

# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

**INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS  
AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO DE FITOSANIDAD**

**ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA**

## **DESARROLLO DE TÉCNICAS DE DETECCIÓN Y MONITOREO DE CULTIVOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS**

**JAIME ALFREDO URZÚA GUTIÉRREZ**

**T E S I S**  
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS**


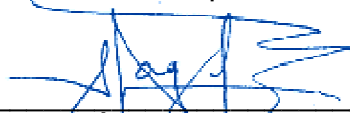
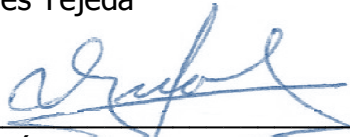
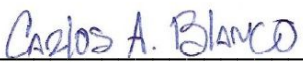
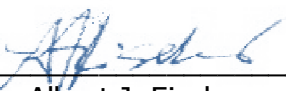
**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO**

2017

La presente tesis titulada: DESARROLLO DE TÉCNICAS DE DETECCIÓN Y MONITOREO DE CULTIVOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS realizada por el alumno: M.C. Jaime Alfredo Urzúa Gutiérrez, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS  
FITOSANIDAD  
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

**CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJERO	 _____
	Dr. J. Concepción Rodríguez Maciel
ASESOR	 _____
	Dr. Ángel Lagunes Tejeda
ASESOR	 _____
	Dr. Fernando Urzúa Soria
ASESOR	 _____
	Dr. Carlos Alberto Blanco Montero
ASESOR	 _____
	Dr. Albert J. Fischer

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Febrero de 2017

## RESUMEN

El uso de organismos modificados en México es considerado como un tema de preocupación pública. Tanto científicos como organizaciones civiles y el gobierno mexicano han mostrado sus puntos de vista por el uso de cultivos modificados y existen aún comentarios muy heterogéneos acerca de estos. Por este motivo, desarrollamos una técnica para poder diferenciar una planta transgénica al herbicida glifosato de una que no presenta esta característica. De igual modo, esta técnica puede ser ocupada para identificar alguna maleza por selección con el herbicida glifosato haya adquirido la resistencia a este.

Además, en la presente tesis se obtuvieron valores de control de línea base para la toxina Vip3Aa20 en gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*). Esto se desarrolló para determinar los niveles de control de las larvas de gusano cogollero en regiones donde se pretende liberar el uso de maíz comercial modificado con la toxina Vip3Aa20. Estos datos ayudarán en un futuro a científicos y organizaciones gubernamentales para monitorear las poblaciones de esta plaga y su manejo de la resistencia.

## ABSTRACT

The use of modified organisms in Mexico is considered an issue of public concern. Scientists, civil organizations and Mexican government have expressed their views on the use of modified crops and there are still very heterogeneous comments about them. For this reason, we developed a technique to differentiate a transgenic plant from glyphosate herbicide from one that does not have this characteristic. Likewise, this technique can be used to identify some weed that by selection of the herbicide glyphosate has acquired the resistance to this one.

In addition, in this thesis, baseline control values for the Vip3Aa20 toxin were obtained from the *Spodoptera frugiperda* worm. This was developed to determine the levels of control of the worm larvae in regions where it is intended to release the use of commercial maize modified with the toxin Vip3Aa20. This data will in the future help scientists and government organizations to monitor populations of this pest and its management of resistance.

# AGRADECIMIENTOS

-Al Consejo Nacional de Ciencia y tecnología (CONACYT) por el financiamiento de mis estudios doctorales, ya que sin su apoyo no hubiera logrado la obtención de este grado.

-Al colegio de Posgraduados campus Montecillo y a todo su personal por todo el conocimiento, experiencias y apoyo que he recibido durante estos años.

-A mi consejo particular quienes me han guiado desde un principio y por muchos años para el desarrollo de mi investigación.

-Al Dr. J. Concepción Rodríguez Maciel que me ha dirigido desde los estudios en maestría. Quien me ha puesto retos pero también me ha enseñado a entender y resolver los problemas que se suscitan durante el trabajo y en la vida. Por su gran amistad y su apoyo que siempre me ha dado. Muchas gracias profesor.

-Al Dr. Ángel Lagunes Tejeda quien desde la Licenciatura he conocido como docente, que me ha enseñado a observar y analizar los problemas desde distintas perspectivas. Por su gran amistad y su tacto para decir las cosas como son sin rodeos.

-Al Dr. Fernando Urzúa Soria, quien me ha tenido la paciencia y tolerancia para enseñarme lo mejor de él en muchos ramos. Por su educación de vida y sus valores que me ha hecho una mejor persona. Por siempre agradecido.

-Al Dr. Albert J. Fischer, quien siempre me ha dado la mano y me a aconsejado en lo laboral como en lo personal. Muchas gracias por su amistad y su cariño. Espero verlo pronto y salir en bote con usted.

-Al Dr. Carlos A. Blanco, quien me a motivado con su orientación en la revisión de esta tesis.

-A todos los profesores del Colegio de posgraduados que dieron lo mejor de ellos y me enseñaron lo mejor de sus conocimientos: Dr. Juan Cibrian Tovar, Dr. Nestor Bautista Martínez, Dra. María Teresa Santillan Galicia, Dr. Hussein Sanchez Arroyo, Dr. Gabriel Otero Colina, Dra. Obdulia Segura León, Dr. Evandro Uscanga, Dra. Heike Vibrans y los que no mencioné.

## **DEDICATORIA**

-A mi esposa: GABRIELA NATALY JIMENEZ DELGADO quien nunca ha dejado de apoyarme en todos mis proyectos por más extraños que sean. Que con su cariño me ha ayudado a crear una familia muy hermosa en la que estamos inculcando valores de superación y desarrollo. Por todo su amor sin medida. Este proyecto es posible gracias a ti. TE AMO NATY.

- A mi hija DANA SOPHIA URZÚA JIMENEZ que me alegra la vida todos los días y que vino a completar mi vida.

-A mi bebe que está próximo a nacer. Que al igual que su hermana SOPHI me llenan de alegría y me motivan para trabajar y ser una mejor persona. Espero que algún día vean este trabajo y se sientan orgullosos de su papá.

-A mis padres Fernando Urzúa Soria y Estrella Gutiérrez Salazar que nunca han dejado de confiar en mí. Que me han motivado y a veces empujado para que se realicen mis metas. Muchas gracias por todo su amor.

-A mis hermanos Fernando y Alvaro, en quienes he encontrado los mejores compañeros en esta vida. Que nunca dejan de jugar conmigo y siempre estamos tomándonos los momentos sin preocupaciones.

-A mis amigos Daniel, Alex, Lupe y Alma que siempre tienen un segundo para saludarme y aunque nos vemos muy poco siempre me procuran.

# CONTENIDO

INTRODUCCIÓN GENERAL	11
I. PRUEBA RÁPIDA DE DETECCIÓN DE RESISTENCIA A GLIFOSATO DE LEPTOCHLOA VIRGATA	20
INTRODUCCIÓN	20
MATERIALES Y MÉTODOS	22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
CONCLUSIONES	28
LITERATURA CITADA	29
II. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA RESISTENCIA DE LAS PLAGAS A LOS CULTIVOS BIOTECNOLÓGICOS	31
INTRODUCCIÓN	31
FACTORES QUE INFLUYEN EN LA RESISTENCIA DE LAS PLAGAS A CULTIVOS BT	33
LITERATURA CITADA	48
III. LÍNEA BASE DE SUSCEPTIBILIDAD A LA PROTEÍNA VIP3AA20 DE BACILLUS THURINGIENSIS BERLINER EN POBLACIONES MEXICANAS DE SPODOPTERA FRUGIPERDA J. E. SMITH (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE).	56
RESUMEN	56
INTRODUCCIÓN	57
MATERIALES Y MÉTODOS	58
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	67
LITERATURA CITADA	69



# ÍNDICE DE CUADROS

## I. PRUEBA RÁPIDA DE DETECCIÓN DE RESISTENCIA A GLIFOSATO DE LEPTOCHLOA VIRGATA

Cuadro 1. Escala de puntuación propuesta por la EWRS (European Weed Research Society) para evaluar control de maleza y su interpretación agronómica y porcentual.\_\_\_\_23

Cuadro 2. Transformación de la escala puntual logarítmica de la EWRS a escala porcentual.\_\_\_\_\_24

Cuadro 3. Separación de medias de los resultados del control de *Leptochloa virgata* después de 28 días de la aplicación de los tratamientos de glifosato.\_\_\_\_\_25

Cuadro 4. Prueba rápida de detección de *Leptochloa virgata* resistente a glifosato\_\_\_\_\_27

## II. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA RESISTENCIA DE LAS PLAGAS A LOS CULTIVOS BIOTECNOLÓGICOS

Cuadro 1. Factores que influyen en la tasa de evolución de la resistencia de las plagas a los cultivos biotecnológicos\_\_\_\_\_36

## III. LÍNEA BASE DE SUSCEPTIBILIDAD A LA PROTEÍNA VIP3AA20 DE BACILLUS THURINGIENSIS BERLINER EN POBLACIONES MEXICANAS DE SPODOPTERA FRUGIPERDA J. E. SMITH (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE).

Cuadro 1. Poblaciones mexicanas del gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda* utilizadas para determinar la línea base de susceptibilidad a la proteína Vip3Aa20 de *Bacillus thuringiensis Berliner*.

---

62

Cuadro 2. Concentración-mortalidad (ng cm<sup>-2</sup>) de larvas neonatales de *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith de los estados mexicanos de Sinaloa, Chihuahua y Tamaulipas, expuestas durante siete días a la proteína Vip3Aa20 de *Bacillus thuringiensis Berliner*. \_71

Cuadro 3. Porcentaje de inhibición del peso corporal con respecto al testigo sin tratar en larvas de neonatas de *Spodoptera frugiperda* JE Smith del estado mexicano de Sinaloa, México, expuesto durante siete días a diferentes concentraciones (ng cm<sup>-2</sup>) de la proteína Vip3Aa20 de un *Bacillus thuringiensis Berliner*.\_\_\_\_\_76

Cuadro 4. Porcentaje de inhibición del peso corporal con respecto al testigo sin tratar en larvas de neonatas de *Spodoptera frugiperda* JE Smith, del estado mexicano de Tamaulipas, México, expuesto durante siete días a diferentes concentraciones (ng cm<sup>-2</sup>) de la proteína Vip3Aa20 de un *Bacillus thuringiensis Berliner*.\_\_\_\_\_79

Cuadro 5. Porcentaje de inhibición del peso corporal con respecto al testigo sin tratar en larvas de neonatas de *Spodoptera frugiperda* JE Smith, del estado mexicano de Chihuahua, México, durante siete días a diferentes concentraciones (ng cm<sup>-2</sup>) de la proteína Vip3Aa20 de un *Bacillus thuringiensis Berliner*.\_\_\_\_\_81

# ÍNDICE DE FIGURAS

## I. PRUEBA RÁPIDA DE DETECCIÓN DE RESISTENCIA A GLIFOSATO DE *LEPTOCHLOA VIRGATA*

Figura 1 .Discos de *Leptochloa virgata* resistentes y susceptibles después de 48 horas bajo la prueba rápida de detección a resistencia de glifosato a una dosis de 4.32 g L-1 de glifosato. \_\_\_\_\_25

## II. LÍNEA BASE DE SUSCEPTIBILIDAD A LA PROTEÍNA VIP3AA20 DE *BACILLUS THURINGIENSIS BERLINER* EN POBLACIONES MEXICANAS DE *SPODOPTERA FRUGIPERDA* J. E. SMITH (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE).

Figura 1. Localidades del estado de Chihuahua donde se recolectaron en el campo poblaciones de *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith. \_\_\_\_\_56

Figura 2. Localidades del estado de Sinaloa donde se recolectaron en el campo poblaciones de *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith. \_\_\_\_\_57

Figura 3. Localidades del estado de Tamaulipas donde se recolectaron en el campo poblaciones de *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith. \_\_\_\_\_58

## **INTRODUCCIÓN GENERAL**

### **LOS ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS**

Para el año 2030 la población mundial con problemas para cubrir sus necesidades de alimentación (FAO 2004), se incrementará en dos mil millones de habitantes; esta cantidad se sumará a la población que en la actualidad no satisface tales requerimientos. En consecuencia se espera un incremento considerable en la sobreexplotación de los recursos naturales, los cuales desde ahora ya se encuentran en niveles alarmantes. Una alternativa que se señala reiteradamente para incrementar la producción agrícola, es la aplicación de la biotecnología en la agricultura, mediante el incremento en el uso de organismos genéticamente modificados o transgénicos (García - Olmedo, 2004).

Los transgénicos que se usan en la agricultura, medicina e industria, son organismos a los que se les alteró su conformación genética, para conferirles características deseables que difícilmente hubieran podido adquirir en condiciones naturales o mediante el proceso de mejoramiento convencional. Algunas de las ventajas que se le atribuyen a esta biotecnología son: que se manipula y transfiere de un organismo a otro a un gen específico, en vez de todo el genoma; que una vez identificado el gen de interés, existe la posibilidad de transferirlo indistintamente, sin importar si es de la misma o de otra especie; y que se reducen significativamente los tiempos para la obtención de nueva variedades o razas. El desarrollo de esta nueva revolución científica, ha sido posible por los avances logrados en ingeniería genética, biología molecular y agronomía entre otras, que están haciendo posible aumentar los rendimientos (Villalobos, 2008).

En 1970 se planteó y demostró la hipótesis de que la agalla del cuello producida *Agrobacterium tumefaciens*, se debía a la transferencia de material genético de la bacteria hacia las células de las plantas infectadas, y no por el efecto de la secreción de toxinas. En el proceso de infección, la bacteria es capaz de insertar un plásmido con fragmentos de su ADN (ADN-T) a la planta infectada, y su expresión es el causante de la formación de tumores en la planta receptora, los cuales continúan manifestándose en las nuevas células, aún cuando la bacteria ya no esté presente. También se encontró que es posible sustituir el fragmento del ADN-T en el plásmido por genes de interés, sin que éste pierda su capacidad de transferencia a otras células vegetales (Villalobos, 2008).

Un paso muy importante en el desarrollo de la ingeniería genética fue el descubrimiento de las enzimas de restricción, las cuales son capaces de reconocer y cortar secuencias de 4, 6 o más bases en diferentes moléculas de ADN. Una vez aisladas las secuencias pueden insertarse a otras moléculas de ADN, mediante la enzima ADN ligasa y generar una molécula de ADN nueva denominada “recombinante”. Se conoce una gran cantidad de enzimas de restricción presentes también en las bacterias, las cuales son una herramienta fundamental para el desarrollo de la ingeniería genética. El siguiente paso ha sido crear cepas recombinantes (plásmido- ADN-T), siendo la más utilizada hasta la fecha *A. tumefaciens* (Sánchez, 2008).

Schnepf y Whiteley (1981) aislaron el “gen Cry” del genoma de *Bacillus thuringiensis*, dicha secuencia génica codifica una proteína con propiedades insecticidas. Chilton en 1983 obtuvo las primeras plantas transgénicas de tabaco utilizando plásmidos de *Agrobacterium tumefaciens* y el

gen Cry. Tales investigaciones culminaron en 1996 con la comercialización de plantas transgénicas de algodón, papa y maíz resistentes a ciertas especies de insectos. A las plantas transformadas se les denominó “Plantas Bt” (*Bacillus thuringiensis*). Esta metodología de transferencia de genes se resume de la siguiente manera: 1. Se identifica un carácter deseable en un organismo; 2. Se aísla el gen responsable del carácter deseado (gen de interés); 3. Se combinar dicho gen con el vector (plásmido) que sea funcional en el organismo receptor; 4. Se transfiere el gen de interés mediante el vector; y 5. Se hace crecer y reproduce el organismo receptor ahora modificado genéticamente (Sánchez, 2008).

La bacteria *Agrobacterium tumefaciens* prácticamente no infecta a las gramíneas, por lo que se dificulta usarla como vector de genes en este grupo plantas; para ellas se desarrolló la técnica conocida como electroporación, que consiste en eliminar la pared celular digiriéndola con un enzima; posteriormente se somete a pulsación eléctrica los protoplastos resultantes, para crearles diminutos poros en la membrana celular y núcleo, para que penetren los genes de interés (el ADN recombinante). La principal dificultad de este método estriba en desarrollar las plántulas a partir de los protoplastos. En 1988 se obtuvieron los primeros cereales (maíz y arroz) transgénicos con esta metodología (Herrera-Estrella, 2003).

Sanford y Wolf en 1984 bombardearon células vegetales usando como proyectiles a micro partículas metálicas enganchadas con ADN del virus del mosaico del tabaco; las partículas se impulsaron con chorros de aire comprimido usando cámaras de vacío (acelerador de partículas), primero se usaron partículas ó tungsteno y posteriormente de oro. Dentro del tejido vegetal, el

ADN se desprendió de las partículas y replicó al virus dentro de las células, demostrando que era posible la transferencia de genes mediante la técnica que se le llamo Biobalística. Esta técnica al no afectar la estructura de las células, facilita la regeneración de las plantas a partir del cultivo de tejidos; con ella se han transferido genes a los cultivos de arroz, maíz y soya (Sánchez, 2008).

La técnica conocida como microinyección, consiste en inyectar soluciones que contienen ADN-T a los núcleos de las células vegetales. En general aunque se han obtenido plantas transgénicas de arroz y nabo por esta vía, es una técnica poco eficiente (Sánchez, 2008). También se ha intentado la transferencia directa de ADN a través del tubo polínico, al depositar los genes sobre el polen de las plantas, que luego es puesto directamente sobre los estigmas. Aunque se ha logrado la transferencia de genes, con esta técnica, no se ha conseguido la expresión de estos en la descendencia (Sánchez, 2008).

El cultivo de tejidos ha sido fundamental para el desarrollo de los organismos genéticamente modificados. Con frecuencia las técnicas de transferencia génica emplean embriones inmaduros como blanco potencial para la introducción del ADN recombinante. Posterior al procesos de transferencia, las células o tejidos deben colocarse en medios de cultivo o condiciones que las discriminen; las que sobrevivan o manifiesten ciertas características serán manejadas apropiadamente en laboratorio, invernadero y campo hasta la obtención de las plantas que se desea (Hoisington, 1995).

A la fecha se han documentado transferencias génicas exitosas en al menos 40 especies de interés agronómico; sin embargo, son cuatro las más cultivadas en el mundo: soya (*Glycine max* L.), maíz (*Zea mays* L.), colza (*Brassica campestris* L.) y algodónero (*Gossypium hirsutum*). En 1995, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos aprobó la primera siembra comercial de papa productora de la toxina Bt; posteriormente en 1996, salieron al mercado semillas transgénicas de maíz Bt y algodónero Bt. Desde entonces se ha incrementado el financiamiento a la investigación para la obtención de plantas transgénicas, principalmente por las empresas transnacionales Monsanto, Novartis, Zeneca, Bayer y Dupont (Villalobos, 2008).

En la actualidad la empresas Arcadia Biosciences señala que puede transferir genes a casi cualquier planta de interés, para volverla más eficiente en el uso del nitrógeno y del agua, tolerante a la salinidad, aumentarle la vida de anaquel o hacerla más productiva de aceites y proteínas (Arcadia Biosciences, 2011).

Los marcos regulatorios de los diferentes países donde se ha permitido la producción y consumo de plantas GM, establecen en todos ellos que el empleo de esta tecnología debe suspenderse inmediatamente, cuando a juicio de las autoridades competentes exista riesgo de daño (López, 2008).

Las principales preocupaciones de la producción y consumo de plantas GM, se relacionan con la posibilidad de aumento de alergénicos, toxinas u otros compuestos nocivos en los productos que se ingieren; así como en la transferencia horizontal de genes relacionados con la resistencia a antibióticos (FAO, 2000). Desde 1996 se han estado consumiendo alimentos provenientes de



plantas GM y aún no se ha documentado ningún caso de daño a la salud humana o animal (Villalobos, 2008).

En 1988 se presentó ante la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) y fue aprobada la primera solicitud para importar y liberar en campo, específicamente en el área de Culiacán, Sinaloa, tomate GM tolerante a insectos. Desde entonces la SAGARPA ha consolidado un grupo de expertos quienes han elaborado normas y contribuido a la toma de decisiones relacionadas con el tratamiento de las solicitudes de liberación en campo de las plantas transgénicas (SENASICA, 2010).

La producción y consumo de plantas GM reviste mayor importancia para los países considerados como centros de origen de los cultivos modificados. Es el caso del arroz y la soya en China, la papa en Perú y el maíz en México; en ellos se debate el riesgo de la pérdida de germoplasma de los cultivos involucrados, particularmente de las variedades criollas. El flujo génico entre las variedades híbridas y las razas nativas de maíz, es muy común y difícil de evitarlo; no obstante, a la fecha no se tiene claridad sobre la magnitud y consecuencias de dicha erosión genética (Villalobos, 2008).

La discusión sobre la liberación de maíz GM en México ha sido muy intensa, pues se tiene la percepción de la existencia de alto riesgo, aunque prevalece la falta de información sobre las posibles repercusiones. A finales del año 2001 la revista Nature, publicó un artículo que demostraba la presencia de maíz transgénico en parcelas de productores de subsistencia de la

sierra de Oaxaca, México (Quist y Chapela, 2001); por lo cual la SAGARPA condujo estudios en diversas zonas maiceras del país, detectando la presencia de transgenes sólo en maíces criollos cultivados en el estado de Oaxaca (Villalobos, 2008). Estudios posteriores realizados en ese mismo estado no encontraron de nuevo su presencia (Ortiz et al., 2005), quizás porque se encontraban en una frecuencia baja, no detectable por la metodología utilizada.

En el año 2004, México manifestó en la primera conferencia de las partes del protocolo de Bioseguridad de Cartagena, celebrada en Kuala Lumpur, Malasia, que prohibiría la experimentación y liberación de maíz transgénico; sin embargo al pasar el tiempo la postura de nuestro país poco a poco se ha flexibilizado (Villalobos, 2008).

En el año 2009 en que se creó la Dirección de Bioseguridad para Organismos Genéticamente Modificados, se aprobaron 32 solicitudes de liberación experimental de maíz genéticamente modificado (MGM), en 14.43 hectáreas de los estados de Sonora, Sinaloa, Chihuahua, Tamaulipas y Durango. Para el año de 2010, se aprobó la siembra de MGM en 9.51 hectáreas de parcelas experimentales, agregándose el estado de Coahuila a la lista del año anterior. Para octubre del año 2011, La Dirección de Bioseguridad había aprobado 61 solicitudes de siembra de MGM en parcelas experimentales y piloto (SENASICA, 2011)

Para evitar flujo génico hacia los maíces criollos con genes provenientes de MGM, se han creado protocolos de bioseguridad, en los que se enlistan las acciones que deben llevarse a cabo al realizar siembras en parcelas experimentales o piloto con MGM. Una de las actividades

primordiales consiste en el monitoreo para la detección de transgenes en maíces criollos (SENASICA, 2011). A continuación se describe brevemente algunos de los procedimientos que se emplean en la detección oportuna de tales materiales.

Arcadia Biosciences, 2005. <http://www.arcadiabio.com/products>. Consultada el día 12-1-2017.

García-Olmedo, F. 2004. Organismos modificados Genéticamente: La Tercera Revolución Verde. En: Agricultura, Medio Ambiente y Sociedad. Ed. Jesús Marrón Gaité y Gerardo García Fernández. Ministerio de Agricultura, pesca y Alimentación. España. Pp: 59-73.

Herrera-Estrella, L., y M. Martínez. 2003. Aplicaciones y controversias de las plantas transgénicas. En: Fronteras de la biotecnología en los inicios del siglo XXI. El colegio nacional, México. Pp.73-99.

Hoisington D. 1995. “Conocimientos actuales en relación con la transformación del maíz. En: Memoria del foro: Flujo genético entre maíz criollo, maíz mejorado y teocintle: implicaciones para el maíz transgénico”. Centro internacional de mejoramiento de maíz y de trigo. (CIMMYT). Pp 2.

López H. A. 2008. Contexto y perspectivas del proyecto bioseguridad en México. En: CIBIOGEM. Bioseguridad en la aplicación y el uso de los organismos genéticamente modificados. Pp 17-22.

Ortiz-García, S., E. Ezcurra, B. Schoel, F. Acevedo, J. Soberon, and A Snow. 2005. Absence of detectable transgenes in local landraces of maize in Oaxaca, Mexico. [www.pnas.com/cgi/doi/10.1073/pnas](http://www.pnas.com/cgi/doi/10.1073/pnas).

Quist, D. and D.H. Chapela. 2001. Transgenic DNA introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca, Mexico. *Nature* 414: 541-543.

Sánchez T., M. 2008. Plantas transgénicas: Biotecnología y alimentación. <http://www.uned.es/experto-biotecnologia-alimentos/TrabajosSelecc/TrinidadSanchez.pdf>.

SENASICA. Dirección de bioseguridad para los organismos genéticamente modificados. Historia para la bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados. (<http://www.senasica.gob.mx/?id=2403>) 2010.

-SENASICA. Dirección de bioseguridad para los organismos genéticamente modificados. Estatus de solicitudes de permiso de liberación al ambiente de maíz genéticamente modificado ingresadas en 2016. (<http://www.senasica.gob.mx/?id=2220>) 2016.

Villalobos A., V.M. 2008. Los transgénicos. Oportunidades y amenazas. Ediciones Mundi prensa. México. 103 p.

# **I. PRUEBA RÁPIDA DE DETECCIÓN DE RESISTENCIA A GLIFOSATO DE *LEPTOCHLOA VIRGATA***

## **INTRODUCCIÓN**

*Leptochloa virgata* es una planta perenne perteneciente a la familia de las poaceas. Es de tallo erecto de 40 a 110 cm de largo y 2 a 3 mm de diámetro. Tiene una ligula con membrana ciliolada de 0.3 a 0.7 mm de largo. Con hojas de 10 a 26 cm de largo y 7 a 10 mm de ancho.

La inflorescencia es compuesta de racimos con pedúnculo de 5 a 28 cm de largo. Presenta racimos de 5 a 20 unidades que aparecen a lo largo de un eje central. Tiene espiguillas solitarias. Las flores tienen dos anteras de 0.2 a 0.3 mm de largo. El fruto es una cariopsis con pericarpio blando libre.

La distribución de este pasto es Malasia, Papúa, centro y sur de Estados Unidos, México, el Caribe y Brasil (Clayton, 2006).

Esta planta se presenta principalmente en cultivos tropicales en los que se mueve poco el suelo y donde el control de la maleza se realiza principalmente por cortes físicos (chapeos) o por la acción de herbicidas sin selectividad. Esto a llevado a que en muchos cultivos se haya adoptado el uso de el glifosato como una estrategia común de control.

Actualmente el producto agroquímico más vendido en el mundo es el glifosato. Esto se debe en gran medida en la adopción en gran escala de cultivos modificados genéticamente resistentes a este herbicida. El glifosato N-(fosfometil glicina] se introdujo al mercado en 1974. Su amplio uso en el mundo se debe a su efectividad para controlar en post emergencia a un amplio espectro de especies de maleza anuales y perennes, no tener actividad herbicida residual en el suelo, y ser

toxicológica y ecológicamente de bajo perfil (Duke y Powless, 2008). Este compuesto inhibe la acción de la enzima 5-enolpiruvyl-shikimato-3-fosfato sintetasa (ESPS) en la ruta del ácido shikímico, al suplantarse al fosfoenolpiruvato, uno de los sustratos para la ESPS (Koger y Reddy, 2005). La insuficiencia de ESPS conlleva a la acumulación de shikimato-3-fosfato y a la escasa producción de aminoácidos aromáticos (triptófano, fenilalanina y tirosina) necesarios para la síntesis de proteínas que intervienen en la formación de carotenoides, produciendo como síntomas iniciales de daño, clorosis y blanqueado (Duke y Powless, 2008).

El incremento en el uso de este herbicida mundialmente ha llevado a la generación de resistencia en muchos cultivos y ambientes muy diversos. En 2016 se reportaba que en todo el mundo al menos 37 especies de malezas habían generado resistencia a este herbicida (Heap, 2017).

El método más confiable para detectar la resistencia a glifosato de cualquier planta consiste en determinar la acumulación de shikimato con una prueba bioquímica y espectrometría (Shaner et al., 2005); sin embargo requiere personal especializado y su capacidad de detección es limitada por la cantidad de muestras que se pueden procesar a la vez. Esta es una prueba muy útil para confirmar la presencia de plantas resistentes a glifosato, pero poco eficiente para detectarla en grandes extensiones cuando las frecuencias alélicas son bajas. Otras metodologías se basan en la aplicación directa del herbicida a las plantas, o en la inmersión de partes de éstas (Yuan, 2001; Koger et al. 2009), pero sus resultados no se consideran satisfactorios por ser lentos, subjetivos y la dificultad para procesar tamaños de muestras grandes (Shaner et al., 2005). El objetivo del

presente trabajo fue determinar una técnica sencilla y rápida para detectar la presencia de malezas resistentes a glifosato.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para este experimento se emplearon dos biotipos de zacate tripa de pollo *Leptochloa virgata*: El primero fue donado por el profesor José Domínguez Valenzuela de la Universidad Autónoma Chapingo. Estos organismos fueron recolectados de la zona de Veracruz, México de parcelas de limón persa a los que se ha demostrado su resistencia al herbicida glifosato del municipio de Cuitlahuac (18.79°N, 96.68°W) (Perez-Lopez, 2014). Los biotipos susceptibles fueron colectados donados por el profesor Fernando Urzúa Soria de la Universidad Autónoma Chapingo. De igual modo, estos biotipos fueron obtenidos del estado Veracruz, México. Sin embargo fueron obtenidos de parcelas de maíz en donde el control de estas malezas es realizado predominantemente con herbicidas de otros mecanismos de acción. Cien semillas de ambos biotipos fueron sembradas individualmente en sustrato en invernadero. Posteriormente al alcanzar los 15 centímetros de altura, se dividieron en cuatro repeticiones cada biotipo, cada repetición se colocó al azar y se aplicó un tratamiento de dosis comercial de glifosato Faena® (720 g de i.a./ha) de la compañía Monsanto®. Los tratamientos se mezclaron con agua destilada con 48.8% de sal potásica de N-fosfonometil glicina, equivalente a 540 g L-1 de equivalente ácido (Anonimo, 2011; CDMS, 2007) para evaluar la resistencia y susceptibilidad de los biotipos evaluados. Los tratamientos fueron aplicados con una mochila manual modelo solo 425



w de la compañía swissmex (SWISSMEX-RAPID S.A. de C.V.). La mochila manual fue equipada con una boquilla modelo 11004 de abanico calibrada para tener un gasto de 312 L/ha.

Cuatro semanas posteriores a la aplicación de los tratamientos se evaluó la mortalidad de las plantas. Se ocupó la escala de la sociedad europea de investigación de malezas (European Weed Research Society) para evaluar la mortalidad de los biotipos resistente y susceptible a los tratamientos de glifosato. Se utilizó un diseño experimental de bloques completamente al azar con 4 repeticiones. Mediante el uso del paquete estadístico SAS (SAS Institute, 1997) se efectuó un análisis de varianza y separación de medias de tipo Tukey LSD ( $p \leq 0.05$ ).

Cuadro 1. Escala de puntuación propuesta por la EWRS (European Weed Research Society) para evaluar control de maleza y su interpretación agronómica y porcentual.

<b>Valor</b>	<b>Efecto sobre la maleza</b>
1	Muerte completa
2	Muy buen control
3	Buen control
4	Suficiente en la práctica
Limite de aceptabilidad	
5	Control medio
6	Regular
7	Pobre

8	Muy pobre control
9	Sin efecto

Cuadro 2. Transformación de la escala puntual logarítmica de la EWRS a escala porcentual.

Valor	Porcentaje de control de maleza
1	99.0 - 100.0
2	96.5 - 99.0
3	93.0 - 96.5
4	87.5 - 93.0
5	80.0 - 87.5
6	70.0 - 80.0
7	50.0 - 70.0
8	1.0 - 50.0
9	0.0 - 1.0

### Prueba rápida de detección de *Leptochloa virgata* resistente a glifosato

Se cortaron discos foliares de 0.5 cm de diámetro de plantas de zacate tripa de pollo (*Leptochloa virgata*) de dos semanas de edad de las plantas resistentes y susceptibles a el herbicida glifosato. Se ocuparon charolas para bioensayos BIO-BA-128W (Australian Entomological supplies® Coorabell, NSW, Australia) de 128 pozos cada una, con capacidad de 4.0 mL por pozo. A 300 pozos se les colocó, individualmente, un disco foliar de la planta resistente de *L. virgata* y a otras 300 se les colocó también individualmente un disco foliar de la planta susceptible de *L. virgata*. Los tratamientos evaluados fueron dos diluciones de glifosato (2.16 y 4.32 gL<sup>-1</sup>) con adición de 2% (p/v) de sulfato de amonio y un testigo sin glifosato. En cada pozo

se añadieron 3 mL de cada dilución respectiva (0.0, 2.16 y 4.32 gL<sup>-1</sup>). De cada tratamiento se tuvieron 200 discos foliares para tener 4 repeticiones con 50 discos cada una. Una vez aplicados los tratamientos químicos, los pozos se cubrieron con un plástico auto adherible (Kleen Pack, película auto adherible. Kimberly-Clark de México, S.A.B. de C.V.) para evitar la evaporación de las diluciones.

Los pozos con los discos se colocaron en una estufa a 35 °C durante 12 h. Posteriormente se transfirieron a una cámara bioclimática (25 °C, e irradianza de 200  $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de PPFd). El daño a los discos foliares se evaluó visualmente a las 24, 36, 48 y 144 h después de que se sumergieron en las diluciones de glifosato. Para la evaluación del daño, se utilizó la escala visual de Koger y Reddy (2005), asignando valores de 0% a los discos sin daño; 33.3% a los discos con daño ligero; 66.6 a los discos con daño severo; y 100% a los completamente decolorados.

Se utilizó un diseño experimental de bloques completamente al azar con 4 repeticiones. Cada repetición constaba de 25 discos. Mediante el uso del paquete estadístico SAS (SAS Institute, 1997), a los resultados se les efectuó un análisis de varianza y separación de medias con la prueba de Tukey, LSD ( $p \leq 0.05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Después de 28 días de la aplicación de los tratamientos de glifosato a los biotipos de *Leptochloa virgata*, se demostró que el biotipo susceptible murieron en su totalidad. Mientras tanto, el biotipo resistente fue capaz de sobrevivir a la aplicación de una dosis comercial de glifosato. Esto hace posible validar que los biotipos utilizados son útiles para el estudio.

Cuadro 3. Separación de medias de los resultados del control de *Leptochloa virgata* después de 28 días de la aplicación de los tratamientos de glifosato.

Biotipo de <i>L. Virgata</i>	Dosis (g.i.a /ha)	% Control
Resistente	720	0.0 b
Susceptible	720	100 a

Valores con la misma letra son iguales estadísticamente (Tukey, 0.05)

EL biotipo resistente demostró que puede pasar al menos 48 horas bajo condiciones que propicien la destrucción de sus carotenoides por acción de la luz, pero su condición de resistente al glifosato le permite continuar con la producción de aminoácidos esenciales. Esto hará que puedan seguir formando los carotenoides, permitiendo que estos discos permanezcan con una coloración verde.

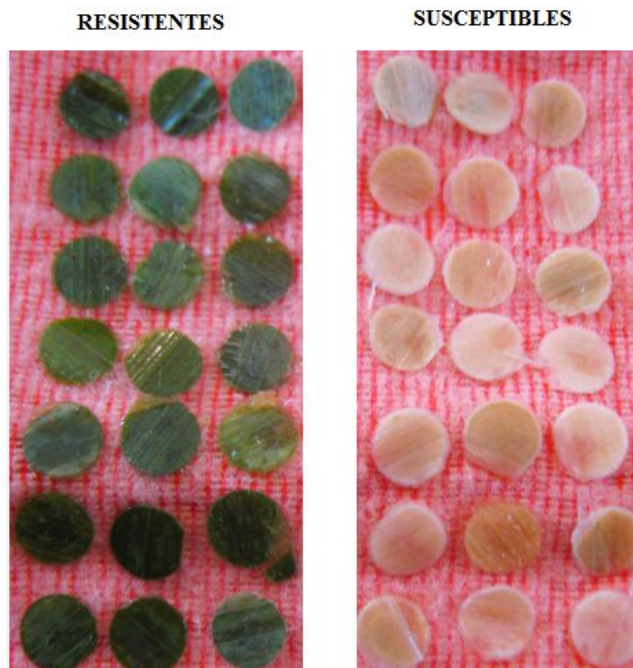
Los discos provenientes de las plantas susceptibles de *Leptochloa virgata* no tuvieron la capacidad de continuar produciendo carotenoides por el bloqueo de la EPSP. Esto se vio reflejado en que estos perdieron toda coloración verde por la falta de carotenoides.

Cuadro 4. Prueba rápida de detección de *Leptochloa virgata* resistente a glifosato

Conc. de glifosato (g L <sup>-1</sup> )	Tiempo de evaluación (h)			
	24	36	48	144
0.0 Resistentes	0.0 c	0.0 c	0.0 c	6.3 c
0.0 Susceptibles	0.0 c	0.0 c	0.0 c	9.4 c
2.16 Resistentes	0.0 c	0.0 c	2.2 c	12.2 c
2.16 Susceptibles	12.4 c	58.8 ab	96.4 a	100 a
4.32 Resistentes	0.0 c	3.6 c	5.8 c	16.5 c
4.32 Susceptibles	18.3 c	74.2 ab	100 a	100 a

\* Valores seguidos por la misma letra en cada columna no difieren estadísticamente (Tukey,  $\alpha = 0.05$ )

Figura 1 .Discos de *Leptochloa virgata* resistentes y susceptibles después de 48 horas bajo la prueba rápida de detección a resistencia de glifosato a una dosis de 4.32 g L<sup>-1</sup> de glifosato.



## CONCLUSIONES

El biotipo resistente de *Leptochloa virgata* resistente demostró que puede ser diferenciado fácilmente de el biotipo susceptible bajo esta técnica después de 48 horas de haber iniciado la prueba. Al pasar este tiempo, es completamente visible la diferenciación entre ambos biotipos.

Esta prueba rápida permite conocer con mucha eficiencia si una planta ha generado resistencia al herbicida glifosato, ya sea una maleza que ha generado resistencia con el tiempo por presión de selección.

También puede ser usada esta técnica para diferenciar un cultivo que haya sido modificado para tolerar la aplicación de glifosato con alguno que no tenga esta modificación.

## LITERATURA CITADA

- Anónimo. 2011. PLM. Diccionario de Especialidades Agroquímicas. Fertilizantes y Agroquímicos. Edición 21. Royce editores. 580 p.
- Clayton, W.D., Vorontsova, M.S., Harman, K.T. and Williamson, H. (2006 onwards). GrassBase - The Online World Grass Flora. <http://www.kew.org/data/grasses-db.html>. [accessed 08 November 2006; 15:30 GMT]\*
- Duke S. O., and Powless S. B. 2008. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. Pest Management Science. 64: 319-325.
- Heap, I. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Online. Internet. Sunday, February 12, 2017 . Available [www.weedscience.org](http://www.weedscience.org)
- Koger C. H., and Reddy, K. N. 2005. Role of absorption and translocation in the mechanism of glyphosate resistance in Horseweed (*Conyza canadensis*). U. S. Department of Agriculture - Agricultural Research Service, Southern Weed Science Research. 53: 84-89.
- Koger, C. H., D. L. Shaner, W. B. Henry, T. Nadler-Hassar, W. E. Thomas, and J. W. Wilcut. 2009. Assessment of two nondestructive assays for detecting glyphosate resistance in horseweed (*Conyza canadensis*). Weed Science 53: 438-445



- Perez-Lopez M. González-Torralva F. Cruz-Hipolito H. Santos F. Domínguez-Valenzuela J.A. De Prado R. 2014. Characterization of Glyphosate-Resistant Tropical Sprangletop (*Leptochloa virgata*) and Its Alternative Chemical Control in Persian Lime Orchards in Mexico. *Weed science* 2014. 62:441-450.
  
- SAS Institute. 1997. *SAS/STAT User's Guide*. SAS Institute, Cary, NC. USA. 1028 p.
  
- Shaner D, L. T. Nadler-Hassar, W. B. Henry, and C. H. Koger. 2005. A rapid *in vivo* shikimate accumulation assay with excised leaf discs. *Weed Science*, 53: 764-774.
  
- Velini ED, Duke SO, Trindade MLB, Meschede DK, Carbonari CA (2009) Modo de ação do glyphosate. Pages 113–133 in Velini ED, Trindade MLB, Meschede DK, Carbonari CA, eds. *Glyphosate*. Botucatu, São Paulo, Brasil.
  
- Yuan C. I., M. Y. Chaing, and Y. M. Chen. 2001. Triple mechanisms of glyphosate resistance in a naturally occurring glyphosate resistant plant *Dicelaetis chinensis*. *Plant Science* 163: 543-554.

## II. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA RESISTENCIA DE LAS PLAGAS A LOS CULTIVOS BIOTECNOLÓGICOS

### INTRODUCCIÓN

Durante 2014 se sembraron en el mundo 181 millones de hectáreas con cultivos transgénicos en 28 países, involucrando a 18 millones de agricultores (ISAAA, 2016). Con la finalidad de tener los argumentos científicos necesarios para permitir o negar el uso de este tipo de cultivos, se realizan estudios tendientes a inferir su impacto en la salud humana, en la biodiversidad y en la fitosanidad. La magnitud de los impactos ya sean deseables o indeseables se encuentran ponderados por la extensión e intensidad de su uso, así como de muchos otros factores inherentes al cultivo, proteínas de *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt), así como aspectos sociales y económicos. En este documento se discuten los factores que, en conjunto, definen la tasa a la que las plagas pueden desarrollar los mecanismos genéticos de adaptación a los cultivos transgénicos. Muchos de estos factores podrían también tener contribución para explicar el impacto que a gran escala podría tener esta tecnología sobre muchos componentes de la biodiversidad.

A la fecha, la utilidad de los cultivos transgénicos se ha centrado principalmente en el combate de plagas que tienen una capacidad elevada de ocasionar daños severos a la producción de alimentos y fibras como la diabrotica (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte, *D. balteata* LeConte, *D. undecimpunctata howardi* Barber), lepidópteros (*Heliothis virescens* (Fabricius), *Helicoverpa armigera* (Hübner) 1808, *Helicoverpa zea* (Boddie), *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith, *Spodoptera exigua* (Hübner), etc). Dentro de este escenario, la herramienta más

importante consiste en utilizar plantas de alto rendimiento que expresan una o más proteínas de *B. thuringiensis*.

*B.s thuringiensis* es una bacteria del suelo gram-positiva que produce proteínas insecticidas altamente activas contra plagas económicamente importantes (Höfte y Whitely 1989, Knowles 1994). Las formulaciones a base de Bt se han utilizado por más de 50 años, principalmente en la fitosanidad de cultivos de la agricultura orgánica (Cannon 1993). Lamentablemente las primeras formulaciones comerciales no fueron ampliamente utilizadas debido a su eficacia pobre e impredecible en el campo, baja persistencia del efecto y alto costo al productor (Roush 1994). Actualmente, el uso de las proteínas de Bt ha aumentado debido al desarrollo de formulaciones más potentes, incremento en el espectro de plagas que controla, eficacia campo predecible, carecen de efectos negativos a los seres humanos y son compatibles con el medio ambiente. A pesar de que el costo al agricultor de las formulaciones comerciales a base de Bt ha bajado, éste sigue siendo elevado para utilizarse en cultivos como maíz o algodón. Además, las zonas algodoneras se caracterizan porque en su mayoría tienen incidencias luminosas y presencia elevada de rayos UV que dañan significativamente dichas formulaciones comerciales.

Los avances en ingeniería genética ha hecho posible insertar los genes responsables de la expresión de proteínas entomocidas de Bt en cultivos importantes (Gasser y Fraley 1989, Koziel *et al.*, 1993). Los cultivos biotecnológicos que contienen estas proteínas son capaces de auto protegerse contra plagas objetivo sin la participación o con una participación mínima de insecticidas convencionales (Meeusen y Warren 1989, Koziel *et al.* 1993, Perlak *et al.* 1993, Feldman y Stone, 1997); además incrementan la compatibilidad con el control biológico, (Gould *et al.* 1991, Gill *et al.* 1992, Stames *et al.* 1993, Fitt *et al.* 1994, Roush 1994, Tabashnik 1994).

En algodónero Bt, el uso general de los insecticidas convencionales se puede reducir en el rango de 50 a 60% (Roush y Shelton, 1997).

La susceptibilidad de las plagas a las proteínas de Bt es un recurso valioso que debe ser preservado; de lo contrario se está en riesgo de regresar al uso de los insecticidas convencionales (Hokkanen y Wearing 1994, Tabashnik *et al.* 1999). La extensa e intensa presión de selección que ejercen los cultivos Bt genera condiciones de riesgo para el desarrollo de resistencia (Comins 1977a y b, Gould 1986, McKensie 1996), tal como se documenta en las revisiones que se han hecho sobre la evolución de la resistencia a Bt (Ferré *et al.* 1995, Gould 1998, McGaughey y Whalon 1992, Tabashnik 1994). En consecuencia, es de alta prioridad implementar medidas preventivas de resistencia (RM) con el fin de retrasar la aparición de resistencia y mitigar su evolución una vez que aparece. De acuerdo con la US EPA (1998), el reto es mantener la susceptibilidad de la población objeto de control. Para lograrlo es altamente deseable desplegar programas de manejo de la resistencia (RM) como una parte de los programas de manejo integrado de plagas (MIP) (Ostlie *et al.* 1997).

#### FACTORES QUE INFLUYEN EN LA RESISTENCIA DE LAS PLAGAS A CULTIVOS BT

En Puerto Rico, el gusano cogollero *S. frugiperda*, desarrolló resistencia a la proteína truncada CRY1F de Bt en tan solo dos años (Storer *et al.* 2010). En Brasil, el maíz Bt que expresa a la citada proteína empezó a estar comercialmente disponible en 2009/2010 y en 2014 se documentó la resistencia en campo del gusano cogollero (Farias *et al.* 2014). En contraste, en México el algodónero Bt se ha cultivado desde 1996 a la fecha, sin que exista evidencia de desarrollo de resistencia, ni en laboratorio ni en campo.

La velocidad a la que las plagas objetivo desarrollan resistencia a los cultivos Bt no depende de un solo factor, sino de la intrincada participación de factores asociados a la plaga, cultivo Bt, genes/proteínas, refugio, así como de factores sociales y económicos. En el presente documento detectamos 31 factores que influyen en la evolución de la resistencia (Cuadro 1).

Antes de tratar de diseñar e implementar programa de manejo de la resistencia, es de gran importancia identificar aquellos factores que influyen, positiva o negativamente en la evolución de la resistencia. A través de la comprensión de ellos se permitirá identificar el nivel de riesgo de resistencia y las estrategias para implementar RM eficiente.

*Frecuencia inicial de alelos de resistencia.* Los alelos de resistencia a las proteínas Bt existen en las poblaciones antes de ejercer la presión de selección a través del uso de insecticidas convencionales o con cultivos Bt. En general, se considera que dichos alelos en poblaciones no seleccionadas de insectos oscilan entre  $10^{-2}$  (Georghiou y Taylor 1977) y  $10^{-13}$  (Whitten y McKensie 1982). La frecuencia inicial de alelos de resistencia a las proteínas de Bt se estima que se encuentren alrededor de  $10^{-3}$ ; es decir uno de cada 1000 individuos es heterocigoto y uno en 1,000,000 es homocigoto resistente a las proteínas de Bt que expresan los cultivos biotecnológicos (Gould *et al.* 1995, 1997; Gould y Tabashnik 1998). Este escenario ocurre antes de que dichos cultivos se utilicen comercialmente. Desafortunadamente, es difícil de detectar, mediante bioensayos, los alelos de resistencia cuando su frecuencia es de  $10^{-2}$  a  $10^{-1}$  o inferior (Roush y Miller 1986).

En la Comarca Lagunera Región, México, el gusano rosado, *Pectinophora gossypiella* (Saunders), solía ser la plaga del algodónero más importante antes de 1996. En 1998 se introdujo comercialmente el algodónero Bollgard I® que expresa la proteína Cry1Ac y en 2004 el Bollgard II® que además expresa la proteína Cry2Ab. El uso de algodónero transgénico,

aunado a otras estrategias de combate a gran escala, ha ocasionado que ahora sea muy difícil encontrar individuos de esta plaga en campo. Weinzierl *et al.* (1997) muestreó más de 160 hectáreas de maíz Bt en busca del barrenador europeo del maíz, *Ostrinia nubilalis* (Hübner), y solo hallaron dos larvas, de los 4.5 millones que se esperaba encontrar si solo hubiera maíz convencional.

Los programas de manejo de la resistencia de las plagas a los cultivos Bt deben implementarse, de manera preventiva, es decir, antes de que la resistencia alcance niveles detectables (McGaughey y Whalon 1992). Una vez que estos alelos son comunes, podría ser demasiado tarde para gestionar la resistencia. Desafortunadamente es difícil convencer a los agricultores sobre la importancia de implementar estos programas cuando la resistencia no es un problema.

*Número de genes de resistencia.* En la resistencia a insecticidas, en general, un solo gene es suficiente para expresar el nivel de resistencia necesario para permitir que el individuo resistente sobreviva a la presión de selección aplicada. Sin embargo, es posible que en algunos casos se requiera la acumulación de varios genes para lograr el nivel de expresión necesario para desarrollar resistencia a cultivos transgénicos. A mayor cantidad de genes necesarios, la población necesitará más tiempo para alcanzar el estado de "resistente" (Georghiou y Taylor 1986). La resistencia a las proteínas de Bt se hereda como un solo gene y niveles altos de resistencia se ha observado después de 15 o más generaciones bajo selección en laboratorio (Tabashnik 1994, Gould *et al.* 1995, Gould 1998). En cultivos biotecnológicos se estima que será común la resistencia en campo derivada de la expresión de un solo gene en los insectos.

**Cuadro 1.** Factores que influyen en la tasa de evolución de la resistencia de las plagas a los cultivos biotecnológicos

---

**1. PLAGA.**

a. Genéticos

- i. Frecuencia inicial de alelos de resistencia
- ii. Número de genes de resistencia
- iii. Dominancia de los alelos de resistencia
- iv. Aptitud biológica de los individuos resistentes

b. Bioecológicos

- i. Cópula aleatoria entre individuos susceptibles y resistentes
- ii. Descendencia por generación
- iii. Tiempo que dura una generación
- iv. Supervivencia diferencial al invierno
- v. Condiciones ambientales para el desarrollo de la plaga
- vi. Efecto “isla”

**2. CULTIVO Bt**

- a. Intensidad de la expresión de la proteína de Bt.
- b. Tiempo que dura la expresión de la proteína Bt en la planta
- c. Expresión de la proteína Bt en toda la planta vs tejidos específicos
- d. Temporalidad del cultivo
- e. Superficie cultivada.

### **3. GENES BT/PROTEÍNAS**

- a. Cantidad de genes diferentes disponibles para su uso
- b. Grado de resistencia cruzada entre los genes que se utilizan en el campo
- c. Uso alternado vs genes apilados
- d. Potencia entomocida de las proteínas de Bt

### **4. REFUGIO**

- a. Tamaño
- b. Disposición espacial
- c. Estructurado/no estructurado
- d. Con control convencional de la plaga objetivo vs sin control
- e. Capacidad de proporcionar individuos de manera sincronizada con el cultivo biotecnológico
- f. Cantidad de individuos que produce en comparación con el cultivo biotecnológico

### **5. ASPECTOS SOCIALES/ECONÓMICOS**

- a. Actitud cultural frente a los cultivos biotecnológicos
- b. Rentabilidad al productor
- c. Nivel de organización social



d. Grado de complejidad de los programas de manejo de la resistencia

e. Estructura regulatoria

---

*Dominancia de los alelos de resistencia.* Los estudios de laboratorio controlados son importantes para determinar la genética de la resistencia a los insecticidas: heredabilidad, nivel de dominancia y número de genes que participan. Para este fin, grupos de individuos homocigotos resistentes se cruzan, en forma recíproca, con un número similar de los homocigotos susceptibles. Bioensayos completos se llevan a cabo con las razas parentales, así como en la progenie F1. Si la línea Log Dosis-Probit de la F1 (RS) está cerca de la parental susceptible, la resistencia es recesiva; de lo contrario es dominante. Cuando esa línea está en el medio de ambas parentales, la resistencia se considera codominante.

Las estrategias de manejo de resistencia son más eficientes cuando la resistencia es recesiva (Tabashnik *et al.*, 1999) debido a que se requiere una presión de selección más pequeña para eliminar individuos heterocigotos, evitando así la aparición de los resistentes homocigotos. En la mayoría de los casos, la resistencia a las proteínas de Bt varía de parcialmente a totalmente recesiva (Tabashnik 1994, Ferre *et al.* 1995, Gould *et al.* 1992, Tabashnik *et al.* 1997 a, b).

*Aptitud biológica.* En general, los individuos resistentes son menos aptos que los susceptibles en ausencia de presión de selección (Georghiou y Taylor 1986); es decir, que tienen problemas para encontrar a la pareja, sus estados biológicos duran más tiempo, dejan menos descendencia, etc. Si no fuera de esta manera, la resistencia sería un fenómeno común independientemente o el uso de insecticidas. Estudios recientes sugieren que los genotipos resistentes al Bt son menos aptos en relación a sus contrapartes susceptibles (Tang *et al.*, 1997); en consecuencia la resistencia es inestable en ausencia de presión de selección.

*Cópula aleatoria entre individuos susceptibles e individuos resistentes.* Apareamiento al azar entre individuos es crucial para retrasar la aparición de resistencia. El apareamiento no aleatorio se produce cuando un individuo susceptible busca un genotipo similar; es decir que para aparearse es deseable que un individuo susceptible sea incapaz de reconocer una pareja que sea resistente. Para minimizar el apareamiento no aleatorio entre los individuos seleccionados con el cultivo Bt y aquellos no seleccionados, el refugio debe ser desplegado lo suficientemente cerca, de tamaño apropiado y que produzca adultos susceptibles de manera sincrónica con el cultivo Bt.

*Descendencia por generación.* A mayor descendencia se aumenta la probabilidad de desarrollar resistencia (Georghiou y Taylor 1986). Una especie sexual con alta fertilidad produce más variación genética entre los descendientes sobre la cual operan las proteínas de Bt que expresa el cultivo transgénico, lo que aumenta la posibilidad de seleccionar genes de resistencia. La misma tendencia se observa con el número de generaciones por año (Georghiou 1981). La mayoría de las plagas Bt-sensibles que afectan el maíz tienen de uno a tres generaciones por año.

*Tiempo que dura una generación.* En muchas zonas de cultivo, el invierno se caracteriza por temperaturas muy bajas. Este fenómeno influye en la esperanza de vida de las plagas durante este periodo. En casos extremos, el invierno elimina a todos los individuos independientemente de que sean resistentes o susceptibles. Teniendo en cuenta que las plagas resistentes a las proteínas de Bt son en general menos aptas, las bajas temperaturas pueden reducir su frecuencia relativa; mitigando así la velocidad a la que la resistencia evoluciona. Sin embargo, se necesitan más estudios para aclarar la importancia de la supervivencia diferencial con hibernación.

*Condiciones ambientales para el desarrollo de la plaga.* Cuando las condiciones ambientales son “ideales” para que se incremente la densidad de población de las plagas objetivo, el control de plagas puede resultar inapropiado a pesar de que el cultivo Bt tenga niveles de eficacia altos. El uso de estos cultivos manifiesta las mismas propiedades del combate químico convencional en el sentido de que la mortalidad es independiente de la densidad; es decir, que si un cultivo Bt elimina al 95% de los individuos de la plaga objetivo se considera una eficacia alta, pero no es lo mismo una supervivencia del 95% cuando los individuos tratados son 1000 a cuando son cien millones. En ambos casos el nivel de eficacia pudiera ser el mismo, pero en éste último se percibe por parte del agricultor como una falla de control.

*Efecto isla.* El efecto “isla” ocurre cuando un cultivo a campo abierto tiene una plaga específica; es decir, que no es compartida con ningún otro cultivo, o bien que se siembra sobre una superficie donde la inmigración es inexistente. Este escenario ocurrió en Puerto Rico con la exposición del gusano cogollero a la proteína Cry1F que expresa el maíz biotecnológico. Puerto Rico es de hecho una isla carente de inmigración de individuos de gusano cogollero y prácticamente toda la población de esta especie fue seleccionada con la citada proteína de Bt. Esto explica parcialmente la razón de del rápido desarrollo de resistencia del gusano cogollero a la proteína Cry1F de Bt en maíz (Storer 2010).

La migración juega un papel crítico en la evolución de la resistencia. Su influencia es tan grande que, en ausencia de la migración, la resistencia se desarrollan a ritmo similar sin importar si la herencia es recesiva o dominante (Georghiou y Taylor 1977, 1986). La cantidad de individuos SS que arriban es crítico para diluir la resistencia al permitir que el cruzamiento con los insectos

RR emergentes del cultivo Bt-cosecha. El cruzamiento de individuos SS y RR producirá descendencia RS, misma que es eliminada por el cultivo Bt.

La migración de a gran distancia implica el movimiento de plagas de insectos entre agroecosistemas lejanos. Este fenómeno es particularmente importante debido a que los programas de manejo de la resistencia pueden ser significativamente afectados dependiendo de la frecuencia y del genotipo de los insectos que ingresan a zonas de cultivos biotecnológicos.

La dispersión implica el movimiento de los insectos a corta distancia, por ejemplo, del refugio al cultivo Bt y viceversa, así como el movimiento de insectos de una planta a otra dentro del cultivo transgénico (Mallet y Porter 1992). Se necesitan más estudios ecológicos para entender este factor y por tanto mejorar el despliegue de refugio para aumentar la interacción entre los individuos seleccionados Bt y no seleccionados.

*Intensidad de la expresión de la proteína de Bt.* El porcentaje de mortalidad de los insectos objeto de control se correlaciona positivamente con el nivel de expresión de la toxina Bt. La resistencia no va a evolucionar si se impone cero o 100% de la mortalidad en los individuos tratados. La expresión elevada de la proteína Bt, es decir capaz de matar a un individuo RS, así como la existencia de un refugio eficaz se consideran las principales estrategias del manejo de la resistencia (Roush 1994, 1996, 1997a, Gould 1998). En este contexto, una dosis alta se define como 25 veces la concentración de proteína de Bt necesaria para matar a una larva susceptible (US EPA 1998). El propósito fundamental del nivel de expresión de proteína de Bt consiste en lograr la eliminación de todos los genotipos heterocigóticos, evitando así la formación de individuos homocigotos resistentes (Roush y Daly 1990, Gould 1994). Los cultivos Bt han sido capaces de matar a 100% de los genotipos heterocigóticos en *Heliothis virescens* (Fabricius) (Gould *et al.*

1997) y *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Roush 1994, Metz *et al.* 1995). Las proteínas Cry1A (b), Cry1A (c), y Cry9C proporcionan un control muy eficaz y selectivo de las principales plagas de lepidópteros del maíz (Koziel *et al.* 1993, Fischhoff 1996, Jansens *et al.* 1997). La proteína Cry1A es particularmente eficaz contra *Spodoptera exigua* (Hübner) (Moar *et al.* 1995), *P. gossypiella*, y *H. virescens*.

En el maíz, la expresión de la proteína Bt disminuye a medida que la planta madura después de la antesis, creando así una ventana para la supervivencia heterocigotos siempre y cuando la planta por su fenología sea vulnerable al ataque de la plaga objetivo. Esta situación no aplica, por ejemplo para *S. frugiperda* que causan daño maíz cuando este aún tiene el color verde característico.

Expresión toxina Bt en el tejido específico de maíz influirá en la esperanza de vida de los individuos RS. Si toda la planta expresa la proteína Bt, la presión de selección se ejerce en todos los insectos susceptibles alimentan de ésta. De lo contrario, las larvas tienen la opción de avanzar hacia los tejidos con baja expresión toxina Bt y crear así las condiciones para que los genotipos RS sobrevivan, incrementando la posibilidad de que entre ellos se encuentren y generen a los individuos RR.

*Temporalidad del cultivo.* Es común que la siembra de un cultivo Bt ocurra una sola vez al año y por ende tenga definido el periodo de siembra. Sin embargo hay ocasiones en que el cultivo se siembra todo el año, como ocurre en Puerto Rico (Storer 2010). Esta condición acelera el desarrollo de resistencia debido a que se tiene el cultivo todo el año y por ende hay mayor cantidad de generaciones de la plaga objetivo por año.

*Superficie cultivada.* La penetración en el mercado de los cultivos Bt influye en la presión de selección total mediante la definición del porcentaje de la población seleccionada. Áreas agrícolas con menos del 50% de la superficie cultivada con cultivos Bt tienen poco riesgo de desarrollo de resistencia, en comparación con aquellas áreas con superficies elevadas de cultivo y que prácticamente todo éste es transgénico. A medida que aumenta la superficie con cultivos Bt, la necesidad de desplegar programas de manejo de la resistencia más eficaces también se hace importante. Existen otros factores ajenos a esta tecnología que podrían limitar su uso extensivo. Por ejemplo, en México, la disponibilidad de agua también influye en la penetración comercial del algodón Bt.

*Cantidad de genes diferentes disponibles para su uso.* A medida que la resistencia se desarrolla, la disponibilidad de nuevas proteínas de Bt sin resistencia cruzada es muy apreciada. Las empresas están invirtiendo gran cantidad de dinero y esfuerzo científico para encontrar nuevas proteínas de Bt con potencial para insertarse en los cultivos importantes y que no tengan resistencia cruzada con las proteínas actualmente en uso. Sin embargo, esta estrategia es de alcance limitado en ausencia de programas de manejo de la resistencia eficaces.

*Grado de resistencia cruzada entre los genes que se utilizan en el campo.* La resistencia cruzada positiva existe cuando el individuo tiene protección contra dos o más agentes de la selección debido a la expresión de un solo mecanismo de resistencia. Desafortunadamente, la selección con una proteína de Bt puede producir resistencia cruzada a otras proteínas (Gould *et al.* 1992, McGaughey y Whalon 1992, Moar *et al.* 1995, Tabashnik *et al.* 1996). El nivel de resistencia cruzada también podría cambiar dependiendo de la especie objetivo; por ejemplo, la proteína

cry1A(b) y la proteína Cry9C actúan de forma independiente en el barrenador europeo del maíz, pero no en el gusano del maíz o gusano cogollero (Lambert *et al.* 1996).

El conocimiento sobre la resistencia cruzada entre proteínas de Bt puede proporcionar ideas sobre su uso en rotación o en forma apilada. Por ejemplo, no hay un sentido en rotar cultivos Bt que expresan proteínas con elevado nivel de resistencia cruzada. Sin embargo, el uso de un refugio y la rotación de las proteínas no relacionadas en un área geográfica grande tienen el potencial de retrasar la resistencia.

*Uso alternado vs genes apilados.* Los cultivos Bt con genes apilados de Bt constituyen mejor opción que aquellos que solo tienen un gene y esto se debe a la mortalidad redundante (Curtis 1985, 1987, Mani 1985, Comins 1986, Taylor 1986); un insecto capaz de sobrevivir a la proteína "A" será eliminado por la proteína "B". El uso secuencial de toxinas Bt podría ser similar o mejor que el despliegue en forma de mosaico (Roush 1989, 1997a, b). Si la plaga objetivo no es altamente sensible, cultivos Bt que expresan una sola proteína están en alto riesgo (Roush 1997b, Gould y Tabashnik 1998). En ausencia de refugio, ninguna de estas estrategias será útil.

*Potencia entomocida de las proteínas de Bt.* La eficacia en el campo de la proteína Bt influye en la evolución de la resistencia. Si la eficacia es lo suficientemente alta como para matar a los individuos heterocigóticos, la evolución de la resistencia será más lenta.

*Tamaño del refugio.* La función principal del refugio es proporcionar suficientes individuos SS para aparearse con aquellos posibles RR que aporte el cultivo Bt (Alstad y Andow 1995, Roush 1996, Andow y Hutchison 1998, Gould 1998). Este papel podría cambiar a medida que el



refugio empiece a ser invadido por insectos RR; en consecuencia, también se debe vigilar cualquier cambio en el papel que el refugio debe tener para mitigar la resistencia.

El tamaño estimado refugio varía de 5 a 60% (Ostlie *et al.* 1997), indicando la complejidad que se tiene para determinar en punto óptimo entre la carga económica de tener refugio y su eficacia en el retraso de la aparición de resistencia. Es difícil convencer a los agricultores sobre la importancia de utilizar cierta cantidad de sus tierras para producir plagas SS, con el argumento de que esta es una manera eficaz para hacer frente a un problema que no existe en ese momento (Pilcher y Rice 1998). Una serie de modelos de computadora se han explorado para evaluar el impacto del tamaño de refugio en el potencial de resistencia de las plagas a los cultivos Bt resistencia (Tabashnik 1990) y lograr un consenso entre la percepción de riesgo y los datos científicos. La situación se complica cuando comparten la misma plaga más de un tipo de cultivo Bt que coexisten en la misma zona de cultivo.

En México, para el caso de algodónero se utilizan dos tipos de proporciones cultivo Bt y refugio: 80:20 y 96:4. En la primera opción, por cada 80 hectáreas de algodónero Bt, los agricultores deben desplegar 20 hectáreas de algodónero no-Bt; plagas objetivo en el refugio se pueden controlar químicamente, excepto con formulaciones comerciales de Bt. En la opción 96:4, por cada 96 hectáreas de algodónero Bt, se deben tener cuatro hectáreas de algodónero no-Bt y no se permite el combate químico de las plagas objetivo en este refugio. Cada agricultor decide la mejor opción. Sin embargo, existe evidencia científica de que la opción 96:4 es mejor debido a que los individuos que emergen del refugio tienen mejor aptitud biológica que los del refugio 20%.

*Refugio estructurado vs refugio no estructurado.* Hay dos tipos de refugios: estructurados y no estructurados. Los refugios estructurados son aquellos que se planean y se cultivan con el propósito específico de contribuir al manejo de la resistencia de las plagas objetivo a los cultivos Bt. Es decir, se espera que sean una fuente significativa de individuos SS con alto potencial de aparearse con los posibles individuos RR que emerjan de los cultivos Bt y así mitigar el desarrollo de resistencia. El refugio no estructurado está constituido por el conjunto cultivos no-Bt y plantas silvestres que sean capaces de permitir la reproducción y emergencia sincrónica de individuos SS que interactúen con aquellos RR que produzca el cultivo Bt. Es decir, existen y contribuyen a mitigar la resistencia pero no existen de forma planeada. Aun así, pueden llegar a tener enorme importancia en los programas de manejo de la resistencia.

*Capacidad de proporcionar individuos de manera sincronizada con el cultivo biotecnológico.* La sincronía en la emergencia de individuos entre refugio y cultivos Bt representa una de las mayores preocupaciones acerca de la utilidad de esta estrategia. El refugio se concibe como un área con las siguientes características: no expresa las proteínas de Bt, se siembra en la misma fecha que el cultivo Bt y se encuentra a una distancia prudente de tal manera permita la interacción exitosa entre los individuos RR y SS. El problema es crítico cuando la población objetivo tiene una sola generación por ciclo de cultivo. Esta preocupación se apoya en el hecho de que los individuos RR del cultivo Bt son menos aptos y por lo tanto les podría tomar más tiempo para convertirse en adultos y en consecuencia se reduce la eficacia del manejo de la resistencia.

*Cantidad de individuos que produce en comparación con el cultivo biotecnológico.* De acuerdo con la EPA (1998) una proporción de 500: 1 es suficiente para frenar la resistencia. Es decir que el refugio produzca 500 individuos SS por cada individuo RR del cultivo Bt.

*Actitud cultural frente a los cultivos biotecnológicos.* Los factores sociales y económicos también juegan un papel importante en la evolución de la resistencia (Blancke *et. al.* 2015). El uso comercial de estos cultivos se debe dar en el escenario de una regulación basada en evidencias científicas cuya evaluación de riesgo permita inferir inferensobre los potenciales efectos adversos a la salud humana, a la biodiversidad y a la fitosanidad misma.

Hay sociedades o sectores de la sociedad que motivados por cuestiones emocionales sostienen que la sola presencia de los transgenes en el cultivo les roba lo natural y por ende su utilidad. Este es un camino subjetivo que menosprecia al análisis de riesgo como herramienta fundamental para decidir o no la pertinencia de utilizar esta tecnología y por ende constituye en sí un enorme riesgo al eliminar *a priori* una herramienta que podría jugar un papel importante en la seguridad alimentaria en el escenario de cambio climático.

*Rentabilidad al productor.* La aceptación de los cultivos Bt por parte de los productores está estrechamente relacionada con su rentabilidad. Esa rentabilidad depende del trinomio calidad genética del recipiente (cultivo), eficacia del transgene y nivel de la necesidad fitosanitaria que satisface. Existe mayor riesgo de resistencia cuando el cultivo Bt reduce sustancialmente el costo de la control de plagas, lo que conlleva a una mayor aceptación en el mercado, imponiendo así mayor presión de selección sobre áreas geográficas extensas.

*Nivel de organización social.* El nivel de organización social influye en la eficacia de los refugios. Antes de la siembra del cultivo Bt, los agricultores deben firmar un acuerdo con la empresa respectiva. En este acuerdo, los agricultores adquieren la responsabilidad de implementar apropiadamente el refugio. Si la organización social es fuerte, es fácil convencerlos de la importancia de refugio como una estrategia de manejo de la resistencia. Las empresas deben considerar que los agricultores no son expertos en manejo de la resistencia y que no están dispuestos a perder el tiempo en algo que es demasiado complicado.

Tratar con pocos agricultores a gran escala es más fácil de tratar con muchos de ellos con pocas superficies. Los grandes agricultores son, en general, más sensibles a las nuevas tecnologías y propensos a utilizarla una vez que se demuestre su rentabilidad.

*Nivel de complejidad de los programas de manejo de resistencia.* Los programas de manejo de resistencia deben, en principio, ser eficaces para mitigar la velocidad a que se incrementa la frecuencia de individuos resistentes. Considerando que, en la mayoría de los casos el productor es un ente importante en el éxito del manejo de la resistencia, a mayor complejidad de las estrategias y tácticas, menor será su posibilidad de adopción y por ende de aplicación.

## LITERATURA CITADA

- Alstad, D. N. and D. A. Andow. 1995. Implementing management of insect resistance to transgenic crops. *AgBiotech news* 8:177-181.
- Andow, D. A. and W. D. Hutchinson. 1998. *Bt* corn resistance management. Now or never: serious new plans to save a natural pest control. Union of Concerned Scientist. M. Mellon and J. Rissler (Eds.).Cambridge, MA.
- Blancke S., F. V. Breusegem, G. De Jaeger, J. Braeckman, M. V. Montagu. 2015. Fatal attraction: the intuitive appeal of GMO opposition. *Trends in Plant Science*. 20: 414-418.
- Cannon, R. J. C. 1993. Prospects and progress for *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. *Pest. Sci.* 37:331-335.
- Comins, H. N. 1977a. The development of insecticide resistance in the presence of migration. *J. Theoret. Biol.* 64:177-197.
- Comins, H. N. 1977b. The management of pesticide resistance. *J. Theoret. Biol.* 65:399-420.
- Comins, H. N. 1986. Tactics for resistance management using multiple pesticides. *Agric. Ecosyst. Environ.* 16:129-148.
- Curtis, C. F. 1985. Theoretical models of the use of insecticide mixtures for the management of resistance. *Bull. Entomol. Res.* 75:259-265.
- Curtis, C. F. 1987. Genetic aspects for selection for resistance pp. 150.161. *In: Combating resistance to xenobiotics: biological and chemical approaches.* M. G. Ford, D. W. Hollman, B. P. S. Khambay, and R. M. Sawacki. Horwood, Chinchester, England.

- Farias, J. R., D. A. Andow, R. Horikoshi, R. J. Sorgatto, P. Fresia, A. C. dos Santos, C. omoto. 2014. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Crop Protection*. 64: 150-158.
- Feldman, J. and T. Stone 1997. The development of a comprehensive resistance management plan for potatoes expressing the cry3A endotoxin, pp 49-61. *In: advances in insect control: the role of transgenic plants*. N. Carozzi and M. Koziel (ed). London: Taylor and Francis.
- Ferré, J., B. Escriche, Y. Bel., and J. Van Rie. 1995. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* 132:1-7.
- Fischhoff, D. A. 1996. Insect-resistant crop plants, pp. 214-227. *In: Biotechnology and integrated pest management*. CAB International, Wallingford, UK.
- Fitt, G. P., C. L. Mares, and D. J. Llewellyn. 1994. Field evaluation and potential ecological impact of transgenic cottons (*Gossypium hirsutum*) in Australia. *Biocont. Sci. and Tech.* 4:535-548.
- Gasser, C. S. and R. T. Fraley. 1989. Isolation of tissue specific cDNAs from tomato pistils. *Plant Cell* 1:15-24.
- Georghiou, G. P. 1981. The occurrence of resistance to pesticides in arthropods: an index of cases reported through 1980. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Georghiou, G. P., and C. E. Taylor. 1977. Genetic and biological influences in the evolution of insecticide resistance. *J. Econ. Entomol.* 70:319-323.

- Georghiou, G. P., and C. E. Taylor. 1986. Factors influencing the evolution of resistance, Pp. 157-169. *In*: Pesticide resistance: strategies and tactics for management. National Academy Press. Washington, D. C.
- Gill, S. S., E. A. Cowles, and P. V. Pietrantonio. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Ann. Rev. Entomol.* 37:615-636.
- Gould, F. 1986. Simulation models for predicting durability of insect-resistant germ plasm: Hessian fly (Diptera: Cecidomyiidae)-resistant winter wheat. *Environ. Entomol.* 15:11-23.
- Gould, F. 1994. Potential and problems with high-dose strategies for pesticidal engineered crops. *Biocont. Sci. Technol.* 4:451-461.
- Gould, F. A. 1998. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. *Ann. Rev. Entomol.* 43:701-726.
- Gould, F. A., A. Anderson, A. Jones, D. Sumerford, D. Heckel, J. Lopez, S. Micinski, R. Leonard, and M. Laster. 1997. Initial frequency of alleles for resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in field populations of *Heliothis virescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 3519-3523.
- Gould, F. A., A. Anderson., A. Reynolds, L. Bumgarder, and W. Moar. 1995. Selection and genetic analysis of a *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) strains with high levels of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *J. Econ. Entomol.* 88:1545-1559.
- Gould, F. A., A. Martínez-Ramírez, A. Anderson, J. Ferré, F. J. Silva, and W. J. Moar. 1992. Broad-spectrum resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:7986-7990.

- Gould, F. and B. E. Tabashnik. 1998. Bt-cotton resistance management, pp.67-105. *In*: Now or never: serious new plans to save a natural pest control. M. Mellon and J. Rissler (Eds.). Cambridge, MA: Union of Concerned Scientist.
- Gould, F., G. G. Kennedy, and M. T. Johnson. 1991. Effects of natural enemies on the rate of herbivore adaptation to resistant host plant. *Entomol. Experimentalis et applicata* 58:1-14.
- Höfte, H. and H. R. Whitely. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53:242-255.
- Hokkanen, H. M. and C. H. Wearing. 1994. The safe deployment of *Bacillus thuringiensis* genes in crop plants: conclusions and recommendations of OECD workshop on ecological implications of transgenic crops containing Bt-toxin genes. *Biocontrol Sci. Technol.* 4:399-404.
- ISAAA. 2016. International service for de Acquisition of Agri-Biotech Applications. <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/> (Consultado en febrero 12, 2016)
- Jansens, S., A. Van Vliet, C. Dickburt, C. Buysse, C. Piens, B. Saey, A. De Wulf, A. Paez, E. Gobel, and M. Peferoen. 1997. Field evaluation of transgenic corn expressing a Cry9C insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*, protected from European corn borer. *Crop. Sci.* 37:1616-1624.
- Knowles, B. 1994. Mechanisms of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal endotoxins. *Adv. Insect. Physiol.* 24:275-308.
- Koziel, M. K., F. L. Belang, C. Bowman, N. B. Carozzi, R. Crenshaw, L. Crossland, J. Dawson, N. Desai, M. Hill, S. Kadwell, K. Launis, K. Lewis, D. Jaddox, K. McPherson, M. R. Mefhji, E. Merlin, R. Rhodes, G. W. Warren, M. Wright, and S. Evola. 1993. Field



- performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology* 11:194-200.
- Lambert, B., L. Buysse, C. Decock, S. Jansens, C. Piensn B. Saey, J. Seurinck, K. Van Audenhove, J. Van Rie, A van Vliet, and M. Peferoen. 1996. A *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a high activity against members of the family Noctuidae. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:80-86.
- Mallet, J., and R. Porter. 1992. Preventing insect adaptation to insect-resistant crops: are seed mixtures or refugia the best strategy? *Proc. Soc. London Ser B* 250:165-169.
- Mani, G. S. 1985. Evolution of resistance in the presence of two insecticides. *Genetics* 109:761-783.
- McGaughey, W. H. and M. E. Whalon. 1992. Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Science* 258:1451-1455.
- Mckensie, J. A. 1996. Ecological and evolutionary aspects of insecticide resistance. Academic Press, Austin, TX. 185p.
- Meeusen, R. L. and G. Warren. 1989. Insect control with genetically engineered crops. *Ann. Rev. Entomol.* 34:373-381.
- Metz, T. D., R. T. Roush, J. Tang, A. M. Shelton, and E. D. Earle. 1995. Transgenic broccoli expressing a *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein: implications for pest resistance management strategies. *Mol. Breeding* 1:309-317.
- Moar, W. J., M. Pusztai-Carey, 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). *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2086-2092.

- Ostlie, K. R., W. D. Hutchinson, and R. L. Hellmich. 1997. Bt-corn and European corn borer: long-term success through resistance management. North Central Reg. Ext. Publ. Univ. Minn. Ext. Serv., St. Paul, MN.
- Perlak, F., T. B. Stone, Y. M. Muskopf, L. J. Petersen, G. B. Parker, S. A. McPherson, J. Wyman, S. Love, D. Biever, G. Reed, and D. Fischhoff. 1993. Genetically improved potatoes; protection from damage by Colorado potato beetles. *Plant Molecular Biol.* 22:313-321.
- Pilcher, C. D. and M. E. Rice. 1998. Management of European corn borer (Lepidoptera: Noctuidae) and corn rootworms (Coleoptera: Chrysomelidae) with transgenic corn: a survey of farmer perceptions. *Am. Entomol.* 44:36-44.
- Roush, R. T. 1989. Designing resistance management programs: How can you choose? *Pestic. Sci.* 26:423-441.
- Roush, R. T. 1994. Managing pests and their resistance to *Bacillus thuringiensis*: can transgenic crops be better than sprays? *Biocontrol Sci. Technol.* 4:501-516.
- Roush, R. T. 1996. Can we slow adaptation by pests to insect resistant transgenic crops pp. 242-263. *In: Biotechnology and integrated pest management.* G. J. Persley (Ed.). University Press, Cambridge, England.
- Roush, R. T. 1997a. Managing resistance to transgenic crops, pp. 271-294. *In: Advances in insect control: the role of transgenic plants.* N. Carozzi and M. Koziel (Ed.). London: Taylor and Francis.
- Roush, R. T. 1997b. Bt-transgenic crops: just another pretty insecticide or a chance for a new start in resistance management? *Pestic. Sci.* 51:328-334.

- Roush, R. T. and A. M. Shelton. 1997. Assessing the odds; the emergence of resistance to Bt transgenic plants. *Nature Biotech.* 15:816-817.
- Roush, R. T., and G. L. Miller. 1986. Considerations for design of insecticide resistance monitoring programs. *J. Econ. Entomol.* 79:293-298.
- Roush, R. T., and J. C. Daly. 1990. The role of population genetics in resistance research and management, pp. 97-152. *In: Pesticide resistance in arthropods.* R. T. Roush and B. E. Tabashnik (Eds.) Chapman and Hall, New York.
- Starnes, R. L., C. L. Liu, and P. G. Marrone. 1993. History, use, and future of microbial insecticides. *Am. Entomologist* 39:83-91.
- Storer, N. P., J. M. Babcock, M. Schlenz, T. Meade, G. D. Tompson, J. W. Bing, and R. M. Huckaba. 2010. Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. *J. Econ. Entomol.* 103: 1031-1038
- Tabashnik, B. E. 1990. Modeling and evaluation of resistance management tactics, pp. 153-182. *In: Pesticide resistance in arthropods.* R. T. Roush and B. E. Tabashnik (Eds.) Chapman and Hall, New York.
- Tabashnik, B. E. 1994. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Ann. Rev. Entomol.* 39:47-79.
- Tabashnik, B. E., L. Yong-Biao, T. Malvar, D. G. Heckel, L. Masson, and J. Ferré. 1999. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*: uniform or diverse? pp 75-80. *In: Insecticide resistance: from mechanisms to management.* I. Denholm, J. A. Pickett, and A. L. Devonshire (edit.). CABI- Publishing – The Royal Society. UK.

- Tabashnik, B. E., T. Malvar, Y. B. Liu, N. Finson, D. Borthakur, B. S. Shin, S. H. Parks, L. Masson, R. A. de maagd, and D. Bosh. 1996. Cross resistance of the diamondback moth indicates altered interactions with domains II of *Bacillus thuringiensis* toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2839-2844.
- Tabashnik, B. E., Y. B. Liu, N. Finson, L. Masson, and D. G. Heckel. 1977a. One gene in diamondback moth confers resistance to four *Bacillus thuringiensis* toxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:1640-1644.
- Tabashnik, B. E., Y. B. Liu., T. Malvar, D. G. Heckel, L. Masson,, V. Ballester, F. Granero, J. L. Mensua, and J. Ferré. 1997b. Global variation in the genetic and biochemical basis of diamondback moth resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:12780-12785.
- Tang, J. D., S. Gilboa, R. T. Roush, and A. M. Shelton. 1997. Inheritance, stability, and lack-of-fitness costs of field-selected resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) from Florida. *J. Econ. Entomol.* 90:732-741.
- Taylor, C. E. 1986. Genetics and evolution of resistance to insecticides. *Biol. J. Linn. Soc.* 27:103-112.
- U. S. Environmental Protection Agency. 1998. FIFRA Scientific Advisory Panel, Subpanel on *Bacillus thuringiensis* (Bt) Plant Pesticides and Resistance Management. February 9-10, 1998. (Docket Number: OPP 00231).
- Weinzierl, R., C. Pierce, and K. Steffy. 1997. Preliminary results of the 1997 summer survey for Bt resistant European corn borers. *Pest. Manag. Crop. Dev. Bull.* 22:183-184.

Whitten, M. J., and J. A. McKensie. 1982. The genetics basis for pesticide resistance, Pp, 1-16.

*In: Proc. 3<sup>rd</sup> Australas. Conf. Grassl. Invert. Ecol. K. E. lee (Ed.) Adelaide, Australia: S. A.*

Government Printer.

### III. LÍNEA BASE DE SUSCEPTIBILIDAD A LA PROTEÍNA VIP3AA20 DE *BACILLUS THURINGIENSIS* BERLINER EN POBLACIONES MEXICANAS DE *SPODOPTERA FRUGIPERDA* J. E. SMITH (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE).

#### RESUMEN

Los requisitos reglamentarios mexicanos establecen que antes del uso comercial de los cultivos modificados genéticamente en la protección de las plantas, la línea base de susceptibilidad de la plaga objetivo a controlar debe ser conocida. Se determinó la línea base de susceptibilidad a la proteína Vip3Aa20 de *Bacillus thuringiensis* (Bt) en larvas de neonatas de *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith procedentes de los estados mexicanos de Sinaloa, Tamaulipas y Chihuahua. Se utilizó el bioensayo completo de capa. A los siete días de exposición a dicha proteína de Bt, los valores de CL<sub>50</sub> oscilaron de 7,9 (0,01-21,5) a 543,6 (351,9-937,9) ng cm<sup>-2</sup>, mientras que los valores de CL<sub>90</sub> estaban entre 90,9 (71,1-131,4) y 2403 (1765-3520) ng cm<sup>-2</sup>. La mayor variación en la mortalidad en la CL<sub>50</sub> fue de 4,91× y en la CL<sub>90</sub> de 6,14×. Para la mayoría de las poblaciones, el peso corporal de las larvas se inhibió en más del 95% con tratamientos a concentraciones de 1120 ng cm<sup>-2</sup> de la proteína Vip3Aa20. Estos valores de respuesta representan la variación geográfica natural de la susceptibilidad y constituyen una línea de base para comparar con los obtenidos tras la comercialización del maíz Bt que expresa la proteína Vip3Aa20 en México.

## INTRODUCCIÓN

La superficie total de cultivo agrícola de México fue de 15.720.035 ha en 2014. De éstos, 8.013.819 se dedicaron exclusivamente al maíz: cereales, forraje, maíz, palomitas de maíz, etc. (SIAP, 2014). El gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae) se considera la plaga principal del maíz causando, en casos extremos, una pérdida del rendimiento del 100%. Esta especie de insectos es polífaga y se ha documentado su capacidad para alimentarse de 98 especies de plantas (Pogue, 2002). En México, para el combate de esta plaga se tienen registrados 38 ingredientes activos de insecticidas convencionales y seis formulaciones comerciales basadas en *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) (DEAQ, 2014). Esta plaga de insectos es un problema cada vez mayor para los agricultores mexicanos que, con frecuencia, aplican hasta seis veces por temporada. Ante este escenario, el uso de otras tecnologías eficaces, tales como cultivos que expresan proteínas entomocidas de Bt, están siendo demandados por productores mexicanos de gran escala.

El uso de maíz Bt está aumentando en todo el mundo (Tabashnik, 1994; James, 2006) para controlar varias plagas de insectos que han sido difíciles de manejar con insecticidas convencionales (Villalobos, 2008). Como una estrategia de control eficaz para el gusano cogollero, se está desplegando el uso de híbridos de maíz Bt que expresan una o más proteínas Bt.

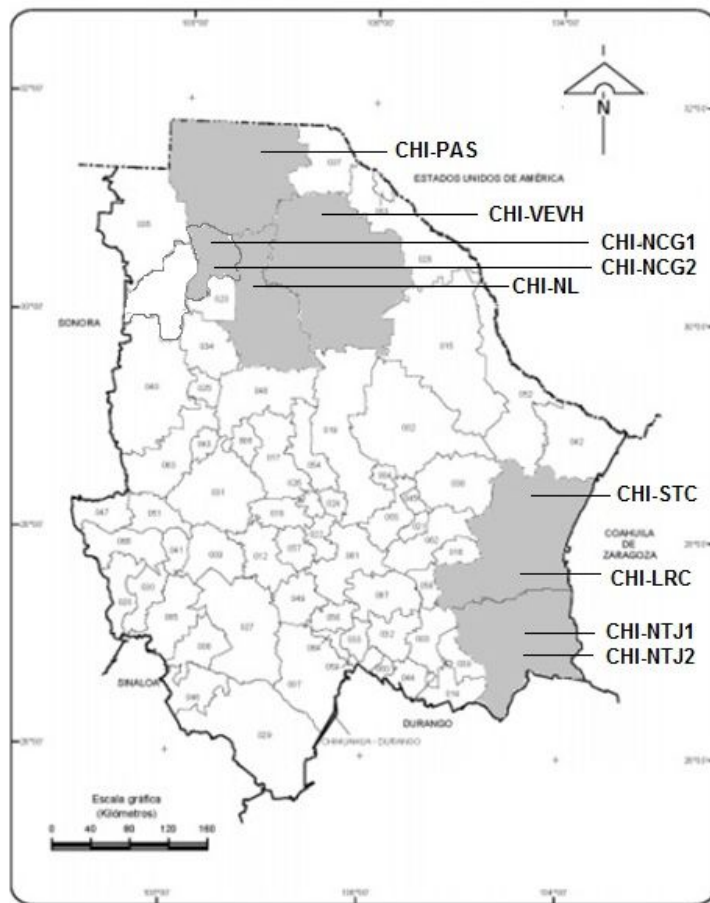
Desde el punto de vista agrícola, una de las principales preocupaciones sobre el uso de los cultivos Bt es el riesgo de desarrollo de resistencia por las plagas objetivo (Tabashnik et al., 2010). Para mitigar este problema, es necesario implementar un programa de manejo de la resistencia a los insectos (PMR). Un componente importante del PMR es la identificación inicial

de la variación natural de la respuesta de plaga objetivo a la proteína Bt expresada por el cultivo modificado genéticamente antes de que el cultivo Bt se utilice comercialmente (FAO, 1984). El objetivo de este estudio fue determinar la respuesta basal de susceptibilidad de las larvas neonatales de *S. frugiperda* a la proteína Vip3Aa20 Bt en poblaciones de diferentes regiones de México con potencial para cultivar maíz Bt en el futuro: Sinaloa, Tamaulipas y Chihuahua.

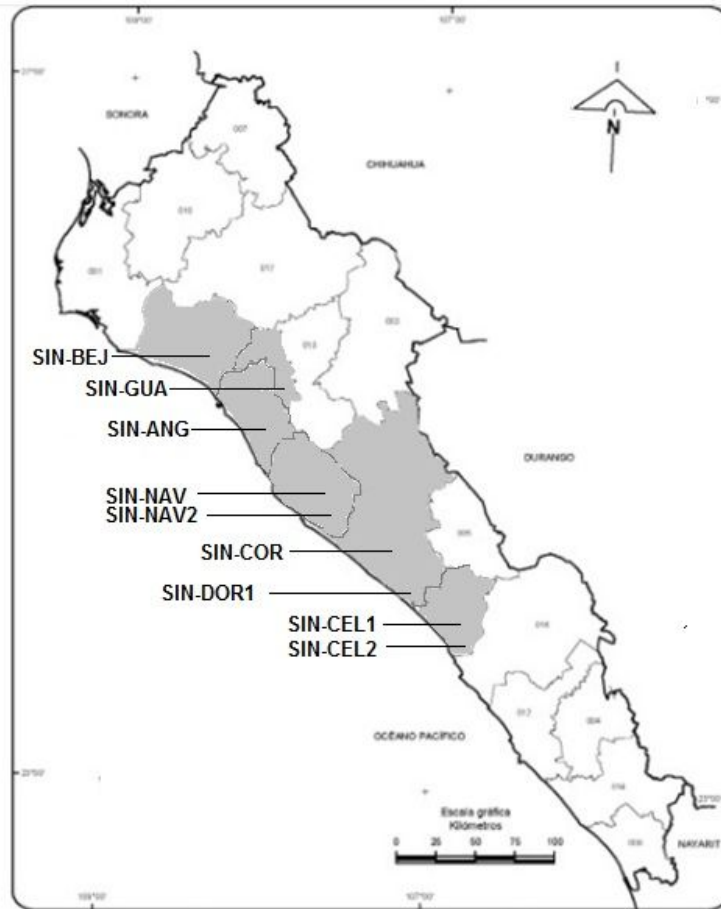
## MATERIALES Y MÉTODOS

**Poblaciones.** Las larvas desarrolladas ( $\geq$  tercer estadio) de *S. frugiperda* se recolectaron en el campo en diferentes lugares de los estados de Sinaloa, Chihuahua y Tamaulipas (Cuadro 1, Figuras 1, 2 y 3) durante 2015 y 2016. Las recolecciones de campo se llevaron a cabo en 27 lugares (nueve por estado), más la población susceptible de laboratorio.

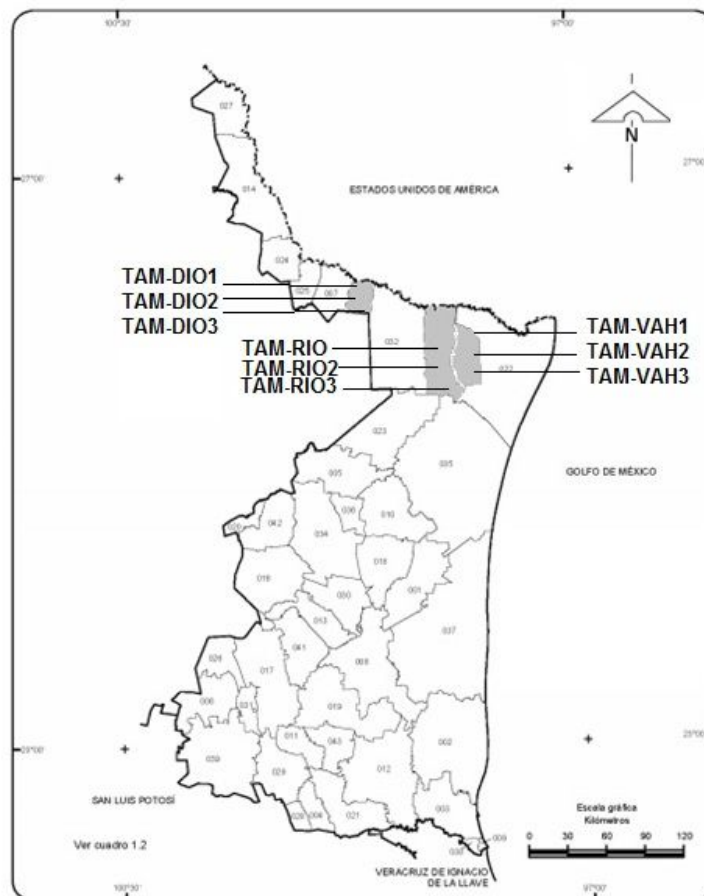




**Figura 1.** Localidades del estado de Chihuahua donde se recolectaron en el campo poblaciones de *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith.



**Figura 2.** Localidades del estado de Sinaloa donde se recolectaron en el campo poblaciones de *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith.



**Figura 1.** Localidades del estado de Tamaulipas donde se recolectaronb en el campo poblaciones de *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith.

Las larvas de *S. frugiperda* se recolectaron en el campo de cultivos convencionales de maíz. De cada localidad, se realizaron dos recolecciones de campo, con una distancia mínima de 15 km entre ellas. Una vez en el laboratorio, las larvas se colocaron en cuarentena para eliminar aquellas que estaban enfermas o parasitadas. Posteriormente, cada larva se transfirió individualmente a recipiente que contenía cuatro mL de dieta meridiana recién preparada (Fall armyworm diet, Southland Products, Inc., Lake Village, AR) para permitirles crecer y alcanzar el estado de pupa. Las pupas se colocaron dentro de bolsas de papel estraza de tamaño 8 y los

adultos que emergieron se alimentaron con agua destilada con 5% de azúcar. De 250 a 350 larvas desarrolladas ( $\geq$  tercer estadio) de cada recolecta en campo, en promedio, el 95% alcanzó la edad adulta. Las hembras ovipositaron en la cara interna de la bolsa, los huevos se recogieron y se colocaron en un recipiente para obtener larvas neonatas de F<sub>1</sub> para realizar bioensayos. Como referencia de susceptibilidad se utilizó una población de *S. frugiperda* susceptible a insecticidas, misma que ha permanecido en laboratorio libre de presión de selección durante 100 generaciones (S-LAB). Esta población susceptible se renueva, cada año, mediante la adición de individuos recolectados en el campo de Montecillo, Estado de México; una región donde no se usan insecticidas contra ella u otras especies de insectos. Estas poblaciones se criaron a  $27 \pm 1$  °C con un fotoperiodo de 14:10 D: N y humedad relativa (RH) de 70-80%.

Cuadro 1. Poblaciones mexicanas del gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda* utilizadas para determinar la línea base de susceptibilidad a la proteína Vip3Aa20 de *Bacillus thuringiensis* Berliner.

<b>Código de Población</b>	<b>Lugar de recolecta</b>	<b>Fecha</b>	<b>Latitud Longitud</b>
<b>Sinaloa</b>			
SIN-NAV1	Navolato	Febrero 11, 2015	N 24° 39' 45.6'' W 107° 30' 56.8''
SIN-DOR	Culiacán, El Dorado	Febrero 11, 2015	N 24° 19' 5.6'' W 107° 12' 12.0''
SIN-GUA	Guamuchil	Febrero 25, 2015	N 25° 14' 20.7'' W 108° 6' 5.6''
SIN-BEJ	Villa Benito Juárez (Tamazula)	Febrero 25, 2015	N 25° 28' 18.01'' W 108° 11' 5.55''
SIN-CEL1	Cruz de Elota	Febrero 25, 2015	N 24° 7' 27.0'' W 107° 4' 9.3''
SIN COR	Culiacán, Costa Rica	Marzo 9, 2015	N 24° 35' 56.0'' W 107° 27' 9.8''
SIN-NAV2	Navolato	Marzo 9, 2015	N 24° 39' 45.6'' W 107° 30' 56.8''
SIN-ANG	Angostura. Guamuchil	Marzo 11, 2015	N 25° 14' 20.7'' W 108° 6' 5.6''
SIN-CEL2	Cruz de Elota	Marzo 11, 2015	N 24° 7' 27.0''

W 107° 4' 9.3''

**Tamaulipas**

TAM-RIO1	Rio Bravo	Abril 30, 2015	N 25° 50' 1.06'' W 98° 00' 28.75''
TAM-DIO1	Díaz Ordaz	Mayo 11, 2015	N 26° 11' 27.44'' W 98° 34' 20.13''
TAM-VAH1	Ej. Molina Enríquez, Valle Hermoso	Mayo 20, 2015	N 25° 51' 22.76'' W 97° 48' 57.15''
TAM-RIO2	Rio Bravo	Mayo 2, 2015	N 25° 58' 02.34'' W 98° 00' 35.79''
TAM-RIO3	Rio Bravo	Agosto 1, 2015	N 25° 57' 58.28'' W 98° 00' 51.57''
TAM-VAH2	Valle Hermoso	Septiembre 10, 2015	N 25° 46' 26.85'' W 97° 45' 14.33''
TAM-VAH3	Valle Hermoso	Abril 13-16, 2016	N 25° 40' 07.8'' W 97° 54' 37.3''
TAM-DIO2	Camargo Díaz Ordaz	Abril 13-16, 2016	N 26° 17' 30.2'' W 98° 49' 0.3''

TAM-DIO3	CD. Gustavo Díaz Ordaz	Abril 18-20, 2016	N 26° 13' 28.45'' W 98° 43' 59.16''
----------	------------------------	----------------------	----------------------------------------

**Chihuahua**

CHI-STC	Santa Elena, Camargo	Agosto 17, 2015	N 27° 39' 07.40'' W 105° 14' 44''
CHI-LRC	Los Reyes, Camargo	Agosto 17, 2015	N 27° 43' 10.2'' W 105° 10' 30.1''
CHI-NCG1	El Capulín Nuevo Casas Grandes	Agosto 17, 2015	N 30° 45' 59.0'' W 107° 58' 18''
CHI-NCG2	Ejido Hidalgo, Nuevo Casas Grandes	Agosto 17, 2015	N 30° 35' 43'' W 107° 54' 21''
CHI-NTJ1	Jacobo Jiménez	Agosto 17, 2015	N 27° 04' 51'' W 104°55'11.9''
CHI-NTJ2	Nuevo Tampico Jiménez	Agosto 17, 2015	N 27° 20'10.6'' W 104° 53'11.9''
CHI-PAS	La Pasadita, Ascensión,	Agosto 19, 2015	N 31° 04' 30'' W 107° 59' 54''
CHI-NL	Ejido Nuevo Lajitas, Flores Magón, Mpio.	Agosto 20, 2015	N 30° 03' 45.3'' W 106° 54'

	Buenaventura,		14.9''
CHI-VEVH	Col. Valle la Esperanza,	Agosto 20, 2015	N 29° 57' 21''
	Villa Ahumada,		W 106° 10' 37''

---

**Proteína.** La proteína Vip3Aa20 fue proporcionada por Syngenta México S.A. de C.V., con una pureza de 86,5% y se almacenó a -20°C.

**Bioensayos de capa.** A cada pozo de una bandeja de bioensayo (BIO-BA-128W, CD International Inc, Pitman, NJ) se vertieron dos mL de dieta meridica (fall armyworm diet, Southland Products, Inc., Lake Village, AR). Dos horas más tarde, cada pozo recibió 30 µL de la proteína Vip3Aa20 a la concentración requerida. Las diluciones se llevaron a cabo usando agua destilada que contenía TritonX-100 al 0,1% para obtener una distribución uniforme de la proteína sobre la superficie de la dieta. Se usaron las siguientes concentraciones de la proteína Vip3Aa20: 0 (control), 20, 36, 64, 112, 360, 640, 1120, 2000 y 3000 ng cm<sup>-2</sup>. Después de que las concentraciones se hubieran aplicado, durante un período de treinta segundos, la bandeja de bioensayo se agitó horizontalmente para ayudar a la proteína a cubrir la superficie de la dieta; Después se dejó secar durante dos horas a temperatura ambiente (Siegfried, 2000). Posteriormente, se colocó una larva de recién nacida (0-24 h de edad y sin exposición a la dieta meridiana) por pozo (Ali y Luttrell, 2007) y se selló con plástico autoadhesivo (pressure sensitive adhesive bioassay tray lid BACV16 Australian Entomological Supplies® Coorabell, NSW, Australia). Luego, las bandejas se colocaron en una cámara bioclimática a 28 ± 1 C ° con una humedad relativa de 60 ± 10% y un fotoperiodo de 14:10 horas (luz: oscuridad). Después de siete días de exposición a la proteína, se evaluó el porcentaje de mortalidad y el porcentaje de



inhibición del peso en comparación con el control no tratado. En total, se realizaron cinco repeticiones en diferentes días, y cada replicación incluyó un testigo sin tratar. Cada repetición consistió en 16 larvas tratadas, y cada una incluyó un testigo (16 larvas) al que solo se le aplicaron 30  $\mu$ L del diluyente. Aquellas larvas que no respondieron al estímulo de un pincel se consideraron muertas. Para cada repetición, se prepararon tanto la dieta merídica como las concentraciones de proteína.

*Análisis estadístico.* Para estimar la  $LC_{50}$ , la  $LC_{90}$  y sus respectivos límites confidenciales, se utilizó el análisis Probit mediante el paquete estadístico SAS (PROC PROBIT, SAS Institute, 2000, Cary, NC). Para lograr normalidad en los datos, el porcentaje de reducción de peso se transformó a la función arcoseno de la raíz cuadrada de la respuesta/100 y se realizó un análisis de varianza utilizando el paquete estadístico SAS y la prueba Tukey de comparación múltiple (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ) para estimar la significación estadística de los tratamientos (SAS Institute, 2000, Cary, NC).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La  $CL_{50}$  osciló entre 7,9 (SIN-DOR1) y 494,3 (CHI-STC)  $ng\ cm^{-2}$ . Los valores de  $CL_{90}$  oscilaron entre 90,9 (TAM-RIO2) y 2403 (CHI-NCG1)  $ng\ cm^{-2}$ , que corresponden a una variación máxima de 4,91 (a  $CL_{50}$ ) 6,14× (a  $CL_{90}$ ) en respuesta (Tabla 2). Sin embargo, de las poblaciones evaluadas, sólo cinco mostraron valores de  $CL_{90}$  mayores de 1.000  $ng\ cm^{-2}$ : TAM-RIO3 (1282), CHI-NCG1 (2403), CHI-STC (2196), CHI -LRC (1439) NTJ2 (1424) (Tabla 2).

La reducción del peso corporal alcanzó el 95% o más a las concentraciones de 1120  $ng\ cm^{-2}$  de proteína Vip3Aa20. Excepto SIN-NAV2 ( $92,5 \pm 4,4$ ), SIN-CEL2 ( $94,6 \pm 4,9$ ), SIN-DOR2 ( $91,2 \pm 1,2$ ) (Tabla 3); TAM – VAH3 (93,3) (Tabla 4) y CHI-STC ( $92,8 \pm 2,2$ ). En las poblaciones del estado de Sinaloa, la mayor reducción de peso (90%) se obtuvo a 640  $ng\ cm^{-2}$  (Tabla 3) y las dosis por encima de 2000  $ng\ cm^{-2}$  condujeron a una inhibición del peso corporal del 99% (Tabla 3).

La  $CL_{90}$  en la población de TAM-RIO3 fue 1282  $ng\ cm^{-2}$ , y una inhibición del peso corporal alcanzó 98,5% a la concentración de 2000  $ng\ cm^{-2}$ , esta población mostró el mayor valor de  $LC_{90}$  (Tabla 2). Las poblaciones del estado de Tamaulipas mostraron un peso de inhibición corporal superior al 94% de 640  $ng\ cm^{-2}$  (Tabla 4).

La población CHI-NCG1 de Chihuahua mostró el valor más alto de  $LC_{90}$  de todas las poblaciones evaluadas (2403  $ng\ cm^{-2}$ ) con límites fiduciales entre 1765 y 3520  $ng\ cm^{-2}$  (Tabla 2). En este estado, la población CHI-NTJ2 mostró, a la dosis de 640  $ng\ cm^{-2}$ , un porcentaje de inhibición del cuerpo de  $87,9\% \pm 1,8$  (Tabla 5). (Vip30Aa20)

En comparación con otros estudios en todo el mundo, las poblaciones mexicanas son más sensibles a la proteína Vip30Aa20 de Bt. En estudios realizados en Brasil por Bernardi *et al.*

(2014), 16 poblaciones locales de gusano de la cañada registraron valores de  $LC_{50}$  que variaron de 92,38 a 611  $ng\ cm^{-2}$  a la proteína Vip30Aa20 (variación de 6,6 veces).

En otros estudios con algodón que expresan esta proteína, se encontró que era más eficaz contra el gusano cogollero que Cry1Ab (Adamczyk, 2008). Bergamasco (2013) mencionó que para retrasar el inicio de la resistencia a Bt es importante utilizar proteínas que no compiten por el mismo receptor y, preferentemente, que muestran efectos sinérgicos. Estos datos de referencia para la proteína Vip3Aa20 serán una fuente valiosa para el establecimiento de programas de monitoreo de la respuesta del gusano cogollero una vez que el maíz Bt se cultive comercialmente en México.

## LITERATURA CITADA

- Adamczyk JJ Jr, and Mahaffey, JS, Efficacy of Vip3A and Cry1Ab transgenic traits in cotton against various lepidopteran pests. *Fla. Entomol.* **91**:570-575 (2008).
- Ali MI, and Luttrell RG, Susceptibility of bollworm, *Helicoverpa zea* (Boddie) and tobacco budworm, *Heliothis virescens* F. (Lepidoptera: Noctuidae) to Cry2Ab2 insecticidal protein. *J. Econ. Entomol.* **100**:921–931 (2007).
- Bergamasco VB, Mendes DRP, Fernandes OA, Desidério JA, and Lemos MVF, *Bacillus thuringiensis* Cry1Ia10 and Vip3Aa protein interactions and their toxicity in *Spodoptera* spp. (Lepidoptera). *J. Invertebr. Pathol.* **112**:152-158 (2013).
- Bernardi O, Bernardi D, Horikoshi J, Okuma MD., Miraldo LL, Fatoretto J, Medeiros CL, Burd T, and Omoto C, Selection and characterization of resistance to the Vip3Aa20 protein from *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda*. *Pest Manag. Sci.* **72**:1794-1802 (2016).
- Bernardi O, Douglas A, Sousa RS, Segatti F, Fatoretto J, Burd DA, and Omoto C, Baseline Susceptibility and Monitoring of Brazilian Populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) to Vip3Aa20 Insecticidal Protein. *J Econom Entomol* **107**:781-790 (2014).
- Burton RL, Mass rearing the corn earworm in the laboratory. USDA, ARS. 33-134 (1969).  
<https://archive.org/details/massrearingcorne134burt> (accessed March 28, 2016)
- DEAQ. Diccionario de Especialidades Agroquímicas PLM. México. 1340p (2014).
- FAO, Recommended Methods for the detection and measurement of resistance of agricultural pests to pesticides. **32**:25-27 (1984).

- Fitt, GP, Omoto C, Maia, AH, Waquil JM, Caprio M, Okech E, Cia N, and Andow DA, Resistance risks of Bt cotton and their management in Brazil, In *Environmental risk assessment of genetically modified organisms: Methodologies for assessing Bt cotton in Brazil*, ed. By Hilbeck A, Andow Da, and Fontes (EMG (eds). CABI Publishing, London, United Kingdom, pp. 300-345 (2016).
- James C, Global status of commercialized Bio/GM crops. ISAAA Brief No. 35. ISAAA: Ithaca, NY. 38p (2006). <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/35/default.html> (accessed 28 March 2016)
- Lee MK, Walters FS, Hart H, Palekar N, and Chen JS, Mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab delta-endotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 4648-4657 (2003).
- Pogue GM, A world revision of the genus *Spodoptera* Guene'e (Lepidoptera: Noctuidae). *Mem Amer Entomol. Soc* **43**: 1-202 (2002).
- Shelton AM, Zhao JZ and Roush RT, Economic, ecological, food safety and social consequences of the deployment of BT transgenic plants. *Ann Rev Entomol* **47**:845 -881 (2002).
- SIAP. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. Cierre de la producción agrícola por cultivo, 2014 <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/> (accessed 28 March 2016)
- Siegfried BD, Spencer T, and Nearman J, Baseline susceptibility of the corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae) to the Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis*. *J Econ Entomol* **93**:1265–1268 (2000).

Tabashnik BE, Brévault T, and Carrière Y, Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. *Nature Biotechnol* **31**:510–521 (2013)

Tabashnik EB, Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Ann Rev Entomol* **39**:47–79 (1994).

Villalobos AVM, Los Transgénicos: oportunidades y amenazas. Ediciones Mundi-Prensa-Universidad Autónoma Chapingo, México. 124p (2015)

**Cuadro 2.** Concentración-mortalidad (ng cm<sup>-2</sup>) de larvas neonatales de *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith de los estados mexicanos de Sinaloa, Chihuahua y Tamaulipas, expuestas durante siete días a la proteína Vip3Aa20 de *Bacillus thuringiensis* Berliner.

<b>Población</b>	<b>n</b>	<b>gl</b>	<b>b (± SE)</b>	<b>CL<sub>50</sub><sup>a</sup> (95% CI)</b>	<b>CL<sub>90</sub><sup>b</sup> (95% CLI)</b>	<b>P≥χ<sup>2c</sup></b>	<b>RR<sub>50</sub><sup>d</sup></b>	<b>RR<sub>90</sub><sup>e</sup></b>
<b>Sinaloa</b>								
S-LAB	560	5	2.17 (±0.15)	100.6 (87.9-115.0)	390.8 (319.3-502.7)	0.17	1.0	1.0
SIN-DOR	480	4	1.08 (±0.28)	7.9 (0.01-21.5)	122.2 (63.2-1243)	0.03	0.08	0.31
SIN COR	480	4	1.69 (±0.18)	26.9 (20.2-33.5)	154.0 (120.8-215.7)	0.19	0.26	0.39
SIN-NAV1	320	2	2.61 (±0.31)	29.8 (25.0-34.4)	92.4 (75.5-124.5)	0.5	0.29	0.23
SIN-BEJ	480	4	2.14 (±0.38)	35.9 (18.4-53.3)	142.8 (89.8-419.2)	0.007	0.35	0.36
SIN-CEL1	640	6	1.78 (±0.40)	42.3 (15.2 - 73.8)	220.4 (118.1-1106)	<0.0001	0.42	0.56
SIN-GUA	400	3	3.04 (±0.72)	42.6 (16.4-80.8)	112.4 (64.7-1977)	<0.0001	0.42	0.28
SIN-ANG	640	6	1.71 (±0.2)	60.1 (34.5-91.3)	336.1 (198.7-921.5)	<0.0001	0.59	0.86

SIN-CEL2	560	5	2.16 ( $\pm 0.20$ )	121.3 (94.8-156.4)	475.2 (331.9-821.7)	0.08	1.20	1.21
SIN-NAV2	640	6	1.84 ( $\pm 0.24$ )	143.7 (97.5-213.0)	709.2 (423.2-1752)	0.0006	1.42	1.81

---



**Cuadro 2.** Continua...

Población	n	gl	b (± SE)	LC <sub>50</sub> <sup>a</sup>	LC <sub>90</sub> <sup>b</sup>	P <sub>≥χ<sup>2c</sup></sub>	RR <sub>50</sub> <sup>d</sup>	RR <sub>90</sub> <sup>e</sup>
				(95% CI)	(95% CLI)			
<b>Tamaulipas</b>								
S-LAB	560	5	2.17 (± 0.1)	100.6 (87.9-115.0)	390.8 (319.3-502.7)	0.17	1.0	1.0
TAM-RIO2	400	3	1.67 (± 0.24)	15.6 (9.5-21.1)	90.9 (71.1-131.4)	0.92	0.15	0.23
TAM-DIO1	560	5	1.86 (± 0.23)	51.7 (34.4-70.9)	252.4 (168.5-497.9)	0.01	0.51	0.64
TAM.VAH1	560	5	1.40 (± 0.12)	63.5 (51.0-76.9)	518.1 (380.3-787.6)	0.51	0.63	1.32
TAM-RIO1	480	4	2.27 (± 0.18)	74.3 (64.9-84.9)	272.0 (220.4-357.7)	0.11	0.73	0.69
TAM-VAH2	720	7	1.91 ± 0.17	146.3 (112.2-190.0)	682.8 (477.3-1137)	0.02	1.45	1.74
TAM-RIO3	720	7	1.73 (± 0.10)	234.9 (202.5-273)	1282 (1011-1714)	0.17	2.33	3.28
TAM-VAH3	720	7	1.94 (± 0.17)	119.9 (93.6 - 152.3)	548.15 (395.1 – 864.3)	0.04	1.19	1.40
TAM-DIO2	640	6	1.36 (±0.10)	108.1	932.86	0.68	1.07	2.38

				(89.2 - 129.7)	(684.6 - 1394)			
TAM-DIO3	800	8	1.42 (±0.17)	84.0	666.46	0.0002	0.83	1.70
				(52.5 - 123.2)	(407.4 - 1440)			

---

Cuadro 2. Continua...

Población	n	gl	b (± SE)	CL <sub>50</sub> <sup>a</sup> (95% CI)	CL <sub>90</sub> <sup>b</sup> (95% CLI)	$P_{\geq \chi^2}$ <sup>c</sup>	RR <sub>50</sub> <sup>d</sup>	RR <sub>90</sub> <sup>e</sup>
<b>Chihuahua</b>								
S-LAB	560	5	2.17 (± 0.15)	100.6 (87.9-115.0)	390.8 (319.3-502.7)	0.17	1.0	1.0
CHI-NL	800	8	1.01 (± 0.19)	20.2 (4.0 - 42.5)	369.9 (191.9 - 1298)	<0.0001	0.20	0.94
CHI-NTJ1	560	5	1.80 (± 0.17)	26.4 (20.3-32.5)	135.6 (109.5-179.7)	0.19	0.26	0.34
	720	7	1.29 (± 0.10)	35.8 (26.6-45.6)	351.6 (269.9-492.6)	0.15	0.35	0.89
CHI-PAS								
CHI-VEVH	560	5	1.62 (± 0.22)	58.3 (36.3-83.5)	360.0 (221.5-871.2)	0.02	0.57	0.92
CHI-NTJ2	800	8	1.13 (± 0.08)	105.1 (83.6-129.3)	1424 (1038-2119)	0.16	1.04	3.64
CHI-NCG2	720	7	2.00 (± 0.16)	187.7 (148.9-236.8)	815.6 (591.2-1267)	0.07	1.86	2.08
CHI-STC	640	6	1.97 (± 0.27)	494.3 (329.7-735.3)	2196 (1333-5309)	0.0001	4.91	5.61
CHI-LRC	640	6	2.35 (± 0.27)	411.3	1439	0.067	4.08	3.68

				(305.9-546.3)	(1003 - 2528)			
CHI-NCG1	800	8	1.24 ( $\pm$ 0.08)	225.5	2403	0.73	2.24	6.14
				(187.3-270.9)	(1765 – 3520)			

---

<sup>a</sup>CL<sub>50</sub>: concentración de proteína Bt necesaria para matar el 50% de larvas a los 7 días.

<sup>b</sup>CL<sub>90</sub>: concentración de proteína Bt necesaria para matar el 90% de las larvas a los 7 días.

<sup>c</sup> P>0.05 en la prueba de bondad de ajuste

Respuesta relativa al 50% de mortalidad = (CL<sub>50</sub> de la población indicada / CL<sub>50</sub> de la población S\_LAB)

Respuesta relativa al 90% de mortalidad = (LC<sub>90</sub> de la población indicada / LC<sub>90</sub> de la población S\_LAB)

**Cuadro 3.** Porcentaje de inhibición del peso corporal con respecto al testigo sin tratar en larvas de neonatas de *Spodoptera frugiperda* JE Smith del estado mexicano de Sinaloa, México, expuesto durante siete días a diferentes concentraciones (ng cm<sup>-2</sup>) de la proteína Vip3Aa20 de un *Bacillus thuringiensis* Berliner.

Concentración	Población						
	S-LAB	SIN-NAVI	SIN-DOR	SIN-GUA	SIN-BEJ	SIN-CELI	SIN COR
3000							
2000	99.2±0.8 a						
1120							
640	93.2±3.1 ab					97.2±2.8 ab	
360	89.4±5.1 abc		99.5±0.5 a			97.1±2.0 ab	97.8±2.2 a
200	77.6±8.2 bc		94.8±3.8 ab	98.7±1.3 a		90.3±6.0 ab	80.4±8.6 ab
112	79.5±6.9 bc	95.9±2.1 ab	84.5±9.6 ab	98.0±2.0 a	93.1±1.8 ab	87.4±2.9 abc	87.5±3.7 ab
64	70.6±2.9 cd	84.2±6.3 abc	92.8±2.8 ab	79.5±3.4 b	84.6±2.9 bc	77.3±5.1 bc	89.2±3.0 ab
36	43.3±6.6 de	79.2±5.1 bc	71.7±18.4ab	77.8±1.4 b	82.7±4.0 bc	84.3±2.1 abc	82.5±2.9 ab
20	30.5±6.9 e	68.1±17.3 c	66.9±17.1 b	64.4±16.3b	65.8±16.5c	64.9±16.3c	68.2±17.1b

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

NOTA: Los espacios en blanco indican que hubo una mortalidad del 100% en las larvas tratadas, por lo que el porcentaje en peso de inhibición no se calculó

**Cuadro 3.** Continua...

Concentration	SIN-NAV2	SIN-ANG	SIN-CEL2
3000			
2000	98.4±1.58ab		99.4±0.6 a
1120			
640	92.5± 4.4 abc		94.6±4.9 ab
360	94.0±2.9 abc	99.2±0.8 ab	96.9±1.3 ab
200	85.5±4.6 abcd	94.5±2.1 ab	89.7±2.0 abc
112	89.2±2.2 bc	44.3±47.1 bc	84.4±2.6 bc
64	85.1±1.8 bcd	87.9±2.1 abc	72.3±4.7 cd
36	76.6±2.7 cd	72.0±6.0 bc	74.9±4.8 cd
20	58.9±14.9d	59.1±15.7 c	53.4±13.5 d

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

NOTA: Los espacios en blanco indican que hubo una mortalidad del 100% en las larvas tratadas, por lo que el porcentaje en peso de inhibición no se calculó

**Cuadro 4.** Porcentaje de inhibición del peso corporal con respecto al testigo sin tratar en larvas de neonatas de *Spodoptera frugiperda* JE Smith, del estado mexicano de Tamaulipas, México, expuesto durante siete días a diferentes concentraciones (ng cm<sup>-2</sup>) de la proteína Vip3Aa20 de un *Bacillus thuringiensis* Berliner.

Concentración	Población						
	S-LAB	TAM-RIO1	TAM-DIO1	TAM-VAH1	TAM-RIO2	TAM-RIO3	TAM-VAH2
3000							
2000	99.2±0.8 a					98.5±1.5 ab	99.1±0.9 a
1120			99.4±0.6 ab	99.4±0.5 ab		96.6±1.6 abcd	96.5±3.4 ab
640	93.2±3.1 ab		97.1±1.4 ab	97.7±1.4 abc		97.3±1.2 abc	96.6±2.8 abc
360	89.4±5.1 abc	99.2±0.8 a		82.9±12.2 abcd		89.5±2.5 cde	92.7±2.7 abcd
200	77.6±8.2 bc	95.0±1.4 b	93.8±4.5 abc	82.7±10.4 abcd	97.2±1.7 a	89.2±4.9 bcde	87.7±3.2 bcde
112	79.5±6.9 bc	89.5±2.6 bc	91.8±2.8 abcd	82.8±3.9 abcd	75.5±4.8 b	84.6±3.6 de	86.7±1.9 cde
64	70.6±2.9 cd	80.1±3.9 c	60.6±24.8 d	75.1±10.8 cd	84.6±3.6 b	74.4±7.1 ef	82.5±1.3 de
36	43.3±6.6 de	66.4±3.0 d	84.5±1.8 bcd	81.1±3.1 bcd	81.5±3.9 b	71.5±4.1 ef	67.8±8.1 ef
20	30.5±6.9 e	55.5±4.5 d	68.9±4.1 cd	60.3±8.2 d	74.4±2.6 b	54.0±6.9 f	54.9±8.1 f

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

NOTA: Los espacios en blanco indican que hubo una mortalidad del 100% en las larvas tratadas, por lo que el porcentaje en peso de inhibición no se calculó

**Cuadro 4.** Continua...

Concentración	Población		
	TAM-VAH3	TAM-DIO2	TAM-DIO3
3000			93.26a
2000	89.8ab		95.19 a
1120	93.3ab	96.30a	97.09±1.77 a
640	96.2±0.50a	94.97±0.18 a	95.63±1.00 a
360	94.8±2.87a	93.49±0.40 a	95.43±1.51 a
200	94.1±1.75a	86.83±6.40 ab	91.00±5.31 a
112	90±2.27 ab	89.26±2.32 a	83.92±4.93 a
64	82.3±3.30abc	86.28±3.42 ab	86.28±1.51 a
36	74.61.06 bc	83.02±2.17 ab	76.30±7.49 a
20	60.2±4.68 c	57.76±8.87 b	67.23±5.97 a

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

NOTA: Los espacios en blanco indican que hubo una mortalidad del 100% en las larvas tratadas, por lo que el porcentaje en peso de inhibición no se calculó



**Cuadro 5.** Porcentaje de inhibición del peso corporal con respecto al testigo sin tratar en larvas de neonatas de *Spodoptera frugiperda* JE Smith, del estado mexicano de Chihuahua, México, durante siete días a diferentes concentraciones (ng cm<sup>-2</sup>) de la proteína Vip3Aa20 de un *Bacillus thuringiensis* Berliner.

Población						
Concentración	S-LAB	CHI-STC	CHI-LRC	CHI-NCG1	CHI-NCG2	CHI-NTJ1
3000				98.1±1.2 ab		
2000	99.2±0.8 a			98.6±0.9 a	99.4±0.5 ab	
1120		92.8±2.2 a	96.2±2.5 ab	96.8±3.1 ab	97.9±1.4 abc	
640	93.2±3.1 ab	87.9±3.5 ab	94.7±1.5 ab	92.9±3.6 abc	96.8±1.9 abc	97.6±2.4 ab
360	89.4±5.1 abc	81.1±5.5 ab	88.7±4.7 b	86.5±2.4 abcd	94.8±2.0 bc	99.5±0.4 a
200	77.6±8.2 bc	70.9±6.6 abc	81.4±1.6 bc	75.1±4.8 cde	93.1±2.3 cd	99.8±0.2 a
112	79.5±6.9 bc	20.9±34.0 bcd	61.3±8.1 cd	81.8±3.6 bcde	82.6±2.7 de	77.4±18.9 b
64	70.6±2.9 cd	3.1±34.1 cde	51.5±6.6 de	71.1±5.6 def	82.9±2.1 de	93.8±2.5 ab
36	43.3±6.6 de	25.1±9.5 cde	34.4±6.1 de	52.9±8.8 ef	75.4±2.3 e	90.6±1.5 ab
20	30.5±6.9 e	15.5±8.9 de	26.3±10.7 e	41.9±11.3 f	68.8±1.9 e	80.2±5.5 b

**Cuadro 5.** Continua...

Concentración	Población			
	CHI-NTJ2	CHI-PAS	CHI-NL	CHI-VEVH
3000	99.0±1.0 a			
2000	97.3±2.3 ab	98.7±1.2 a	99.9± 0.1 a	
1120	98.9±0.7 ab	98.8±1.0 a	99.8±0.2 a	
640	87.9±1.8 abcd	95.0±5.0 ab	99.8±0.1 a	99.3±0.6 a
360	93.0±2.3 abc	93.7±5.4 abc	96.4±2.4 ab	91.7±5.0 ab
200	81.1±2.5 bcde	94.0±3.7 abc	96.0±1.4 abc	92.4±2.4 ab
112	69.9±7.2 cdef	92.6±3.9 abcd	95.6±1.3 abc	83.3±4.4 bc
64	30.2±41.5 ef	80.8±4.9 cd	82.4±6.9 c	84.0±6.7 bc
36	60.4±8.5 def	84.9±3.3 bcd	87.4±6.8 bc	74.1±5.2 cd
20	42.0±4.2 f	72.6±1.9 d	85.5±5.4 bc	57.8±6.6 d

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

NOTA: Los espacios en blanco indican que hubo una mortalidad del 100% en las larvas tratadas, por lo que el porcentaje en peso de inhibición no se calculó