

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO



Centro Universitario Tenancingo



**EFFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN
Spodoptera frugiperda (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)**

ANAYELY ROSALES JUÁREZ

T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE**

INGENIERA AGRÓNOMA EN FLORICULTURA

DIRECTOR

DR. en C. SOTERO AGUILAR MEDEL

ASESORES

DR. en C. JAIME MEJÍA CARRANZA

DRA. en C. MARTHA ELENA MORA HERRERA

TENANCINGO, ESTADO DE MÉXICO, ABRIL DE 2015.

Tenanancingo, Estado de México a 5 de marzo de 2015.

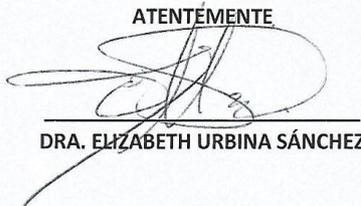
P.L.R.E.I. ELIZABETH ESTEFANIA BRITO GARCÍA
ENCARGADA DEL DEPARTAMENTO DE EVALUACIÓN
PROFESIONAL DEL CENTRO UNIVERSITARIO UAEM TENANCINGO

PRESENTE:

Por medio de la presente me dirijo a Usted para comunicarle en relación a la revisión de la tesis titulada "Efectos subletales de *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) en gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) y gusano elotero *Helicoverpa zea* (BODDIE)"., de la alumna **Anayely Rosales Juárez** con número de cuenta **0825421**; que el dictamen fue aprobado con comentarios: La tesis presenta un título muy largo y le falta considerar algunos aspectos evaluados, el índice esta mal estructurado y no presenta niveles, ni número de páginas, presenta citas de 1917, 1928, 1923, 1927 etc. Como si ella las hubiera consultado, presenta algunos errores ortográficos y de sintaxis. En el escrito se dan algunas recomendaciones

Sin más por el momento me despido de Usted enviándole un cordial saludo.

ATENAMENTE



DRA. ELIZABETH URBINA SÁNCHEZ

Tenancingo, México a 09 de marzo de 2015

P.L.R.E.I. ELIZABETH ESTEFANIA BRITO GARCÍA
ENCARGADA DEL DEPARTAMENTO DE EVALUACIÓN PROFESIONAL
CENTRO UNIVERSITARIO UAEM TENANCINGO
P R E S E N T E:

Por este conducto remito a usted el dictamen del trabajo de tesis titulado "**Efectos subletales de *Bacillus thuringiensis* Berliner en gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) y gusano elotero *Helicoverpa zea* (Boddie)**" presentado por **Anayely Rosales Juárez**.

Dictamen: **Aprobado con comentarios.**

Sugerencias.

1. Checar que la bibliografía citada en el texto, esta se encuentre completa en lista de literatura citada. Y que esté acorde al sistema elegido.
2. Corregir las abreviaturas del Sistema Internacional de Unidades de Medidas.
3. Considerar las correcciones indicadas en el texto entregado.

Sin otro particular, quedo a sus órdenes.

ATENTAMENTE



DR. RÓMULO GARCÍA VELASCO
PROFESOR INVESTIGADOR DEL
CENTRO UNIVERSITARIO UAEM TENANCINGO.

C.c.p. Dra. Luz María Robles Hernández. Subdirectora Académico.
C.c.p. Archivo

Tenancingo, Estado de México; 17 de Marzo de 2015.

C. ANAYELY ROSALES JUÁREZ
PASANTE DE LA LICENCIATURA

PRESENTE

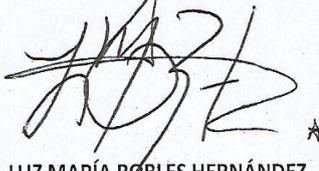
Por este conducto comunico a Usted, que con base en el Reglamento de Facultades y Escuelas Profesionales de la UAEM que en su Capítulo VIII artículo 120, 121 y 122, así como el Reglamento de Opciones de Evaluación Profesional de la UAEM Capítulo I artículo 6º, puede proceder a realizar la elaboración en formato electrónico del trabajo de Tesis, "EFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* BERLINER EN *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)" y continuar con los trámites y requisitos requeridos para efecto de poder sustentar su examen profesional y obtener el título de **LICENCIADA EN INGENIERO AGRONOMO EN FLORICULTURA**.

Sin otro particular, quedo a sus apreciables órdenes.

Atentamente

PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO

"2015, Año del Bicentenario luctuoso de José María Morelos y Pavón"



DRA. LUZ MARÍA ROBLES HERNÁNDEZ
SUBDIRECTORA ACADÉMICA DEL CENTRO
UNIVERSITARIO UAEM TENANCINGO

c.c.p. Dra. Luz María Robles Hernández, Subdirectora Administrativa/VLR
c.c.p. Archivo EEGG/DEP

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 mis padres. Sergio Rosales[†] y Agustina Juárez. Gracias papá por haberme dado la vida, y aunque tú ahora no estás conmigo si no con dios, sé que me dejaste a mi ángel de la guarda aquí en la tierra. 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. Los amo y los amare por siempre.

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.

Al Dr en C. Sotero Aguilar. Gracias a Usted por haber creído en mí, por haberme impulsado a seguir con mi carrera profesional, porque gracias a eso no deserte. No hay palabras para agradecerle todo su apoyo.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Sotero Aguilar Medel, por confiar en mí, por la paciencia, el apoyo y tiempo dedicado en esta etapa de mi vida profesional, pero sobre todo por haber llegado como un ángel de la guarda.

A la Dra Martha Elena y el Dr Jaime por haber aceptado ser mis asesores de este proyecto de tesis, su aportación fue muy valiosa.

A mi amiga Maricela Esmeralda Flores Vázquez, que se convirtió en mi hermana, gracias por estar en las buenas y en las malas conmigo. Amigas como tu son pocas, TQM Princess.

A mis compañeras de licenciatura (2008-2013) que se han convertido en mis mejores amigas: Ime, Jan, Lizy, Nico, Lauris, Nay y Gloria quienes me alentaron a titularme y no me dejan sola en los momentos difíciles. Gracias también por haber hecho de este trayecto en la universidad una etapa hermosa. Las quiero.

A todos mis profesores por haberme guiado al éxito.

A mi novio Fede Millán, tú te has convertido en mi compañero y mi amigo, gracias por tu apoyo constante y amor en la culminación de esta etapa de mi vida, con tu comprensión y paciencia te has ganado mi amor y mi confianza. Honey!!!! Thank you. Don't forget that I love you.

RESUMEN

El gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) y el gusano elotero *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae) son plagas importantes en cultivos frutícolas, hortícolas, forestales y ornamentales; estas especies se controlan principalmente con insecticidas químicos de diferentes grupos toxicológicos. En la actualidad existen alternativas para el control de estas plagas, las cuales no afectan al medio ambiente, tal es el caso de la bacteria *Bacillus thuringiensis kurstaki* (Btk) que ha sido ampliamente usada para el control de varias especies de insectos lepidópteros. El objetivo de este trabajo fue evaluar en condiciones de laboratorio los efectos subletales de las proteínas Cry2Ab y Cry1Ac de *B. thuringiensis* en *S. frugiperda* y *H. zea* desde larvas recién nacidas (neonatas) hasta el estado adulto; y en el caso particular de gusano cogollero, se evaluaron los efectos subletales desde larvas neonatas de la primera generación (F_0) hasta larvas neonatas de la segunda generación (F_1).

Los bioensayos consistieron en alimentar con dieta contaminada de diferentes concentraciones de las toxinas Cry2Ab y Cry1Ac a larvas de gusano cogollero y gusano elotero. Las concentraciones de la toxina Cry2Ab usadas en gusano cogollero fueron: 0.001, 0.01, 0.1, 1, 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y un testigo absoluto; en el caso de la toxina Cry1Ac fueron: 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y un testigo absoluto. Para el gusano elotero, las concentraciones de las dos proteínas fueron: 0.001, 0.01, 0.1, 1, 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y un testigo absoluto. Los bioensayos se realizaron con base al diseño experimental de bloques completos al azar con tres repeticiones. Por otra parte, con la finalidad de reproducir los resultados de los primeros bioensayos a manera de confirmación, también se realizaron bioensayos con cada proteína donde sólo se evaluaron dos concentraciones (0.01 y 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y el testigo. En general, los resultados indicaron que la mortalidad de las larvas, pupas y adultos se incrementaron al aumentar las concentraciones de las proteínas, y el incremento también se dio a través del tiempo, se prolongó el tiempo del ciclo de vida de los insectos para alcanzar los estados de pupa y adulto; se redujo el peso de las larvas, pupas y adultos, también se redujo el número de individuos que se desarrollaron al

estado adulto de ambas especies. En los bioensayos con *S. frugiperda*, con la concentración de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de la Cry2Ab, a los 24 días se registró el 62.5% de mortalidad y con la Cry1Ac ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$), la mortalidad fue del 70%. Para Cry2Ab, sólo el 11.3% de las larvas se desarrollaron hasta el estado adulto, los cuales, se retrasaron 4.8 días respecto al testigo y su peso promedio fue de 12.5 mg menos que los adultos del testigo, mientras que con Cry1Ac sólo el 3.3% de las larvas se desarrollaron hasta el estado adulto, con 5.1 días de retraso respecto al testigo y el peso promedio de éstos adultos fueron 16.9 mg (37.5 mg menos que el testigo). En los bioensayos con gusano elotero *H. zea*, con la concentración de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de la Cry2Ab, que fue la concentración más alta para las dos toxinas, a los 27 días, la mortalidad fue del 87.1%, y con la Cry1Ac, la mortalidad fue del 90.8%. El porcentaje de larvas que se desarrollaron al estado adulto fue muy bajo, se prolongó el tiempo de su desarrollo y el peso fue muy bajo. Para la toxina Cry2Ab, en la concentración más alta $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, sólo el 1.3% de las larvas se desarrollaron hasta el estado adulto, los cuales, se retrasaron 9 días respecto al testigo y su peso promedio fue de 55.7 mg menos que los adultos del testigo, en el caso de la toxina Cry1Ac, en el testigo, el 62.0% de las larvas se desarrollaron al estado de pupa; de los cuales, el 56.7% alcanzaron el estado de adulto. Con la concentración de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, sólo el 2.7% de las larvas alcanzaron el estado de pupa (59.3% menos que el testigo) y 0% se desarrollaron al estado adulto. Al evaluar los efectos subletales de Bt en larvas *F1* de *S. frugiperda*, éstas mostraron el mismo comportamiento, ya que el porcentaje de mortalidad se incrementó al aumentar las concentraciones; por otra parte, también se prolongó el tiempo para alcanzar los estados de pupa, adulto, huevo y larvas neonatas de la *F1*, a medida que se incrementaron las concentraciones de las proteínas. El número de huevos y larvas de la *F1* disminuyeron al aumentar la concentración, tal es el caso de las larvas alimentadas con la concentración más alta de la proteína Cry2Ab, donde las hembras sólo ovipositaron en promedio 161 huevos-hembra⁻¹ y de ellos eclosionaron 117 larvas, mientras que en los testigos, las hembras ovipositaron 772 huevos-hembra⁻¹ en promedio y de ellos emergieron 766 larvas. Lo mismo ocurrió con larvas alimentadas con la concentración más alta de la proteína Cry1Ac, las hembras sólo ovipositaron en promedio 1.4 huevos, de los cuales no hubo emergencia de larvas y en los testigos las hembras ovipositaron en

**EFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN
Spodoptera frugiperda (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)**

promedio 629 huevos y emergieron 605 larvas. Los resultados de estas investigaciones indican que las diferentes concentraciones subletales de *B. thuringiensis* afectaron en diferente grado el desarrollo de cada uno de los estados biológicos de las especies estudiadas y que finalmente también contribuyen a reducir las densidades poblacionales del gusano cogollero y del gusano elotero.

Palabras clave: Gusano cogollero, gusano elotero, efecto subletal, *Bacillus thuringiensis*, control biológico.

INDICE

RESUMEN.....	i
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1. LITERATURA CITADA.....	3
II. ANTECEDENTES	6
2.1. GENERALIDADES DE GUSANO COGOLLERO <i>Spodoptera frugiperda</i> J. E. Smith.	6
2.1.1. Taxonomía	6
2.1.2. Biología	6
2.1.3. Origen y distribución	8
2.1.4. Hospederos.....	9
2.1.5. Daños.....	10
2.2. GENERALIDADES DE GUSANO ELOTERO <i>Helicoverpa zea</i> Boddie.	11
2.2.1. Taxonomía.	11
2.2.2. Biología	12
2.2.3. Origen y distribución	13
2.2.4. Hospederos.....	13
2.2.5. Daños.....	14
2.3. METODOS DE CONTROL.....	15
2.3.1. Control cultural.	15
2.3.2. Control Químico.	15
2.3.3. Control Biológico.	15
2.4. GENERALIDADES DE <i>Bacillus thuringiensis</i> Berliner	17
2.4.1. Mecanismo de acción.	17
2.4.2. Proteínas Cry de Bt tóxicas para insectos lepidópteros.	18
2.4.3. Productos comerciales (bioinsecticidas) a base de Bt.	21
2.4.4. Bioinsecticidas de primera generación.....	22
2.4.5. Bioinsecticidas de segunda generación.	23
2.4.6. Bioinsecticidas de tercera generación.....	23
2.4.7. Plantas transgénicas resistentes a insectos (plantas Bt).	24
2.5. EFECTOS SUBLETALES	25

**EFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN
Spodoptera frugiperda (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)**

2.6. LITERATURA CITADA.....	26
III. JUSTIFICACIÓN	42
IV. HIPÓTESIS.....	43
V. OBJETIVOS.....	44
5.1. Objetivo general.	44
5.2. Objetivos específicos.	44
VI. CAPITULO 1.- EFECTO SUBLETAL DE LAS PROTEÍNAS Cry2Ab Y Cry1Ac DE <i>Bacillus thuringiensis</i> BERLINER EN GUSANO COGOLLERO <i>Spodoptera frugiperda</i> J. E. Smith.	45
6.1. RESUMEN	45
6.2. INTRODUCCIÓN	46
6.3. MATERIALES Y MÉTODOS	48
6.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50
6.5. CONCLUSIONES.....	67
6.6. LITERATURA CITADA.....	68
VII. CAPITULO 2.- EFECTO SUBLETAL DE LAS PROTEÍNAS Cry2Ab Y Cry1Ac DE <i>Bacillus thuringiensis</i> BERLINER EN GUSANO ELOTERO <i>Helicoverpa zea</i> (BODDIE).	73
7.1. RESUMEN	73
7.2. INTRODUCCIÓN	74
7.3. MATERIALES Y MÉTODOS	75
7.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	77
7.5. CONCLUSIONES.....	95
7.6. LITERATURA CITADA.....	96
VII. CAPITULO 3.- EFECTO SUBLETAL DE LAS PROTEÍNAS Cry2Ab Y Cry1Ac DE <i>Bacillus thuringiensis</i> BERLINER EN GUSANO COGOLLERO <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. SMITH) EN LA F0 y F1.	101
8.1. RESUMEN	101
8.2. INTRODUCCIÓN	102
8.3. MATERIALES Y MÉTODOS	103
8.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	105
8.5. CONCLUSIONES.....	120
8.6. LITERATURA CITADA.....	120

IX. DISCUSIÓN GENERAL	124
X. CONCLUSIONES GENERALES.....	133
XI. RECOMENDACIÓN.....	136
XII. LITERATURA CITADA.....	137
XIII. ANEXOS	141
13.1. ANEXO 1. El XVI Congreso Internacional en Ciencias Agrícolas. Producción y protección de cultivos: Bajo un escenario de cambio climático.	141
13.1. ANEXO 2. El IV Congreso Latinoamericano de Aracnología y XLIX Congreso Nacional de Entomología de la SME.	149

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1.- Bioinsecticidas comerciales contra lepidópteros.....	21
CAPÍTULO 1	
1.- Porcentaje de mortalidad acumulada corregida a través del tiempo de larvas de <i>S. frugiperda</i> alimentadas con dieta contaminada con diferentes concentraciones de la proteína Cry2Ab de <i>B. thuringiensis</i>	50
2.- Efecto de diferentes concentraciones de la proteína Cry2Ab de <i>B. thuringiensis</i> en <i>S. frugiperda</i> sobre el tiempo de desarrollo (días) de larvas neonatas a pupa y adulto.....	52
3.- Peso promedio de larvas a los 3 y 12 días, peso de pupas y adultos de <i>S. frugiperda</i> alimentada con diferentes concentraciones de la proteína Cry2Ab de <i>B. thuringiensis</i>	52
4.- Porcentaje de mortalidad acumulada corregida a través del tiempo de larvas de <i>S. frugiperda</i> alimentadas con dieta contaminada con dos concentraciones de la proteína Cry2Ab de <i>B. thuringiensis</i>	54
5.- Efecto de dos concentraciones de la proteína Cry2Ab de <i>B. thuringiensis</i> en <i>S. frugiperda</i> sobre el tiempo de desarrollo (días) de larvas neonatas a pupa y adulto.....	55
6.- Peso promedio de larvas a los 3 y 12 días, peso de pupas y adultos de	

S. <i>frugiperda</i> alimentada con dos diferentes concentraciones de la proteína Cry2Ab de <i>B. thuringiensis</i>	55
Porcentaje de mortalidad acumulada corregida a través del tiempo de larvas de <i>S. frugiperda</i> alimentadas con dieta contaminada con diferentes concentraciones de la proteína Cry1Ac de <i>B. thuringiensis</i>	56
7.- Efecto de diferentes concentraciones de la proteína Cry1Ac de <i>B. thuringiensis</i> en <i>S. frugiperda</i> sobre el tiempo de desarrollo (días) de larvas neonatas a pupa y adulto.....	58
8.- Peso promedio de larvas a los 3 y 12 días, peso de pupas y adultos de <i>S. frugiperda</i> alimentada con diferentes concentraciones de la proteína Cry1Ac de <i>B. thuringiensis</i>	58
9.- Porcentaje de mortalidad acumulada corregida a través del tiempo de larvas de <i>S. frugiperda</i> alimentadas con dieta contaminada con dos concentraciones de la proteína Cry1Ac de <i>B. thuringiensis</i>	60
10.- Efecto de dos concentraciones de la proteína Cry1Ac de <i>B. thuringiensis</i> en <i>S. frugiperda</i> sobre el tiempo de desarrollo (días) de larvas neonatas a pupa y adulto.....	61
11.- Peso promedio de larvas a los 3 y 12 días, peso de pupas y adultos de <i>S. frugiperda</i> alimentada con dos diferentes concentraciones de la proteína Cry1Ac de <i>B. thuringiensis</i>	61
12.-	

CAPÍTULO 2

1.- Porcentaje de mortalidad acumulada corregida a través del tiempo de larvas de <i>H. zea</i> alimentadas con dieta contaminada con diferentes concentraciones de la proteína Cry2Ab de <i>B. thuringiensis</i>	78
2.- Efecto de diferentes concentraciones de la proteína Cry2Ab de <i>B. thuringiensis</i> en <i>H. zea</i> sobre el tiempo de desarrollo (días) de las larvas neonatas a pupa y adulto.....	80
3.- Peso promedio de larvas a los 3 y 12 días, peso de pupas y adultos de <i>H. zea</i> alimentada con diferentes concentraciones de la proteína Cry2Ab de <i>B. thuringiensis</i>	81
4.- Porcentaje de mortalidad acumulada corregida de <i>H. zea</i> alimentadas con dieta contaminada con dos concentraciones 0.01 µg mL ⁻¹ y 1 µg mL ⁻¹	

**EFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN
Spodoptera frugiperda (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)**

1	de la proteína Cry2Ab de <i>B. thuringiensis</i>	82
5.-	Efecto de dos concentraciones de la proteína Cry2Ab de <i>B. thuringiensis</i> en <i>H. zea</i> sobre el tiempo de desarrollo (días) de las larvas neonatas a pupa y adulto.....	83
6.-	Peso promedio de larvas a los 3 y 12 días, peso de pupas y adultos de <i>H. zea</i> alimentada con dos concentraciones de la proteína Cry2Ab de <i>B. thuringiensis</i>	83
7.-	Porcentaje de mortalidad acumulada corregida a través del tiempo de larvas de <i>H. zea</i> alimentadas con dieta contaminada con diferentes concentraciones de la proteína Cry1Ac de <i>B. thuringiensis</i>	84
8.-	Efecto de diferentes concentraciones de la proteína Cry1Ac de <i>B. thuringiensis</i> en <i>H. zea</i> sobre el tiempo de desarrollo (días) de larvas neonatas a pupa y adulto.....	86
9.-	Peso promedio de larvas a los 3 y 12 días, peso de pupas y adultos de <i>H. zea</i> alimentada con diferentes concentraciones de la proteína Cry1Ac de <i>B. thuringiensis</i>	86
10.-	Porcentaje de mortalidad acumulada corregida a través del tiempo de larvas de <i>H. zea</i> alimentadas con dieta contaminada con dos concentraciones de la proteína Cry1Ac de <i>B. thuringiensis</i>	88
11.-	Efecto de dos concentraciones de la proteína Cry1Ac de <i>B. thuringiensis</i> en <i>H. zea</i> sobre el tiempo de desarrollo (días) de larvas neonatas a pupa y adulto.....	89
12.-	Peso promedio de larvas a los 3 y 12 días, peso de pupas y adultos de <i>H. zea</i> alimentada con dos de la proteína Cry1Ac de <i>B. thuringiensis</i>	89

CAPÍTULO 3

1.-	Porcentaje de mortalidad acumulada corregida a través del tiempo de larvas de <i>S. frugiperda</i> alimentadas con dieta contaminada con diferentes concentraciones de la proteína Cry2Ab de <i>B. thuringiensis</i>	107
2.-	Efecto de diferentes concentraciones de la proteína Cry2Ab de <i>B. thuringiensis</i> en <i>S. frugiperda</i> sobre el tiempo de desarrollo (días) de larvas neonatas a pupa, adulto, huevo y de larva (F0)-larva (F1).....	108
3.-	Efecto subletal de concentraciones de la proteína Cry2Ab de <i>B.</i>	

<i>thuringiensis</i> en <i>S. frugiperda</i> en el número de pupas y adultos (machos y hembras), del número de huevos y larvas neonatas de la F1 por hembra.....	109
4.- Porcentaje de mortalidad acumulada corregida a través del tiempo de larvas de <i>S. frugiperda</i> alimentadas con dieta contaminada con diferentes concentraciones de la proteína Cry1Ac de <i>B. thuringiensis</i>	111
5.- Efecto de diferentes concentraciones de la proteína Cry1Ac de <i>B. thuringiensis</i> en <i>S. frugiperda</i> sobre el tiempo de desarrollo (días) de larvas neonatas a pupa, adulto, huevo y de larva (F0)-larva (F1).....	113
6.- Efecto subletal de concentraciones de la proteína Cry1Ac de <i>B. thuringiensis</i> en <i>S. frugiperda</i> en el número de larvas neonatas que llegaron al estado pupa, adulto, huevo por hembra y de larva por hembra.....	114

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1.- Ciclo biológico de gusano cogollero <i>S. frugiperda</i> . A. Huevecillos, B. Larvas de primer instar, C. Pupas, D. Adulto macho, E. Adulto hembra...	7
2.- Principal distribución de <i>Spodoptera frugiperda</i> a nivel mundial.....	9
3.- Daño de gusano cogollero <i>Spodoptera frugiperda</i> en la planta de maíz...	10
4.- Ciclo biológico de gusano elotero <i>H. zea</i> . A. Huevo, B. Larva, C. Pupa, D. Adulto.....	13
5.- Daño de gusano elotero <i>Helicoverpa zea</i> en plantas de maíz.....	14
6.- Filograma de la identidad entre las secuencias de las proteínas Cry.....	20

Capítulo 1

1.- Mal formaciones en larvas y pupas de <i>Spodoptera frugiperda</i> provocadas por concentraciones subletales de la proteína Cry2Ab de <i>Bacillus thuringiensis</i> a los 21 días de alimentarse con dieta contaminada.....	53
2.- Malformaciones en larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> provocadas por concentraciones subletales de la proteína Cry1Ac de <i>Bacillus</i>	

thuringiensis a los 21 días de alimentarse con dieta contaminada..... 59

Capítulo 2

1.- Mortalidad provocada por *B. thuringiensis* a los 15 días de desarrollo larval de *Helicoverpa zea* en diferentes concentraciones de la proteína... 78

2.- Desarrollo larval de *Helicoverpa zea* a los 15 días de haber expuesto las larvas a la dieta con la proteína Cry2Ab..... 79

3.- Ennegrecimiento de la cutícula de una larva de *H. zea* a los 18 días de estarse alimentado con 1 µg mL⁻¹ de la proteína Cr1Ac..... 85

4.- Adulto de *H. zea* sin salir por completo de la cutícula pupal..... 87

Capítulo 3

1.- Malformaciones de estados intermedios y adultos de *Spodoptera frugiperda* a los 27 días de haber expuesto las larvas con 1 µg mL⁻¹ de la proteína Cry2Ab. A. Endurecimiento y ennegrecimiento del integumento, B y C. Ennegrecimiento de la pupa y segmentos abdominales, D. Desarrollo parcial de alas..... 110

2.- Malformaciones de estados intermedios y adultos de *Spodoptera frugiperda* a los 27 días de haber expuesto las larvas con 1 µg mL⁻¹ de la proteína Cry1Ac. A. Ennegrecimiento y depresiones en los segmentos abdominales, B y C. Malformación y ennegrecimiento de la pupa, D. Alas reducidas sin desprender la cutícula..... 119

3.- Pupas de *Spodoptera frugiperda*. A. Hembra. B. Macho..... 119

4.- Adultos de *Spodoptera frugiperda*. A. Macho. B. Hembra..... 119

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

Los insectos plaga son uno de los grandes problemas fitosanitarios que ocasionan pérdida de las cosechas de hasta el 30% a nivel mundial. Por lo que se puede asegurar que el daño causado por los insectos no sólo tiene impacto social si no también económico (Isman, 2006). Unos de estos insectos plagas más importantes son el gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) y el gusano elotero *Helicoverpa zea* Bodie (Lepidoptera: Noctuidae), son dos especies altamente polípagas y por eso es importante señalar los daños que causan en muchos cultivos, tales como el maíz (*Zea mays* L.), algodón (*Gossypium hirsutum* L.), soya (*Glycine max* L.), camote (*Ipomea batata* L.), entre otros (Bergvison, 2005). Las larvas comúnmente se alimentan del follaje y en casos extremos puede causar la pérdida del cultivo. Éstas y otras especies de insectos lepidópteros son controladas principalmente con insecticidas químicos, como piretroides y organofosforados (Cook *et al.*, 2004), entre otros insecticidas sintéticos. Estos insecticidas a su vez han provocado la resistencia de los insectos y por ello se ha limitado su uso (Abdelghafar *et al.*, 1993; Al-Sarar *et al.* 2006 y Pietrantonio *et al.*, 2007). No obstante, existen otros métodos alternativos para el control de estas plagas, como es el uso de entomopatógenos, uno de esos grupos son los hongos que atacan a estadios inmaduros del insecto (larvas y ninfas) infectando todo el cuerpo hasta llegar a la formación de esporas, las cuales se dispersan provocando la muerte, algunos de los hongos son: *Metarhizium anisopliae* Metsch, *Beauveria bassiana* Vuillemin, *Entomophthora spp.*, *Aspergillus flavus* Link, y *Peaecilomyces fumosoroseus* (Tanada y Kaya, 1993). El otro grupo son las bacterias, los cuales poseen un potencial microbial muy grande para la elaboración de productos a base de la bacteria *Bacillus thuringiensis* Berniler (Berniler, 1915), es la bacteria más utilizada a nivel mundial como bioinsecticida (Powell y Jutsum, 1993), es una bacteria gram positiva que forma esporas, habita de forma natural en el suelo; además, forma δ -endotoxinas como inclusiones parasporales durante la esporulación, éstas se disuelven en el intestino medio del insecto liberando protoxinas que se convierten en moléculas tóxicas (Höfte y Whiteley, 1989; Gill *et al.*, 1992). Las protoxinas se unen a las microvellosidades de la membrana epitelial del mesenteron de las larvas

produciendo pequeños poros que alteran el balance osmótico de las células, rompimiento de las células, la destrucción del intestino (Yu, 2008) y como consecuencia, la muerte por septicemia (Schnepf, 1998). Estas toxinas presentan actividad insecticida contra diversos órdenes de insectos, principalmente lepidóptera (Brock y Madigan, 1988), díptera (Lambert y Perferoen, 1992; Garcia-YanéZ *et al.*, 2000) y coleóptera (Chiang *et al.*, 1986; Schnepf *et al.*, 1998). *B. thuringiensis* posee un alto potencial y es recomendado para usarse como agente de control biológico contra *S. frugiperda* (Silva-Werneck *et al.*, 1999; Aragon *et al.*, 2002) y *H. zea*. Más aún, con la ingeniería genética, el algodón, maíz y soya (*Glycine max* Merr.) (ISAAA, 2010), han sido genéticamente modificados (plantas transgénicas resistentes a insectos) capaces de expresar genes que codifican las δ -endotoxinas de *B. thuringiensis* permitiéndoles protegerse de estas plagas (Perlak *et al.*, 1993; Sterwart *et al.*, 2001; Buntin *et al.*, 2001; Adamcyk y Gore, 2004), y otras especies de lepidópteros como *Heliothis virescens* (Fabricius) (Koziel *et al.*, 1993; Perlak *et al.*, 1993; Benedict *et al.*, 1994; Feldman y Stone, 1997). Por ello, es necesario la búsqueda de nuevas alternativas de control (Matten *et al.*, 2008; Tabashnik *et al.*, 2008) y estudiar qué pasa con los insectos que se exponen a concentraciones bajas (dosis subletales) de proteína de Bt. Los efectos provocados por dosis subletales, son producidos cuando los productos a base de Bt se degradan a través del tiempo por acción de factores ambientales, y por tal razón dichas dosis o concentraciones de la sustancia tóxica no matan el 100% de la población, sin embargo, en un tiempo más prolongado repercuten en su desarrollo y en la densidad poblacional de las plagas. A la fecha, se han realizado múltiples estudios para estimar los efectos letales de *B. thuringiensis*, y son pocos los estudios que existen donde se señalan los posibles efectos subletales que *B. thuringiensis* provoca en plagas lepidópteros. Debido a lo antes mencionado, el objetivo de esta investigación, fue determinar en condiciones de laboratorio los efectos subletales de las proteínas Cry2Ab y Cry1Ac de *B. thuringiensis* en gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith y gusano elotero *Helicoverpa zea* Boddie.

1.1. LITERATURA CITADA

- Abd-elghafar, S. F., C. O. Knowles y M. L. Wall. 1993. Pyrethroid resistance in two field strains of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 86: 1651-1655.
- Adamcyk, J. J. y J. Gore. 2004. Laboratory and field performance of cotton containing Cry1Ac, Cry1Ff, and both Cry1Ac and Cry1F (Widestrike) against beet armyworm and fall armyworm larvae (Lepidoptera: Noctuidae). *Florida Entomologist* 87:427-432.
- 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.
- Aragon, J.A., M. Romero y S. Orduz. 2002. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Colombia with insecticidal activity against st (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal Applied Microbiology* 923: 466-474.
- Benedict, J. H., E. S. Sachs., J. L. Halcomb., D. R. Ring., B. Cook., D. M. Stelly., D. W. Alman., R. J. Kohel., J. C. Correa., M. W. Goynes., J. F. Taylor y S. K. Davis. 1994. Feeding preference and movement of tabbaco budworm and bollworm in mixed stands of transgenic Bt and non-Bt cotton. *Annual Plant Resistance to insects Newsletter* 20: 31-32.
- Bergvinson, D. J. 2005. *Heliothis/ Helicoverpa* Managment Emerging Trends and Strategies for Future Research. Plymouth, UK. Science Publishers, Inc. pp. 7-37.
- Brock, T. D. y T. Madigan. 1988. *Biology of microorganismos*. 5th ed. Prentice-Hall. Englewood, Cliffs. New Jersey. pp. 229-245.
- Buntin, G. D., R. D. Lee, D. M. Wilson y R. McPherson. 2001. Evaluation of Yieldgard transgenic resistance for control fall armyworm and corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae) on corn. *Florida Entomologist*. 84:37-42.
- 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.

- Chiang, A. S., D. F. Yen y W. K. Peng. 1986. Germination and proliferation of *Bacillus thuringiensis* in the gut of rice moth larva *Corcyca cephalica*. J. Invertebr. Pathol. 48: 96-99.
- Feldman, J. y T. Stone. 1997. The development of a comprehensive resistance management plan for potatoes expressing the cry3A endotoxin *In*: N. Carozzi y M. Koziel (eds.). Advances in Insect Control: the role of transgenic plants. Taylor y Francis, London. pp. 49-61.
- García-Yáñez, J., J. M. Sánchez-Yáñez y E. C. López-Barbosa. 2000. Producción de bioinsecticida a base de *Bacillus thuringiensis*. Minirevisión. Cuatro vientos 14: 29-35.
- Gill, S., E. Cowles y Pietrantonio. 1992. The mode on action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. Annu. Rev. Entomol. 37:615-636.
- Höfte, H. y H. R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev. 53: 242-255.
- ISAAA. 2010. Monsanto's bt roundup ready 2 yeild soybeans approved for planting in brazil. Crop Biothech Update. (www.Isaaa.org/kc/cropbiotechupdate/. consultada el 15 de abril de 2014).
- Isman, M. B. 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and increasingly regulated world. Annu. Rev. Entomol. 51:45-66.
- Koziel, M. K., F. L. Belang, C. Bowman, N. B. Carozzi., R. Crenshaw., L. Crossland., J. Dawson., N. Desai, M. Hill, S. Kadwell., K. Launis, K. Lewis., D. Addox, K. Mcpherson., M. R. Mefhji., E. Merlin., R. Rhodes., G. W. Warren., M. Wright y S. Evola. 1993. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. Biotechnology 11: 194-200.
- Lambert, B. y M. Perferoen. 1992. Insecticide promise of *Bacillus thuringiensis*. Facts and mysteries about a successful biopesticide. Bioscience 42: 112-122.
- Matten, S. R., G. P.Head y H. D.Quemada. 2008. How governmental regulation can help or hider the integration of *Bt* crops within IPM programs. *In* J. Romeis, A.M. Shelton and G.G. Kennedy (eds). Integration of insect-resistant genetically modified crops within IPM programs. Springer. USA. pp. 27-39.

- Perlak, F., T. B. Stone., Y. M. Muskopf., L. J. Petersen., G. B. Parker., S. A. Mcpherson., J. Wyman., S. Love., D. B iever., G. Reed y D. Fischhoff. 1993. Genetically improved potatoes; protection from damage by Colorado potato beetles. *Plant Molecular Biol.* 22: 313-321.
- Pietrantonio, P.V., T. A. Juneck, 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.
- Powell, K. A. y A. R. Jutsum. 1993. Technical and commercial aspects of biocontrol products. *Pesticide Science* 37: 165-167.
- Silva-Werneck, O., M.T. De Souza., J. M. C. D. Dias y B. M. Ribeiro. 1999. Characterization of *Bacillus thuringiensis* subsp *Kurstaki* strain S93 effective against the fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). *Canadian J. Econ. Entomol.* 45: 464-471.
- Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D.R. Zeigler y D.H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62. pp. 775–806.
- Stewart, S. D., J. J. Adamczyk., K. S. Knighten y F. M. Davis. 2001. Impact of Bt Cottons expressing one or two insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis* Berniler on growth and survival of noctuid (Lepidoptera) larvae. *J. Econ. Entomol.* 94: 752-760.
- Tabashnik, B., A. J., Gassman, D.W. Croeder y Y. Carrière. 2008. Insect resistance to *Bt* crops: evidence versus theory. *Nature Biotechnology* 26: 199-202.
- Tanada, H y K. Kaya. 1993. *Insect pathology*. Academic Press, Inc. New York. p 666.
- Yu, S. J. 1992. Detection and biochemical characterization of insecticide resistance in Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 85: 675-682.
- Yu, S. J. 2008. *The toxicology and biochemistry of insecticides*. CRC Press. Boca Florida. USA. pp. 1-296.

II. ANTECEDENTES

2.1. GENERALIDADES DE GUSANO COGOLLERO *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith.

El Gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuide) fue descrito por J.E. Smith en 1852, se ubica dentro del género *Spodoptera*. En este género se encuentran otras especies como: *S. exigua* Hübner., *S. dolichos* F., *S. cosmioides* Walker., *S. eridania* Cramer., *S. praefica* Grote (Levy et al., 1976). Ocasiona severos daños, provocando pérdidas de hasta un 20% de los cultivos en las primeras etapas de desarrollo y en floración (Del Rincón et al., 2006)

2.1.1. Taxonomía

Es un insecto ubicado taxonómicamente en la familia noctuidae, dentro del orden Lepidóptera, su posición taxonómica se presenta a continuación (Banda, 1981).

Phylum	Anthropoda
Subphylum	Mandibulata
Clase	Insecta
Subclase	Pterygota
Orden	Lepidoptera
Suborden	Frenatae
Superfamilia	Noctuoidea
Familia	Noctuidae
Género	<i>Spodoptera</i>
Especie	<i>S. frugiperda</i> (J. E. Smith)

2.1.2. Biología

El ciclo de vida del gusano cogollero (Figura 1) oscila entre 19 y 48 días, esto depende de la temperatura, cuando estas son elevadas el ciclo se acorta (Jassic y Reines, 1974; Piedra, 1974). Las hembras con una temperatura de 26,5°C ponen

**EFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN
Spodoptera frugiperda (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)**

1,216 huevos por día, y si baja la temperatura a 25°C ponen 944 huevos y a 30°C se reduce a 386 huevos. Las hembras durante su vida son capaces de producir hasta 3,600 huevecillos (Borbolla, 1981; Silvain, 1987). Los huevecillos los ponen en masas, colocadas en el envés de las hojas, son cubiertos por escamas de la misma hembra. Los huevecillos eclosionan de dos a 10 días según sea la temperatura (Luginbill, 1928; Borbolla, 1981).

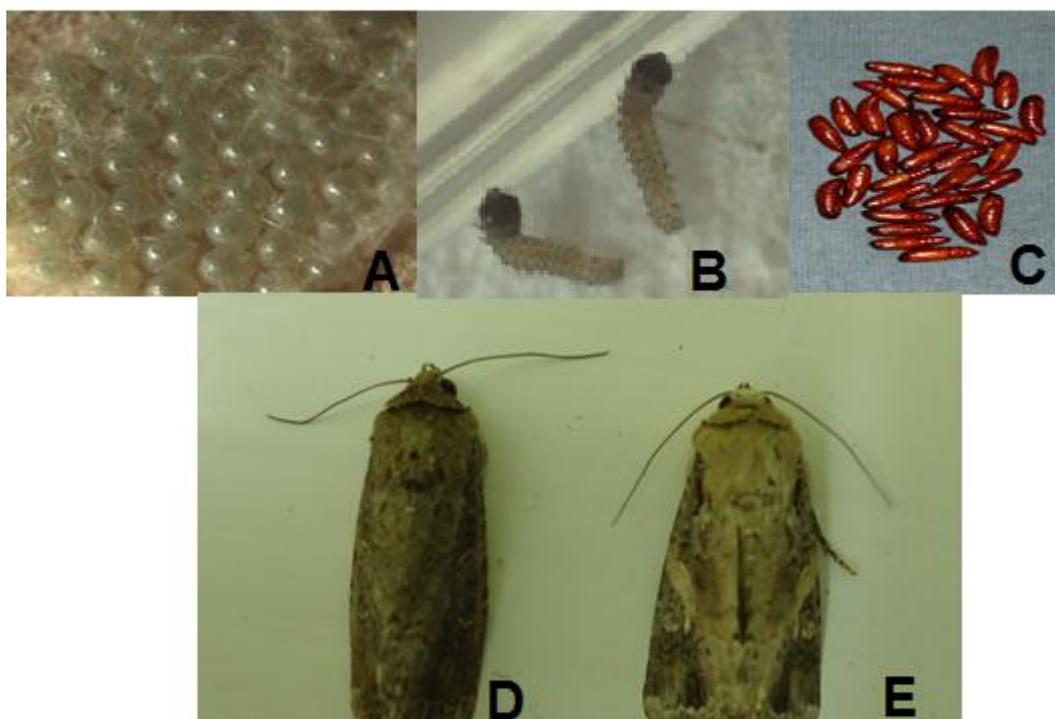


Figura 1. Ciclo biológico de gusano cogollero *S. frugiperda*. A. Huevecillos, B. Larvas de primer instar, C. Pupas, D. Adulto macho, E. Adulto hembra.

Las larvas pasan por seis estadios o instares, su desarrollo se diferencia totalmente porque cambia la coloración y la longitud de la cabeza y cuerpo (Villa *et al.*, 2004), el estado larvario transcurre en un periodo de dos a tres semanas y después se introducen en el suelo para pupar. La cabeza de las larvas es de color negro en los últimos estadios, con la sutura epicraneal bien marcada; el cuerpo es cilíndrico, de color café gris dorsalmente y verde ventralmente, con líneas dorsales y subdorsales visibles, se pueden identificar porque presentan una forma de “Y” invertida color blanco en la parte fronto-dorsal de la cabeza (Borbolla, 1981). Las larvas de primer instar son de color café en todo el cuerpo y miden 1.7 mm, el segundo instar miden 3.5 mm y la cabeza mide 0.45 mm mostrando una coloración

naranja. En el tercer instar, la cabeza mide 0.75 mm y su cuerpo es de color oscuro, y el cuerpo mide 6.4 mm con líneas blancas en los laterales. Del cuarto al sexto instar, el cuerpo mide de 1 a 4 cm de longitud y su cuerpo presenta una coloración café con líneas blancas en la parte dorsal y lateral del cuerpo (Vivas, 2003). Las larvas de primer instar, al principio viven en grupos y se separan posteriormente, debido a sus hábitos caníbales, quedando en forma general una larva por planta (Borbolla, 1981), donde comienzan a alimentarse en el envés de las hojas, se dispersan a las partes tiernas de la planta, en plantas de maíz se dirigen al cogollo, donde se alimentan de las hojas en crecimiento, las cuales posteriormente muestran perforaciones irregulares (Sparks, 1979; Lagunes *et al.*, 1985).

Las pupas son de tipo obtecta y miden cerca de dos cm de largo, son de color pardo rojizo, con el protórax más oscuro, encontrándose normalmente enterradas en el suelo, donde permanecen una semana aproximadamente y luego emergen como adultos (Lagunes *et al.*, 1985; Vivas, 2003), este desarrollo puede llegar a durar de ocho a nueve días en verano y de 20 a 30 días en invierno (Vivas, 2003).

Los adultos presentan hábitos nocturnos, con una longevidad de vida que varía de cuatro a ocho días, dependiendo de las condiciones ambientales. Las alas de los adultos miden hasta 3.75 cm de extensión alar. Los machos pueden diferenciarse de las hembras (dimorfismo sexual) por caracteres físicas. Las alas metatorácicas del macho son de color pardo claro, con marcas oscuras y líneas irregulares o trianguladas pálidas en el centro, mientras que las de la hembra son más oscuras y grisáceas, con diseños menos notorios (Morón y Terrón, 1988).

2.1.3. Origen y distribución

El origen de *S. frugiperda* está en los trópicos del continente americano (Figura 2) (Walton y Luginbill, 1917; Luginbill, 1928; Borbolla, 1981), ya que no poseen diapausa (Carpenter *et al.*, 1983; Rojas *et al.*, 2004; Murúa *et al.*, 2006; Farias *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 encontrado en zonas templadas (Sparks, 1979; Andrews, 1988; Abbas *et al.*, 1989; López-Edwards *et al.*, 1999). Aunque *S. frugiperda* es endémica del continente americano, incluyendo Las Antillas y el Caribe, Tood y Poole (1980), reportan su presencia en Israel, que es un país del continente asiático.



Figura 2. Principal distribución de *Spodoptera frugiperda* a nivel mundial.

En México, el gusano cogollero se encuentra ampliamente distribuido en todas las zonas agrícolas, los principales estados donde se encuentra son: Baja California Norte, Baja California Sur, Nuevo León, Nayarit, Sinaloa, Sonora, Jalisco, Colima, Chihuahua, Veracruz, Morelos, Oaxaca, Chiapas y Campeche. Aunque también en los estados con altitudes superiores a los 2000 msnm como Puebla, Tlaxcala, Hidalgo, Guanajuato, Querétaro y el Estado de México, en donde según Andrews (1988), éste insecto tiene menos importancia económica. Por ello, Pashley (1986), señaló que las condiciones climáticas están relacionadas con la dispersión y fluctuación de *S. frugiperda*.

2.1.4. 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), siendo las gramíneas como el maíz el hospedero primario (Mitchell *et al.*, 1989; Van Dine, 1913; Smith, 1919; Cowdey, 1923; Cifuentes, 1967; Popov y Reines, 1975; Raulston *et al.*, 1986). Otros cultivos de importancia económica son el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), tomate (*Lycopersicon esculentum* L.), maní (*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 (*Cumunis sativus* L.), tabaco (*Nicotiana*

tabacum L.) y algodón (*Gossypium hirsutum* L.) (Luginbill, 1928; Bruner y Deschappelles, 1965; Metcalf y Flint, 1965). Otros hospederos de importancia económica son los pastos (Fernández y Estefanía, 1974; Kumar y Mihm, 2002; Martínez *et al.*, 2004). En México, *S. frugiperda* daña pastos, principalmente *Paspalum vaginatum* Swart, de los campos de golf de la Riviera Maya, Quintana Roo (León-García, 2009). En EE.UU. y Canadá se asocia a pasto bermuda (*Cynodon dactylon* L.), pasto ovillo (*Lolium perenne* L.) y agrostis (*Agrostis* spp.) (Reinert *et al.*, 1997; Braman *et al.*, 2004; Pessarakli, 2007).

2.1.5. Daños

El gusano cogollero se alimenta de las hojas tiernas (Figura 3) de las plantas del maíz, posteriormente se introduce en el cogollo, dejando áreas traslucidas, si no se controla, llega a causar severos daños al cultivo. Hernández (1989), mencionó que las pérdidas del área foliar causadas por el ataque del gusano cogollero en cultivos de maíz, afecta la fotosíntesis de las plantas. Este ataque puede ocurrir en cualquier etapa del desarrollo vegetativo (Wiseman *et al.*, 1977).



Figura 3. Daño de gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* en la planta de maíz.

En pastos, las larvas se alimentan de los márgenes de las hojas y reducen el vigor, se provoca un daño mayor cuando muerden la corona de las plantas ocasionando debilitamiento, mal desarrollo y muerte de la planta (Potter, 1998; Kumar y Mihm, 2002). Aunque *S. frugiperda* se considera una plaga ocasional en pastos en los EE.UU., tiene el potencial para dañar severamente los jardines (Potter, 1998; Johnson *et al.*, 2002; Potter, 2008).

2.2. GENERALIDADES DE GUSANO ELOTERO *Helicoverpa zea* Boddie.

Existen más de 18 especies descritas con este género (Hardwick, 1965). Es una especie altamente polífaga, aunque tiene preferencia por mazorcas y espigas jóvenes de maíz (Smith *et al.*, 1992), se conoce con muchos nombres comunes: gusano del maíz, gusano del fruto del tomate, gusano del algodón (Sherman, 1914; Laffoon, 1960; Burkett *et al.*, 1983; Dowd y Lagrimini, 1997), o simplemente como “gusano” (Quaintance y Brues, 1905).

2.2.1. Taxonomía.

El gusano elotero *H. zea* pertenece a la familia Noctuidae. Hardwick (1965), separa esta especie taxonómicamente del género *Heliothis* al complejo del “gusano elotero” de maíz; *Heliothis zea* (Boddie), *H. armigera* (Hubner), *H. obsoleta* (Fabricius) y *H. gelotopon* (Dyar), y los incluye en el género *Helicoverpa*, porque las estructuras de los órganos genitales de los machos de *Helicoverpa* poseen vesícula alargada, helicoidal con numerosas vueltas y está provista de denticulos; en *Heliothis* es relativamente pequeña, con una o dos vueltas y sin denticulos; en hembras, *Helicoverpa*, el apéndice bursae es considerablemente más largo que la bursa y más estrecho; en *Heliothis* éste es ligeramente más largo que la bursa y de diámetro más o menos uniforme.

Phylum	Anthropoda
Subphylum	Mandibulata
Clase	Insecta
Subclase	Pterygota
Orden	Lepidoptera
Suborden	Frenatae
Superfamilia	Noctuoidea
Familia	Noctuidae
Género	<i>Helicoverpa</i>
Especie	<i>H. zea</i> (Boddie)

2.2.2. Biología

Las hembras de *H. zea* ovipositan sus huevos durante la noche, llegan a poner de 500 a 3,000 huevos (Ditman *et al.*, 1931; Hardwick, 1965). Los huevos parecen como cúpulas de marfil colocados individualmente (Hardwick, 1965). El maíz es el cultivo preferido por esta especie, aquí las hembras ponen los huevos en sedas frescas en etapas avanzadas de la planta (McColloch, 1922). Los huevos eclosionan de dos a seis días posteriores a la oviposición. Los primeros estadios muestran una coloración pálida, y a través del tiempo muestran diferentes coloraciones, desde el verde pálido a rojo rosado (Flood *et al.*, 2005). Existen características que distinguen a las larvas de *H. zea* de otros lepidópteros, ya que la cápsula de la cabeza se torna de color claro y muchas micro-espinas negras a lo largo del cuerpo. La alternancia de líneas oscuras y claras están a lo largo de la parte dorsal. Estadios tardíos del *H. zea* se diferencian de una especie parecida (*Heliothis virescens*) debido a que *H. virescens* posee una estructura adicional en la mandíbula (diente) (UC-IPM, 1996). Las larvas de gusano elotero dejan de alimentarse a los 16 días (a 25°C) después de la eclosión para bajar al suelo y pupar (Hardwick, 1965). Las pupas son de color caoba marrón, miden de 18-19 mm de longitud y pesan 0.4 g aproximadamente (Quaintance y Brues, 1905). Los adultos emergen 13 días después de pupar, o entran en diapausa y permanecen en el suelo durante varios meses para pasar el invierno; las hembras adultas emergen alrededor de un día antes que los machos (Hardwick, 1965; Hogg y Calderón, 1981). Los adultos presentan un color verde pálido con las alas anteriores marcadas con una mancha en forma de coma oscuro. Tienen una envergadura de unos 3.8 cm y son más activos durante la noche, por lo general los adultos sobreviven entre 5 y 17 días después de la emergencia (Quaintance y Brues, 1905; Hardwick, 1965; Flood *et al.*, 2005). El ciclo biológico de gusano elotero (Figura 4) depende de las temperaturas, por su parte, Mangat y Apple (1966), afirman que a temperaturas de 22.5°C tiene un ciclo biológico de 47.04 días (huevo, 4.54; larva, 21.33; pupa, 21.7 días) y a 25°C son 36.05 días (huevo, 4.04; larva, 17.01; pupa, 15 días); mientras que King y Saunders (1984), mencionan que el ciclo, de huevo a adulto tiene duración variable de 35 a 68 días. La hembra deposita sus huevos sobre hojas, flores y frutos y duran

de 2 a 5 días. Las larvas de 18 a 25 días y pasa por seis estadios, las cuales puede alcanzar una longitud de 30 a 35 mm.



Figura 4. Ciclo biológico de gusano elotero *Helicoverpa zea*. A. Huevo, B. Larva, C. Pupa, D. Adulto.

2.2.3. Origen y distribución

El gusano elotero *H. zea* es una especie endémica de América del Norte (Flood *et al.*, 2005), se encuentra distribuido gran parte del Norte y Sudamérica (incluso Hawai), así como de las Indias Occidentales (Hardwick, 1965; Reed *et al.*, 1986; Sharma *et al.*, 2007). Es una especie que tiene varias generaciones durante todo el año debido a su adaptación en climas tropicales y subtropicales. Las pupas de *H. zea* pueden entrar en diapausa invernal facilitando la persistencia de las poblaciones provenientes de regiones templadas, aunque ésta invernación se limita a latitudes <40° N (Hardwick, 1965; Lindgren *et al.*, 1994). Tanto en Estados Unidos como en México, se tienen infestaciones anuales severas en los cultivos hospederos (Sandstrom *et al.*, 2007). La migración de *H. zea* es altamente dependiente de los patrones climáticos y el viento, y se sabe que está impulsado por las corrientes superficiales y viento en altitud (Sandstrom *et al.*, 2007).

2.2.4. Hospederos.

El gusano elotero es polífago y se alimenta de alrededor de 100 especies de plantas cultivadas y silvestres. Las larvas prefieren alimentarse de maíz, pero muchos otros cultivos son atacados, incluyendo los vegetales que son de alto valor comercial, tales como tomates (*Solanum lycopersicum* L.), pepinos (*Capsicum* spp.), lechuga (*Lactuca sativa* L.), frijol (*P. vulgaris* L.), berenjena (*Solanum melongena* L.), haba (*Vicia faba* L), así como algodón (*G. hirsutum* L.), tabaco (*Nicotiana tabaccum* L.), sorgo (*Sorghum bicolor* L.) y soya (*G. max* Merr.) (Stadelbacher, 1980; Zalom *et*

al., 1986; Smith *et al.*, 1992; Bergvinson, 2005; Souza *et al.*, 2007; Hutchison *et al.*, 2007). Y por lo menos 76 plantas silvestres hospedaras han sido documentadas para *H. zea* incluyendo la carolina (*Coronilla varia* L.), malva común (*Malva neglecta* Wallroth), malva (*Abutilon theophrasti* Medikus), girasol (*Helianthus annuus* L.), geranio (*Geranium dissectum* L.) y trébol carmesí (*Trifolium incarnatum* L.) (Neunzig, 1963; Harding, 1976; Fitt, 1989; Sudbrink y Grant, 1995; Blanco *et al.*, 2007). La capacidad que tiene el gusano elotero de alimentarse de plantas silvestres le permite extender sus poblaciones antes y después de la temporada de crecimiento del cultivo. Las plantas silvestres son sitios importantes de invernación (Sudbrink y Grant, 1995).

2.2.5. Daños

Los daños pueden ser visibles, aunque las larvas normalmente se ocultan dentro de los órganos de las plantas (tallos, hojas, frutos o flores) (Figura 5) (CESAVEG, 2008). CATIE (1990), afirma que el “complejo *Heliothis*” causa pérdidas considerables en cultivos, los daños son principalmente económicos, ya que el consumo del follaje puede provocar pérdida del cultivo.



Figura 5. Daño de gusano elotero *Helicoverpa zea* en plantas de maíz.

2.3. METODOS DE CONTROL

La integración de medidas fitosanitarias aumenta la posibilidad de tener un mejor control de plagas y enfermedades. El control de *Spodoptera frugiperda* y *Helicoverpa zea*, se realiza usando diversos métodos:

2.3.1. Control cultural.

Comprende una serie de medidas, básicamente de limpieza, con la finalidad de eliminar todo refugio que sirva de protección al insecto, principalmente durante el invierno, estas medidas incluyen un barbecho profundo, rastreo, manejo de fechas de siembra y uso de cultivos trampa (CESAVEG, 2008)

2.3.2. Control Químico.

Es el método de control más empleado por los productores, usando principalmente insecticidas del grupo de los piretroides y organofosforados (SARH, 1993; Cook *et al.*, 2004); sin embargo, a través del tiempo, los insectos han desarrollado resistencia a varios insecticidas, lo que limita el uso de estos agroquímicos (Landazabal, 1973; Brattsten *et al.*, 1986; Roush y McKenzie, 1987; Georghiou y Lagunes-Tejeda, 1991; Yu, 1991, 1992; Abd-elghafar *et al.*, 1993; Al-Sarar *et al.*, 2006; Pietrantonio *et al.*, 2007). La Arthropod Pesticide Resistance Database (APRD, 2014) reporta que en los últimos 100 años (1914 al 2014) *S. frugiperda* registra 41 casos de resistencia y *H. zea* 44.

En México, el control químico, es el método más usado, destacando el uso de compuestos organofosforados, carbamatos, organoclorados y clorpirifos (Cortez *et al.*, 2002).

2.3.3. Control Biológico.

Los enemigos naturales son los responsables para el mantenimiento de los niveles poblacionales de gusano cogollero y gusano elotero, estos organismos son incapaces de producir un deterioro en el ambiente (Fernandez y Clavijo, 1985). King y Saunders (1984), indicaron que el número de especies de insectos benéficos activos en el campo en condiciones normales puede variar dependiendo del lugar y

señalaron que el control biológico funciona con el uso de parasitoides de huevo, tal es el caso de *Tricograma* sp. (Himenoptera: Trichogrammatidae); parasitoides de larvas: *Apanteles marginiventris* C., *Bracon hebetor* S., *Chelonus antillarum* M, (Himenoptera: Braconidae), *Eucelatoria* sp. (Diptera: Tachinidae), así como liberaciones de *Teleomun remus* (Hymenoptera: Scelionidae) parasitoide de huevos (Andara, 1990). Los entomopatógenos tienen un alto potencial en el control de estas plagas, en la actualidad se conocen diferentes especies de microorganismos entomopatógenos que disminuyen la necesidad de usar otras medidas de control. Existen al menos 20 entomopatógenos, de los cuales, los hongos, los virus, protozoarios, nematodos y bacterias son usados para su control (Dicke, 1972; Gardner y Fuxa, 1980; Gardner *et al.*, 1984; Agudelo-Silva, 1986; Hamm *et al.*, 1986; Fuxa *et al.*, 1988; Richter y Fuxa, 1990; Lezema-Gutierrez *et al.*, 1996; Molina-Ochoa, 1999). Los virus que atacan a los insectos pertenecen a las familias: *baculoviridae*, *reoviridae* y *poxviridae* que presentan envolturas proteicas de protección (Faulkner y Boucias, 1985). De todos los virus entomopatógenos el virus de la poliedrosis nuclear es el más destacado, ya que se ha aplicado con éxito para el control de lepidópteros noctuidos. Los virus atraviesan el epitelio intestinal hasta el tejido de replicación del insecto y los ácaros, causando la muerte (Lewis y Rollinson, 1978). Los hongos entomopatógenos afectan a individuos de todos los órdenes; hemíptera, himenóptera, coleóptera, lepidóptera, ortóptera y díptera, en estados inmaduros y maduros, excepto huevos y pupas (Tanada y Kaya, 1993). Entre los hongos entomopatógenos más conocidos por infectar cerca de 100 especies de diferentes insectos en varios ordenes son; *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* (Ferron *et al.*, 1981). En el caso de las bacterias, existen mas de 100 bacterias entomopatógenas, que al momento de incubarse dentro de las larvas producen toxinas capaces de provocar la muerte (Gladston, 2003). Sin embargo, la bacteria *Bacillus thuringiensis* es la más usada (Gill *et al.*, 1992), esto debido a que tiene un amplio espectro de hospederos y un alto grado de toxicidad (Vergara, 2004) ya que produce esporas y forman cristales proteínicos que son tóxicos contra muchas especies de insectos (Angus, 1954; Falcón, 1971; Tanada y Kaya, 1993; Knowles y Dow, 1993; Bauer, 1995).

2.4. GENERALIDADES DE *Bacillus thuringiensis* Berliner

Bacillus 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 bacteria (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 la aplicación de esta bacteria como agente de biocontrol (Boucias y Pendland, 1998).

2.4.1. Mecanismo de acción.

Los cristales paraesporales de *B. thuringiensis*, al ser ingeridos y solubilizados en el intestino medio del insecto, liberan las proteínas cristalinas en forma de protoxinas. Estas proteínas son estimuladas por proteasas intestinales para generar toxinas activas que provocan la muerte de la larva (Bravo *et al.*, 2004). Las toxinas tienen una forma monomérica que atraviesan la membrana peritrófica y se unen por medio de una cadherina (moléculas de adhesión de células) con gran afinidad a la membrana epitelial (Bravo *et al.*, 2004; Griko *et al.*, 2007). Luego, el ion magnesio por medio de señales es el responsable de la muerte celular (Zhang *et al.*, 2006). Ésta señalización es capaz de estimular la excitosis de la cadherina provocando la unión de toxinas libres (Gómez *et al.*, 2002; Jiménez-Juárez *et al.*, 2007; Zhanga *et al.*, 2008). Ésta unión provoca la formación de un pre-poro, que unido con una aminopeptidasa N o fosfatasa alcalina forman un poro en el epitelio del intestino medio, y como consecuencia, un desequilibrio osmótico y por último la ruptura celular (Schneph, 1998; Gringorten, 2001; Jurat-Fuentes y Adang, 2004; Bravo *et al.*, 2004). El tejido intestinal resulta dañado, lo que impide la retención y asimilación de compuestos vitales para la larva y el insecto muere. La muerte se acelera al germinar las esporas y proliferar las células vegetativas en el hemocele del insecto (Schnepf *et al.*, 1998; De Maagd, 2001). Por su parte, Broderick *et al.* (2006), descartaron estas posibilidades y demostraron que la mortalidad provocada por *B. thuringiensis* dependerá de las bacterias que forman parte de la microbiota normal del intestino del insecto, ya que sólo *B. thuringiensis* no sería suficiente, y a su vez, esta bacteria será la responsable de causar la septicemia en el insecto luego de que

B. thuringiensis les permite alcanzar el hemocele tras dañar el epitelio intestinal. *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 se caracteriza por la portación de genes *cry* antilepidópteros como: *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry2Aa*, *cry2Ab* y *cry1Ia*, y por ello es la bacteria más estudiada (Höfte y Whiteley, 1989; Sauka, 2007).

2.4.2. Proteínas Cry de Bt tóxicas para insectos lepidópteros.

Existen 376 genes *cry* distintos que se clasificaron 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.*, 1998 y Crickmore *et al.*, 2008) (Figura 6). Los genes *cry* poseen una secuencia codificante de entre 1900 pares de bases (*cry2Ab*) y unos 3600 (*cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, etc.) (Crickmore y Ellar, 1992). Las proteínas codificadas por los genes *cry* presentan una identidad aminoácida que puede variar desde más de un 90 % hasta menos de un 20 %, y el intervalo de masas moleculares oscila entre 50 y 140 kDa.

2.4.2.1. Genes *cry2*.

Los genes *cry2* están presentes en cepas de distintos serovares: *B. thuringiensis* svar. *kurstaki* HD-1, *B. thuringiensis* svar. *thuringiensis* Berliner, *B. thuringiensis* svar. *kenyae*, *B. thuringiensis* svar. *tolworthi* (Höfte y Whiteley, 1989). En la actualidad existen 43 genes descritos de *cry2* (Crickmore *et al.*, 2008). Es muy común que se encuentren los genes *cry2Aa* y *cry2Ab* simultáneamente o el gen *cry2Ab* solo, pero no el *cry2Aa* en forma aislada (Ben-Dov *et al.*, 1997 y Sauka *et al.*, 2005).

2.4.2.2. Genes *cry1*.

Los genes *cry1* codifican proteínas de aproximadamente 130 kDa, estas proteínas son sintetizadas como protoxinas que se solubilizan en las condiciones alcalinas del intestino medio del insecto y se activan por proteólisis en toxinas mediante proteasas asociadas al cristal o al intestino medio de la larva. En la actualidad existen 150 genes *cry1* distintos (Crickmore *et al.*, 2008). La combinación más frecuentemente detectada es la de genes *cry1Aa*, *cry1Ab* y *cry1Ac*, ya sea los tres juntos o en pares (Cerón *et al.*, 1995; Ben-Dov *et al.*, 1997; Kim, 2000; Uribe *et*

al., 2003; Juárez-Pérez *et al.*, 2004; Sauka *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2005; Sauka, 2007) estos tres genes *cry1* forman parte de *B. thuringiensis* svar. *kurstaki* HD-1 (Carlton y Gonzales, 1985).

B. thuringiensis var. *kurstaki* HD-1 se caracteriza por la portación de genes *cry* antilepidópteros como: *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry2Aa*, *cry2Ab* y *cry1la*, y por ello es la más estudiada (Höfte y Whiteley, 1989; Sauka, 2007).

Aunque las proteínas Cry1 son tóxicas para las larvas del orden lepidóptera, las proteínas Cry1Ba y Cry1ta, también son tóxicas contra coleópteros (Tailor *et al.*, 1992; Ruiz de Escudero *et al.*, 2006; Grossi *et al.*, 2007 y Martins *et al.*, 2008) y la proteína Cry1Ca para dípteros (Smith *et al.*, 1996). En la actualidad ya existen bioinsecticidas que portan estas proteínas que como ingrediente activo es una mezcla de cristales y esporas de *B. thuringiensis*. Estos productos presentan una potencia baja y toxicidad residual corta, además de ser específicos a ciertos órdenes de insectos.

EFFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN
Spodoptera frugiperda (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)

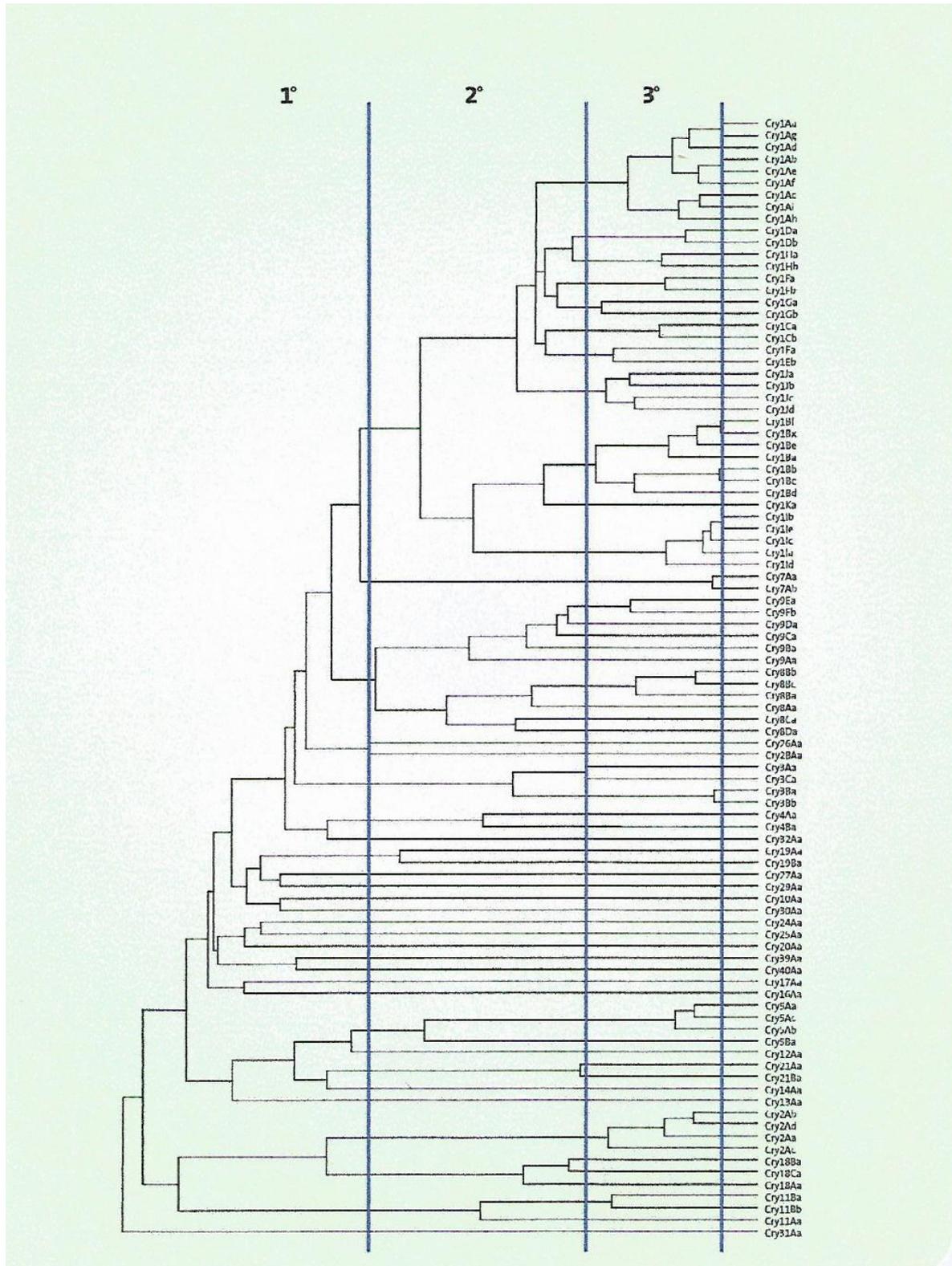


Figura. 6. Filograma de la identidad entre las secuencias de las proteínas Cry. Analisis NEIGHBOR de un alineamiento múltiple desarrollado con un programa CLUSTAL W. Las líneas verticales indican los cuatro niveles de la nomenclatura. www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/

2.4.3. Productos comerciales (bioinsecticidas) a base de Bt.

Productos a base de *Bt* son los agentes de control biológico más ampliamente usados (Brar *et al.*, 2006). *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 es la cepa más usada para el control de insectos lepidópteros, incluyendo plagas agrícolas y forestales. Esta cepa fue aislada por Dulmage en 1970, lo que constituye un hecho en la historia del uso de *B. thuringiensis* como larvicida, ésta cepa es la responsable de que los productos a base de *B. thuringiensis* puedan competir con los insecticidas químicos debido a que en algunos casos pueden ser hasta 200 veces más tóxica para algunas especies de lepidópteros. En la actualidad existen muchos productos comerciales a base de esta bacteria, en el Cuadro 1 se muestran algunos de los diferentes bioinsecticidas comerciales a nivel mundial contra lepidópteros.

Cuadro 1. Bioinsecticidas comerciales contra lepidópteros.

Nombre comercial	Compañía	Serovar de Bt	Proteínas Cry
Dipel, Biobit	Abbott Labs.	Kurstaki	1Aa, 1Ab, 1Ac, 2Aa, 2Ab
XL, Foray		Aizawai	1Aa, 1Ab, 1Ba, 1Ca, 1Da
Florbac, Xentari Futura		Kurstaki	1Aa, 1Ab, 1Ac, 2Aa, 2Ab
Bernan Bt	Bactec	Kurstaki	1Aa, 1Ab, 1Ac, 2Aa, 2Ab
Bathurin	Chamapol-Biokrna	Thuringiensis	
Bactis	Compagnia di Recerca chim. CRC	Kurstaki	1Aa, 1Ab, 1Ac, 2Aa, 2Ab
Biospor	Farbwerke-Hoechst	Kurstaki	1Aa, 1Ab, 1Ac, 2Aa, 2Ab
Cutlass	Fermenta ASC Co.	Kurstaki	1Aa, 1Ab, 1Ac, 2Aa, 2Ab
Larvo-Bt	Knoll Bioproducts	Kurstaki	1Aa, 1Ab, 1Ac, 2Aa, 2Ab
Bt	Korea Explosives	Kurstaki	1Aa, 1Ab, 1Ac, 2Aa, 2Ab

**EFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN
Spodoptera frugiperda (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)**

Selectgyn	Kyowa-Hakko Kogyo Co.	Aizawai	1Aa, 1Ab, 1Ba, 1Ca, 1Da
Sporoine	LIBEC	Kurstaki	1Aa, 1Ab, 1Ac, 2Aa, 2Ab
M-Peril	Mycogen	Kurstaki	1Aa, 1Ab, 1Ac, 2Aa, 2Ab
Biobit	Novo Nordisk	Kurstaki	1Aa, 1Ab, 1Ac, 2Aa, 2Ab
Foray			
SOK	Nor-Am Chemical	Kurstaki	1Aa, 1Ab, 1Ac, 2Aa, 2Ab
Bactospeine	Philips	Kurstaki	1Aa, 1Ab, 1Ac, 2Aa, 2Ab
Plantibac	Procida	Kurstaki	1Aa, 1Ab, 1Ac, 2Aa, 2Ab
Baturad	Radonja	Kurstaki	1Aa, 1Ab, 1Ac, 2Aa, 2Ab
Nubilacid			
Thuricide	Trilogy	Kurstaki	1Aa, 1Ab, 1Ac, 2Aa, 2Ab
Javelin, Delfin CoStar Steward Vault	Corporation		
Bacillex	Shionogi Co	Thuringiensis	b-exotoxina

Fuente: Sauka y Benindente, 2008.

Los productos comerciales a base de Bt fueron mejorando a través del tiempo, clasificando así a los productos como de primera, segunda y tercer generación hasta el desarrollo de plantas transgénicas.

4.4.4. Bioinsecticidas de primera generación.

Son aquellos productos cuyo ingrediente activo es una mezcla de cristales y esporas de *B. thuringiensis*. Constituyendo de esta forma la mayor proporción de los productos comerciales más usados a nivel mundial (Mahilum *et al.*, 2005; Maxwell *et al.*, 2006). Estos productos se utilizan en el sector agrícola, principalmente para el control de plagas lepidópteras en cultivos como maíz, algodón, trigo, soja, sorgo y frutales (Sauka y Benintende, 2008).

2.4.5. Bioinsecticidas de segunda generación.

Están constituidos por una mezcla de esporas y cristales de *B. thuringiensis* a la cual se le introdujo mediante un mecanismo de transferencias de genes, genes *cry* presentes en otras cepas de *B. thuringiensis* y no en la receptora, permitiendo de esta forma aumentar su toxicidad y ampliar su espectro contra otras plagas (Sauka y Benintende, 2008). Éstos productos ofrecen una serie de ventajas, ya que las cepas de *B. thuringiensis* pueden permanecer estables y expresar eficientemente varios genes *cry*, los cuales, tienen diferentes formas de acción o diferentes propiedades de unión al receptor, lo que pueden reducir considerablemente el desarrollo de la resistencia (Tabashnik, 1994). Por ejemplo, Kalman *et al.* (1995), desarrollaron una cepa a la que se le introdujo de manera estable el gen *cry1c* de *B. thuringiensis* var. *aizawai*, (específico para *Spodoptera*) dentro de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73 (sólo contiene *cry1Ac*), de esta forma se logró ampliar el rango de huéspedes susceptibles.

2.4.6. Bioinsecticidas de tercera generación.

Son aquellos cuya formulación contiene bacterias recombinantes que han sido modificadas genéticamente con genes *cry* o cepas de *B. thuringiensis* modificadas con otros genes que codifican otros factores de virulencia distintos de las δ -endotoxinas. Son productos desarrollados con el objetivo de resolver la limitación de la toxicidad residual corta que poseen los bioinsecticidas de la primera generación y aumentar la toxicidad hacia los insectos. Una de las estrategias para obtener este tipo de productos, fue el uso de bacterias recombinantes muertas con el objetivo de obtener una nueva manera de utilización de las proteínas Cry (Gaertner *et al.*, 1993). Por ejemplo la compañía Mycogen creó una estrategia que implica encapsular varias proteínas de Cry dentro de células de *Pseudomonas fluorescens*. A este sistema se le llamó CellCap[®], éste sistema consiste en matar las células mediante un tratamiento físico o químico. La ventaja de este sistema es que las *Pseudomonas fluorescens* protegen a las proteínas Cry de *B. thuringiensis* de la degradación causada por el medio ambiente como lo son las altas temperaturas, y manifiesta actividad insecticida residual más prolongada (Sauka y Benintende, 2008).

2.4.7. Plantas transgénicas resistentes a insectos (plantas Bt).

En la actualidad, a través de la ingeniería genética se han desarrollado muchas especies de plantas que expresan genes *cry* de *B. thuringiensis*, convirtiéndolas en “plantas insecticidas o cultivos Bt” (por ejemplo, maíz Bt y algodón Bt) (Vaeck *et al.*, 1987). El uso de plantas Bt reduce el uso de insecticidas convencionales, provee una protección duradera durante el ciclo del cultivo y solo los insectos expuestos a la toxina son aquellos que se encuentran alimentándose de los cultivos. No obstante, todas estas ventajas se reflejan en beneficios para la producción de alimentos y menor contaminación del medio ambiente (Hossain *et al.*, 1981; Khetan, 2001). Una de sus desventajas, es la posible generación de resistencia de insectos que se alimentan de ellas, porque después sería inútil el uso de proteínas Cry para su control, ya sea mediante el empleo de las plantas transgénicas o con los bioinsecticidas (Gonzales-Cabrera, 2001).

En los Estados Unidos y en Australia, en el año 2002 se aprobó el uso comercial de una planta transgénica de algodón que produce de manera simultánea las proteínas Cry1Ac y Cry2Ab (Zhao *et al.*, 2003). En la actualidad las plantas que expresan dos genes *cry* diferentes son más efectivos en el control de insectos plaga y tendrían el potencial de retrasar la aparición de resistencia (Lu y Adang, 1996; Roca, 2002; Zhao *et al.*, 2003; García-Degano *et al.*, 2009).

En campo, los productos a base de Bt que son aplicados para el control de las plagas, se van degradando a través del tiempo por efectos ambientales, tales como la temperatura, la luz solar, lluvia, el viento, entre otros factores. En el caso de las plantas Bt, las concentraciones de las toxinas se reducen a medida que las plantas van madurando; generalmente las plantas transgénicas producen mayor concentración de toxinas Bt en las primeras etapas de sus desarrollo, y se reduce a partir de la etapa de floración y fructificación. Los insectos se exponen a concentraciones bajas (dosis subletales) de proteínas Bt cuando los productos comerciales a base de Bt se degradan a través del tiempo por acción de éstos factores ambientales, así como a las concentraciones bajas de toxinas que expresan las plantas transgénicas. A simple vista, los efectos de estas dosis subletales son imperceptibles, sin embargo, de alguna manera pueden afectar a mediano y largo plazo a las poblaciones de insectos que son expuestas, lo que debe repercutir en la

disminución del desarrollo de las larvas, pupas y adultos, así como en una baja tasa de reproducción. Estos efectos de las dosis subletales son las que habría que ser estudiados.

2.5. EFECTOS SUBLETALES

Existen estudios sobre efectos subletales en plagas importantes, tanto en larvas como en adultos. Estos efectos incluyen retraso o aceleración en el tiempo de desarrollo (Adel y Sehnal, 2000; Birddinger *et al.*, 2006), pérdida de peso de larvas y pupas (Pineda *et al.*, 2007; Zamora *et al.*, 2008), mortalidad y deformación de pupas (Gobbi *et al.*, 2000 y Pineda *et al.*, 2004) y deformaciones de las alas (Trisyono y Chippendale, 1998; Sundaram *et al.*, 2007).

Sutherland *et al.* (1967), señalan que el término “Subletal” se puede usar para una dosis de insecticida que no causa la mortalidad en el insecto; mientras tanto, Brown (1971), en una investigación hizo énfasis en la condición genética que pudiera influir en el incremento o reducción de la fertilidad o fecundidad de los insectos tratados. Erb *et al.* (2001), revelaron que dosis subletales afectan el desarrollo el cual puede variar en el tiempo de ingestión pero no la fecundidad potencial de los parasitoides que puedan estar expuestos a su infección con Bt. Pakyari y Enkegaard (2013), al evaluar los efectos subletales de un producto químico (fenpropatrin) sobre los depredadores de la araña roja *Scolothrips longicornis* Priesner (Thysanoptera: Thripidae) alimentados con *Tetranychus urticae* Koch, encontraron que estos efectos son el acortamiento del ciclo vida, reducción en la oviposición y fecundidad. En la actualidad existen algunos estudios relacionados con la evaluación de los efectos subletales con insecticidas químicos, y poco son los trabajos que se han realizado para estudiar los efectos provocados por las dosis subletales de *Bacillus thuringiensis* en especies de plagas agrícolas.

2.6. LITERATURA CITADA

- Abd-elghafar, S. F., C. O. Knowles y M. L. Wall. 1993. Pyrethroid resistance in two field strains of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol. 86: 1651-1655.
- Abbas, A., R. G. Luttrell., H. N. Pitre y F. M. Davis. 1989. Distribution of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) Egg Masses cotton. Environ. Entomol. 18: 881-885.
- Adel, M. M y F. Sehnal. 2000. Azadirachtin potentiates the action of ecdysteroid agonist RH-2485 in *Spodoptera littoralis*. J. Insect. Physiol. 46: 267-274.
- Agudelo-Silva, F. 1986. Naturally occurring pathogens of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae collected in Venezuela. Florida Entomol. 69: 768-769.
- 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.
- Andara, J. 1990. Produccion masica de *Telenomus* sp. y algunas experiencias de campo. Seminario sobre alternativas para el control de gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Smith). Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado (Barquisimeto). Multigrafiado. p. 12-18.
- Angus, T. A. 1954. A bacterial toxin paralysing silkworm larvae. Nature. 173: 54-56.
- APRD, Arthropod Pesticide Resistance Database. 2014.
WWW.pesticideresistance.org
- Banda, T. J. F. 1981. Importancia económica de *Heliothis zea* (Boddie) determinación del umbral económico, distribución matemática y muestreo secuencial de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) en maíz criollo. Tesis Doctorado, ITESM Monterrey N.L: p. 74.
- Bauer, L. S. 1995. Resistance: A threat to the insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Florida Entomol. 783: 414-443.

**EFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN
Spodoptera frugiperda (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)**

- Ben-Dov, E., A. Zaritsky., E. Dahan., Z. Barak., R. Sinai y R. Manashherob. 1997. Extended screening by PCR for seven cry-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4883-4890.
- Bergvinson, D. J. 2005. *Heliothis/ Helicoverpa* Management Emerging Trends and Strategies for Future Research (pp. 7-37). Plymouth, UK. Science Publishers, Inc.
- Biddinger, D., L. Hull., H. Huang., B. McPherson y M. Loyer. 2006. Sublethal effects of chronic exposure to tebufenozide on the development, survival, and reproduction of the tufted apple bud moth (Lepidoptera: Tortricidae). *J. Econ. Entomol.* 99: 834-842.
- Borbolla, I. S. 1981. Estudio comparativo de insecticidas a diferentes dosis y número de aplicaciones para el control de gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) en maíz de temporal. *Agronomía en Sinaloa-UAS* 1:21-30.
- Blanco, C. A., A. P. Teran-Vargas., J. D. Lopez., J. V. Kauffman y X. Wei, X. 2007. Densities of *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in three plant hosts. *Florida Entomologist* 90: 742-750.
- Boucias, D. G. y J. C. Pendland. 1998. Principles of insect Pathology. Kluwer academic publishers, Boston. p. 537.
- Braman, S. K., R. R. Duncan., W. W. Hanna y M. C. Engelke. 2004. Turfgrass species and cultivars influences on survival and parasitism of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 97: 1993-1998.
- Brar, S., M. Verma., R. Tyagi y J. Valéro. 2006. Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Process Biochem.* 41: 323-342.
- Brattsten, L. B., C. W. Jr. Holyoke., J. R. Leeper, y K. F. Raffa. 1986. Insecticide resistance: challenge to pest management and basic research. *Sci.* 231: 1255-1260.
- 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.

**EFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN
Spodoptera frugiperda (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)**

- Broderik, N., K. Raffa y J. Handelsma. 2006. Bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 103: 549-57.
- Bruner, S. C. y J. R. Deschappelles. 1965. La palomilla del maíz o gusano de la yerba y medios de combate. Estación Experimental Agronómica. Santiago de las Vegas. Habana.
- Burkett, G. R., J. C. Schneider y F. M. Davis. 1983. Behavior of the tomato, *Heliothis zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae), on tomato. Environ. Entomol. 12: 905-910.
- Carpenter, J. E., J. R. Young, E. F. Knipling y A. N. Spark. 1983. Fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) inheritance of gamma-induced deleterious effects and potential for pest control. J. Econ. Entomol. 76: 378- 382.
- Carlton, B. C y J. M. González. 1985. The genetics and molecular biology of *Bacillus thuringiensis*. En: Dudnan, editors. The molecular biology of the bacilli. p. 211-249.
- CATIE, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 1990. Guía para el manejo integrado de plagas del cultivo del maíz. Turrialba, Costa Rica. p. 88.
- Cerón, J, A. Ortiz., R. Quintero., L. Guereca y, A. Bravo. 1995. Specific PCR primers directed to identify cryI and cryIII genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. Appl Environ Microbiol. 61: 3826-3831.
- Cifuentes, J.A. 1967. Oviposición del cogollero y daño de las larvas en plántulas de maíz y sorgo en invernadero. Agricultura Técnica de México. 2(7).
- Cowdey, C.C. 1923. The principal agricultural pest of Jamaica. Entomol. Bull. 3 :18-20.
- 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) (Lepidoptera: Noctuidea) en

- maíz. Informe técnico. Campo Experimental del Valle del Fuerte. INIFAP. Juan José Ríos, Sinaloa. p. 15.
- Crickmore, N., D. Zeigler., J. Feitelson., E. Schnepf., J. Van Rie y D. Lereclus. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol. Biol. Rev.* 62: 807-13.
- 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, D. Zeigler., E. Schnepf., J. Van Rie., D. Lereclus y J. Baum. 2008. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature: www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/.
- De Maagd, R., A. Bravo y N. Crickmore. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genet.* 17: 193-199.
- 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.
- Dicke, F. F. 1972. Philosophy on the biological control of insect pests. *J. Environ. Qual.* 1: 249-253.
- Ditman, L. P. y E.N. Cory. 1931. The corn earworm: biology and control. *MD Agric. Exp. Stn. Bull.* 328: 546-547.
- Erb, S. L., R. S. Bouchier, K. van Frankenhuyzen y S. M. Smith. 2001. Sublethal Effects of *Bacillus thuringiensis* Berliner subsp. *kurstaki* on *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) and the Tachinid Parasitoid *Compsilura concinnata* (Diptera: Tachinidae). *Environ. Entomol.* 30:1174-1181.
- Falcon, L. A. 1971. Use of bacteria for microbial control. *In* H.P. Burgess y N. W. Hussey (eds). *Microbial Control of Insects and Mites.* Academic Press, London. New York. 3: 67-95.
- 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.
- Faulkner, P. y D. G. Boucias. 1985. Genetic improvement of insect's pathogens: emphasis on the use of baculoviruses. Academic Press. Florida. USA. pp. 263-281.
- Fernández, R. y S. Clavijo. 1985. Efectos de los insecticidas (uno químico y otro biológico) sobre el parasitismo observado en larvas de *Spodoptera frugiperda* provenientes de parcelas experimentales de maíz. *Rev. Fac. Agron.* 13: 101-109.
- Fernández, W. L. y V. L. Estefania. 1974. Coconut water waste disposal of some desiccated coconut factories in the Philippines. *Phil. Agric.* 57: 359-363.
- Ferron, P. 1981. Pest control by the fungi *Beauveria* and *Metarhizium*. In: Buerges, H. ed. *Microbial control of pests and plants diseases 1970-1980*. p. 465-482. Academic Press, New York. p. 949.
- Fitt, G. P. 1989. The Ecology of *Heliothis* species in Relation to Agroecosystems. *Annual Rev. Entomol.*, 34: 17-52.
- Flood, B. R., R. Foster., B. Hutchison., y S. Pataky. 2005. Sweet corn, pp.38-63. In R. Foster and B. Flood [eds.], *Vegetable insect management*. Meister Media World-wide, Willoughby, OH.
- Fuxa, J. R., A. R. Ritcher, y F. Agudelo-Silva. 1988. Effect of host age and nematode strain on susceptibility of *Spodoptera frugiperda* to *Steirnerinema feltiae*. *J. Nematol.* 20: 91-95.
- Gaertner, F., T. Quick y Thompson M. 1993. CellCap: an encapsulation system for insecticidal biotoxin proteins. En: Kim, editor. *Advanced engineered pesticides*. Marcer Dekker p. 73-83.
- García Degano, M. F., M. G. Murúa, S. Prieto, M. L. Juárez, G. Gastaminza y E. willink. 2009. Cultivos transgénicos o genéticamente modificados (OGM): Maíces Bt: Claves para un adecuado manejo de la resistencia. *En: Gamboa D., D. Medina & M. Devani (eds.), El maíz en el NOA – Campaña 2008/2009, Publicación Especial EEAOC (39), EEAOC, Tucumán, pp. 111-115.*
- Gardner, A. W. y J. R. Fuxa. 1980. Pathogens for the suppression of the fall armyworm. *Florida Entomol.* 63: 439-447.

- Gardner, A. W., N. Raymond y D. S. Robert. 1984. The potential of microbial agents in managing populations of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). Florida. Entomol. 67: 325-332.
- Georghiou, G. P. y A. Lagunes-Tejeda. 1991. The occurrence of resistance to pesticides in arthropods. Food and Agriculture Organization (FAO), Universidad de Michigan. p. 318.
- 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.
- Gobbi, A., F. Budia., M. I. Schneider., P. Del Estal., S. Pineda y E. Viñuela. 2000. Acción del tebufenocida sobre *Spodoptera littoralis* (Boisduval), *Mythimna unipuncta* (Haworth) y *Spodoptera exigua* (Hübner). Bol. San Veg. Plagas 26: 119-127.
- Gómez, I, J. Sánchez., R. Miranda., A. Bravo y M. Soberón. 2002. Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix alpha-1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. FEBS Lett. 513: 242-2466.
- González-Cabrera, J. 2001. Plantas transgénicas con la capacidad insecticida de *Bacillus thuringiensis*. En: Caballero P, Ferré J, editores. Bioinsecticidas: fundamentos y aplicaciones de *Bacillus thuringiensis* en el Control Integrado de Plagas. p. 169-187.
- Griko, N. B., L. Rose-Young. , X. Zhang., L. Carpenter., M. Candas., M. A. Ibrahim., M. Junker y L. A. Jr. Bulla. 2007. Univalent binding of the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis* to a conserved structural motif in the cadherin receptor BT-R1. Biochemistry 2007; 46: 10001-10007.
- Grossi-de-Sa, M. F., M. Quezado de Magalhaes., M. S. Silva., S. M. Silva., S. C. Dias., E. Y. Nakasu., P. S. Brunetta., G. R. Oliveira., O. B. Neto., R. Sampaio de Oliveira., L. H. Soares., M. A. Ayub., H. A. Siqueira y E. L. Figueira. 2007..

- Susceptibility of *Anthonomus grandis* (cotton boll weevil) and *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm) to a Cry1Ia-type toxin from a Brazilian *Bacillus thuringiensis* strain. J. Biochem. Mol. Biol. 40: 773-782.
- Hamm, J. J., S. D. Pair y O. G. Marti. 1986. Incidence of host range of a new ascovirus isolated from fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Florida Entomol. 69: 524-531.
- Harding, J. A. 1976. *Heliothis* spp.: seasonal occurrence, hosts and host importance in the lower Rio Grande Valley. Environ. Entomol. 5: 666-668.
- Hardwick, D. F. 1965. The corn Earworm complex. Memoirs, Entomological Society of Canada. pp. 40-247.
- Hernández, C, R. Andrew., Y. Bel y F. Ferré. 2005. Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from potato-growing areas in Bolivia. J. Invertebr. Pathol. 88: 8-16.
- Hernández, M. J. L. 1989. Ecopathologie et degats de *Spodoptera 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.
- Höfte, H. y H. R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev. 53: 242-255.
- Hogg, D. B. y M. Calderon. 1981. Developmental times of *Heliothis zea* and *H. virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae and pupae in cotton. Environ. Entomol. 10: 177-179.
- Hossain, F., C. Pray., Y. Lu., J. Huang., C. Fan y R. Hu. 2004. Genetically modified cotton and farmers' health in China. Int J Occup Environ Health. 10: 296-303.
- Hutchison, W D., E. C. Burkness., B. Jensen., B. R. Leonard., J. Temple., D. R. Cook., R. A. Weinzierl., R. E. Foster., T. L. Rabaey B. R. Flood. 2007. Evidence for decreasing *Helicoverpa zea* susceptibility to pyrethroid insecticides in the Midwestern United States. Plant Health Progress, available online:<http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/symposium/hzea/dec rease/>.

- Jassic, J. y M. Reinés. 1974. Estudio experimental de la influencia de la temperatura de la palomilla del maíz. *Ciencias*. 44:1-19.
- Jiménez-Juárez, N., C. Muñoz-Garay., I. Gómez., G. Saab-Rincón., J. Damián-Almazo., S. Gill., M. Soberon y A. Bravo. 2007.. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab mutants affecting oligomer formation are non-toxic to *Manduca sexta* larvae. *J. Biol. Chem.* 282: 21222-21229.
- Johnson, A. W., M. E. Snook, and B. R. Wiseman. 2002. Green leaf chemistry of various turfgrass: differentiation and resistance to fall armyworm. *Crop Sci.* 42: 2004-2010.
- Juárez-Pérez V, M. Ferrandis y R. Frutos. 1997. PCR-based approach for detection of novel *Bacillus thuringiensis* cry genes. *Appl Environ Microbiol.* 63: 2997-3002.
- Kalman S, Kiehne K, Cooper N, Reynoso M, Yamamoto T. 1995. Enhanced production of insecticidal proteins in *Bacillus thuringiensis* strains carrying an additional crystal protein gene in their chromosomes. *Appl Environ Microbiol.* 61: 3063-3068.
- King, A.B.S y J. L. Saunders. 1984. Plagas Invertebradas de Cultivos Anuales Alimenticios en America Central. TDR, CATIE. 182 pp.
- Kim, H. 2000. Comparative study of the frequency, flagellar serotype, crystal shape, toxicity, and cry gene contents of *Bacillus thuringiensis* from three environments. *Curr. Microbiol.* 41: 250-256.
- Khetan S. 2001. Bacterial Insecticide: *Bacillus thuringiensis*. En: Khetan editor. *Microbial Pest Control*. p. 14.
- Koziel, M. K., F. L. Belang, C. Bowman, N. B. Carozzi., R. Crenshaw., L. Crossland., J. Dawson., N. Desai, M. Hill, S. Kadwell., K. Launis, K. Lewis., D. Addox, K. Mcpherson., M. R. Mefhji., E. Merlin., R. Rhodes., G. W. Warren., M. Wright y S. Evola. 1993. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology.* 11: 194-200.

- Knowles, H. B. y J. A. T. Dow 1993. The crystal delta-endotoxins of *Bacillus thuringiensis* models for their mechanism of action on the insect gut. *Bioessays*. 15: 469-476.
- Kumar, H y J. A. Mihm. 2002. Fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae), southwestern corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) and sugarcane borer (Lepidoptera: Pyralidae) damage and grain yield of four maize hybrids in relation to four tillage systems. *Crop Protection* 21: 121-128.
- Laffoon, J. L. 1960. Insects listed by scientific name. *Bull. Entomol Soc. Am.* 6: 192-207.
- Lagunes T. A., M. C. Rodríguez y R. R. Domínguez. 1985. Plagas del maíz en la mesa central. Centro de Entomología y Acarología, Colegio de Postgraduados, México: 18-21.
- Landazabal, J., F. Fernández y A. Figueroa 1973: Control biológico de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), con el nematodo: *Neoaplectana carpocapsae* en maíz *Zea mayz*. *Acta Agron. (Colombia)*. 23: 41-70.
- León-García, I. 2009. Detección de *Sphenophorus venatus vestitus* Chittenden y manejo de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) sobre césped en Quintana Roo, México. Tesis de Doctorado en Ciencias, Colegio de Postgrados, Montecillo, Texcoco, Estado de México. P. 89.
- Levy, R. y D. H. Habeck. 1976. Descriptions of the larvae of *Spodoptera Frugiperda* and *Spodoptera latifascia* with a key to the mature *Spodoptera* larvae of the Eastern United States, (Lepidoptera: Noctuidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 69: 585-588.
- Lewis, R. y W. D. Rollinson. 1978. Effect of storage on the virulence of Gypsomoth nucleo polyhedrosis inclusion Bodies. *J. Econ. Entomol.* 71: 719-722.
- Lezama-Gutiérrez, R., 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.
- Lindgren, P. D., J. K. Westbrook., V. M. Bryant., J. R. Raulston. J. F., Esquivel y G. D. 1994. Origin of corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae) migrants as

- determined by Citrus pollen markers and synoptic weather systems. *Environ. Entomol.* 23: 562-570.
- 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. *Florida Entomol.* 82: 254-262.
- Lu, Y. y M. J. Adang. 1996. Distinguishing fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) strains using a diagnostic mitochondrial DNA marker. *Florida Entomologist.* 79: 48- 55.
- Luginbill, P. 1928. The fall armyworm. USDA. *Tech. Bull.* 34. 92.
- Mahilum, M., M. Ludwig., M. Madon y N. Becker. 2005. Evaluation of the present dengue situation and control strategies against *Aedes aegypti* in Cebu City, Philippines. *J. Vector Ecol.* 30: 277-283
- Mangat, B. S. y J. W. Apple. 1966. Corn Earworm Development in Relation to Temperature. *J. Econ. Entomol.* 59: 1005-1006.
- Martinez, A. M., P. Caballero., M. Villanueva., N. Miralles., I. San Martin., E. Lopez y T. Williams. 2004. Formulation with an optical brightener does not increase probability of developing resistance to *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus in the laboratory. *J. Econ. Entomol.* 97: 1202-1208.
- Martins, E. S., R. W. Aguiar., N. F. Martins., V. M. Melatti., R. Falcão., A. C. M. M. Gomes., B. M. Ribeiro y R. G. Monnerat. Recombinant Cry1Ia protein is highly toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis* Boheman) and fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). *J. Appl Microbiol.* 104: 1363-1371.
- Maxwell E, H. Fadamiro y J. McLaughlin. 2006. Suppression of *Plutella xylostella* and *Trichoplusia ni* in cole crops with attracticide formulations. *J. Econ. Entomol.* 99: 1334-1344.
- Metcalf, C. R y Flint. 1965. Insectos destructivos e insectos útiles. Primera Edición Española.
- Mitchell, E. R., H. R. Agee y R. R. Heath. 1989. Influence of pheromone trap color and design on the capture of male velvetbean caterpillar and fall armyworm moths (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Chemical Ecology* 15:1775-1784.

- Morón, A. M. y R. Terrón. 1988. Entomología práctica. Instituto de Ecología. México: 12, 373, 423.
- 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). Florida Entomol. 82: 263-271.
- McColloch, J. W. 1922. The attraction of *Chloridea obsoleta* Fabr. to the corn plant. J. Econ. Entomol. 15: 333-339.
- 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.
- Neunzig, H. H. 1963. Wild host plants of the corn earworm and the tobacco budworm in eastern North Carolina. J. Econ. Entomol. 56: 135-139.
- Pashey D. P. 1988. Current status of armyworm host strains. Florida Entomol. 71: 227-234.
- Pessaraki, M. 2007. Handbook of Turfgrass Management and Physiology. CRC Press. USA. 400 p.
- Pakyari., H. y A. Enkegaard. 2013. Lethal and Sublethal Effects of Fenprothrin on the Biological Performance of *Scolothrips longicornis* (Thysanoptera: Thripidae). J. Econ. Entomol. 106: 2371-2377.
- Pashey D. P. 1988. Current status of armyworm host strains. Florida Entomol. 71: 227-234.
- Pessaraki, M. 2007. Handbook of Turfgrass Management and Physiology. CRC Press. USA. p. 400.
- Pietrantonio, P.V., T. A. Juneke, 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.
- Piedra, F. 1974. Effect of different forage diets on the biology of *Spodoptera frugiperda* (Lep. Noctuidae). Cuban. J. Agric. Sci. 8: 99-103.
- Pineda, S., F. Budia., M. I. Schneider., A. Gobbi., E. Viñuela., J. Valle y P. Del Estal. 2004. Effect of two biorational insecticides, spinosad and methoxyfenozide, on

- Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) under laboratory conditions. J. Econ. Entomol. 97: 1906-1911.
- Pineda, S., M. I. Schneider., G. Smagghe., A. M. Martínez., P. Del Estal., E. Viñuela., J. Valle y F. Budia. 2007. Lethal and sublethal effects of methoxyfenozide and spinosad on *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol. 100: 773-780.
- Popov, P y Reinés, M.A.1975. Estudio de los daños ocasionados por el gusano *S.frugiperda* (Smith y Abbott) sobre el maíz (*Zea mays*).Ciencias, Serie II San. Veg. Universidad de la Habana. Cuba.
- Potter, A. D. 1998. Destructive Turfgrass Insect: Biology, Diagnosis and Control. Ann. Arbor Press Chelsea. Michigan. p. 345.
- Potter, A. D. 2008. Managing insect pest of sport fields: What does the future hold? Acta Horticulture 783: 48-498.
- Quaintance, A.L. y C. T. Brues. 1905. The cotton bollworm. USDA Bur. Entomol. Bull. 50: 1-112.
- Raulston, J. N., S. D. Pair, A. N. S. Parks, J. Luera, F. A. Pedraza, J. Pérez M, R. Rodríguez, H. Carrillo, R. Archundia y F. Herrera.1986. Fall armyworm distributions and population dynamics in the Texas Mexico. Gulf Coast Area. Florida Entomol. 69:455-468.
- Reinert, J. A., M. C. Engelke., J. C. Reed., S. J. Maranz y B. R. Wise-man. 1997. Susceptibility of cool and warm season turfgrasses to fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. Int. Turfgrass Soc. Res. J. 8: 1003-1011.
- Reed, W., Cadona, C., Sithanatham, S., Lateef, F. 1986. Chickpea insect pest and their control. In Saxena, M y K. Singh (Eds.). The Chickpea. CAB International, Wallingford, U.K, 399 pp.
- Richter, A. R. y J. R. Fuxa. 1990. Effect of *Steinernema feltiae* on *Spodoptera frugiperda* and *Heliothis zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in corn. J. Econ. Entomol. 83: 1286-1291.
- Roca, C. 2002. Manejo de resistencia de insectos en maíces *Bt*. En: Vaquero, P. (ed.), Guía Dekalb del cultivo de maíz, Monsanto Argentina S.A., Buenos Aires, pp. 136-140.

- Rojas, J. C., A. Virgen y E. A. Malo. 2004. Seasonal and nocturnal flight activity of *Spodoptera frugiperda* males (Lepidoptera: Noctuidae) monitored by pheromone traps in the coast of Chiapas, Mexico. *Florida Entomol.* 87: 496-503.
- Roush, R. T. y J. A. McKenzie. 1987. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. *Ann. Rev. Entomol.* 32: 361-380.
- Ruiz de Escudero, I., A. Estela, M. Porcar, C. Martínez, J. A. Oguiza, B. Escriche, J. Ferré y P. Caballero, 2006. Molecular and insecticidal characterization of a cry11 protein toxic to insects of the families Noctuidae, Tortricidae, Plutellidae, and Chrysomelidae. *Applied Environmental Microbiology* 72: 4796–4804.
- Sandstrom, M. A., D. Changnon y B. R. Flood.. 2007. Improving our understanding of *Helicoverpa zea* migration in the Midwest: assessment of source populations. *Plant Health Prog.*
- 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. Director: Benintende G.
- Sauka, D. H. y G. B. Benintende. 2008. *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Rev. Argentina de Microbiología* 40: 124-140.
- Sauka, D., J. Cozzi y G. Benintende. 2005.. Screening of cry2 genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from Argentina. *Antonie van Leeuwenhoek.* 88: 163-165.
- SARH, 1993. Guía para cultivar maíz de riego en el estado de Colima. Instituto Nacional de investigaciones Forestales y Agropecuarias. Centro de Investigaciones del Pacífico Centro Colima. Folleto para productores. N. 4. Colima, Colima, México.
- Sharma, H. C., C.L. Gowda, P. C. Stevenson, T. J. Ridsill-Smith, S. L. Clement, G. V. Ranga Rao, J. Romeis y M. El Bouhssini. 2007. Host plant resistance and insect pest management in chickpea. In Yadav, S. et al (Eds.) *Chickpea breeding and managent*. CAB International, India. 638 pp.
- Sherman, F. 1914. Insect enemies of corn. The corn earworm (*Heliothis armigera*, Hüb.). N.C. Dept. Agr. Bul. 35. pp. 56.
- Silvain, J. F. 1987. *Spodoptera frugiperda*. SUAD-ORSTOM, Francia, 2 p.

**EFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN
Spodoptera frugiperda (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)**

- Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D.R. Zeigler y D.H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62. pp. 775–806.
- Smith, W.G. 1919. List of the insects and mites pests of sugarcane in Porto Rico. *Journal Dep. Agric. Puerto Rico.* 3:135-150.
- Smith, I. M., D. G. McNamara., P. R. Scott y K. M. Harris. 1992. *Helicoverpa zea*. Data sheets on quarantine pests. CAB International y EPPO.
- Smith, G., J. Merrick, E. Bone y D. Ellar D. 1996. Mosquitocidal activity of the CryIC delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 680-684.
- Souza, M., A. Roel., E. J. Arruda e A y S. Marques. 2007. Eficiencia de productos vegetais no controle da largarta-do cartucho-do milhp *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidopteran: Noctuidae). *Cienc. Agrotec.* 31: 326-331.
- Sparks, N. A. 1979. A review of the biology of the fall armyworm. *Florida Entomol.* 62: 82-87.
- Stadelbacher, E. A. 1980. Oviposition preference of the bollworm for species of early-season host plants in the delta of Mississippi. *Environ. Entomol.* 9: 542-545.
- Sudbrink, D. L. y J. F. Grand. 1995. Wild Host Plants of *Helicoverpa zea* and *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) in Eastern Tennessee. *Environ. Entomol.* 24: 1080-1085.
- Sundaram, M., S. R. Palli., G. Smagghe., I. Ishaaya., Q. L. Feng, M. Primavera., W. L. Tomkins., P. J. Krell y A. Retnakaran. 2002. Effect of RH-5992 on adult development in spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 32: 225-231.
- Tabashnik, B. 1994. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Ann Rev Entomol.* 39: 47-79.
- Tanada, H y K. Kaya. 1993. *Insect pathology*. Academic Press, Inc. New York. p 666.
- Taylor, R., J. Tippett., G. Gibb., S. Pells., D. Pike., L. Jordan y S. Ely. 1992. Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. *Mol Microbiol.* 6: 1211-1217.

**EFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN
Spodoptera frugiperda (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)**

- 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.
- Trisyono, A. y M. Chippendale. 1997. Effect of the nonsteroidal ecdysone agonists, methoxyfenozide, and tebufenozide, on the European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae). J. Econ. Entomol. 90: 1486-1492.
- UC-IPM, University of California Integrated pest management for cotton in the western region of the United States. 2nd ed. 1996. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources Publication 3305 Oakland, CA. Online adaptation: (<http://www.ipm.ucdavis.edu/PMG/FIG/cot-worms.html>).
- Uribe, D, W. Martínez y J. Cerón. 2003. Distribution and diversity of cry genes in native strains of *Bacillus thuringiensis* obtained from different ecosystems from Colombia. J. Invertebr. Pathol. 82: 119-27.
- Vaeck, M., A. Reynaerts., H. Höfte., S. Jansens., M. De Beuckeleer., C. Dean., M. Zabeu., M. Van Montagu y J. Leeman . 1987. Transgenic plants protected from insect attack. Nature. 328: 33-37.
- Van Dine, D.L. 1913. The insects affecting sugarcane in Porto Rico. J. Econ. Entomol. 6:251- 257.
- 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.
- Villa, M. y E. A. Catalán. 2004 Determinación de estadios larvales de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) para la construcción de un modelo de predicción. Folia Entomológica Mexicana. 43: 307-312.
- Vivas, L. 2003. Plagas agrícolas de Venezuela: Artrópodos y vertebrados: gusano ejército *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) 1797. Editorial Entomología Venezolana. Venezuela. p. 147.

**EFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN
Spodoptera frugiperda (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)**

- Walton, W. R. y P. Luginbill. 1917. The fall armyworm, or grass worm, and its control. USDA Farmers Bull: 752: 3-12.
- Wiseman B. R., N. W. Widstrom y W. W. McMillian. 1977. Ear characteristics and mechanism of resistance among selected corn earworm. Florida Entomol. 60: 97-104.
- Yu, S. J. 1991. Insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). Pestic. Biochem. Physiol. 39: 84-91.
- Yu, S. J. 1992. Detection and biochemical characterization of insecticide resistance in Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol. 85: 675-682.
- Zalom, F., L. T. Wilson y M. P. Hoffmann. 1986. Impact of feeding by tomato fruitworm, *Heliothis zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae), and beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae), on processing tomato fruit quality. J. Econ. Entomol. 79: 822-826.
- Zamora, M. C., A. M. Martínez, M. S. Nieto., M. I. Schneider., J. I. Figueroa y S. Pineda. 2008. Actividad de algunos insecticidas biorracionales contra el gusano cogollero. Rev. Fitotec. Mex. 31: 351-357.
- Zhang, X., M. Candas., N. Griko., R Taussig y L. Jr. Bulla. 2006. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. Proc Natl Acad Sci USA. 103: 9897-9902.
- 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.
- Zhao. J., J. Cao., Y. Li., H. Collins., R. Roush., E. Earle y A. Shelton. 2003. Transgenic plants expressing two *Bacillus thuringiensis* toxins delay insect resistance evolution. Nat. Biotechnol. 21: 1493-1497.

III. JUSTIFICACIÓN

Los insectos plaga en México y en todo el mundo son el principal problema que el hombre sigue enfrentando en la agricultura, debido a que tienen una gran adaptabilidad a muchas condiciones ambientales. El control químico contra estos insectos resulta cada vez más complicado y en la mayoría de veces decepcionante, la principal causa es la resistencia a los plaguicidas químicos convencionales.

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 son usados como control de plagas agrícolas y forestales. Se ha reportado que el uso de estos productos a base de Bt han logrado controlar en gran medida diversas plagas de importancia económica como, gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* y gusano elotero *Helicoverpa zea*. Estos insectos son altamente polívoros que causan daños a cultivos como: maíz, tabaco, algodón, frutales, flores, etc. Estas plagas evitan el desarrollo de las plantas e incluso pueden ocasionar su muerte.

En la genética, han desarrollado plantas transgénicas (plantas Bt) portadoras del gen de *B. thuringiensis*, convirtiéndolas en plantas insecticidas. Sin embargo, también existen productos comerciales (bioinsecticidas) que pueden ser aplicables de manera directa a las plantas, pero debido a los efectos meteorológicos como: las altas temperaturas, la lluvia, el viento, entre otros factores, las concentraciones de la toxina que expresan dichas plantas y aquellos productos comerciales a base de Bt se degradan, y no causan el mismo efecto (letal). De ahí la importancia de conocer los efectos subletales que las proteínas de Bt pueden provocar en gusano cogollero y gusano elotero. Debido a la importancia de estas plagas, muchos estudios se han enfocado a su control. Existen reportes de investigación relacionados con *B. thuringiensis* y sus efectos letales que provocan en estas especies, pero son escasos los estudios relacionados con los efectos subletales que provoca *B. thuringiensis* en gusano cogollero y gusano elotero con las toxinas Cry2Ab y Cry1Ac.

Por ello, conocer que efectos provocan las concentraciones subletales, servirá para determinar y demostrar que *B. thuringiensis* puede estar actuando a pesar de no estar presente en altas concentraciones, debido a que los individuos podrían verse afectados, mostrando así reducción en los niveles de población de estos insectos a mediano o largo plazo, lo que puede afectar sus diferentes estados de desarrollo y como consecuencia una tasa baja de reproducción. Por estas razones los efectos subletales deben ser estudiados.

En base a lo anterior, se implementó en el laboratorio de Entomología y Acarología del Centro Universitario UAEMex Tenancingo un proyecto de investigación para evaluar los posibles efectos subletales de las proteínas Cry2Ab y Cry1Ac de *B. thuringiensis* en gusano cogollero y gusano elotero.

IV. HIPÓTESIS

Las concentraciones subletales de las proteínas Cry2Ab y Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* en larvas del gusano cogollero *S. frugiperda* y gusano elotero *H. zea*, afectan el desarrollo de larvas, pupas y adultos, reducen significativamente la población de la generación expuesta a la proteína, lo que disminuye además la tasa de reproducción de la siguiente generación.

V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general.

Evaluar los efectos subletales de las proteínas Cry2Ab y Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* en larvas de lepidópteros.

5.2. Objetivos específicos.

Evaluar los efectos subletales de las proteínas Cry2Ab y Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* en larvas de gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith).

Evaluar los efectos subletales de las proteínas Cry2Ab y Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* en larvas de gusano elotero *Helicoverpa zea* (Boddie).

Evaluar los efectos subletales de las proteínas Cry2Ab y Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* en gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) en la generación *F0* y producción de huevos y larvas en la generación *F1*.

Cabe aclarar que cada uno de los objetivos específicos fue trabajado individualmente en capítulos diferentes; es decir, este trabajo de investigación está integrado por tres capítulos.

**VI. CAPITULO 1.- EFECTO SUBLETAL DE LAS PROTEÍNAS Cry2Ab Y Cry1Ac
DE *Bacillus thuringiensis* BERLINER EN GUSANO COGOLLERO *Spodoptera
frugiperda* J. E. Smith.**

6.1. RESUMEN

El gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* J. E. Smith), es una plaga importante en cultivos básicos, frutícolas, hortícolas, forestales y ornamentales; su control se basa principalmente en el uso de insecticidas químicos. En la actualidad existen alternativas para el control biológico de esta plaga, las cuales no afectan al medio ambiente, tal es el caso de productos a base de la bacteria *Bacillus thuringiensis kurstaki* que ha sido ampliamente usados para el control de varias especies de insectos lepidópteros. El objetivo de este trabajo fue evaluar en condiciones de laboratorio los efectos subletales de las proteínas Cry2Ab y Cry1Ac de *B. thuringiensis kurstaki* en *S. frugiperda*. Los bioensayos consistieron en alimentar con dieta contaminada de diferentes concentraciones de las proteínas Cry2Ab y Cry1Ac a grupos de 150 larvas del gusano cogollero para cada proteína. Las concentraciones de la proteína Cry2Ab usadas fueron: 0.001, 0.01, 0.1, 1, 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y un testigo absoluto; en el caso de la proteína Cry1Ac, además de las concentraciones usadas en la Cry2Ab, con excepción de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, se usaron también las concentraciones de 10 y 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, en total se utilizaron 1950 larvas neonatas (larvas ≤ 12 h de edad) por los dos bioensayos. Con la finalidad de reproducir nuevamente los resultados de los bioensayos, posteriormente se realizaron bioensayos únicamente con dos concentraciones (0.01 y 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y un testigo absoluto para las dos proteínas. En cada concentración se usaron 100 larvas y se hicieron tres repeticiones, en total se usaron 900 larvas neonatas por cada proteína. Los resultados indicaron que la mortalidad de larvas, pupas y adultos se incrementaron al aumentar las concentraciones de ambas proteínas y también a través del tiempo, se prolongó el ciclo de vida de los insectos para alcanzar los estados de pupa y adulto.

En el caso de la proteína Cry2Ab, la mortalidad en la concentración más alta (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) fue del 60.3% a los 24 días, y la mortalidad de las pupas fue de 81.1% con 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, el peso entre el testigo y la concentración más alta se redujo; a los tres días, las larvas pesaron 1.6 mg, a los 12 días 135.9 mg, de pupas y adultos se

redujo 31.3 y 12.5 mg respectivamente, el ciclo de vida de pupas y adultos se prolongó en 2.5 y 4.8 días respectivamente con respecto al testigo. Para la proteína Cry1Ac, con la concentración más alta (50 µg mL⁻¹), el porcentaje de mortalidad a los 24 días fue del 70.0%, el peso entre el testigo y la concentración más alta se redujo; a los 3 días las larvas pesaron 1.5 mg, 12 días 205.3 mg, pupas y adultos en 53.7 y 27.8 mg respectivamente, y el ciclo de vida de pupas y adultos se prolongó en 2.7 y 5.1 días respectivamente con respecto al testigo.

Los bioensayos con dos concentraciones y un testigo realizados a manera de confirmación de los efectos de las proteínas, indican que la mortalidad de larvas, pupas y adultos se incrementaron al aumentar las concentraciones de la proteína y también a través del tiempo, se prolongó el tiempo para alcanzar los estados de pupa y adulto, se redujo el peso de larvas, pupas y adultos de los tratamientos en las dos proteínas.

Palabras clave: Proteínas, lepidóptero, ciclo de vida.

6.2. INTRODUCCIÓN

El gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) es una de las plagas importantes que se desarrolla en regiones tropicales y subtropicales (Rojas *et al.*, 2004), su distribución va desde el sur de Estados Unidos hasta Chile y Argentina (Álvarez y Sánchez, 1983), afecta a cultivos ornamentales, frutícolas, hortícolas y pastos (Fernández y Estefanía, 1974). El uso intensivo de insecticidas de amplio espectro pertenecientes al grupo de los piretroides y organofosforados (Cook *et al.*, 2004) usados en el control de este insecto, ha ocasionado el desarrollo de resistencia y están causando serios problemas ambientales (Colborn, 1995; Crowe y Booty, 1995; Hruska y Gould, 1997; Morillo y Notz, 2003), por esta razón, es indispensable estudiar nuevas alternativas para el control de esta plaga.

El gusano cogollero es atacado por enemigos naturales como *Trichogramma atopovitilia* Oatman y Platner (Trichogrammatidae) parasitoide de huevo, *Cotesia marginiventris* Cresson (Braconidae) parasitoide de larvas (Múrua y Virla, 2004), y también es atacado por Bacterias como *Bacillus thuringiensis* (Molina *et al.*, 2003).

B. thuringiensis Berliner, es la bacteria entomopatógena más conocida, estudiada y ampliamente utilizada como agente de control biológico, con un gran potencial en el manejo de poblaciones de insectos plaga (Aronson *et al.*, 1986; McClintock *et al.*, 1995). Más del 90% del mercado de bioinsecticidas incluye productos a base de esta bacteria (Glare y O'Callaghan, 2000). *B. thuringiensis* es una bacteria tóxica, forma δ -endotoxinas como inclusiones parasporales durante la esporulación (Aronson *et al.*, 1986; Gawron-Burke y Baum, 1991), las cuales se disuelven en el intestino medio del insecto liberando protoxinas que proteolíticamente se convierten en pequeñas moléculas tóxicas (Fast, 1974; Fast *et al.*, 1978; Huber y Luthy, 1981; Knowles *et al.*, 1984; Singh *et al.*, 1986; Gill *et al.*, 1992). En la actualidad, las δ -endotoxinas son consideradas venenos intestinales, por lo que deben ser consumidas por los insectos susceptibles (Know y Dow, 1993), y son producidas por alrededor de 100 subespecies de Bt (Sanahuja *et al.*, 2011). *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (HD-1) es por excelencia la cepa más utilizada para el control de insectos lepidópteros, plagas agrícolas y forestales. Esta cepa es hasta 200 veces más tóxica para algunas especies de lepidópteros, y se caracteriza por la portación de los siguientes genes *cry* antilepidópteros: *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry2Aa*, *cry2Ab* y *cry11a* (Sauka y Benintende, 2008). A la fecha, se han realizado múltiples estudios para evaluar los efectos letales de *B. thuringiensis*, y son pocos los estudios que existen indicando cuales son los efectos subletales que esta bacteria provoca. Estos efectos subletales son provocados al exponer los organismos vivos a concentraciones con sustancias tóxicas por debajo de la concentración que mata el 100%, sin embargo, tienen repercusiones en su desarrollo. En el caso de insecticidas convencionales, existen algunos trabajos que reportan los efectos subletales que estos ocasionan, por ejemplo, Reyes-Villanueva *et al.* (1990), encontraron que los mosquitos *Aedes aegypti* que se expusieron a concentraciones subletales del insecticida Abate® (Temephos) muestra una reducción en el número de huevos ovipositados por las hembras, lo cual contribuye a reducir el número de individuos de la población de este insecto. Por ello, el objetivo de esta investigación, fue determinar en condiciones de laboratorio los efectos subletales ocasionados por las proteínas *Cry2Ab* y *Cry1Ac* de *B. thuringiensis kurstaki* en gusano cogollero *S. frugiperda*.

6.3. MATERIALES Y MÉTODOS

Cría del gusano cogollero. Los experimentos fueron realizados con larvas de *S. frugiperda* provenientes de una colonia que se ha mantenido por más de tres años en el laboratorio de entomología del Centro Universitario UAEMex Tenancingo. Esta colonia se continuó criando en una cámara de cría en condiciones controladas: temperatura de $27\pm 1^\circ\text{C}$, humedad relativa del $75\pm 5\%$ y un fotoperiodo de 13:11 h luz: oscuridad. Las larvas se alimentaron con una dieta artificial (Fall Armyworm, Southland Products, Inc.) hasta obtener las pupas, las cuales se colocaron en jaulas entomológicas (25 x 25 x 35 cm) para la emergencia de los adultos, mismos que fueron alimentados con agua azucarada al 10% (agua destilada y azúcar). Las hembras ovipositaron en bolsas de papel de estraza del número 20, estas bolsas se cambiaron cada 24 horas durante el periodo de oviposición. Se obtuvieron larvas neonatas (larvas ≤ 12 h de edad) con las cuales se realizaron los bioensayos correspondientes.

Proteína. Para la proteína Cry2Ab se utilizó tejido de maíz modificado genéticamente y liofilizado que contienen la proteína a una concentración de 0.6%, y para la proteína Cry1Ac se utilizó el bioinsecticida comercial MVP II (Mycogen, Corp. San Diego CA) a 19.1%, formulación sólida que contiene una protoxina híbrida similar a la δ -endotoxina Cry1Ac de *B. thuringiensis* var. *Kurstaki*, expresada y encapsulada en *Pseudomonas fluorescens* (Gilroy y Wilcox, 1992).

Bioensayos. Los bioensayos consistieron en alimentar las larvas del gusano cogollero con dieta artificial contaminada con las siguientes concentraciones de la proteína Cry2Ab: 0.001, 0.01, 0.1, 1 y $5 \mu\text{g mL}^{-1}$; y con la proteína Cry1Ac las concentraciones fueron: 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 y $50 \mu\text{g mL}^{-1}$.

La alimentación con dieta contaminada fue en todo el estado larval y esta dieta se cambió cada 72 h (3 días) para evitar exponer las larvas a una proteína degradada. En los primeros seis días de evaluación, cada larva fue alimentada con 1 mL de dieta, en este tiempo, la dieta y las larvas fueron colocadas en charolas para bioensayos (Bio-Assay Tray Bio-BA-128: C-D Internacional, Inc) con 128 cavidades, en cada cavidad se colocó una larva neonata confinada con un plástico transparente autoadherible (PULL N' PEEL Tab Bio-Cv-16; C-D International, Inc.). Posteriormente, a partir del séptimo día, las larvas fueron alimentadas con 5 mL de

dieta, y colocadas en vasitos de plástico del número 0 (Envases Primo Cuevas® S.A. de C.V. Ecatepec, Estado de México, Méx.). Para favorecer el intercambio gaseoso de los vasitos, en la tapa se realizó una pequeña perforación. Al momento de transferir las larvas a la nueva dieta (cada 72 h), se evaluaron los porcentajes de mortalidad.

Las larvas fueron pesadas individualmente a los tres y 12 días, posteriormente se evaluaron otras variables como: tiempo (días) que alcanzaron el estado de pupa, peso de las pupas, tiempo (días) que llegaron al estado adulto y finalmente el peso de los adultos. Los porcentajes de mortalidad en los tratamientos se ajustó mediante el uso de la fórmula Abbott (Abbott, 1925):

$$\frac{(\% \text{mortalidad tratamiento} - \% \text{mortalidad testigo})}{(100 - \% \text{mortalidad testigo})} \times 100$$

Diseño experimental y análisis estadístico. Se utilizó el diseño experimental de bloques completos al azar con cinco tratamientos para la proteína Cry2Ab y seis para la Cry1Ac con sus respectivos testigos absolutos. Los experimentos se realizaron con tres repeticiones. Para cada tratamiento se iniciaron con 50 larvas neonatas. Posterior a estos experimentos, también se realizaron otros dos experimentos independientes donde sólo se usaron dos concentraciones y un testigo absoluto; el experimento fue repetido tres veces (con tres repeticiones). Las concentraciones usadas en las dos proteínas fueron de 0.01 y 1 µg mL⁻¹. Cabe aclarar que estas concentraciones ya habían sido incluidas en los primeros experimentos, los segundos experimentos se realizaron sólo con la finalidad de confirmar la consistencia de los resultados por los menos de las dos concentraciones de cada proteína. En estos últimos experimentos, el número de larvas neonatas usadas se elevó a 100 por concentración. En total, en cada experimento se utilizaron 900 larvas (100 larvas X 3 tratamientos X 3 repeticiones = 900 larvas neonatas). Los resultados se sometieron a un análisis de varianza y a una prueba de comparación de medias con Tukey con un nivel de significancia del 95% ($P \leq 0.05$) con el programa Infostat (Balzarini, 2008).

6.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PROTEÍNA Cry2Ab

Mortalidad. La mortalidad de las larvas se incrementó conforme aumentó la concentración de la proteína, y también a través del tiempo. Por ejemplo, a los tres días, en la concentración más baja ($0.001 \mu\text{g mL}^{-1}$) se registró el 3.3% de mortalidad, en el rango de 0.01 a $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, los porcentajes de mortalidad fluctuaron de 5.3 a 6.7%, mientras que en la concentración más alta ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) fue del 10%. A los 12 días (aproximadamente a la mitad del desarrollo larval), la mortalidad con las concentraciones más bajas (0.001, 0.01 y $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$) fueron del 12.4, 17.2 y 15.8% respectivamente y con las más altas (1 y $5 \mu\text{g mL}^{-1}$) se registró el 23.9 y 37.1%. A los 24 días, con la concentración más baja ($0.001 \mu\text{g mL}^{-1}$) la mortalidad fue del 29.5% y con $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ se registró el 62.8%. En todas la fechas, la mortalidad más bajas se registró en la concentración más baja, en las concentraciones intermedias (0.01, 0.1 y $1 \mu\text{g mL}^{-1}$) los porcentajes de mortalidad fueron similares o iguales entre las concentraciones bajas y con la concentración más alta (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 1).

En el estado de pupa, se registraron altos porcentajes de mortalidad, con la concentración más baja se registró el 64.6%, con 0.01 y $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ las mortalidades fueron estadísticamente iguales con 68.1 y 68.3%, le siguió la concentración más alta con 78.7% y el mayor porcentaje de mortalidad fue del 81.1% con $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 1). La mortalidad de las larvas y pupas se manifestó con mal formaciones y ennegrecimientos en las diferentes partes del cuerpo (Figura 1).

Cuadro 1. Porcentaje de mortalidad acumulada corregida a través del tiempo de larvas de *S. frugiperda* alimentadas con dieta contaminada con diferentes concentraciones de la proteína Cry2Ab de *B. thuringiensis*.

Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	Periodo larval (días)				
	3±E*	6±E*	9±E*	12±E*	15±E*
0.001	3.3±1.2a	6.7±3.1a	10.9±4.4a	12.4±2.0a	16.8±6.5a
0.01	5.3±3.1ab	12.0±2.0a	14.9±0.9ab	17.2±3.2a	28.4±4.2b
0.1	5.3±3.1ab	13.3±3.1a	14.9±4.0ab	15.8±3.3a	33.3±4.7bc
1	6.7±3.1ab	14.0±0.0ab	16.3±3.3ab	23.9±10.5ab	42.0±2.2cd
5	10.0±1.2b	21.3±4.2b	25.1±5.5b	37.1±5.1b	47.8±1.9d

*Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $P \leq 0.05$).
E Error Estándar de la media.

**EFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN
Spodoptera frugiperda (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)**

Continuación del Cuadro 1.

Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	Periodo larval (días)			Pupas $\pm E^*$
	18 $\pm E^*$	21 $\pm E^*$	24 $\pm E^*$	
0.001	24.0 $\pm 2.9^a$	27.6 $\pm 5.6a$	29.5 $\pm 10.8a$	64.6 $\pm 1.8a$
0.01	32.4 $\pm 6.9ab$	33.3 $\pm 6.1ab$	34.2 $\pm 4.9ab$	68.1 $\pm 3.6ab$
0.1	25.4 $\pm 6.2a$	29.2 $\pm 2.4a$	31.8 $\pm 5.0a$	68.3 $\pm 1.9ab$
1	43.4 $\pm 0.4bc$	43.8 $\pm 4.2bc$	46.2 $\pm 6.3ab$	81.1 $\pm 1.7c$
5	52.2 $\pm 4.6c$	52.8 $\pm 3.7c$	62.5 $\pm 19.4b$	78.7 $\pm 9.8bc$

*Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $P \leq 0.05$).
E Error Estándar de la media.

Peso de larvas a los 3 y 12 días. El peso de las larvas se redujo al aumentar la concentración de la proteína. A los tres días, el peso promedio de las larvas testigo fue de 2.4 mg y con 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pesaron 0.8 mg, es decir, 1.6 mg menos que las larvas testigo, mientras que con las concentraciones intermedias (0.001, 0.01 y 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) pesaron 2.1 mg en promedio y con 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ fue de 1.3 mg. A los 12 días, las larvas testigo pesaron 422.2 mg, con 0.001, 0.01 y 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ fueron de 363.3, 353.7 y 347.1 mg respectivamente y en las dos concentraciones más altas 1 y 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pesaron 288.7 y 286.3 mg respectivamente. Las larvas expuestas con 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pesaron 135.9 mg menos que las larvas testigo. Estadísticamente, el peso de larvas a los tres y 12 días no son significativamente diferentes entre las concentraciones intermedias (0.001, 0.01, 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) pero si diferentes entre el testigo y la concentración más alta (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 3).

Tiempo en llegar al estado de pupa. El tiempo requerido para que las larvas se desarrollaran al estado de pupa fue mayor conforme se incrementó la concentración de la proteína en la dieta, habiendo una diferencia de hasta 2.5 días entre el testigo y la concentración más alta (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Es decir, en el testigo las pupas se desarrollaron a los 15.5 días y en la concentración más alta, éstas se formaron a los 18 días. En las concentraciones intermedias 0.001, 0.01, 0.1 y 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ las pupas se formaron entre los 16 y 17 días. Estadísticamente, el tiempo para llegar al estado de pupa fue diferente entre el testigo, la concentración más baja (0.001 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y las concentraciones más altas (1 y 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 2).

Peso de pupas. En el testigo, las pupas pesaron 249.2 mg, con 0.001, 0.01, 0.1 y 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pesaron 240.5, 236, 230.9, 229.6 mg respectivamente, y con la concentración más alta (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) el peso fue de 217.9 mg, es decir, 31.3 mg

**EFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN
Spodoptera frugiperda (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)**

menos que el testigo, siendo estadísticamente diferentes el testigo, la concentración más baja ($0.001 \mu\text{g mL}^{-1}$) y las concentraciones más altas (1 y $5 \mu\text{g mL}^{-1}$), (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 3).

Cuadro 2. Efecto de diferentes concentraciones de la proteína Cry2Ab de *B. thuringiensis* en *S. frugiperda* sobre el tiempo de desarrollo (días) de larvas neonatas a pupa y adulto.

Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	N ¹	N ²	T ¹ ±E*	N ³	T ² ±E*
TESTIGO	150	77.3	15.5±0.3a	52.0	22.8±1.3a
0.001	150	55.3	16.4±0.7ab	18.7	25.8± 2.1b
0.01	150	52.0	16.5±0.6ab	16.0	26.8±1.9bc
0.1	150	53.3	17.0±0.8bc	16.7	26.6±1.6bc
1	150	40.0	17.5±0.3bc	10.0	27.2±2.2bc
5	150	29.3	18.0±0.5c	11.3	27.6± 2.4c

N¹ Número de larvas expuestas a las diferentes concentraciones de la proteína Cry2Ab

N² Porcentaje de larvas que llegaron al estado de pupa.

N³ Porcentaje de larvas que llegaron al estado de adulto.

T¹ Tiempo transcurrido en días desde larvas neonatas al estado de pupa.

T² Tiempo transcurrido en días desde larvas neonatas al estado de adulto.

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

E Error Estándar de la media

Tiempo en llegar al estado de adulto. El tiempo requerido para que las larvas se desarrollaran al estado adulto, también fue mayor conforme se incrementó la concentración, las larvas testigo se desarrollaron a los 22.8 días, con $0.001 \mu\text{g mL}^{-1}$ 25.8 días, con 0.01, 0.1, $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ los adultos se formaron a los 26.8 días en promedio. La diferencia en tiempo para desarrollarse al estado adulto entre el testigo y la concentración más alta fue de 4.8 días, siendo estadísticamente diferentes entre sí (Tukey, $P \leq 0.05$), pero iguales entre las concentraciones intermedias con 0.01, 0.1, $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Cuadro 2).

Cuadro 3. Peso promedio de larvas a los 3 y 12 días, peso de pupas y adultos de *S. frugiperda* alimentada con diferentes concentraciones de la proteína Cry2Ab de *B. thuringiensis*.

Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	Peso en mg			
	Larvas (3 días±E*)	Larvas (12 días±E*)	Pupas ±E*	Adulto±E*
TESTIGO	2.4±0.2a	422.2±49.3a	249.2±11.6a	50.4±3.6a
0.001	2.1±0.2ab	363.3±31.3ab	240.5±7.7ab	46.6±6.0ab
0.01	2.1±0.1ab	353.0±36.7ab	236.0±8.4ab	44.7±3.9abc
0.1	2.1±0.1ab	347.1±26.5ab	230.9±9.9bc	43.7±3.1abc
1	1.3±1.0ab	288.7±67.3b	229.6±7.9bc	41.7±2.5bc
5	0.8±1.2b	286.3±72.9b	217.9±17.8c	37.9±3.4c

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

E Error Estándar de la media.

**EFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN
Spodoptera frugiperda (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)**

Peso de adultos. Los adultos testigo pesaron 50.4 mg, con 0.001, 0.01, 0.1, 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$: 46.6, 44.7, 43.6 y 41.7 mg respectivamente, y en la concentración más alta (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) los adultos pesaron 37.9 mg, es decir 12.5 mg menos que los adultos testigos. Estadísticamente los pesos de los adultos fueron diferentes entre sí (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 3).

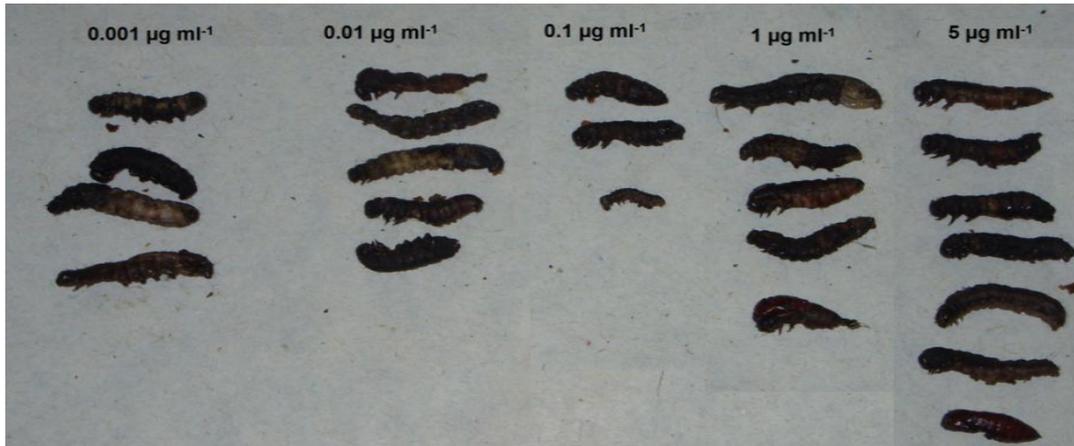


Figura 1. Mal formaciones en estado de larvas y pupas provocadas por concentraciones subletales de la proteína Cry2Ab de Bt en gusano cogollero a los 21 días de alimentarse con dieta contaminada.

BIOENSAYO CON DOS CONCENTRACIONES DE Cry2Ab Y UN TESTIGO

En este bioensayo se evaluaron dos concentraciones: 0.01 y 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de la proteína Cry2Ab y un testigo absoluto. Las dos concentraciones ya habían sido evaluadas anteriormente y el objetivo de incluirlos en este bioensayo, fue para evaluar la consistencia de los resultados obtenidos en el primer bioensayo a manera de confirmación. Para esto, en cada concentración y por repetición se usaron 100 larvas.

Mortalidad. Los porcentajes de mortalidad de las larvas se incrementaron a través del tiempo, por ejemplo, a los tres días, sólo se registró el 2.7% de larvas muertas en la concentración de 0.01 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y 5.7% con 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, pero a los 24 días, la mortalidad con la primera concentración fue de 27.7% y con 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de 54.2%. En este experimento sólo se observaron diferencias estadísticas entre las mortalidades de las dos concentraciones a los 9 y 24 días, en las otras fechas de evaluación fueron estadísticamente iguales. En el caso de la mortalidad de pupas,

**EFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN
Spodoptera frugiperda (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)**

en éste estado de desarrollo sí se registraron diferencias, con 0.01 µg mL⁻¹ la mortalidad fue de 32% y con 1 µg mL⁻¹ fue del 69.9% (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Porcentaje de mortalidad acumulada corregida a través del tiempo de larvas de *S. frugiperda* alimentadas con dieta contaminada con dos concentraciones de la proteína Cry2Ab de *B. thuringiensis*.

Concentración µg mL ⁻¹	Periodo larval (días)				
	3±E*	6±E*	9±E*	12±E*	15±E*
0.01	2.7±2.1a	9.4±2.7a	10.5±2.0a	13.6±8.6a	15.8±13a
1	5.7±2.0a	16.3±5.7a	24.9±8.2b	27.0±14.4a	37.3±11.7a

*Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $P \leq 0.05$).
E Error Estándar de la media.

Continuación del Cuadro 4.

Concentración µg mL ⁻¹	Periodo larval (días)			
	18±E*	21±E*	24±E*	pupas
0.01	23.0±15.1a	26.9±14.3a	27.7±14.7a	32.0±19.1a
1	30.9±20.5a	42.5±14.0a	54.2±4.1b	69.9±0.5b

*Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $P \leq 0.05$).
E Error Estándar de la media.

Peso de larvas a los 3 y 12 días. El peso de las larvas se redujo al incrementar la concentración de la proteína. A los tres días, el peso promedio de las larvas testigo fue de 2.4 mg, con 0. 1 µg mL⁻¹ pesaron 2 mg y con 1 µg mL⁻¹ pesaron 1.5 mg, es decir, 0.9 mg menos que las larvas testigo. A los 12 días, las larvas testigo pesaron 405.9 mg, con 0.01 µg mL⁻¹ fue de 352.0 mg, y con 1 µg mL⁻¹ fue de 287 mg. Entre el testigo y la concentración más alta la diferencia fue de 118.6 mg. Estadísticamente, los pesos a los tres y 12 días fueron iguales entre el testigo y la concentración más baja, pero diferentes con la concentración más alta (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 6).

Tiempo en llegar al estado de pupa. El tiempo requerido para alcanzar el estado de pupa fue mayor conforme se incrementó la concentración, las larvas testigo se desarrollaron al estado de pupa a los 15.6 días, con 0.01 µg mL⁻¹ fueron 16.6 días, y con 1 µg mL⁻¹ 17.5 días. Es decir, entre el testigo y la concentración más alta, la diferencia fue de 1.9. Estadísticamente, el tiempo de desarrollo para llegar al estado de pupa fueron diferentes entre las concentraciones (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 5).

Peso de pupas. En el testigo las pupas pesaron 251.0 mg, con 0.01 µg mL⁻¹ fue de 326.0 mg, con 1 µg mL⁻¹ el peso fue de 222.0 mg, es decir, 29.0 mg menos

**EFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN
Spodoptera frugiperda (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)**

entre el testigo y la concentración más alta. Estadísticamente el peso de pupas fue diferente entre las diferentes concentraciones (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 6).

Tiempo en llegar al estado de adulto. En el testigo, las larvas tardaron 22.3 días en promedio para desarrollarse al estado adulto, con $0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$ el tiempo fue de 24.2 días, con $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ fue de 27.0 días, es decir, 4.7 días más entre el testigo y la concentración más alta ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$). Estadísticamente, el tiempo para que las larvas se desarrollaran al estado de adulto fueron diferentes entre sí (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 5).

Peso de adultos. En el testigo los adultos pesaron en promedio 50.8 mg, con $0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$ el peso fue 42.8 mg, y con $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de 40.0 mg, lo cual representó que entre el testigo y la concentración más alta la diferencia fue de 10.8 mg. Estadísticamente, el peso de los adulto en el testigo fue mayor y le siguieron los pesos registrados en las concentraciones de 0.01 y $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, los cuales fueron estadísticamente fueron iguales (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 6).

Cuadro 5. Efecto de dos concentraciones de la proteína Cry2Ab de *B. thuringiensis* en *S. frugiperda* sobre el tiempo de desarrollo (días) de larvas neonatas a pupa y adulto.

Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	N ¹	N ²	T ¹ ±E*	N ³	T ² ±E*
TESTIGO	300	82.0	15.6±0.4a	78.7	22.3±0.7a
0.01	300	57.7	16.6±0.9ab	54.7	24.2±1.7ab
1	300	37.3	17.5±0.5b	23.7	27.0±1.4b

N¹ Número de larvas expuestas a las diferentes concentraciones de la proteína Cry2Ab.

N² Porcentaje de larvas que llegaron al estado de pupa.

N³ Porcentaje de larvas que llegaron al estado de adulto.

T¹ Tiempo transcurrido en días desde larvas neonatas al estado de pupa.

T² Tiempo transcurrido en días desde larvas neonatas al estado de adulto.

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

E Error Estándar de la media.

Cuadro 6. Peso promedio de larvas a los 3 y 12 días, peso de pupas y adultos de *S. frugiperda* alimentada con dos diferentes concentraciones de la proteína Cry2Ab de *B. thuringiensis*.

Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	Peso en mg			
	Larvas (3 días±E*)	Larvas (12 días±E*)	Pupas ±E*	Adulto±E*
TESTIGO	2.4 ±0.1a	405.9±13.9a	251.0±8.6a	50.8±2.0a
0.01	2.0±0.2a	352.0±11.6a	236.0±6.6ab	42.8±6.4b
1	1.5±0.2b	287.3±39.1b	222.0±2.6b	40.0±1.1b

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

E Error Estándar de la media.

PROTEÍNA Cry1Ac

Mortalidad. La mortalidad de las larvas se incrementó conforme aumentaron las concentraciones de la proteína, y también a través del tiempo. Por ejemplo, a los tres días, en la concentración más baja (0.001 $\mu\text{g mL}^{-1}$) se registró el 1.3% de mortalidad, en el rango de 0.01 a 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, los porcentajes de mortalidad fluctuaron de 4.0 a 6.0%, mientras que en las concentraciones más altas (10 y 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) fue del 8.6%. A mitad del desarrollo larval (a los 12 días), la mortalidad en el rango de concentraciones con 0.001 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ la mortalidad fluctuó entre el 5.5 y 20.2%, con 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ la mortalidad fue del 23.5% y con la concentración más alta (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) la mortalidad fue del 42.7%. A los 24 días, con la concentración más baja (0.001 $\mu\text{g mL}^{-1}$) se registró el 22.6% de mortalidad, en el rango de concentraciones con 0.01 a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ la mortalidad fue del 24.6 al 46.9% y con 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ se registró el 70.0% de mortalidad. En todas la fechas, la mortalidad más baja se registró en la concentración más baja, en las concentraciones intermedias (0.01, 0.1 y 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) los porcentajes de mortalidad fueron similares o iguales entre las concentraciones bajas y con la concentración más alta de proteína (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 7). En el estado de pupa, se registraron altos porcentajes de mortalidad, con la concentración más baja (0.001 $\mu\text{g mL}^{-1}$) se registró el 50.0%, con 0.01 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 56.1%, con 0.01 $\mu\text{g mL}^{-1}$ las mortalidades fueron estadísticamente iguales con 63.4%, le siguió 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ con el 67.1% y el mayor porcentaje de mortalidad fue del 96.4% con 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 7).

Cuadro 7. Porcentaje de mortalidad acumulada corregida a través del tiempo de larvas de *S. frugiperda* alimentadas con dieta contaminada con diferentes concentraciones de la proteína Cry1Ac de *B. thuringiensis*.

Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	Periodo larval (días)				
	3 \pm E*	6 \pm E*	9 \pm E*	12 \pm E*	15 \pm E*
0.001	1.3 \pm 1.2a	6.0 \pm 4.0a	5.6 \pm 1.3a	5.5 \pm 1.0a	9.4 \pm 6.1a
0.01	4.0 \pm 2.0ab	8.0 \pm 3.4a	5.5 \pm 2.2a	11.8 \pm 6.9a	16.7 \pm 8.2a
0.1	6.0 \pm 2.0ab	8.7 \pm 4.1ab	8.2 \pm 3.9a	7.6 \pm 4.0a	18.3 \pm 5.4a
1	6.0 \pm 2.0ab	16.8 \pm 6.7ab	18.6 \pm 8.5a	20.2 \pm 9.9a	22.9 \pm 5.0a
10	8.6 \pm 2.3b	20.1 \pm 2.2bc	18.7 \pm 1.7a	23.5 \pm 7.1ab	27.6 \pm 11.5a
50	8.6 \pm 3.1b	28.9 \pm 4.3c	37.5 \pm 11.5b	42.7 \pm 12.7b	49.5 \pm 6.0b

*Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $P \leq 0.05$).
E Error Estándar de la media.

**EFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN
Spodoptera frugiperda (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)**

Continuación del Cuadro 7.

Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	Periodo larval (días)			
	18 \pm E*	21 \pm E*	24 \pm E*	Pupas \pm E*
0.001	11.6 \pm 10.1a	14.4 \pm 11.7a	22.6 \pm 20.7a	50.0 \pm 3.1a
0.01	25.8 \pm 13.8ab	23.8 \pm 14.4a	24.6 \pm 13.4ab	56.1 \pm 2.9 ab
0.1	23.3 \pm 2.9ab	22.0 \pm 7.5a	33.1 \pm 10.7ab	63.4 \pm 3bc
1	32.5 \pm 16.4ab	36.6 \pm 21.6b	38.3 \pm 24.3ab	63.4 \pm 2bc
10	37.5 \pm 2.5ab	41.7 \pm 9.4ab	46.9 \pm 7.0ab	67.1 \pm 3.1c
50	55.0 \pm 15.2b	63.2 \pm 16.3b	70.0 \pm 18.9b	96.4 \pm 3.6d

*Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $P \leq 0.05$).
E Error Estándar de la media.

Peso de larvas a los 3 y 12 días. El peso de las larvas se redujo considerablemente al aumentar la concentración de la proteína. A los tres días, el peso promedio de las larvas testigo fue de 2.7 mg, en el rango de concentraciones de 0.001 a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ el peso promedio fluctuó entre el 2.3 y 1.5 mg, mientras que con la concentración más alta (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) pesaron 1.2 mg, es decir, 1.5 mg menos que las larvas testigo. A los 12 días, el peso promedio de las larvas testigo fue de 490.9 mg, en el rango de concentraciones de 0.001 a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ el peso promedio de las larvas fluctuaron entre 359.2 y 306.5 mg, con la concentración más alta (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) pesaron 285.6, es decir, 205.3 mg menos que el testigo. Estadísticamente, el peso a los tres y 12 días fueron diferentes entre los tratamientos (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 9).

Tiempo en llegar al estado de pupa. El tiempo promedio para que las larvas se desarrollaran al estado de pupa fue mayor conforme se incrementó la concentración. Las larvas testigo se desarrollaron a los 16.0 días, con 0.001 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a los 16.8, en el rango de concentraciones de 0.01 a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ se desarrollaron a los 17.4 días en promedio, mientras que con la concentración más alta (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) las larvas llegaron al estado de pupa a los 18.7 días. Es decir, entre el testigo y la concentración más alta hubo una diferencia de 2.7 días. Estadísticamente, el tiempo para que las larvas se desarrollaran al estado de pupa fue diferente entre el testigo y la concentración más alta, y entre las concentraciones intermedias (0.01 0.1 y 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) fueron iguales (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 8).

Peso de pupas. El peso promedio de las pupas testigo fue de 257.4 mg, con 0.001 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de 244.4 mg, en el rango de 0.01 a 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pesaron en promedio 230.3 mg, y en las concentraciones más altas 10 y 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ fueron de 222.8 y

**EFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN
Spodoptera frugiperda (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)**

203.7 mg respectivamente, es decir, aproximadamente 53.7 mg menos que en el testigo. Estadísticamente, el peso de las pupas fue diferente entre el testigo, la concentración baja (0.001 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y las concentraciones altas (10 y 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$), mientras que entre las concentraciones intermedias (0.01, 0.1 y 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) fueron iguales entre sí (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 9).

Cuadro 8. Efecto de diferentes concentraciones de la proteína Cry1Ac de *B. thuringiensis* en *S. frugiperda* sobre el tiempo de desarrollo (días) de larvas neonatas a pupa y adulto.

Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	N ¹	N ²	T ¹ ±E*	N ³	T ² ±E*
TESTIGO	150	78.0	16.0± 0.7a	54.7	21.9± 0.9a
0.001	150	60.7	16.8± 0.7ab	27.3	23.9± 1.14b
0.01	150	58.7	17.1± 0.7abc	24.7	24.5±1.1b
0.1	150	52.0	17.2± 0.5abc	20.0	24.6±0.3b
1	150	48.0	17.7± 0.8bc	20.7	25.8±1.3bc
10	150	41.3	17.6±0.5abc	18.0	25.6±0.04bc
50	150	23.3	18.7±0.7c	3.3	27.0±0.0c

N¹ Número de larvas expuestas a las diferentes concentraciones de la proteína Cry1Ac

N² Porcentaje de larvas que llegaron al estado de pupa.

N³ Porcentaje de larvas que llegaron al estado de adulto.

T¹ Tiempo transcurrido en días desde larvas neonatas al estado de pupa.

T² Tiempo transcurrido en días desde larvas neonatas al estado de adulto.

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

E Error Estándar de la media.

Cuadro 9. Peso promedio de larvas a los 3 y 12 días, peso de pupas y adultos de *S. frugiperda* alimentada con diferentes concentraciones de la proteína Cry1Ac de *B. thuringiensis*.

Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	Peso en mg			
	Larvas (3 días±E*)	Larvas (12 días±E*)	Pupas ±E*	Adulto±E*
TESTIGO	2.7±0.11a	490.9±19.4a	257.4±6.6a	54.4±1.6a
0.001	2.3±0.01bc	352.9±7.3b	244.4±6.4ab	46.4±1.6b
0.01	2.6± 0.2ab	334.2±8.7bc	235.4±4.3abc	44.5±2.5b
0.1	2.2± 0.02cd	316.9±4.3cd	229.2±2.9abc	41.3±2.1bc
1	2.1±0.02d	315.2±5.1cd	226.3±6.5abc	43.2±2.3bc
10	1.5±0.04e	306.5±2.6de	222.8±5.3bc	37.1±1.6c
50	1.2±0.05f	285.6±8.5e	203.7±27.6c	16.9± 5.2d

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

E Error Estándar de la media.

Tiempo en llegar al estado de adulto. En el testigo las larvas neonatas se desarrollaron al estado adulto a los 21.9 días en promedio, con 0.001, 0.01, 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a los 23.9, 24.5, 24.6 días respectivamente, con 1 y 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ se desarrollaron a los 25.7 días, y con 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ los adultos se desarrollaron hasta los 27.0 días en promedio. La diferencia en tiempo para que las larvas de desarrollaran al estado adulto entre el testigo y la concentración más alta fue de 5.1 días. Estadísticamente, el tiempo para que las larvas se desarrollaran al estado adulto fue diferente entre el

**EFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN
Spodoptera frugiperda (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)**

testigo, la concentración más baja ($0.001 \mu\text{g mL}^{-1}$) y las concentraciones altas (10 y $50 \mu\text{g mL}^{-1}$), pero las concentraciones con 0.01 , 0.1 y $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ fueron iguales entre sí (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 8).

Peso de adultos. El peso promedio de los adultos testigo fue de 54.4 mg, en el rango de 0.001 a $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ los adultos pesaron 43.8 en promedio, con $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ fue de 37.1 mg, mientras que con la concentración más alta ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) los adultos pesaron solamente 16.9 mg en promedio. La diferencia de peso entre el testigo y la concentración más alta fue de 27.8 mg. Estadísticamente, el peso de los adultos fue diferente entre el testigo, la concentración baja ($0.001 \mu\text{g mL}^{-1}$) y las concentraciones altas ($1, 10$ y $50 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 9).



Figura 2. Malformaciones en larvas de *S. frugiperda* provocadas por concentraciones subletales de la proteína Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* a los 21 días de alimentarse con dieta contaminada.

BIOENSAYO CON DOS CONCENTRACIONES DE Cry1Ac Y UN TESTIGO

En este bioensayo solamente se evaluaron las concentraciones de 0.01 y $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de la proteína Cry1Ac y un testigo absoluto. Las dos concentraciones ya habían sido evaluadas anteriormente y el objetivo de incluirlos en este bioensayo, fue para tratar reproducir los resultados obtenidos en el primer bioensayo a manera de confirmación.

Mortalidad. Las mortalidades de las larvas generalmente fueron iguales entre las dos concentraciones (0.01 y $1 \mu\text{g mL}^{-1}$), las únicas fechas donde hubo diferencias estadísticas fueron a los 12 y 24 días. A través del tiempo, la mortalidad se fue incrementando en cada fecha de evaluación, principalmente a los 3, 6, 9, 12 y 15 días, en esta última fecha, la mortalidad fue del 15.4% con $0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$ y del

**EFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN
Spodoptera frugiperda (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)**

19.7% con 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A los 18, 21 y 24 días las mortalidades fueron estables, fluctuaron entre el 24.3% con 0.01 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a los 24 días a 39.6% a los 21 días con 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 10). En cuanto a la mortalidad de las pupas, con 0.01 $\mu\text{g mL}^{-1}$, ésta fue de 53.3% y 61.9% con 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, estadísticamente fueron iguales (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 10).

Cuadro 10. Porcentaje de mortalidad acumulada corregida a través del tiempo de larvas de *S. frugiperda* alimentadas con dieta contaminada con dos concentraciones de la proteína Cry1AC de *B. thuringiensis*.

Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	Periodo larval (días)				
	3±E*	6±E*	9±E*	12±E*	15±E*
0.01	2.3±1.5a	1.7±2.2a	2.5±0.6a	8.0±1.8a	15.4±1.4a
1	4.0±1.0a	4.9±2.4a	6.8±3.3a	12.7±0.7b	19.7±6.6a

*Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $P \leq 0.05$).
E Error Estándar de la media.

Continuación del Cuadro 10.

Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	Periodo larval (días)			
	18±E*	21±E*	24±E*	pupas
0.01	27.7±1.2a	29.1±5.9a	24.3±1.7a	53.3±11.2a
1	31.9±2.5a	39.6±5.5a	37.0±5.4b	61.9±3.7a

*Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $P \leq 0.05$).
E Error Estándar de la media.

Peso de larvas a los 3 y 12 días. A los tres días, el peso promedio de las larvas testigo fue de 2.6 mg, con 0.01 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 2.4 mg y con 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ fue 1.6 mg, es decir, 1.0 mg menos que las larvas testigo, estadísticamente, el peso de las larvas en el testigo y la concentración baja fueron mayores que en la concentración más alta. A los 12 días, las larvas testigo pesaron en promedio 446.4 mg, con 0.01 $\mu\text{g mL}^{-1}$ fueron de 319 mg y con 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 307.0 mg, es decir, 139.6 mg menos que el testigo, estadísticamente, el peso promedio de las larvas en el testigo fue mayor que en las dos concentraciones evaluadas (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 12).

Tiempo en llegar al estado de pupa. En el testigo, las pupas se desarrollaron a los 15.3 días, con 0.01 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a los 16.3 días y con 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a los 17.0 días. La diferencia entre el testigo y la concentración más alta fue de 1.7 días. Estadísticamente, el tiempo de desarrollo al estado de pupa, el testigo fue diferente a las dos concentraciones evaluadas, es decir, en el testigo el tiempo fue menor que en las otras concentraciones (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 11).

Peso de pupas. En el testigo las pupas pesaron 279.7 mg en promedio, con 0.01 $\mu\text{g mL}^{-1}$ fue de 246.4 mg, y con 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ fue de 237.3 mg, es decir, 42.4 mg

**EFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN
Spodoptera frugiperda (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)**

menos que en el testigo. Estadísticamente, los pesos de las pupas fueron diferentes entre los tratamiento (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 12).

Tiempo en llegar al estado de adulto. En el testigo las larvas neonatas se desarrollaron al estado adulto a los 22.2 días, con $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ a los 24.3 mg, y con $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ se desarrollaron a los 25.7 días en promedio. La diferencia en tiempo entre el testigo y la concentración más alta fue de 3.5 días. Estadísticamente, el tiempo de desarrollo de los adultos en el testigo y las dos concentraciones fueron diferentes entre sí (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 11).

Peso de adultos. En el testigo, los adultos pesaron 52.8 mg en promedio, con $0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$ fue de 48.9 mg, y con la concentración más alta ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) el peso promedio fue de 43.6 mg, es decir, 9.2 mg menos que en el testigo. El peso de los adultos estadísticamente fueron diferentes entre sí (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 12).

Cuadro 11. Efecto de dos concentraciones de la proteína Cry1Ac de *B. thuringiensis* en *S. frugiperda* sobre el tiempo de desarrollo (días) de larvas neonatas a pupa y adulto.

Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	N ¹	N ²	T ¹ ±E*	N ³	T ² ±E*
TESTIGO	300	77	15.3±0.4a	56.3	22.2±0.2a
0.01	300	56	16.4±0.3b	26	24.3± 0.2ab
1	300	51.3	17.0±0.3b	21.3	25.7±0.6b

N¹ Número de larvas expuestas a las diferentes concentraciones de la proteína Cry1Ac.

N² Porcentaje de larvas que llegaron al estado de pupa.

N³ Porcentaje de larvas que llegaron al estado de adulto.

T¹ Tiempo transcurrido en días desde larvas neonatas al estado de pupa.

T² Tiempo transcurrido en días desde larvas neonatas al estado de adulto.

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

E Error Estándar de la media.

Cuadro 12. Peso promedio de larvas a los 3 y 12 días, peso de pupas y adultos de *S. frugiperda* alimentada con dos concentraciones de la proteína Cry1Ac de *B. thuringiensis*.

Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	Peso en mg			
	Larvas (3 días±E*)	Larvas (12 días±E*)	Pupas ±E *	Adulto±E*
TESTIGO	2.6 ±0.6a	446.4±18.5a	279.7±14.3a	52.8± 1.2a
0.01	2.4±0.5a	319.0±15.7b	246.4±6.0ab	48.9±4.5ab
1	1.6±0.01b	307.0±20.2b	237.3 ±7.5b	43.6± 3.8b

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

E Error Estándar de la media.

El nivel de daño en los diferentes estados de desarrollo de los insectos dependen de varios factores; por ejemplo, el nivel de susceptibilidad de una determinada especie de insecto a la toxina de *B. thuringiensis*, la patogenicidad de las toxinas, la concentración de la toxina, el tiempo de exposición o de alimentación

de las larvas con alimentos contaminados con la toxina y el estado del desarrollo del insecto en la cual se expone al tóxico. Para este estudio, se trabajó con el gusano cogollero, una especie en la cual ya está documentado que es sensible a las toxinas Cry1Ac y Cry2Ab de *B. thuringiensis*, donde se usaron larvas neonatas, debido a que son las más sensibles que cualquier otro estado de desarrollo. En cuanto a la variación de las concentraciones de las toxinas y tiempo de exposición, es posible predecir que a mayor concentración y mayor tiempo de exposición, los insectos susceptibles muestran mayor daño en todos sus estados de desarrollo. El daño de las toxinas en los insectos, cualquiera que sea su estado de desarrollo, se puede manifestar de muchas maneras. En este estudio por ejemplo, los daños ocasionados por las diferentes concentraciones subletales fueron evaluados a través de algunas variables, tales como: la mortalidad, reducción del peso de las larvas, pupas y adultos, tiempo requerido para la formación de las pupas y la emergencia de los adultos. Todos estos efectos subletales están muy relacionados con el mecanismo de acción de las toxinas de *B. thuringiensis*. De acuerdo con varios autores (Maagd *et al.*, 2001; Wang, 2003; Broderik *et al.*, 2006), durante el proceso de intoxicación de los insectos con toxinas de *B. thuringiensis*, ocurren las siguientes fases: 1) ingestión y solubilización del cristal proteínico formado por protoxinas, 2) activación de la protoxina, 3) difusión de la toxina activada a través de la membrana peritrófica del intestino medio, 4) unión de las toxinas a receptores específicos en la membrana del intestino medio, 5) inserción en la membrana y formación de poros, y 6) lisis celular y disrupción del epitelio del intestino medio. De acuerdo a lo anterior, el daño se ocasiona directamente en el estado de larva, y en éste estado de desarrollo se pueden presentar los efectos letales y subletales, mientras que en los estados de pupa y adulto se presentan los efectos subletales, y cuando éstos son severos puede conducir a la muerte de los individuos. Finalmente, tanto los efectos letales como subletales contribuyen en un momento dado a reducir la población de los insectos, y depende de la toxina que se trate, dosis y el tiempo de exposición. En este estudio, el efecto letal se presentó en las dos toxinas desde los primeros días de exposición de las larvas; por ejemplo, a los tres días, con $0.001 \mu\text{g mL}^{-1}$ la mortalidad con la Cry2Ab fue de 3.3% y con la Cry1Ac de 1.3%; a los 24 días de exposición, la mortalidad ya fue de 29.5% con la primera toxina y de 22.6% con la

segunda. En el caso de la concentración de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de la Cry2Ab, que fue la concentración más alta para esta toxina, a los 24 días, la mortalidad ya fue del 62.5%, y con la Cry1Ac cuya concentración más alta fue de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, la mortalidad fue del 70%. En esta última toxina, con $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ la mortalidad fue menor al 50%, ya que con $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ a los 24 días sólo fue 46.9%. Esto se debe a que la toxina Cry2Ab es más tóxica contra el gusano cogollero que con la Cry1Ac. Por otra parte, también se observó el efecto letal al incrementar la concentración de cada una de las toxinas. Con $0.001 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Cry2Ab, la mortalidad fue de 3.3% a los tres días, pero con $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, la mortalidad ya fue del 10%; en el caso de la toxina Cry1Ac, con $0.001 \mu\text{g mL}^{-1}$ la mortalidad fue del 1.3%, y con $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ fue del 8.6%. En general, en todas las fechas de evaluación se pudo observar menor porcentaje de mortalidad en las concentraciones más bajas, y mayor porcentaje en la concentración más alta. En el caso de la toxina Cry2Ab, en el segundo experimento donde sólo se evaluaron dos concentraciones (0.01 y $1 \mu\text{g mL}^{-1}$) y el testigo, la mortalidad de las larvas fueron similares con los resultados del primer experimento en las mismas concentraciones; por ejemplo, a los 24 días, con $0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$, en el primer experimento la mortalidad fue del 34.2% y el segundo experimento fue de 27.7%. Con la toxina Cry1Ac, en el primer experimento la mortalidad fue de 24.6% y en el segundo fue de 24.3%. Con la concentración de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, de igual forma, a los 24 días, con la toxina Cry2Ab, en el primer experimento fue de 46.2%, y en el segundo experimento de 54.2%. Para el caso de la toxina Cry1Ac, la mortalidad en el primer experimento fue del 38.3%, y en el segundo de 37%. Con estos ejemplos se confirma la consistencia de los resultados sobre los efectos letales de larvas del gusano cogollero de los dos experimentos realizados. En el caso de la mortalidad en el estado de pupa también fueron similares. En estudios realizados por Zeener de Polonia *et al.* (2005), reportan que la proteína Cry1Ac afecta el desarrollo de larvas de *S. frugiperda* provocando un porcentaje de mortalidad del 20.8% a los 24 días con $1 \mu\text{g mL}^{-1}$; por su parte, Eizaguirre *et al.* (2005), evaluaron los posibles efectos subletales de *B. thuringiensis* variedad Kurstaki (Dipel DF) sobre el desarrollo de *Sesamia nonagrioides* y señalan que la mortalidad de pupas fue del 20% al exponer las larvas a una concentración de 0.35 mg kg^{-1} .

**EFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN
Spodoptera frugiperda (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)**

El peso de las larvas también estuvo en función de la concentración y del tiempo de exposición. Con la toxina Cry2Ab, a los tres días, en todas las concentraciones todos los pesos estuvieron por debajo de los 2.4 mg, pero a los 12 días, las larvas incrementaron su peso significativamente, en el testigo las larvas pesaron 422 mg, mientras que con 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ el peso fue de 286.3 mg; la diferencia entre estos dos tratamientos fue de 136 mg. Con la toxina Cry1Ac, a los 12 días, en el testigo las larvas pesaron 490.9 mg, y con 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ el peso fue de 285.6 mg; la diferencia fue de 204.4 mg. Las larvas cuando ingieren una dosis baja de la toxina por un tiempo determinado, generalmente tienden a recuperarse debido a la regeneración de nuevas células intestinales, por lo que continúan con su alimentación, pero cuando ingieren una dosis mayor, se incrementa la cantidad de células intestinales dañadas, por lo que dejan de alimentarse parcialmente y eso se refleja en el bajo peso de las larvas. Cuando la dosis es muy alta y el tiempo de intoxicación es prolongado, las larvas pueden dejar de comer por completo y morir por inanición; razón por la cual, en este estudio se observó que a mayor concentración y mayor tiempo de exposición, las larvas redujeron su peso respecto al testigo. Los pesos también se redujeron en los estados de pupa y adulto como consecuencia del daño ocasionado en el estado larval, ya que en esta especie, las larvas son las que se especializan en la alimentación y acumulan más de 95% de sus reservas para continuar con su desarrollo al estado de pupa y adulto; en el estado adulto solamente se llegan a alimentar de algunos líquidos como agua y algunos néctares. Con la toxina Cry2Ab, las pupas testigo pesaron 249.2 mg, y los adultos 50.4 mg, mientras que con 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, las pupas pesaron 217 mg (32 mg menos que el testigo) y los adultos 37.9 mg (12.5 mg menos que el testigo). En el caso de la toxina Cry1Ac, las pupas testigo pesaron 257.4 mg y los adultos 54.4 mg, mientras que con 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, las pupas pesaron 203 mg (54.4 mg menos que el testigo) y los adultos 16.9 mg (37.5 mg menos que el testigo). De Sousa *et al.* (2011), evaluaron el efecto del algodón transgénico con la proteína Cry1Ac y algodón sin la proteína (algodón convencional) usando larvas de *S. frugiperda*, reportaron que el peso de las pupas que procedieron de larvas alimentadas con algodón transgénico pesaron sólo 42 mg y las pupas que procedieron de larvas alimentadas con algodón convencional pesaron 61.0 mg, es decir, una diferencia de

19 mg. Otro de los efectos subletales, es el retraso para alcanzar el estado de pupa y adulto. Las larvas, al detener parcial o completamente su alimentación, la cual depende de la concentración y el tiempo de exposición a la toxina, posiblemente también se afectan varias funciones fisiológicas relacionadas con su desarrollo, como por ejemplo, el proceso de muda y la metamorfosis (Stapel *et al.*, 1998). Las larvas del gusano cogollero debe mudar seis veces antes de ocurrir la metamorfosis para transformarse al estado de pupa y posteriormente al estado adulto (Borbolla, 1981). En el caso de la toxina Cry2Ab, en la concentración más alta $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, las pupas se formaron a los 18 días y los adultos a los 27.6 días, mientras que en el testigo, las pupas se formaron a los 15.5 días (2.5 días más rápido que con $5 \mu\text{g mL}^{-1}$) y los adultos a los 22.8 días (4.8 días más rápido que en con $5 \mu\text{g mL}^{-1}$). Con la Cry1Ac, en la concentración más alta $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, las pupas se formaron a los 18.7 días y en el testigo a los 16.0 días (2.7 días más rápido) y los adultos se formaron a los 27 días y en el testigo a los 21.9 días (5.1 días de diferencia). Los resultados de este estudio concuerdan con los reportados por Zarate *et al.* (2010), quienes evaluaron los efectos letales y subletales no precisamente de toxinas de *B. thuringiensis*, sino con un producto químico cuyo ingrediente activo es el Metoxifenoza en larvas de *S. frugiperda*, y reportan que los efectos son progresivos con el incremento de la concentración del producto, ya que con una CL_{10} la mortalidad acumulada fue del 12% y en la CL_{25} fue del 60% hasta antes de pupar, las larvas tratadas mostraron mayor mortalidad y menor peso de pupas, el tiempo de desarrollo de larvas también fue afectado, hubo presencia de pupas y adultos deformes en comparación a las larvas no tratadas. Dong *et al.* (2013), quienes evaluaron los efectos subletales de Spinosad sobre *Spodoptera exigua* reportaron que el periodo del desarrollo de las larvas se prolongó y como consecuencia los periodos de prepupa, pupa, longevidad de adultos y su fecundidad. Moreau y Bauce (2003), también evaluaron los efectos subletales usando *B. thuringiensis* en *Choristoneura fumiferana* Clemens, afirmando que el desarrollo larval se prologó en días y que se redujo el peso de pupas.

Por otra parte, es importante señalar los porcentajes de larvas que alcanzan el estado de pupa y el estado adulto. Por ejemplo, con la Cry2Ab, en el testigo, el 77% de las larvas se desarrollaron al estado de pupa; de los cuales, el 52% alcanzaron el

estado de adulto. Con la concentración de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, sólo el 29% de las larvas alcanzaron el estado de pupa (48% menos que el testigo) y el 11.3% el estado de adulto; es decir, 40.7% menos adultos que en el testigo. En general, para esta toxina (Cry2Ab), en la concentración más alta $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, sólo el 11.3% de las larvas se desarrollaron hasta el estado adulto, los cuales, se retrasaron 4.8 días respecto al testigo y su peso promedio fue de 12.5 mg menos que los adultos del testigo. En el caso de la toxina Cry1Ab, en el testigo, el 78% de las larvas se desarrollaron al estado de pupa; de los cuales, el 54.7% alcanzaron el estado de adulto. Con la concentración de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, sólo el 23.3% de las larvas alcanzaron el estado de pupa (30% menos que el testigo) y sólo el 3.3% se desarrollaron al estado adulto; es decir, 51.4% menos adultos que en el testigo. En general, para esta toxina (Cry1Ac), en la concentración más alta $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, sólo el 3.3% de las larvas se desarrollaron hasta el estado adulto, con 5.1 días de retraso respecto al testigo y el peso promedio de éstos adultos fueron 16.9 mg (37.5 mg menos que el testigo). Desde luego, en concentraciones bajas e intermedias, el impacto en el desarrollo de los insectos es menor que con las concentraciones más altas de cada una de las toxinas. Como se podrá observar, los efectos subletales, muchas veces son imperceptibles por el ser humano, pero en la realidad impactan sustancialmente en el desarrollo y en la densidad poblacional de los insectos. Para este estudio, los experimentos se realizaron en condiciones de laboratorio, pero las evaluaciones también deberán de hacerse en condiciones de campo en las aplicaciones de los productos comerciales de *B. thuringiensis* o en la plantas transgénicas, ya que en este escenario, son muchos los factores que podrían sinergizar la acción de las toxinas de *B. thuringiensis*, como por ejemplo, presencia de enemigos naturales, tales como los parasitoides, depredadores u otros entomopatógenos; y podrían ser más eficaz en el control de las plagas, o bien, podrían existir algunos factores que favorezcan la sobrevivencia de las plagas como es el escape a la exposición de las toxinas de Bt, mediante la alimentación de otras plantas hospederas o las condiciones ambientales que reducen la efectividad de las toxinas de *B. thuringiensis*.

6.5. CONCLUSIONES

Las concentraciones evaluadas de la proteína Cry2Ab y Cry1Ac de *B. thuringiensis* en larvas de *Spodoptera frugiperda* no ocasionaron el 100% de mortalidad, sin embargo afectaron significativamente el desarrollo de esta especie en todos sus estados de desarrollo. En el caso de la proteína Cry2Ab, la mortalidad de las larvas aumentó conforme se incrementaron las concentraciones de la proteína, a los 24 días la mortalidad fue del 62.5% en la concentración más alta ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) y del 29.5% con la concentración más baja ($0.001 \mu\text{g mL}^{-1}$). La mortalidad de pupas fue del 81.1% con $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Por otra parte, la diferencia en peso de las larvas entre el testigo y la concentración más alta a los 3 y 12 días fueron de 1.6 y 135 mg respectivamente, y la diferencia del peso en el estado de pupa fue de 31.3 mg y en el estado adulto de 12.5 mg. También se incrementó el tiempo para la formación de pupas y adultos con respecto al testigo, con $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ el incremento en tiempo para la formación de pupas fue de 2.5 días y para la emergencia de adultos de 4.8 días.

Los resultados del segundo bioensayo (dos concentraciones 0.01 y $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ y un testigo) para corroborar la consistencia de los resultados de primer bioensayo, confirmaron los resultados de los parámetros evaluados en el primer bioensayo, donde la mortalidad de pupas fue del 69.9%, el peso de larvas a los 3 días fue de 0.9 mg, y el peso a los 12 días de 118.6 mg, en la concentración más alta ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$), el peso de las pupas y adultos se redujo respecto al testigo en 29.0 y 10.8 mg y el tiempo de desarrollo al estado de pupa y adulto se incrementó en 1.9 y 4.7 días.

Para la proteína Cry1Ac, La mortalidad de las larvas aumentó conforme se incrementaron las concentraciones de la proteína, a los 24 días la mortalidad fue del 70.0% en la concentración más alta ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) y del 22.6% con la concentración más baja ($0.001 \mu\text{g mL}^{-1}$). La mortalidad de pupas fue del 96.4% con la concentración más alta. Por otra parte, la diferencia en peso de las larvas entre el testigo y la concentración más alta a los 3 y 12 días fueron de 1.5 y 205.3 mg respectivamente, y la diferencia del peso en el estado de pupa fue de 5.7 mg y en el estado adulto de 12.5 mg. También se incrementó el tiempo para la formación de pupas y adultos con respecto al testigo, con $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ el incremento en tiempo para la formación de pupas fue de 2.7 días y para la emergencia de adultos de 5.1 días.

Los resultados del segundo bioensayo (dos concentraciones 0.01 y 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y un testigo) para corroborar la consistencia de los resultados de primer bioensayo, confirmaron los resultados de los parámetros evaluados en el primer bioensayo, donde la mortalidad de pupas fue del 61.9%, el peso de larvas a los 3 días fue de 1.0 mg, y el peso a los 12 días de 139.6 mg, en la concentración más alta (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$), el peso de las pupas y adultos se redujo respecto al testigo en 42.4 y 9.2 mg y el tiempo de desarrollo al estado de pupa y adulto se incrementó en 1.7 y 3.5 días.

Los resultados de estos estudios confirman la hipótesis de que las concentraciones de las toxinas Cry1Ac y Cry2b por debajo de la dosis letal, afectan el desarrollo el desarrollo de los insectos en sus estados larvarios, pupa y adultos sustancialmente, lo cual, podría contribuir en la disminución de los individuos de la siguiente generación.

6.6. LITERATURA CITADA

- Abbott, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18: 265-267.
- Álvarez, R.J. A. y G. G. Sánchez. 1983. Variación en el número de instares de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). Rev. Col. Entomol. 9:43-49.
- Aronson, A. L., W. Beckman y D. Peter. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insects pathogens. Microbiol. Rev. 56: 1-24.
- Balzarini, M. G., L. González., M. Tablada., F. Casanoves., J. A. Di Rienzo y C. W. Robledo. 2008. Infostat. Manual del Usuario, Editorial Brujas, Córdoba, Argentina.
- Borbolla, I. S. 1981. Estudio comparativo de insecticidas a diferentes dosis y número de aplicaciones para el control de gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) en maíz de temporal. Agronomía en Sinaloa-UAS 1:21-30.
- Broderik, N., K. Raffa y J. Handelsma. 2006. Bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 103: 549-57.
- 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.

- Colborn, T. 1995. Pesticides-how research has succeeded and failed to translate Science into Policy: Endocrinological effects on wildlife. *Environ. Health Perspect.* 103: 81-86.
- Crowe, A. S. y W. G. Booty. 1995. A multi-level assessment methodology for determining the potential for groundwater contamination by pesticides. *Environ. Monitor. Assess.* 35: 239-261.
- De Sousa, R. F., L. T. Azeredo., B. N. A. Rogerio., F. F. Sales., J. J. L. Nascimento., M. J. Bruno., S. C. A. Domingues y Z. J. Cola. 2011. Feeding of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, on Bt transgenic cotton and its isolate. *Entomologia Experimentalis et Applicata.* 139: 207-2014.
- Dong, W., W. Yong-Ming., L. Hui-Yuan., X. Zheng , y M. Xue. 2013. Lethal and Sublethal Effects of Spinosad on *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 106: 1825-183.
- Eizaguirre, M., S. Tort., C. López y R. Albajes. 2005. Effects of sublethal concentrations of *Bacillus thuringiensis* on larval development of *Sesamia nonagrioides*. *J. Econ. Entomol.* 98: 464-470.
- Eizaguirre, M., S. Tort, C. López y R. Albajes. 2005. Effects of sublethal concentrations of *Bacillus thuringiensis* on larval development of *Sesamia nonagrioides*. *J. Econ. Entomol.* 98: 464-470.
- Fast, P. G. 1974. *Bacillus thuringiensis* its history and mode of action. *Dev. Ind. Microbial.* 15: 195-198.
- Fast, P. G., D. W. Murphy y S. S. Sohi. 1978. *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxin: evidence that toxin acts at the surface of susceptible cells. *Experientia.* 34: 762-763.
- Fernández, W. L. y V. L. Estefania. 1974. Coconut water waste disposal of some desiccated coconut factories in the Philippines. *Phil. Agric.* 57: 359-363.
- Gawron-Burke., C y J. A. Baum. 1991. Genetic manipulation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein genes in bacteria, *In: Setlow JK (Ed.). Genetic engineering principles and methods*, 13. Plenum Press, New York, p. 237.
- Gill, S. S., E. A. Cowles y P.V. Pietrantonio. 1992. The mode on action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu. Rev. Entomol.* 37:615-636.
- Gilroy, T. E y E. R. Wilcox. 1992. Hibrid *Bacillus thuringiensis* gene, plasmid and transformed *Pseudomonas fluorescens*. U.S. patent 5, 128, 130.

- Glare, T. y M. O'Callaghan. 2000. *Bacillus thuringiensis*. Biology, ecology and safety. Reino Unido, Wiley and sons. p. 350.
- Huber, H. E. y P. Luthy. 1981. *Bacillus thuringiensis* delta endotoxin; composition and activation. pp. 209-234. In E. W. Davidson (Ed.). Pathogenesis of Invertebrate Microbial Diseases. Allenheld. Osmun Publisher. New. Jersey. USA.
- Hruska, A. J. y F. Gould. 1997. Fall Armyworm (Lepidopteran: 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.
- Knowles, H. B., W. E. Thomas y D. J. Ellar. 1984. Lectinlike binding of *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* lepidopteran-specific toxin is an initial step in insecticidal action. FEBS Microbiol. Lett. 168: 197-202.
- Knowles, H. B., y J. A. T. Dow .1993. The crystal delta-endotoxins of *Bacillus thuringiensis* models for their mechanism of action on the insect gut. Bioessays. 15: 469-476.
- Maagd, R. A., A. Bravo, y N. Crickmore. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. Trends in Genetics. 17: 193-199.
- McClintock, J. T., C. R. Schaffer y R. D. Sjoblad. 1995. A comparative review the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. Pestic. Sci. 45: 95-105.
- Molina, J., R. Lezama, M. Gonzalez, M. Lopez, M. A. Rodríguez y F. Arceo. 2003. Pathogens and parasitic nematodes associated whit population of fall armyworm (Lepidoptera: noctuidae) larvae in Mexico. Florida Entomologist. 86: 244-253.
- Moreau, G. y E. Bauce. 2003. Lethal and sublethal effects of single and double applications of *Bacillus thuringiensis* variety *kurstaki* on Spruce Budworm (Lepidoptera: Tortricidae) Larvae. J. Econ. Entomol. 96: 280-286.
- Morillo, F. y A. Notz. 2003. Resistencia de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a lambdacihalotrina y metomil. Entomotropica 16: 79-87.

- Múrua, M. G. y E. G. Virla. 2004. Precencia invernal de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptara: Noctuidae) en el área maicera de la provincia de Tucumán, Argentina. Revista de la Facultad de Agronomía. 105: 46-52.
- Reyes-Villanueva, F., M. Juárez-Eguia y A. Flores-Leal. 1990. Effects of sublethal dosages of Abate® upon adult fecundity and longevity of *Aedes aegyti*. Journal of American Mosquito Control association 6: 739-741.
- Rojas, J. C., A. Virgem y E. A. Malo. 2004. Seasonal and nocturnal flight activity of *Spodoptera frugiperda* males (Lepidoptera: Noctuide) monitored by pheromone traps in the coast of Chiapas, México. Florida Entomologist. 87: 496-503.
- Sanahuja, G. R. Banakar, R. M. Twyman, T. Capell y P. Christou. 2011. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. Plant. Biotechnol. J. 9: 283–300.
- Sanders, C. J. 2005. Interactions between *Spodoptera frugiperda* and two of its natural enemies on conventional and Bt maize hybrids. Tesis Doctoral. University of Southampton (United Kingdom).
- Sauka, D. H. y G. B. Benintende. 2008. *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. Rev. Argentina de Microbiología 40: 124-140.
- Singh, G. J. P., P. Jr. Leo y S. G. Sarjeet. 1986. Action of *Bacillus* subsp. *israelensis* delta-endotoxin on the ultraestructure of the house fly larva neuromuscular system in vitro. J. Invertebr. Pathol. 47: 155-166.
- Shelton, A., J. Z. Zhao y R. Roush. 2002. Economic, ecological, food safety, and social consequences of the development of Bt transgenic plants. Annu. Rev. Entomol. 47: 845–881.
- Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler y D. H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Rev. Microbiol. Mol. Biol. 62: 775–806.
- Stapel, J. O., J. W. Deborah, J. R. Ruberson y W. L. Joe. 1998. Development and behavior of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in choice test with food substrates containing toxins of *Bacillus thuringiensis*. Biological control. 11: 29-37.

- Stewart, S. D., J. J. Adamczyk, K. S. Knighten y F. M. Davis. 2001. Impact of Bt cotton expressing one or two insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis* Berliner on growth and survival of noctuid (Lepidoptera) larvae. *J. Econ. Entomol.* 94: 752–760.
- Wu, K. M., Y. Y. Guo, N. Lv., J. T. Greenplate y R. Deaton. 2003. Efficacy of transgenic cotton containing a Cry1Ac gene from *Bacillus thuringiensis* against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in northern China. *J. Econ. Entomol.* 96: 1322–1328.
- Wang, J., A. Boets, A., J. Van Rie y G. Ren. 2003. Characterization of cry1, cry2 and cry9 genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from China. *J. Invertebr. Pathol.* 82: 63-71.
- Zarate, N., O. Díaz., A. M. Martínez., J. I. Figueroa., M. I. Schneider., G. Smaghe., E. Viñuela., F. Budia y S. Pineda. 2010. Lethal and Sublethal Effects of Methoxyfenozide on the Development, Survival and Reproduction of the Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Neotrop. Entomol.* 40: 129-137.
- Zeener de Polonia, I., A. Álvarez, R. Mejía y M. Bayona. 2005. Influencia de la toxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* sobre el desarrollo del cogollo del maíz, *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH). En: Colombia. Revista. U.D.C.A. Actualidad y Divulgación Científica. 8:129-139.

VII. CAPITULO 2.- EFECTO SUBLETAL DE LAS PROTEÍNAS Cry2Ab Y Cry1Ac DE *Bacillus thuringiensis* BERLINER EN GUSANO ELOTERO *Helicoverpa zea* (BODDIE).

7.1. RESUMEN

Gusano elotero *Helicoverpa zea* Boddie, es un insecto polífago que afecta a cultivos básicos, hortícolas, especies silvestres, etc; su control es principalmente usando insecticidas químicos. En la actualidad se siguen buscando alternativas de control biológico de este insecto, las cuales no afecten al medio ambiente, tal es el caso de la bacteria *Bacillus thuringiensis kurstaki* que ha sido ampliamente usada como control biológico de varias especies de insectos lepidópteros. El objetivo de este trabajo fue evaluar en condiciones de laboratorio los efectos subletales de las proteínas Cry2Ab y Cry1Ac de *B. thuringiensis kurstaki* en *H. zea*. Los bioensayos consistieron en alimentar con dieta contaminada de diferentes concentraciones de las proteínas Cry2Ab y Cry1Ac a grupos de 150 larvas de gusano elotero para cada proteína. Las concentraciones usadas para las dos proteínas fueron: 0.001, 0.01, 0.1, 1, 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y un testigo absoluto, en total se utilizaron 1800 larvas neonatas (larvas ≤ 12 h de edad) por los dos bioensayos. Con la finalidad de reproducir nuevamente los resultados de los bioensayos, posteriormente se realizaron bioensayos únicamente con dos concentraciones (0.01 y 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y un testigo absoluto para las dos proteínas. En cada concentración se usaron 100 larvas y se hicieron tres repeticiones, en total se usaron 900 larvas neonatas por cada proteína. Los resultados indicaron que la mortalidad de larvas, pupas y adultos se incrementaron al aumentar las concentraciones de la proteína y a través del tiempo. En el caso de la proteína Cry2Ab, en la concentración más alta (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), el porcentaje de mortalidad a los 27 días fue del 87.1% y del 57.3% en la concentración más baja (0.001 $\mu\text{g mL}^{-1}$), la mortalidad de las pupas fue de hasta el 91.4% con la concentración más alta, se redujo el peso de las larvas a los 3 y 12 días en 2.8 y 326.5 mg, pupas y adultos en 264.8 y 55.7 mg entre el testigo y la concentración más alta, el ciclo de vida de los insectos para alcanzar el estado de pupa y adulto se prolongó en 9 y 6.3 días respectivamente con referencia al testigo. Con la proteína Cry1Ac, el porcentaje de mortalidad en la concentración más alta (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) a los 27 días fue del 90.8%, en la concentración más baja (0.001 $\mu\text{g mL}^{-1}$)

fue del 56.1%. La mortalidad de las pupas fue de hasta el 95.9% en la concentración más alta, de las pupas que sobrevivieron no hubo emergencia de adultos lo que representó el 100% de mortalidad, se redujo el peso de las larvas a los 3 días en 2.9, a los 12 días en 269.9 mg, pupas y adultos en 144.5 y 31.4 mg respectivamente entre el testigo y la concentración más alta, el ciclo de vida de los insectos para alcanzar el estado de pupa y adulto se prolongó en 4.8 y 5.1 días con respecto al testigo.

Los bioensayos donde sólo se evaluaron las dos concentraciones (0.01 y 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y un testigo usados a manera de confirmación corroboran que la mortalidad de larvas, pupas y adultos se incrementaron al incrementar las concentraciones de la proteína y a través del tiempo, también se prolongó el ciclo de vida de los insectos para alcanzar los estados de pupa y adulto, se redujo el peso de larvas, pupas y adultos con las dos proteínas

7.2. INTRODUCCIÓN

Gusano elotero (*Helicoverpa zea* Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae) es un insecto polífago, afecta a varios cultivos como; maíz (*Zea mays* L.), tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), jitomate (*Solanum lycopersicum* L.), pepino (*Capsicum* spp.), lechuga (*Lactuca sativa* L.), frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), berenjena (*Solanum melongena* L.), haba (*Vicia faba* L.), algodón (*Gossypium hirsutum* L.), tabaco (*Nicotiana tabaccum* L.), sorgo (*Sorghum bicolor* L.), soya (*Glycine max* Merr.), camote (*Ipomoea batata* L.) (Lutrell *et al.*, 1999; Tillman y Mullinix, 2004; Bergvinson, 2005; Hutchison *et al.* 2007; Souza *et al.*, 2007) y por lo menos a 76 plantas silvestres (Neunzig, 1963; Harding, 1976; Fitt, 1989; y Blanco *et al.*, 2007). Esta larva se alimenta del follaje, llegando a causar la pérdida total de los cultivos. Se controla mediante el uso de insecticidas sintéticos (Cook *et al.*, 2004). El uso irracional y descontrolado de estos productos, ha ocasionado la resistencia de esta y otras plagas a los insecticidas (Yu, 1992; Abd-elghafar *et al.*, 1993; Al-sarar *et al.*, 2006 y Pietrantonio *et al.*, 2007), además de provocar problemas ambientales (Morillo y Notz, 2003), residuos peligrosos en los alimentos, intoxicaciones y desequilibrio biológico (Roel y Vendramim, 2006). La búsqueda de métodos alternativos al control químico incluye el uso de productos menos agresivos al medio ambiente. Los

bioinsectidas son productos biológicos que no alteran el medio ambiente, entre ellos los productos a base *Bacillus thuringiensis* son insecticidas biológicos más aplicados en el mundo y se usan para controlar diversos insectos que afectan la agricultura y entre ellos están los lepidópteros. En la actualidad la genética ya ha desarrollado plantas (plantas Bt) como; maíz y algodón que han sido modificados genéticamente expresando una toxina a base de *Bacillus thuringiensis* Berniler, las cuales les permiten protegerse de estas y otras plagas (Koziel *et al.*, 1993; Perlak *et al.*, 1993; Benedict *et al.*, 1994; Feldman y Stone, 1997; Buntin *et al.*, 2001; Gore *et al.*, 2001; Adamcyk y Gore, 2004), sin embargo su acceso a este material aun es limitado. *B. thuringiensis* es una bacteria gram positiva capaz de formar δ -endotoxinas como inclusiones parasporales durante la esporulación (Aronson *et al.*, 1986; Gawron-Burke y Baum, 1991), disolviéndose en el intestino medio del insecto liberando protoxinas que se convierten en moléculas tóxicas (Fast, 1974; Fast *et al.*, 1978; Huber y Luthy, 1981; Knowles *et al.*, 1984; Gill *et al.*, 1992), causando así la muerte de los insectos (Zhang *et al.*, 2008), esta muerte es provocada por la ruptura de las células y una eventual destrucción del intestino (Yu, 2008). En la actualidad existen estudios sobre los efectos letales que provoca *B. thuringiensis*, pero aún siguen siendo escasa la información de los efectos subletales que provoca esta bacteria. Estos efectos subletales son provocados dosis más bajas de alguna sustancia tóxica la cual no provoca el 100% de la mortalidad pero si tienen repercusiones en su desarrollo. Por ello la presente investigación tuvo como objetivo, evaluar en condiciones de laboratorio los efectos subletales de las proteínas Cry2Ab y Cry1Ac de *B. thuringiensis kurstaki* Berniler en el gusano elotero *H. zea* Boddie.

7.3. MATERIALES Y MÉTODOS

Cría del gusano elotero. Los experimentos se realizaron con larvas de *H. zea* provenientes de una colonia que se ha mantenido en el laboratorio de Entomología por más de tres años en el Centro Universitario UAEMex Tenancingo y se continuó criando en una cámara de cría en condiciones controladas: temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$, humedad relativa del $75 \pm 5\%$ y un fotoperiodo de 13:11 h luz: oscuridad. Las larvas se alimentaron con una dieta artificial (Corn earworm, Southland Products, Inc.) hasta obtener pupas, las cuales se colocaron en jaulas

**EFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN
Spodoptera frugiperda (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)**

entomológicas (25 x 25 x 35 cm) para la emergencia de los adultos, mismos que fueron alimentados con agua azucarada al 10% (agua destilada y azúcar). Las hembras ovipositaron en tela "Tull", esta tela se cambió cada 24 horas durante el periodo de oviposición. Se obtuvieron larvas neonatas (larvas ≤ 12 h de edad) con las cuales se realizaron los bioensayos correspondientes.

Proteína. Para la proteína Cry2Ab se utilizó tejido de maíz modificado genéticamente y liofilizado que contienen la proteína a una concentración de 0.6%. Se utilizó el bioinsecticida comercial MVP II (Mycogen, Corp. San Diego CA) a 19.1%, formulación sólida que contiene una protoxina híbrida similar a la δ -endotoxina Cry1Ac de *B. thuringiensis* var. *Kurstaki*, expresada y encapsulada en *Pseudomonas fluorescens* (Gilroy y Wilcox, 1992).

Bioensayos. Los bioensayos consistieron en alimentar en todo el estado larval del gusano elotero con dieta artificial contaminada usando concentraciones con 0.001, 0.01, 0.1, 1 y 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para las dos proteínas de *B. thuringiensis*. La dieta contaminada se cambió cada 72 h (3 días) para evitar exponer las larvas a una proteína degradada. En los primeros seis días de evaluación, cada larva fue alimentada con 1 mL de dieta, en este tiempo, la dieta y las larvas fueron colocadas en charolas para bioensayos (Bio-Assay Tray Bio-BA-128: C-D Internacional, Inc) con 128 cavidades, en cada cavidad se colocó una larva neonata confinada con un plástico transparente autoadherible (PULL N' PEEL Tab Bio-Cv-16; C-D International, Inc.). Posteriormente, se alimentaron con 5 mL de dieta, los cuales, tanto la dieta como las larvas se colocaron en vasitos de plástico del número 0 (Envases Primo Cuevas® S.A. de C.V. Ecatepec, Estado de México, Méx.), para favorecer el intercambio gaseoso de los vasitos, en la tapa se realizó una pequeña perforación. Al momento de transferir las larvas a la nueva dieta (cada 72 h), se evaluaron los porcentajes de mortalidad.

Las larvas fueron pesadas individualmente a los 3 y 12 días; posteriormente se evaluaron otras variables: tiempo (días) que alcanzaron el estado de pupa, peso de las pupas, tiempo (días) que llegaron al estado adulto y finalmente el peso de los adultos. Los porcentajes de mortalidad en los tratamientos se ajustó mediante el uso de la fórmula Abbott (Abbott, 1925):

$$\frac{(\% \text{mortalidad tratamiento} - \% \text{mortalidad testigo})}{(100 - \% \text{mortalidad testigo})} \times 100$$

Diseño experimental y análisis estadístico. Se utilizó el diseño experimental de bloques completos al azar con cinco tratamientos para cada proteína con su respectivo testigo absoluto y con tres repeticiones. Para cada tratamiento se iniciaron con 50 larvas neonatas. Posterior a estos experimentos, también se realizaron otros dos experimentos independientes donde sólo se usaron dos concentraciones, un testigo absoluto y el experimento fue repetido tres veces (con tres repeticiones). Las concentraciones usadas en ambas proteínas fueron de 0.01 y 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Cabe aclarar que estas concentraciones ya habían sido incluidas en los primeros experimentos, los segundos experimentos se realizaron sólo con la finalidad de confirmar la consistencia de los resultados por los menos de las dos concentraciones de cada proteína. En estos últimos experimentos el número de larvas neonatas usadas se elevó a 100 por concentración. En total, en cada experimento se utilizaron 900 larvas (100 larvas X 3 tratamientos X 3 repeticiones = 900 larvas neonatas). Los resultados se sometieron a un análisis de varianza y a una prueba de comparación de medias con Tukey con un nivel de significancia del 95% ($P \leq 0.05$) con el programa Infostat (Balzarini, 2008).

7.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PROTEÍNA Cry2Ab

Mortalidad. La mortalidad de las larvas se incrementó a través del tiempo, por ejemplo, a los tres días, la mortalidad varió del 4% con 0.001 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (concentración más baja) hasta 26.0% con 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (concentración más alta), y previo a la formación de pupas (en la novena evaluación a los 27 días) la mortalidad fluctuó de 57.3% en la concentración más bajas, hasta el 87.1% en la concentración más alta. Por otra parte, la mortalidad también se incrementó al incrementarse la concentración en cada fecha de evaluación. En todas las fechas, la menor mortalidad se registró con la concentración más baja (0.001 $\mu\text{g mL}^{-1}$), y la mayor mortalidad se registró en la concentración más alta (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) en casi todas las fechas de evaluación. En las concentraciones intermedias (0.001, 0.1 y 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$), en general siempre presentaron mortalidades similares entre ellas, y en ocasiones fueron iguales con la concentración más baja o con la concentración más alta (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 1).

**EFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN
Spodoptera frugiperda (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)**

En el estado de pupa, la menor mortalidad fue del 61.5% con la concentración baja; con 0.01 y 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ las mortalidades fueron estadísticamente iguales 67.3 y 69.2%, le siguió 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ con el 75.9% y el mayor porcentaje de mortalidad fue del 91.4% en la concentración más alta (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 1). Los efectos de *B. thuringiensis* se manifestaron durante todo el desarrollo larval (Figura 1), produciendo en las lavas deshidratación y rompimiento celular.

Cuadro 1. Porcentaje de mortalidad acumulada corregida a través del tiempo de larvas de *H. zea* alimentadas con dieta contaminada con diferentes concentraciones de la proteína Cry2Ab de *B. thuringiensis*.

Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	Periodo larval (días)				
	3±E*	6±E*	9±E*	12±E*	15±E*
0.001	4.0±0.0a	12.7±5.5a	12.3±7.7a	19.0±11.6a	24.8±12a
0.01	8.0±0.0ab	15.7±8.0ab	20.9±6.8a	21.5±8.2a	35.9±8.3a
0.1	10.0±3.5ab	18.6±8.3ab	24.5±11.6ab	30.7±14.0ab	39.4±7.2ab
1	14.0±2.0b	25.9±5.1ab	28.3±6.9ab	37.2±7.9ab	46.1±9.0ab
5	26.0±4.0c	30.2±5.6b	34.1±4.7b	51.2±3.3b	62.3±6.0b

*Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $P \leq 0.05$). E Error Estándar de la media.

Continuación del Cuadro 1.

Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	Periodo larval (días)				
	18±E*	21±E*	24±E*	27±E*	Pupas±E*
0.001	40.5±11.7a	47.9±9.5a	53.5±6.2a	57.3±3.1a	61.5±1.4a
0.01	51.8±2.8a	52.7±1.4a	58.2±2.0a	58.2±2.0a	67.3±2.0ab
0.1	52.7±3.5a	59.1±3.5a	61.8±5.9a	63.7±4.3a	69.2±2.2ab
1	57.1±5.1ab	65.5±7.2ab	67.3±7.8a	68.3±7.1a	75.9±1.5b
5	78.8±13.6b	82.3±10.1b	85.2±8.6b	87.1±11.7b	91.4±13.1c

*Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $P \leq 0.05$). E Error Estándar de la media.



Figura 1. Mortalidad provocada por *B. thuringiensis* a los 15 días de desarrollo larval en diferentes concentraciones de la proteína.

Peso de larvas a los 3 y 12 días. Las larvas fueron pesadas a los 3 y 12 días, y el peso se redujo al aumentar la concentración de la proteína, principalmente a los 12 días.

A los 3 días, el peso promedio en el testigo fue de 2.9 mg, en el rango de 0.001 a 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ el peso promedio fue de 0.6 mg, mientras que en la concentración más alta (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) pesaron 0.02 mg, es decir, 2.8 mg menos que las larvas testigo. Estadísticamente, el peso de las larvas entre el rango de concentraciones intermedias (0.001, 0.01, 0.1 y 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) fueron iguales, pero diferentes entre el testigo y la concentración más alta (Tukey, $P \leq 0.05$). A los 12 días, sólo en las concentraciones de 0.001 y 0.01 $\mu\text{g mL}^{-1}$ el peso de las larvas fueron iguales estadísticamente, en las otras concentraciones fueron diferentes incluyendo al testigo (Tukey, $P \leq 0.05$). En esta fecha, el mayor peso se registró en el testigo, cuyo peso promedio fue de 470.9 mg, y el menor fue observado en la concentración más alta (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) donde el peso promedio fue de 144.4 mg, es decir, la diferencia entre el testigo y la concentración más alta es de 326.5 mg (Cuadro 3). El desarrollo de las larvas testigo fue más rápido que las larvas alimentadas con proteína contaminada (Figura 2)

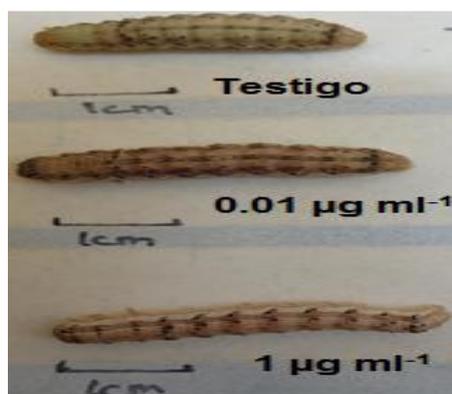


Figura 2. Desarrollo larval a los 15 días de haber expuesto las larvas a la dieta con la proteína Cry2Ab.

Tiempo en llegar al estado de pupa. En el testigo, las pupas se formaron a los 16.7 días, y en la concentración más alta ($\mu\text{g mL}^{-1}$) fue a los 25.7 días. En las otras concentraciones, los tiempos requeridos estuvieron dentro de este rango. La diferencia para que las larvas se desarrollaran al estado de pupa entre el testigo y la

**EFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN
Spodoptera frugiperda (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)**

concentración más alta fue de 9 días. Todos los tratamientos fueron estadísticamente diferentes entre sí (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 2).

Peso de pupas. El peso promedio de las pupas testigo fue de 404.9 mg, en el rango de concentraciones de 0.001 a 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ el peso fluctuó entre 399.4 y 162.6 mg, y en la concentración más alta (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) fue de 140.1 mg, es decir, 264.8 mg menos que en el testigo. Estadísticamente, el peso de las pupas entre las concentraciones intermedias de 0.001 a 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ fueron iguales, pero diferentes con el testigo y la concentración más alta (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 3).

Tiempo en llegar al estado de adulto. Las larvas testigo se desarrollaron al estado adulto en 26.7 días, con 0.001, 0.01, y 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a los 28.8, 29.9 y 30.1 días respectivamente, con las concentraciones de 1 y 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ se desarrollaron a los 32.5 y 33.0 días. La diferencia en tiempo para que las larvas se desarrollaran al estado adulto entre el testigo y la concentración más alta fueron 6.3 días. Todos los tratamientos fueron diferentes estadísticamente, con la excepción de las concentraciones más altas (1 y 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), las cuales fueron iguales (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Efecto de diferentes concentraciones de la proteína Cry2Ab de *B. thuringiensis* en *H. zea* sobre el tiempo de desarrollo (días) de las larvas neonatas a pupa y adulto.

Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	N ¹	N ²	T ¹ ±E*	N ³	T ² ±E*
TESTIGO	150	69.3	16.7±0.5a	63.3	26.7±0.8a
0.001	150	26.7	17.7±0.7ab	14.7	28.8± 0.3b
0.01	150	21.3	19.7±0.7abc	10.0	29.9± 0.6bc
0.1	150	22.7	21.0±2.2bcd	11.3	30.1± 0.2c
1	150	16.7	24.3±0.3cd	3.3	32.5±0.5d
5	150	6.0	25.7±1.5d	1.3	33.0± 0.1d

N¹ Número de larvas expuestas a las diferentes concentraciones de la proteína Cry2Ab.

N² Porcentaje de larvas que llegaron al estado de pupa.

N³ Porcentaje de larvas que llegaron al estado de adulto.

T¹ Tiempo transcurrido en días desde larvas neonatas al estado de pupa.

T² Tiempo transcurrido en días desde larvas neonatas al estado de adulto.

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

E Error Estándar de la media.

Peso de adultos. Estadísticamente, el mayor peso se registró en el testigo cuyo peso promedio de los adultos fueron de 89.1 mg, le siguieron 0.001 y 0.01 $\mu\text{g mL}^{-1}$ con 71.4 y 68.6 mg respectivamente, posteriormente 0.1 y 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ con 54.2 y 53.2 mg y finalmente 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ con 33.4 mg, la diferencia entre el testigo y la concentración más alta fue de 55.7 mg (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 3).

**EFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN
Spodoptera frugiperda (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)**

Cuadro 3. Peso promedio de larvas a los 3 y 12 días, peso de pupas y adultos de *H. zea* alimentada con diferentes concentraciones de la proteína Cry2Ab de *B. thuringiensis*.

Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	Peso en mg		Pupas $\pm E^*$	Adulto $\pm E^*$
	Larvas (3 días $\pm E^*$)	Larvas (12 días $\pm E^*$)		
TESTIGO	2.9 \pm 0.9a	470.9 \pm 23a	404.9 \pm 12.0a	89.1 \pm 8.6a
0.001	0.7 \pm 0.6b	399.4 \pm 1.9b	323.0 \pm 9.5ab	71.4 \pm 2.6ab
0.01	0.8 \pm 0.7b	387.5 \pm 8.9b	306.2 \pm 5.7ab	68.6 \pm 1.0ab
0.1	0.6 \pm 0.6b	226.8 \pm 22.6bc	217.9 \pm 10.2ab	54.2 \pm 4.2bc
1	0.4 \pm 0.3b	162.6 \pm 39.1c	156.6 \pm 19.1ab	53.2 \pm 3.5bc
5	0.02 \pm 0.03c	144.4 \pm 15.2d	140.1 \pm 8.4b	33.4 \pm 29.0c

*Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $P \leq 0.05$).
E Error Estándar de la media.

7.4.2. BIOENSAYO CON SÓLO DOS CONCENTRACIONES Y UN TESTIGO DE PROTEÍNA Cry2Ab

Se realizaron bioensayos en el que sólo se usaron dos concentraciones 0.01 y 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y un testigo absoluto, para evaluar los efectos subletales que provoca la proteína Cry2Ab de *B. thuringiensis* en gusano elotero, con la finalidad de reproducir los resultados a manera de confirmación del primer experimento. Cabe señalar que en estos bioensayos se usaron 100 larvas por tratamiento/repetición, a diferencia de los primeros bioensayos donde sólo se usaron 50 larvas por tratamiento/repetición.

Mortalidad. En este segundo experimento se confirma que las larvas al alimentarse con dicha proteína, la mortalidad se incrementó al aumentar la concentración de la proteína, de tal forma, que en todas las fechas de evaluación la mortalidad siempre fue mayor en la concentración más alta (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$), a excepción de las registradas a los 3 y 18 días, donde los dos tratamientos fueron estadísticamente iguales (Tukey, $P \leq 0.05$). En el caso de las pupas, la menor mortalidad se registró en la concentración de 0.01 $\mu\text{g mL}^{-1}$, la cual fue del 73.4%, y la mayor mortalidad (86.8%), se registró en la concentración más alta (Tukey, $P \leq 0.05$). Por otra parte, la mortalidad también se incrementó a través del tiempo, es decir, a mayor tiempo de exposición, mayor tasa de mortalidad; por ejemplo, con 0.01 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a los 3 días, la mortalidad sólo fue del 3.6%, pero a los 24 días ya fue del 58.2%; en el caso de la concentración de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a los 3 días la mortalidad fue del 6.6%, y a los 24 días, ésta ya fue del 77.7% (Cuadro 4).

**EFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN
Spodoptera frugiperda (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)**

Cuadro 4. Porcentaje de mortalidad acumulada corregida de *H. zea* alimentadas con dieta contaminada con dos concentraciones 0.01 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de la proteína Cry2Ab de *B. thuringiensis*.

Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	Periodo larval (días)				
	3±E*	6±E*	9±E*	12±E*	15±E*
0.01	3.6±1.5a	19.3±1.1a	26.8±2.6a	39.9±4.4a	44.4±2.9a
1	6.6±3.1a	26.8±1.3b	32.8±2.6b	50.7±1.5b	55.5±2.5b

*Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $P \leq 0.05$).
E Error Estándar de la media.

Continuación del Cuadro 4.

Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	Periodo larval (días)			
	18±E*	21±E*	24±E*	pupas
0.01	51.8±3.2a	53.7±1.8a	58.2±5.4a	73.4±2.2a
1	57.9±3.1a	67.8±5.1b	77.7±4.3b	86.8±3.7b

*Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $P \leq 0.05$).
E Error Estándar de la media.

Peso de larvas a los 3 y 12 días. En este segundo experimento donde sólo se evaluaron dos concentraciones (0.01 y 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) se confirma que el peso de las larvas se redujo al incrementar la concentración de la proteína. A los tres días, el peso promedio de las larvas testigo fue de 2.7 mg, con 0.01 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pesaron 2.4 mg, y con la concentración más alta (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) pesaron 1.0 mg, es decir, 1.7 mg menos que las larvas testigo. Estadísticamente, el peso fue igual entre el testigo y la concentración baja, pero diferente de la concentración más alta (Tukey, $P \leq 0.05$). A los 12 días, el peso promedio de las larvas testigo fue de 520.5 mg, con 0.01 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pesaron 308.7 mg, y con 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ el peso fue de 154.4 mg; en esta última concentración las larvas pesaron 366.1 mg menos que las larvas testigo (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$). En esta fecha de evaluación (a los 12 días), todos los pesos fueron estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 6).

Tiempo en llegar al estado de pupa. En el testigo, las pupas se desarrollaron a los 17.3 días, con 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a los 19.0 días, y en la concentración más alta (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) se desarrollaron a los 23.1 días. La diferencia entre el testigo y la concentración más alta fue de 5.8 días. Todos los resultados fueron estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 5).

Peso de pupas. Las pupas testigo, en promedio pesaron 398.7 mg, con 0.01 $\mu\text{g mL}^{-1}$ fue de 210.3 mg, y en la concentración más alta (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) su peso fue de

**EFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN
Spodoptera frugiperda (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)**

155.7 mg, es decir, 243.0 mg menos que en el testigo. En todos los casos hubo diferencias estadísticas (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 6).

Tiempo en llegar al estado de adulto. En el testigo, las larvas se desarrollaron a los 26.3 días en promedio, con $0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$ a los 28.5 días, y en la concentración más alta ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) los adultos se desarrollaron a los 32.2 días. La diferencia en tiempo para que se desarrollaran los adultos entre el testigo y la concentración más alta fue de 5.9 días. Estadísticamente, el tiempo para desarrollarse los adultos fueron iguales entre el testigo y la concentración más baja, y diferentes con la concentración más alta (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 5).

Peso de adultos. En el testigo los adultos pesaron en promedio 90.6 mg, con $0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$ pesaron 68.5 mg, y con la concentración más alta ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) los adultos pesaron 52.7 mg, lo cual representó una diferencia de 37.9 mg con el testigo. Los resultados fueron estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 6).

Cuadro 5. Efecto de dos diferentes concentraciones de la proteína Cry2Ab de *B. thuringiensis* en *H. zea* sobre el tiempo de desarrollo (días) de las larvas neonatas a pupa y adulto.

Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	N ¹	N ²	T ¹ ±E*	N ³	T ² ±E*
TESTIGO	300	83.3	17.3±0.9a	79.0	26.3±1.0a
0.01	300	29.7	19.0±0.2b	21.0	28.5± 0.a
1	300	13.3	23.1±0.8c	10.3	32.2±1.0b

N¹ Número de larvas expuestas a las diferentes concentraciones de la proteína Cry2Ab.

N² Porcentaje de larvas que llegaron al estado de pupa.

N³ Porcentaje de larvas que llegaron al estado de adulto.

T¹ Tiempo transcurrido en días desde larvas neonatas al estado de pupa.

T² Tiempo transcurrido en días desde larvas neonatas al estado de adulto.

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

E Error Estándar de la media.

Cuadro 6. Peso promedio de larvas a los 3 y 12 días, peso de pupas y adultos de *H. zea* alimentada con dos concentraciones de la proteína Cry2Ab de *B. thuringiensis*.

Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	Peso en mg			
	Larvas (3 días±E*)	Larvas (12 días±E*)	Pupas ±E*	Adulto±E*
TESTIGO	2.7±0.4a	520.5±36.0a	398.7±5.2a	90.6±1.5a
0.01	2.4±0.2a	308.7±3.2b	210.3±19.5b	68.5±3.2b
1	1.0±0.3b	154.4±5.3c	155.7±12.3c	52.7±0.5c

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

E Error Estándar de la media.

**EFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN
Spodoptera frugiperda (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)**

PROTEÍNA Cry1Ac

Mortalidad. En todas las fechas de evaluación siempre hubo diferencias estadísticas significativas en los porcentajes de mortalidad de larvas, y en la mayoría de las fechas de evaluación, la menor mortalidad se registró en la concentración más baja 0.001 µg mL⁻¹, mientras que la mayor mortalidad se presentó en la concentración más alta 5 µg mL⁻¹ (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 7). Por otra parte, los porcentajes se incrementaron a través del tiempo; por ejemplo, a los tres días (primera evaluación sobre la mortalidad en el estado larval), la mortalidad en la concentración de 0.001 µg mL⁻¹ fue de 2.7% y con 5 µg mL⁻¹ ésta fue del 20.6%; a los 24 días (novena y última evaluación sobre la mortalidad en el estado larval), en la concentración más baja la mortalidad fue del 51.1%, mientras que con la más alta la mortalidad fue del 75.4%. En base a este registro se observó el incremento de la mortalidad de las larvas al incrementar la concentración de la proteína y se observó el incremento de la mortalidad a través del tiempo de exposición. En algunos casos las larvas muertas mostraron ennegrecimiento de la cutícula cuando se alimentaron con concentraciones altas (1 µg mL⁻¹) de dicha proteína (Figura. 3)

Cuadro 7. Porcentaje de mortalidad acumulada corregida a través del tiempo de larvas de *H. zea* alimentadas con dieta contaminada con diferentes concentraciones de la proteína Cry1Ac de *B. thuringiensis*.

Concentración µg mL ⁻¹	. Periodo larval (días)				
	3±E*	6±E*	9±E*	12±E*	15±E*
0.001	2.7±3.1a	12.0±5.2a	10.3±1.2a	12.3±0.2a	15.1±4.4a
0.01	6.7±4.6ab	26.1±6.7ab	29.6±17.4bc	26.2±1.6bc	27.0±2.8a
0.1	6.0±5.3ab	24.8±3.0ab	23.5±2.7b	22.9 ±3.0b	31.1±10.6a
1	14.0±0.0bc	27.5±7.1b	30.1±4.2bc	28.7±1.7c	33.6±8.1a
5	20.6±3.2c	33.5±3.2b	38.2±5.1c	50.8±1.9d	58.3±10.2b

*Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $P \leq 0.05$).
E Error Estándar de la media.

Continuacion del Cuadro 7.

Concentración µg mL ⁻¹	Periodo larval (días)				
	18±E*	21±E*	24±E*	27±E*	Pupas±E*
0.001	36.0±5.8a	36.2±3.4a	51.1±8.5a	56.1±5.7a	60.3±10.0a
0.01	36.8±7.3a	39.1±3.3a	58.2±4.0ab	62.2±2.9a	71.5±8.9ab
0.1	43.4±3.7ab	45.9±7.6a	51.1±2.8ab	62.3±7.2a	67.4±9.4a
1	46.8±3.6ab	48.8±7.5ab	64.2±4.8ab	73.6±12.0ab	77.7±12.1ab
5	59.3±8.2b	67.4±11.2b	75.4±13.4b	90.8±3.0b	95.9±1.7b

*Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $P \leq 0.05$).
E Error Estándar de la media.



Figura 3. Ennegrecimiento de la cutícula de una larva de *H. zea* a los 18 días de haberse alimentado con $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de la proteína Cry1Ac.

Peso de larvas a los 3 y 12 días. El peso de las larvas del gusano elotero se redujo al aumentar la concentración de la proteína. A los tres días, el peso promedio de las larvas fueron bajos, pero a pesar de ello, hubo diferencias estadísticas significativas, por ejemplo, en el testigo, las larvas pesaron en promedio 3.0 mg, y con $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ el peso fue de 0.1 mg, es decir, la diferencia entre el testigo y la concentración más alta fue de 2.9 mg. Los pesos en las otras concentraciones estuvieron dentro de este rango, mostrando ciertas diferencias estadísticas (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 6). A los 12 días, el mayor peso se registró en el testigo, donde las larvas pesaron en promedio 453.7 mg, y el menor peso se observó con $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ cuyo peso fue de 183.8 mg, es decir 269.9 mg menos que el testigo. En todas las concentraciones, el peso de las larvas fueron estadísticamente diferentes, excepto en dos concentraciones intermedias 0.01 y $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ donde fueron iguales (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 9).

Tiempo en llegar al estado de pupa. En el testigo, las pupas se desarrollaron más rápidamente, a los 20.4 días; en el rango de concentraciones de 0.001 a $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ las pupas se formaron a los 21.2 días en promedio; con $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ fue de 23 días y con $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ fue donde más tiempo se tardaron, a los 25.2 (Tukey, $p \leq 0.05$) (Cuadro 8). En la concentración más alta, las pupas se formaron 4.8 días después que en el testigo.

Peso de pupas. El mayor peso se registró en el testigo, éste fue de 327.2 mg, le siguieron las concentraciones de 0.001 , 0.01 , $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ cuyos pesos fueron

**EFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN
Spodoptera frugiperda (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)**

de 249.0, 264.4 y 246.0 mg respectivamente, y los pesos más bajos se registraron en las dos concentraciones más altas 1 y 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, donde las pupas pesaron 194.1 y 162.7 mg respectivamente (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 9). En la concentración más alta el peso fue 194.5 mg menos que en el testigo.

Cuadro 8. Efecto de diferentes concentraciones de la proteína Cry1Ac de *B. thuringiensis* en *H. zea* sobre el tiempo de desarrollo (días) de larvas neonatas a pupa y adulto.

Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	N ¹	N ²	T ¹ ±E*	N ³	T ² ±E*
TESTIGO	150	62.0	20.4±0.5a	56.7	29.9±0.4a
0.001	150	26.0	20.9±0.4ab	15.3	31.9± 0.2b
0.01	150	18.7	21.1±1.0ab	13.3	32.0± 0.0bc
0.1	150	21.3	21.6±0.1ab	17.3	32.7± 0.5c
1	150	14.7	23.0±1.5bc	8.7	35.0±0.0d
5	150	2.7	25.2±1.1c	0.0	0.0± 0.0

N¹ Número de larvas expuestas a las diferentes concentraciones de la proteína Cry1Ac

N² Porcentaje de larvas que llegaron al estado de pupa.

N³ Porcentaje de larvas que llegaron al estado de adulto.

T¹ Tiempo transcurrido en días desde larvas neonatas al estado de pupa.

T² Tiempo transcurrido en días desde larvas neonatas al estado de adulto.

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

E Error Estándar de la media

Cuadro 9. Peso promedio de larvas a los 3 y 12 días, peso de pupas y adultos de *H. zea* alimentada con diferentes concentraciones de la proteína Cry1Ac de *B. thuringiensis*.

Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	Peso en mg			
	Larvas (3 días±E*)	Larvas (12 días±E*)	Pupas ±E*	Adulto±E*
TESTIGO	3.0±0.6a	453.7±46.8a	327.2±25.2a	83.4±3.5a
0.001	2.1±0.1b	320.3±34.4b	249.0±6.5b	68.0±3.2b
0.01	1.7±0.2b	327.8±9.8bc	264.4±7.9b	68.5±1.2b
0.1	0.9±0.2c	286.6±20.3bc	246.0±5.2b	65.6±2.8b
1	0.2±0.3cd	253.3±5.8c	194.1±6.5c	52.0±2.6c
5	0.1±0.0d	183.8±11.7d	162.7±12.0c	0.0±0.0d

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

E Error Estándar de la media.

Tiempo en llegar al estado de adulto. En el testigo, las larvas neonatas se desarrollaron al estado adulto a los 29.9 días en promedio, con 0.001, 0.01, 0.1, 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ se desarrollaron a los 31.9, 32.0, 32.7, 35.0 días respectivamente, mientras que en la concentración más alta (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) no se registró ningún adulto, ya que no lograron emerger de la cutícula pupal (Figura 4). La diferencia entre el testigo y la concentración de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, fue de 5.1 días. En todos los casos se observó diferencias estadísticas significativas sobre el tiempo en el que las larvas neonatas se desarrollaron al estado adulto (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 8).



Figura. 4. Adulto de *H. zea* sin salir por completo de la cutícula pupal.

Peso de adultos. El mayor peso de los adultos se registró en el testigo, donde éste fue de 83.4 mg, le siguieron tres concentraciones intermedias 0.001, 0.01 y $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ cuyos pesos fueron de 6.7 mg, y en la concentración de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ los adultos pesaron 52.0 mg, es decir, 31.4 mg menos que en el testigo (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 9). En la concentración de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ no hubo desarrollo de adultos.

BIOENSAYO CON SÓLO DOS CONCENTRACIONES DE LA PROTEÍNA Cry1Ac Y UN TESTIGO

Se realizaron bioensayos en el que sólo se usaron dos concentraciones (0.01 y $1 \mu\text{g mL}^{-1}$) y un testigo absoluto para evaluar los efectos subletales que provoca la proteína Cry1Ac de *B. thuringiensis* en gusano elotero, con la finalidad de reproducir los resultados a manera de confirmación. Cabe señalar que en estos bioensayos se usaron 100 larvas por tratamiento/repetición a diferencia de los primeros bioensayos donde sólo se usaron 50 larvas por tratamiento.

Mortalidad. En el estado larval, la mortalidad se evaluó cada tres días en ocho ocasiones, de la cuales, en siete fechas, la mortalidad siempre fue mayor en la concentración más alta ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$), y sólo a los 24 días (última evaluación en el estado larval), los porcentajes fueron iguales entre las dos concentraciones (0.01 y $1 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Tukey, $P \leq 0.05$). Por otra parte, la mortalidad se incrementó a través del tiempo, a los tres días, con $0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$ la mortalidad sólo fue del 9.0%, pero a los 24 días, ésta fue del 62.6%; en el caso de la concentración de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, a los tres días la mortalidad fue del 15%, y a los 24 días del 70.4% (Cuadro 10).

**EFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN
Spodoptera frugiperda (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)**

Cuadro 10. Porcentaje de mortalidad acumulada corregida a través del tiempo de larvas de *H. zea* alimentadas con dieta contaminada con dos concentraciones de la proteína Cry1Ac de *B. thuringiensis*.

Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	Periodo larval (días)				
	3±E*	6±E*	9±E*	12±E*	15±E*
0.01	9.0±1.7a	15.0±1.1a	22.1±3.0a	35.5±3.2a	41.2±2.9a
1	15.0±0.9b	28.7±1.7b	34.0±2.8b	45.5±2.9b	52.5±2.2b

*Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $P \leq 0.05$).
E Error Estándar de la media.

Continuación del Cuadro 10.

Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	Periodo larval (días)			
	18±E*	21±E*	24±E*	pupas
0.01	49.9±4.3a	57.6±3.1a	62.6±7.8a	71.4±6.0a
1	60.9±3.7b	67.8±5.1b	70.4±8.1a	83.7±4.8a

*Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $P \leq 0.05$).
E Error Estándar de la media.

Peso de larvas a los 3 y 12 días. El peso de las larvas se redujo al aumentar la concentración de la proteína. A los tres días, el peso promedio de las larvas testigo fue de 3.1 mg, con $0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$ pesaron 2.0 mg, y con la concentración más alta ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) fue de 0.1 mg, es decir, 3.0 mg menos que las larvas testigo. A los 12 días, las larvas testigo pesaron 519.6 mg en promedio, con $0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$ fue de 212.9 mg, y con $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ el peso registrado fue de 167.9 mg, es decir 351.7 mg (67.6%) menos que las larvas testigo. El peso de las larvas a los tres y 12 días fueron estadísticamente diferentes entre sí (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 12).

Tiempo en llegar al estado de pupa. En el testigo, las pupas se desarrollaron a los 20.9 días, con $0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$ a los 22.3 días, y con $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ fueron 24.6 días. La diferencia para desarrollarse al estado de pupa entre el testigo y la concentración más alta fue de 3.7 días. Estadísticamente, el tiempo que las larvas se desarrollaron al estado de pupa fueron diferentes entre las concentraciones evaluadas (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 11).

Peso de pupas. En el testigo, las pupas pesaron 325.7 mg en promedio, con $0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$ fue 238.2 mg, y con la concentración más alta ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) el peso fue de 195.4 mg, es decir, 130.3 mg (40%) menos que en el testigo. Estadísticamente, el peso de las pupas entre los tratamientos fueron diferentes entre sí (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 12).

**EFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN
Spodoptera frugiperda (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)**

Cuadro 11. Efecto de dos concentraciones de la proteína Cry1Ac de *B. thuringiensis* en *H. zea* sobre el tiempo de desarrollo (días) de larvas neonatas a pupa y adulto.

Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	N ¹	N ²	T ¹ ±E*	N ³	T ² ±E*
TESTIGO	300	69.3	20.9±0.9a	63.3	27.8±0.9a
0.01	300	21.3	22.3±0.1ab	10.0	32.2± 0.7b
1	300	16.7	24.6±0.2b	3.3	34.8±0.5c

N¹ Número de larvas expuestas a las diferentes concentraciones de la proteína Cry1Ac

N² Porcentaje de larvas que llegaron al estado de pupa.

N³ Porcentaje de larvas que llegaron al estado de adulto.

T¹ Tiempo transcurrido en días desde larvas neonatas al estado de pupa.

T² Tiempo transcurrido en días desde larvas neonatas al estado de adulto.

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

E Error Estándar de la media.

Cuadro 12. Peso promedio de larvas a los 3 y 12 días, peso de pupas y adultos de *H. zea* alimentada con dos concentraciones de la proteína Cry1Ac de *B. thuringiensis*.

Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	Peso en mg			
	Larvas (3 días±E*)	Larvas (12 días±E*)	Pupas ±E*	Adulto±E*
TESTIGO	3.1±0.2a	519.6±20.6a	325.7±5.9a	85.9±4.4a
0.01	2.0±0.2b	212.9±20.8b	238.2±6.9b	70.0±1.2b
1	0.0±0.0c	167.9±2.9c	195.5±6.7c	51.3±2.2c

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

E Error Estándar de la media.

Tiempo en llegar al estado de adulto. En el testigo las larvas se desarrollaron al estado adulto a los 27.8 días en promedio, con $0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$ fueron a los 32.2 días, y con la concentración más alta ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) se desarrollaron a los 34.8 días. La diferencia en tiempo para que se desarrollaran los adultos en el testigo y la concentración más alta fue de 7 días. Estadísticamente, el tiempo de desarrollo de las larvas al estado adulto fueron diferentes entre los tratamientos (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 11).

Peso de adultos. En el testigo los adultos pesaron en promedio 85.9 mg, con $0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$ fue de 70.0 mg, y en la concentración más alta ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) de 51.3 mg, lo cual, representó una diferencia de 34.6 mg entre el testigo y la concentración más alta. En todos los tratamientos se observaron diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 12).

Los daños provocados por los insectos, depende en gran medida de la susceptibilidad a la toxina de *B. thuringiensis*, la patogenicidad de las toxina, la concentración de la toxina, el periodo de exposición o de alimentación de las larvas

con alimentos contaminados con la toxina y el estado del desarrollo del insecto en la cual se expone al tóxico. Para este estudio, se trabajó con el gusano elotero *H. zea*, una especie que ya ha sido reportada en varios trabajos como sensible a las toxinas Cry1Ac y Cry2Ab de *B. thuringiensis* y se usaron larvas neonatas, ya que son las más sensibles que cualquier otro estado de desarrollo. En cuanto a la variación de las concentraciones de las toxinas y tiempo de exposición, es posible predecir que a mayor concentración y mayor tiempo de exposición, los insectos susceptibles muestran mayor daño en todos sus estados de desarrollo. El daño de las toxinas en los insectos, cualquiera que sea su estado de desarrollo, se puede manifestar de muchas maneras (Gore *et al.*, 2003). En este estudio por ejemplo, los daños ocasionados por las diferentes concentraciones subletales fueron evaluados a través de algunas variables, tales como: la mortalidad, reducción del peso de las larvas, pupas y adultos, tiempo requerido para la formación de las pupas y la emergencia de los adultos. Todos estos efectos subletales están muy relacionados con el mecanismo de acción de las toxinas de *B. thuringiensis*. De acuerdo con varios autores (Broderik *et al.*, 2006), durante el proceso de intoxicación de los insectos con toxinas de *B. thuringiensis*, ocurren las siguientes fases: 1) ingestión y solubilización del cristal proteínico en el intestino medio del insecto, 2) liberación de las proteínas cristalinas en forma de protoxinas, 3) proceso de las toxinas por proteasas intestinales, 4) generación de toxinas activas que provocan lisis celular y la muerte. De acuerdo a lo anterior, el daño se ocasiona en el estado de larva, por lo que en este estado de desarrollo se pueden presentar los efectos letales y subletales, mientras que en los estados de pupa y adulto se presentan los efectos subletales, provocados por los periodos de exposición a la toxina en estado de larva, y si éstos son severos, puede conducir a la muerte de los individuos. Se puede afirmar que, tanto los efectos letales como subletales contribuyen en un momento dado a reducir la población de los insectos, pero esto depende de la toxina, dosis y el tiempo de exposición. Los resultados obtenidos en este trabajo permiten demostrar que, a manera que se incrementa la concentración el porcentaje de mortalidad aumenta; por ejemplo, a los tres días, con $0.001 \mu\text{g mL}^{-1}$ la mortalidad con la Cry2Ab fue de 4.0% y con la Cry1Ac de 2.7%; a los 27 días de exposición, la mortalidad ya fue de 57.3% con la primera proteína y de 56.1% con la segunda. En el caso de la

concentración de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de la Cry2Ab, que fue la concentración más alta para las dos proteínas, a los 27 días, la mortalidad ya fue del 87.1%, y con la Cry1Ac, la mortalidad fue del 90.8%. Esto se debe a que la proteína Cry1Ac es más tóxica contra el gusano elotero que la Cry2Ab. Por otra parte, también se observó el efecto letal al incrementar la concentración de cada una de las proteínas. Con $0.001 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Cry2Ab, la mortalidad fue de 4.0% a los tres días, pero con $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, la mortalidad ya fue del 26.0%; en el caso de la proteína Cry1Ac, con $0.001 \mu\text{g mL}^{-1}$ la mortalidad fue del 2.7%, y con $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ fue del 20.6%. En general, la mortalidad fue dependiente de la concentración a la que estuvieron expuestas, dando como resultado que a mayor concentración mayor porcentaje de mortalidad y esto fue progresivo a través del tiempo. En el caso de la proteína Cry2Ab, en el segundo experimento donde sólo se evaluaron dos concentraciones (0.01 y $1 \mu\text{g mL}^{-1}$) y el testigo, la mortalidad de las larvas fueron similares que con los resultados del primer experimento en las mismas concentraciones; por ejemplo, a los 24 días, con $0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$, en el primer y segundo experimento la mortalidad fue del 58.2%. Con la proteína Cry1Ac, en el primer experimento la mortalidad fue del 58.2% y en el segundo fue de 24.3%. Con la concentración de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, de igual forma, a los 24 días, con la proteína Cry2Ab, en el primer experimento fue de 68.3%, y en el segundo experimento de 77.7%. Para el caso de la proteína Cry1Ac, la mortalidad en el primer experimento fue del 73.6%, y en el segundo de 70.4%. Con estos ejemplos se confirma la consistencia de los resultados sobre los efectos letales de larvas del gusano elotero de los dos experimentos realizados. En el caso de la mortalidad en el estado de pupa también fueron similares. Estudios realizados por Silva *et al.*, (2010) quienes mostraron que *Peumus boldus* Molina provocó el 67.5% de mortalidad a una concentración del 8% y concentraciones menores al 2% no superaron el 40% de mortalidad, el peso de larvas y pupas se redujo conforme se incrementó la concentración ya que en el testigo las larvas pesaron 730 mg, con el 1% 500 mg y con 8% de 80 mg; por su parte, Eizaguirre *et al.* (2005), evaluaron los posibles efectos subletales de *B. thuringiensis* variedad Kurstaki (Dipel DF) sobre el desarrollo de *Sesamia nonagrioides* y señalan que la mortalidad de pupa fue del 20% al exponer las larvas a una concentración de 0.35 mg kg^{-1} .

**EFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN
Spodoptera frugiperda (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)**

El peso de las larvas también estuvo en función de la concentración y del tiempo de exposición. Con la proteína Cry2Ab, a los tres días, en todas las concentraciones todos los pesos estuvieron por debajo de los 2.9 mg, pero a los 12 días, las larvas incrementaron su peso significativamente, en el testigo, las larvas pesaron 470.9 mg, mientras que con $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ el peso fue de 144.4 mg; la diferencia entre estos dos tratamientos fue de 326.5 mg. Con la proteína Cry1Ac, a los 12 días, en el testigo las larvas pesaron 453.7 mg, y con $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ el peso fue de 183.8 mg; la diferencia fue de 136.5 mg. Las larvas cuando ingieren una dosis baja de la toxina por un tiempo determinado, generalmente tienden a recuperarse debido a la regeneración de nuevas células intestinales, por lo que continúan con su alimentación, pero cuando ingieren una dosis mayor, se incrementa la cantidad de células intestinales dañadas, por lo que dejan de alimentarse parcialmente y eso se refleja en el bajo peso de las larvas. Cuando la dosis es muy alta y el tiempo de intoxicación es prolongado, las larvas pueden dejar de comer por completo y morir por inanición; razón por la cual, en este estudio se observó que a mayor concentración y mayor tiempo de exposición, las larvas redujeron su peso respecto al testigo. Los pesos también se redujeron en los estados de pupa y adulto como consecuencia del daño ocasionado en el estado larval, ya que en esta especie, las larvas son las que se especializan en la alimentación y acumulan más de 95% de sus reservas para continuar con su desarrollo al estado de pupa y adulto; en el estado adulto solamente se llegan a alimentar de algunos líquidos como agua y algunos néctares. Con la proteína Cry2Ab, las pupas testigo pesaron 404.9 mg, y los adultos 89.1 mg, mientras que con $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, las pupas pesaron 140.1 mg (264.8 mg menos que el testigo) y los adultos 33.4 mg (55.7 mg menos que el testigo). En el caso de la proteína Cry1Ac, las pupas testigo pesaron 327.2 mg y los adultos 83.4 mg, mientras que con $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, las pupas pesaron 162.7 mg (164.5 mg menos que el testigo) y con esta concentración no hubo emergencia de adultos. Horner y Dively, (2003), y Horner *et al.* (2003), revelan que los efectos subletales de las endotoxinas Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis* variedad kurstaki (Bt) del maíz transgénico MON810 afectan el desarrollo larval del gusano elotero. A los 12 días con la proteína Cry1Ac, el peso con 0.01 y $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ fue de 327.8 y 253.3 mg, datos similares reportan Zeener de Polonia *et al.*, (2009) quienes muestran la misma tendencia, pero

los pesos larvales no coinciden debido a que los pesos fueron menores: de 35.7 mg con $0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$, mientras que con $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ pesaron sólo 13.7 mg a los 20 días de desarrollo larval, esto puede ser por que las condiciones del laboratorio correspondieron a temperaturas más bajas ($23.5 \pm 1^\circ\text{C}$), humedad relativa de $68 \pm 4\%$ y en total oscuridad. De igual forma no coinciden con los pesos obtenidos por Adamczyk y Gore (2004), quienes alimentaron las larvas de *H. zea* con las variedades transgénicas de algodón NuCOTN 33B que produce la toxina Cry1Ac a una concentración de 8.56 ppm y la variedad DP 50B que produce 2.85 ppm. Las larvas fueron pesadas a los 14 días, y el peso del primer grupo correspondió a 54.47 mg y el del segundo grupo a 99.92 mg.

Otro de los efectos subletales, es el retraso para alcanzar el estado de pupa y adulto. Las larvas, al detener parcial o completamente su alimentación, la cual depende de la concentración y el tiempo de exposición a la toxina, posiblemente también se afectan varias funciones fisiológicas relacionadas con su desarrollo, como por ejemplo, el proceso de muda y la metamorfosis (Stapel *et al.*, 1998). Las larvas del gusano elotero deben mudar seis veces antes de ocurrir la metamorfosis para transformarse al estado de pupa y posteriormente al estado de adulto (King y Saunders, 1984). En el caso de la proteína Cry2Ab, en la concentración más alta $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, las pupas se formaron a los 25.7 días y los adultos a los 33.0 días, mientras que en el testigo, las pupas se formaron a los 16.7 días (9 días más rápido que con $5 \mu\text{g mL}^{-1}$) y los adultos a los 26.7 días (6.3 días más rápido que con $5 \mu\text{g mL}^{-1}$). Con la Cry1Ac, en la concentración más alta $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, las pupas se formaron a los 25.2 días y en el testigo a los 20.4 días (4.8 días más rápido) y los adultos se formaron 29.9 días en el testigo, mientras que adultos en la concentración más alta no hubo. Los resultados de este estudio concuerdan con los reportados por Dong *et al.* (2013), quienes indican que la toxicidad de Spinosad sobre *Spodoptera exigua* a las 48 y 72 horas con tratamientos de 0.317 y $0.293 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, los efectos subletales se mostraron en la reducción del peso y prolongación del periodo larval. Dutton *et al.* (2005), evaluaron los efectos que provoca el maíz que expresa la toxina Cry1Ab y la aspersión de Bt sobre *Spodoptera littoralis* y afirman que el desarrollo de las larvas se prolonga, el peso de pupas no se vió afectado, lo que demuestra que en esta etapa el peso promedio de los individuos no lo hizo diferir entre los tratamiento. S.

littoralis no fue sensible a este Cry1Ab. Sin embargo, nuestros resultados demuestran que ambas toxinas muestran efectos subletales contra *H. zea*. Moreau y Bauce (2003), también evaluaron los efectos subletales usando *B. thuringiensis* en *Choristoneura fumiferana*, afirmando que el desarrollo larval se prolongó en días y que se redujo el peso de las pupas.

Por otra parte, es importante señalar los porcentajes de larvas que alcanzan el estado de pupa y el estado adulto. Por ejemplo, con la Cry2Ab, en el testigo, el 69.3% de las larvas se desarrollaron al estado de pupa; de las cuales, el 63.3% alcanzaron el estado de adulto. Con la concentración de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sólo el 6.0% de las larvas alcanzaron el estado de pupa (63.3% menos que el testigo) y el 1.3% el estado de adulto; es decir, 62% menos adultos que en el testigo. En general, para esta proteína (Cry2Ab), en la concentración más alta 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sólo el 1.3% de las larvas se desarrollaron hasta el estado adulto, de las cuales, se retrasaron 9 días respecto al testigo y su peso promedio fue de 55.7 mg menos que los adultos del testigo. En el caso de la proteína Cry1Ac, en el testigo, el 62.0% de las larvas se desarrollaron al estado de pupa; de las cuales, el 56.7% alcanzaron el estado de adulto. Con la concentración de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sólo el 2.7% de las larvas alcanzaron el estado de pupa (59.3% menos que el testigo) y 0% se desarrollaron al estado adulto. En general, para esta proteína (Cry1Ac), en la concentración más alta 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, no hubo adultos. Pero cabe señalar que también las concentraciones bajas e intermedias tuvieron importantes impactos en el desarrollo de estos insectos, a pesar de que estuvieron expuestas a concentraciones más bajas de las toxinas. Los resultados obtenidos permiten demostrar que los efectos subletales, impactan en su desarrollo, lo que conlleva a una disminución en la densidad poblacional. En este estudio, los experimentos se realizaron en condiciones de laboratorio, pero se recomienda que las evaluaciones también se realicen en condiciones de campo, con aplicaciones de productos comerciales (Bioinsecticidas) o en las plantas transgénicas, debido a que en campo pueden existir factores que beneficien la acción de las toxinas de *B. thuringiensis*, tal como, presencia de enemigos naturales, tales como los parasitoides, depredadores u otros entomopatógenos, y podrían ser más eficientes en el control de las plagas, o bien, podrían existir algunos factores que favorezcan la sobrevivencia de las plagas como es el escape a la exposición de las toxinas de Bt,

mediante la alimentación de otras plantas hospederas o las condiciones ambientales que reducen la efectividad de las toxinas de *B. thuringiensis*.

7.5. CONCLUSIONES

Las concentraciones evaluadas de la proteína Cry2Ab y Cry1Ac de *B. thuringiensis* en larvas de *Helicoverpa zea*, afectaron significativamente el desarrollo de esta especie en todos sus estados de desarrollo, incluso, en la concentración más alta, la mortalidad fue del 100%. En el caso de la proteína Cry2Ab, La mortalidad de las larvas aumentó conforme se incrementaron las concentraciones de la proteína, a los 27 días, la mortalidad fue del 87.1% en la concentración más alta ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) y del 57.3% con la concentración más baja ($0.001 \mu\text{g mL}^{-1}$). La mortalidad de pupas fue del 91.4% en la concentración más alta. Por otra parte, la diferencia en peso de las larvas entre el testigo y la concentración más alta a los tres y 12 días fueron del 2.8 y 326.5 mg respectivamente, y la diferencia del peso en el estado de pupa fue de 264.8 mg y en el estado adulto de 55.7 mg. También se incrementó el tiempo para la formación de pupas y adultos con respecto al testigo, con $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ el incremento en tiempo para la formación de pupas fue de 9.0 días y para la emergencia de adultos de 6.3 días.

Los resultados del segundo bioensayo (dos concentraciones 0.01 y $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ y un testigo) para corroborar la consistencia de los resultados de primer bioensayo, confirmaron los resultados de los parámetros evaluados en el primer bioensayo, donde la mortalidad de pupas fue del 86.8%, el peso de larvas a los tres días fue de 1.7 mg, y el peso a los 12 días de 366.1 mg, en la concentración más alta ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$), el peso de las pupas y adultos se redujo respecto al testigo en 243.0 y 37.9 mg y el tiempo de desarrollo al estado de pupa y adulto se incrementó en 5.8 y 5.9 días.

Para la proteína Cry1Ac, la mortalidad de las larvas también aumentó conforme se incrementaron las concentraciones de la proteína, a los 27 días la mortalidad fue del 90.8% en la concentración más alta ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) y del 51.6% con la concentración más baja ($0.001 \mu\text{g mL}^{-1}$). La mortalidad de pupas fue del 95.9% con la concentración más alta. Por otra parte, la diferencia en peso de las larvas entre el testigo y la concentración más alta a los tres y 12 días fueron de 2.9 y 269.9 mg respectivamente, y la diferencia del peso en el estado de pupa fue de 194.5 mg y en

el estado adulto de 31.4 mg. También se incrementó el tiempo para la formación de pupas y adultos con respecto al testigo, con 5 µg mL⁻¹ el incremento en tiempo para la formación de pupas fue de 4.8 días y para la emergencia de adultos de 5.1 días. Los resultados del segundo bioensayo (dos concentraciones 0.01 y 1 µg mL⁻¹ y un testigo) para corroborar la consistencia de los resultados de primer bioensayo, confirmaron los resultados de los parámetros evaluados en el primer bioensayo; por ejemplo, con la concentración más alta (1 µg mL⁻¹), la mortalidad de pupas fue del 83.7%, el peso de larvas a los tres días fue de 3.0 mg, y el peso a los 12 días de 312.9 mg, el peso de las pupas y adultos se redujo respecto al testigo en 130.3 y 34.6 mg, y el tiempo de desarrollo al estado de pupa y adulto se incrementó en 3.7 y 7.0 días.

7.6. LITERATURA CITADA

- Abbott, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18: 265-267.
- Abd-elghafar, S. F., C. O. Knowles y M. L. Wall. 1993. Pyrethroid resistance in two field strains of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol. 86: 1651-1655.
- Adamcyk, J. J. y J. Gore. 2004. Laboratory and field performance of cotton containing Cry1Ac, Cry1F, and both Cry1Ac and Cry1F (Widestrike®) against beet armyworm and fall armyworm larvae (Lepidoptera: Noctuidae). Florida Entomologist. 87:427-432.
- 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.
- Aronson, A. L., W. Beckman y D. Peter. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insects pathogens. Microbiol. Rev. 56: 1-24.
- Balzarini, M. G., L. González, M. Tablada, F. Casanoves, J. A. Di Rienzo y C. W. Robledo. 2008. Infostat. Manual del Usuario, Editorial Brujas, Córdoba, Argentina.
- Benedict, J. H., E. S. Sachs, J. L. Halcomb, D. R. Ring, B. Cook, D. M. Stelly, D. W. Altman, R. J. Kohel, J. C. Correa, M. W. Goynes, J. F. Taylor y S. K. Davis.

1994. Feeding preference and movement of tobacco budworm and bollworm in mixed stands of transgenic Bt and non-Bt cotton. Annual Plant Resistance to Insects New letter. 20: 31-32.
- Bergvinson, D. J. 2005. *Heliothis/ Helicoverpa* Management Emerging Trends and Strategies for Future Research (pp. 7-37). Plymouth, UK. Science Publishers, Inc.
- Blanco, C. A., A. P. Teran-Vargas, J. D. López, J. V. Kauffman y X. Wei. 2007. Densities of *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in three plant hosts. Florida Entomologist. 90: 742-750.
- Broderik, N., K. Raffa y J. Handelsma. 2006. Bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 103: 549-57.
- Buntin, G. D., R. D. Lee, D. M. Wilson y R. McPherson. 2001. Evaluation of Yieldgard transgenic resistance for control fall armyworm and corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae) on corn. Florida Entomologist. 84:37-42.
- 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.
- Dong, W., W. Yong-Ming., L. HUI-Yuan., X, Zheng y X. Ming. 200. Lethal and sublethal effects of spinosad on *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol. 1: 1825-1831.
- Dutton, A., J. Romeis y F. Bigler. 2005. Effects of Bt maize expressing Cry1Ab and Bt spray on *Spodoptera littoralis*. Entomologia Experimentalis et Applicata. 1143:161–169.
- Eizaguirre, M., S. Tort, C. López y R. Albajes. 2005. Effects of sublethal concentrations of *Bacillus thuringiensis* on larval development of *Sesamia nonagrioides*. J. Econ. Entomol. 98: 464-470.
- Fast, P. G. 1974. *Bacillus thuringiensis* its history and mode of action. Dev.Ind. Microbial. 15: 195-198.
- Fast, P. G., D. W. Murphy y S. S. Sohi. 1978. *Bacillus thuringiensis* -endotoxin: evidence that toxin acts at the surface of susceptible cells. Experientia. 34: 762-763.

- Feldman, J. y T. Stone. 1997. The development of a comprehensive resistance management plan for potatoes expressing the cry3A endotoxina, pp. 49-61. In N. Carozzi y M. Koziel (eds). *Advances in Insect Control: the role of transgenic plants*. Taylor and Francis, London.
- Fitt, G. P. 1989. The Ecology of *Heliothis* species in Relation to Agroecosystems. *Annu. Rev. Entomol.* 34: 17-52.
- Gawron-Burke, C. y J. A. Baum. 1991. Genetic manipulation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein genes in bacteria, *In: Setlow JK (Ed.). Genetic engineering principles and methods*, 13. Plenum Press, New York, p. 237.
- Gill, S. S., E. A. Cowles y P. V. Pietrantonio. 1992. The mode on action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu. Rev. Entomol.* 37:615-636.
- Gilroy, T. E. y E. R. Wilcox. 1992. Hibrid *Bacillus thuringiensis* gene, plasmid and transformed *Pseudomonas fluorescens*. U.S. patent 5, 128, 130.
- Gore, J., B. R. Leonard y J. J. Adamczyk. 2001. Bollworm (Lepidoptera: Noctuidae) Survival on Bollgard and Bollgard II Cotton Flower Bud and Flower Components. *J. Econ. Entomol.* 94: 1445-1451.
- Gore, J., B. R. Leonard y R. H. Jones. 2003. Influence of agronomic hosts on the susceptibility of *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae) to genetically engineered and non-engineered cotton. *Environ. Entomol.* 32: 103-110.
- Harding, J. A. 1976. *Heliothis* spp.: seasonal occurrence, hosts and host importance in the lower Rio Grande Valley. *Environ. Entomol.* 5: 666-668.
- Horner, T. A., G. P. Dively y D. A. Herbert. 2003. Development, survival and fitness performance of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in MON810 Bt field corn. *J. Econ. Entomol.* 96:914–924.
- Horner., T. A. y G. P. Dively. 2003. Effect of MON810 Bt Field Corn on *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) Cannibalism and Its Implications to Resistance Development. *J. Econ. Entomology* 96:931-934.
- Huber, H. E. y P. Luthy. 1981. *Bacillus thuringiensis* delta endotoxin; composition and activation. pp. 209-234. *In* E. W. Davidson (Ed.). *Pathogenesis of Invertebrate Microbial Diseases*. Allenheld. Osmun Publisher. N. J.

- Hutchison, W. D., E. C. Burkness, B. Jensen, B. R. Leonard, J. Temple, D. R. Cook, R. A. Weinzierl, R. E. Foster, T. A. Rabaey y B. R. Flood. 2007. Evidence for decreasing *Helicoverpa zea* susceptibility to pyrethroid insecticides in the Midwestern United States. Plant Health Progress.
- Koziel, M. K., F. L. Belang, C. Bowman, N. B. Carozzi, R. Crenshaw, L. Crossland, J. Dawson, N. Desai, M. Hill, S. Kadwell, K. Launis, K. Lewis, D. Addox, K. Mcpherson, M. R. Mefhji, E. Merlin, R. Rhodes, G. W. Warren, M. Wright y S. Evola. 1993. Field performance of elite transgenic maize plants expressing and insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. Biotechnol. 11: 194-200.
- King, A.B.S y J. L. Saunders. 1984. Plagas Invertebradas de Cultivos Anuales Alimenticios en America Central. TDR, CATIE. 182 pp.
- Knowles, H. B., W. E. Thomas y D. J. Ellar. 1984. Lectinlike binding of *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* lepidopteran-specific toxin is an initial step in insecticidal action. FEBS Microbiol. Lett. 168: 197-202.
- Luttrell, R.G., L. Wan y K. Knighten. 1999. Variation in Susceptibility of noctuid (Lepidoptera) larvae attacking cotton and soybean to purified entotoxin proteins and commercial formulations of *Bacillus thuringiensis*. J. Econ. Entomol. 92: 21-32.
- Morillo, F. y A. Notz. 2003. Resistencia de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a lambdacihalotrina y metonil. Entomotropica 16: 79-87.
- Moreau, G. y E. Bause. 2003. Lethal and sublethal effects of single and double applications of *Bacillus thuringiensis* variety *kurstaki* on Spruce Budworm (Lepidoptera: Tortricidae) Larvae. J. Econ. Entomol. 96: 280-286.
- Neunzig, H. H. 1963. Wild host plants of the corn earworm and the tobacco budworm in eastern North Carolina. J. Econ. Entomol. 56: 135-139.
- Perlak, F., T. B. Stone., Y. M. Muskopf., L. J. Petersen., G. B. Perker., S. A. Mcpherson., J. Wyman., S. Love., D. Biever., G. Reed y D. Fischhoff. 1993. Genetically improved potatoes; protection from damage by Colorado potato beetles. Plants Molecular Biol. 11: 313-321.

- Pietrantonio, P. V., T. A. Juneck, 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.
- Roel, A. y J. D. Vendramim. 2006. Efeito residual do extracto acetato de etila de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) para lagartas de diferentes idades de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). *Ciencia Rural.* 36: 1049-1054.
- Silva, G., J. C. Rodriguez., A. Lagunes., C. Llanderal., R. Alatorre., A. M. Shelton y C. A. Blanco. 2010. Toxicidad del aceite esencial de *Peumus boldus* Molina sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) y *Helicoverpa zea* Boddie. Tesis Doctoral. Colegio de Postgraduados. México. pp. 68-88.
- Sousa, M., A. Roel., E. J. Arruda e A y S. Marques. 2007. Eficiencia de productos vegetais no controle da largarta-do cartucho-do milhp *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidopteran: Noctuidae). *Cienc. Agrotec.* 31: 326-331.
- Stapel, J. O., J. W. Deborah, J. R. Ruberson y W. L. Joe. 1998. Development and behavior of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in choice fest with Food substrates containg toxins of *Bacillus thuringiensis*. *Biological control.* 11: 29-37.
- Tillman, P. G y Jr. G. Mullinix. 2004. Grain sorghum as a trap crop for corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae) in cotton. *Environ. Entomol.* 33: 1371-1380.
- Yu, S. J. 1992. Detection and biochemical characterization of insecticide resistance in Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 85: 675-682.
- Yu, S.J. 2008. The toxicology and biochemistry of insecticides. CRC Press. Boca Florida. USA.
- 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.
- Zeener de Polonia, I., R. A. Álvarez y M. H. Arévalo. 2009. Respuestas de *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae), Procedente del Piedemonte Llanero Colombiano, a la Toxina Cry1Ac del *Bacillus thuringiensis*. *Southwestern Entomologist.* 35: 85-98.

VII. CAPITULO 3.- EFECTO SUBLETAL DE LAS PROTEÍNAS Cry2Ab Y Cry1Ac DE *Bacillus thuringiensis* BERLINER EN GUSANO COGOLLERO *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) EN LA F0 y F1.

8.1. RESUMEN

El gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* J. E. Smith), es un insecto que ataca a varios cultivos como maíz, algodón y tomate. El control de esta plaga se hace principalmente con el uso de insecticidas químicos. Una de las alternativas es el uso de la bacteria *Bacillus thuringiensis kurstaki* que ha sido ampliamente usada para el control de varias especies de insectos lepidópteros. El objetivo de este trabajo fue evaluar en condiciones de laboratorio los efectos subletales de las proteínas Cry2Ab y Cry1Ac de *B. thuringiensis kurstaki* en todos los estados de desarrollo de *S. frugiperda* de las generaciones F0 y la producción de huevos y larvas de la generación F1. Los bioensayos consistieron en alimentar en todo el estado larval del gusano cogollero con dieta artificial contaminada de diferentes concentraciones de las proteínas Cry2Ab y Cry1Ac. Las concentraciones usadas de la proteína Cry2Ab fueron: 0.001, 0.01, 0.1, 1, 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y un testigo absoluto, y con la proteína Cry1Ac, además de las concentraciones usadas en la Cry2Ab, con excepción de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, se usaron además las concentraciones de 10 y 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, incluyendo al testigo absoluto. Los resultados indicaron que la mortalidad de larvas, pupas, adultos de la F0 se incrementaron al aumentar las concentraciones de las proteínas y también a través del tiempo. En el caso de la proteína Cry2Ab, en la concentración más alta de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, el porcentaje de mortalidad a los 24 días fue del 60.3%, se prolongó el ciclo de vida de los insectos respecto al testigo, ya que para alcanzar el estado de pupa el incremento fue de 3.1 días, adulto 5.9, huevos y larvas neonatas de la siguiente generación (F1) 6.0 y 7.3 días respectivamente. Por otra parte, se redujo el 56.0% de pupas y 64.7% de adultos. En esta misma concentración, las hembras adultas ovipositaron 610.6 huevos menos que las hembras testigo, y la diferencia en el número de larvas que emergieron fueron de 655. Con la proteína Cry1Ac, en la concentración más alta de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, el porcentaje de mortalidad fue del 75.8%, se prolongó el ciclo de vida de los insectos respecto al testigo, ya que para alcanzar el estado de pupa el incremento fue de 2.7 días, adulto 4.1, huevos y larvas neonatas de la siguiente generación (F1) 6.2 y 8.0

días respectivamente. Por otra parte, se redujo el 78.0% de pupas y el 84.7% de adultos, en el caso de los huevos *F1* hubo 627.7 menos que en testigo y larvas *F1* no emergieron.

Los resultados de éstos estudios indican que las concentraciones subletales de las dos proteínas de *Bacillus thuringiensis* no matan el 100% de las larvas, pero sí afectan todos los estados de desarrollo de los insectos, lo cual contribuyen a reducir el número de individuos de la misma generación (*F0*) y de la siguiente (*F1*) de las poblaciones afectadas.

Palabras clave: Plaga, *F0*, *F1*, proteína.

8.2. INTRODUCCIÓN

Los insectos plaga son el principal problema fitosanitario capaz de causar pérdidas superiores al 30% (Del Rincón *et al.*, 2006). El gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) es un insecto altamente polífago que afecta a cultivos de importancia económica, tales como el maíz (*Zea mays* L.), soya (*Glycine max* L.), tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), algodón (*Gossypium hirsutum* L.), tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) (Bergvinson, 2005). El control de esta plaga es principalmente mediante el uso de insecticidas químicos (Cook *et al.*, 2004), pero el desarrollo de resistencia a estos productos convencionales ha disminuido su uso (Yu, 1992; Abd-elghafar *et al.*, 1993; Al-Sarar *et al.*, 2006; Pietrantonio *et al.*, 2007). En la actualidad el uso de insecticidas microbiales y vegetales son los grupos de biocidas naturales más utilizados en el control de las plagas. Uno de los insecticidas microbiales es *Bacillus thuringiensis* (Bt), una bacteria gram positiva, formadoras de δ -endotoxinas como inclusiones paraesporales que proteolíticamente se convierten en pequeñas moléculas tóxicas (Gill *et al.*, 1992). Estas protoxinas se unen a las microvellosidades de la membrana epitelial del intestino medio de las larvas susceptibles, y produce pequeños poros que alteran el balance osmótico de las células, provocando el rompimiento de las células, y como consecuencia, la destrucción del intestino medio del insecto (Yu, 2008). Actualmente existen varios productos comerciales a base de esta bacteria, la cual es recomendada principalmente contra insectos lepidópteros y en menor grado contra dípteros y

coleópteros. En las dos últimas décadas, los avances de la ingeniería genética han logrado la inserción de genes responsables de la síntesis de toxinas de *B. thuringiensis* en cultivos de importancia económica como maíz (*Z. mays* L.) y algodón (*G. hirsutum* L.), capaces de expresar una alta concentración de la toxina Cry1Ac (Perlak *et al.*, 1993). El uso de insecticidas a base de esta bacteria es principalmente para contrarrestar a las plagas de una manera más racional y sin dañar al medio ambiente, en la mayoría de estos productos no eliminan al insecto por intoxicación, sino que inhiben el desarrollo normal (Silva *et al.*, 2003) provocando de esta manera efectos subletales a las plagas. Existen estudios que demuestran los efectos letales que los insecticidas químicos e incluso Bt producen, pero aun es escasa la información acerca de los efectos subletales que produce Bt en los insectos lepidópteros; por ello, el objetivo de esta investigación fue evaluar en condiciones de laboratorio los efectos subletales de las proteínas Cry2Ab y Cry1Ac de *B. thuringiensis kurstaki* en los diferentes estados de desarrollo de la generación *F0* y en la producción de huevo y emergencia de larvas de la generación *F1* del gusano cogollero *S. frugiperda* (J. E. Smith).

8.3. MATERIALES Y MÉTODOS

Cría del gusano cogollero. Los experimentos fueron realizados con larvas de *S. frugiperda* provenientes de una colonia que se ha mantenido en el laboratorio de entomología por más de tres años en el Centro Universitario UAEMex Tenancingo. Esta colonia se continuó criando en una cámara de cría en condiciones controladas: temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$, humedad relativa del $75 \pm 5\%$ y un fotoperiodo de 13:11 h luz: oscuridad. Las larvas se alimentaron con una dieta artificial (Fall Armyworm, Southland Products, Inc.) hasta obtener pupas, las cuales se colocaron en jaulas entomológicas (25 x 25 x 35 cm) para la emergencia de los adultos, mismos que fueron alimentados con agua azucarada al 10% (agua destilada y azúcar). Las hembras ovipositaron en bolsas de papel de estraza del número 20, ésta bolsa se cambió cada 24 horas durante el periodo de oviposición. Se obtuvieron larvas que fueron tomadas como *F0* con las cuales se realizaron los bioensayos correspondientes.

Proteína. Para la proteína Cry2Ab se utilizó tejido de maíz modificado genéticamente y liofilizado que contienen la proteína a una concentración de 0.6%, y para la proteína Cry1Ac se utilizó el bioinsecticida comercial MVP II (Mycogen, Corp. San Diego CA) a 19.1%, formulación sólida que contiene una protoxina híbrida similar a la δ -endotoxina Cry1Ac de *B. thuringiensis* var. *Kurstaki*, expresada y encapsulada en *Pseudomonas fluorescens* (Gilroy y Wilcox 1992).

Bioensayos. Los bioensayos consistieron en alimentar en todo el estado larval del gusano cogollero con dieta artificial contaminada con concentraciones de 0.001, 0.01, 0.1, 1 y 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de la proteína Cry2Ab, y concentraciones de 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 y 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de proteína Cry1Ac. La dieta contaminada se cambió cada 72 h (tres días) para evitar exponer las larvas a una proteína degradada. En los primeros seis días de evaluación, cada larva fue alimentada con 1 mL de dieta, en este tiempo, la dieta y las larvas fueron colocadas en charolas para bioensayos (Bio-Assay Tray Bio-BA-128: C-D Internacional, Inc) con 128 cavidades, en cada cavidad se colocó una larva neonata confinada con un plástico transparente autoadherible (PULL N' PEEL Tab Bio-Cv-16; C-D International, Inc.). Posteriormente, se alimentaron con 5 mL de dieta, los cuales, tanto la dieta como las larvas se colocaron en vasitos de plástico del número 0 (Envases Primo Cuevas® S.A. de C.V. Ecatepec, Estado de México, Méx.), y para favorecer el intercambio gaseoso de los vasitos, en la tapa se realizó una pequeña perforación. Al momento de transferir las larvas a la nueva dieta (cada 72 h), se evaluaron los porcentajes de mortalidad, los cuales, para su análisis fueron ajustados mediante la fórmula Abbott (Abbott, 1925):

$$\frac{(\% \text{mortalidad tratamiento} - \% \text{mortalidad testigo})}{(100 - \% \text{mortalidad testigo})} \times 100$$

Las larvas fueron pesadas individualmente a los 3 y 12 días, posteriormente se evaluaron otras variables, tales como el tiempo (días) que alcanzaron el estado de pupa, adulto, de larva *F0* a larva *F1*; así como el peso de las pupas y los adultos, número promedio de huevos (*F1*) por hembra y el promedio de larvas (*F1*) por hembra. Con la finalidad de evaluar las dos últimas variables (huevos *F1* x hembra y larvas *F1* x hembra), las pupas fueron sexadas usando un microscopio estereoscópico de hasta 40x (ZEISS®), las cuales se colocaron en jaulas

entomológicas (25 x 25 x 25 cm). En cada jaula se colocaron 50 hembras y 50 machos cuyas larvas procedieron del mismo tratamiento (larvas alimentadas con dieta contaminada con la misma concentración de toxina). Para la toxina Cry2Ab se utilizaron 18 jaulas (6 tratamientos x 3 repeticiones) y 21 jaulas para la toxina Cry1Ac (7 tratamientos x 3 repeticiones). Durante cinco días se registró el número de hembras y de machos que emergieron en cada jaula, en este tiempo, los adultos fueron alimentados con una solución azucarada al 10% (agua + azúcar), posteriormente, fueron colocados en bolsas de papel del número 20 donde las hembras ovipositaron por 24 horas. Los huevos *F1* fueron cuantificados con la ayuda de un pincel en una caja Petri previamente cuadrículada, y se colocaron en recipientes de plástico de medio litro debidamente etiquetados para la eclosión y la cuantificación de las larvas *F1*.

Diseño experimental y análisis estadístico. Se utilizó el diseño experimental de bloques completos al azar con cinco tratamientos para la proteína Cry2Ab y seis para Cry1Ac con sus respectivos testigo absoluto. Los experimentos se realizaron con tres repeticiones. Para cada tratamiento se iniciaron con 50 larvas neonatas. Los resultados se sometieron a una análisis de varianza y a una prueba de comparación de medias con Tukey con un nivel de significancia del 95% ($P \leq 0.05$) con el programa Infostat (Balzarini, 2008).

8.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PROTEÍNA Cry2Ab

Mortalidad. La mortalidad de las larvas se incrementó conforme aumentó la concentración de la proteína, y a través del tiempo. A los tres días, el porcentaje de mortalidad con la concentración más baja ($0.001 \mu\text{g mL}^{-1}$) fue del 4.7%, en el rango de concentraciones de 0.01 a $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, los porcentajes de mortalidad fluctuaron del 5.3 al 9.3%. A los tres días, en todos los tratamientos fueron iguales estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.05$). A los seis días, el menor porcentaje de mortalidad se registró en la concentración más baja ($0.001 \mu\text{g mL}^{-1}$) que fue del 5.3%, y los porcentajes más altos se registraron en las dos concentraciones más elevadas (1 y $5 \mu\text{g mL}^{-1}$) donde los porcentajes fueron del 14.7 y 15.3%. Los

**EFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN
Spodoptera frugiperda (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)**

porcentajes de mortalidad de los tratamientos intermedios estuvieron entre el 5.3 y 15.3%. Los dos últimos tratamientos fueron iguales y los otros fueron diferentes entre sí (Tukey, $P \leq 0.05$). A los nueve días, el menor porcentaje se registró en la concentración de $0.001 \mu\text{g mL}^{-1}$ cuya mortalidad fue del 5.4%, y la más alta se observó con $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, donde la mortalidad fue del 19.0%; los porcentajes de mortalidad de todos los tratamientos fueron diferentes entre sí, excepto en los tratamientos 0.1 y $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ que fueron iguales (Tukey, $P \leq 0.05$). A los 12 días, los porcentajes de mortalidad más bajos se registraron en las concentraciones de 0.001 y $0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$, donde éstas fueron del 8.2 y 11.6% respectivamente, le siguió la mortalidad del 17.1% registrado en la concentración de $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ y los porcentajes más altos se observaron en las concentraciones más altas (1 y $5 \mu\text{g mL}^{-1}$) cuyas mortalidades fueron del 25.4 y 25.5% (Tukey, $P \leq 0.05$). A los 15 días, las mortalidades más bajas se registraron en las dos concentraciones bajas 0.001 y $0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$, donde las mortalidades fueron del 8.2 y 13.7%, y las mortalidades más altas se registraron en las tres concentraciones más elevadas 0.1 , 1 y $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, con porcentajes de 24.8, 28.9 y 34.4% (Tukey, $P \leq 0.05$). A los 18 días, las mortalidades más bajas se registraron en las concentraciones de 0.001 y $0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$, donde éstas fueron de 9.1 y 14.7% respectivamente, y las mortalidades más altas fueron observadas con 1 y $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, cuyos porcentajes fueron del 32.4 y 43.6%; el 25.3% se registró en la concentración intermedia de $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$, el cual fue diferente a al menor y mayor porcentaje de mortalidad (Tukey, $P \leq 0.05$). A los 21 días, la mortalidad más baja (10.6%) se registró en la concentración de $0.001 \mu\text{g mL}^{-1}$ y la más alta (46.4%) en la concentración de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Los porcentajes de mortalidad de las concentraciones intermedias estuvieron entre el rango del 10.6 al 46.4%. Todos los porcentajes de mortalidad fueron estadísticamente diferentes entre sí (Tukey, $P \leq 0.05$). A los 24 días, la menor mortalidad fue del 12.1% y se registró en la concentración de $0.001 \mu\text{g mL}^{-1}$, mientras que la mayor mortalidad fue del 60.3% y se observó en la de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Las otras mortalidades estuvieron dentro de este rango, registrándose diferencias significativas entre todos los porcentajes de mortalidad (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 1). Durante este desarrollo larval, el efecto de la proteína provocó malformaciones en cada uno de los estadios (larva, pupas y adultos) (Figura 1).

**EFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN
Spodoptera frugiperda (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)**

Cuadro 1. Porcentaje de mortalidad acumulada corregida a través del tiempo de larvas de *S. frugiperda* alimentadas con dieta contaminada con diferentes concentraciones de la proteína Cry2Ab de *B. thuringiensis*.

Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	Periodo larval (días)			
	3±E*	6±E*	9±E*	12±E*
0.001	4.7±1.2a	5.3±1.2a	5.4±1.1a	8.2±3.9a
0.01	5.3±1.2a	12.0±2.0bc	11.5±4.0ab	11.6±4.9a
0.1	5.3±1.2a	10.0±0.0b	13.5±2.9bc	17.1±4.2ab
1	7.3±3.1a	14.7±1.2c	17.0±2.4bc	25.4±3.2b
5	9.3±2.3a	15.3±2.3c	19.0±1.2c	25.5±6.6b

*Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $P \leq 0.05$).
E Error Estándar de la media.

Continuación del Cuadro 1.

Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	Periodo larval (días)			
	15±E*	18±E*	21±E*	24±E*
0.001	8.2±3.9a	9.1±3.1 ^a	10.6±5.6a	12.1±4.4a
0.01	13.7±4.8a	14.0±3.2a	17.8±1.5ab	19.3±2.1ab
0.1	24.8±1.3b	25.3±1.8b	27.1±4.2bc	27.3±3.5b
1	28.9±4.0b	32.4±1.5b	36.4±2.6c	38.5±0.5c
5	34.4±3.2b	43.6±4.6c	46.4±3.1d	60.3±6.3d

*Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $P \leq 0.05$).
E Error Estándar de la media.

Tiempo en llegar al estado de pupa. En el testigo, las larvas se desarrollaron al estado de pupa a los 15.7 días en promedio, mientras que en la concentración más alta fue a los 18.8 días, en concentraciones intermedias (0.001, 0.01, 0.1 y 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) el tiempo requerido para la formación de pupas estuvieron dentro de este rango. La diferencia entre el testigo y la concentración más alta fue de 3.1 días. El tiempo de desarrollo de larvas a pupas fueron estadísticamente diferentes entre las concentraciones evaluadas (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 2).

Tiempo en llegar al estado adulto. En el testigo, las larvas se desarrollaron al estado adulto a los 22.1 días en promedio, y en la concentración más alta fue a los 28.0 días, en concentraciones intermedias (0.001, 0.01, 0.1 y 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) el tiempo requerido para la formación de adultos estuvieron dentro de este rango. La diferencia entre el testigo y la concentración más alta fue de 5.9 días. El tiempo de desarrollo de larvas a adultos fueron estadísticamente diferentes entre las concentraciones evaluadas (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 2).

Tiempo en llegar de larva (F0)-huevo (F1).

En el testigo, las hembras adultas ovipositaron sus huevos en promedio a los 24.6 días, con 0.001, 0.01, 0.1, 1 y 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ovipositaron a los 25.4, 26.2, 28.1, 29.6 y 30.6 días respectivamente. El testigo y las dos primeras concentraciones fueron estadísticamente iguales, le siguió 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, posteriormente 0.001 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y finalmente la concentración más alta 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 2). La diferencia entre el testigo y la concentración más alta fue de 6.0 días.

Tiempo en llegar de larva (F0)-larva (F1). El tiempo requerido para completar el ciclo de larva neonata de la F0 (primera generación) a larva neonata de la F1 se prolongó mientras se incrementó la concentración de la proteína con la que se alimentaron las larvas de la F0. Las larvas testigo eclosionaron a los 27.2 días en promedio, con la concentración más baja (0.001 $\mu\text{g mL}^{-1}$) eclosionaron a los 28.6 días, y con las concentraciones altas (0.1, 1 y 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) las larvas eclosionaron los 32.4, 33.1 y 34.5 días respectivamente. La diferencia en tiempo de eclosión de larvas entre el testigo y la concentración más alta fue de 7.3 días. Estadísticamente, el tiempo de eclosión de larvas desde la F0 a la F1 fueron estadísticamente diferentes entre los tratamientos, excepto el testigo y la concentración baja (0.001 $\mu\text{g mL}^{-1}$), los cuales fueron iguales (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Efecto de diferentes concentraciones de la proteína Cry2Ab de *B. thuringiensis* en *S. frugiperda* sobre el tiempo de desarrollo (días) de larvas neonatas a pupa, adulto, huevo y de larva (F0)-larva (F1).

Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	T ¹ ±E*	T ² ±E*	T ³ ±E*	T ⁴ ±E*
TESTIGO	15.7±0.4 a	22.1±0.5a	24.6±0.2 a	27.2±0.6 a
0.001	16.6±0.5ab	23.6± 0.3ab	25.4± 0.4a	28.6± 0.8a
0.01	17.0±0.1b	25±0.4bc	26.2±0.7a	31.3±0.4b
0.1	17.6±0.4bc	26.1±1.2cd	28.1±1.0b	32.4±0.6bc
1	18.1±0.3cd	27.0±0.3de	29.6±0.6bc	33.1±0.7cd
5	18.8±0.3d	28.0±0.5e	30.6± 0.5c	34.5± 0.6d

T¹ Tiempo transcurrido en días desde larvas neonatas al estado de pupa.

T² Tiempo transcurrido en días desde larvas neonatas al estado de adulto.

T³ Tiempo transcurrido en días desde larvas neonatas (F0) al estado de huevo (F1).

T⁴ Tiempo transcurrido en días desde larvas neonatas (F0) - larva neonata (F1).

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

E Error Estándar de la media

Sexo de pupas. El sexo de los lepidópteros en estado de pupa se observó en la parte ventral, en los segmentos abdominales terminales. El macho (♂) muestra

**EFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN
Spodoptera frugiperda (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)**

una mancha o hendidura oscura con una línea segmentada en forma de pico (figura 2). La hembra (♀) se identifica porque tiene dos manchas o hendiduras oscuras con una línea segmentada que la rodea (figura 3). En este estudio, en el testigo se registraron 69♂ y 72♀, con 0.001 µg mL⁻¹ 62♂ y 59♀; 0.01, 59♂ y 49♀; 0.1, 55♂ y 43♀; 1, 42♂ y 40♀; 5 µg mL⁻¹, 35♂ y 31♀. En la concentración más alta se registraron 41♀ y 34♂ menos que en el testigo (Cuadro 3).

Sexo de palomillas. Los adultos macho se diferenciaron de las hembras. Los machos presentan un color de gris a café claro en las alas con manchas triangulares en las puntas y en el centro de las alas. En las hembras se puede distinguir un color más homogéneo en las alas que va de gris a café oscuro (observación personal) (Figura. 4). El número de adultos machos y hembras disminuyó al incrementar la concentración de la proteína, en el testigo se registraron 57♂ y 59♀, con 0.001 µg mL⁻¹ 51♂ y 46♀; 0.01, 42♂ y 35♀; 0.1, 36♂ y 34♀; 1, 34♂ y 32♀; 5 µg mL⁻¹, 26♂ y 27♀. En la concentración más alta se registraron 32♀ y 31♂ menos que en el testigo (Cuadro 3).

Cuadro 3. Efecto subletal de concentraciones de la proteína Cry2Ab de *B. thuringiensis* en *S. frugiperda* en el número de pupas y adultos (machos y hembras), del número de huevos y larvas neonatas de la F1 por hembra.

Concentración µg mL ⁻¹	N ¹	N ²			N ³			L1±E	L2±E
		T	H♀	M♂	T	H♀	M♂		
TESTIGO	150	139	72	69	116	59	57	772.1±82.3a	766.7±82.8a
0.001	150	121	59	62	97	46	51	346.0±42.9b	305.9±6.8b
0.01	150	108	49	59	77	35	42	324.9±32.7bc	296.2±15.9bc
0.1	150	98	43	55	70	34	36	296.2±86.7bc	234.7±54.6bcd
1	150	82	40	42	66	34	32	202.7±42.6bc	170.0±42.4cd
5	150	66	31	35	53	27	26	161.6±75.6c	111.7±33.6d

N¹ Número de larvas expuestas a las diferentes concentraciones de la proteína Cry2Ab

N² Número de larvas que llegaron al estado de pupa.

N³ Número de larvas que llegaron al estado adulto.

H♀ Número de pupas/adulto hembra.

M♂ Número de pupas/adulto macho.

L1 Promedio de huevos por hembra.

L2 Promedio de larvas por hembra.

*Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, P≤0.05).

E Error Estándar de la media.

Número de huevos por hembra. Estadísticamente, el mayor número de huevos fueron puestos por las hembras testigo con 772.1 huevos-hembra⁻¹, le siguieron hembras cuyas larvas fueron alimentadas con 0.001 µg mL⁻¹ con 346 huevos ovipositados, posteriormente, las hembras que procedieron de larvas alimentadas con 0.01, 0.1 y 1 µg mL⁻¹, el números de huevos que ovipositaron fueron: 324.9, 296.2 y 202.7 respectivamente, y finalmente las hembras que procedieron de larvas alimentadas con la concentración más alta 5 µg mL⁻¹ sólo ovipositaron 161.6 huevos-hembra⁻¹ (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 3).

Número de larvas por hembra. El mayor de número larvas *F1* x hembra fue en el testigo, donde el número de larvas emergidas fue de 766.7, y el menor número de larvas se registró en la concentración más alta 5 µg mL⁻¹, donde sólo emergieron 111.7 larvas-hembra⁻¹. En las otras concentraciones (0.001, 0.01, 0.1 y 1 µg mL⁻¹) el número de larvas *F1* estuvieron dentro de este rango. En todas las concentraciones se observaron diferencias estadísticas significativas en cuanto al número de larvas *F1* emergidas, excepto en las concentraciones de 0.1 y 1 µg mL⁻¹ (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 3).



Figura. 1. Malformaciones de estados intermedios y adultos de *S. frugiperda* a los 27 días de haber expuesto las larvas con 1 µg mL⁻¹ de la proteína Cry2Ab. A. Endurecimiento y ennegrecimiento del integumento, B y C. Ennegrecimiento de la pupa y segmentos abdominales, D. Desarrollo parcial de alas.

PROTEÍNA Cry1Ac

Mortalidad. La mortalidad de las larvas se incrementó conforme aumentó la concentración de la proteína, ya que en las ocho evaluaciones que se realizaron, la mayor mortalidad siempre se registró en el testigo y/o en la concentración baja, mientras que la mayor mortalidad se registró en las concentraciones más altas (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 4). Por otra parte, la mortalidad también se incrementó a través del tiempo, por ejemplo, en la concentración más baja $0.001 \mu\text{g mL}^{-1}$, la mortalidad a los tres días sólo fue del 1.3%, pero a los 24 días, ésta ya fue del 25.5%. En el caso de la concentración más alta ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$), a los 3 días la mortalidad fue del 11.3%, y a los 24 días ya fue del 75%. En base a estos resultados se determina que las mortalidad se incrementaron al incrementar la concentración de la proteína y a través del tiempo, a mayor tiempo, mayor mortalidad de larvas. Durante el desarrollo larval, el efecto de la proteína provocó malformaciones en el mismo estado de larva y en los estados de pupa y adulto (Figura 2).

Cuadro 4. Porcentaje de mortalidad acumulada corregida a través del tiempo de larvas de *S. frugiperda* alimentadas con dieta contaminada con diferentes concentraciones de la proteína Cry1Ac de *B. thuringiensis*.

Concentra-cion $\mu\text{g mL}^{-1}$. Periodo larval (días)			
	3±E*	6±E*	9±E*	12±E*
0.001	1.3± 1.2a	4.7±4.6a	6.2±2.2a	8.3±2.3a
0.01	4.0±2.0a	6.0±4.0a	7.5±1.1ab	13.0±3.0ab
0.1	4.6±3.1a	8.7±4.1a	8.2±3.5ab	13.7±4.2ab
1	6.0±2.0ab	12.0±1.9ab	16.5±4.4ab	21.3±0.6ab
10	7.3±2.3ab	16.8±5.3ab	22.6±3.9bc	26.3±4.0b
50	11.3±3.1b	25.5±10.0b	37.8±12.0c	45.0±9.7c

*Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $P \leq 0.05$).
E Error Estándar de la media.

Continuacion del Cuadro 4.

Concentra-cion $\mu\text{g mL}^{-1}$	Periodo larval (días)			
	15±E*	18±E*	21±E*	24±E*
0.001	15.4±4.7a	21.2±5.3a	24.5±4.8a	25.5±4.3a
0.01	19.6±1.7ab	29.1±2.1ab	33.2±1.3ab	38.6±2.1b
0.1	23.1±3.6ab	30.5±4.8ab	35.5±1.3ab	40.1±2.9bc
1	28.1±3.4ab	37.5±4.2ab	42.8±0.4b	47.4±3.8c
10	31.7±2.2b	43.2±3.3b	45.1±13.9b	59.1±0.4d
50	51.5±9.4c	61.8±12.2c	68.8±1.2c	75.8.0±3.0e

*Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $P \leq 0.05$).
E Error Estándar de la media.

Tiempo en llegar al estado de pupa. Las pupas se formaron más rápidamente en el testigo y en la concentración baja de $0.001 \mu\text{g mL}^{-1}$, en estos tratamientos las larvas se desarrollaron al estado de pupa a los 16.0 y 16.8 días en promedio respectivamente, le siguieron las concentraciones intermedias de 0.01, 0.1, 1 y $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, donde el tiempo requerido para la formación de pupas fueron de 17.1, 17.2, 17.7 y 17.7 días, y en la concentración más alta $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, las pupas se formaron a los 18.7 días (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 5). La diferencia entre el testigo y la concentración más alta fue de 2.7 días.

Tiempo en llegar al estado adulto. En el testigo, las larvas se desarrollaron al estado adulto a los 22.9 días en promedio, y en la concentración más alta fue a los 27.0 días, en concentraciones intermedias ($0.001, 0.01, 0.1$ y $1 \mu\text{g mL}^{-1}$) el tiempo requerido para la formación de adultos estuvieron dentro de este rango. La diferencia entre el testigo y la concentración más alta fue de 4.1 días. El tiempo en el desarrollo de larvas a adultos fueron estadísticamente diferentes entre el testigo, las concentraciones de $0.001, 0.01$ y $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, mientras que $0.1, 1$ y $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ fueron iguales (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 5).

Tiempo en llegar de larva *F0* a huevo *F1*.

En el testigo, las hembras adultas ovipositaron sus huevos a los 23.5 días, con $0.001, 0.01, 0.1, 1, 10$ y $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ovipositaron a los 25.4, 25.8, 26.4, 27.8, 29.2 y 29.7 días respectivamente. En cuanto a diferencias estadísticas, las que mostraron similitudes fueron 0.01 y $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ y por otra parte, 10 y $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, las otras concentraciones fueron estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 5) La diferencia entre el testigo y la concentración más alta fue de 6.2 días.

Tiempo en llegar de larva *F0* a larva *F1*. El tiempo requerido para completar el ciclo de larva neonata de la *F0* (primera generación) a larva neonata de la *F1* (segunda generación) se prolongó mientras se incrementó la concentración de la proteína con la que se alimentaron las larvas de la generación *F0*. Las larvas testigo de la *F1* emergieron a los 26.0 días en promedio, mientras que en la concentración más alta ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) no hubo emergencia de larvas. El tiempo requerido para la emergencia de las larvas en las otras concentraciones estuvieron dentro de este

**EFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN
Spodoptera frugiperda (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)**

rango. En todos los tratamientos se observaron diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 5).

Cuadro 5 Efecto de diferentes concentraciones de la proteína Cry1Ac de *B. thuringiensis* en *S. frugiperda* sobre el tiempo de desarrollo (días) de larvas neonatas a pupa, adulto, huevo y de larva (F0)-larva (F1).

Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	T ¹ ±E*	T ² ±E*	T ³ ±E*	T ⁴ ±E*
TESTIGO	16.0±0.7a	22.9±0.9a	23.5±0.3a	26.0±0.4a
0.001	16.8±0.7a	23.9± 1.4ab	24.8± 0.2ab	28.0± 0.5b
0.01	17.1±0.7ab	24.7±1.1b	25.8±0.2abc	28.5±0.5bc
0.1	17.2±0.5ab	24.6±0.3bc	26.4±0.5bc	29.6±0.2c
1	17.7±0.8ab	25.7±1.3bc	27.8±0.4bcd	30.8±0.3d
10	17.7±0.5ab	25.8±0.4bc	29.2± 0.4d	32.8± 0.6e
50	18.7±0.7b	27.0±0.0c	29.7± 0.7d	0.0±0.0

T¹ Tiempo transcurrido en días desde larvas neonatas al estado de pupa.

T² Tiempo transcurrido en días desde larvas neonatas al estado de adulto.

T³ Tiempo transcurrido en días desde larvas neonatas (F0) al estado de huevo (F1).

T⁴ Tiempo transcurrido en días desde larvas neonatas (F0) - larva neonata (F1).

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

E Error Estándar de la media

Sexo de pupas. En este estudio, en el testigo se registraron 74♂ y 63♀, con 0.001 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 48♂ y 54♀; 0.01, 39♂ y 45♀; 0.1, 39♂ y 43♀; 1, 31♂ y 41♀; 10, 23♂ y 33♀; 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 15♂ y 18♀. En la concentración más alta se registraron 45♀ y 59♂ menos que en el testigo (Cuadro 6).

Sexo de palomillas. El número de adultos machos y hembras disminuyeron al incrementar la concentración de la proteína, en el testigo se registraron 61♂ y 59♀, con 0.001 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 44♂ y 44♀; 0.01, 31♂ y 31♀; 0.1, 29♂ y 30♀; 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 22♂ y 22♀; 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 13♂ y 10♀. En la concentración más alta se registraron 32♀ y 31♂ menos que en el testigo (Cuadro 6).

Número de huevos por hembra. Estadísticamente, el mayor número de huevos fueron puestos por las hembras testigo con 629.4 huevos•hembra⁻¹, le siguieron hembras cuyas larvas fueron alimentadas con 0.001, 0.01 y 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ con 344.7, 318.4 y 325.7 huevos ovipositados respectivamente, posteriormente, las que procedieron de larvas alimentadas con 1 y 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, los números de huevos que ovipositaron fueron 58.7 y 9.6 respectivamente, y finalmente las hembras que

**EFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN
Spodoptera frugiperda (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)**

procedieron de larvas alimentadas con la concentración más alta 50 µg mL⁻¹, las cuales sólo ovipositaron 1.7 huevos-hembra⁻¹ (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 6).

Número de larvas por hembra. El mayor de número larvas *F1* por hembra fue en el testigo, donde el número de larvas emergidas fueron de 604.9, y el menor número se registró en la concentración de 10 µg mL⁻¹, en la cual, sólo emergieron el 0.7 larvas-hembra⁻¹. En la concentración más alta (50 µg mL⁻¹) no hubo emergencia de larvas. En las otras concentraciones (0.001, 0.01, 0.1 y 1 µg mL⁻¹) el número de larvas *F1* estuvieron dentro de este rango. Estadísticamente se observaron tres grupos diferentes, el primero fue el testigo donde se registró el mayor número de larvas emergidas, le siguieron tres concentraciones: 0.001, 0.01, 0.1 µg mL⁻¹ cuyo número de larvas emergidas fueron iguales estadísticamente y finalmente las concentraciones de 1 y 10 µg mL⁻¹ (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Efecto subletal de concentraciones de la proteína Cry1Ac de *B. thuringiensis* en *S. frugiperda* en el número de larvas neonatas que llegaron al estado pupa, adulto, huevo por hembra y de larva por hembra.

Concentración µg mL ⁻¹	N ¹	N ²			N ³			L1±E	L2±E
		T	H _♀	M _♂	T	H _♀	M _♂		
TESTIGO	150	137	63	74	120	59	61	629.4±66.0a	604.9±89.2a
0.001	150	102	54	48	88	44	44	344.7±55.3b	235.4±2.2b
0.01	150	84	45	39	62	31	31	318.4±23.5b	256.8±55.5b
0.1	150	82	43	39	59	30	29	325.7±64.3b	228.7±17.8b
1	150	72	41	31	44	22	22	58.7±54.9c	9.7±7.1c
10	150	56	33	23	39	19	20	9.6±7.8c	0.7±1.2c
50	150	33	18	15	23	10	13	1.7±0.0d	0.0±0.0d

N¹ Número de larvas expuestas a las diferentes concentraciones de la proteína Cry1Ac

N² Número de larvas que llegaron al estado de pupa.

N³ Número de larvas que llegaron al estado adulto.

H_♀ Número de pupas/adulto hembra.

M_♂ Número de pupas/adulto macho.

L1 Promedio de huevos por hembra.

L2 Promedio de larvas por hembra.

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

E Error Estándar de la media

EFFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)



Figura. 2. Malformaciones de estados intermedios y adultos de *Spodoptera frugiperda* a los 27 días de haber expuesto las larvas con $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de la proteína Cry1Ac. A. Ennegrecimiento y depresiones en los segmentos abdominales, B y C. Malformación y ennegrecimiento de la pupa, D. Alas reducidas sin desprender la cutícula.



Figura. 3. Pupas de *Spodoptera frugiperda*. A. Hembra. B. Macho.

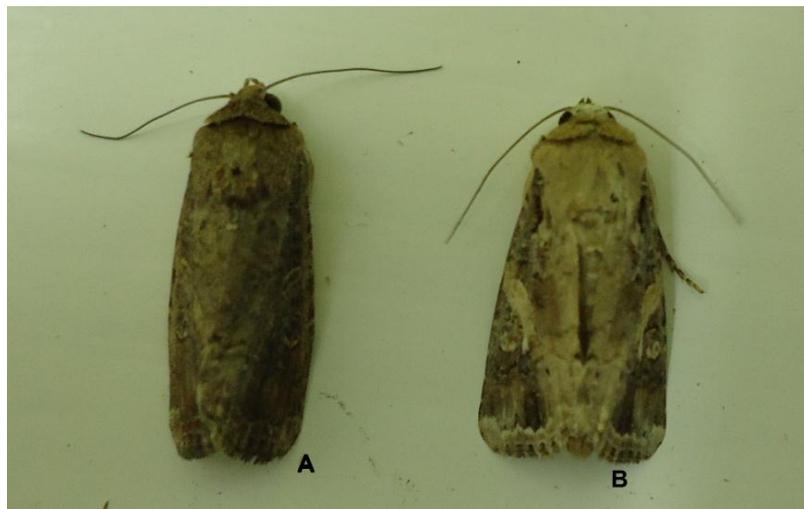


Figura. 4. Adultos de *Spodoptera frugiperda*. A. Hembra. B. Macho.

Los daños provocados en los diferentes estados de desarrollo de los insectos depende del nivel de tolerancia a las proteínas de *B. thuringiensis*, el desarrollo de enfermedades que son capaces de producir las proteínas, la concentración y el tiempo de exposición o de alimentación de las larvas con alimentos contaminados con la proteína, y el estado del desarrollo del insecto en la cual se expone a la proteína. En este estudio, se trabajó con el gusano cogollero *S. frugiperda*, una especie de importancia económica, la cual que ha sido estudiada y documentada por su sensibilidad a las proteínas Cry1Ac y Cry2Ab de *B. thuringiensis*. Se usaron larvas neonatas (*F0*), debido a que es el estado de desarrollo más sensible. Los daños en los diferentes estados de desarrollo son dependientes de la concentración de la proteína, ya que a mayor concentración de la proteína mayor porcentaje de mortalidad, esto es progresivo a través del tiempo. Los daños de las proteínas en los insectos, cualquiera que sea su estado de desarrollo, se pueden manifestar de diferentes maneras. En este estudio por ejemplo, los daños ocasionados por las concentraciones subletales fueron evaluadas a través de algunas variables, tales como: la mortalidad, tiempo requerido para la formación de las pupas, la emergencia de los adultos, tiempo para la oviposición y eclosión de los huevos, número de hembras y machos en estado de pupa y adulto, número de huevos *F1* y larvas *F1* x hembra. Estos efectos subletales están muy relacionados con el mecanismo de acción de las proteínas de *B. thuringiensis*. De acuerdo con varios autores (Maagd *et al.*, 2001; Broderik *et al.*, 2006), durante el proceso de intoxicación de los insectos con proteínas de *B. thuringiensis*, las larvas al ingerir dichas proteínas, éstas se solubilizan, se activan, y atraviesan la membrana peritrófica del intestino medio de los insectos, se unen a receptores específicos lo que forman pequeños poros dentro la membrana provocando lisis celular y finalmente la muerte de los insectos. De acuerdo a lo anterior, el daño se ocasiona directamente en el estado de larva, y en este estado de desarrollo se pueden presentar los efectos letales y subletales, mientras que en los estados de pupa y adulto se presentan los efectos subletales, y si los daños son severos puede conducir a la muerte de los individuos. Finalmente, tanto los efectos letales como subletales contribuyen en un momento dado a reducir la población de los insectos, y esto depende del tipo de la proteína, dosis y el tiempo de exposición.

Los resultados de este estudio, permitieron observar que el efecto letal se presentó en las dos proteínas desde los primeros días de exposición de las larvas; por ejemplo, a los tres días, con $0.001 \mu\text{g mL}^{-1}$, la mortalidad con la Cry2Ab fue de 4.7% y con la Cry1Ac de 1.3%; a los 24 días de exposición, la mortalidad fue de 12.1% con la primera proteína y de 25.5% con la segunda. En el caso de la concentración de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de la Cry2Ab, que fue la concentración más alta para esta proteína, a los 24 días, la mortalidad fue del 60.3%, y con la Cry1Ac cuya concentración más alta fue de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, la mortalidad fue del 75.8%. En esta última proteína, con $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ la mortalidad fue menor al 60%. Esto se debe a que la toxina Cry2Ab es más tóxica contra el gusano cogollero que la Cry1Ac. Por otra parte, también se observó el efecto letal al incrementar la concentración de cada una de las toxinas. Con $0.001 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Cry2Ab, la mortalidad fue de 4.7% a los tres días, pero con $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, la mortalidad ya fue del 9.3%; en el caso de la toxina Cry1Ac, con $0.001 \mu\text{g mL}^{-1}$ la mortalidad fue del 1.3%, y con $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ fue del 1.3%. Mientras que con $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ para Cry1Ac la mortalidad fue del 47.4%. En estudios similares realizados por Zeener de Polonia *et al.* (2005), reportan que la proteína Cry1Ac afecta el desarrollo de larvas de *S. frugiperda* provocando un porcentaje de mortalidad del 20.8% a los 24 días con $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Mientras que con $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, el porcentaje de mortalidad a los 3 y 6 días provocó el 7.3 y 16.8%, porcentajes menores a los registrados por Zeener de Polonia *et al.* (2009), quienes registraron porcentajes mayores a 20 y 40% en larvas de *Helicoverpa zea* al mismo tiempo. Lo que se asume que los efectos de la toxicidad de las proteínas en los insectos dependen de la especie, lo que concuerda con Muhammand. (1999), quien evaluó el efecto subletal de lepidópteros en algodón transgénico, y reveló que dichos efectos varían entre las especies, ya que las especies que sobrevivieron fueron más susceptibles a efectos negativos. Los resultados obtenidos en las diferentes concentraciones de las proteínas de *B. thuringiensis*, permiten explicar que la mortalidad aumentó conforme se incrementó la concentración y a través del tiempo. Por otra parte, el tiempo de desarrollo se prolongó, resultados similares, asociados con especies como *Spodoptera exigua* (Hübner) (Salama *et al.*, 1981; Stapel *et al.*, 1998), *Plodia interpunctella* (Hübner) (Giles *et al.*, 2000), *Pseudoplusia includens* (Walker) (Nyouki *et al.*, 1996), *Helicoverpa armigera* (Hübner), *Spodoptera littoralis*

(Boisduval) (Salama *et al.*, 1981; Dutton *et al.*, 2002), *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Adamczyk *et al.*, 2001), *Leptinotarsa decemlineata* (Costa *et al.*, 2000; Nault *et al.*, 2000) y *Chrysomela scripta* F. (James *et al.*, 1999) confirman tales efectos, ya que observaron que el tiempo de desarrollo de los individuos se prolongó y presentaron mayor porcentaje de mortalidad al aumentar la concentración del producto.

Las larvas del gusano cogollero deben pasar por seis estadios o instares antes de desarrollarse al estado de pupa y adulto (Villa y Catalán, 2004). En el caso de la proteína Cry2Ab, en la concentración más alta $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, las pupas se formaron a los 18.8 días, los adultos a los 28.0 días, para la producción de huevecillos *F1* 30.6 días y para la emergencia de larvas neonatas *F1* 34.5 días, mientras que en el testigo las pupas se formaron a los 15.7 días, los adultos a los 22.1 días, huevecillos *F1* a los 24.6 días y la emergencia de larvas neonatas *F1* 27.5 días, es decir, 3.1, 5.9, 6 y 7.3 días respectivamente más rápido que con $5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Con la Cry1Ac, en la concentración más alta $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, las pupas se formaron a los 18.7 días y en el testigo a los 16.0 días (2.7 días más rápido), los adultos se formaron a los 27 días y en el testigo a los 22.9 días (4.1 días de diferencia), las hembras ovipositaron a los 29.7 días y las hembras testigo a los 23.5 (6.2 días menos que con $50 \mu\text{g mL}^{-1}$) y la emergencia de larvas neonatas en el testigo fue a los 26.0 días y con $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ no hubo eclosión de larvas. Las larvas, al detener parcial o completamente su alimentación, la cual depende de la concentración y el tiempo de exposición a la toxina, posiblemente también se afectan varias funciones fisiológicas relacionadas con su desarrollo, como por ejemplo, el proceso de muda y la metamorfosis (Stapel *et al.*, 1998).

El porcentaje de larvas que se desarrollaron al estado de pupa y adulto se redujo al incrementarse la concentración de la proteína. Con Cry2Ab, en el testigo, el 92.7% de las larvas se desarrollaron al estado de pupa, de los cuales, el 51.8% fueron pupas ♀ y el 48.2% de ♂; y con $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, el 44% alcanzaron el estado de pupa, de los cuales, el 47% fueron ♀ y 45% de ♂. El porcentaje de adultos testigo fue del 77.3% del cual el 50.8% fueron adultos ♀ y el 49.2 de adultos ♂. Con $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, sólo el 35.3% de larvas llegaron al estado de adulto, de los cuales, el 50.6% es

de ♀ y el 49.4% de ♂. Con Cry1Ac, en el testigo, el 91.3% de las larvas se desarrollaron al estado de pupa, de los cuales, el 46% fueron de pupas ♀ y el 54% ♂, y con 50 µg mL⁻¹, el 22% alcanzaron el estado de pupa, de los cuales el 54.6% fueron ♀ y el 45.4% ♂. El porcentaje de adultos testigo fue del 80% del cual el 49.2% es de adultos ♀ y el 80.8 de adultos ♂. Con 50 µg mL⁻¹, sólo el 15.3% de larvas llegaron al estado adulto, de los cuales, el 43.5% es de ♀ y el 56.5% de ♂.

El número de huevos *F1* y larvas *F1* también estuvo en función de la concentración, ya que a mayor concentración menor número de huevos y emergencia de larvas. Con la proteína Cry2Ab, con 5 µg mL⁻¹ fue de 161.6 huevos·hembra⁻¹, y en el testigo las hembras ovipositaron 772.1 x hembra (610.5 huevos de diferencia). El número de larvas *F1* por hembra fue de 766.7 en el testigo, y con 5 µg mL⁻¹ fue solamente de 111.7 larvas. Con la proteína Cry1Ac, en el testigo hubo 629 huevos·hembra⁻¹, de los cuales, emergieron 604.9 x hembra larvas neonatas *F1*, y con 50 µg mL⁻¹, las hembras sólo ovipositaron 1.7 huevos·hembra⁻¹, de los cuales, no hubo emergencia de larvas. De igual forma Reyes-Villanueva *et al.* (1990), en un estudio encontraron que los mosquitos *Aedes aegypti* que se expusieron a concentraciones subletales del insecticida Abate® (Temephos) mostraron una reducción en el número de huevos ovipositados por las hembras. Autores como Moriarty (2008), muestran que el uso de insecticidas puede afectar la capacidad de reproducción, los cuales pueden aumentar o disminuir el número de huevos producidos y por ende la fertilidad de los huevos se puede ver afectada.

En general, para la proteína Cry2Ab, en la concentración más alta 5 µg mL⁻¹, sólo el 44% de las larvas se desarrollaron hasta el estado adulto, los cuales, el 47% fue de pupas ♀, y estas a su vez ovipositaron 161.6 huevos·hembra⁻¹, de los cuales solo eclosionaron 111.7 larvas x hembra. En el testigo, del 77.3% de adultos, el 50.8% fue de adultos ♀, y estas ovipositaron 772.1 huevos·hembra⁻¹ (610.5 huevos más que con 5 µg mL⁻¹) y eclosionaron 766.7 larvas neonatas x hembra (655 larvas *F1* más que con 5 µg mL⁻¹). Con la proteína Cry1Ac no hubo emergencia de larvas con 5 µg mL⁻¹, debido a que los huevillos no eclosionaron, posiblemente porque no fueron fértiles.

8.5. CONCLUSIONES

Las concentraciones evaluadas de las proteínas Cry2Ab y Cry1Ac de *B. thuringiensis* en larvas de *Spodoptera frugiperda* afectaron significativamente el desarrollo de esta especie en todos sus estados de desarrollo. En el caso de la proteína Cry2Ab, la mortalidad de las larvas aumentó conforme se incrementaron las concentraciones de la proteína; a los 24 días, en la concentración más alta ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$), la mortalidad fue del 60.3% y del 12.1% con la concentración más baja ($0.001 \mu\text{g mL}^{-1}$). También se incrementó el tiempo para la formación de pupas, adultos, huevos y larvas de la generación *F1*, con respecto al testigo. Con $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, el incremento en tiempo para la formación de pupas fue de 9.0 días, para la emergencia de adultos de 6.3 días, para que las hembras ovipositaran 6.0 días y para que eclosionaran las larvas 7.3 días. Por otra parte, se redujo el 56.0% de pupas y el 64.7% de adultos, en el caso de huevos *F1* y larvas *F1* fueron 610.5 y 655.0 huevos menos que en el testigo.

Para la proteína Cry1Ac, la mortalidad de las larvas aumentó conforme se incrementaron las concentraciones de la proteína, a los 24 días la mortalidad fue del 75.8% en la concentración más alta ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) y del 25.5% con la concentración más baja ($0.001 \mu\text{g mL}^{-1}$). También se incrementó el tiempo para la formación de pupas, adultos, huevos de la *F1* y larvas de la *F1* con respecto al testigo. Con $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ el incremento en tiempo para la formación de pupas fue de 2.7 días, para la emergencia de adultos de 4.1 días, para que las hembras ovipositaran 6.2 días y para que eclosionaran las larvas 8.0 días. Por otra parte, se redujo el 78.0% de pupas y el 84.7% de adultos, en el caso de huevos *F1* hubo 627.7 menos que en el testigo, y larvas *F1* en la concentración más alta no emergieron.

8.6. LITERATURA CITADA

- Abbott, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18: 265-267.
- Abd-elghafar, S. F., C. O. Knowles y M. L. Wall. 1993. Pyrethroid resistance in two field strains of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol. 86: 1651-1655.

- 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.
- Adamczyk, J. J. Jr., D. D. Hardee, L. C. Adams y D. V. Sumerford. 2001. Correlating differences in larval survival and development of bollworm (Lepidoptera: Noctuidae) and fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) to differential expression of Cry1A (d) δ -endotoxin in various plant parts among commercial cultivars of transgenic *Bacillus thuringiensis* cotton. *J. Econ. Entomol.* 94: 284-290.
- Balzarini, M. G., L. González, M. Tablada, F. Casanoves, J. A. Di Rienzo y C. W. Robledo. 2008. *Infostat. Manual del Usuario*, Editorial Brujas, Córdoba, Argentina.
- Bergvinson, D. J. 2005. *Heliothis/Helicoverpa* Management Emerging Trends and Strategies for Future Research (pp. 7-37). Plymouth, UK. Science Publishers, Inc.
- Broderik, N., K. Raffa y J. Handelsma. 2006. Bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103: 549-57.
- Del Rincón, M. C., J. Mendez y J. Ibarra. 2006. Caracterización de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* con actividad insecticida hacia el gusano colgollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Folia Entomológica Mexicana.* 45: 157-164.
- 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.
- Costa, S. D., M. E. Barbercheck y G. G. Kennedy. 2000. Sublethal acute and chronic exposure of Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) to the δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* 93: 680-689.
- Dutton, A., H. Klein, J. Romeis y F. Bigler. 2002. Uptake of Bt toxin by herbivores feeding on transgenic maize and consequences for the predator *Chrysoperla carnea*. *Ecol. Entomol.* 27: 441-447
- Gill, S. S., E. A. Cowles y P. V. Pietrantonio. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu. Rev. Entomol.* 37:615-636.

**EFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN
Spodoptera frugiperda (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)**

- Giles, K. L., R. L. Hellmich, C. T. Iverson y L. L. Lewis. 2000. Effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* maize grain on *B. thuringiensis*-susceptible *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol. 93: 1011- 1016.
- Gilroy, T. E. y E. R. Wilcox. 1992. Hibrid *Bacillus thuringiensis* gene, plasmid and transformed *Pseudomonas fluorescens*. U.S. patent 5, 128, 130.
- James, R. R., B. A. Croft y S. H. Strauss. 1999. Susceptibility of the cottonwood leaf beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) to different strains and transgenic toxins of *Bacillus thuringiensis*. Environ. Entomol. 28: 108-115.
- Maagd, R. A., A. Bravo, y N. Crickmore. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. Trends in Genetics. 17: 193-199.
- Moriarty, F. 2008. The sublethal effects of synthetic insecticides on insects. Biological Rev. 44: 321-356.
- Muhammad, A. 1999. Mortality and Sublethal Effects in Major Lepidopterous Larval Pests on Bt-cotton and *Bacillus Thuringiensis* Var. Kurstaki-treated Non-Bt-cotton. University of Arkansas, Fayetteville. pp. 150.
- Nault, B. A., S. D. Costa y G. G. Kennedy. 2000. Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) feeding, development, and survival to adulthood after continuous exposure to *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* treated potato foliage from the field. J. Econ. Entomol. 93: 149-156.
- Nyoki, F. F. R., J. R. Fuxa y A. R. Richter. 1996. Spore toxin interactions and sublethal effects of *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda* and *Pseudaletia includes* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Entomol. Sci. 31: 52-62.
- Perlak, F., T. B. Stone, y. M. Muskopf, L. J. Petersen, G. B. Parker, S. A. Mcpherson, J. Wyman, S. Love, D. Biever, G. Reed y D. Fischhoff. 1993. Genetically improved potatoes; protection from damage by Colorado potato beetles. Plant Molecular Biol. 22: 313-321.
- Pietrantonio, P. V., T. A. Juneck, 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.

- Reyes-Villanueva, F., M. Juárez-Eguía y A. Flores-Leal. 1990. Effects of sublethal dosages of Abate® upon adult fecundity and longevity of *Aedes aegypti*. Journal of American Mosquito Control association 6: 739-741.
- Salama, H. S., M. S. Foda, A. El-Sharaby, M. Matter y M. Khallafallah. 1981. Development of some lepidopterous cotton pests as affected by exposure to sublethal levels of endotoxin of *Bacillus thuringiensis* for different periods. J. Invertebr. Pathol. 38: 220-229.
- Silva G., A. Lagunes y J. C. Rodríguez. 2003. Control de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) con polvos vegetales solos y en mezcla con carbonato de calcio. Ciencia e Investigación Agraria 30: 153-160.
- Stapel, J. O., J. W. Deborah, J. R. Ruberson y W. L. Joe. 1998. Development and behavior of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in choice test with food substrates containing toxins of *Bacillus thuringiensis*. Biological control. 11: 29-37.
- Villa, M. y E. A. Catalán. 2004 Determinación de estadios larvales de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) para la construcción de un modelo de predicción. Folia Entomológica Mexicana. 43: 307-312.
- Yu, S. J. 1992. Detection and biochemical characterization of insecticide resistance in Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol. 85: 675-682.
- Yu, S. J. 2008. The Toxicology and Biochemistry of Insecticides. CRC Press. Boca Raton. Florida. USA.
- Zeener de Polonia, I., J. A. Álvarez., C. R. Mejía y M. A. Bayona. 2005. Influencia de la toxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* sobre el desarrollo del cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH). Rev. U.D.C.A. Actualidad y Divulgación Científica. 8:129-139.
- Zeener de Polonia, I., R. A. Álvarez y M. H. Arévalo. 2009. Respuestas de *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae), Procedente del Piedemonte Llanero Colombiano, a la Toxina Cry1Ac del *Bacillus thuringiensis*. Southwestern Entomologist. 35: 85-98.

IX. DISCUSIÓN GENERAL

Los daños provocados por los insectos en sus diferentes estados de desarrollo, no solo depende de la especie, también de su nivel de susceptibilidad a las proteínas de *B. thuringiensis*, la concentración de las proteínas y el tiempo de exposición o de alimentación de las larvas con alimentos contaminados con las proteínas. En el presente estudio, se trabajó con el gusano cogollero *S. frugiperda* y gusano elotero *H. zea*, especies que ya han sido documentadas por su sensibilidad a las toxinas Cry1Ac y Cry2Ab de *B. thuringiensis*, donde se usaron larvas neonatas (≤ 12 hrs), ya que son las más sensibles que cualquier otro estado de desarrollo. En cuanto a la variación de las concentraciones de las toxinas y tiempo de exposición, es posible predecir que a mayor concentración y mayor tiempo de exposición, los insectos susceptibles muestran mayor daño en todos sus estados de desarrollo. En este estudio por ejemplo, los daños ocasionados por las diferentes concentraciones subletales fueron evaluados a través de algunas variables, tales como: la mortalidad, peso de las larvas, pupas y adultos, tiempo requerido para la formación de las pupas y la emergencia de los adultos, además de estas variables, en el bioensayo donde se avaluó el efecto subletal en la *F0* y *F1*, también se evaluó el tiempo requerido para la oviposición y la emergencia de larvas *F1*, número de hembras y machos en estado de pupa y adulto, número de huevos *F1* y larvas *F1*/hembra. Partiendo de la hipótesis planteada de que las concentraciones subletales afectan los estados de desarrollo de los insectos, se determinó que los efectos subletales que provocan las proteínas Cry2Ab y Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* sobre larvas de gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) y gusano elotero *Helicoverpa zea* (Boddie) al alimentarse de dieta contaminada con dichas proteínas, la mortalidad de las larvas se incrementó al aumentar la concentración de las proteínas. Dichos efectos subletales están relacionados con el mecanismo de acción de las toxinas de *B. thuringiensis*. De acuerdo con varios autores (Maagd *et al.*, 2001; Wang, 2003; Broderik *et al.*, 2006;), las proteínas actúan en el intestino medio de las larvas, debido a la ingestión y solubilización del cristal proteínico, se liberan las proteínas en forma de protoxinas, estas proteínas son estimuladas por proteasas intestinales para generar toxinas activas que provocan la muerte de las larvas. De acuerdo a lo anterior, el daño se ocasiona directamente en el estado de larva, y en este estado de

**EFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN
Spodoptera frugiperda (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)**

desarrollo se pueden presentar los efectos letales y subletales, mientras que en los estados de pupa y adulto se presentan los efectos subletales, y si éstos son severos, puede conducir a la muerte de los individuos. En general, este estudio permitió demostrar que, el peso de larvas, pupas y adultos se redujo al incrementar la concentración, lo que pudo haber provocado malformaciones en todos los estados de desarrollo, y se asume que fue provocado por la toxicidad de estas proteínas, las cuales posiblemente afectaron las hormonas encargadas de producir la muda, produciendo bajos niveles de ecdisona y hormona juvenil.

Los resultados de este estudio, demostraron que hubo un efecto letal provocado por las dos proteínas y con las dos especies de insectos, desde los primeros días de exposición de las larvas; por ejemplo, 24 días *S. frugiperda*, con $0.001 \mu\text{g mL}^{-1}$ la mortalidad fue de 29.5% con la Cry2Ab y del 22.6% con Cry1Ac. En el caso de la concentración de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de la Cry2Ab, que fue la concentración más alta para esta proteína, a los 24 días, la mortalidad ya fue del 62.5%, y con la Cry1Ac cuya concentración más alta fue de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, la mortalidad fue del 70%. *H. zea* a los 27 días, con $0.001 \mu\text{g mL}^{-1}$ la mortalidad con la Cry2Ab fue del 57.3% y de 56.1% con Cry1Ac. En el caso de la concentración de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de la Cry2Ab, a los 27 días, la mortalidad ya fue del 87.1%, y con la Cry1Ac, la mortalidad fue del 90.8%. Esto afirma que la proteína Cry2Ab es más tóxica contra el gusano cogollero que la Cry1Ac, mientras que Cry1Ac es más tóxica para gusano elotero que Cry2Ab. En todas las fechas de evaluación se pudo observar menor porcentaje de mortalidad en las concentraciones más bajas, y mayor porcentaje en la concentración más alta. En el caso de la proteína Cry2Ab, en el segundo experimento donde sólo se evaluaron dos concentraciones (0.01 y $1 \mu\text{g mL}^{-1}$) y el testigo, la mortalidad de las larvas de *S. frugiperda* fueron similares que con los resultados del primer experimento en las mismas concentraciones; por ejemplo, a los 24 días, con $0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$, en el primer experimento la mortalidad fue del 34.2% y el segundo experimento fue de 27.7%. Con la proteína Cry1Ac, en el primer experimento la mortalidad fue de 24.6% y en el segundo fue de 24.3%. Con la concentración de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, de igual forma, a los 24 días, con la proteína Cry2Ab, en el primer experimento fue de 46.2%, y en el segundo experimento de 54.2%. Para el caso de la proteína Cry1Ac, la mortalidad en el primer experimento fue del 38.3%, y en el segundo de 37%.

Mientras que con *H. zea*, la proteína Cry2Ab, en el segundo experimento, a los 24 días, con $0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$, en el primer y segundo experimento la mortalidad fue del 58.2%. Con la toxina Cry1Ac, en el primer experimento la mortalidad fue del 58.2% y en el segundo fue de 24.3%. Con la concentración de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, de igual forma, a los 24 días, con la toxina Cry2Ab, en el primer experimento fue de 68.3%, y en el segundo experimento de 77.7%. Para el caso de la toxina Cry1Ac, la mortalidad en el primer experimento fue del 73.6%, y en el segundo de 70.4%. Con estos ejemplos se confirma la consistencia de los resultados sobre los efectos letales de larvas del gusano cogollero de los dos experimentos realizados. En el caso de la mortalidad en el estado de pupa también fueron similares. En estudios realizados por Zeener de Polonia *et al.* (2005), reportan que la proteína Cry1Ac afecta el desarrollo de larvas de *S. frugiperda* provocando un porcentaje de mortalidad del 20.8% a los 24 días con $1 \mu\text{g mL}^{-1}$; por su parte, Eizaguirre *et al.* (2005), evaluaron los posibles efectos subletales de *B. thuringiensis* variedad Kurstaki (Dipel DF) sobre el desarrollo de *Sesamia nonagrioides* y señalan que la mortalidad de pupa fue del 20% al exponer las larvas a una concentración de 0.35 mg kg^{-1} . Silva *et al.* (2010), quienes mostraron que *Peumus boldus* Molina provocó el 67.5% de mortalidad a una concentración del 8% y concentraciones menores al 2% no superaron el 40% de mortalidad. Lo que se asume que los efectos de la toxicidad de las proteínas en los insectos dependen de la especie, lo que concuerda con Muhammand (1999), quien evaluó el efecto subletal de lepidópteros en algodón transgénico, y reveló que dichos efectos varían entre las especies, y por lo general las especies que sobrevivieron fueron más susceptibles a efectos negativos. En general, los resultados obtenidos por las diferentes concentraciones de las proteínas de *B. thuringiensis*, permiten explicar que la mortalidad aumentó conforme se incrementó la concentración y a través del tiempo. Por otra parte el tiempo de desarrollo de los insectos se prolongó, resultados similares, asociados con especies como *Spodoptera exigua* (Hübner) (Salama *et al.*, 1981, Stapel *et al.*, 1998), *Plodia interpunctella* (Hübner) (Giles *et al.*, 2000), *Pseudoplusia includens* (Walker) (Nyouki *et al.*, 1996), *Helicoverpa armigera* (Hübner), *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Salama *et al.*, 1981, Dutton *et al.*, 2002), *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Adamczyk *et al.*, 2001), *Leptinotarsa decemlineata* (Costa *et al.*, 2000; Nault *et al.*, 2000) y *Chrysomela scripta* F. (James

et al., 1999) confirman tales efectos, ya que observaron que el tiempo de desarrollo de los individuos se prolongó y se presenta mayor porcentaje de mortalidad al aumentar la concentración del producto.

El peso de las larvas también estuvo en función de la concentración y del tiempo de exposición. *S. frugiperda*, con la proteína Cry2Ab, a los tres días, en todas las concentraciones todos los pesos estuvieron por debajo de los 2.4 mg, pero a los 12 días, las larvas incrementaron su peso significativamente, en el testigo las larvas pesaron 422 mg, mientras que con 5 µg mL⁻¹ el peso fue de 286.3 mg; la diferencia entre estos dos tratamientos fue de 136 mg. Con la toxina Cry1Ac, a los 12 días, en el testigo las larvas pesaron 490.9 mg, y con 50 µg mL⁻¹ el peso fue de 285.6 mg; la diferencia fue de 204.4 mg. Con *H. zea*, a los tres días con Cry2Ab, los pesos estuvieron por debajo de los 2.9 mg, pero a los 12 días, las larvas incrementaron su peso, en el testigo las larvas pesaron 470.9 mg, mientras que con 5 µg mL⁻¹ el peso fue de 144.4 mg; la diferencia entre estos dos tratamientos fue de 326.5 mg. Con la toxina Cry1Ac, a los 12 días, en el testigo las larvas pesaron 453.7 mg, y con 5 µg mL⁻¹ el peso fue de 183.8 mg; la diferencia fue de 136.5 mg. Las larvas cuando ingieren una dosis baja de la toxina por un tiempo determinado, generalmente tienden a recuperarse debido a la regeneración de nuevas células intestinales, por lo que continúan con su alimentación, pero cuando ingieren una dosis mayor, se incrementa la cantidad de células intestinales dañadas, por lo que dejan de alimentarse parcialmente y eso se refleja en el bajo peso de las larvas. Cuando la dosis es muy alta y el tiempo de intoxicación es prolongado, las larvas pueden dejar de comer por completo y morir por inanición; razón por la cual, en este estudio se observó que a mayor concentración y mayor tiempo de exposición, las larvas redujeron su peso respecto al testigo. Los pesos también se redujeron en los estados de pupa y adulto como consecuencia del daño ocasionado en el estado larval, ya que en esta especie, las larvas son las que se especializan en la alimentación y acumulan más de 95% de sus reservas para continuar con su desarrollo al estado de pupa y adulto; en el estado adulto solamente se llegan a alimentar de algunos líquidos como agua y algunos néctares. Con la toxina Cry2Ab, las pupas y adultos testigo de *S. frugiperda* pesaron 249.2 mg, y los adultos 50.4 mg, mientras que con 5 µg mL⁻¹, las pupas pesaron 217 mg (32 mg menos que el

testigo) y los adultos 37.9 mg (12.5 mg menos que el testigo). En el caso de la toxina Cry1Ac, las pupas testigo pesaron 257.4 mg y los adultos 54.4 mg, mientras que con $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, las pupas pesaron 203 mg (54.4 mg menos que el testigo) y los adultos 16.9 mg (37.5 mg menos que el testigo). Mientras que las pupas y adultos de *H. zea* con la proteína Cry2Ab, las pupas testigo pesaron 404.9 mg, y los adultos 89.1 mg, mientras que con $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, las pupas pesaron 140.1 mg (264.8 mg menos que el testigo) y los adultos 33.4 mg (55.7 mg menos que el testigo). En el caso de la toxina Cry1Ac, las pupas testigo pesaron 327.2 mg y los adultos 83.4mg, mientras que con $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, las pupas pesaron 162.7 mg (164.5 mg menos que el testigo) y con esta concentración no hubo emergencia de adultos. De Sousa *et al.* (2011), evaluaron el efecto del algodón transgénico con la proteína Cry1Ac y algodón sin la proteína (algodón convencional) usando larvas de *S. frugiperda*, reportaron que el peso de las pupas que procedieron de larvas alimentadas con algodón transgénico pesaron sólo 42 mg y las pupas que procedieron de larvas alimentadas con algodón convencional pesaron 61.0 mg, es decir, una diferencia de 19 mg. Otro de los efectos subletales, es el retraso para alcanzar el estado de pupa y adulto. Horner y Dively, (2003), y Horner *et al.*, (2003) revelan que los efectos subletales de las endotoxinas Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis* variedad kurstaki (Bt) del maíz transgénico MON810 afectan el desarrollo larval debido a que se reduce su nivel de canibalismo. A los 12 días, gusano elotero con la toxina Cry1Ac, el peso con 0.01 y $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ fue de 327.8 y 253.3 mg, datos similares reportan Zeener de Polonia *et al.*, (2009) quienes muestran la misma tendencia, pero los pesos larvales no coinciden debido a que los pesos fueron menores: de 35.7 mg con $0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$, mientras que con $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ pesaron sólo 13.7 mg a los 20 días de desarrollo larval, esto puede ser por que las condiciones del laboratorio correspondieron a temperaturas más bajas ($23.5 \pm 1^\circ\text{C}$), humedad relativa de $68 \pm 4\%$ y en total obscuridad. De igual forma no coinciden con los pesos obtenidos por Adamczyk y Gore (2004) quienes, alimentaron larvas de *H. zea* con las variedades transgénicas de algodón NuCOTN 33B (contenido promedio de Cry1Ac de 8.56 ppm) y DP 50B (2.85 ppm), y las pesaron a los 14 días, el peso del primer grupo correspondió a 54.47 mg y el del segundo grupo a 99.92 mg. Las larvas, al detener parcial o completamente su alimentación, la cual depende de la concentración y el tiempo de exposición a la

toxina, posiblemente también se afectan varias funciones fisiológicas relacionadas con su desarrollo, como por ejemplo, el proceso de muda y la metamorfosis (Gueldner *et al.*, 1992; Navon *et al.*, 1992; Stapel *et al.*, 1998).

Las larvas del gusano cogollero debe mudar seis veces antes de ocurrir la metamorfosis para transformarse al estado de pupa y posteriormente al estado adulto (Villa y Catalán, 2004; Borbolla, 1981). En el caso de la toxina Cry2Ab, *S. frugiperda* con $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, las pupas se formaron a los 18 días y los adultos a los 27.6 días, mientras que en el testigo, las pupas se formaron a los 15.5 días (2.5 días más rápido que con $5 \mu\text{g mL}^{-1}$) y los adultos a los 22.8 días (4.8 días más rápido que con $5 \mu\text{g mL}^{-1}$). Con la Cry1Ac, en la concentración más alta $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, las pupas se formaron a los 18.7 días y en el testigo a los 16.0 días (2.7 días más rápido) y los adultos se formaron a los 27 días y en el testigo a los 21.9 días (5.1 días de diferencia). *H. zea* con $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, las pupas se formaron a los 25.7 días y los adultos a los 33.0 días, mientras que en el testigo, las pupas se formaron a los 16.7 días (9 días más rápido que con $5 \mu\text{g mL}^{-1}$) y los adultos a los 26.7 días (6.3 días más rápido que con $5 \mu\text{g mL}^{-1}$). Con la Cry1Ac, en la concentración más alta $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, las pupas se formaron a los 25.2 días y en el testigo a los 20.4 días (4.8 días más rápido) y los adultos se formaron 29.9 días en el testigo, mientras que adultos en la concentración más alta no hubo. Los resultados de este estudio concuerdan con los reportados por Zarate *et al.* (2010), quienes evaluaron los efectos letales y subletales no precisamente de toxinas de *B. thuringiensis*, sino con un producto químico cuyo ingrediente activo es el Metoxifenoazida en larvas de *S. frugiperda*, y reportan que los efectos son progresivos con el incremento de la concentración del producto, ya que con una CL_{10} la mortalidad acumulada fue del 12% y en la CL_{25} fue del 60% hasta antes de pupar, las larvas tratadas mostraron mayor mortalidad y menor peso de pupas, el tiempo de desarrollo de larvas también fue afectado, hubo presencia de pupas y adultos deformes en comparación a las larvas no tratadas. Dong *et al.* (2013), quienes evaluaron los efectos subletales de Spinosad sobre *Spodoptera exigua* reportaron que el periodo del desarrollo de las larvas se prolongó y como consecuencia los periodos de prepupa, pupa, longevidad de adultos y su fecundidad. Moreau y Bause (2003), también evaluaron los efectos subletales usando *B. thuringiensis* en *Choristoneura fumiferana*, afirmando que el desarrollo

larval se prolongó en días y que se redujo el peso de pupas. Por su parte, Dutton *et al.*, (2005) evaluó los efectos que provoca el maíz que expresa la proteína Cry1Ab y la aspersion de Bt sobre *Spodoptera littoralis* y afirman que el desarrollo de las larvas se prolonga, el peso de pupas no se vio afectado, lo que demuestra que en esta etapa el peso promedio de los individuos no lo hizo diferir entre los tratamiento. *S. littoralis* no fue sensible a esta proteína Cry1Ab. Sin embargo, nuestros resultados demuestran que ambas proteínas muestran efectos subletales contra *S. frugiperda* y *H. zea*. Por otra parte, es importante señalar los porcentajes de larvas que alcanzan el estado de pupa y el estado adulto. Por ejemplo, gusano cogollero con la proteína Cry2Ab, en la concentración más alta 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sólo el 11.3% de las larvas se desarrollaron hasta el estado adulto, los cuales, se retrasaron 4.8 días respecto al testigo y su peso promedio fue de 12.5 mg menos que los adultos del testigo, y con la proteína Cry1Ac (en la concentración más alta 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sólo el 3.3% de las larvas se desarrollaron hasta el estado adulto, con 5.1 días de retraso respecto al testigo y el peso promedio de éstos adultos fueron 16.9 mg (37.5 mg menos que el testigo). Mientras que *H. zea*, con la proteína Cry2Ab, en la concentración más alta 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sólo el 1.3% de las larvas se desarrollaron hasta el estado adulto, los cuales, se retrasaron 9 días respecto al testigo y su peso promedio fue de 55.7 mg menos que los adultos del testigo. Con la proteína Cry1Ac, en la concentración más alta 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, no hubo presencia de adultos. Desde luego, en concentraciones bajas e intermedias, el impacto en el desarrollo de los insectos es menor que con las concentraciones más altas de cada una de las toxinas.

La fecundidad se vio afectada severamente, ya que a mayor concentración de la toxina, menor número de individuos se desarrollaron a la siguiente generación. En este estudio, larvas neonatas *F0* de gusano cogollero se evaluaron hasta la siguiente generación (*F1*). En el caso de la proteína Cry2Ab, en la concentración más alta 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, las pupas se formaron a los 18.8 días, los adultos a los 28.0 días, para la producción de huevecillos *F1* 30.6 días y para la emergencia de larvas neonatas *F1* 34.5 días, mientras que en el testigo las pupas se formaron a los 15.7 días, los adultos a los 22.1 días, huevecillos *F1* a los 24.6 días y la emergencia de larvas neonatas *F1* 27.5 días, es decir, 3.1, 5.9, 6 y 7.3 días respectivamente más rápido que con 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Con la Cry1Ac, en la concentración más alta 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$,

las pupas se formaron a los 18.7 días y en el testigo a los 16.0 días (2.7 días más rápido), los adultos se formaron a los 27 días y en el testigo a los 22.9 días (4.1 días de diferencia), las hembras ovipositaron a los 29.7 días y las hembras testigo a los 23.5 (6.2 días menos que con 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y la emergencia de larvas neonatas en el testigo fue a los 26.0 y con 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ no hubo eclosión de larvas.

El porcentaje de larvas que se desarrollaron al estado de pupa y adulto fue menor a manera que se incrementó la concentración. Con Cry2Ab, el porcentaje de pupas testigo fue del 92.7%, y con 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ fue del 44%, de adultos testigo fue el 77.3%, con 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ sólo el 35.3% de larvas llegaron al estado adulto. Con Cry1Ac, el porcentaje de pupas testigo fue del 91.3%, y con 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ fue del 22%, el porcentaje de adultos testigo fue del 80%, con 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ sólo el 15.3% de larvas llegaron al estado adulto.

El número de huevos *F1* y larvas *F1* también estuvo en función de la concentración, ya que a mayor concentración menor número de huevos. Con la proteína Cry2Ab, con 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ fue de 161.6 huevos-hembra⁻¹ mientras que en el testigo hubo 772.1 (610.5 huevos de diferencia), el número de larvas *F1* por hembra fue de 766.7 en el testigo, y con 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ hubo solamente 111.7 larvas *F1*. Con la proteína Cry1Ac, en el testigo hubo 629 huevos-hembra⁻¹ y de esos emergieron 604.9 larvas neonatas *F1*, mientras que con 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ las hembras solo ovipositaron 1.7 huevos de los cuales no hubo emergencia de larvas. De igual forma Reyes-Villanueva *et al.* (1990), en un estudio encontraron que los mosquitos *Aedes aegypti* que se expusieron a concentraciones subletales del insecticida Abate® (Temephos) mostraron una reducción en el número de huevos ovipositados por las hembras. Estas reducciones en el número de huevos y su fertilidad pueden estar relacionadas por la acción directa de las proteínas o por el estrés indirecto al que estuvieron expuestas las larvas *F0*. Autores como Moriarty, (2008) muestran que el uso de insecticidas puede afectar la capacidad de reproducción, los cuales pueden aumentar o disminuir el número de huevos producidos y por ende la fertilidad de los huevos se puede ver afectada.

Como se podrá observar, los efectos subletales, muchas veces no son importantes para el ser humano, pero lo que demuestra este estudio es que dosis o

concentraciones bajas, afectan sustancialmente en el desarrollo y en la densidad poblacional de los insectos. Para este estudio, los experimentos se realizaron en condiciones de laboratorio, pero las evaluaciones se recomienda hacerlas en condiciones de campo, con aplicaciones de los productos comerciales de *B. thuringiensis* o en la plantas transgénicas, ya que en campo es donde podrían existir factores que beneficien el efecto de la acción de las proteínas de *B. thuringiensis*, como por ejemplo, presencia de enemigos naturales, tales como los parasitoides, depredadores u otros entomopatógenos; y podrían ser más eficaz en el control de las plagas, o bien, podrían existir algunos factores que favorezcan la sobrevivencia de las plagas como es el escape a la exposición de las toxinas de Bt, mediante la alimentación de otras plantas hospederas o las condiciones ambientales que reducen la efectividad de las toxinas de *B. thuringiensis*.

Información de este trabajo fue aceptada para su publicación en memorias en extenso en:

El XVI Congreso Internacional en Ciencias Agrícolas. Producción y protección de cultivos: Bajo un escenario de cambio climático. Con título “**EFECTO SUBLETAL DE *Bacillus thuringiensis* BERLINER EN GUSANO COGOLLERO *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH)**”. Mexicali Baja California, Mexico. Octubre 2013. ISBN 978-0-9911261-0-1 (Anexo 1).

El IV Congreso Latinoamericano de Aracnología y XLIX Congreso Nacional de Entomología de la SME. Con título “**EFECTO SUBLETAL DE LA PRITEINA Cry1Ac DE *Bacillus thuringiensis* BERLINER EN GUSANO COGOLLERO *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH)**”. Morelia Michoacán, Mexico. Julio 2014. ISBN (Pendiente) (Anexo 2).

X. CONCLUSIONES GENERALES

Las concentraciones evaluadas de la proteína Cry2Ab y Cry1Ac de *B. thuringiensis* en larvas de *Spodoptera frugiperda* y *Helicoverpa zea* no ocasionaron el 100% de mortalidad, sin embargo afectaron significativamente el desarrollo de estas dos especie en todos sus estados de desarrollo. En el caso de la proteína Cry2Ab, la mortalidad de las larvas aumentó conforme se incrementaron las concentraciones de la proteína, a los 24 días la mortalidad de *S. frugiperda* fue superior al 60.0% en la concentración más alta ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) y del 12.0% con la concentración más baja ($0.001 \mu\text{g mL}^{-1}$). La mortalidad de pupas fue del 81.1% con $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. La mortalidad de *H. zea* a los 27 días fue del 87.1% en la concentración más alta ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) y del 57.3% con la concentración más baja ($0.001 \mu\text{g mL}^{-1}$). La mortalidad de pupas fue del 91.4% en la concentración más alta. Por otra parte, la diferencia en peso de las larvas de *S. frugiperda* entre el testigo y la concentración más alta a los 3 y 12 días fueron de 1.6 y 135 mg respectivamente, y la diferencia del peso en el estado de pupa fue de 31.3 mg y en el estado adulto de 12.5 mg, para *H. zea* la diferencia en peso de las larvas entre el testigo y la concentración más alta a los 3 y 12 días fueron de 2.8 y 326.5 mg respectivamente, y la diferencia del peso en el estado de pupa fue de 264.8 mg y en el estado adulto de 55.7 mg. También se incrementó el tiempo para la formación de pupas y adultos con respecto al testigo, con $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ el incremento en tiempo para la formación de pupas de *S. frugiperda* fue de 2.5 días y para la emergencia de adultos de 4.5 días, mientras que para *H. zea* la formación de pupas fue de 9.0 días y para la emergencia de adultos de 6.3 días.

Los resultados del segundo bioensayo (dos concentraciones 0.01 y $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ y un testigo) para corroborar la consistencia de los resultados del primer bioensayo, confirmaron los resultados de los parámetros evaluados, donde la mortalidad de pupas fue del 69.9%, el peso de larvas a los 3 días fue de 0.9 mg, y el peso a los 12 días de 118.6 mg, en la concentración más alta ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$), el peso de las pupas y adultos se redujo respecto al testigo en 29.0 y 10.8 mg y el tiempo de desarrollo al estado de pupa y adulto se incrementó en 1.9 y 4.7 días en *S. frugiperda* y para *H. zea* la mortalidad de pupas fue del 86.8%, el peso de larvas a los tres días fue de 1.0 mg, y el peso a los 12 días de 366.1 mg, en la concentración más alta ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$), el

**EFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN
Spodoptera frugiperda (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)**

peso de las pupas y adultos se redujo respecto al testigo en 243.0 y 37.9 mg y el tiempo de desarrollo al estado de pupa y adulto se incrementó en 5.8 y 5.9 días.

El efecto de *B. thuringiensis* sobre la siguiente generación de las larvas también afectó los estados de desarrollo de *S. frugiperda*, ya que se incrementó el tiempo para la formación de pupas, adultos, huevos de la *F1* y larvas de la *F1* con respecto al testigo, con $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ el incremento en tiempo para la formación de pupas fue de 9.0 días, para la emergencia de adultos de 6.3 días, para que las hembras ovipositaran 6.0 días y para que eclosionaran las larvas 7.3 días. Por otra parte, se redujo el 56.0% de pupas y el 64.7% de adultos, en el caso de huevos *F1* y larvas *F1* fueron 610.5 y 655.0 huevos menos que en el testigo.

Para la proteína Cry1Ac, La mortalidad de las larvas aumentó conforme se incrementaron las concentraciones de la proteína, a los 24 días la mortalidad de *S. frugiperda* fue superior al 70.0% en la concentración más alta ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) y del 20.0% con la concentración más baja ($0.001 \mu\text{g mL}^{-1}$). La mortalidad de pupas fue del 96.4% con la concentración más alta. La mortalidad de *H. zea* a los 27 días la mortalidad fue del 90.8% en la concentración más alta ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) y del 51.6% con la concentración más baja ($0.001 \mu\text{g mL}^{-1}$). La mortalidad de pupas fue del 95.9% con la concentración más alta. Por otra parte, la diferencia en peso de las larvas de *S. frugiperda* entre el testigo y la concentración más alta a los 3 y 12 días fueron de 1.5 y 205.3 mg respectivamente, y la diferencia del peso en el estado de pupa fue de 5.7 mg y en el estado adulto de 12.5 mg, para *H. zea* la diferencia en peso de las larvas entre el testigo y la concentración más alta a los 3 y 12 días fueron de 2.9, 269.9 mg respectivamente, y la diferencia del peso en el estado de pupa fue de 164.5 mg y en el estado adulto de 31.4 mg. También se incrementó el tiempo para la formación de pupas y adultos con respecto al testigo, *S. frugiperda* con $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ el incremento en tiempo para la formación de pupas fue de 2.7 días y para la emergencia de adultos de 5.1 días, mientras que *H. zea* con $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ el incremento en tiempo para la formación de pupas fue de 4.8 días y para la emergencia de adultos de 5.1 días.

Los resultados del segundo bioensayo (dos concentraciones 0.01 y $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ y un testigo) para corroborar la consistencia de los resultados de primer bioensayo, confirmaron los resultados de los parámetros evaluados en el primer bioensayo,

**EFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN
Spodoptera frugiperda (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)**

donde la mortalidad de pupas fue del 61.9%, el peso de larvas a los 3 días fue de 1.0 mg, y el peso a los 12 días de 139.6 mg, en la concentración más alta ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$), el peso de las pupas y adultos se redujo respecto al testigo en 42.4 y 9.2 mg y el tiempo de desarrollo al estado de pupa y adulto se incrementó en 1.7 y 3.5 días de *S. frugiperda* y para *H. zea* la mortalidad de pupas fue del 83.7%, el peso de larvas a los 3 días fue de 3.0 mg, y el peso a los 12 días de 312.9 mg, en la concentración más alta ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$), el peso de las pupas y adultos se redujo respecto al testigo en 130.3 y 34.6 mg y el tiempo de desarrollo al estado de pupa y adulto se incrementó en 3.7 y 7.0 días.

El efecto de *B. thuringiensis* sobre la siguiente generación de larvas también afectó los estados de desarrollo de *S. frugiperda*, ya que se incrementó el tiempo para la formación de pupas, adultos, huevos de la *F1* y larvas de la *F1* con respecto al testigo, con $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ el incremento en tiempo para la formación de pupas fue de 2.7 días, para la emergencia de adultos de 4.1 días, para que las hembras ovipositaran 6.2 días y para que eclosionaran las larvas 8.0 días. Por otra parte, se redujo el 78.0% de pupas y el 84.7% de adultos, en el caso de huevos *F1* hubo 627.7 menos que en el testigo, y larvas *F1* en la concentración más alta no hubo.

XI. RECOMENDACIÓN

En este estudio, los experimentos se realizaron en condiciones de laboratorio, y se demostró que los efectos subletales disminuyen la densidad de la población de los individuos alimentados con las proteínas Cry2Ab y Cry1Ac de *B. thuringiensis* pero se recomienda seguir investigando sobre los efectos subletales que provocan las proteínas de *B. thuringiensis*, y de esta manera las evaluaciones también se realicen en condiciones de campo, con aplicaciones de productos comerciales (Bioinsecticidas) o en las plantas transgénicas, debido a que en campo pueden existir factores que beneficien la acción de la toxinas de *B. thuringiensis*, tal como, presencia de enemigos naturales, tales como los parasitoides, depredadores u otros entomopatógenos, y podrían ser más eficientes en el control de las plagas, o bien, podrían existir algunos factores que favorezcan la sobrevivencia de las plagas como es el escape a la exposición de las toxinas de Bt, mediante la alimentación de otras plantas hospederas o las condiciones ambientales que reducen la efectividad de las toxinas de *B. thuringiensis*.

XII. LITERATURA CITADA

- Adamczyk, Jr., L. C. Adams y D. D. Hardee. 2001. Field efficacy and seasonal expression profiles for terminal leaves of single and double *Bacillus thuringiensis* toxin cotton genotypes. *J. Econ. Entomol.* 94: 1589-1593.
- Adamczyk, J. J. y J. Gore. 2004. Laboratory and field performance of cotton containing Cry1Ac, Cry1Ff, and both Cry1Ac and Cry1F (Widestrike) against beet armyworm and fall armyworm larvae (Lepidoptera: Noctuidae). *Florida Entomologist* 87:427-432.
- Borbolla, I. S. 1981. Estudio comparativo de insecticidas a diferentes dosis y número de aplicaciones para el control de gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) en maíz de temporal. *Agronomía en Sinaloa-UAS* 1:21-30.
- Broderik, N., K. Raffa y J. Handelsma. 2006. Bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103: 549-57.
- Costa, S. D., M. E. Barbercheck y G. G. Kennedy. 2000. Sublethal acute and chronic exposure of Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) to the δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* 93: 680-689.
- De Sousa, R. F., L. T. Azeredo., B. N. A. Rogerio., F. F. Sales., J. J. L. Nascimento., M. J. Bruno., S. C. A. Domingues y Z. J. Cola. 2011. Feeding of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, on Bt transgenic cotton and its isolate. *Entomologia Experimentalis et Applicata.* 139: 207-214.
- Dong, W., W. Yong-Ming., L. Hui-Yuan., X. Zheng , y M. Xue. 2013. Lethal and Sublethal Effects of Spinosad on *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 106: 1825-183.
- Eizaguirre, M., S. Tort., C. López y R. Albajes. 2005. Effects of sublethal concentrations of *Bacillus thuringiensis* on larval development of *Sesamia nonagrioides*. *J. Econ. Entomol.* 98: 464-470.
- Dutton, A., H. Klein, J. Romeis y F. Bigler. 2002. Uptake of Bt toxin by herbivores feeding on transgenic maize and consequences for the predator *Chrysoperla carnea*. *Ecol. Entomol.* 27: 441-447.
- Dutton, A., J. Romeis y F. Bigler. 2005. Effects of Bt maize expressing Cry1Ab and Bt spray on *Spodoptera littoralis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata.* 1143:161–169.

- Eizaguirre, M., S. Tort, C. López y R. Albajes. 2005. Effects of sublethal concentrations of *Bacillus thuringiensis* on larval development of *Sesamia nonagrioides*. J. Econ. Entomol. 98: 464-470.
- Giles, K. L., R. L. Hellmich., C. T. Iverson y L. L. Lewis. 2000. Effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* maize grain on *B. thuringiensis*-susceptible *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol. 93: 1011- 1016.
- Gueldner, R. C., M. E. Snook, N. W. Widstrom, y B. R. Wiseman. 1992. TLC Screen for maysin, chlorogenic acid, and other posible resistance factors to the fall armyworm and the corn earworm in *Zea mays*. J. Agric. Food. Chem. 40:1211-1213.
- Horner, T. A., G. P. Dively y D. A. Herbert. 2003. Development, survival and fitness performance of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in MON810 Bt field corn. J. Econ. Entomol. 96:914–924.
- Horner., T. A. y G. P. Dively. 2003. Effect of MON810 Bt Field Corn on *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) Cannibalism and Its Implications to Resistance Development. J. Econ. Entomology 96:931-934.
- Maagd, R. A., A. Bravo, y N. Crickmore. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. Trends in Genetics. 17: 193-199.
- Moreau, G. y E. Bauce. 2003. Lethal and sublethal effects of single and double aplicaciones of *Bacillus thuringiensis* Variety kurstaki on spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae) larvae. J. Econ. Entomol. 96: 280-286.
- Moriarty, F. 2008. The sublethal effects of synthetic insecticides on insects. Biological Rev. 44: 321-356.
- Muhammad, A. 1999. Mortality and Sublethal Effects in Major Lepidopterous Larval Pests on Bt-cotton and *Bacillus Thuringiensis* Var. Kurstaki-treated Non-Bt-cotton. University of Arkansas, Fayetteville. pp. 150.
- Nault, B. A., S. D. Costa y G. G. Kennedy. 2000. Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) feeding, development, and survival to adulthood after

- continuous exposure to *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* treated potato foliage from the field. J. Econ. Entomol. 93: 149-156.
- Navon, A., J. D., B. A. Federici, T. S. Walsh, y U. M. Peiper. 1992. Mandibular Adduction Forte of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae Fed the Insecticidal Crystals of *Bacillus thuringiensis*. J. Econ. Entomol. 85: 2138-2143.
- Nyouki, F. F. R., J. R. Fuxa y A. R. Richter. 1996. Spore toxin interactions and sublethal effects of *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda* and *Pseudoplusia includes* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol. Sci. 31: 52-62.
- Reyes-Villanueva, F., M. Juárez-Eguia y A. Flores-Leal. 1990. Effects of sublethal dosages of Abate® upon adult fecundity and longevity of *Aedes aegypti*. Journal of American Mosquito Control association 6: 739-741.
- Salama, H. S., M. S. Foda, A. El-Sharaby, M. Matter y M. Khallafallah. 1981. Development of some lepidopterous cotton pests as affected by exposure to sublethal levels of endotoxin of *Bacillus thuringiensis* for different periods. J. Invertebr. Pathol. 38: 220-229.
- Silva G. 2010. Actividad del polvo, extractos y aceite esencial de *Peumus boldus* Molina solos y en mezcla con *Bacillus thuringiensis* Berniler contra *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) y *Helicoverpa zea* (Boddie). Tesis Doctoral. Colegio de Posgraduados Campus Montecillo. Pp. 1-163.
- Stapel, J. O., J. W. Deborah., J. R. Ruberson y W. L. Joe. 1998. Development and behavior of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in choice fest with Food substrates containg toxins of *Bacillus thuringiensis*. Biological control. 11: 29-37.
- Villa, M. y E. A. Catalán. 2004 Determinación de estadios larvales de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidea) para la construcción de un modelo de predicción. Folia Entomológica Mexicana. 43: 307-312.
- Wang, J, A. Boets., J. Van Rie y G. Ren G. 2003. Characterization of cry1, cry2 and cry9 genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from China. J. Invertebr. Pathol. 82: 63-71.

**EFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN
Spodoptera frugiperda (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)**

- Zarate, N., O. Díaz., A. M. Martínez., J. I. Figueroa., M. I. Schneider., G. Smaghe., E. Viñuela., F. Budia y S. Pineda. 2010. Lethal and Sublethal Effects of Methoxyfenozide on the Development, Survival and Reproduction of the Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Neotrop. Entomol. 40: 129-137.
- Zeener de Polonia, I., J. A. Álvarez., C. R. Mejía y M. A. Bayona. 2005. Influencia de la toxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* sobre el desarrollo del cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH). Rev. U.D.C.A. Actualidad y Divulgación Científica. 8:129-139
- Zeener de Polonia, I., R. A. Álvarez y M. H. Arévalo. 2009. Respuestas de *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae), Procedente del Piedemonte Llanero Colombiano, a la Toxina Cry1Ac del *Bacillus thuringiensis*. Southwestern Entomologist. 35: 85-98.

XIII. ANEXOS

13.1. ANEXO 1. El XVI Congreso Internacional en Ciencias Agrícolas. Producción y protección de cultivos: Bajo un escenario de cambio climático.



XVI CONGRESO INTERNACIONAL EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

SIMPOSIO: *PRODUCCIÓN DE CULTIVOS EN INVERNADERO Y CAMPO BAJO CONDICIONES DE ZONAS ÁRIDAS*

SIMPOSIO: *ALTERNATIVAS BIOTECNOLÓGICAS PARA EL CONTROL DE PATOGENOS DEL SUELO*

**EFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN
Spodoptera frugiperda (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)**

XVI Congreso Internacional de Ciencias Agrícolas

24 y 25 de octubre de 2013

Producción y protección de cultivos Bajo un escenario de cambio climático

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

Instituto de Ciencias Agrícolas



**XVI CONGRESO INTERNACIONAL EN CIENCIAS
AGRÍCOLAS**

M E M O R I A S

Mexicali Baja California México

24 y 25 de octubre del 2013

ISBN 978-0-9911261-0-1

otorgan la presente
Constancia

A: Rosales Juárez Anayely

**Por su participación como Ponente en el Congreso,
los días 24 y 25 del presente, en la ciudad de Mexicali.**

Mexicali, Baja California, octubre de 2013
“Por la realización plena del hombre”

XVI
Congreso Internacional en Ciencias Agrícolas
Producción y protección de cultivos: Bajo un escenario de cambio climático

Instituto de Ciencias Agrícolas
Gobierno del Estado
SAGARPA
MEXICALI

Dr. Roberto Soto Ortiz
Director del Instituto de Ciencias Agrícolas

Dr. Manuel Cruz Villiegus
Presidente del XVI - CIA

M.C. Jacobo Enrique Cruz Ortega
Director de la Facultad de Agronomía UAS

Dr. Jesús López Elías
Director del Depto. de Agríc. y Ganadería UNISONI

LA LINEA QUE NOS UNE
AEROMEXICO
LECTURA
GOWAN MEXICANA
Sistema de Sembrado SPF
Agencia Mexicana de Sembrado
ETRIGOSA
HMI HARRIS MORAN SEED COMPANY

Unión Agrícola Mexicana

EFFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)

XVI Congreso Internacional de Ciencias Agrícolas

24 y 25 de octubre de 2013

Producción y protección de cultivos Bajo un escenario de cambio climático

EFFECTO SUBLETAL DE *Bacillus thuringiensis* BERLINER EN GUSANO COGOLLERO *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH)

Rosales Juárez Anayely¹, Aguilar Medel Sotero¹, Martínez Carrillo J. Luis²

¹Centro Universitario Tenancingo, Universidad Autónoma del Estado de México. Km 1.5 Carretera Tenancingo-Villa Guerrero. 52400 Tenancingo, Estado de México. ²Instituto Tecnológico de Sonora, 5 de Febrero 818 sur, Ciudad Obregón, Sonora, México. anayely1406@hotmail.com

Resumen

El gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith es una plaga importante en cultivos frutícolas, hortícolas, forestales y ornamentales; su control se basa principalmente en el uso de insecticidas químicos. En la actualidad existen alternativas para el control de esta plaga, las cuales no afectan al medio ambiente, tal es el caso de la bacteria *Bacillus thuringiensis kurstaki* que ha sido ampliamente usada para el control de varias especies de insectos lepidópteros. El objetivo de este trabajo fue evaluar en condiciones de laboratorio los efectos subletales de la proteína Cry2Ab de *B. thuringiensis kurstaki* en *S. frugiperda*. Los bioensayos consistieron en alimentar con dieta contaminada de diferentes concentraciones de la proteína Cry2Ab a grupos de 150 larvas de gusano cogollero, en total se utilizaron 900 larvas neonatas. Las concentraciones usadas fueron: 0.001, 0.01, 0.1, 1 y 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y un testigo absoluto. Los resultados indicaron que la mortalidad de larvas, pupas y adultos se incrementaron al incrementar las concentraciones de la proteína y a través del tiempo, se prolongó el ciclo de vida de los insectos, se redujo el peso de las larvas, pupas y adultos, y se redujo el número de individuos que se desarrollaron al estado adulto. En la concentración más alta (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) se registró el 78.6% mortalidad de larvas (hasta antes de pupar), sólo el 11.3% de los individuos se desarrollaron al estado adulto, el ciclo biológico se prolongó en 2.5 días al estado de pupa y 4.8 días al estado adulto, y el peso de las larvas (a los 12 días), pupas y adultos se redujo en 135.9, 31.3 y 12.5 mg respectivamente con referencia al testigo.

Palabras clave: Gusano cogollero, Efecto subletal, *Bacillus thuringiensis*

Abstract

The fall armyworm *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith, is a key insect pest of several fruit, forest, horticultural and ornamental crops, its control is based mainly on chemical insecticides. Actually there are alternatives to control this insect pest, which are area environmental friendly such as *Bacillus thuringiensis kurstaki* that has been widely used for several Lepidoptera species. The objective of this work was to evaluate under laboratory conditions the sublethal effects of the protein Cry2Ab of *B. thuringiensis kurstaki* on *S. frugiperda*. Bioassays were designed to feed groups of 150 fall armyworm larvae with different concentrations of Cry2Ab placed on artificial diet. A total of 900 neonate larvae were used in these bioassays. The concentrations were as follows: 0.001, 0.01, 0.1, 1 and 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and a control. Results indicated that mortality of larvae, pupae and adults increased at higher protein concentrations and the life cycle of the insects was prolonged through time; larvae, pupae and adults weight was reduced as it was the number of individuals that reached the adult stage. 78.6% larvae mortality (before pupation) was recorded at the highest concentration (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), only 11.3% individuals reached the adult stage, biological cycle was prolonged in 2.5 days to the pupae stage and 4.5 days to the adult stage. Larval weight (at 12 days), pupae, and adults were reduced in 135.9, 31.3 and 12.5 mg respectively as compared to the control.

Key words: Fall armyworm, Sublethal effect, *Bacillus thuringiensis*

Introducción

El gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) es una de las plagas importantes en América Latina (Martínez *et al.*, 2004), afecta a cultivos ornamentales, frutícolas y hortícolas (Fernández y Estefanía, 1974). El uso intensivo de insecticidas de amplio espectro para el control de este insecto, ha ocasionado el desarrollo de resistencia a la mayoría de los compuestos convencionales registrados para su control, y ha repercutido en la contaminación del medio ambiente (Morillo y Notz, 2003), razón por la cual, es necesario estudiar nuevas alternativas para el control de esta plaga, una de ellas es el uso de productos a base de *Bacillus thuringiensis kurstaki* Berliner, ya que es la bacteria entomopatógena más conocida, estudiada y ampliamente utilizada como agente de control biológico. Más del 90% del mercado de bioinsecticidas incluye productos a base de esta bacteria (Glare y O'Callaghan, 2000). En el mundo existen alrededor de 60,000 aislamientos de *B.thuringiensis* pertenecientes a colecciones públicas y privadas, lo que revela el interés que existe en la aplicación de esta bacteria como agente de control biológico (Boucias y Pendland, 1998). *B. thuringiensis* forma \square -endotoxinas como inclusiones parasporales durante la esporulación, las cuales se disuelven en el intestino medio del insecto liberando protoxinas que proteolíticamente se convierten en pequeñas moléculas tóxicas (Gill *et al.*, 1992). *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (HD-1) es por excelencia la cepa utilizada para el control de insectos lepidópteros, plagas agrícolas y forestales. Esta cepa fue aislada originalmente por Dulmage en 1970, lo que constituye un hecho importante en la historia del uso de *B. thuringiensis* como larvicida, ya que fue la responsable de que los productos a base de *B. thuringiensis* puedan competir con los insecticidas químicos. Esta cepa es hasta 200 veces más tóxica para algunas especies de lepidópteros, y se caracteriza por la portación de los siguientes genes cry antilepidópteros: cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry2Aa, cry2Ab y cry11a (Sauka y Benintende, 2008). A la fecha se han realizado múltiples estudios para evaluar los efectos letales de *B. thuringiensis*, y no existen estudios que indiquen cuales son los efectos subletales que esta bacteria provoca. En el caso de insecticidas convencionales, existen algunos trabajos que reportan los efectos subletales que estos ocasiona, por ejemplo, Reyes-Villanueva *et al.* (1990), encontraron que los mosquitos *Aedes aegypti* que se expusieron a concentraciones subletales del insecticida Abate® muestra una reducción en el número de huevos ovipositados por las hembras, lo cual contribuye a reducir el número de individuos de la población de este insecto. Por ello, el objetivo de esta investigación, fue determinar en condiciones de laboratorio los efectos subletales de la proteína Cry2Ab de *B. thuringiensis kurstaki* en el gusano cogollero *S.frugiperda*.

Materiales y Métodos

Cría del gusano cogollero. Los experimentos fueron realizados con larvas de *S. frugiperda* provenientes de una colonia que se ha mantenido en el laboratorio de Entomología por más de tres años en el Centro Universitario UAEMex Tenancingo. Esta colonia se continuó criando en una cámara de cría en condiciones controladas: temperatura de 27±1°C, humedad relativa del 75± 5% y un fotoperiodo de 13:11 h luz: oscuridad. Las larvas se alimentaron con una dieta artificial (Fall Armyworm, Southland Products, Inc.) hasta obtener pupas, las cuales se colocaron en jaulas entomológicas (25x25x35 cm) para la emergencia de los adultos, mismos que fueron alimentados con agua azucarada al 10% (agua destilada y azúcar). Las hembras ovipositaron en bolsas de papel de estraza # 20, esta bolsa se cambió cada 24 horas durante el periodo de oviposición. Se obtuvieron larvas de la *F1* con las cuales se realizaron los bioensayos correspondientes.

Proteína Cry2Ab. Se utilizó tejido de maíz modificado genéticamente y liofilizado que contienen la proteína a una concentración de 0.6%.

Bioensayos. Los bioensayos consistieron en alimentar las larvas del gusano cogollero con dieta artificial contaminada con concentraciones de 0.001, 0.01, 0.1, 1 y 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de proteína de *B. thuringiensis*. La alimentación de las larvas fue en todo el estado larval. La dieta contaminada se cambió cada 72 h (3 días) para evitar exponer las larvas a una proteína degradada. En los primeros seis días de evaluación las larvas

EFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)

Producción y protección de cultivos Bajo un escenario de cambio climático

fueron alimentadas con 1 ml de dieta por larva, en este periodo, la dieta y las larvas fueron colocadas en charolas para biensayos (Bio-Assay Tray Bio-BA-128: C-D Internacional, Inc) con 128 cavidades, en cada cavidad se colocó una larva neonata confinada con un plástico transparente autoadherible (PULL N' PEEL Tab Bio-Cv-16; C-D International, Inc.). Posteriormente, fueron alimentadas con 5 mL de dieta, los cuales, tanto la dieta como las larvas se colocaron en vasitos de plástico del número 0 (Envases Primo Cuevas S.A. de C.V. Ecatepec, Estado de México, México), para favorecer el intercambio gaseoso de los vasitos, en la tapa se realizó una pequeña perforación. Al momento de transferir las larvas a la nueva dieta (cada 72 h), se evaluaron los porcentajes de mortalidad. Las larvas fueron pesadas individualmente a los 3 y 12 días; posteriormente se evaluaron otras variables: tiempo (días) que alcanzaron el estado de pupa, peso de las pupas, tiempo (días) que llegaron al estado adulto y finalmente el peso de los adultos. Los porcentajes de mortalidad en los tratamientos se ajustó mediante el uso de la fórmula Abbott (Abbott, 1925).

Diseño experimental y análisis estadístico. Se utilizó un diseño experimental de bloques completos al azar con cinco tratamientos y un testigo absoluto y se realizaron tres repeticiones. En cada tratamiento se iniciaron con 50 larvas neonatas y las repeticiones se realizaron en días diferentes. Los resultados se sometieron a una análisis de varianza y a una prueba de comparación de medias con Tukey con un nivel de significancia del 95% ($p \leq 0.05$) con el programa INFOSTAT.

Resultados y discusión

Mortalidad. La mortalidad de las larvas se incrementó conforme aumentó la concentración de la proteína, y a través del tiempo. A los tres días, en el rango de concentraciones de 0.001 a 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, los porcentajes de mortalidad fluctuaron del 3.3 al 5.3%, mientras que en la concentración más alta (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) fue del 10%. A los seis días, en la concentración más baja (0.001 $\mu\text{g mL}^{-1}$) se registró una mortalidad del 6.7%, en el rango de 0.01 a 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ fue del 12 al 14%, y con 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ la mortalidad fue del 21.3%. A los nueve días, en la concentración más baja se registró el 10.9% de mortalidad, y en las concentraciones de 0.01, 0.1, y 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ la mortalidad fluctuó entre el 14.9 y 16.3%; con 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ la mortalidad fue del 25%. A los 12 días la mortalidad en las concentraciones 0.001, 0.01, 0.1 y 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ fueron del 10.9 al 16.3% y en la más alta (con 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) fue del 31%. A los 15 días se registró en la concentración más alta (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) un 47.8% de mortalidad, en concentraciones con 0.01, 0.1 y 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ la mortalidad fue de 28.1, 33.8 y 42 % respectivamente, mientras que en la concentración más baja (0.001 $\mu\text{g mL}^{-1}$) la mortalidad llegó solo al 16.4% (Cuadro 1).

Cuadro 1. Porcentaje de mortalidad a través del tiempo de larvas de *S. frugiperda* alimentadas con dieta contaminada con diferentes concentraciones de la proteína Cry2Ab de *B. thuringiensis*.

Concentra- ción $\mu\text{g mL}^{-1}$	Periodo larval (días)								Pupas*
	3*	6*	9*	12*	15*	18*	21*	24*	
0.001	3.3ab	6.7ab	10.9ab	12.4ab	16.4ab	23.8ab	27.3ab	29.2ab	64.9b
0.01	5.3ab	12abc	14.9bc	17.2abc	28.1bc	32.5ab	33.3ab	34.3bc	68.7bc
0.1	5.3ab	13.3abc	14.9bc	15.9abc	33.8bcd	25.6ab	28.9ab	31.6abc	68.7bc
1	6.7ab	14.0bc	16.3bc	23.9bc	42.0cd	43.6b	43.9b	43.7bc	81.1d
5	10.0b	21.3c	25.2c	31.0c	47.8d	54.4b	52.4b	62.8c	78.7cd

*Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra minúscula no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $p \leq 0.05$).

A los 18 días, en la concentración más baja se registró el 23.8 % de mortalidad y en concentraciones de 0.01 y 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ la mortalidad fue del 32.5 y 28.9% sin diferencia significativa, mientras que en 1 y 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ la mortalidad fluctuó en 43.6 y 54.4 %. A los 21 días, la mortalidad fue del 27.3% al 33.3% en las concentraciones de 0.001, 0.01, 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, y en las concentraciones de 1 y 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ fue del 43.7 y 52.4% respectivamente. A los 24 días la concentración más baja (0.001 $\mu\text{g mL}^{-1}$) el porcentaje de mortalidad fue del 29.2%, en concentraciones de 0.01, 0.1 y 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ la mortalidad fue del 34.3, 31.6 y

EFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)

XVI Congreso Internacional de Ciencias Agrícolas

24 y 25 de octubre de 2013

Producción y protección de cultivos Bajo un escenario de cambio climático

43.7 % respectivamente, mientras que en la concentración alta ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) fue del 62.8%. El porcentaje de mortalidad de pupas en la concentración más baja ($0.001 \mu\text{g mL}^{-1}$) fue del 64.9%, y en las concentraciones de 0.01, 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ el porcentaje de mortalidad fue del 68.7%, mientras que en las concentraciones más altas (1 y $5 \mu\text{g mL}^{-1}$) se registró el 81.1 y 78.7% de mortalidad (Cuadro 1).

Peso de larvas a los 3 y 12 días. El peso de las larvas se redujo considerablemente al aumentar la concentración de la proteína. A los 3 días, el peso promedio de las larvas testigo fue de 2.4 mg, y en las concentraciones 0.001, 0.01 y $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ pesaron 2.1 mg en promedio, en la concentración $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ pesaron 1.8 mg, mientras que en la concentración más alta ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) pesaron 0.8 mg, es decir, 1.6 mg menos que las larvas testigo. A los doce días, el testigo pesó 422.2 mg y en las concentraciones 0.001, 0.01 y $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ pesaron de 363.3, 353.7 y 347.1 mg respectivamente, y en las concentraciones de 1 y $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ estadísticamente fueron iguales, los pesos registrados fueron de 288.7 y 286.3 mg respectivamente, casi 135.9 mg menos que el testigo (cuadro 2).

Tiempo en llegar al estado de pupa. El tiempo requerido para alcanzar el estado de pupa fue mayor conforme se incrementó la concentración, habiendo una diferencia hasta de 2.5 días para el alcanzar el estado de pupa entre el testigo y la concentración más alta ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$). Es decir, en el testigo las pupas se desarrollaron a los 15.5 días y en la concentración más alta las pupas se formaron a los 18 días. En las concentraciones intermedias 0.001, 0.01, 0.1 y $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ las pupas se formaron entre los 16 y 17 días (cuadro 2).

Peso de pupas. En el testigo las pupas pesaron 249.2 mg, en las concentraciones 0.001, 0.01, 0.1 y $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ pesaron 240.5, 236, 230.9, 229.6 mg respectivamente, y en la concentración más alta ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) el peso fue de 217.9 mg, es decir, 31.3 mg menos que en el testigo (cuadro 2).

Tiempo en llegar al estado de adulto. En el testigo las larvas neonatas tardaron 22.8 días para desarrollarse al estado adulto, y en las concentraciones 0.001, 0.01, 0.1, 1 y $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ los adultos se formaron a los 25.8, 26.8, 26.6, 27.2 y 27.6 días respectivamente. La diferencia en tiempo para que se desarrollaran los adultos del testigo y la concentración más alta fue de 4.8 días (cuadro 2).

Peso de adultos. En el testigo los adultos pesaron 50.4 mg, en las concentraciones 0.001, 0.01, 0.1 y $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ el peso fue de 46.6, 44.7, 43.6 y 41.7 mg respectivamente, y en la concentración más alta los adultos pesaron 37.9 mg, lo cual representó una diferencia de 12.5 mg menos que en el testigo (Cuadro 2).

Cuadro 2. Efecto de diferentes concentraciones de la proteína Cry2Ab de *B. thuringiensis* en *S. frugiperda* sobre el tiempo de desarrollo (días) de larvas neonatas a pupa y adulto, peso promedio de larvas a los 3 y 12 días, peso de pupas y adultos.

Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	N ¹	N ²	T ^{1*}	N ³	T ^{2*}	Peso en mg			
						Larvas (3 días*)	Larvas (12 días*)	Pupas *	Adulto*
TESTIGO	150	77.3	15.5 a	52.0	22.8 a	2.4 a	422.2 a	249.2 a	50.4 a
0.001	150	55.3	16.4 ab	18.7	25.8 b	2.1 ab	363.3 ab	240.5 ab	46.6 ab
0.01	150	52.0	16.5 ab	16.0	26.8 bc	2.1 ab	353.7 ab	236.0 ab	44.7 abc
0.1	150	53.3	17.0 bc	16.7	26.6 bc	2.1 ab	347.1 ab	230.9 bc	43.7 abc
1	150	40.0	17.5 bc	10.0	27.2 bc	1.3 ab	288.7 b	229.6 bc	41.7 bc
5	150	29.3	18.0 c	11.3	27.6 c	0.8 b	286.3b	217.9 c	37.9 c

N¹ Número de larvas expuestas a las diferentes concentraciones de la proteína Cry2Ab

N² Porcentaje de larvas que llegaron al estado de pupa.

N³ Porcentaje de larvas que llegaron al estado de adulto.

T¹ Tiempo transcurrido en días desde larvas neonatas al estado de pupa.

T² Tiempo transcurrido en días desde larvas neonatas al estado de adulto.

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

Los resultados confirman que las larvas de gusano cogollero al alimentarse de dieta contaminada con la proteína Cry2Ab de *B. thuringiensis*, la bacteria provoca una mortalidad superior al 75% usando

EFFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)

Producción y protección de cultivos Bajo un escenario de cambio climático

concentraciones de 1 y 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Broderik et al. (2006), confirman que la mortalidad provocada por Bt depende de la microbiota natural del intestino del insecto causando septicemia después de que esta bacteria les permite alcanzar el hemocele tras dañar el epitelio intestinal. El uso de concentraciones subletales afectó el desarrollo larval, incrementando el tiempo para llegar al estado de pupa y adulto en 2.5 y 4.8 días respectivamente. El peso de larvas a los 3 y 12 días, pupas y adultos se redujo mientras se incrementó la concentración, Stapel et al. (1998), confirman que el uso de toxinas de Bt afecta el desarrollo larval y la alimentación producto de la intoxicación bacteriana. Zeener de Polonia et al. (2005), de igual forma encontraron que la proteína Cry1Ac afecta el desarrollo de larvas de gusano cogollero y disminuye el peso de las pupas; por su parte Hare y Nasci (1986), evaluaron dosis subletales usando *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* en *Aedes aegypti*, los cuales afectaron la asimilación de nutrientes y prolongaron la vida del desarrollo larval.

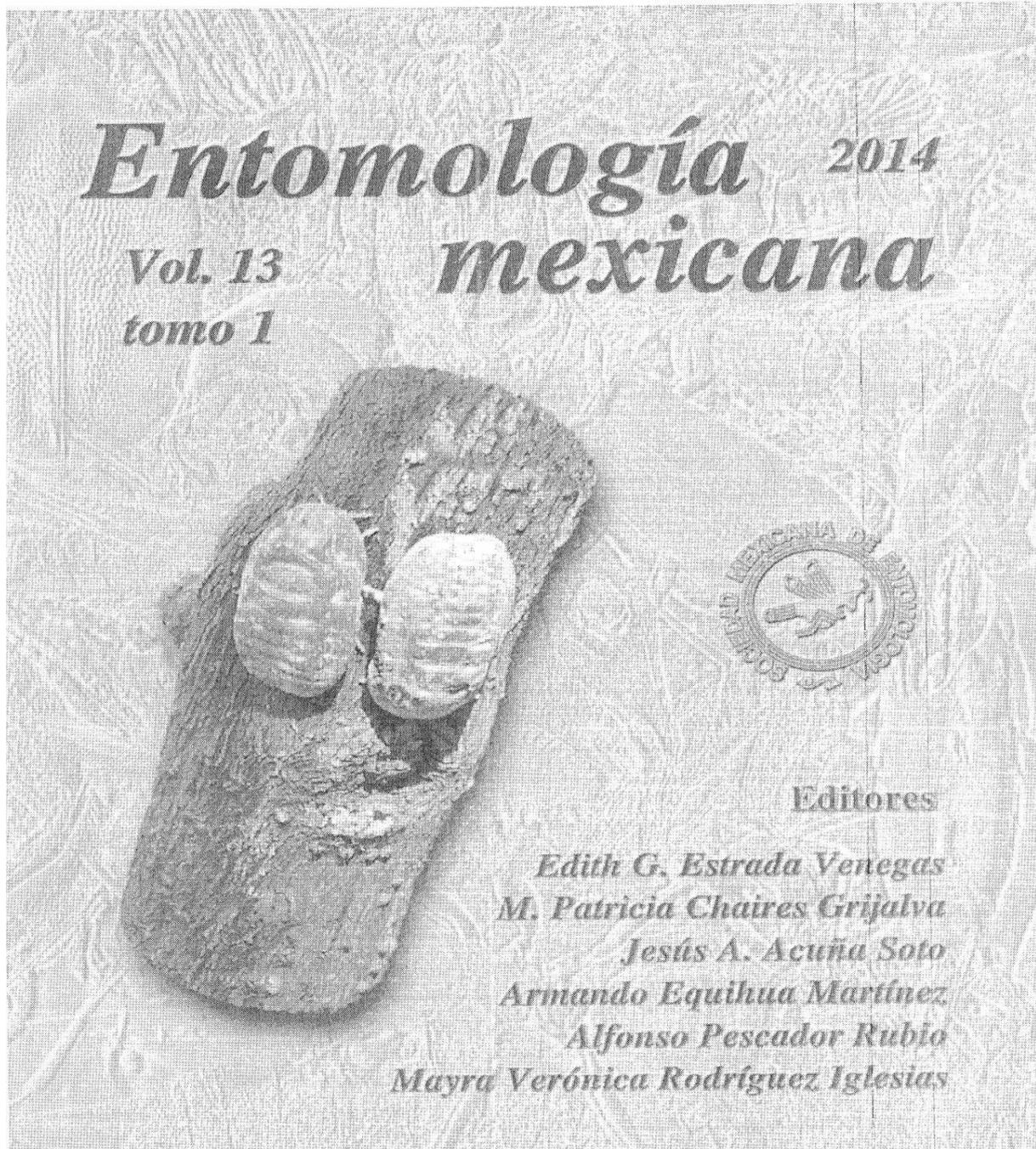
Conclusión

Todas las concentraciones evaluadas de la proteína Cry2Ab de *B. thuringiensis* en *S. frugiperda* no ocasionaron el 100% de mortalidad, sin embargo, los individuos que sobrevivieron en las diferentes concentraciones, su ciclo biológico fue prolongado, se redujo el peso de las larvas, pupas y adultos, y se redujo el número de individuos que se desarrollaron al estado adulto.

Literatura Citada

- Abbott, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18: 265-267.
- Boucias, D.G., J.C. Pendland. 1998. Principles of insect pathology. Norwel, US, Klumer Academic Publishers. p. 75-84.
- Broderik, N., K. Raffa y J. Handelsma. 2006. Bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103: 549-57.
- Fernández, W. L. y V. L. Estefanía. 1974. Coconut water waste disposal of some desiccated coconut factories in the Philippines. *Phil. Agric.* 57: 359-363.
- Gill, S.S., E.A. Cowles y P.V. Pietrantonio. 1992. The mode on action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu. Rev. Entomol.* 37:615-636.
- Glare, T. y M. O'Callaghan. 2000. *Bacillus thuringiensis*. Biology, ecology and safety. Reino Unido, Wiley and sons. 350 p.
- Hare, S.G.F. y R.S. Nasci. 1986. Effects sublethal exposure to *Bacillus thuringiensis* Var. *Israelensis* on larval development and adult size in *Aedes aegypti*. *Journal of American Mosquitoes Control Association* 2: 310-313.
- Martínez, A. M., P. Caballero, M. Villanueva, N. Miralles, I. San Martín, E. López y T. Williams. 2004. Formulation with an optical brightener does not increase probability of developing resistance to *Spodoptera frugiperda* nucleopolyedrovirus in the laboratory. *J. Econ. Entomol.* 97: 1202-1208
- Morillo, F. y A. Notz. 2003. Resistencia de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a lambda-cyhalotrina y metonil. *Entomotrópica* 16: 79-87.
- Reyes-Villanueva, F., M. Juárez-Eguía y A. Flores-Leal. 1990. Effects of sublethal dosages of Abate® upon adult fecundity and longevity of *Aedes aegypti*. *Journal of American Mosquito Control association* 6: 739-741.
- Sauka, D. H. y G. B. Benintende. 2008. *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Revista Argentina de Microbiología* 40: 124-140.
- Stapel, J. O., J. W. Deborah, J. R. Ruberson y W. L. Joe. 1998. Development and behavior of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in Choice Test with Food Substrates containing toxins of *Bacillus thuringiensis*. *Biological control.* 11: 29-37.
- Zeener de Polonia, I., A. Álvarez, R. Mejía y M. Bayona. 2005. Influencia de la toxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* sobre el desarrollo del cogollo del maíz, *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH). En: Colombia. *Revista. U.D.C.A. Actualidad & Divulgación Científica* 8:129-139.

13.1. ANEXO 2. El IV Congreso Latinoamericano de Aracnología y XLIX Congreso Nacional de Entomología de la SME.



**EFFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN
Spodoptera frugiperda (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)**

CONSEJO DIRECTIVO 2013-2015

Presidente

Alfonso Pescador Rubio

Primer Vicepresidente

M. Patricia Chaires Grijalva

Segundo Vicepresidente

Edith G. Estrada Venegas

Secretario

Jesús Alberto Acuña Soto

Tesorero

Manuel A. Balcázar Lara

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

Director General

Dr. Jesús María Moncada de la Fuente

Secretario General

Dr. Raúl Gerardo Obando Rodríguez

Secretario Administrativo

Lic. Rolando Ramos Escobar

SOCIEDAD MEXICANA DE ENTOMOLOGÍA A. C.

Responsable Editorial

Sociedad Mexicana de Entomología A. C.

Foto de la Portada: *Llaveia axin axin* Llave, 1832 (Hemiptera: Margarodidae) AJE

Autor: Hernesto Alonso Sánchez Rosas

Diseño de la Portada: M. en C. Jorge M. Valdez Carrasco

Primera edición 2014

©Editores

Edith G. Estrada Venegas

M. Patricia Chaires Grijalva

Jesús A. Acuña Soto

Armando Equihua Martínez

Alfonso Pescado Rubio

Mayra V. Rodríguez Iglesias

©Para la presente edición

Volumen 13

Tomo I

ISBN:

Miembro 306 CANIEM

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

Km 36.5 Carretera México-Texcoco

Montecillo, Texcoco, CP. 56230

Estado de México

©D. R. Todos los derechos Reservados conforme a la ley

Impreso y Hecho en México

Printed and Made in Mexico

**EFFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN
Spodoptera frugiperda (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)**

PAPILIONIDAE Y PIERIDAE (LEPIDOPTERA: PAPILIONOIDEA) EN LA REGIÓN LOXICHA DE LA SIERRA MADRE DEL SUR, OAXACA, MÉXICO. Alejandra Sánchez-García, Armando Luis-Martínez y José Luis Salinas-Gutiérrez.	154
CONTROL BIOLÓGICO	
EXPLORACION Y AISLAMIENTO DE HONGOS ENTOMOPATOGENOS PARA EL MANEJO DE PLAGAS DE ZARZAMORA: UN ENFOQUE REGIONAL. Hipólito Cortez-Madrigal.	162
EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO RADIAL Y CONIDIACION DE CEPAS NATIVAS DE <i>Hirsutella citrifomis</i> . Georgina Cruz-Juárez, María Guadalupe Maldonado-Blanco, Myriam Elías-Santos, Raúl Rodríguez-Guerra, María del Socorro Flores González y Carlos Francisco Sandoval-Coronado.	167
PRODUCCIÓN DE BIOINSECTICIDA DE <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> EN DOS MEDIOS DE CULTIVO CONTRA LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> . Gabriela Fernández-Peña, María Guadalupe Maldonado-Blanco, Zinnia Judith Molina Garza, Myriam Elías-Santos, Humberto Quiroz-Martínez y María del Socorro Flores-González.	173
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD TÓXICA DE CEPAS NUEVAS DE <i>Bacillus thuringiensis</i> AISLADAS DE CHIAPAS CONTRA <i>Trichoplusia ni</i> (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE). José Fernando Ornelas-Pérez, María Guadalupe Maldonado-Blanco, Myriam Elías-Santos, María del Socorro Flores González, Carlos Francisco Sandoval-Coronado y Luis J. Galán Wong.	177
EVALUACIÓN TOXICA DE ACEITES ESENCIALES CONTRA <i>Diaphorina citri</i> Y SU COMPATIBILIDAD CON <i>Metarhizium anisopliae</i> . Villegas-Mendoza Jesús Manuel, Alba-Moreno Isela Madai, Rosas-García Ninfa María, Mireles-Martínez Maribel, Rivera-Sánchez Gildardo y Paz-González Alma Delia.	181
EVALUACIÓN TÓXICA A NIVEL LABORATORIO DE EXTRACTO ACÉTICO Y TRES METABOLITOS DE RUDA (<i>Ruta graveolens</i>) CONTRA EL GUSANO COGOLLERO (<i>Spodoptera frugiperda</i>). Villegas-Mendoza Jesús Manuel, Santes-Hernández Zuridai, Rivera-Sánchez Gildardo, Mireles-Martínez Maribel, Rosas-García Ninfa María y Paz-Gonzalez Alma Delia.	185
EFFECTO SUBLETAL DE LA PROTEÍNA CRYIAC DE <i>Bacillus thuringiensis</i> BERLINER EN GUSANO COGOLLERO <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. SMITH). Anayely Rosales-Juárez, Sotero Aguilar-Medel y José Luis Martínez-Carrillo.	190
EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE BIOINSECTICIDAS Y BIORRACIONALES EN EL CONTROL DE <i>Spodoptera frugiperda</i> L. (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) EN EL ESTADO DE DURANGO. J. Natividad Gurrola-Reyes, María Berenice González-Maldonado y Miguel Mauricio Correa-Ramírez.	196



La Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y la Sociedad Mexicana de Entomología

organizan la presente

Constancia

a

Anayely Rosales Juárez

por su distinguida participación como ponente

Morelia, Michoacán a 24 de julio de 2014

Dra. Margarita Vargas Sandoval
Comité Organizador Local

Dr. Alfonso Pescador Rubio
Presidente de la SME

Dr. Cándido Luna León
Comité Organizador Nacional



EFFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)

EFFECTO SUBLETAL DE LA PROTEÍNA CRY1AC DE *Bacillus thuringiensis* BERLINER EN GUSANO COGOLLERO *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH)

Anayely Rosales-Juárez¹, Sotero Aguilar-Medel¹, José Luis Martínez-Carrillo².¹Centro Universitario Tenancingo, Universidad Autónoma del Estado de México. Km 1.5 Carretera Tenancingo-Villa Guerrero. 52400 Tenancingo, Estado de México. anayely1406@hotmail.com; soteromex@hotmail.com ²Instituto Tecnológico de Sonora, 5 de Febrero 818 sur, Ciudad Obregón, Sonora, México.

RESUMEN: El gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith es una plaga importante en cultivos básicos, hortícolas, ornamentales y forestales; su control se basa principalmente en el uso de insecticidas químicos. En la actualidad existen alternativas para el control biológico de esta plaga, las cuales no afectan al medio ambiente, tal es el caso de la bacteria *Bacillus thuringiensis kurstaki* que ha sido ampliamente usada para el control de varias especies de insectos lepidópteros. El objetivo de este trabajo fue evaluar en condiciones de laboratorio los efectos subletales de la proteína Cry1Ac de *B. thuringiensis kurstaki* en *S. frugiperda*. Los resultados indicaron que la mortalidad de larvas, pupas y adultos se incrementaron al aumentar las concentraciones de la proteína y a través del tiempo, se prolongó el ciclo de vida de los insectos en 2.7 días al estado de pupa y 5.1 días al estado adulto, se redujo el peso de las larvas (a los 3 y 12 días), pupas y adultos en 1.5, 205.3, 53.7 y 27.8 mg respectivamente con referencia al testigo, y se redujo el número de individuos que se desarrollaron al estado adulto. En la concentración más alta (50 µg ml⁻¹) solo el 3.3% alcanzaron este estado de desarrollo.

Palabras clave: Plaga, Lepidópteros, Control biológico.

Sublethal effect of cry1ac protein of *Bacillus thuringiensis* Berliner on the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)

ABSTRACT: The fall armyworm *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith, is a key pest of grain, grass, vegetables, ornamental and forest crops, its control is based basically on chemical control. Actually, there are alternative biological control methods for this insect pest, which are not harmful to the environment, such as *Bacillus thuringiensis kurstaki*, a bacteria widely used to control a variety of Lepidoptera insect species. The objective of this work was to evaluate under laboratory conditions the sublethal effects of the Cry1Ac protein of *B. thuringiensis kurstaki* on *S. frugiperda*. Results indicated that larvae, pupae and adult mortality was higher as concentrations of the protein were increased and through time the life cycle of the insects was prolonged by 2.7 days to the pupae stage and 5.1 days to the adult stage, larvae weight was reduced (at 3 and 12 days), pupae and adults in 1.5, 205.3, 53.7 and 27.8 mg respectively as compared to the untreated control, and there was a reduction of the number of adults that reached the adult stage. At the highest concentration (50 µg ml⁻¹) only 3.3% reached this insect developmental stage.

Key words: Insect pests, Lepidoptera, Biological Control

Introducción

El gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) es una de las plagas importantes que se desarrolla en regiones tropicales y subtropicales, afecta a cultivos ornamentales, frutícolas y hortícolas (Fernández y Estefanía, 1974). El uso intensivo de insecticidas de amplio espectro pertenecientes al grupo de los piretroides y organofosforados (Cook *et al.*, 2004) usados en el control de este insecto, ha ocasionado el desarrollo de resistencia y están causando serios problemas ambientales (Morillo y Notz, 2003), por esta razón, es indispensable estudiar más alternativas de control biológico para el control de esta plaga, una de ellas es el uso de productos a base de *Bacillus thuringiensis* Berliner, ya que es la bacteria entomopatógena más conocida, estudiada y ampliamente utilizada como agente de control biológico. Más del 90% del mercado de

bioinsecticidas incluye productos a base de esta bacteria (Glare y O'Callaghan, 2000). *B. thuringiensis* forma δ -endotoxinas como inclusiones parasporales durante la esporulación, las cuales se disuelven en el intestino medio del insecto liberando protoxinas que proteolíticamente se convierten en pequeñas moléculas tóxicas (Gill *et al.*, 1992). En la actualidad las δ -endotoxinas son producidas por alrededor de 100 subespecies de Bt (Sanahuja *et al.*, 2011). *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (HD-1) es por excelencia la cepa utilizada para el control de insectos lepidópteros, plagas agrícolas y forestales. Esta cepa es hasta 200 veces más tóxica para algunas especies de lepidópteros, y se caracteriza por la portación de los siguientes genes cry antilepidópteros: cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry2Aa, cry2Ab y cry1Ia (Sauka y Benintende, 2008). A la fecha se han realizado múltiples estudios para evaluar los efectos letales de *B. thuringiensis*, y no existen estudios que indiquen cuales son los efectos subletales que esta bacteria provoca, tales efectos son provocados por una sustancia tóxica en dosis por abajo ala necesaria para provocar el 100% de la mortalidad. Por ello, el objetivo de esta investigación, fue determinar en condiciones de laboratorio los efectos subletales de la proteína Cry1Ac de *B. thuringiensis kurstaki* en el gusano cogollero *S. frugiperda*.

Materiales y Método

Cría del gusano cogollero. Los experimentos fueron realizados con larvas de *S. frugiperda* provenientes de una colonia que se ha mantenido en el laboratorio de Entomología por más de tres años en el Centro Universitario UAEMex Tenancingo. Esta colonia se continuó criando en una cámara de cría en condiciones controladas: temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$, humedad relativa del $75 \pm 5\%$ y un fotoperiodo de 13:11 h luz: oscuridad. Las larvas se alimentaron con una dieta artificial (Fall Armyworm, Southland Products, Inc.) hasta obtener pupas, las cuales se colocaron en jaulas entomológicas (25 x 25 x 35 cm) para la emergencia de los adultos, mismos que fueron alimentados con agua azucarada al 10% (agua destilada y azúcar). Las hembras ovipositaron en bolsas de papel de estraza # 20, esta bolsa se cambió cada 24 horas durante el periodo de oviposición. Se obtuvieron larvas de la F1 con las cuales se realizaron los bioensayos correspondientes.

Proteína Cry1Ac. Se utilizó el bioinsecticida comercial MVP II (Mycogén, Corp. San Diego CA) a 19.1 %, formulación sólida que contiene una protoxina híbrida similar a la δ -endotoxina Cry1Ac de *B. thuringiensis* var. *Kurstaki*, expresada y encapsulada en *Pseudomonas fluorescens*.

Bioensayos. Los bioensayos consistieron en alimentar las larvas del gusano cogollero con dieta artificial contaminada con concentraciones de 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 y 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de proteína de *B. thuringiensis*. La alimentación de las larvas fue en todo el estado larval. La dieta contaminada se cambió cada 72 h (3 días) para evitar exponer las larvas a una proteína degradada. En los primeros seis días de evaluación cada larva fue alimentada con 1 ml de dieta, en este tiempo, la dieta y las larvas fueron colocadas en charolas para bioensayos (Bio-Assay Tray Bio-BA-128: C-D International, Inc) con 128 cavidades, en cada cavidad se colocó una larva neonata confinada con un plástico transparente autoadherible (PULL N° PEEL Tab Bio-Cv-16; C-D International, Inc.). Posteriormente, se alimentaron con 5 ml de dieta, los cuales, tanto la dieta como las larvas se colocaron en vasitos de plástico del número 0 (Envases Primo Cuevas® S.A. de C.V. Ecatepec, Estado de México, Méx.), para favorecer el intercambio gaseoso de los vasitos, en la tapa se realizó una pequeña perforación. Al momento de transferir las larvas a la nueva dieta (cada 72 h), se evaluaron los porcentajes de mortalidad. Las larvas fueron pesadas individualmente a los 3 y 12 días; posteriormente se evaluaron otras variables: tiempo (días) que alcanzaron el estado de pupa, peso de las pupas, tiempo (días) que llegaron al estado adulto y finalmente el peso de los adultos.

**EFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN
Spodoptera frugiperda (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)**

Los porcentajes de mortalidad en los tratamientos se ajustó mediante el uso de la formula Abbott (Abbott, 1925).

Diseño experimental y análisis estadístico. Se utilizó un diseño experimental de bloques completos al azar con seis tratamientos y un testigo absoluto, y se realizaron tres repeticiones. En cada tratamiento se iniciaron con 50 larvas neonatas y las repeticiones se realizaron en días diferentes. Los resultados se sometieron a una análisis de varianza y a una prueba de comparación de medias con Tukey con un nivel de significancia del 95 % ($p \leq 0.05$) con el programa Infostat.

Resultados y Discusión

Mortalidad. La mortalidad de las larvas se incrementó conforme aumentó la concentración de la proteína, y a través del tiempo. A los tres días, en el rango de concentraciones de 0.001 a 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$, los porcentajes de mortalidad fluctuaron del 1.3 al 6.0%, mientras que en las concentraciones más altas (10 y 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$) fue del 8.6% sin diferencias significativas. A los seis días, en la concentración más baja (0.001 $\mu\text{g ml}^{-1}$) se registró una mortalidad del 6.0%, en el rango de 0.01 a 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ fue del 8.0 al 16.8%, con las concentraciones más altas (10 y 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$) la mortalidad fue del 21.1 y 28.9% respectivamente.

Cuadro 1. Porcentaje de mortalidad a través del tiempo de larvas de *S. frugiperda* alimentadas con dieta contaminada con diferentes concentraciones de la proteína CryIAc de *B. thuringiensis*.

Concentra- cion $\mu\text{g ml}^{-1}$	Periodo larval (días)								Pupas*
	3*	6*	9*	12*	15*	18*	21*	24*	
0.001	1.3ab	6.0ab	5.6ab	5.3ab	9.3ab	12.0ab	22.0ab	23.0ab	50.0ab
0.01	4.0abc	8.0ab	5.5ab	11.7ab	16.3ab	26.0abc	24.0abc	24.7abc	56.3bc
0.1	6.0bc	8.7ab	8.2bc	7.7ab	18.0ab	23.3ab	22.3ab	33.0ab	63.7cd
1	6.0abc	16.8bc	18.7b	20.0ab	23.0b	32.7bc	36.7abc	38.3abc	63.7cd
10	8.6c	20.1cd	18.6b	23.3bc	28.0b	37.7bc	42.0bc	47.0bc	67.0d
50	8.6c	28.9 d	37.5 c	42.7c	49.7 c	55.3c	63.3c	70.3c	96.3f

*Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre si (Tukey, $p \leq 0.05$).

A los nueve días, en las concentración más bajas (0.001 y 0.01 $\mu\text{g ml}^{-1}$) se registró el 5.6 y 5.5% de mortalidad, y en las concentraciones de 0.01, 0.1, 1 y 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ la mortalidad fluctuó entre el 8.2 y 20.1%; con 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ la mortalidad fue del 37.5%. A los 12 días la mortalidad en las concentraciones 0.001, 0.01, 0.1 y 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ fueron del 5.3 al 20.0% y en las más altas (con 10 y 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$) fue del 23.8 y 42.7%. A los 15 días se registró en la concentración más alta (50 $\mu\text{g ml}^{-1}$) un 49.7% de mortalidad, en concentraciones con 0.01, 0.1, 1 y 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ la mortalidad fue de 16.3, 18.0, 23.0 y 28.0 % respectivamente, mientras que en la concentración más baja (0.001 $\mu\text{g ml}^{-1}$) la mortalidad fue solo del 9.3%. A los 18 días, en la concentración más baja se registró el 12.0 % de mortalidad y en concentraciones de 0.01 y 0.1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ la mortalidad fue del 26.0 y 23.3 % respectivamente sin diferencia significativa, en 1 y 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ la mortalidad fue de 32.7 y 37.7 %, y en la concentración más alta (50 $\mu\text{g ml}^{-1}$) la mortalidad fue del 55.3%. A los 21 días, la mortalidad fue del 22.0% al 42.0% en las concentraciones con 0.001 a 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$, y en la concentración de 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ fue del 63.3%. A los 24 días, en las concentraciones más bajas (0.001 y 0.1 $\mu\text{g ml}^{-1}$) los porcentajes de mortalidad fueron de 23.0 y 24.7% sin diferencias significativas, en concentraciones de 0.1, 1 y 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ la mortalidad fue del 33.0, 38.3 y 47.0 % respectivamente, y con 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ fue del 70.3%. El porcentaje de mortalidad de pupas, con 0.001 $\mu\text{g ml}^{-1}$ fue del

**EFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN
Spodoptera frugiperda (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)**

50.0%, en la concentración con 0.01 $\mu\text{g ml}^{-1}$ la mortalidad fue de 56.3% y en las concentraciones con 0.1 y 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ el porcentaje de mortalidad fue del 63.7%, mientras que en las concentraciones más altas (10 y 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$) se registró el 67.0 y 96.3% de mortalidad respectivamente (Cuadro 1).

Peso de larvas a los 3 y 12 días. El peso de las larvas se redujo considerablemente al aumentar la concentración de la proteína. A los 3 días, el peso promedio de las larvas testigo fue de 2.7 mg, y en las concentraciones con 0.001, 0.01, 0.1 y 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ pesaron 2.3 mg en promedio, en la concentración 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ pesaron 1.5 mg, mientras que en la concentración con 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ pesaron 1.2 mg, es decir, 1.5 mg menos que las larvas testigo. A los 12 días, el testigo pesó 490.9 mg y en las concentraciones 0.001, 0.01, 0.1 y 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ pesaron de 352.9, 334.2, 316.9 y 315.2 mg respectivamente, y en las concentraciones de 10 y 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ los pesos registrados fueron de 306.5 y 285.6 mg respectivamente, casi 205.3 mg menos entre el testigo y la concentración de 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (Cuadro 2).

Tiempo en llegar al estado de pupa. El tiempo requerido para alcanzar el estado de pupa fue mayor conforme se incrementó la concentración, habiendo una diferencia hasta de 2.7 días para el alcanzar el estado de pupa entre el testigo y 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Es decir, en el testigo las pupas se desarrollaron a los 16.0 días y en la concentración más alta las pupas se formaron a los 18.7 días. En las concentraciones intermedias 0.001, 0.01, 0.1, 1 y 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ las pupas se formaron entre los 16 y 17 días (Cuadro 2).

Peso de pupas. En el testigo las pupas pesaron 257.4 mg, en las concentraciones 0.001, 0.01, 0.1, 1 y 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ pesaron 244.4, 235.4, 229.2, 226.3 y 222.8 mg respectivamente, y con 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ el peso fue de 203.7 mg, es decir, 53.7 mg menos que en el testigo (Cuadro 2).

Tiempo en llegar al estado de adulto. En el testigo las larvas neonatas tardaron 21.9 días para desarrollarse al estado adulto, y en las concentraciones 0.001, 0.01, 0.1, 1 y 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ los adultos se formaron a los 23.9, 24.5, 24.6, 25.8 y 25.6 mg respectivamente, y en la concentración más alta (50 $\mu\text{g ml}^{-1}$) los adultos se desarrollaron a los 27.0 días. La diferencia en tiempo para que se desarrollaran los adultos del testigo y la concentración más alta fue de 5.1 días (Cuadro 2).

Peso de adultos. En el testigo los adultos pesaron 54.4 mg, en las concentraciones 0.001, 0.01, 0.1, 1 y 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ los pesos fueron: 46.4, 44.5, 41.3, 43.2 y 37.1 mg respectivamente, y en la concentración más alta los adultos pesaron 16.9 mg, lo cual representó una diferencia de 27.8 mg menos que en el testigo (Cuadro 2).

Los resultados encontrados confirman que las larvas de gusano cogollero al alimentarse con dieta contaminada con la proteína Cry1Ac de *B. thuringiensis* y al exponerse a concentraciones subletales, la toxina provocó una mortalidad superior al 67% usando concentraciones de 10 y 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ en estado de pupa. A los 24 días, con 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ la mortalidad de las larvas fue de 38.3%; estos datos concuerdan con estudios realizados por Zeener de Polonia *et al.* (2005), donde de igual forma, determinaron que la proteína Cry1Ac afecta el desarrollo de larvas de gusano cogollero provocando una mortalidad del 20.8% en el mismo tiempo y a la misma concentración, según Broderik *et al.* (2006), confirman que esta mortalidad provocada por Bt depende de la microbiota natural del intestino del insecto debido a que causa septicemia después de que esta bacteria les permite alcanzar el hemocele tras dañar el epitelio intestinal.

Este trabajo demuestra que las concentraciones subletales afectaron el desarrollo larval, incrementando el tiempo para llegar al estado de pupa y adulto en 2.7 y 5.1 días respectivamente respecto al testigo, este atraso se atribuye a la disminución en la alimentación y como consecuencia aumento en tiempo de desarrollo de cada uno de los estadios.

**EFFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN
Spodoptera frugiperda (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)**

Cuadro 2. Efecto de diferentes concentraciones de la proteína Cry1Ac de *B. thuringiensis* en *S. frugiperda* sobre el tiempo de desarrollo (días) de larvas neonatas a pupa y adulto, peso promedio de larvas a los 3 y 12 días, peso de pupas y adultos.

Concentración µg ml ⁻¹	N ¹	N ²	T ^{1*}	N ³	T ^{2*}	Peso en mg			
						Larvas (3 días*)	Larvas (12 días*)	Pupas *	Adulto*
TESTIGO	150	78.0	16.0 a	54.7	21.9 a	2.7a	490.9 a	257.4 a	54.4 a
0.001	150	60.7	16.8 ab	27.3	23.9 b	2.3 bc	352.9 b	244.4 ab	46.4 b
0.01	150	58.7	17.1 abc	24.7	24.4 b	2.6 ab	334.2 bc	235.4 abc	44.5 b
0.1	150	52.0	17.2 abc	20.0	24.6 b	2.2 cd	316.9 cd	229.2 abc	41.3 bc
1	150	48.0	17.7 bc	20.7	25.8 bc	2.1 d	315.2 cd	226.3 abc	43.2 bc
10	150	41.3	17.6 abc	18.0	25.6 bc	1.5 e	306.5 de	222.8 bc	37.0 c
50	150	23.3	18.7 c	3.3	27.0 c	1.2 f	285.6 e	203.7 c	26.9 d

N¹ Número de larvas expuestas a las diferentes concentraciones de la proteína Cry1Ac.

N² Porcentaje de larvas que llegaron al estado de pupa.

N³ Porcentaje de larvas que llegaron al estado de adulto.

T¹ Tiempo transcurrido en días desde larvas neonatas al estado de pupa.

T² Tiempo transcurrido en días desde larvas neonatas al estado de adulto.

*Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, p ≤ 0.05).

El peso de larvas a los 3 y 12 días, pupas y adultos se redujo mientras se incrementó la concentración, Stapel *et al.* (1998), confirman que el uso de toxinas de Bt afecta el desarrollo larval y la alimentación producto de la intoxicación bacteriana. En investigaciones realizadas por Ezaguirre *et al.* (2005), evaluaron los posibles efectos subletales de *B. thuringiensis* variedad Kurstaki (Dipel DF) sobre el desarrollo de *Sesamia nonagrioides* demostrando que hay un porcentaje de mortalidad del 20.1% en el estado de pupa al exponer las larvas a una concentración de 0.35 mg kg⁻¹ de Bt, más tiempo de desarrollo y una muda extra comparada con el testigo. Mientras tanto Moreau y Bauce (2003), evaluaron los efectos subletales usando *Bacillus thuringiensis* en *Choristoneura fumiferana*, afirmando que los efectos subletales afectaron el desarrollo larval prologándolo en días y se redujo significativamente el peso de pupas.

Conclusión

Se determinó que las concentraciones de la proteína Cry1Ac de *B. thuringiensis* en *S. frugiperda* evaluadas no ocasionaron el 100% de mortalidad, sin embargo, tienen influencia sobre el desarrollo del insecto, ya que los individuos que sobrevivieron en las diferentes concentraciones, su ciclo biológico se prolongó en 2.7 días para llegar al estado de pupa y 5.1 días para llegar al estado adulto con respecto al testigo, se redujo el peso de las larvas, pupas y adultos, y se redujo el número de individuos que se desarrollaron al estado adulto.

Literatura Citada

- Abbott, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18: 265-267.
- Broderik, N., Raffa, K y J. Handelsma. 2006. Bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103: 549-57.
- Cook, D.R., Leonard, B. R. y J. Gore. 2004. Field and laboratory performance of novel insecticides against armyworms (Lepidoptera: Noctuidae). *Florida Entomologist.* 87: 433-439.

**EFFECTOS SUBLETALES DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN
Spodoptera frugiperda (J. E. SMITH) Y *Helicoverpa zea* (BODDIE)**

- Eizaguirre, M., Tort, S., López, C. y R. Albajes. 2005. Effects of sublethal concentrations of *Bacillus thuringiensis* on larval development of *Sesamia nonagrioides*. J. Econ. Entomol. 98: 464-470.
- Fernández, W. L. y V. L. Estefanía. 1974. Coconut water waste disposal of some desiccated coconut factories in the Philippines. *Phil. Agric.* 57: 359-363.
- Gill, S.S., Cowles, E.A. y P.V. Pietrantonio. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu. Rev. Entomol.* 37:615-636.
- Glare, T. y M. O'Callaghan. 2000. *Bacillus thuringiensis*. Biology, ecology and safety. Reino Unido, Wiley and sons. p. 350 .
- Moreau G. y E. Bauce. 2003. Lethal and sublethal effects of single and Dpuble Applications of *Bacillus thuringiensis* Variety *kurstaki* on Spruce Budworm (Lepidoptera: Tortricidae) Larvae. *J. Econ. Entomol.* 96: 280-286.
- Morillo, F. y A. Notz. 2003. Resistencia de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a lambda cihalotrina y metonil. *Entomotripica* 16: 79-87.
- Sanahuja G, Banakar R., Twyman R. M., Capell T. y P.Christou. 2011. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnol J* 9:283-300.
- Sauka, D. H. y G. B. Benintende. 2008. *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Revista Argentina de Microbiología* 40: 124-140.
- Stapel, J. O., Deborah, J. W., Ruberson J. R. y W. L. Joe. 1998. Development and behavior of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in Choice Test with Food Substrates containing toxins of *Bacillus thuringiensis*. *Biological control.* 11: 29-37.
- Zecner de Polonia, I., Álvarez, A., Mejía, R. y M. Bayona. 2005. Influencia de la toxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* sobre el desarrollo del cogollo del maíz, *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH). En: Colombia. *Revista. U.D.C.A. Actualidad y Divulgación Científica* 8:129-139.