Journal of Economic Entomology*, 102(5): 1935-1947.
- Anilkumar, K. J., S. A. Rodrigo, J. Ferré, C. M. Puztai, S. Sivasupramaniam, and W. J. Moar. 2008. Production and characterization of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac-resistant cotton bollworm *Helicoverpa zea* (Boddie). *Applied and Environmental Microbiology*, 74(2): 462-469.

- Ansari, M. S., S. Ahmad, N. Ahmad, T. Ahmad, and F. Hasan. 2013. Microbial insecticide: Food security and human health. 341-360p. In: Malik, A., E. Grohmann, and M. Alves. 2013. Management of Microbial Resources in the Environment. Springer. 530p.
- Aranda, E., J. Sánchez, M. Peferoen, L. Güereca, and A. Bravo. 1996. Interactions of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with the midgut epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Journal of Invertebrate Pathology, 68: 203–212.
- Blanco, C. A., J. G. Pellegaud, C. U. Nava, B. D. Lugo, A. P. Vega, J. Coello, V. A. P. Terán, and C. J. Vargas. 2014. Maize pests in Mexico and challenges for the adoption of integrated pest management programs. Journal of Integrated Pest Management, 5(4): 1-9.
- Blanco, C. A., M. Portilla, F. J. L. Jurat, J. F. Sánchez, D. Viteri, A. P. Vega, V. A. P. Terán, D. A. Azuara, J. D. López, R. S. Arias *et al.* 2010. Susceptibility of isofamilies of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to Cry1Ac and Cry1Fa proteins of *Bacillus thuringiensis*. Southwestern Entomologist, 35(3): 409–415.
- Blanco, C. A., W. Chiaravalle, R. M. Dalla, J. R. Farías, D. M. F. García *et al.* 2016. Current situation of pests targeted by Bt crops in Latin America. Current Opinion in Insect Science, 15: 131–138.
- Bohorova, N., M. Cabrera, C. Abarca, R. Quintero, A. M. Maciel, R. M. Brito, D. Hoisington, and A. Bravo. 1997. Susceptibility of four tropical lepidopteran maize pest to *Bacillus thuringiensis* CryI-type insecticidal toxins. Journal of Economic Entomology, 90(2): 412-415.
- Brar, S. K., M. Verma, R. D. Tyagi, and J. R. Valero. 2006. Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. Process Biochemistry, 41: 323–342.

- Bravo, A., S. S. Gill, and M. Soberón. 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49(4): 423–435.
- CABI. 2017. *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm). Datasheets. Invasive Species Compendium. En línea: <http://www.cabi.org/isc/datasheet/29810> (Fecha de consulta: 19-01-17).
- Capinera, J. L. 2014. Fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). EENY098. University of Florida. 6p.
- Carballo, M., E. Hidalgo, y P. J. A. Lopez. 2004. Control biológico de insectos mediante bacterias. En: Carballo, M., y F. Guaharay (Ed.). 2004. Control Biológico de Plagas Agrícolas. Manual Técnico No. 53. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Managua. 224p.
- Casmuz, A., M. L. Juárez, M. G. Socías, M. G. Murúa, S. Prieto, S. Medina, E. Willink, y G. Gastaminza. 2010. Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 69 (3-4): 209-231.
- Chandrashekar, K., A. Kumari, V. Kalia, and G. T. Gujar. 2005. Baseline susceptibility of the american bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) to *Bacillus thuringiensis* Berl var. *kurstaki* and its endotoxins in India. *Current Science*, 88(1): 167-175.
- Crickmore, N., D. R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, and D. H. Dean. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3): 807–813.
- Crickmore, N., J. Baum, A. Bravo, D. Lereclus, K. Narva, K. Sampson, E. Schnepf, M. Sun, and D. R. Zeigler. 2016. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. En línea: <http://www.btnomenclature.info/> (Fecha de Consulta: 19-01-17)

- Del Rincón, C. M. C., L. J. Méndez, y J. E. Ibarra. 2006. Caracterización de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* con actividad insecticida hacia el gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Folia Entomológica Mexicana*, 45(2): 157-164.
- Dhingra, S., and P. Sarup. 1990. Development of techniques for detecting resistance in crop pests to insecticides. *Journal of Entomological Research*, 14(2): 156-163.
- Dhurua, S., and G. T. Gujar. 2011. Field-evolved resistance to Bt toxin Cry1Ac in the pink bollworm, *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera: Gelechiidae), from India. *Pest Management Science*, 67(8): 898-903.
- Dos Santos, K. B., P. Neves, A. M. Meneguim, R. B. Dos Santos, W. J. Dos Santos, B. G. Villas, V. Dumas, E. Martins, P. L. Botelho, P. Queiroz, C. Berry, and R. Monnerat. 2009. Selection and characterization of the *Bacillus thuringiensis* strains toxic to *Spodoptera eridania* (Cramer), *Spodoptera cosmioides* (Walker) and *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Biological Control*, 50: 157–163.
- Estruch, J. J., G. W. Warren, M. A. Mulling, G. J. Nye, J. A. Craig, and M. G. Koziel. 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93: 5389-5394.
- Federici, B. 1998. Transgenic Bt crops and resistance: Broadscale use of pest-killing plants to be true test. *California Agriculture*, 52(6): 14-20.
- Feitelson, J. S. 1993. The *Bacillus thuringiensis* Family Tree. 63-72p. En: Kim, L. (Ed.). 1993. *Advanced Engineered Pesticides*. Marcel Dekker, Inc. USA. 448p.
- Fernández, O., y L. Vega. 2002. Tecnologías de producción de *Bacillus thuringiensis*. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)*, 64: 110-115.

- Gassmann, A. J., M. J. L. Petzold, R. S. Keweshan, and M. W. Dunbar. 2011. Field-evolved resistance to Bt maize by western corn rootworm. *PLoS One*, 6(7): e22629.
- Gill, S. S., E. A. Cowles, and P. V. Pietrantonio. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu. Rev. Entomol.*, 37: 615-636.
- González, M. A., y C. J. F. Ávila, 2014. El maíz en Estados Unidos y en México. Hegemonía en la producción de un cultivo. *Argumentos*, 27(75): 215-237.
- Gujar, G. T., V. Kalia, A. Kumari, B. P. Singh, A. Mittal, R. Nair, and M. Mohan. 2007. *Helicoverpa armigera* baseline susceptibility to *Bacillus thuringiensis* Cry toxins and resistance management for Bt cotton in India. *Journal of Invertebrate Pathology*, 95: 214-219.
- Hernández, M. P., J. Ferré, and B. Escriche. 2008. Susceptibility of *Spodoptera exigua* to 9 toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 97: 245–250.
- Hernández, R. C. S., M. P. Hernández, J. Van Rie, B. Escriche, and J. Ferré. 2013. Shared midgut binding sites for Cry1A.105, Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac and Cry1Fa proteins from *Bacillus thuringiensis* in two important corn pests, *Ostrinia nubilalis* and *Spodoptera frugiperda*. *PLoS ONE*, 8(7): e68164.
- Herrero, S., Y. Bel, M. P. Hernández, and J. Ferré. 2016. Susceptibility, mechanisms of response and resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Spodoptera* spp. *Current Opinion in Insect Science*, 15: 89-96.
- Hofte, H., and H. R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews*, 53(2): 242–255.
- Huang, F., J. A. Qureshi, R. L. Meagher, D. D. Reising, G. P. Head *et al.* 2014. Cry1F Resistance in fall armyworm *Spodoptera frugiperda*: Single gene versus pyramided Bt maize. *PLoS ONE*, 9(11): e112958.

- Huang, F., L. L. Buschman and R. A. Higgins. 2005. Larval survival and development of susceptible and resistant *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae) on diet containing *Bacillus thuringiensis*. *Agricultural and Forest Entomology*, 7: 45–52.
- Huang, F., L. L. Buschman, R. A. Higgins, and W. H. McGaughey. 1999. Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin (Dipel ES) in the European corn borer. *Science*, 284: 965-967.
- Ibarra, J. E., y C. M. C. Del Rincón. 2015. Análisis e integración de la información sobre OGMs con eventos Bt.: Reporte final sobre el análisis de riesgo por su liberación. CINVESTAV. Irapuato, Gto. México. 48p.
- Ibrahim, M. A., N. Griko, M. Junker, and L. A. Bulla. 2010. *Bacillus thuringiensis*: A genomics and proteomics perspective. *Bioengineered Bugs*, 1(1):31-50.
- Jakka, S. R. K., V. R. Knight, and F. J. L. Jurat. 2014. *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) with field-evolved resistance to *Bt* maize are susceptible to *Bt* pesticides. *Journal of Invertebrate Pathology*, 122: 52-54.
- Knaak, N., A. R. Franz, G. F. Santos, and L. M. Fiuza. 2010. Histopathology and the lethal effect of Cry proteins and strains of *Bacillus thuringiensis* Berliner in *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith caterpillars (Lepidoptera, Noctuidae). *Brazilian Journal of Biology*, 70(3): 677-684.
- Lagunés, T. A., y J. J. A. Villanueva. 2009. Toxicología y Manejo de Insecticidas. Colegio de Postgraduados. México. 110p.
- Lecadet, M. M., E. Frachon, V. C. Dumanoir, H. Ripouteau, S. Hamon, P. Laurent, and I. Thiery. 1999. Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Applied Microbiology*, 86: 660-672.

- Li, H., and G. Bouwer. 2012. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry proteins to *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in South Africa. *Journal of Invertebrate Pathology*, 109: 110–116.
- Li, H., B. Oppert, R. A. Higgins, F. Huang, L. L. Buschman, and Z. K. Yan. 2005. Susceptibility of Dipel-resistant and susceptible *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) to individual *Bacillus thuringiensis* protoxins. *Journal of Economic Entomology*, 98(4): 1333-1340.
- Liu, F., Z. Xu, Y. C. Zhu, F. Huang, Y. Wang, H. Li, C. Gao, W. Zhou, and J. Shen. 2010. Evidence of field-evolved resistance to Cry1Ac-expressing Bt cotton in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in northern China. *Pest Management Science*, 66(2): 155-161.
- Lozzia, C. G., and B. Manachini. 2003. Susceptibility of *Ostrinia nubilalis* to *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *Bulletin of Insectology*, 56(2): 215-219.
- Luo, K., D. Banks, and M. J. Adang. 1999. Toxicity, binding, and permeability analyses of four *Bacillus thuringiensis* Cry1 δ -endotoxins using brush border membrane vesicles of *Spodoptera exigua* and *Spodoptera frugiperda*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(2): 457–464.
- Macintosh, S. C., T. B. Stone, S. R. Sims, P. L. Hunst, J. T. Greenplate, P. G. Marrone, F. J. Perlak, D. A. Fischhoff, and R. L. Fuchs. 1990. Specificity and efficacy of purified *Bacillus thuringiensis* proteins against agronomically important insects. *Journal of Invertebrate Pathology*, 56: 258–266.
- Marcon, P. C. R. G., L. J. Young, K. L. Steffey, and B. D. Siegfried. 1999. Baseline susceptibility of european corn borer (Lepidoptera: Crambidae) to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Journal of Economic Entomology*, 92(2): 279-285.

- Martínez, C., M. Porcar, A. López, de E. I. Ruiz, Ll. F. J. Pérez, and P. Caballero. 2004. Characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain with a broad spectrum of activity against lepidopteran insects. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 111: 71–77.
- Mashtoly, T. A., A. Abolmaaty, M. S. El-Zemaity, M. I. Hussien, and S. R. Alm. 2011. Enhanced toxicity of *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* and *aizawai* to black cutworm larvae (Lepidoptera: Noctuidae) with *Bacillus* sp. NFD2 and *Pseudomonas* sp. FNFD1. *Journal of Economic Entomology*, 104(1): 41-46.
- McGaughey, W. H. 1985. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science*, 229: 193-195.
- McGaughey, W. H., and R. W. Beeman. 1988. Resistance to *Bacillus thuringiensis* in colonies of indianmeal moth and almond moth (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Economic Entomology*, 81(1): 28-33.
- McLeod, R., B. Moisset, M. Quinn, M. Heiman, R. L. Zimlich, M. Oconnor, R. Hardy, and K. Austin. 2017. *Spodoptera frugiperda* - Fall Armyworm. BugGuide. Identification, images, and information for insects, spiders and their kin for the United States and Canada. Iowa State University. <http://bugguide.net/node/view/40787> (Fecha de consulta: 21-01-17).
- Milner, R. J. 1994. History of *Bacillus thuringiensis*. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 49: 9-13.
- Moar, W. J., C. M. Puzstai, H. Van Faassen, D. Bosch, R. Frutos, C. Rang, K. Luo, and M. J. Adang. 1995. Development of *Bacillus thuringiensis* Cry1C resistance by *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera, Noctuidae). *Applied and Environmental Microbiology*, 61(6): 2086-2092.
- Monnerat, R., E. Martins, C. Macedo, P. Queiroz, L. Praça, C. M. Soares, H. Moreira, I. Grisi, J. Silva, M. Soberón, and A. Bravo. 2015. Evidence of field-evolved resistance of *Spodoptera*

- frugiperda* to Bt corn expressing Cry1F in Brazil that is still sensitive to modified Bt toxins. PLoS ONE 10(4): e0119544.
- Monnerat, R., E. Martins, P. Queiroz, S. Ordúz, G. Jaramillo *et al.* 2006. Genetic variability of *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Latin America is associated with variations in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* Cry Toxins. Applied and Environmental Microbiology, 72(11): 7029–7035.
- Nava, P. E., G. C. García, B. J. R. Camacho, y M. E. L. Vázquez. 2012. Bioplaguicidas: una opción para el control biológico de plagas. Ra Ximhai, 8: 17-29.
- Navon, A. 2000. Bioassays of *Bacillus thuringiensis* products used against agricultural pests. 1-24p. In: Navon, A. and K. R. S. Ascher. (Eds.). 2000. Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes. CABI Publishing. 324p.
- Navon, A., and M. Klein. 1990. *Bacillus thuringiensis* potency bioassays against *Heliothis armigera*, *Earias insulana*, and *Spodoptera littoralis* larvae based on standardized diets. Journal of Invertebrate Pathology, 55: 387-393.
- Ordúz, P. S. 1992. *Bacillus thuringiensis*: Aspectos generales y biología molecular. Revista Palmas, 13(4): 7-14.
- Porcar, M., C. Martínez, and P. Caballero. 2000. Host range and gene contents of *Bacillus thuringiensis* strains toxic towards *Spodoptera exigua*. Entomologia Experimentalis et Applicata, 97: 339–346.
- Raymond, B., P. R. Johnston, C. Nielsen-LeRoux, D. Lereclus, and N. Crickmore. 2010. *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen. Trends in Microbiology, 18(5): 189-194.
- Robertson, J. L., and H. K. Preisler. 1992. Pesticide Bioassay with Arthropods. CRC Press, USA. 127p.

- Robertson, J. L., H. K. Preisler, S. S. Ng, L. A. Hickie, and W.D. Gelernter. 1995. Natural variation: a complicating factor in bioassays with chemical and microbial pesticides. *Journal of Economic Entomology*, 88(1):1–10.
- Rosas, G. N. M. 2014. *Bacillus thuringiensis*: una aplicación de la ciencia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 16(2): 5-6.
- SAGARPA. 2012. Línea de acción: Determinación del nivel riesgo fitosanitario para los cultivos de importancia económica en México. Subsecretaría de Fomento a los Agronegocios. Dirección General de estudios Agropecuarios y Pesqueros. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 64p.
- SAGARPA. 2013. Agricultura de Autoconsumo. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). En línea: <http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/oaxaca/Paginas/Autoconsumo2013.aspx> (Fecha de Consulta: 20-01-17).
- SAGARPA-SENASICA-SEDEREC. 2009. Programa de Trabajo de la Campaña Manejo Fitosanitario de Maíz, a operar con recursos del componente Sanidad e Inocuidad del Programa de Soporte, 2009. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). Secretaría de Desarrollo Rural y Equidad para las Comunidades (SEDEREC). 24p.
- Sanahuja, G., R. Banakar, R. M. Twyman, T. Capell, and P. Christou. 2011. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnology Journal*, 9: 283–300.
- Sanchis, V. 2011. From microbial sprays to insect-resistant transgenic plants: history of the biopesticide *Bacillus thuringiensis*. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 31: 217–231.

- SAS Institute. 2002. SAS versión 9.0. SAS Institute, Cary, NC, USA.
- Sauka, D. H., y G. B. Benintende. 2008. *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Revista Argentina de Microbiología*, 40: 124-140.
- Saunders, J. L., D. T. Coto, y A. B. S. King. 1998. *Plagas Invertebradas de Cultivos Anuales Alimenticios en América Central*. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Turrialba Costa Rica. 305p.
- Sena, J. A. D., R. C. S. Hernández, and J. Ferré. 2009. Interaction of *Bacillus thuringiensis* Cry1 and Vip3A proteins with *Spodoptera frugiperda* midgut binding sites. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(7): 2236–2237.
- SIAP. 2017. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). En línea: http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/ientidad/index.jsp (Fecha de Consulta: 20-01-17).
- Silva, M.C., H. A. A. Siqueira, L. M. Silva, E. J. Marqués, and R. Barros. 2015. Cry proteins from *Bacillus thuringiensis* active against diamondback moth and fall armyworm. *Neotropical Entomology*, 44: 392-401.
- Sims, S. B., J. T. Greenplate, T. B. Stone, M. A. Caprio, and F. L. Gould. 1996. Monitoring strategies for early detection of Lepidoptera resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins. pp. 229-242. In: Brown, T. M. (Edit.). 1996. *Molecular genetics and evaluation of pesticide resistance*. American Chemical Society Symposium. Series No. 645. Washington, DC.
- Soberón, M., y A. Bravo. 2007. Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación. *Biotecnología*, 14: 303- 314.

- Stone, T. B., and S. R. Sims. 1993. Geographic susceptibility of *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) to *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Economic Entomology*, 86(4): 989-994.
- Storer, N. P., J. M. Babcock, M. Schlenz, T. Meade, G. D. Thompson, J. W. Bing, and R. M. Huckaba. 2010. Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. *Journal of Economic Entomology*, 103(4): 1031-1038.
- Tabashnik, B. E., N. Finson, M. W. Johnson, and D. G. Heckel. 1994. Cross-resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin CryIF in the diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Applied Environmental Microbiology*, 60(12): 4627-4629.
- Tabashnik, B. E., N. L. Cushing, N. Finson, and M. W. Johnson. 1990. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Journal of Economic Entomology*, 83(5):1671-1676.
- Tamez, G. P., F. R. Castro, R. H. Medrano, M. R. McGuire, W. L. J. Galán, and O. H. A. Luna. 1998. Laboratory and field comparisons of strains of *Bacillus thuringiensis* for activity against noctuid larvae using granular formulations (Lepidoptera). *Journal of Economic Entomology*, 91(1): 86-93.
- Tamez, G. P., M. R. McGuire, R. W. Behle, B. S. Shasha, and W. L. J. Galañ. 2000. Assessment of microencapsulated formulations for improved residual activity of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Economic Entomology*, 93(2): 219-225.
- Valent Biosciences. 2009. What makes DiPel® DF Biological Insecticide and XenTari® DF Biological Insecticide superior products. 2p. En línea: <https://microbials.valentbiosciences.com/docs/ag-microbials-resources-library/xentari-prototoxin-blend-technical-bulletin-ag-5398> (Fecha de Consulta: 20-01-17).

- Van Frankenhuyzen, K. 2009. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology*, 101: 1–16.
- Van Rensburg, J. B. J. 2007. First report of field resistance by the stem borer, *Busseola fusca* (Fuller) to Bt-transgenic maize. *South African Journal Plant and Soil*, 24(3):147-151.
- Waquil, J. M., F. M. F. Vilella, B. D. Siegfried, and J. E. Foster. 2004. Atividade biológica das toxinas do *Bt*, Cry1A(b) e Cry 1F em *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, 3(2):161-171.
- Wei, J., Y. Guo, G. Liang, K. Wu, J. Zhang, B. E. Tabashnik, and X. Li. 2015. Cross-resistance and interactions between Bt toxins Cry1Ac and Cry2Ab against the cotton bollworm. *Scientific Reports*, 5: 7714.
- Welch, K. L., G. C. Unnithan, B. A. Degain, J. Wei, J. Zhang, X. Li, B. E. Tabashnik, and Y. Carriere. 2015. Cross-resistance to toxins used in pyramided Bt crops and resistance to Bt sprays in *Helicoverpa zea*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 132: 149–156.
- Zago, H. B., H. A. A. Siqueira, E. J. G. Pereira, M. C. Picanco, and R. Barros. 2014. Resistance and behavioural response of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) populations to *Bacillus thuringiensis* formulations. *Pest Management Science*, 70: 488-495.