



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

PROGRAMA DE POSGRADO EN FITOSANIDAD

ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

LÍNEAS BASE DE SUSCEPTIBILIDAD DE *Spodoptera frugiperda* J. E. SMITH A PROTEÍNAS NATIVAS Y MODIFICADAS DE *Bacillus thuringiensis* BERLINER.

ANAYELY ROSALES JUÁREZ

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

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2018

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe ANAYELY ROSALES JUAREZ, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser participe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor Dr. J. Concepción Rodríguez Maciel, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis Líneas base de susceptibilidad de Spodoptera frugiperda J. E. Smith a proteínas nativas y modificadas de Bacillus thuringiensis Berliner.

y de los producto de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre el colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 13 de Junio de 2018

Firma del
Alumno (a)

Dr. J. Concepción Rodríguez Maciel
Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada: **Líneas base de susceptibilidad de *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith a proteínas nativas y modificadas de *Bacillus thuringiensis* Bernier.**

Realizada por la alumna: **Anaye y Rosales Juárez** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

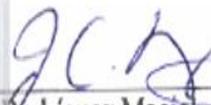
MAESTRÍA EN CIENCIAS

FITOSANIDAD

ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO


Dr. J. Concepción Rodríguez Maciel

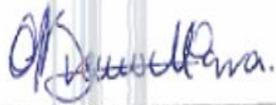
ASESOR


Dr. Ángel Lagunes Tejeda

ASESOR


Dr. Sotero Aguilár Medel

ASESORA


Dra. María Alejandra Bravo de la Parra

**LÍNEAS BASE DE SUSCEPTIBILIDAD DE *Spodoptera frugiperda* J. E. SMITH A
PROTEÍNAS NATIVAS Y MODIFICADAS DE *Bacillus thuringiensis* BERLINER.**

**Anayely Rosales Juárez, M. en C.
Colegio de Posgraduados, 2018**

RESUMEN

Se determinó, en condiciones de laboratorio, la susceptibilidad a proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis* Berliner en larvas de *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith en dos poblaciones de campo (Laguna y Valle del Fuerte) y una población Susceptible que se utilizó como referencia. Se realizaron bioensayos de capa en larvas neonatas (<12 h) con proteínas nativas: Cry1Ab, Cry1C-1, Cry1C-2, Cry1Fa, Cry9Aa y Vip3Aa, y proteínas modificadas: Cry1Ab ER, Cry1Ab N514A, Cry1Ab N514A-S587A, Cry1Ab N514F, Cry1Ab N514F-S587A, Cry1AbMod-1, Cry1AbMod-2, Cry1Ab S587A, Cry1Ab T585A, Cry1Ab Wt, Cry1C L507A, Cry1C N510A, Cry1C Q508A, Cry1C V505A, Cry1C V509A, Cry1Fa DK, Cry1Fa ER y Cry1Fa N507A, bajo condiciones controladas: temperatura de 25 ± 2 °C, humedad relativa de 75 ± 5 % y un fotoperiodo de 13: 11 h luz: oscuridad. A los siete días de exposición a las proteínas, se evaluaron las variables: porcentaje de mortalidad, porcentaje de inhibición de peso y desarrollo de larvas al tercero y cuarto instares. Los valores más bajos de la CL_{50} y CL_{95} , fueron con las proteínas Vip3Aa, Cry1Fa y Cry1Fa N507A, los cuales fueron 6.0 a 16.2, y 121.3 a 646.5 $ng \cdot cm^{-2}$, respectivamente. Los valores más altos de CL_{50} se registraron con la proteína Cry1C (Cry1C-1 y CryC-2) en ambas muestras, los cuales fluctuaron entre 65 y 77 $ng \cdot cm^{-2}$ y $CL_{95} > 35\ 000$ $ng \cdot cm^{-2}$ Mientras que con la proteína Cry9Aa evaluada con la población Valle del Fuerte, provocó niveles bajos de toxicidad donde a la concentración de 5000 $ng \cdot cm^{-2}$ la mortalidad fue solo del 12.5%. Las larvas expuestas a las diferentes concentraciones de las proteínas nativas y modificadas inhibieron de desarrollo de las larvas considerablemente. Con Cry1C y debido a que la toxicidad fue baja, para que en promedio de 2.7 y 4.7 larvas llegaran al tercer instar la concentración fue de 1000 $ng \cdot cm^{-2}$, valor elevado comparado con el resto de las proteínas. Con la proteína Vip3Aa se registraron los valores más bajos, ya que, con una concentración de 5 $ng \cdot cm^{-2}$ únicamente se desarrollan un máximo 3.3% larvas en promedio. Valle del Fuerte fue la población más sensible, con valores de CE_{50} y CE_{90} más bajos a las proteínas Cry1Fa y Vip3Aa.

Palabras clave: Lepidóptera, gusano cogollero, bioensayo.

**SUSCEPTIBILITY BASELINES OF *Spodoptera frugiperda* J. E. SMITH TO NATIVE
AND MODIFIED PROTEINS OF *Bacillus thuringiensis* BERLINER.**

**Anayely Rosales Juárez, M. en C.
Colegio de Posgraduados, 2018**

ABSTRACT

The susceptibility to the insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis* Berliner in *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith larvae was determined, under laboratory conditions, in two field-collected populations (Laguna and Valle del Fuerte) and one Susceptible population that was used as a reference. Layer bioassays were performed on neonatal larvae (<12 h) with native proteins: Cry1Ab, Cry1C-1, Cry1C-2, Cry1Fa, Cry9Aa and Vip3Aa, and modified proteins: Cry1Ab ER, Cry1Ab N514A, Cry1Ab N514A-S587A, Cry1Ab N514F, Cry1Ab N514F-S587A, Cry1AbMod-1, Cry1AbMod-2, Cry1Ab S587A, Cry1Ab T585A, Cry1Ab Wt, Cry1C L507A, Cry1C N510A, Cry1C Q508A, Cry1C V505A, Cry1C V509A, Cry1Fa DK, Cry1Fa ER and Cry1Fa N507A, under controlled conditions: temperature of 25 ± 2 ° C, relative humidity of $75 \pm 5\%$ and a photoperiod of 13: 11 h light: dark. After seven days of protein exposure, these variables were evaluated: percentage of mortality, percentage of weight inhibition and development of larvae at the third and fourth instars. The lowest values of the LC_{50} and CL_{95} , were observed with the proteins Vip3Aa, Cry1Fa and Cry1Fa N507A, which were 6.0 to 16.2, and 121.3 to 646.5 ng cm⁻², respectively. The highest values of LC_{50} were registered with the protein Cry1C (Cry1C-1 and CryC-2) in both samples, which fluctuated between 65 and 77 ng·cm⁻² and $CL_{95} > 35\ 000$ ng·cm⁻². While with the evaluated Cry9Aa protein from Valle del Fuerte population, the lowest levels of toxicity was observed since at the concentration of 5000 ng·cm⁻² the mortality was only 12.5%. Larvae exposed to different concentrations of native and modified proteins inhibited larval development considerably. With Cry1C and because the toxicity was low, on average 2.7 and 4.7 larvae reached the third instar at the concentration 1000 ng·cm⁻², this is a high concentration value compared with the one observed in the rest of the evaluated proteins. With the Vip3Aa protein, the lowest values were recorded, since a concentration of 5 ng · cm⁻², on average only 3.3% larvae develop. Valle del Fuerte was the most sensitive population, with lower CE_{50} and CE_{90} values for the Cry1Fa and Vip3Aa proteins.

Key words: Lepidoptera, Fall armyworm, bioassay.

DEDICATORIA

A dios. Por haberme regalado la vida, la sabiduría y la capacidad para poder desarrollar este trabajo, gracias señor por guiarme por el buen camino; te ofrezco este esfuerzo y toda mi vida, gracias por darme esa fortaleza de levantarme tras varios tropiezos.

A mi hijo. Rafael, esta tesis te la dedico a ti por la sencilla razón de haber llegado a mi vida, por haberla cambiado, ahora eres mi motor para continuar y salir adelante. Eres un guerrero que ha luchado por estar aquí conmigo. Gracias mi amor TE AMO.

A mis padres. Sergio † y Agustina. A ti mamá por ser una madre bien padre, supiste sacar adelante a todos tus hijos que ahora los vez convertidos en hombres maravillosos y buenos padres. Te quiero

A mis hermanos. Noé, Laurencio y Ricardo gracias por su apoyo constante y sus sabios consejos, ustedes son parte importante de este triunfo. Los quiero mucho.

AGRADECIMIENTOS

Al pueblo Mexicano que pagan impuestos, quienes, a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) me apoyaron con una beca para poder realizar mis estudios de Maestría sin la cual no hubiese podido lograrlo.

Al Colegio de Postgraduados darme la oportunidad de continuar con mi formación profesional y académica.

Las personas integrantes de mi Consejo Particular: Dr J. Concepción Rodríguez Maciel, al Dr. Ángel Lagunes Tejeda y la Dra. Alejandra Bravo de la Parra por el esfuerzo, la dedicación, el tiempo y el apoyo que me han brindado. En especial al Dr. Sotero Aguilar Medel, que a pesar de la incertidumbre creyó en mí, pero sobre todo por su infinita paciencia para conmigo y mis problemas.

Todos los individuos, llámense profesor (a), compañero (a), amigo (a) o familia, A quienes de alguna manera me han acompañado hasta hoy, aun en la distancia.

Agradecemos a CONACyT fronteras de la ciencia proyecto 008 por el apoyo para la realización de este trabajo.

CONTENIDO

RESUMEN	iv
ABSTRACT.....	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTOS	vii
CONTENIDO	viii
LISTA DE CUADROS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
OBJETIVOS	3
Objetivo general.....	3
Objetivo específico.....	3
HIPÓTESIS.....	4
Literatura citada.....	5
REVISIÓN DE LITERATURA	7
Generalidades de gusano cogollero <i>Spodoptera frugiperda</i> J. E. Smith.....	7
Origen y distribución.....	7
Hospederos	7
Daños	8
Cultural.....	8
Químico.....	8
Biológico y microbiológico.....	8
<i>Bacillus thuringiensis</i> Berliner.....	9
Modo de acción.....	9
Proteínas Cry de Bt tóxicas para lepidópteros.....	9
Proteínas Vip	9
Literatura citada.....	10
CAPITULO I. LÍNEAS BASE DE SUSCEPTIBILIDAD DE <i>Spodoptera frugiperda</i> J. E. SMITH A PROTEÍNAS NATIVAS Y MODIFICADAS DE <i>Bacillus thuringiensis</i> BERLINER.	14
1.1 RESUMEN	14

1.2.	ABSTRACT.....	15
1.3.	INTRODUCCION	15
1.4.	MATERIALES Y MÉTODOS	17
1.4.1.	Lugar de estudio.	17
1.4.2.	Poblaciones.....	17
1.4.3.	Cría de <i>S. frugiperda</i>	18
1.4.4.	Proteínas.	18
1.4.5.	Bioensayos.....	19
1.4.6.	Diseño experimental y Análisis estadístico	20
1.5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
1.5.1.	Mortalidad.	20
	Proteínas Cry1Ab.	20
	Proteínas Cry1C.....	22
	Proteínas Cry1Fa.	23
	Proteína Vip.....	24
1.5.2.	Inhibición de desarrollo al tercer y cuarto instar.	26
	Proteínas Cry1Ab.	26
	Proteínas Cry1C.....	27
	Proteínas Cry1Fa.	27
	Proteína Vip.....	27
1.5.3.	Inhibición de peso.....	27
	Proteínas Cry1Ab.	27
	Proteínas Cry1C.....	28
	Proteínas Cry1Fa.	28
	Proteína Vip.....	29
1.6.	LITERATURA CITADA	39
	CONCLUSIONES	45
	ANEXOS	45

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Proteínas nativas y modificadas de <i>B. thuringiensis</i>	18
Cuadro 2. Análisis Probit de la mortalidad de larvas de <i>S. frugiperda</i> expuestas a las proteínas nativas y modificadas Cry1Ab de <i>B. thuringiensis</i>	30
Cuadro 3. Análisis Probit de la mortalidad de larvas de <i>S. frugiperda</i> expuestas a las proteínas nativas Cry1C-1 y Cry1C-2 de <i>B. thuringiensis</i>	32
Cuadro 4. Análisis Probit de la mortalidad de larvas de <i>S. frugiperda</i> expuestas a las proteínas nativas y modificadas Cry1Fa de <i>B. thuringiensis</i>	32
Cuadro 5. Análisis Probit de la mortalidad de larvas de <i>S. frugiperda</i> expuestas a la proteína Vip3Aa de <i>B. thuringiensis</i>	33
Cuadro 6. Larvas de <i>S. frugiperda</i> expuestas a diferentes concentraciones (ng·cm ⁻²) de proteínas Cry1Ab nativa y modificadas de <i>B. thuringiensis</i> y alcanzaron el tercero y cuarto instar.....	33
Cuadro 7. Larvas de <i>S. frugiperda</i> expuestas a diferentes concentraciones (ng·cm ⁻²) de dos muestras de la proteína Cry1C de <i>B. thuringiensis</i> y alcanzaron el tercero y cuarto instar.....	34
Cuadro 8. Larvas de <i>S. frugiperda</i> expuestas a diferentes concentraciones (ng·cm ⁻²) de proteínas Cry1Fa nativa y modificadas de <i>B. thuringiensis</i> y alcanzaron el tercero y cuarto instar.....	35
Cuadro 9. Larvas de <i>S. frugiperda</i> expuestas a diferentes concentraciones (ng·cm ⁻²) de la proteína Vip3Aa de <i>B. thuringiensis</i> y alcanzaron el tercero y cuarto instar.	35
Cuadro 10. Líneas base sobre inhibición de peso en poblaciones de <i>S. frugiperda</i> recolectadas en el Valle del Fuerte, Sinaloa; La Laguna, Coahuila, por efecto de exposición a las proteínas nativas y modificadas Cry1Ab (CE, ng·cm ⁻²) de <i>B. thuringiensis</i>	36
Cuadro 11. Líneas base sobre inhibición de peso en poblaciones de <i>S. frugiperda</i> recolectadas en el Valle del Fuerte, Sinaloa; Laguna, Coahuila, por efecto de exposición a las proteínas nativas Cry1C (CE, ng·cm ⁻²) de <i>B. thuringiensis</i>	37
Cuadro 12. Líneas base sobre inhibición de peso en poblaciones de <i>S. frugiperda</i> recolectadas en el Valle del Fuerte, Sinaloa; Laguna, Coahuila, por efecto de exposición a las proteínas nativas y modificadas Cry1Fa (CE, ng·cm ⁻²) de <i>B. thuringiensis</i>	37
Cuadro 13. Líneas base sobre inhibición de peso en poblaciones de <i>S. frugiperda</i> recolectadas en el Valle del Fuerte, Sinaloa; Laguna, Coahuila, por efecto de exposición a la proteína Vip3Aa (CE, ng·cm ⁻²) de <i>B. thuringiensis</i>	37
Cuadro 14. Mortalidad de <i>S. frugiperda</i> expuesta a la proteína Cry9Aa• (0.20) [†] de <i>B. thuringiensis</i>	38
Cuadro 15. Mortalidad de <i>S. frugiperda</i> expuestas a las proteínas Cry1C modificadas de <i>B. thuringiensis</i>	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Bioensayo línea base de <i>S. frugiperda</i> con la proteína Cry1Ab ER. Representa a una sola repetición del bioensayo.	46
Figura 2. Bioensayo línea base de <i>S. frugiperda</i> con la proteína Cry1Ab N514A. Representa a una sola repetición del bioensayo.....	46
Figura 3. Bioensayo línea base de <i>S. frugiperda</i> con la proteína Cry1AbMod1. Representa a una sola repetición del bioensayo.	47
Figura 4. Bioensayo línea base de <i>S. frugiperda</i> con la proteína Cry1AbMod-2. Representa a una sola repetición del bioensayo.	47
Figura 5. Bioensayo línea base de <i>S. frugiperda</i> con la proteína Cry1C. Representa a una sola repetición del bioensayo.	48
Figura 6. Bioensayo línea base de <i>S. frugiperda</i> con la proteína Cry9Aa. Representa a una sola repetición del bioensayo.	48
Figura 7. Bioensayo línea base de <i>S. frugiperda</i> con la proteína Vip3Aa. Representa a una sola repetición del bioensayo.	49

INTRODUCCIÓN GENERAL

Los insectos plaga ocasionan severas pérdidas económicas en la agricultura a nivel mundial (Isman, 2006), y una de las especies más importantes es el gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), misma que se originó en las regiones tropicales y actualmente se distribuye desde Estados Unidos de Norteamérica hasta Argentina (Rodríguez y Marín, 2008). Actualmente es un plaga invasiva en el occidente y centro del continente Africano (Germain *et al.*, 2018). Se trata de una especie polífaga que se ha documentado infestando a más de 186 especies de plantas en Centro y Norte América (Casmuz *et al.*, 2010). Entre los cultivos más importantes que ataca son: maíz (*Zea mays* L.), algodón (*Gossypium hirsutum* L.), soya (*Glycine max* L.) y varias especies de pastos (Murúa *et al.*, 2008). Su ataque se puede traducir en pérdidas en el rendimiento que van de 30% en el rendimiento (García-Gutiérrez *et al.*, 2012) hasta mayores del 73 % (Hkuska y Gould, 1997; Germain *et al.*, 2018). El combate de ésta plaga se ha enfocado principalmente al uso de insecticidas orgánicos sintéticos, lo que ha conllevado a una serie de efectos adversos como resistencia, daños a la salud humana y al ambiente. El uso indiscriminado de insecticidas también ha ocasionado que una plaga secundaria que se convierta en una plaga primaria (Al-Sarar *et al.* 2006; Pietrantonio *et al.*, 2007). Ante este escenario se han estado buscando alternativas eficaces más amigables al ambiente y a la salud humana como son las proteínas de la bacteria *B. thuringiensis* Berliner (Bt).

B. thuringiensis (Bt) (Berliner, 1915), es la bacteria entomopatógena con la acción insecticida más conocida, estudiada y utilizada en el campo del control microbiano de plagas. Más del 90% del mercado de bioinsecticidas incluye productos a base de esta especie (Glare y O'Callaghan, 2000; Rosas, 2009). Sus proteínas entomopatógenas son biodegradables y altamente específicas (Soberón, 2007; Rosas, 2008). Bt es un bacilo gram-positivo que produce δ -endotoxinas en inclusiones de cristal durante su fase de esporulación. A estas proteínas con acción insecticida se les conoce como Cry (por su formación en cristales), o Cyt (por su acción citolítica) (Bravo *et al.*, 2007). Una vez que esta proteína se ingiere y se disuelve en el mesenterón, su dominio tóxico se libera, se une a receptores específicos que se localizan en los microvilli de las células epiteliales y ocasiona la muerte (Zhang *et al.*, 2008), por la ruptura de las células y destrucción del intestino (Yu, 2008). Los insecticidas a base de proteínas de Bt que más se

emplean en la agricultura se derivan de un cepa silvestre de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) que expresa las proteínas Cry1A y Cry2A eficiente contra lepidópteros (Roh *et al.*, 2007), o de *B. thuringiensis* var. *aizawai* HD137 que expresa las proteínas.: Cry1A, Cry1B, Cry1C y Cry1D (Soberón *et al.*, 2009).

Con el uso de la ingeniería genética, los genes que codifican las proteínas Cry también se insertan en las plantas para que dichas proteínas se expresen y confieran autoprotección contra plagas insectiles susceptibles, como ocurre con la familia Cry1A (Cry1Ab y Cry1Ac) en cultivos como Maíz y algodónero (Soberón *et al.*, 2007).

En la actualidad, debido a la elevada presión de selección que ejercen las plantas Bt contra los insectos blanco, el riesgo de desarrollo de resistencia es elevado. En México Aguilar-Medel *et al* (2017), realizaron un programa de monitoreo de resistencia en distintas áreas geográficas de *Helicoverpa zea* a las δ -endotoxinas de Cry1Ac y Cry2Ab desde el año 1998 hasta el 2015, donde determinaron que durante ese tiempo no ha habido cambios sustanciales en la susceptibilidad a dichas proteínas, lo que refleja un manejo exitoso de la resistencia. Da Silva *et al.* (2016) evaluaron la susceptibilidad de diferentes poblaciones de *S. frugiperda* a la proteína Cry1F de *B. thuringiensis*, y observaron diferencias de 2 y 6× en respuesta entre las poblaciones susceptibles y las poblaciones de campo más tolerantes para el año 2012 y 2013, respectivamente. El riesgo de desarrollo de resistencia conlleva a una constante búsqueda de proteínas nativas de Bt o mejorar genéticamente las existentes para tener opciones viables a una agricultura con cultivos Bt eficaces. Por tanto, el objetivo de esta investigación, fue determinar las líneas base de susceptibilidad de poblaciones mexicanas de *S. frugiperda* J. E. Smith a proteínas insecticidas de *B. thuringiensis* Berniler, tanto nativas como modificadas genéticamente.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los insectos plaga en México, y en todo el mundo, son el principal problema que el ser humano sigue enfrentando en la agricultura, debido a que tienen una gran adaptabilidad a muchas condiciones ambientales. El combate químico contra estos insectos resulta cada vez más complicado; además, la resistencia a los insecticidas convencionales, afecta a una gran cantidad de cultivos, y se distribuye en poblaciones de insectos plaga de todo el mundo.

Debido a estos fenómenos, es necesaria la implementación de alternativas viables para su control, y una de ellas es la utilización de bioinsecticidas como agentes de control biológico de las plagas. *Bacillus thuringiensis* es la bacteria entomopatógena más importante y la más comercial en todo el mundo. Los bioinsecticidas a base de Bt se utilizan en el combate de plagas tanto agrícolas como forestales. Se ha documentado que el uso de estos productos a base de Bt han logrado controlar diversas plagas de importancia económica como, gusano cogollero *S. frugiperda*, un insecto altamente polífago que causa daños a cultivos como: maíz, algodón, frutales, ornamentales, entre otras.

La ingeniería genética, han desarrollado plantas transgénicas (plantas Bt) portadoras de proteínas de *B. thuringiensis*. Sin embargo, también existen productos comerciales (bioinsecticidas) que pueden ser aplicados de manera directa a las plantas.

OBJETIVOS

Objetivo general.

Determinar las líneas base de susceptibilidad de poblaciones mexicanas de *S. frugiperda* J. E. Smith a proteínas insecticidas de *B. thuringiensis* Berliner tanto nativas como modificadas genéticamente.

Objetivo específico.

Determinar la susceptibilidad a *B. thuringiensis* de dos poblaciones de campo de *S. frugiperda*: Laguna (Comarca Lagunera, Torreón, Coahuila) y Sinaloa (Valle del Fuerte) y una población susceptible a insecticidas, tanto a proteínas nativas: Cry1Ab, Cry1Fa, Cry1C, Cry9Aa y Vip3Aa, como modificadas: Cry1Ab ER, Cry1Ab N514A, Cry1Ab N514A-S587A, Cry1Ab N514F, Cry1Ab N514F-S587A, Cry1AbMod1, Cry1AbMod2, Cry1Ab S587A, Cry1Ab T585A y

Cry1Ab Wt, Cry1C L507A, Cry1C N510A, Cry1C Q508A, Cry1C V505A, Cry1C V509A, Cry1Fa DK, Cry1Fa ER y Cry1Fa N507A.

HIPÓTESIS

Las poblaciones de campo: Laguna y Valle del Fuerte, además de la población Susceptible de de gusano cogollero son susceptibles a las proteínas de *B. thuringiensis* tanto nativas: Cry1Ab, Cry1Fa, Cry1C, Cry9Aa y Vip3Aa, como modificadas: Cry1Ab ER, Cry1Ab N514A, Cry1Ab N514A-S587A, Cry1Ab N514F, Cry1Ab N514F-S587A, Cry1AbMod1, Cry1AbMod2, Cry1Ab S587A, Cry1Ab T585A y Cry1Ab Wt, Cry1C L507A, Cry1C N510A, Cry1C Q508A, Cry1C V505A, Cry1C V509A, Cry1Fa DK, Cry1Fa ER y Cry1Fa N507A.

Literatura citada.

- Al-Sarar, A., F. R. Hall y R. A. Downer. 2006. Impact of spray application methodology on the development of resistance to cypermethrin and spinosad by fall armyworm *S.frugiperda* (J.E.Smith). *Pest Manag. Sci.* 62:1023-1031.
- Aguilar-Medel, S., Rodríguez, J.C., Martínez- Carrillo, J. L. y Silva-Aguayo, G. 2017. Susceptibilities of Geographic Populations of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in Mexico to Bt δ -Endotoxins Cry1Ac and Cry2Ab: An 18-Yr Study. *J. Econ. Entomol.* 110 (5): 2207–2216.
- Bravo, A., I. Gómez., J. Conde., C. Muñoz-Garay., J. Sánchez, R. Miranda., M. Zhuang., S.S. Gill y M. Soberón. 2004. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochim. Biophys. Acta.* 1667: 38-46.
- Casmuz, A., Juárez, M. L., Socías, M. G., Murúa, M. G., Prieto, S., Medina, S., Willink, E y G. Gastaminza. 2010. Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 69: 209–231.
- Da Silva, F. K., Spencer, A. T., Crespo, L. B. A. y D. B. Siegfried. 2016. Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) field populations to the Cry1F *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein. *Fla Entomol.* 99: 629-633.
- García-Gutiérrez, C., González-Maldonado, M. B y E. Cortez-Mondaca. 2012. Uso de enemigos naturales y biorracionales para el control de plagas de maíz. *Ra Ximhai* 8: 57–70.
- Germain, J. F., Georg, G., Reynaud, P. y Silvia, P. 2018. Un noctuido Americano invade África. *Cereales Transferencia Tecnológica. Phytoma España* No. 297. 57-61.
- Glare, T. R. y M. O'Callaghan. 2000. *Bacillus thuringiensis: biology, ecology and safety.* John Wiley y sons, LTD. New York. p. 350.
- Gladstone, S. y A. Hruska. 2003. Una guía para promover el manejo de plagas más seguro y más eficaz con los pequeños agricultores: una contribución al cumplimiento Ambiental de la USAID-APP. CARE. Atlanta, Georgia. p. 25-65.
- Hruska H. A, Gould F., 1997, Fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) and *Diatraea lineolate* (Lepidoptera: Pyralidae): impact of larval population level and temporal occurrence on maize yield in Nicaragua, *J. Econ. Entomol.*, 90: 611-622.

- Isman, M. B. 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and increasingly regulated world. *Annu. Rev. Entomol.* 51:45-66.
- Murúa, G., J. Molina-Ochoa y C. Coviella. 2006. Population dynamics of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and its parasitoids in Northwestern Argentina. *Fla. Entomol.* 89: 175-182.
- Pietrantonio, P.V., T. A. Junek, R. Parker, D. Mott, K. Sider, N. Troxclair, J. Vargas-Camplis, J. K. Westbrook y V. A. Vassiliou. 2007. Detection and evolution of resistance to the pyrethroid cypermethrin in *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Texas. *Environ. Entomol.* 36: 1174-1188.
- Rodríguez, D. L. A y A. J. Marín. 2008. Insectos plaga y su control, pp. 29–46 *In* Rodríguez, M. R, De León, C. [eds.], El cultivo del maíz. Temas selectos 1. Colegio de postgraduados, Mundi Prensa, México.
- Rosas, G. N. M. 2008. Avances en el desarrollo de formulaciones insecticidas a base de *Bacillus thuringiensis*. *Rev Colombiotec.* Vol. 10, No 1.
- Rosas, G. N. M. 2009. Biopesticide Production from *Bacillus thuringiensis*: An Environmentally Friendly Alternative. *Recerit Patents on Biotechnology.* Vol. 3 No 1.
- Soberón, M., L. Pardo-López., I. López., I. Gómez., B. E. Tabashnik y A. Bravo. 2007. Engineering modified Bt toxins to counter insect resistance. *Science.* 318(5856): 1640-1642.
- Soberón M, Gill S, S, y Bravo A. 2009. Signaling versus punching hole: how do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? *Cell. Mol. Life Sci.* 66:1337–1349.
- Zhang, X., N. Griko., S. Corona y L. Jr. Bulla. 2008. Enhanced exocytosis of the receptor BT-R(1) induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis* directly correlates to the execution of cell death. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 149: 581-588.

REVISIÓN DE LITERATURA

Generalidades de gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith.

Origen y distribución.

El origen de *S. frugiperda* se ubica en los trópicos del Continente Americano (Luginbill, 1928; Borbolla, 1981). En dichos lugares se documenta que esta especie no presenta diapausa (Murúa *et al.*, 2006; Farías *et al.*, 2008). En el hemisferio occidental se le ha encontrado desde el sureste de Canadá hasta Chile y Argentina. Es una especie de distribución tropical pero se ha extendido a zonas templadas (López-Edwards *et al.*, 1999). Tood y Poole (1980), documentan la presencia de esta especie en Israel. Actualmente se encuentra invadiendo gran parte del continente Africano (Germain *et al.*, 2018).

En México, el gusano cogollero está ampliamente distribuido en todas las zonas agrícolas, y es un plaga relevante en Baja California Norte, Baja California Sur, Nuevo León, Nayarit, Sinaloa, Sonora, Jalisco, Colima, Chihuahua, Veracruz, Morelos, Oaxaca, Chiapas y Campeche (Andrews, 1988; López *et al.*, 2002). Actualmente se le ha observado ocasionando daños de consideración en lugares superiores a los 2000 msnm como Puebla, Tlaxcala, Hidalgo, Guanajuato, Querétaro y el Estado de México (Hernández-Mendoza *et al.*, 2008)

Hospederos

Gusano cogollero es una especie polífaga, se alimenta de más de 23 familias y 80 especies de plantas tanto cultivadas como silvestres (Pashey, 1988; Andrews, 1988). Las gramíneas como el maíz se consideran hospederos primarios de *S. frugiperda* (Raulston *et al.*, 1986). Otros cultivos de importancia económica que también afecta esta plaga son: frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), tomate (*Lycopersicon esculentum* L.), cacahuete (*Arachis hypogaea* L.), soya (*Glycine max* L.), cebolla (*Allium cepa* L.), alfalfa (*Medicago sativa* L.), col (*Brassica oleracea* L.), eucalipto (*Eucalyptus camaldulensis* Dehn), gladiolo (*Gladiolus* spp. Miller), pepino (*Cucumis sativus* L.), tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) y algodónero (*Gossypium hirsutum* L.) (Metcalf y Flint, 1965).

Daños

El gusano cogollero se alimenta de las hojas tiernas de las plantas del maíz. Posteriormente se introduce en el cogollo y si no se controla, puede causar severos daños al cultivo, con pérdidas de 20 a 100% (Del Rincón *et al.*, 2006). Hernández (1989), sostiene que las pérdidas del área foliar causadas por el ataque del gusano cogollero en cultivos de maíz, afecta significativamente la actividad fotosintética de la planta. Combate.

Cultural.

Se basa en labores al suelo como barbecho profundo y rastreo para destruir las pupas que ahí se encuentran. También el ajuste en las fechas de siembra y uso de cultivos trampa reducen significativamente la densidad de individuos del gusano cogollero (CESAVEG, 2008).

Químico.

Es el método de control más empleado por los productores y se sustenta principalmente en el uso de insecticidas organofosforados y piretroides (Cook *et al.*, 2004). Sin embargo, a través del tiempo, esta especie ha desarrollado resistencia a varios de ellos, limitando la eficacia de esta estrategia (Georghiou y Lagunes-Tejeda, 1991; Al-Sarar *et al.*, 2006; Pietrantonio *et al.*, 2007). En México, para el combate de esta especie se usa una amplia variedad de insecticidas organofosforados, carbamatos y piretroides (Cortez *et al.*, 2002).

Biológico y microbiológico.

Ante los problemas que ocasionan los insecticidas convencionales, se han usado otras alternativas para el control de gusano cogollero, como los enemigos naturales (Fernández y Clavijo, 1985). Los entomopatógenos tienen un alto potencial en el control de estas plagas. Actualmente existen diferentes especies de microorganismos entomopatógenos que son eficaces contra *S. frugiperda*. Una amplia variedad de hongos, virus, protozoarios, nematodos y bacterias se han utilizado en campo contra esta especie de plaga (Lezema-Gutierrez *et al.*, 1996; Molina-Ochoa, 1999). Existen más de 100 especies de bacterias entomopatógenas promisorias o de probada eficacia contra el gusano cogollero (Gladston, 2003). Dentro de las bacterias entomopatógenas, la más utilizada es *Bacillus thuringiensis* Berliner (Gill *et al.*, 1992), debido a que tiene un amplio espectro de hospederos y aceptable eficacia biológica (Vergara, 2004).

Bacillus thuringiensis Berliner.

B. thuringiensis Berliner, es la bacteria entomopatógena más conocida, estudiada y utilizada como agente de control microbiano. Más del 90% del mercado de bioinsecticidas incluye productos a base de esta especie (Glare y O'Callaghan, 2000). Existen en el mundo alrededor de 60,000 aislamientos de *B. thuringiensis*, pertenecientes a colecciones públicas y privadas, lo que revela el interés que existe en el uso de esta bacteria como agente de biocontrol (Boucias y Pendland, 1998).

Modo de acción.

Los cristales para esporales de *B. thuringiensis*, para que actúen deben ingerirse y solubilizarse en el intestino medio. Posteriormente, las proteasas liberan el dominio entomotóxico, mismo que se une a receptores específicos que se localizan en el microvilli de las células epiteliales, lo que desencadena la muerte de la larva (Bravo *et al.*, 2004). *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 se caracteriza por la presencia de genes *cry* antilepidópteros como: *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry2Aa*, *cry2Ab* y *cry1Ia*, y por ello es la bacteria más estudiada (Sauka, 2007).

Proteínas Cry de Bt tóxicas para lepidópteros.

Existen 376 genes *cry* distintos que se clasifican sobre la base de su similitud de secuencias en 54 grupos, que a su vez están divididos en diferentes clases y subclases (Crickmore *et al.*, 2016). Los genes *cry* poseen una secuencia codificante entre 1900 (*cry2Ab*) y 3600 pares de bases (*cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, etc.) (Crickmore y Ellar, 1992). Las proteínas codificadas por los genes *cry* presentan una identidad en la secuencia de aminoácidos que puede variar desde >90 % hasta <20 %, y el intervalo de masas moleculares oscila entre 50 y 140 kDa.

Proteínas Vip

El gen *vip3A* (a) de *B. thuringiensis* proviene de la cepa AB88 y codifica una proteína de 88.5 kDa (Estruch *et al.*, 1996). No contiene el típico N-terminal de secuencia de señales y no se procesa durante la secreción. En el intestino medio de las larvas, esta proteína la procesan proteasas en varios sitios, dejando un 33 kDa activo que se fragmenta (aminoácidos 200-455). La proteína Vip3A se une al epitelio del intestino medio de larvas susceptibles, causando la muerte celular en un proceso que se asemeja apoptosis (Yu, 1997). La producción de Vip3A, mediante

la germinación de esporas, es un factor importante en la combinación de la toxicidad de esporas y toxinas Cry inactivas contra varias especies de insectos (Donovan *et al.*, 2001).

Literatura citada.

- Al-Sarar, A., F. R. Hall y R. A. Downer. 2006. Impact of spray application methodology on the development of resistance to cypermethrin and spinosad by fall armyworm *S. frugiperda* (J.E. Smith). *Pest Manag. Sci.* 62:1023-1031.
- Andrews, K. L. 1988. Latin American Research on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Florida Entomol.* 71: 630-653.
- Boucias, D. G. y J. C. Pendland. 1998. *Principles of insect Pathology*. Kluwer academic publishers, Boston. p. 537.
- Bravo, A., I. Gómez., J. Conde., C. Muñoz-Garay, J. Sánchez, R. Miranda., M. Zhuang., S.S. Gill y M. Soberon. 2004. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochim. Biophys. Acta.* 1667: 38-46.
- Comité Estatal de Sanidad Vegetal Guanajuato (CESAVEG). 2008. Campaña de manejo fitosanitario de maíz. pp. 20.
- Cook, D. R., B. R. Leonard y J. Gore. 2004. Field and laboratory performance of novel insecticides against armyworms (Lepidoptera: Noctuidae). *Florida Entomologist.* 87: 433-439.
- Cortez, M. E. 2002. Evaluación de extractos vegetales para el control del gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidóptera: Noctuidae) en maíz. Informe técnico. Campo Experimental del Valle del Fuerte. INIFAP. Juan José Ríos, Sinaloa. p. 15.
- Crickmore, N y D. Ellar. 1992. Involvement of a possible chaperonin in the efficient expression of a cloned CryIIA deltaendotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 6: 1533-1537.
- Crickmore, N, Baum, J., Bravo, A., Lereclus, D., Narva, K., Sampson, K., Schnepf, E., Sun, M. y Zeigler, D.R. 2016. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature: <http://www.btnomenclature.info/>. [Consultada: 9 de Junio de 2018].
- Del Rincón, M. C., J. Méndez y J. Ibarra. 2006. Caracterización de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* con actividad insecticida hacia el gusano cogollero del maíz *Spodoptera*

- frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Folia Entomológica Mexicana. 45: 157-164.
- Donovan, W. P., Donovan, J. C. y Engleman, J. T. 2001. Gene knockout demonstrates that *vip3A* contributes to the pathogenesis of *Bacillus thuringiensis* toward *Agrotis ipsilon* and *Spodoptera exigua*. J. Invertebr. Pathol. 78
- Estruch, J. J., Warren, G. W., Mullins, M. A., Nye G. J., Craig, J. A. y Koziel, M. G. 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:5389–94. :45–51
- Farias, P. R. S., J. C. Barbosa., A. C. Busoli., W. L. Overal., V. S. Miranda y S. Ribeiro. 2008. Spatial analysis of the distribution of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) and losses in maize crop productivity using geostatistics. *Neotrop. Entomol.* 37: 321-327.
- Fernández, R. y S. Clavijo. 1985. Efectos de los insecticidas (uno químico y otro biológico) sobre el parasitismo observado en larvas de *Sopodoptera frugiperda* provenientes de parcelas experimentales de maíz. *Rev. Fac. Agron.* 13: 101-109.
- Georghiou, G. P. y A. Lagunes-Tejeda. 1991. The occurrence of resistance to pesticides in arthropods. Food and Agriculture Organization (FAO). AGPP/MISC/91-1. pp. 317.
- Germain, J. F., Georg, G., Reynaud, P. y Silvia, P. 2018. Un noctuido Americano invade África. *Cereales Transferencia Tecnológica. Phytoma España* No. 297. 57-61
- Gill, S., E. Cowles y Pietrantonio. 1992. The mode on action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu. Rev. Entomol.* 37:615-636.
- Glare, T. R. y M. O'Callaghan. 2000. *Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety. John Woley y sons, LTD. New York. p. 350.
- Gladstone, S. y A. Hruska. 2003. Una guía para promover el manejo de plagas más seguro y más eficaz con los pequeños agricultores: una contribución al cumplimiento Ambiental de la USAID-APP. CARE. Atlanta, Georgia. p. 25-65.
- Hernández, M. J. L. 1989. Ecopathologie et degats de *Spodopfera frugiperda* J. E. Smith) en culture de mais au Mexique (Etat de Colima) possibilite de lutte a l'aide de la bacterie entomopatogene *Bacillus thuringiensis*. Tesis Doctorado, Escuela Nacional Superior de Agronomía, ENSAM Montpellier, Francia: p. 144.

- Hernández-Mendoza, J. L., López-Barbosa, E. C., Garza-González, E. y Mayek-Pérez, N. 2008. International Journal of Tropical Insect Science. 28: 126-129.
- Lezama-Gutiérrez, R., Alatorre-Rosas, L. F. Bojalil- Jaber, J. molina-Ochoa, M. Arenas-Vargas, M. González-Ramírez, y O. Rebolledo-Domínguez. 1996. Virulence of five entomopathogenic fungi (Hyphomycetes) against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) eggs and neonate larvae. *Vedalia*. 3: 35-39.
- López-Edwards, M., J. L. Hernández-Mendoza, A. Pescador-Rubio, J. Molina- Ochoa, R. Lezama-Gutiérrez, J. J. Hamm and B. R. Wiseman. 1999. Biological differences between five populations of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) collected from corn México. *Fla Entomol.* 82: 254-262.
- Luginbill, P. 1928. The fall armyworm. USDA. *Tech. Bull*: 34. 92.
- Metcalf, C. R y Flint. 1965. Insectos destructivos e insectos útiles. Primera Edición Española.
- Molina-Ochoa J., R. Lezama-Gutiérrez., J. J. Hamm., B. R. Wiseman y M. López- Edwards. 1999. Integrated control of fall armyworm (Lepidoptera:Noctuidae) using resistant plants and entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae). *Fla Entomol.* 82: 263-271.
- Murúa, G., J. Molina-Ochoa y C. Coviella. 2006. Population dynamics of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and its parasitoids in Northwestern Argentina. *Fla. Entomol.* 89: 175-182.
- Pashey D. P. 1988. Current status of armyworm host strains. *Florida Entomol.* 71:227-234.
- Pietrantonio, P.V., T. A. Junek, R. Parker, D. Mott, K. Sider, N. Troxclair, J. Vargas-Camplis, J. K. Westbrook y V. A. Vassiliou. 2007. Detection and evolution of resistance to the pyrethroid cypermethrin in *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Texas. *Environmental Entomology* 36: 1174-1188.
- Sauka D. 2007. Estudio de genes y proteínas insecticidas de aislamientos nativos de *Bacillus thuringiensis*. Aportes al conocimiento de su distribución y toxicidad en plagas agrícolas. Tesis Doctoral. UBA. Universidad de Buenos Aires. Director: Benintende G.
- Soberón, M., Gill, S. S. y A. Bravo. 2009. Signaling versus punching hole: how do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? *Cell. Mol. Life Sci.* 66:1337–1349

- Tood, E. L. y R. W. Poole. 1980. Key and illustrations for the fall armyworm moths of noctuid genus *Spodoptera* Guenée from the Western Hemisphere. *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 73: 722-738.
- Vergara, O. J. D., N. J. C. López y C. B. Chaves. 2004. Evaluación de la patogenicidad de nemátodo *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar (Rhabditida: Heterorhabditidae) sobre la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) en condiciones de laboratorio. En. XXIV Congreso Sociedad Colombiana de Entomología (Resúmenes). Pereira: Socolen.
- Vickery, R. A. 1929. Studies on the fall armyworm in the Gulf Coast District of Texas. USDA Tech. Bull: 138:68.
- Yu, C.G., Mullins, M. A., Warren, G. W, Koziel, M. G. y Estruch, J. J. 1997. The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:532–36.

CAPITULO I. LÍNEAS BASE DE SUSCEPTIBILIDAD DE *Spodoptera frugiperda* J. E. SMITH A PROTEÍNAS NATIVAS Y MODIFICADAS DE *Bacillus thuringiensis* BERLINER.

1.1 RESUMEN

Se determinaron las líneas base de susceptibilidad de poblaciones mexicanas de *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith a proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis* Berliner, en dos poblaciones de campo procedentes de Torreón, Coahuila (Laguna) y Sinaloa (Valle del Fuerte), y una población Susceptible. Se hicieron bioensayos de capa en larvas neonatas (<12 h) con proteínas nativas: Cry1Ab, Cry1C-1, Cry1C-2, Cry1Fa, Cry9Aa y Vip3Aa, y proteínas modificadas: Cry1Ab ER, Cry1Ab N514A, Cry1Ab N514A-S587A, Cry1Ab N514F, Cry1Ab N514F-S587A, Cry1AbMod-1, Cry1AbMod-2, Cry1Ab S587A, Cry1Ab T585A, Cry1Ab Wt, Cry1C L507A, Cry1C N510A, Cry1C Q508A, Cry1C V505A, Cry1C V509A, Cry1Fa DK, Cry1Fa ER y Cry1Fa N507A bajo condiciones controladas: temperatura de 25 ± 2 °C, humedad relativa de 75 ± 5 % y fotoperiodo de 13: 11 h luz: oscuridad. A los siete días de exposición a las proteínas, se evaluaron las variables: porcentaje de mortalidad, porcentaje de inhibición de peso y desarrollo de larvas al tercer y cuarto instares. Los valores más bajos de la CL_{50} y CL_{95} , se observaron con las proteínas Vip3Aa, Cry1Fa y Cry1Fa N507A, los cuales fueron 6.0 a 16.2, y 121.3 a 646.5 $\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}$, respectivamente. Los resultados mostraron que, los valores de la CL_{50} y CL_{95} de las proteínas evaluadas en las dos poblaciones registraron diferencias estadísticas. Los valores más altos de CL_{50} se registraron con la proteína Cry1C-1 que oscilaron entre 65 y 77 $\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ y $CL_{95} > 35\ 000$ $\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}$. La proporción de resistencia (RR_{50} y RR_{95}) fue $< 5x$. La relación de resistencia (RR_{50} y RR_{95}) fue menor de 5x, y su mayor valor se observó con la proteína Vip3Aa - Laguna. La concentración que inhibió el 50 % el peso (CE_{50}) varió entre 0.33 $\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ con Cry1Fa (Valle del Fuerte) a 4.07 $\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ con Cry1C (Susceptible). La CE_{90} estuvo entre 2.76 - 394.6 $\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}$. La proteína Cry9Aa presentó su menor efecto en la población Valle del Fuerte, dado que 5000 $\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ causó 12.5% de mortalidad.

1.2. ABSTRACT

The susceptibility baselines of Mexican populations of *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith to the insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis* Berliner, in two field-collected populations from Torreón, Coahuila (Laguna) and Sinaloa (Valle del Fuerte) and one Susceptible population that was used as a reference. Layer bioassays were made in neonatal larvae (<12 h) with native proteins: Cry1Ab, Cry1C-1, Cry1C-2, Cry1Fa, Cry9Aa and Vip3Aa, and modified proteins: Cry1Ab ER, Cry1Ab N514A, Cry1Ab N514A-S587A, Cry1Ab N514F, Cry1Ab N514F-S587A, Cry1AbMod-1, Cry1AbMod-2, Cry1Ab S587A, Cry1Ab T585A, Cry1Ab Wt, Cry1C L507A, Cry1C N510A, Cry1C Q508A, Cry1C V505A, Cry1C V509A, Cry1Fa DK, Cry1Fa ER and Cry1Fa N507A under controlled conditions: temperature of 25 ± 2 ° C, relative humidity of $75 \pm 5\%$ and photoperiod of 13: 11 h light: dark. After seven days of protein exposure, these variables were evaluated: percentage of mortality, percentage of weight inhibition and development of larvae at third and fourth instars. The lowest values of the LC_{50} and CL_{95} , were observed with the proteins Vip3Aa, Cry1Fa and Cry1Fa N507A, which were 6.0 to 16.2, and 121.3 to 646.5 $ng \cdot cm^{-2}$, respectively. The results showed that, the values of the LC_{50} and CL_{95} of the proteins evaluated in the two populations registered statistical differences. The highest values of LC_{50} were registered with the Cry1C-1 protein that ranged between 65 and 77 $ng \cdot cm^{-2}$ and $CL_{95} > 35\ 000$ $ng \cdot cm^{-2}$. The resistance ratio (RR_{50} and RR_{95}) was $<5x$. The resistance ratio (RR_{50} and RR_{95}) was less than 5x, and its highest value was observed with the Vip3Aa protein - Laguna. The concentration that inhibited 50% weight (EC_{50}) varied between 0.33 $ng \cdot cm^{-2}$ with Cry1Fa (Valle del Fuerte) at 4.07 ng / cm^{-2} with Cry1C (Susceptible). The CE_{90} was between 2.76 - 394.6 $ng \cdot cm^{-2}$. The Cry9Aa protein had its lowest effect in the Valle del Fuerte population, given that 5000 $ng \cdot cm^{-2}$ caused 12.5% mortality.

1.3. INTRODUCCION

El Gusano cogollero *S. frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidóptera: Noctuidae), es una plaga nativa de las regiones tropicales de América y se distribuye desde Estados Unidos de Norteamérica hasta Argentina (Rodríguez y Marín, 2008), en regiones donde las temperaturas invernales son templadas y las plantas hospederas están disponibles (Nagoshi *et al.*, 2012). Actualmente es un plaga invasiva en el centro y occidente de África (Germain *et al.*, 2018). Es una especie polífaga,

la cual se documenta infestando a más de 186 especies de plantas (Casmuz *et al.*, 2010). En México se considera una plaga primaria y de importancia económica (Sena *et al.*, 2003) y entre los cultivos que ataca están: el maíz (*Zea mays* L.), algodónero (*Gossypium hirsutum* L.), sorgo (*Sorghum vulgare* L.), soya (*Glycine max* L.), cacahuete (*Arachis hypogaea* L), arroz (*Oryza sativa* L.), forrajes y pastos (Nagoshi y Meagher, 2004; Murúa *et al.*, 2008); en ocasiones puede causar pérdidas del 30% en el rendimiento (García-Gutiérrez *et al.*, 2012). La aplicación de insecticidas convencionales es el método de control más usado, y ahora es resistente a la mayoría de los grupos de plaguicidas convencionales (Georghiou y Mellon 1983; Yu *et al.* 2003; Ahmad y Arif 2010). La bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Berliner, 1915) es un organismo entomopatógeno con acción insecticida (Bravo *et al.*, 2007) y más del 90% del mercado de bioinsecticidas incluye productos a base de Bt (Glare y O'Callaghan, 2000; Rosas, 2009). Esta bacteria es una alternativa para el manejo y control de algunas plagas de insectos, ya que son específicos, no afecta a los insectos benéficos (Herrero *et al.*, 2016) ni dañan al medio ambiente. *B. thuringiensis* se considera un patógeno tóxico porque produce δ -endotoxinas en inclusiones de cristal durante su fase de esporulación; estos cristales están formados por proteínas con acción insecticida, y se conocen como Cry (por su formación en cristales), Cyt (con acción citolítica) (Bravo y Soberón, 2007) y Vip (proteínas insecticidas vegetativas) que controlan plagas de los órdenes Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Hemiptera, Blattaria y Lepidoptera (incluida *S. frugiperda*) (van Frankenhuyzen, 2009). Después de la ingesta, estas proteínas se activan por enzimas digestivas y se unen a receptores específicos dentro de las células epiteliales del intestino medio formando poros en las membranas, provocando septicemia y muerte del insecto (Zhang *et al.*, 2008; Yu, 2008; Adang *et al.*, 2014).

Los bioinsecticidas a base de proteínas Bt más empleados en los cultivos están compuestos de derivados de cepas silvestres de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) que expresan las proteínas Cry1A y Cry2A eficiente contra lepidópteros (Roh *et al.*, 2007), lo mismo que la cepa *B. thuringiensis* var. *aizawai* HD137 que expresa las toxinas: Cry1A, Cry1B, Cry1C y Cry1D (Soberón *et al.*, 2009).

Además, con el uso de la ingeniería genética, las toxinas Cry también se emplean en productos biotecnológicos como las plantas genéticamente modificadas que expresan uno o más genes de proteínas Cry. Los genes más empleados son aquellos que codifican para las proteínas *cry1Ab*, y

cryIAc en cultivos como maíz y algodón (Soberón *et al.*, 2007; ISAAA, 2018), *vip3* (Doss *et al.*, 2002;), *cryIAb* en sorgo y maíz (Van Rensburg, 2011), *cryIAc* y *cryIFa* en soya (CTNBio, 2010; EPA, 2014; NCBI, 2018), *cryIAb* y *cryIAc* en arroz (ISAAA, 2018) convirtiéndolas en plantas Bt que producen su propio insecticida. Sin embargo, especies de plagas que atacan a los cultivos y las plantas Bt están amenazados por la evolución de la resistencia (Storer *et al.*, 2010; Dhurua y Gujar, 2011; Gassmann *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011). La posibilidad de desarrollo de la resistencia de gusano cogollero es alta, de ahí la necesidad de crear programas de manejo de la resistencia. Shelton y Zhao (2009), consideran necesario establecer programas anuales de monitoreo para distintas especies. En México, Aguilar-Medel *et al* (2017), realizaron estudios de monitoreo de resistencia en *Helicoverpa zea* de distintas áreas geográficas de a las δ -endotoxinas de Cry1Ac y Cry2Ab desde el año 1998 hasta el 2015, determinando que las larvas expuestas a dichas proteínas no llegan al tercer instar y la reducción de peso es significativa respecto al testigo, concluyendo que la susceptibilidad de *H. zea* no ha cambiado. Por estos motivos, el objetivo de este estudio fue determinar líneas base de susceptibilidad de *S. frugiperda* de dos colonias de campo: Laguna (Comarca Lagunera, Torreón, Coahuila) y Sinaloa (Valle del Fuerte, Sinaloa) y una Susceptible (Tenancingo, Estado de México) a proteínas nativas de *B. thuringiensis*

1.4. MATERIALES Y MÉTODOS

1.4.1. Lugar de estudio.

El estudio se realizó en el laboratorio de entomología del Centro Universitario Tenancingo de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMex). Tenancingo, Estado de México, México

1.4.2. Poblaciones.

Se utilizaron dos poblaciones de campo de *S. frugiperda* provenientes de: Laguna (Comarca Lagunera, Coahuila-Durango), latitud 25. 686306, 25.447972 y longitud: 103. 001175, 103. 755778, en cultivo de maíz; Valle del Fuerte (Sinaloa), latitud: 25. 94698, 25. 94344, 25.72748, 25.92154, 27. 27999y longitud: 109.1757, 109. 18003, 109. 28304, 108. 99563, 109. 28986, 109.93504, en cultivo de maíz y sorgo. Para cada población se hizo una recolecta de por lo menos 300 larvas de diferentes instares. Las larvas se enviaron al laboratorio de Entomología del

Centro Universitario Tenancingo donde se criaron hasta obtener larvas neonatas en la F1, las cuales se usaron para hacer los bioensayos. Como referencia se usó una colonia Susceptible que se ha mantenido por más de tres años en condiciones de laboratorio.

1.4.3. Cría de *S. frugiperda*.

La cría de gusano cogollero se realizó con insectos en estado larvario de las dos poblaciones de campo (Laguna y Valle del Fuerte) y la colonia Susceptible. Las colonias se mantuvieron en una cámara de cría en condiciones controladas: temperatura de 25 ± 2 °C, humedad relativa de 75 ± 5 % y un fotoperiodo de 13: 11 h luz: oscuridad. Las larvas se alimentaron con una dieta merídica (Fall Armyworm, Southland Products, Inc.) hasta obtener las pupas, éstas se colocaron en jaulas entomológicas (25 x 25 x 30 cm) donde permanecieron hasta la emergencia de los adultos, mismos que se alimentaron con agua azucarada al 10% (agua destilada y miel maple Karo®). Posteriormente las hembras ovipositaron por siete días sobre tela “Tul”, esta tela se cambió cada 24 h durante el periodo de oviposición. Se obtuvieron larvas neonatas (larvas ≤ 12 h de edad) con las cuales se realizaron los bioensayos.

1.4.4. Proteínas.

Las proteínas de *B. thuringiensis* las proporcionó el Instituto de Biotecnología (IBT-UNAM) de la Universidad Nacional Autónoma de México (Cuadro 1). La presentación de las proteínas fue en estado líquido, y se mantuvieron durante los ensayos a temperatura de 0 ± 2 °C. Para obtener las concentraciones requeridas, las proteínas de Bt se diluyeron en un solvente al 1% (agua destilada + agar Banto™) y previo a su utilización, la solución se agitó durante 30 segundos mediante el uso de un agitador Vortex (Vortex T-Genie2, Scientific industries).

Cuadro 1. Proteínas nativas y modificadas de *B. thuringiensis*.

	Nativas	Modificadas	Concentración (mg·mL ⁻¹)
1	Cry1Ab		1.63
2		Cry1Ab ER	0.25
3		Cry1Ab N514A	1.87
4		Cry1Ab N514A-S587A	1.3
5		Cry1Ab N514F	2.15
6		Cry1Ab N514F-S587A	1.04
7		Cry1Ab Mod1	1.76
8		Cry1Ab Mod2	0.93
9		Cry1Ab S587A	1.82
10		Cry1Ab T585A	1.68
11		Cry1Ab Wt	2.53
12	Cry1C-1		2.72

13	Cry1C-2	1.75
14	Cry1C L507A	1.85
15	Cry1C N510A	2.26
16	Cry1C Q508A	2.78
17	Cry1C V505A	3.09
18	Cry1C V509A	1.83
19	Cry1Fa	0.807
20	Cry1Fa DK	2
21	Cry1Fa ER	0.25
22	Cry1Fa N507A	1.4
23	Cry9Aa	0.2
24	Vip3Aa	0.27

1.4.5. Bioensayos.

Para los bioensayos se colocó un mililitro de dieta merídica en cada cavidad de la charola para bioensayos (Bio-Assay Tray Bio-BA-128: C-D Internacional, Inc) con presentación de 128 cavidades. Cuando la dieta solidificó (15 min) se depositarán 200 μ L de la proteína respectiva con un dosificador múltiple Eppendor a una concentración deseada. A las 24 h se colocó una larva neonata (< 12 h). Las unidades experimentales se cubrieron con un plástico transparente autoadherible (PULL N' PEEL Tab Bio-Cv-16; C-D International, Inc.) que tiene micro perforaciones que permiten el intercambio de oxígeno y se mantuvieron en una cámara bioclimática a temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, humedad relativa de $75\pm 5\%$ y un fotoperiodo de 13:11 h luz: oscuridad. A los siete días de exposición a las proteínas se evaluaron los siguientes parámetros: porcentaje de mortalidad, porcentaje de larvas en tercer y cuarto instar, y porcentaje de reducción de peso respecto al testigo.

Inicialmente se evaluaron una serie de concentraciones logarítmicamente espaciadas para determinar la ventana biológica; es decir donde se encontraba tuvo el cero y el 100% de la respuesta. Posteriormente se concentraciones intermedias y se realizaron cuatro repeticiones en días diferentes. El tamaño de muestra para cada proteína fue de 32 larvas/dosis/repetición. En cada repetición se incluyó un testigo al cual únicamente se le aplicaron 200 μ L de agua-agar al 1% (Bacto Nutrient Agar; Difco Laboratories, Detroit, MI). La mortalidad en los tratamientos respecto al testigo se ajustó mediante la fórmula de Abbott (Abbott, 1925). El nivel máximo de mortalidad aceptable para el testigo fue 10%. El criterio usado para determinar la mortalidad fue sí la larva no presentaba movimiento físico al ser tocada con una agua entomológica y aquellas que estuvieran vivas con apariencias de una larva neonata o larvas de primer instar.

1.4.6. Diseño experimental y Análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental de bloques completos al azar. Donde cada bloque fue una repetición realizada en día diferente. El porcentaje de mortalidad y la inhibición de peso se sometieron a un análisis Probit, mediante el procedimiento Proc Probit en el paquete estadístico SAS 9.4 (SAS University Edition, 2012-2016), la respuesta de las poblaciones no fue significativamente diferente cuando sus correspondientes límites de confianza al 95% se traslaparon. Para el desarrollo de larvas se realizó un ANOVA (Proc ANOVA, SAS University Edition, 2012-2016) y una comparación de medias con Tukey, $\alpha=0.05$.

1.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El manejo integrado de plagas representa uno de los mayores costos en la producción agrícola. Los insecticidas químicos generalmente no son específicos, por lo que también afecta a los organismos benéficos. Por ello, el uso de bioinsecticidas se ha convertido en una alternativa para el control de plagas. Los insecticidas biológicos a base de toxinas de *B. thuringiensis* (Bt) son biodegradables, amigables con el ambiente y específicos contra el insecto plaga (Bravo *et al.*, 2007 y Kumar *et al.*, 2008). En este estudio se evaluaron tres poblaciones de *S. frugiperda* con diferentes proteínas de *B. thuringiensis* las cuales se separaron en grupos; Cry1Ab, Cry1C, Cry1Fa, Cr9Aa y Vip3Aa.

1.5.1. Mortalidad.

Proteínas Cry1Ab.

Los valores de CL_{50} con la proteína nativa Cry1Ab fluctuaron entre $43.6 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ (población Valle del Fuerte) a $74.1 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ (Laguna). La CL_{95} estuvo entre $1221 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ (Valle del Fuerte) y $5310 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ (Susceptible). Ríos-Diez *et al.*, (2012) documentaron valores de CL_{50} de hasta $193.42 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ en gusano cogollero, es decir hasta cinco veces más tolerante que las poblaciones evaluadas en este estudio. Del Toro y Bravo (2010), evaluaron la proteína Cry1Ab y compararon su efecto en dos poblaciones de *S. frugiperda*; IBT-UNAM (Instituto de Biotecnología) y CP (Colegio de Posgraduados) registrando valores de CL_{50} de hasta $837101 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ y $3944 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$, respectivamente. Las proteínas Cry1Ab S587A y Cry1Ab Wt presentaron los niveles de CL_{50} y CL_{95} más bajos. La CL_{50} osciló entre 22.1 (Susceptible) a $32.4 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ (Laguna). La CL_{95} estuvo entre 1457 a $2151 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ para las mismas poblaciones con la proteína Cry1Ab S587A. Los

valores que se obtuvieron con la proteína Cry1Ab Wt fluctuaron en un rango de 20.4 ng·cm⁻² (Susceptible) a 60.1 ng·cm⁻² (Valle del Fuerte). Los valores más altos obtenidos fueron con la proteína Cry1Ab ER, donde la CL₅₀ estuvo entre 63.1 ng·cm⁻² (Susceptible) a 132.6 ng·cm⁻² (Valle del Fuerte). En el caso de las proteínas Cry1AbMod (Mod-1 y Mod-2), los valores de CL₅₀ fluctuaron entre 30.2 ng·cm⁻² (Laguna) a 112.6 ng·cm⁻² (Valle del Fuerte), sin diferencias estadísticas significativas entre proteínas. las poblaciones de *S. frugiperda* que se evaluaron muestran tolerancia a las proteínas modificadas aquí evaluadas, pero su fortaleza consiste en utilizarse cuando se detecte resistencia a las proteínas nativas.

Estudios con las proteínas modificadas Cry1AbMod y Cry1AcMod en otras especies como *Plutella xylostella* y *Ostrinia nubilalis* se encontró que la resistencia está relacionada con mutaciones de cadherina. Las proteínas Cry1Ab y la modificada Cry1AbMod se han evaluado en especies del Orden Coleoptera (*Leptinotarsa texana* Schaeffer y *Tribolium cateneum* Herbst), sin afectación alguna (Del Toro y Bravo, 2010), lo que pudo deberse a que la proteína Cry1Ab no es reconocida por las proteasas naturales de los coleópteros, que le permite ser activada y afectar coleópteros llegando a intoxicarlos (Walters *et al.*, 2008). Erasmus y Van den Berg (2014), en Sudáfrica evaluaron el efecto del maíz Bt que expresa la proteína Cry1Ab contra coleópteros y lepidópteros, demostrando que tales proteínas no tienen efecto para el control de *Heteronychus arator* Fabricio (Coleoptera: Scarabaeidae) y *Somaticus angulatus* Hope (Coleoptera: Tenebrionidae), mientras que sí tienen efecto sobre *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). Farias *et al.* (2013), evaluaron durante dos años el maíz MON810 que expresa la proteína Cry1Ab, y se compararon los resultados con aplicaciones convencionales de insecticidas y como resultado obtuvieron que las aplicaciones convencionales no controlaron las plagas de *D. saccharalis* (F) y *H. zea*. Esto indica que las plantas Bt y los productos portadores de estas bacterias son una opción al control de esta plaga. Flores *et al.* (2016), también por dos años, en cultivo de maíz en el estado de Sinaloa, México, evaluaron el efecto de maíces modificados genéticamente como: “Agrisure™ 3000 GT” y “Agrisure® Viptera™ 3111” portadores de las proteínas Cry1Ab, mCry3A y Vip3A20 y observaron que los daños de *D. saccharalis* (F) fueron menores, en comparación con los híbridos convencionales. Niu *et al.* (2013) y Yang *et al.* (2013) sostienen que la combinación de la proteína Cry1Ab con proteínas Vip3A, proporcionan una mejor protección al cultivo de Maíz, en comparación con la expresión individual de ellos. Sin embargo, en este estudio las proteínas combinadas: Cry1Ab N514A-S587A y Cry1Ab N514F-

S587A los valores de CL_{50} y CL_{95} oscilaron entre $14.0 \text{ ng}\cdot\text{cm}^2$ con Cry1Ab N514A-S587A (Valle del Fuerte) entre $14.0 \text{ ng}\cdot\text{cm}^2$ a $63.5 \text{ ng}\cdot\text{cm}^2$ con Cry1Ab N514A-S587A (Laguna), resultados que mostraron no ser más tóxicas combinadas ni mejores que la nativa Cry1Ab (Cuadro 2).

En general la proteína Cry1Ab nativa requiere de cadherina para formar oligómeros, mientras que las proteínas modificadas que carecen de una α -hélice no, estas se evaluaron en larvas de *Manduca sexta* a las que le silenciaron el receptor cadherina, demostrando de esta forma que son efectivas estas proteínas (Soberón *et al.*, 2007). Aunque está demostrado que las proteínas nativas y modificadas matan por diferentes vías lo que puede ayudar a manejar la resistencia (Tabashnik *et al.*, 2015).

Proteínas Cry1C.

Con las proteínas Cry1C (muestra 1: Cry1C-1 y muestra 2: Cry1C-2), los valores de CL_{50} y CL_{95} fueron los más altos de este estudio. Con la proteína Cry1C-1, los valores de CL_{50} oscilaron entre $65.4 \text{ ng}\cdot\text{cm}^2$ (Laguna) a $77.2 \text{ ng}\cdot\text{cm}^2$ (Valle del Fuerte), y la CL_{95} entre $35142 \text{ ng}\cdot\text{cm}^2$ (Susceptible) a $40615 \text{ ng}\cdot\text{cm}^2$ (Laguna), respectivamente, sin diferencias estadísticas entre poblaciones. Resultados similares obtuvieron Hernández-Martínez *et al.* (2008) quienes evaluaron 9 proteínas de Bt contra *S. exigua* en dos colonias de laboratorio. Los valores de CL_{50} de la proteína Cry1Ca fueron de $90 \text{ ng}\cdot\text{cm}^2$ (LF 95% = 42-197) en una colonia de Francia y $333 \text{ ng}\cdot\text{cm}^2$ (LF95%= 120-1070) para la población Netherlands. Avisar *et al.* (2009) determinaron que las plantas que expresan la proteína Cry1Ca fueron tolerantes al daño de *Spodoptera littoralis*. Keller *et al.* (1996) consideran que se puede deber al aumento de la actividad de las proteasas intestinales que tienen esta especie ya que degradan e inactivan a la proteína Cry1C. Bravo *et al.* (1998) demostraron que la cepa nativa IB126 que contienen genes de cry1C y cry1D fueron tóxicos para *S. exigua* y *S. frugiperda* con valores de CL_{50} de 22 (15-30), 22 (16-31), respectivamente. Esto pudiera ser por la combinación de proteínas. Mientras que con la proteína Cry1C-2 los valores de CL_{50} fluctuaron entre $405 \text{ ng}\cdot\text{cm}^2$ (Susceptible) y $4959 \text{ ng}\cdot\text{cm}^2$ (Laguna), siendo la Susceptible significativamente diferente a las poblaciones Laguna y Valle del Fuerte (Cuadro 2).

En el caso de las proteínas Cry1C modificadas: Cry1C L507A, Cry1C N510A, Cry1C Q508A, Cry1C V505A, Cry1C V509A no se determinaron líneas base de susceptibilidad debido a su baja

toxicidad. En larvas de la población Susceptible, la concentración más alta evaluada fue de 5000 ng·cm⁻² el porcentaje de mortalidad fue 57, 53, 59, 61 y 58 %, respectivamente (Cuadro 15).

Proteínas Cry1Fa.

Con las proteínas Cry1Fa, los valores de CL₅₀ oscilaron entre 7.6 ng·cm⁻² con las proteínas Cry1Fa (Valle del Fuerte) y 60.4 ng·cm⁻² con Cry1Fa DK (Laguna). La CL₉₅ fue menor a 3000 ng·cm⁻² (Cuadro 4). La eficacia de esta proteína ya ha sido documentada en otros estudios. Butin (2008), mostró que híbridos de maíz transgénico que expresan las endotoxinas Cry1Ab (MON810) y Cry1F (TC1507) durante los años 2006 y 2007 redujeron considerablemente los daños provocados por *S. frugiperda* y *Helicoverpa zea*, en Georgia, Estados Unidos de Norteamérica. Algunas investigaciones concuerdan con nuestros resultados. Los valores de CL₅₀ que se han obtenido a la proteína Cry1F han sido de 0.14 ng·cm⁻² (Blanco *et al.*, 2010), 3.56 ng·cm⁻² (Farías *et al.*, 2014), 36 ng·cm⁻² (Waquil *et al.*, 2004) y de 181 a 289 ng·cm⁻² (Storer *et al.*, 2010). Estas diferencias pueden estar asociadas con el instar de los insectos, el método de bioensayo, el criterio de mortalidad o la variabilidad genética de las poblaciones. Las dos proteínas más tóxicas en este estudio para *S. frugiperda* fueron la proteína nativa Cry1Fa y la modificada Cry1Fa N507A, con valores de CL₅₀ menores a 16 ng·cm⁻² y CL₉₅ menor a 277 ng·cm⁻², sin diferencias estadísticas (Cuadro 4).

A pesar del éxito de la ingeniería genética al generar nuevas tecnologías con el propósito de controlar los daños de las plagas en los cultivos, en algunos países documentan resistencia de las plagas a los organismos modificados genéticamente. Tabashnik *et al.*, (1994) reportaron casos de resistencia cruzada de *Plutella xylostella* a proteínas Cry1Fa y Cry1A. Monnerat *et al.* (2015) revelaron que la resistencia del gusano cogollero fue significativa a la proteína Cry1Fa con valores de CL₅₀ de hasta 3500 ng·cm⁻². Existen altos niveles altos de resistencia de las poblaciones de *S. frugiperda* al maíz que a la proteína Cry1Fa en varias regiones de Brasil (Farías *et al.*, 2014). Storer *et al.* (2010) documentaron que la resistencia de poblaciones de gusano cogollero a maíz Bt en Puerto Rico, cuyo maíz contenía la toxina Cry1Fa, fue de hasta 350 veces en porcentaje de inhibición de peso y 34 veces en mortalidad. Recientemente se demostró que esta población resistente fue sensible a las formulaciones DiPel y XenTari Bt. DiPel contiene las proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac y Cry2Aa y XenTari expresa Cry1C y Cry1D (Jakka *et al.*, 2014).

Proteína Vip.

Los valores de CL_{50} para Valle del Fuerte, Laguna y Susceptible fueron de 6.8, 12.2 y 9.4 $ng \cdot cm^{-2}$, respectivamente. Mientras que la CL_{95} fue de 219.6, 646.5 y 121.3 $ng \cdot cm^{-2}$, respectivamente (Cuadro 5). Bergamasco *et al.*, (2013) evaluaron las proteínas CryIIa10 y Vip3Aa en *Spodoptera spp* y encontraron que la proteína Vip3Aa fue más tóxica para *S. frugiperda* donde los valores de CL_{50} y CL_{90} con sus correspondientes límites fiduciales fueron de 24.6 (9.72 - 44.51) y 262.7 (153.17 - 560.3.) $ng \cdot cm^{-2}$, respectivamente. La internación de ambas proteínas arrojaron una CL_{50} de 5.67 (3.83 - 8.76) y CL_{90} de 217.12 (107.68 - 542.83) $ng \cdot cm^{-2}$. Otras investigaciones manifiestan que la toxicidad de la proteína Vip3Aa en gusano cogollero fue alta con una CL_{50} de 620 $ng \cdot cm^{-2}$ (Hernández-Martínez *et al*, 2013), cuyo valor es hasta 10 veces más alto comparado con el de este estudio donde la CL_{50} en la población Valle del Fuerte fue de 6.0 $ng \cdot cm^{-2}$. Estas diferencias pueden deberse al método de bioensayo que usaron, ya que en un pozo de 2 cm^2 aplicaron únicamente 50 μL^{-1} mientras que para este estudio se utilizaron 200 μL^{-1} . Otra posible causa es el fotoperiodo, pues le dieron hasta 16 h luz con solo 8 de obscuridad y las larvas al tener más luz tienden alimentarse más. Observaciones histopatológicas muestran que la ingesta de proteínas Vip3A por insectos susceptibles de *S. frugiperda* causa parálisis a concentraciones de entre 4 y 40 $ng \cdot cm^{-2}$ (Swiecicka y Mahillon, 2005), los resultados de este trabajo están dentro de este rango.

En general, los valores más bajos se obtuvieron con las proteínas Cry1Fa y Vip3Aa, cuyas CL_{50} estuvieron en un rango de 7.6 $ng \cdot cm^{-2}$ (Valle del Fuerte) y 16.2 $ng \cdot cm^{-2}$ (Laguna) con Cry1Fa, y entre 6.0 $ng \cdot cm^{-2}$ en Valle del Fuerte a 12.2 $ng \cdot cm^{-2}$ para Laguna con la proteína Vip3Aa. Las CL_{95} con Cry1Fa oscilaron entre 189.7 $ng \cdot cm^{-2}$ (Valle del Fuerte) a 277.8 $ng \cdot cm^{-2}$ (Susceptible), y con Vip3Aa fue de 121.3 $ng \cdot cm^{-2}$ (Susceptible) a 646.5 $ng \cdot cm^{-2}$ (Laguna).

Los valores de CL_{50} de las proteínas evaluadas entre las poblaciones Valle del Fuerte, Laguna y Susceptible, no fueron diferentes estadísticamente debido a que sus límites de confianza se traslaparon a excepción de la proteína Cry1Fa donde la población Valle del Fuerte registró valores de CL_{50} de 7.6 (6.4 – 9.1) $ng \cdot cm^{-2}$, menor al de las poblaciones Laguna y Susceptible cuyos los valores fueron de 16.2 (13.6 – 19.1) $ng \cdot cm^{-2}$ y 15.4 (12.5 – 18.9) $ng \cdot cm^{-2}$, respectivamente. Aunque los valores de CL_{95} fueron más altos, la respuesta no fue diferente entre las poblaciones a las mismas proteínas, con la excepción de la proteína Vip3Aa, ya que el

valor de la CL₉₅ de la Laguna fue de 646.5 (335.5 – 1580) ng·cm⁻² más alto que Valle del Fuerte y Susceptible, de las cuales la CL₉₅ fue de 219.6 (75.6 – 1664) y 121.3 (73.0 – 250.8) ng·cm⁻², respectivamente. Las diferencias de la CL₅₀ y CL₉₅ para Valle del Fuerte, Laguna y Susceptible se observaron entre proteínas en cada una de las poblaciones (Cuadro 2, 3, 4 y 5), cuyos valores de CL₅₀ para Valle del Fuerte con las proteínas nativas Cry1Ab, Cry1C, Cry1Fa y Vip3Aa fueron de 43.6, 77.2, 7.6 y 6.0 ng·cm⁻², respectivamente. La respuesta a nivel de CL₉₅ fue de 1221, 36256, 19.7 y 219.6 ng·cm⁻², con diferencias estadísticas.

Para la población Laguna, los valores de CL₅₀ con las proteínas Cry1Ab, Cry1C, Cry1Fa y Vip3Aa fueron de 74.1, 65.4, 16.2 y 12.2 ng·cm⁻², respectivamente, habiendo diferencias estadísticas entre las proteínas Cry1Fa, Vip3Aa contra Cry1Ab, Cry1C. Los resultados a nivel de CL₉₅ estuvieron en un rango de 192.3 (137.2-300.6) ng·cm⁻² con Cry1Fa a 40615 (16161-132272) ng·cm⁻², con Cry1C para esta población de Laguna los que muestran diferencias estadísticas significativas entre proteínas. En la población Susceptible, los valores de CL₅₀ fueron de 59.5, 71.4, 15.4 y 9.4 ng·cm⁻² con las proteínas Cry1Ab, Cry1C, Cry1Fa y Vip3Aa, respectivamente, siendo estadísticamente diferentes, y los valores de CL₉₅ fueron de 5310, 35142, 277.8 y 121.3 ng·cm⁻², respectivamente; siendo iguales Cry1Ab con Cry1C y Cry1Fa con Vip3Aa, pero entre estos dos grupos hubo diferencias estadísticas (Cuadro 2, 3, 4 y 5). Además, se hizo evaluación con la proteína Cry9Aa en la población Valle del Fuerte, y se observó baja toxicidad, ya que con 5000 ng·cm⁻² se registró 12.5 % de mortalidad (Cuadro 15). Los mismo sucedió con las proteínas modificadas de Cry1C: Cry1C L507A, Cry1C N510A, Cry1C Q508A, Cry1C V505A, Cry1C V509A ya que las proteínas registraron mortalidad inferior al 60 % con 5000 ng·cm⁻², por ello no fue posible determinar las línea base de susceptibilidad. Debido a su baja toxicidad de estas proteínas no se intentó realizar los bioensayos con las otras dos poblaciones faltantes

Estos resultados indican que la proteína Vip3Aa fue la más toxica, lo contrario a las muestras Cry1C (Cry1C-1 y Cry1C--2), las proteínas modificadas de Cry1C quienes fueron las menos tóxicas.

Las pendientes generalmente fueron bajas entre 0.67 en Cry1Ab ER - Valle del Fuerte a 1.31 en Cry1Ab – Laguna. Los porcentajes de mortalidad registrados en cada población/proteína, se

ajustaron a una línea recta, ya que los valores de la X^2 fueron bajos pues fluctuaron de 0.8 con Cry1Ab N514F (Laguna) a 9.93 Cry1Ab (Susceptible). También se estimaron las proporciones de resistencia a nivel de la CL_{50} (RR_{50}) y CL_{95} (RR_{95}), los cuales fueron bajos, alrededor de 5x. La RR_{50} varió de 0.61x con Cry1Ab N514F - Valle del Fuerte a 2.97x Cry1Ab Wt (Valle del Fuerte) y en el caso de la RR_{95} , estos fueron de 0.12x Cry1AbMod-2 (La Laguna) a 7.3x con la Cry1AbMod-2 (Valle del Fuerte) (Cuadro 2, 3, 4 y 5). Esto indica que las poblaciones de campo son susceptibles a las proteínas evaluadas. Con la excepción de la proteína Cry1C-1 la RR_{50} varió de 12.2x y la RR_{95} de 195x.

1.5.2. Inhibición de desarrollo al tercer y cuarto instar.

Proteínas Cry1Ab.

El desarrollo de las larvas expuestas a las proteínas de *B. thuringiensis* se redujo (Cuadro 6, 7, 8 y 9). En el testigo, el número de individuos que llegaron o rebasaron el tercer instar fue superior a 26.7 ± 0.5 , incluso llegó a 100% (promedio 32 larvas/repetición), esto sucedió con las proteínas Cry1Ab N514A (Valle del Fuerte), Cry1AbMod-1 (Valle del Fuerte y Laguna). Para la proteína nativa Cry1Ab, con $30 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$, el número de larvas que llegaron al tercer instar fue 2.7 ± 1.3 . Mientras que con $10 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ de la proteína Cry1Ab T585A solamente alcanzaron el tercer instar un promedio de 6.3 ± 1.5 , 5.5 ± 0.6 y 9.7 ± 0.5 larvas de las poblaciones Valle del Fuerte, Laguna y Susceptible, respectivamente. Resultados similares ocurrieron con la proteína Cry1Ab Wt, ya que con $12 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ el desarrollo se inhibió en un promedio de 3.7, 3.0 y 4.3 larvas respectivamente para las mismas poblaciones. Lo que indica que estas proteínas son más tóxicas e inhiben los estados de desarrollo a concentraciones menores que la proteína nativa Cry1Ab. Con las proteínas Cry1Ab combinadas (Cry1Ab N514A-S587A Y Cry1Ab N514F-S587A), se redujo del desarrollo con un promedio de entre 70 y 60 $\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}$, respectivamente. Mientras que con las muestras de las proteínas modificadas Cry1Ab Mod-1 con $40 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ se redujo el desarrollo al tercero y cuarto instar en un promedio de 2.5 larvas con la población Valle del Fuerte. sin embargo, con las poblaciones Laguna y Susceptible el desarrollo fue de 0. Con la proteína Cry1AbMod-2 se inhibió el desarrollo a un promedio de entre 3.7 y 6.3 larvas con una concentración de $30 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ (Cuadro 6)

Proteínas Cry1C.

La proteína Cry1C-1 mostró ser menos toxica, ya que un promedio de entre 2.7 ± 0.5 (Valle del Fuerte) y 4.7 ± 3.6 (Susceptible) de larvas llegaron al tercero y cuarto instares a una concentración de hasta $1000 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$. Con Cry1C-2, a $320 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ se inhibió el desarrollo de las larvas en un promedio de entre 2.5 ± 0.5 (Cuadro 7).

Proteínas Cry1Fa.

La proteína nativa Cry1Fa redujo el desarrollo de larvas al tercer y cuarto instar en un promedio de 3.2 ± 0.5 (Valle del Fuerte) y 10.3 ± 0.6 (Susceptible) con la concentración de $4 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$. Según Farías *et al* (2014) en un estudio realizado en Brasil, encontró que la concentración que inhibió 50% el desarrollo de las larvas de segundo instar osciló entre 3.59 a $72.47 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ y la inhibición de 90% de entre 200 y $2000 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$. Cry1Fa ER a una concentración de $60 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ aún hubo desarrollo de larvas al tercer instar y cuarto instares. Con $0.7 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$, el desarrollo de las larvas para las poblaciones Valle del Fuerte, Laguna y Susceptible fue de: 14, 20 y 20 larvas en promedio con la proteína Cry1Fa, de 23.3, 20.6 y 19.2 con Cry1Fa DK, 25.7, 23.0 y 19.6 con Cry1Fa ER y 19.0, 16.2 y 19 con Cry1Fa N507A, respectivamente. En todas las proteínas se marcaron diferencias estadísticas significativas entre las concentraciones (Cuadro 8).

Proteína Vip

La proteína Vip3Aa redujo el desarrollo de larvas casi en 50% a una concentración de $1 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$, ya que en promedio el número de larvas que se desarrollaron al tercero y cuarto instares en las poblaciones Valle del Fuerte, Laguna y Susceptible fueron: 14.2, 15.7 y 21.6, respectivamente. La concentración más alta a la que hubo desarrollo del tercer instar fue con $10 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$, donde Valle del Fuerte registró un promedio de 0.7 ± 0.5 larvas, la Susceptible de 1.7 ± 0.5 , larvas de Laguna no mostraron desarrollo (Cuadro 9). Los valores de desarrollo se aprecian en la Figura 7 (Anexos).

1.5.3. Inhibición de peso

Proteínas Cry1Ab.

Con la proteína nativa Cry1Ab, el 50% de inhibición del crecimiento (CE50), fluctuó entre $1.28 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ (Susceptible) a $3.16 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ (Laguna). El 90% de inhibición (CE90) varió de 27.72

ng·cm⁻² (Valle del Fuerte) a 5-2.31 ng·cm⁻² (Susceptible) (Cuadro 10). Hernández-Martínez *et al.*, (2009) determinaron que Cry1Ab, en larvas de *S. exigua*, a los siete días de exposición, el 50% de la inhibición de peso fue de 75 (24-127), mientras que la CE₅₀ de la proteína Cry1Aa fue de 57 (8-101); éstos valores fueron 10 veces más altos que los observados en este estudio. La CE₅₀ de las proteínas modificadas oscilo entre 0.65 ng·cm⁻² para Cry1Ab ER (Susceptible) a 3.99 ng·cm⁻² en Cry1AbMod-1 (Valle del Fuerte). La CE₉₀ fluctuaron entre 15.99 ng·cm⁻² Cry1Ab S587A (Valle del Fuerte) a 100.5 ng·cm⁻² con Cry1AbMod-2 (Susceptible) (Cuadro 10).

Proteínas Cry1C.

Con las proteínas Cry1C-1 y Cry1C-2, los valores de CE₅₀ estuvieron entre 0.79 ng·cm⁻² (Valle del Fuerte) y 4.07 ng·cm⁻² (Susceptible), y la CE₉₀ se registró entre 116.2 ng·cm⁻² (Laguna) a 394. 6 ng·cm⁻² (Susceptible), con Cry1C-2. Mientras que con Cry1C-1, los valores de CE₅₀ fueron de entre 7.07 ng·cm⁻² (Valle del Fuerte) y 10.8 ng·cm⁻² (Laguna). La CE₉₀ llegó a 464 ng·cm⁻² (Laguna) (Cuadro 11). La CE₅₀ que obtuvieron Hernández-Martínez *et al.*, (2009) fue de 88 (20 - 155) con la proteína Cry1Ca en *S. exigua*.

Proteínas Cry1Fa.

Para la proteína Cry1Fa, los valores de CE₅₀ oscilaron entre 0.33 ng·cm⁻² (Valle del Fuerte) a 1.01 ng·cm⁻² (Susceptible), siendo éstas las concentraciones más bajas que inhiben el crecimiento de las larvas en un 50%. Los valores de CE₉₀ estuvieron entre 2.76 ng·cm⁻² (Valle del Fuerte) y 27.11 ng·cm⁻² (Susceptible). Con la proteína Cry1Fa N507A, los valores de CE₅₀ y CE₉₀ estuvieron entre 1 y 10 ng·cm⁻². (Cuadro 12). Esta última proteína podría ser una alternativa para el control de *S. frugiperda*. Resultados similares a los obtenidos por Farías *et al* (2014), confirma que la CE₅₀ para poblaciones Brasileñas de *S. frugiperda* con la proteína Cry1Fa fluctúa en un rango de 0.8 a 1.71 ng·cm⁻². Otros resultados basados en la inhibición del desarrollo fueron los obtenidos por Da Silva *et al*, (2016) quien evaluaron el efecto de la proteína Cry1Fa en larvas de *S. frugiperda* obteniendo valores de CE₅₀ de entre 0. 10 a 0.48 ng·cm⁻² en evaluación durante el año 201-2 y valores de CE₅₀ entre 0.10 a 0.41 ng·cm⁻². Hernández-Martínez *et al.* (2008) confirman que la proteína Cry1Fa es efectiva en larvas de *S. exigua* de tres colonias de laboratorio, determinando que la CE₅₀ fue de 18 ng·cm⁻² (a los 7 días de exposición). *Plutella xylostella* ha sido documentada resistente a la proteínas Cry1Fa (Tabashnik *et al.*, 1994). De

acuerdo con Blanco *et al.*, (2010), *S. frugiperda* es tolerante a las proteínas Cry1A y Cry1F, ya que con Cry1Fa la CE₅₀ fue de hasta 11, 018 ng·cm⁻².

Proteína Vip.

Para la proteína Vip3Aa, los valores de CE₅₀ fluctuaron entre 0.74 ng·cm⁻² (Valle del Fuerte) y 1.19 ng·cm⁻² (Laguna). La CE₉₀ fluctuó entre 5.75 ng·cm⁻² (Valle del Fuerte) y 19.3-2 ng·cm⁻² (Laguna) (Cuadro 13). Las diferencias estadísticas se registraron entre las poblaciones a las mismas proteínas, con la excepción de Vip3Aa, cuyos valores de CE₅₀ no existe diferencia.

En general, los valores más altos de la CE₅₀ se registraron con las proteínas Cry1Ab y Cry1C. Valle del Fuerte fue la población más sensible, con valores de CE₅₀ y CE₉₀ más bajos a las proteínas Cry1Fa y Vip3Aa. Los resultados de este estudio concuerdan con los obtenidos por otros autores quienes determinaron la susceptibilidad de las proteínas Cry y Vip. Sena *et al.* (2009) afirman que la toxicidad de las proteínas Vip3Aa es mayor a las Cry. Esto se podría deber a la diversidad de receptores que se encuentran en las membranas del insecto, lo que es benéfico para que las proteínas actúen (Malik *et al.* 2006). Además, la variabilidad observada se puede deber a las diferencia genéticas que desarrollan los insectos a lo largo de procesos evolutivos alopátricos (Del Toro y Bravo, 2010; Monerat *et al.*, 2015). Es posible que esta variabilidad mitigue el desarrollo de la resistencia (Crespo *et al.*, 2010).

Cuadro 2. Análisis Probit de la mortalidad de larvas de *S. frugiperda* expuestas a las proteínas nativas y modificadas Cry1Ab de *B. thuringiensis*.

Proteína	Población	N	P±ES	CL ₅₀ (95% CI) ^{1,-2}	CL ₉₅ (95% CI) ^{1,-2}	χ ²	Gl	Pr>ChiSq	RR ₅₀ [¶]	RR ₉₅ [¶]
Cry1Ab*	Valle del Fuerte	1152	1.13±0.07	43.6 (35.6-53.4)a ¹ b ²	1221 (793.5-2116)a ¹ a ²	5.37	4	0.25	0.73*	0.21
	Laguna	864	1.31±0.18	74.1 (39.3-139.1)a ¹ b ²	1327 (480.7-16231)a ¹ bc ²	7.59	3	0.05	1.24	0.23
	Susceptible	1152	0.84±0.08	59.5 (37.7-100.7)a ¹ bc ²	5310 (1784-31394)a ¹ abc ²	9.93	5	0.07		
Cry1Ab ER	Valle del Fuerte	1152	0.67±0.05	132.6 (89.8-214.3)a ¹ c ²	35130 (12401-144164)b ¹ bc ²	3.63	5	0.6	2.10	2.41
	Laguna	1152	0.99±0.06	97.8 (77.4-124.9)a ¹ b ²	4483 (2631-8866)a ¹ bc ²	7.19	4	0.12	1.54	0.30
	Susceptible	864	0.69±0.05	63.1 (45.1-90.9)a ¹ bc ²	14564 (6380-42778)a ¹ c ²	4.14	6	0.65		
Cry1Ab N514A	Valle del Fuerte	1024	0.92±0.06	40.5 (31.8-52)a ¹ b ²	2442 (1373-5180)a ¹ ab ²	4.27	4	0.37	0.88	2.05
	Laguna	1024	1.23±0.06	36.1 (29.7-43.5)a ¹ a ²	773.7 (548.2-1174)a ¹ a ²	7.38	5	0.19	0.78	0.65
	Susceptible	1024	1.16±0.10	45.9 (30.5-70.7)a ¹ bc ²	1189 (544.7-4130)a ¹ ab ²	7.84	4	0.097		
Cry1Ab N514A-S587A	Valle del Fuerte	1024	0.60±0.04	14.0 (9.3-20.8)a ¹ a ²	7166 (2914-23973)a ¹ b ²	7.11	5	0.21	0.22	0.53
	Laguna	1024	0.87±0.05	63.5 (44.05-95.0)b ¹ b ²	16867 (6866-55801)a ¹ c ²	6.80	5	0.23	1.01	1.25
	Susceptible	1024	0.78±0.05	62.6 (45.9-87.5)b ¹ bc ²	13387 (6319-34764)a ¹ c ²	4.42	5	0.49		
Cry1Ab N514F	Valle del Fuerte	768	0.92±0.06	35.6 (19.6-67.5)a ¹ abc ²	2137 (696.8-15326)a ¹ ab ²	8.04	4	0.08	0.61	0.63
	Laguna	1024	0.94±0.06	48.2 (37.5-62.6)a ¹ ab ²	2687 (1552-5393)a ¹ b ²	0.80	4	0.93	0.83	0.79
	Susceptible	768	0.93±0.10	58.0 (31.0-120.8)a ¹ bc ²	3376 (989.4-32220)a ¹ abc ²	9.06	4	0.059		
Cry1Ab N514F-S587A	Valle del Fuerte	768	0.79±0.07	45.7 (23.8-92.0)a ¹ abc ²	5211 (1571-36389)a ¹ b ²	9.2	4	0.056	1.17	1.49
	Laguna	1024	0.84±0.05	40.2 (30.1-54.1)a ¹ ab ²	3628 (2056-7329)a ¹ bc ²	4.8	4	0.30	1.03	1.04
	Susceptible	1024	0.84±0.05	38.8 (29.0-52.2)a ¹ b ²	3480 (1962-7072)a ¹ bc ²	4.63	4	0.32		
Cry1Ab Mod1	Valle del Fuerte	1024	0.76±0.07	88.3 (58.4-152.4)a ¹ c ²	12396 (3999-65941)a ¹ c ²	3.83	3	0.27	2.3	7.3
	Laguna	1024	1.09±0.13	30.2 (16.3-69.2)a ¹ ab ²	956.2 (275.1-13615)a ¹ abc ²	7.64	3	0.053	0.80	0.56
	Susceptible	768	0.99±0.11	37.6 (20.5-74.4)a ¹ ab ²	1691 (548.6-12982)a ¹ abc ²	9.35	4	0.052		

Cry1Ab Mod2	Valle del Fuerte	1152	0.69±0.09	112.6 (53.8-372.8)a ¹ c ²	25594 (4183-561067)a ¹ bc ²	4.16	3	0.24	1.2	1.60
	Laguna	864	1.12±0.11	65.5 (38.5-113.5)a ¹ ab ²	1924 (775.1-9087)a ¹ abc ²	8.64	4	0.07	0.74	0.12
	Susceptible	864	0.72±0.10	88 (39.2-322.3)a ¹ bc ²	15901 (2203-14705)a ¹ bc ²	9.41	4	0.051		
Cry1Ab S587A	Valle del Fuerte	768	0.88±0.06	27.8 (20.5-38.1)a ¹ ab ²	1990 (1024-4795)a ¹ ab ²	7.17	4	0.12	1.25	1.36
	Laguna	1024	0.90±0.06	32.4 (24.9-42.4)a ¹ a ²	2151 (1208-4483)a ¹ b ²	3.08	4	0.54	1.46	1.47
	Susceptible	1024	0.90±0.08	22.1 (12.7-39.3)a ¹ ab ²	1457 (515.2-8153)a ¹ abc ²	8.78	4	0.097		
Cry1Ab T585A	Valle del Fuerte	768	0.91±0.08	65.7 (46.5-96.0)a ¹ bc ²	8538 (3788-25431)a ¹ b ²	4.70	4	0.31	0.74	2.80
	Laguna	1024	0.66±0.05	41.2 (29.4-58.6)a ¹ a ²	12724 (5411-39574)b ¹ c ²	3.23	4	0.51	0.46	4.17
	Susceptible	1024	1.06±0.06	87.8 (69.4-111.1)a ¹ c ²	3049 (1985-5158)a ¹ b ²	6.36	4	0.17		
Cry1Ab Wt	Valle del Fuerte	1024	0.96±0.05	60.6 (47.8-77.1)b ¹ bc ²	3130 (1968-5506)b ¹ ab ²	1.70	5	0.88	2.97	5.76
	Laguna	1024	0.90±0.06	34.1 (25.7-47.3)a ¹ ab ²	2272 (1084-6265)a ¹ ab ²	4.84	3	0.18	1.67	4.1
	Susceptible	768	1.15±0.94	20.4 (15.7-26.8)a ¹ a ²	542.9 (313.2-1138)a ¹ a ²	5.18	3	0.15		

n Número de individuos tratados. CL₅₀ Concentración Letal que mata el 50%. CL₉₅ Concentración Letal que mata el 95%. ¶ Respuesta relativa = CL₅₀₍₉₅₎ de la población de campo / CL₅₀₍₉₅₎ de la población susceptible. ¹ Valores con diferentes letras son significativamente diferentes a través del no traslape de los límites de confianza con una probabilidad del 95% esto entre poblaciones dentro de una misma proteína. ² Valores con diferentes letras son significativamente diferentes a través del no traslape de los límites de confianza con una probabilidad del 95% esto entre proteínas evaluadas de una misma población.

Cuadro 3. Análisis Probit de la mortalidad de larvas de *S. frugiperda* expuestas a las proteínas nativas Cry1C-1 y Cry1C-2 de *B. thuringiensis*.

Proteína	Población	n	P±ES	CL ₅₀ (95% CI)	CL ₉₅ (95% CI)	χ ²	Gl	Pr>ChiSq	RR ₅₀ [¶]	RR ₉₅ [¶]
Cry1C-1•	Valle del Fuerte	1152	0.52±0.04	1025 (630.2-1862)ab ¹ b ²	1352998 (356857-8304652)a ¹ b ²	7.38	5	0.19	2.5	4.5
	Laguna	1152	0.41±0.05	4959 (1643-30793)b ¹ b ²	45563702 (2357789-7649259907)ab ²	2.31	4	0.67	12.2	154.1
	Susceptible	1152	0.57±0.04	405 (272.6-641.4)a ¹ b ²	295616 (102049-1199322)a ¹ b ²	5.3	5	0.37		
Cry1C-2•	Valle del Fuerte	1024	0.69±0.04	77.2 (53.8-114.5)a ¹ a ²	36256 (15021-111444)a ¹ a ²	1.67	5	0.89	1.08	1.03
	Laguna	1024	0.58±0.03	65.4 (45.2-97.7)a ¹ a ²	40615 (16164-132275)a ¹ a ²	2.93	5	0.70	0.91	1.15
	Susceptible	1024	0.61±0.04	71.4 (49.8-105.7)a ¹ a ²	35142 (14531-108354)a ¹ a ²	1.10	5	0.95		

n Número de individuos tratados. CL₅₀ Concentración Letal que mata el 50%. CL₉₅ Concentración Letal que mata el 95%. ¶ Respuesta relativa = CL₅₀₍₉₅₎ de la población de campo / CL₅₀₍₉₅₎ de la población susceptible. ¹ Valores con diferentes letras son significativamente diferentes a través del no traslape de los límites de confianza con una probabilidad del 95% esto entre poblaciones dentro de una misma proteína..² Valores con diferentes letras son significativamente diferentes a través del no traslape de los límites de confianza con una probabilidad del 95% esto entre proteínas evaluadas de una misma población. • Proteína nativa o silvestre.

Cuadro 4. Análisis Probit de la mortalidad de larvas de *S. frugiperda* expuestas a las proteínas nativas y modificadas Cry1Fa de *B. thuringiensis*.

Proteína	Población	n	P±ES	CL ₅₀ (95% CI)	CL ₉₅ (95% CI)	χ ²	Gl	Pr>ChiSq	RR ₅₀ [¶]	RR ₉₅ [¶]
Cry1Fa•	Valle del Fuerte	1152	1.17±0.06	7.6 (6.4-9.1)a ¹ a ²	189.7 (133.3-239.3)a ¹ a ²	5.63	6	0.46	0.49	0.68
	Laguna	1152	1.53±0.12	16.2 (13.6-19.1)b ¹ b ²	192.3 (137.2-300.6)a ¹ a ²	6.21	3	0.1	1.05	0.69
	Susceptible	864	1.31±0.10	15.4 (12.5-18.9)b ¹ b ²	277.8 (174.8-495.1)a ¹ a	6.31	4	0.17		
Cry1Fa DK	Valle del Fuerte	864	0.92±0.10	47.9 (31.9-85.5)a ¹ b ²	2828 (958-15339)a ¹ b ²	4.39	4	0.35	1.8	1.27
	Laguna	864	0.83±0.09	31.0 (21.1-53.0)a ¹ c ²	2918 (936.5-17543)a ¹ b ²	2.3	4	0.66	1.2	1.3
	Susceptible	1152	0.85±0.09	25.8 (17-46.7)a ¹ bc ²	2213 (713.7-12351)a ¹ b ²	4.27	4	0.36		
Cry1Fa ER	Valle del Fuerte	1152	1.42±0.15	35.8 (20.8-58.0)a ¹ b ²	507 (239.9-2076)a ¹ b ²	7.41	3	0.059	1.0	0.64
	Laguna	864	0.99±0.10	60.4 (40.5-87.6)a ¹ c ²	2702 (1207-8828)a ¹ b ²	0.98	3	0.80	1.68	3.44
	Susceptible	864	1.22±0.10	35.8 (28.1-46.6)a ¹ c ²	784.7 (454.7-1658)a ¹ b ²	5.14	3	0.16		

Cry1Fa N507A	Valle del Fuerte	768	1.28±0.09	7.84 (6.3-9.7)a ¹ a ²	149.8 (95.5-271.4)a ¹ ab ²	7.3	4	0.11	0.94	0.97
	Laguna	1024	1.37±0.08	8.8 (7.4-10.5)a ¹ a ²	140.0 (96.8-222.8)a ¹ a ²	6.2	4	0.18	1.06	0.91
	Susceptible	1024	1.30±0.08	8.3 (6.9-10.0)a ¹ a ²	153.2 (103.5-252.0)a ¹ a ²	6.0	4	0.19		

n Número de individuos tratados. CL₅₀ Concentración Letal que mata el 50%. CL₉₅ Concentración Letal que mata el 95%. ¶ Respuesta relativa = CL₅₀₍₉₅₎ de la población de campo / CL₅₀₍₉₅₎ de la población susceptible. ¹ Valores con diferentes letras son significativamente diferentes a través del no traslape de los límites de confianza con una probabilidad del 95% esto entre poblaciones a una sola proteína. ² Valores con diferentes letras son significativamente diferentes a través del no traslape de los límites de confianza con una probabilidad del 95% esto entre proteínas evaluadas de una misma población. • Proteína nativa o silvestre.

Cuadro 5. Análisis Probit de la mortalidad de larvas de *S. frugiperda* expuestas a la proteína Vip3Aa de *B. thuringiensis*.

Proteína	Población	n	P±ES	CL ₅₀ (95% CI)	CL ₉₅ (95% CI)	χ ²	Gl	Pr>ChiSq	RR ₅₀ ¶	RR ₉₅ ¶
Vip3Aa•	Valle del Fuerte	896	1.05±0.12	6.0 (3.9-10.3)a ¹	219.6 (75.6-1664)b ¹	8.06	4	0.08	0.63	1.81
	Laguna	896	0.95±0.07	12.2 (9.6-15.8)a ¹	646.5 (335.5-1580)b ¹	2.12	4	0.71	1.28	5.32
	Susceptible	672	1.48±0.14	9.4 (7.7-11.9)a ¹	121.3 (73.0-250.8)a ¹	4.74	3	0.19		

n Número de individuos tratados. CL₅₀ Concentración Letal que mata el 50%. CL₉₅ Concentración Letal que mata el 95%. ¶ Respuesta relativa = CL₅₀₍₉₅₎ de la población de campo / CL₅₀₍₉₅₎ de la población susceptible. ¹ Valores con diferentes letras son significativamente diferentes a través del no traslape de los límites de confianza con una probabilidad del 95% esto entre poblaciones a una sola proteína. • Proteína nativa o silvestre.

Cuadro 6. Larvas de *S. frugiperda* expuestas a diferentes concentraciones (ng·cm⁻²) de proteínas Cry1Ab nativa y modificadas de *B. thuringiensis* y alcanzaron el tercero y cuarto instar.

Conc.	Cry1Ab• (1.63) [†] ± EE ^a			Conc.	Cry1Ab ER (0.25) [†] ± EE ^a			Conc.	Cry1Ab N514A (1.87) [†] ± EE ^a		
	Valle del Fuerte	Laguna	Susceptible		Valle del Fuerte	Laguna	Susceptible		Valle del Fuerte	Laguna	Susceptible
Testigo	31.5 ± 1.0 a	31.0±1.0 a	29.7 ± 2.1 a	Testigo	31.0 ± 2.0 a	31.2 ± 1.0 a	30.0 ± 0.0 a	Testigo	32.0 ± 0.0 a	31.0 ± 2.0 a	32.0 ± 0.0 a
0.6	24.5 ± 3.7 b	25.0±2.0 b	25.2 ± 1.5 b	0.35	26.0 ± 0.8 ab	26.2 ± 2.0 b	25.3 ± 0.6 b	2	16.5 ± 2.5 b	19.2 ± 3.7 b	17.2 ± 4.9 b
1.6	17.5 ± 2.6c	20.3±3.1 c	22.2 ± 1.7 b	1.1	22.2 ± 3.5 b	20.7 ± 3.1 c	18.6 ± 1.2 c	7	10.2 ± 3.4 c	8.5 ± 2.6 c	9.2 ± 0.5 c
4	14.2 ± 1.7 c	17.0 ± 3.6 c	18.2 ± 1.5 c	3.5	13.7 ± 5.1 c	17.0 ± 3.6 d	16.6 ± 1.5 c	20	2.7 ± 1.7 d	2.7 ± 2.6 c	2.2 ± 1.0 d
11	7.5 ± 1.0 d	8.0 d ± 1.0	12.5 ± 1.3 d	11	12.7 ± 3.0 c	8.0 ± 1.0 e	9.3 ± 1.2 d	50	1.2 ± 1.3 d	0±0	0±0
30	2.7 ± 1.3 e	3.0 ± 1.7e	8.2 ± 1.0 e	35	5.0 ± 0.0 d	3.0 ± 1.7 f	6.6 ± 1.2 e				

Conc.	Cry1Ab N514A-S587A (1.3) [†] ± EE ^a			Conc.	Cry1Ab N514F (2.15) [†] ± EE ^a			Conc.	Cry1Ab N514F-S587A (1.04) [†] ± EE ^a		
	Valle del Fuerte	Laguna	Susceptible		Valle del Fuerte	Laguna	Susceptible		Valle del Fuerte	Laguna	Susceptible
Testigo	26.7 ± 0.5 a	30.6 ± 0.6 a	30.7 ± 1.5 a	Testigo	31.3 ± 1.2 a	31.7 ± 0.5 a	31.6 ± 0.6 a	Testigo	30.5 ± 1.0 a	30.2 ± 0.5 a	31.2 ± 0.5 a
1.3	18.7 ± 3.4 b	25.3 ± 1.5 b	19.5 ± 1.9 b	1	22.6 ± 2.5 b	23.5 ± 1.0 b	16.6 ± 1.2 b	0.4	22.0 ± 3.4 b	24.7 ± 3.2 b	27.0 ± 0.0 b
0.4	15.5 ± 5.1 b	20.6 ± 4.0 bc	18.5 ± 3.4 b	3.5	16.3 ± 4.0 b	18.7 ± 4.5 c	12.0 ± 2.0 c	2	18.0 ± 1.2 c	16.0 ± 0.8 c	22.2 ± 1.7 c
5	7.7 ± 2.2 c	16.0 ± 0.0 c	8.7 ± 1.9 c	13	4.6 ± 1.5 c	4.7 ± 1.7 d	4.6 ± 1.2 d	10	12.0 ± 1.8 d	7.5 ± 3.3 d	14.0 ± 2.2 d
19	2.5 ± 0.6 cd	2.3 ± 0.6 d	4.7 ± 1.3 cd	50	3.0 ± 2.0 c	1.2 ± 1.0 d	2.0 ± 1.0 d	60	2.7 ± 1.0 e	1.7 ± 0.5 e	3.2 ± 1.0 e

70				170							
	1.2 ± 0.5 d	1.3 ± 0.6 d	2.7 ± 1.0 d		0.3 ± 0.6 c	0±0	0±0				
Cry1AbMod-1 (1.76)[†] ± EE^a				Cry1AbMod-2 (0.93)[†] ± EE^a				Cry1Ab S587A (1.68)[†] ± EE^a			
Conc.	Valle del Fuerte	Laguna	Susceptible	Conc.	Valle del Fuerte	Laguna	Susceptible	Conc.	Valle del Fuerte	Laguna	Susceptible
Testigo	32.0 ± 0.0 a	32.0 ± 0.0 a	30.6 ± 1.2 a	Testigo	30.7 ± 1.0 a	31.3 ± 7.9 a	31.0 ± 1.0 a	Testigo	31.3 ± 1.2 a	32.0 ± 0.0 a	31.7 ± 0.5 a
0.8	25.0 ± 3.2 b	24.7 ± 1.3 b	20.3 ± 4.6 b	0.3	26.5 ± 1.0 b	25.5 ± 6.8 ab	19.0 ± 1.0 b	0.6	24.0 ± 1.0 b	23.2 ± 1.3 b	21.2 ± 3.6 b
3	21.5 ± 2.4 b	20.5 ± 2.4 c	19.3 ± 4.0 b	0.8	23.7 ± 1.7 b	21.0 ± 6.5 bc	17.3 ± 2.1 bc	2.5	15.3 ± 1.2 c	14.0 ± 1.4 c	10.0 ± 4.8 c
10	12.5 ± 0.6 c	9.2 ± 1.3 d	11.6 ± 0.6 c	2.8	19.0 ± 1.6 c	18.3 ± 6.3 c	12.0 ± 3.0 dc	10	3.6 ± 1.2 d	6.5 ± 2.1 d	4.5 ± 1.7 c
40	2.5 ± 1.9 d	0±0	1.0 ± 1.0 d	9	11.5 ± 2.4 d	15.3 ± 6.3 c	8.6 ± 3.8 d	35	1.3 ± 0.6 d	2.5 ± 3.8 e	0±0
130	0.7 ± 1.0 d	0±0	0±0	30	3.7 ± 0.5 e	7.0 ± 7.5 d	6.3 ± 2.5 d				
Cry1Ab T585A (1.68)[†] ± EE^a				Cry1Ab Wt (2.53)[†] ± EE^a							
Conc.	Valle del Fuerte	Laguna	Susceptible	Conc.	Valle del Fuerte	Laguna	Susceptible				
Testigo	29.3 ± 0.6 a	28.5 ± 1.3 a	32.0 ± 0.0 a	Testigo	31.5 ± 1.0 a	32.0 ± 0.0 a	31.3 ± 1.2 a				
0.8	18.0 ± 1.0 b	18.0 ± 1.8 b	21.2 ± 3.8 b	0.9	23.2 ± 2.6 b	17.7 ± 8.9 b	16.6 ± 7.4 b				
3.1	16.6 ± 2.5 b	11.0 ± 1.6 c	19.5 ± 4.5 b	3.5	12.7 ± 1.7 c	10.0 ± 3.6 bc	13.3 ± 3.8 bc				
10	6.3 ± 1.5 c	5.5 ± 0.6 d	9.7 ± 0.5 c	12	3.7 ± 1.7 d	3.0 ± 2.4 c	4.3 ± 2.1 c				
50	1.3 ± 1.2 d	2.0 ± 0.0 e	1.7 ± 1.0 d								

Conc. Concentración de la proteína. EE: Error Estándar de la media. ^a: Valores con diferentes letras dentro de cada columna son significativamente diferentes a través de la comparación de medias con Tukey 0.05. [†] Concentración original en mg · mL. . * Proteína nativa o silvestre.

Cuadro 7. Larvas de *S. frugiperda* expuestas a diferentes concentraciones (ng · cm⁻²) de dos muestras de la proteína Cry1C de *B. thuringiensis* y alcanzaron el tercero y cuarto instar.

Cry1C-1• (1.82)[†] ± EE^a				Cry1C-2• (2.172)[†] ± EE^a			
Conc.	Valle del Fuerte	Laguna	Susceptible	Conc.	Valle del Fuerte	Laguna	Susceptible
Testigo	32.0 ± 0.0 a	32.0 ± 0.0 a	30.0 ± 0.8 a	Testigo	27.0 ± 0.8 a	30.0 ± 2.0 a	30.2 ± 2.2 a
1	23.2 ± 5.7 b	26.7 ± 1.7 ab	24.5 ± 2.1 b	0.18	24.5 ± 3.7 a	21.0 ± 2.8 b	25.7 ± 4.6 ab
4	21.0 ± 3.6 b	23.5 ± 1.7 b	17.4 ± 1.7 c	0.8	19.2 ± 4.0 b	16.7 ± 1.7 c	23.0 ± 3.7 b
15	18.0 ± 2.8 b	13.0 ± 7.1 c	14.2 ± 1.3 d	3.5	14.2 ± 0.5 c	11.2 ± 2.2 d	13.5 ± 1.9 c
60	7.0 ± 0.8 c	9.7 ± 4.3 c	11.5 ± 1.7 de	11	9.7 ± 0.5 c	8.7 ± 1.5 d	9.5 ± 1.3 cd
125	5.5 ± 0.6 c	8.7 ± 2.9 c	9.2 ± 2.2 e	70	3.0 ± 1.4 d	2.5 ± 0.6 e	6.5 ± 1.3 d
1000	2.7 ± 0.5 c	0±0	4.7 ± 3.6 f	320	2.5 ± 0.6 d	1.2 ± 0.5 e	1.0 ± 0.0 e

Conc. Concentración de la proteína. EE: Error Estándar de la media. ^a: Valores con diferentes letras dentro de cada columna son significativamente diferentes a través de la comparación de medias con Tukey. [†] Concentración original en mg · mL. Cry1C-1: muestra 1; Cry1C-2: muestra 2. . * Proteína nativa o silvestre.

Cuadro 8. Larvas de *S. frugiperda* expuestas a diferentes concentraciones (ng·cm⁻²) de proteínas Cry1Fa nativa y modificadas de *B. thuringiensis* y alcanzaron el tercero y cuarto instar.

Cry1Fa• (0.807)[†] ± EE^a				Cry1Fa DK (2.0)[†] ± EE^a				Cry1Fa ER (0.25)[†] ± EE^a			
Conc.	Valle del Fuerte	Laguna	Susceptible	Conc.	Valle del Fuerte	Laguna	Susceptible	Conc.	Valle del Fuerte	Laguna	Susceptible
Testigo	31.5 ± 1.0 a	31.7 ± 0.5 a	31.6 ± 0.6 a	Testigo	30.6 ± 1.2 a	31.3 ± 0.6 a	30.7 ± 1.3 a	Testigo	30.7 ± 0.5 a	31.3 ± 1.2 a	31.3 ± 0.6 a
0.3	22.0 ± 0.8 b	24.5 ± 1.9 b	25.3 ± 0.6 b	0.3	23.6 ± 3.2 ab	21.6 ± 2.1 b	21.7 ± 1.5 b	0.7	25.7 ± 1.9 ab	23.0 ± 3.6 b	19.6 ± 1.5 b
0.7	14.0 ± 0.8 c	20.0 ± 5.4 bc	20.0 ± 4.4 c	0.7	23.3 ± 3.8 b	20.6 ± 2.5 bc	19.2 ± 1.5 b	2	21.2 ± 2.2 b	19.6 ± 3.2 b	17.0 ± 1.0 b
1.7	10.7 ± 0.5 d	16.2 ± 3.6 c	13.6 ± 1.5 d	1.7	20.6 ± 5.5 b	16.6 ± 1.5 cd	14.7 ± 2.4 c	6.5	15.2 ± 5.6 c	10.0 ± 1.0 c	11.6 ± 1.5 c
4	3.2 ± 0.5 e	8.0 ± 4.1 d	10.3 ± 0.6 e	4	18.0 ± 4.4 bc	13.0 ± 2.0 d	11.5 ± 0.6 cd	20	5.7 ± 1.5 d	0±0	10.0 ± 0.0 c
				9	12.6 ± 5.5 c	7.3 ± 1.5 e	7.5 ± 2.1 d	60	0±0	0±0	2.6 ± 1.2 d
				20	3.3 ± 2.1 d	2.3 ± 0.6 f	3.0 ± 1.8 e				

Cry1Fa N507A(1.4)[†] ± EE^a			
Conc.	Valle del Fuerte	Laguna	Susceptible
Testigo	30.3 ± 1.5 a	30.5 ± 1.3 a	29.7 ± 1.0 a
0.7	19.0 ± 1.0 b	16.2 ± 3.9 b	19.0 ± 1.2 b
1.5	16.0 ± 1.7 b	11.2 ± 2.5 c	16.7 ± 1.5 b
4	6.3 ± 1.5 c	5.5 ± 2.1 d	5.5 ± 0.6 c
10	1 ± 0.0 d	3.5 ± 1.3 d	0±0

Conc. Concentración de la proteína. EE: Error Estándar de la media. ^a: Valores con diferentes letras dentro de cada columna son significativamente diferentes a través de la comparación de medias con Tukey 0.05. [†] Concentración original en mg mL. ¹. [•] Proteína nativa o silvestre.

Cuadro 9. Larvas de *S. frugiperda* expuestas a diferentes concentraciones (ng·cm⁻²) de la proteína Vip3Aa de *B. thuringiensis* y alcanzaron el tercero y cuarto instar.

Vip3Aa• (0.27)[†] ± EE^a			
Conc.	Valle del Fuerte	Laguna	Susceptible
Testigo	28.2 ± 1.3 a	28.0 ± 1.4 a	31.0 ± 1.7 a
0.4	20.7 ± 2.5 b	21.5 ± 3.3 b	24.3 ± 3.1 b
1	14.2 ± 1.7 c	15.7 ± 3.3 c	21.6 ± 2.1 b
2.1	10.0 ± 1.6 d	8.7 ± 1.3 d	8.6 ± 1.2 c
5	1.7 ± 0.5 e	1.7 ± 0.5 e	3.3 ± 1.5 d
10	0.7 ± 0.5 e	0±0	1.0 ± 0.0 d

Conc. Concentración de la proteína. EE: Error Estándar de la media. ^a: Valores con diferentes letras dentro de cada columna son significativamente diferentes a través de la comparación de medias con Tukey 0.05. [†] Concentración original en mg mL. ¹. [•] Proteína nativa o silvestre.

Cuadro 10. Líneas base sobre inhibición de peso en poblaciones de *S. frugiperda* recolectadas en el Valle del Fuerte, Sinaloa; La Laguna, Coahuila, por efecto de exposición a las proteínas nativas y modificadas Cry1Ab (CE, ng·cm⁻²) de *B. thuringiensis*.

Proteína	Población	N	CE50 (IC 95%)a	CE90 (IC 95%)a
Cry1Ab•	Valle del Fuerte	1152	1.82(1.36-2.27)ab	27.72(11.94-43.50)a
	Laguna	864	3.16(2.55-3.76)b	41.54(23.32-59.66)a
	Susceptible	1152	1.28(1.11-1.45)a	52.31(38.00-66.62)a
Cry1Ab ER	Valle del Fuerte	1152	1.94(1.12-2.75)b	69.00(3.50-134.5)a
	Laguna	1152	1.69(1.01-1.32)b	16.70(11.82-21.58)a
	Susceptible	864	0.65 (0.56-0.74a)	24.42(19.97-34.8)a
Cry1Ab N514A	Valle del Fuerte	1024	1.25(0.90-1.59)a	27.74(15.57-37.92)a
	Laguna	1024	2.02(1.57-2.47)ab	26.28(16.01-36.55)a
	Susceptible	1024	2.94(2.79-3.09)b	22.77(20.36-25.18)a
Cry1Ab N514A-S587A	Valle del Fuerte	1024	0.93(0.74-1.12)a	48.9(27.6-70.35)a
	Laguna	1024	2.0(1.59-2.4)b	42.6(22.28-63.05)a
	Susceptible	1024	0.82(0.70-0.95)a	44.4(30.8-58.0)a
Cry1Ab N514F	Valle del Fuerte	768	1.02(0.61-1.43)a	29.4(8.19-50.61)a
	Laguna	1024	2.87(2.52-3.21)b	18.25(11.82-24.67)a
	Susceptible	768	1.26(0.90-1.63)ab	23.79(10.07-35.51)a
Cry1Ab N514F-S587A	Valle del Fuerte	768	1.41(1.30-1.52)ab	29.54(21.16-34.93)a
	Laguna	1024	1.16(0.89-1.44)a	37.81(17.46-58.16)a
	Susceptible	1024	3.14(2.80-3.48)b	28.74(21.35-35.60)a
Cry1Ab Mod-1	Valle del Fuerte	1024	3.99(2.92-5.07)a	69.45(26.30-112.6)a
	Laguna	1024	4.13(3.36-4.89)a	39.04(22.41-55.67)a
	Susceptible	768	3.52(2.47-4.57)a	89.51(28.1-150.9)a
Cry1Ab Mod-2	Valle del Fuerte	1152	2.44(1.79-3.09)b	27.68(11.21-44.15)a
	Laguna	864	3.08(2.31-3.85)b	40.97(17.58-64.37)a
	Susceptible	864	0.68(0.45-0.91)a	100.5(27.41-173.5)a
Cry1Ab S587A	Valle del Fuerte	768	1.60(1.39-1.80)b	15.99(11.55-20.43)a
	Laguna	1024	1.05(0.92-1.19)a	21.85(16.11-27.58)a
	Susceptible	1024	1.44(1.29-1.59)b	16.61(12.79-20.44)a
Cry1Ab T585A	Valle del Fuerte	768	1.39(0.84-1.95)a	18.32(2.25-34.39)a
	Laguna	1024	1.04(0.77-1.53)a	34.84(16.92-52.76)a
	Susceptible	1024	3.51(3.02-4.01)b	39.54(26.28-52.80)a
Cry1Ab Wt	Valle del Fuerte	1024	1.08(0.96-1.20)a	12.16(9.49-14.84)a
	Laguna	1024	2.72(2.29-3.14)b	23.30(15.20-31.39)a
	Susceptible	768	1.52(1.06-1.98)ab	13.82(4.74-22.90)a

n Número de individuos tratados. CE₅₀: Concentración de las proteínas (ng·cm⁻²) que inhibe el 50% del crecimiento de las larvas en un periodo de siete días. CE₉₀: Concentración de las proteínas (ng·cm⁻²) que inhibe el 90% del crecimiento de las larvas en un periodo de siete días. ^aLímites de confianza al 95% de probabilidad. Valores con diferentes letras dentro de cada columna son significativamente diferentes a través del no traslape de los límites de confianza. • Proteína nativa o silvestre.

Cuadro 11. Líneas base sobre inhibición de peso en poblaciones de *S. frugiperda* recolectadas en el Valle del Fuerte, Sinaloa; Laguna, Coahuila, por efecto de exposición a las proteínas nativas Cry1C (CE, ng·cm⁻²) de *B. thuringiensis*.

Proteína	Población	n	CE50 (IC 95%)a	CE90 (IC 95%)a
Cry1C-1•	Valle del Fuerte	1152	7.07(5.60-8.53)ab	221.9(118.7-325.1)a
	Laguna	1152	10.82(7.77-13.86)b	464(162.3-767.4)a
	Susceptible	1152	5.63(4.19-7.07)a	366.7(153.4-580.0)a
Cry1C-2•	Valle del Fuerte	1024	0.79(0.60-0.99)a	293.0(129.1-457.0)a
	Laguna	1024	1.32(1.09-1.56)b	116.2(68.07-164.3)a
	Susceptible	1024	4.07(3.41-4.72)c	394.6(240.7-548.4)a

n Número de individuos tratados. CE₅₀: Concentración de las proteínas (ng·cm⁻²) que inhibe el 50% del crecimiento de las larvas en un periodo de siete días. CE₉₀: Concentración de las proteínas (ng·cm⁻²) que inhibe el 90% del crecimiento de las larvas en un periodo de siete días. ^aLímites de confianza al 95% de probabilidad. Valores con diferentes letras dentro de cada columna son significativamente diferentes a través del no traslape de los límites de confianza. • Proteína nativa o silvestre.

Cuadro 12. Líneas base sobre inhibición de peso en poblaciones de *S. frugiperda* recolectadas en el Valle del Fuerte, Sinaloa; Laguna, Coahuila, por efecto de exposición a las proteínas nativas y modificadas Cry1Fa (CE, ng·cm⁻²) de *B. thuringiensis*.

Proteína	Población	n	CE50 (IC 95%)a	CE90 (IC 95%)a
Cry1Fa•	Valle del Fuerte	1152	0.33(0.30-0.37)a	2.76(2.25-3.28)a
	Laguna	1152	1.01(0.82-1.19)c	16.56(9.48-23.63)b
	Susceptible	864	0.59(0.46-0.73)b	27.11(14.92-39.30)b
Cry1Fa DK	Valle del Fuerte	864	2.95(2.13-3.76)b	42.93(15.84-70.02)a
	Laguna	864	2.07(1.74-2.40)b	20.83(13.52-28.14)a
	Susceptible	1152	1.07(0.92-1.23)a	18.20(12.22-24.18)a
Cry1Fa ER	Valle del Fuerte	1152	2.06(1.43-2.69)a	22.82(6.79-38.85)a
	Laguna	864	1.66(1.38-1.94)a	11.55(6.96-16.1)a
	Susceptible	864	1.34(1.10-1.58)a	45.08(27.85-62.31)b
Cry1Fa N507A	Valle del Fuerte	768	0.94(0.86-1.03)a	9.62(7.77-11.48)a
	Laguna	1024	0.88(0.32-1.31)a	8.50(2.11-14.89)a
	Susceptible	1024	1.02(0.95-1.09)a	7.42(6.27-8.56)a

n Número de individuos tratados. CE₅₀: Concentración de las proteínas (ng·cm⁻²) que inhibe el 50% del crecimiento de las larvas en un periodo de siete días. CE₉₀: Concentración de las proteínas (ng·cm⁻²) que inhibe el 90% del crecimiento de las larvas en un periodo de siete días. ^aLímites de confianza al 95% de probabilidad. Valores con diferentes letras dentro de cada columna son significativamente diferentes a través del no traslape de los límites de confianza. • Proteína nativa o silvestre.

Cuadro 13. Líneas base sobre inhibición de peso en poblaciones de *S. frugiperda* recolectadas en el Valle del Fuerte, Sinaloa; Laguna, Coahuila, por efecto de exposición a la proteína Vip3Aa (CE, ng·cm⁻²) de *B. thuringiensis*.

Proteína	Población	N	CE50 (IC 95%)a	CE90 (IC 95%)a
Vip3Aa•	Valle del Fuerte	896	0.74(0.60-0.88)a	5.75(3.41-8.09)a
	Laguna	896	1.19(0.84-1.53)a	19.32(9.06-29.57)b
	Susceptible	672	1.02(0.84-1.20)a	10.75(6.51-14.90)b

n Número de individuos tratados. CE₅₀: Concentración de las proteínas (ng·cm⁻²) que inhibe el 50% del crecimiento de las larvas en un periodo de siete días. CE₉₀: Concentración de las proteínas (ng·cm⁻²) que inhibe el 90% del crecimiento de las larvas en un periodo de siete días. ^aLímites de confianza al 95% de probabilidad. Valores con diferentes letras dentro de cada columna son significativamente diferentes a través del no traslape de los límites de confianza. • Proteína nativa o silvestre.

Cuadro 14. Mortalidad de *S. frugiperda* expuesta a la proteína Cry9Aa• (0.20)[†] de *B. thuringiensis*.

Concentración ng·cm⁻²	N	No. Muertos	% de Mortalidad
Testigo	64	0	0
1	64	5	7.8
10	64	5	7.8
100	64	6	9.4
1000	64	8	12.5
5000	64	8	12.5

N tratados. [†] Concentración original en mg·mL⁻¹. • Proteína nativa o silvestre.

Cuadro 15. Mortalidad de *S. frugiperda* expuestas a las proteínas Cry1C modificadas de *B. thuringiensis*.

Proteína	n	Testigo	Concentración (ng·cm²)				
			1	10	100	1000	5000
Cry1C L507A (1.85) [†]	64	0	4	7	23	35	57
Cry1C N510A (2.26) [†]	64	0	2	5	22	43	53
Cry1C Q508A (2.78) [†]	64	0	7	7	17	49	59
Cry1C V505A (3.09) [†]	64	0	5	8	18	45	61
Cry1C V509A (1.83) [†]	64	0	3	9	15	46	58

n tratados. [†] Concentración original en mg·mL⁻¹

1.6. LITERATURA CITADA

- Abbott, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18: 265-267.
- Aguilar-Medel, S., Rodríguez, J.C., Martínez- Carrillo, J. L. y Silva-Aguayo, G. 2017. Susceptibilities of Geographic Populations of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in Mexico to Bt δ -Endotoxins Cry1Ac and Cry2Ab: An 18-Yr Study. J. Econ. Entomol. 110 (5): 2207–2216.
- Al-Sarar, A., F. R. Hall y R. A. Downer. 2006. Impact of spray application methodology on the development of resistance to cypermethrin and spinosad by fall armyworm *S. frugiperda* (J.E.Smith). Pest Manag. Sci. 6-2:1023-1031.
- Avisar, D., Eilenberg, H., Keller, M., Reznik, N., Segal, M. y Sneh, B. 2009. *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1C as a potential bioinsecticide in plants. Plant Science. 176: 315-324.
- Bergamasco, V.B., Mendes, D.R.P., Fernandes, O.A., Desiderio, J. A. y Lemos, M. V. F. 2013. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ia10 and Vip3Aa protein interactions and their toxicity in *Spodoptera spp.* (Lepidoptera). Journal of Invertebrate Pathology. 11-2: 15-2-158.
- Blanco, A. C., Portilla, M. Jurat-Fuentes, J. L., Sánchez, F. J., Viteri, D. Vega-Aquino, P. Terán-Vargas, P. A., Azuara-Domínguez, A. López, Jr. D. J. Arias, Reneé, Yu-Cheng, Z. Lugo-Barrera, D. y R. Jackson. 2010. Susceptibility of isofamilies of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to Cr1Ac and Cry1Fa Proteins of *Bacillus thuringiensis*. Southwestern Entomologist. 35(3): 409-415.
- Bravo, A., S. S. Gill y M. Soberon. 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. Toxicon. 49(4): 423-435.
- Buntin, G. D. 2008. Corn expressing Cry1Ab or Cry1F endotoxin for fall armyworm and corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae) management in field corn for grain production. Fla. Entomol. 91: 523-530.
- Casmuz, A., Juárez, M. L., Socías, M. G., Murúa, M. G., Prieto, S., Medina, S., Willink, E y G. Gastaminza. 2010. Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Revista de la Sociedad Entomológica Argentina 69: 209–231.

- CTNBio. 2010. Technical Opinion No. 254-2/2010 - Commercial Release of Genetically Modified Insect-Resistant and Herbicide-Tolerant Soy Containing Genetically Modified Events MON 87701 and MON 89788. Brazil: Ministério Da Ciência, Tecnologia E Inovação. [Consultada: 5 de Junio de 2018].
- Da Silva, F. K., Spencer, A. T., Crespo, L. B. A. y D. B. Siegfried. 2016. Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) field populations to the Cry1F *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein. Fla. Entomol. 99(4): 629-633.
- Del Toro, L. G. y A. P. Bravo. 2010. Caracterización del espectro de acción de la toxina Cry1AbMod, activa contra insectos resistentes, y su comparación con la toxina convencional Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis*. Tesis. Facultad de Ciencias de la UNAM. Pp. 63.
- Dhurua, S. y Gujar, G. T. 2011. Field-evolved resistance to Bt toxin Cry1Ac in the pink bollworm, *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera: Gelechiidae), from India. Pest Manag Sci 67: 898–903.
- EPA. 2014. Biopesticides Registration Action Document: Plant-Incorporated Protectants: *Bacillus Thuringiensis* Cry1Ac Protein and the Genetic Material Necessary for its Production [Pc Code 006527] and *Bacillus Thuringiensis*Cry1F Protein and the Genetic Material Necessary for its Production [Pc Code 006528] as Expressed in Event Das-81419--2 Soybean (Pip Product). Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency. https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/pip/bt_brad.htm. [Consultada: 5 de Junio de 2018]
- Erasmus, A. y J. Van den Berg. 2014. Effect of Bt-maize expressing Cry1Ab toxin on non-target Coleoptera and Lepidoptera pests of maize in South Africa. African Entomology. 2-2(1):167-179.
- Farias, J. R., E. C. Costa, J. V. C. Guedes, A. P. Arbage, A. B. Neto, M. Bigolin, y F. F. Pinto. 2013. Managing the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*, and corn earworm, *Helicoverpa zea*, using Bt corn and insecticide treatments. J. Insect Sci. 13: 1-10.
- Farias, J. R., Horikoshi, R. J., Santos, A. C. y C. Omoto. 2014. Geographical and Temporal Variability in Susceptibility to Cry1F Toxin from *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Populations in Brazil. J. Econ. Entomol 107(6): 218-2-2189.

- Flores, M., Hernández-Juárez, A., Aguirre, L. A. Cerna, E., Landeros, J. Frías, G. A. y Ochoa, Y. 2016. Susceptibility of Genetically Modified Maize Hybrids to Sugarcane Borer, *Diatraea saccharalis* (F.), at Sinaloa, México. Southwest. Entomol. 41 (4): 991-998.
- García-Gutiérrez, C., González-Maldonado, M. B y E. Cortez-Mondaca. 201-2. Uso de enemigos naturales y biorracionales para el control de plagas de maíz. Ra Ximhai 8: 57–70.
- Gassmann, A. J., Petzold-Maxwell, J. L., Keweshan, R. S. y Dunbar, M. W. 2011. Field-evolved resistance to Bt maize by western corn rootworm. PLoS ONE 6: e22629.
- Georghiou, G. P. y A. Lagunes-Tejeda. 1991. The occurrence of resistance to pesticides in arthropods. Food and Agriculture Organization (FAO). AGPP/MISC/91-1. pp. 317.
- Germain, J. F., Georg, G., Reynaud, P. y Silvia, P. 2018. Un noctuido Americano invade África. Cereales Transferencia Tecnológica. Phytoma España No. 297. 57-61
- Glare, T. R. y M. O'Callaghan. 2000. *Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety. John Wiley y sons, LTD. New York. p. 350.
- Hernández-Martínez, P. Ferre, J. y Escriche, B. 2008. Susceptibility of *Spodoptera exigua* to 9 toxins from *Bacillus thuringiensis*. J. Invertebr. Pathol. 97: 245-250.
- Hernández-Martínez, P., Hernández-Rodríguez, C. S., Van, R. J., Escriche, B. y Ferre, J. 2013. Insecticidal activity of Vip3Aa, Vip3Ad, Vip3Ae, and Vip3Af from *Bacillus thuringiensis* against lepidopteran corn pests. J. Invertebr. Pathol. 113: 78-81.
- Herrero, S., Bel, Y., Hernandez-Martinez, P. y Ferré, J, 2016. Susceptibility, mechanisms of response and resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Spodoptera spp.* Current Opinion in Insect Science. 15; 89-96.
- ISAAA. 2018. International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications-GM Approval Database. Available at: <https://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/default.asp> (acceso Abril, 2018).
- Jakka, S. R. K., Knight. V. R. y Jurat-Fuentes, J. L. 2014. *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) with field-evolved resistance to Bt maize are susceptible to Bt pesticides. J. Invertebr. Pathol.; 12-2: 5-2–54.
- Keller, M., Sneh, B., Strizhov, N., Prudovsky, E., Regev, A., Koncz, C., Schell, J. y Zilberstein, A. 1996. Digestion of delta-endotoxin by gut proteases may explain reduced sensitivity of advanced instar larvae of *Spodoptera littoralis* to Cry1C. Insect Biochem. Mol. Biol. 26: 365–373.

- Lee, I. H.; Je, Y. H.; Chang, J. H.; Roh, J. Y., OH, H. W., Lee, S. G. Shin, S.C. y Boo, K. S. 2001. Isolation and characterization of a *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* strain toxic to *Spodoptera exigua* and *Culex pipiens*. *Current. Microbiol.* 43: 284-287.
- Malik, K., Riazuddin, S.A. y Riazuddin, S. 2006. Identification, purification, cloning and expression of a novel receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1a deltaendotoxins in the Brush Border Membranes of the *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pak. J. Bot.* 38 (3), 767–778.
- Monnerat, R., Martins, E., Macedo, C., Queiroz, P., Praça, L., Soares, M., Moreira, H., Grisi, I., Silva, J., Soberon, M y Bravo, A. 2015. Evidence of Field-Evolved Resistance of *Spodoptera frugiperda* to Bt Corn Expressing Cry1F in Brazil That Is Still Sensitive to Modified Bt Toxins. *PLoS ONE.* 10(4): 1-1-2.
- Murúa, G., J. Molina-Ochoa y C. Coviella. 2006. Population dynamics of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and its parasitoids in northwestern Argentina. *Fla. Entomol.* 89: 175-18-2.
- Nagoshi, R. D., and R. L. Meagher. 2004. Behavior and distribution of the two fall armyworm host strains in Florida. *Fla. Entomol.* 87: 440-448.
- NCBI (Nacional Center for Biotechnology Information). 2018. Rockville Pike. Bethesda, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/>. [Consultada: Junio 2018]
- Niu, Y., Meagher Jr, R. L, Yang, F. y Huang F. 2013. Susceptibility of field populations of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) from Florida and Puerto Rico to purified Cry1F and corn leaf tissue containing single and pyramided *Bt* genes. *Fla Entomol.* 96: 701–713.
- Pietrantonio, P.V., T. A. Junek, R. Parker, D. Mott, K. Sider, N. Troxclair, J. Vargas-Camplis, J. K. Westbrook y V. A. Vassiliou. 2007. Detection and evolution of resistance to the pyrethroid cypermethrin in *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Texas. *Environ. Entomol.* 36: 1174-1188.
- Ríos-Díez, J. D., Siegfried, B. y C. I. Saldamando-Benjumea. 201-2. Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Strains from Central Colombia to Cry1Ab and Cry1Ac Endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. *Southwestern Entomologist.* 37(3). 281-293.

- Rodríguez, D. L. A y A. J. Marín. 2008. Insectos plaga y su control, pp. 29–46 *In* Rodríguez, M. R, De León, C. [eds.], El cultivo del maíz. Temas selectos 1. Colegio de postgraduados, Mundi Prensa, México.
- Robertson, J. L., and H. K. Preisler. 199-2. Pesticide bioassays with arthropods. CRC, Boca Raton, FL.
- Rodríguez, D. L. A y A. J. Marín. 2008. Insectos plaga y su control, pp. 29–46 *In* Rodríguez, M. R, De León, C. [eds.], El cultivo del maíz. Temas selectos 1. Colegio de Postgraduados, Mundi Prensa, México.
- Roh, J. R., Jae, Y, C., S. L. Ming., R. J. Byung y H. J. Yeon. 2007. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. *J. Microbiol. Biotechnol.* 14(4): 547-559.
- Rosas, G. N. M. 2009. Biopesticide Production from *Bacillus thuringiensis*: An Environmentally Friendly Alternative. *Recerit Patents on Biotechnology*. Vol. 3 No 1.
- SAS Institute Inc., 201-2-2016. SAS/STAT: Statistical Analysis System: Studio University Edition 9.4. SAS Institute Inc., Cary, NC. USA.
- Sena, J.A.D., Hernández-Rodríguez, C.S., Ferre, J., 2009. Interaction of *Bacillus thuringiensis* Cry1 and Vip3A proteins with *Spodoptera frugiperda* midgut binding sites. *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (7), 2236–2237.
- Shelton, A. M y Zhao, J. 2009. Resistance management to transgenic insecticidal plants, pp. 247–259 *In* Radcliffe EB, Hutchison WD, RE [eds.], *Integrated Pest Management: Concepts, Tactics, Strategies and Case Studies*. Cambridge University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Soberón, M., L. Pardo-López., I. López., I. Gómez., B. E. Tabashnik y A. Bravo. 2007. Engineering modified Bt toxins to counter insect resistance. *Science*. 318(5856): 1640-164-2.
- Storer N. P., Babcock, J. M., Schlenz. M., Meade, T., Thompson, G. D., Bing, J. W. y R. M. Huckaba. 2010. Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. *Journal of Economic Entomology* 103: 1031–1038.

- Swiecicka, I y Mahillon, J. 2005. The clonal structure of *Bacillus thuringiensis* isolates from north-east Poland does not correlate with their cry gene diversity. *Environ Microbiol* 7:34–39
- Tabashnik, B. E., Finson, N., Johnson, M. W. y Heckel, D. G. 1994. Cross-resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin CryIF in the diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Appl Environ Microbiol* 60: 4627–4629.
- Tabashnik, B. E., Huang, F., Ghimire, N. M., Leonard, B. R., Siegfried, B. D., Rangasamy, M., Yang, Y., Wu, Y., Gahan, L. J., Heckel, D. G., Bravo, A. and Soberón, M. 2011. Efficacy of genetically modified *Bt* toxins against insects with different genetic mechanisms of resistance. *Nature Biotechnology*. 1-6.
- Tabashnik, B. E., Zhang, M., Fabrick, J. A. Wu, Y., Gao, M., Huang, F., Wei, J., Zhan, J. Yelich, A., Unnithan, G. C., Bravo, A., Soberón, M., Carrière, Y. y Li, X. 2015. Dual mode of action of Bt proteins: protoxin efficacy against resistant insects. *Science Reports*. 5: 1-10.
- Young-Joon, K., Si-Hyeock, L., Si-Woo, L y Young-Joon, A. 2004. Fenpyroximate resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae): cross-resistance and biochemical resistance mechanism. *Pest Manag. Sci.* 60: 1001-1006.
- Van Frankenhuyzen K. 2009. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *J. Invertebr. Pathol.* 101:1-16.
- Van Rensburg JBJ. First report of field resistance by stem borer, *Busseola fusca* (Fuller) to Bt-transgenic maize. *S African J Plant Soil.* 2007; 24: 147–151.
- Waquil, J.M., Villela, F.M., y Foster, J.E. 200-2. Resistencia do milho (*Zea mays* L.) transgênico a lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, 1: 1-11.
- Yu, S. J. 2008. *The Toxicology and Biochemistry of Insecticides*. CRC Press. Boca Florida. USA. pp. 1-296.
- Zhang, X., N. Griko., S. Corona y L. Jr. Bulla. 2008. Enhanced exocytosis of the receptor BT-R(1) induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis* directly correlates to the execution of cell death. *Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol.* 149: 581-588.
- Zhang, H., Yin, W., Zhao, J., Jin, L., Yang, Y., Wu, S., Tabashnik, B. E. y Wu, Y. 2011. Early warning of cotton bollworm resistance associated with intensive planting of Bt cotton in China. *PLoS ONE* 6: e22874.

CONCLUSIONES

Los valores más bajos de la CL_{50} que se registraron para la familia Cry1A, se observaron con la proteína Cry1Ab S587A, los cuales fueron de 27.8, 3-2.4 y 2-2.1 $ng \cdot cm^{-2}$ en Valle del Fuerte, La Laguna y Susceptible, respectivamente. Mientras que para la familia Cry1F, los valores bajos se presentaron con la proteína Cry1Fa, los cuales fueron de 7.6, 16.-2 y 15.4 $ng \cdot cm^{-2}$ para las mismas poblaciones. Las proteínas combinadas: Cry1Ab N514A-S587A y Cry1Ab N514F-S587A, no dan mejores resultados que si se aplican por sí solas. La proteína de la familia Cry1C, registró valores de CL_{50} superiores a 1025 $ng \cdot cm^{-2}$. Los valores de la CL_{95} para las tres familias: Cry1A, Cry1C y Cry1F, fueron elevados y a su vez difícil de comparar por la amplitud de sus límites de confianza, ya que los valores de la CL_{50} y CL_{95} están en función de la pendiente de la recta. Los porcentajes de mortalidad registrados en cada población por proteína se ajustaron a una línea recta. Los valores de RR_{50} y RR_{95} estimados entre las poblaciones de campo y la Susceptible, indican que las poblaciones de la Laguna y Valle del Fuerte no son resistentes a las proteínas de las tres familias: Cry1A, Cry1C y Cry1F y Vip3Aa.

ANEXOS

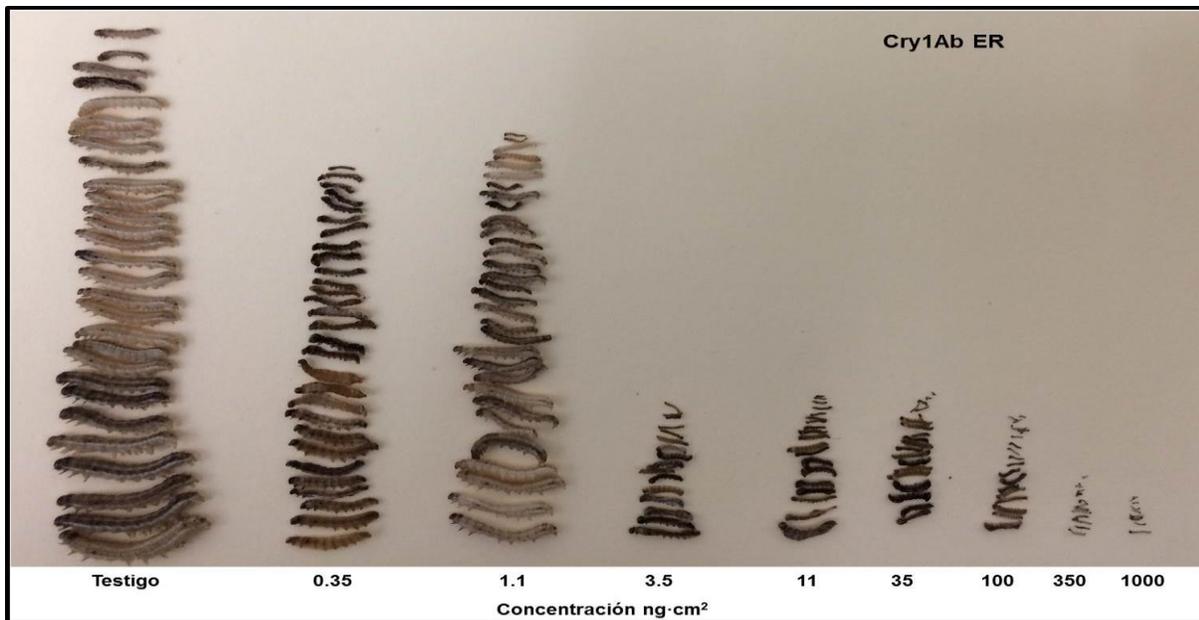


Figura 1. Bioensayo línea base de *S. frugiperda* con la proteína Cry1Ab ER. Representa a una sola repetición del bioensayo.

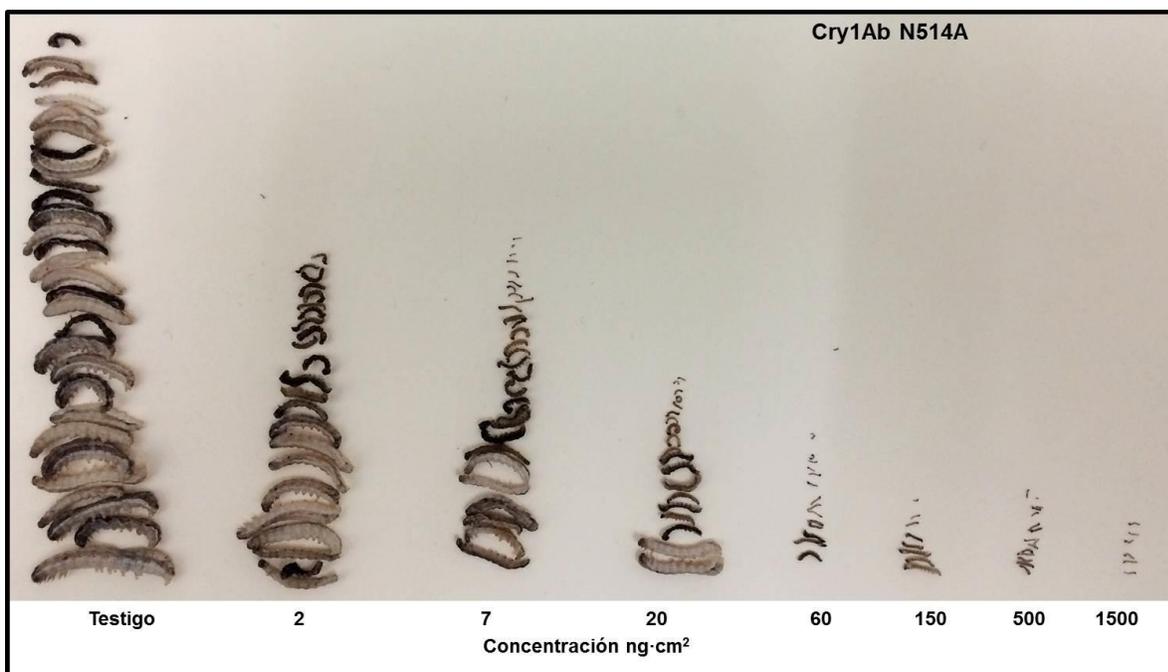


Figura 2. Bioensayo línea base de *S. frugiperda* con la proteína Cry1Ab N514A. Representa a una sola repetición del bioensayo.

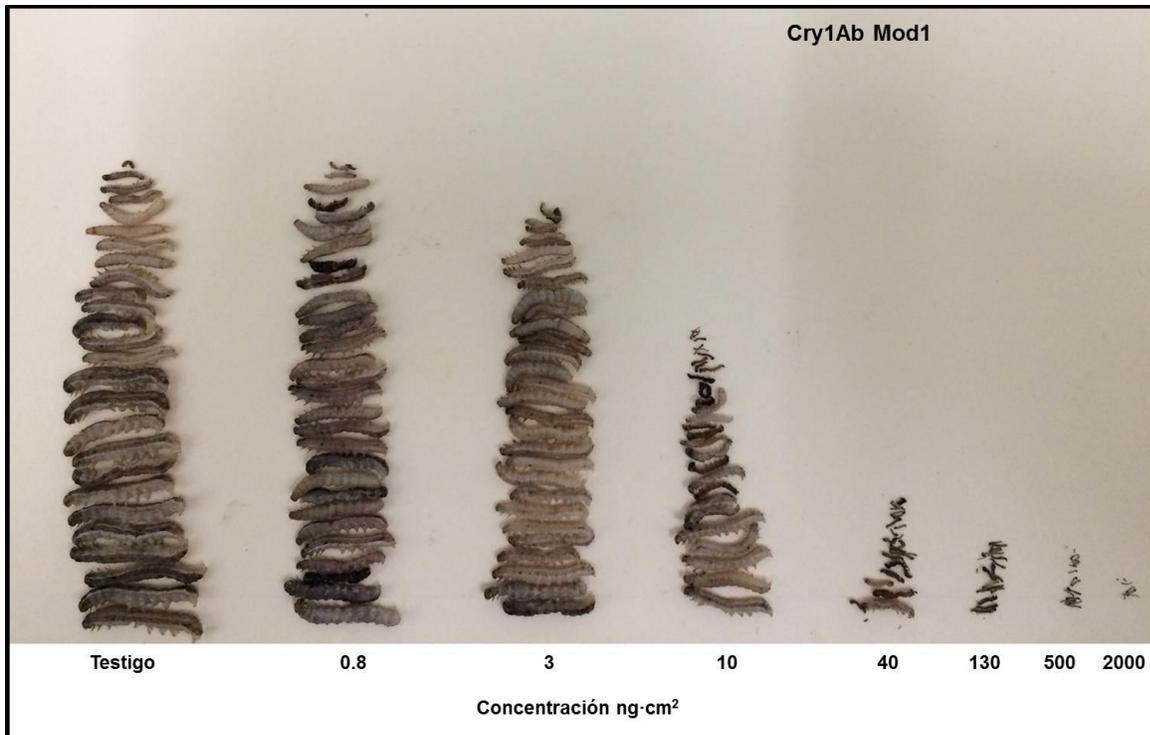


Figura 3. Bioensayo línea base de *S. frugiperda* con la proteína Cry1AbMod1. Representa a una sola repetición del bioensayo.

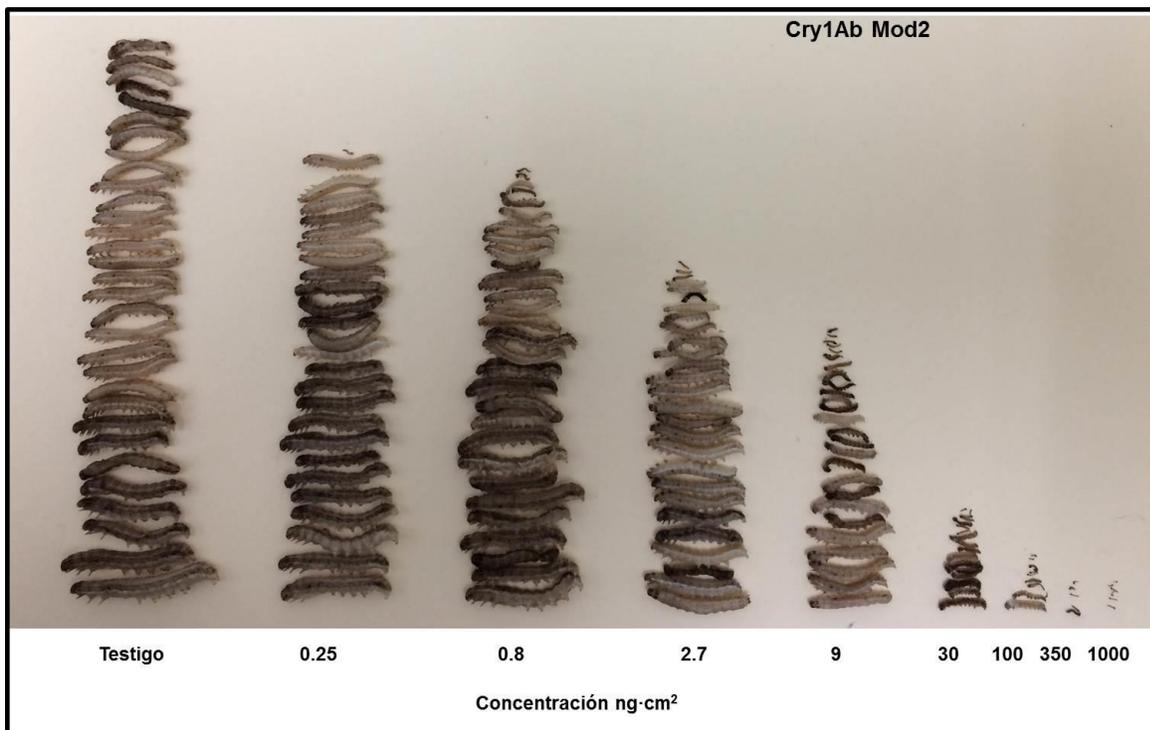


Figura 4. Bioensayo línea base de *S. frugiperda* con la proteína Cry1AbMod-2. Representa a una sola repetición del bioensayo.

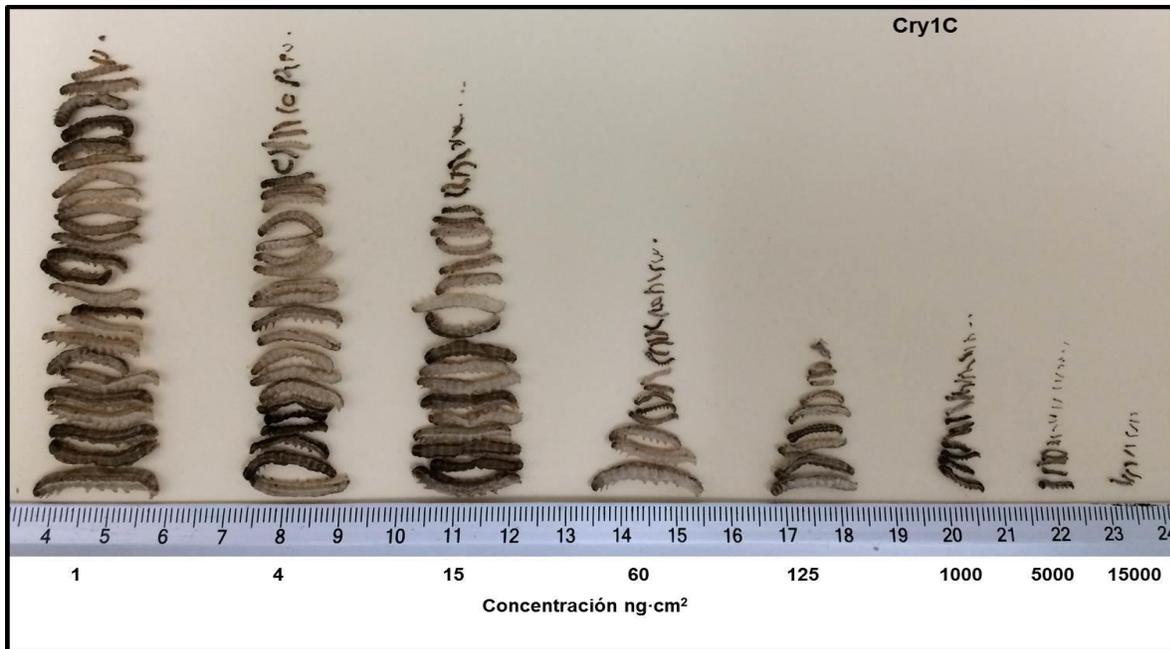


Figura 5. Bioensayo línea base de *S. frugiperda* con la proteína Cry1C. Representa a una sola repetición del bioensayo.

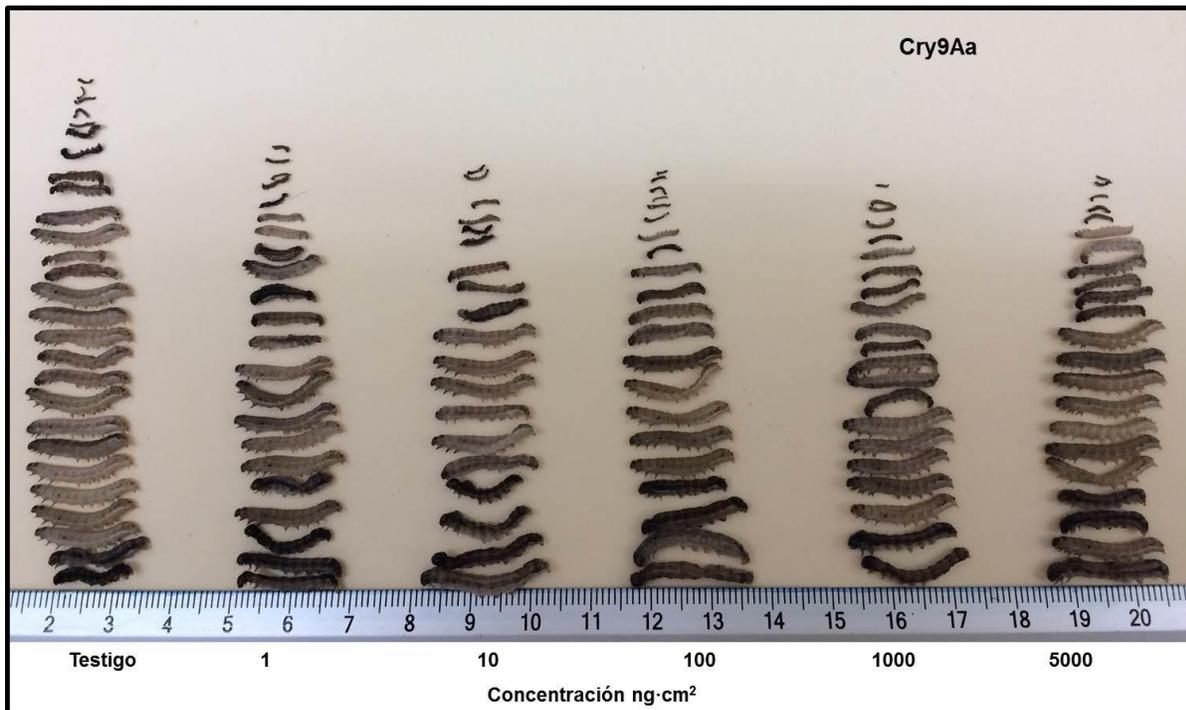


Figura 6. Bioensayo línea base de *S. frugiperda* con la proteína Cry9Aa. Representa a una sola repetición del bioensayo.

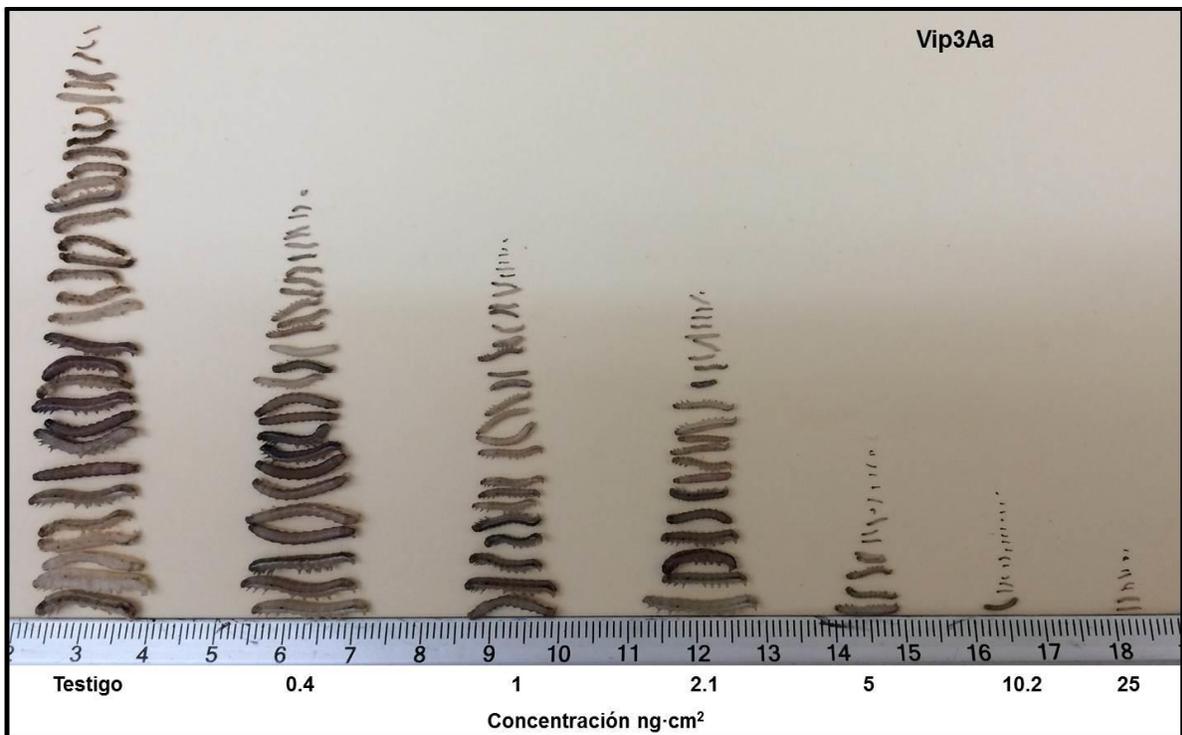


Figura 7. Bioensayo línea base de *S. frugiperda* con la proteína Vip3Aa. Representa a una sola repetición del bioensayo.