

00322

195



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

SUSCEPTIBILIDAD DE *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) Y *Spodoptera exigua* (Hübner) A LA δ- ENDOTOXINA cry2Ab de *Bacillus thuringiensis* (Berliner).

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A :
KATINA STAMATIU SANCHEZ

DIRECTOR DE TESIS:
DR. JOSE LUIS MARTINEZ CARRILLO

2003



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

I



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**TESIS CON
FALLA DE
ORIGEN**



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico o impreso el contenido de mi trabajo recepcional

NOMBRE: Katina
Stamatiu Sanchez

FECHA: 31-OCT-2003

FIRMA: [Signature]

DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:
SUSCEPTIBILIDAD DE *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) Y *Spodoptera exigua* (Hübner) A LA δ - ENDOTOXINA cry2Ab de *Bacillus thuringiensis* (Berliner).

realizado por **STAMATIU SÁNCHEZ KATINA**

con número de cuenta **8435181-2** , quien cubrió los créditos de la carrera de: **BIOLOGÍA**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. José Luis Martínez Carrillo

[Signature]

Propietario

Dr. José Concepción Rodríguez Maciel

[Signature]

Propietario

M. en C. Adriana Muñoz Hernández

Suplente

M en C. José Luis Bortolini Rosales

Suplente

Biol. Ivette Ruíz Boijseauneau

[Signature]

Consejo Departamental de

[Signature]
M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

**El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Entomología
del Campo Experimental del Valle del Yaqui (CEVY), Cd. Obregón, Sonora,
el cual es dirigido por el Dr. José Luis Martínez Carrillo,
Investigador Titular "C" del INIFAP y
Líder Nacional de Investigación en Fitoprotección.**

DEDICATORIA

A la memoria de mi Padre

Que desde donde esté, sé que comparte mis penas y alegrías.

A mi Madre

Por darme la vida, su amor y su incansable esfuerzo para sacarme adelante.

A mi hermano y hermanas

Dimitri, Kaliopi, Helas y Atehnea por la inolvidable infancia, el cariño y el apoyo que siempre me han brindado.

Al resto de mi familia

*Mis cuñados y sobrinos que han sazonado la convivencia familiar día a día.
Páris, Ioannis, Homero y Popi, gracias por sus travesuras.*

A la vida

Porque aún no dejo de sorprenderme de lo maravilloso que es vivirla.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi director de tesis, el Dr. José Luis Martínez Carrillo por su incondicional apoyo para la realización de este trabajo, por su paciencia, sus consejos y sus enseñanzas.

Al Dr. J. Concepción Rodríguez Maciel, no sólo por su prestancia para compartir sus conocimientos, sino por brindarme su amistad, comprensión y ayuda.

A los M. en C. Adriana Muñoz, José Luis Bortolini y la Biól. Ivette Ruiz por sus muy atinados consejos que enriquecieron este trabajo y mi formación académica.

Expreso mi profunda gratitud a la familia Gutiérrez Moreno por la quien no habría sido posible mi estancia en Sonora. Javier, Anabel, Paty, Lupita, Denhi y Javier Isaac gracias por el apoyo moral, económico y todos los lindos momentos.

A Dinora Romero por enseñarme el teje y manejo del laboratorio, al personal del laboratorio, Don Lupe, Don Berna y Morón, por la agradable convivencia y su gran ayuda. Al M. en C. Juan José Pacheco, por las facilidades para el uso de las instalaciones del CEVY, al Dr. Tamayo por el intercambio vinícola e ideologías centro-noroeste. Gracias a Lydia, Vianney, Melissa y Yolanda por su amistad.

Agradezco especialmente a mis queridos amigos que con su amistad han hecho este viaje por la vida un puñado de alegrías.

Fernando y Mario gracias por su amistad y entusiasmo en esta etapa de mi vida y por estar conmigo en las buenas y en las malas.

A mis entrañables amigos de aventuras universitarias, Javier, Jorgelina, Hugo, Ángel, Arturo, Aquiles y los agregados culturales, Gina, Gerardo y Laura.

A Lulú, Columba, Paty, Horacio, Laura, Isabel, Judith, Bibiana, Luis y a todos aquellos que compartieron conmigo momentos en la facultad y fuera de ella, muy en especial a la generación 1988-1991.

A Elva, Valeria, Gerardo, Blanquita, Anita, Graciela y todos los buenos amigos de trabajo.

A Maria, Araceli, Juan Carlos, Katia, Ivan, Octavio, Edy, Francisco y Carlos por disipar mi soledad en caundo mi estancia en Culiacán.

Con infinito agradecimiento a quien ha sido desde preparatoria mi *alma mater*, la Universidad Nacional Autónoma de México, LA MÁXIMA CASA DE ESTUDIOS muy a pesar de los que no quieran aceptarlo.

Agradezco en general a todos aquellos que hicieron posible la culminación de este trabajo y mi formación como profesional, desde maestros, académicos, administrativos y amigos, que por el hecho de no mencionarlos sean menos importantes.

INDICE GENERAL

DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
INDICE GENERAL	vi
INDICE DE CUADROS	viii
INDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
3. OBJETIVOS	8
3.1 Objetivo General	8
3.2 Objetivos particulares	8
4. BIOLOGÍA DE ORGANISMOS	9
4.1 <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith)	9
4.1.1 Ciclo de vida	9
4.1.2 Importancia	10
4.1.3 Manejo	10
4.2 <i>Zea mays</i> L.	11
4.3 <i>Spodoptera exigua</i> (Hübner)	13
4.3.1 Ciclo de vida	13
4.3.2 Importancia	13
4.3.3 Manejo	14
4.4 <i>Gossypium hirsutum</i> L.	15
4.5 <i>Bacillus thuringiensis</i> (Berliner)	17
4.5.1 Activación, Efecto y Modos de acción de las toxinas	18
5. ÁREA DE ESTUDIO	20
5.1 Campo experimental Valle del Yaqui (CEVY)	20
6. MATERIALES Y MÉTODO	22
6.1 Material Biológico	22
6.2 Crianza de Insectos	22
6.3 Toxina cry2Ab	23
6.4 Bioensayos	23
6.5 Evaluaciones	23
6.6 Análisis estadísticos	24
7. RESULTADOS	25
7.1 <i>Spodoptera frugiperda</i> después de cinco días de exposición	25
7.2 <i>Spodoptera frugiperda</i> después de siete días de exposición	28
7.3 <i>Spodoptera exigua</i> después de cinco días de exposición	33
7.4 <i>Spodoptera exigua</i> después de siete días de exposición	36

8. DISCUSIÓN	41
9. CONCLUSIONES	45
10. ANEXOS	46
9.1 Anexo 1 Crianza de Insectos	46
9.2 Anexo 2 Bioensayo	48
11. LIRETATURA CITADA	51

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Porcentaje de mortalidad, de inhibición de peso y de inhibición de desarrollo de larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> después de cinco días de exposición a distintas dosis de la δ - endotoxina de <i>Bacillus thuringiensis</i>	25
Cuadro 2	Porcentaje de mortalidad, de inhibición de peso y de inhibición de desarrollo de larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> después de siete días de exposición a distintas dosis de la δ - endotoxina de <i>Bacillus thuringiensis</i>	29
Cuadro 3.	Larvas vivas de <i>Spodoptera frugiperda</i> a los siete días de exposición a diferentes concentraciones de la δ - endotoxina cry2Ab de <i>Bacillus thuringiensis</i>	32
Cuadro 4.	Porcentaje de mortalidad, de inhibición de peso y de inhibición de desarrollo de larvas de <i>Spodoptera exigua</i> después de cinco días de exposición a distintas dosis de la δ - endotoxina de <i>Bacillus thuringiensis</i>	33
Cuadro 5.	Porcentaje de mortalidad, de inhibición de peso y de inhibición de desarrollo de larvas de <i>Spodoptera exigua</i> después de siete días de exposición a distintas dosis de la δ - endotoxina de <i>Bacillus thuringiensis</i>	36
Cuadro 6.	Larvas vivas de <i>Spodoptera exigua</i> a los siete días de exposición a diferentes concentraciones de la δ - endotoxina cry2Ab de <i>Bacillus thuringiensis</i>	38
Cuadro 7	Dosis de diagnóstico, análisis probit de la inhibición de peso y de inhibición de desarrollo al tercer instar de larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> y <i>Spodoptera exigua</i> por efecto de la δ - Endotoxina cry2Ab de <i>Bacillus thuringiensis</i>	40

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Diagrama. Proceso de activación y modo de acción de la toxina de <i>Bacillus thuringiensis</i>	19
Figura 2	Mapa. Localización del Valle del Yaqui, Sonora, México	21
Figura 3	Gráfica. Porcentaje de mortalidad de larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> después de cinco días de exposición a la δ - endotoxina cry2Ab de <i>Bacillus thuringiensis</i>	26
Figura 4	Gráfica. Porcentaje de Inhibición de peso de larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> después de cinco días de exposición a la δ - endotoxina cry2Ab de <i>Bacillus thuringiensis</i>	27
Figura 5	Gráfica. Porcentaje de inhibición de desarrollo de larvas al tercer ínstar de <i>Spodoptera frugiperda</i> después de cinco días de exposición a la δ - endotoxina cry2Ab de <i>Bacillus thuringiensis</i>	27
Figura 6	Fotografía. Larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> después de cinco días de exposición a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la δ - endotoxina cry2Ab de <i>Bacillus thuringiensis</i> en comparación con el testigo	28
Figura 7	Gráfica. Porcentaje de mortalidad de larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> después de siete días de exposición a la δ - endotoxina cry2Ab de <i>Bacillus thuringiensis</i>	30
Figura 8	Gráfica. Porcentaje de Inhibición de peso de larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> después de siete días de exposición a la δ - endotoxina cry2Ab de <i>Bacillus thuringiensis</i>	30
Figura 9	Gráfica. Porcentaje de inhibición de desarrollo de larvas al tercer ínstar de <i>Spodoptera frugiperda</i> después de siete días de exposición a la δ - endotoxina cry2Ab de <i>Bacillus thuringiensis</i>	31
Figura 10	Fotografía. Larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> después de siete días de exposición a 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la δ - endotoxina cry2Ab de <i>Bacillus thuringiensis</i> en comparación con el testigo	32
Figura 11	Gráfica. Porcentaje de mortalidad de larvas de <i>Spodoptera exigua</i> después de cinco días de exposición a la δ - endotoxina cry2Ab de <i>Bacillus thuringiensis</i>	34
Figura 12	Gráfica. Porcentaje de inhibición de peso larvas de <i>Spodoptera exigua</i> después de cinco días de exposición a la δ - endotoxina cry2Ab de <i>Bacillus thuringiensis</i>	34
Figura 13	Gráfica. Porcentaje de inhibición de desarrollo de larvas al tercer ínstar de <i>Spodoptera exigua</i> después de cinco días de exposición a la δ - endotoxina cry2Ab de <i>Bacillus thuringiensis</i>	35

Figura 14	Fotografía. Larvas de <i>Spodoptera exigua</i> después de cinco días de exposición a 0.5 µg/mL de la δ-endotoxina cry2Ab de <i>Bacillus thuringiensis</i> en comparación con el testigo	35
Figura 15	Gráfica. Porcentaje de mortalidad de larvas de <i>Spodoptera exigua</i> después de siete días de exposición a la δ- endotoxina cry2Ab de <i>Bacillus thuringiensis</i>	37
Figura 16	Gráfica. Porcentaje de inhibición de peso larvas de <i>Spodoptera exigua</i> después de siete días de exposición a la δ- endotoxina cry2Ab de <i>Bacillus thuringiensis</i>	37
Figura 17	Gráfica. Porcentaje de inhibición de desarrollo de larvas al tercer ínstar de <i>Spodoptera exigua</i> después de siete días de exposición a la δ- endotoxina cry2Ab de <i>Bacillus thuringiensis</i>	38
Figura 18	Fotografía. Larvas de <i>Spodoptera exigua</i> después de siete días de exposición a 15 µg/mL de la δ-endotoxina cry2Ab de <i>Bacillus thuringiensis</i> en comparación con el testigo	39

RESUMEN

La presente investigación contribuye a la generación de las líneas base de respuesta de poblaciones susceptibles de gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) y gusano soldado *Spodoptera exigua* (Hübner) a la δ -endotoxina cry2Ab de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) en nuestro país, que desde 1996 se ha visto envuelto con el uso de los cultivos transgénicos. La posibilidad de generación de resistencia hacia las δ -endotoxinas ha obligado a evaluar la susceptibilidad de las plagas objetivo. Sin embargo, ésta información se ha enfocado principalmente en monitoreo con la δ -endotoxina cry1Ac en gusano bellotero *Helicoverpa zea* (Boddie) y gusano tabacalero *Heliothis virescens* (Fabricius). La reciente introducción de la δ -endotoxina cry2Ab a cultivos como el algodónero y maíz involucran directa e indirectamente la exposición de *S. frugiperda* y *S. exigua*, por ello la importancia de la aportación de éste trabajo. El método utilizado para los bioensayos fue el de contaminación de dieta artificial con diferentes concentraciones de cry2Ab suspendida en una solución de agar al 0.2%, incubando las larvas expuestas en cámaras a 26° C de temperatura, 60% de humedad relativa y 12:12 horas de luz:oscuridad por 5 y 7 días para cada especie (5 y 7 dde). Se hicieron 4 repeticiones en el tiempo. Se encontró baja mortalidad de larvas tanto para *S. frugiperda* como para *S. exigua*, por lo que no se pudo calcular la línea de respuesta Log concentración-mortalidad en ninguno de los casos. Aunque la mortalidad fue baja, se presentaron altos porcentajes de inhibición de peso (IP) de larvas en comparación con los testigos y de inhibición del desarrollo de larvas al tercer ínstar (ID). Se calcularon las IP₅₀ e IP₉₅ y las ID₅₀ e ID₉₅ que se definen como la concentración que inhibió en un 50 y 95% el peso y la formación de larvas al tercer ínstar. de la población tratada. Se obtuvieron además las dosis de diagnóstico (DD) para ambas especies, tomando como criterio a aquella concentración que inhibe en un cien por ciento el desarrollo de larvas del tercer ínstar. Para *S. frugiperda* a los 5 dde los valores de IP₅₀ e IP₉₅ fueron de 0.06 y 6.5 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, mientras que el valor de ID₅₀ fue 0.13 $\mu\text{g/mL}$ e ID₉₅ de 5.2 $\mu\text{g/mL}$. A los 7 dde la IP₅₀ fue de 0.1 $\mu\text{g/mL}$ y la IP₉₅ de 5.4 $\mu\text{g/mL}$, la ID₅₀ fue de 1.1 y la ID₉₅ de 19.6 $\mu\text{g/mL}$. *S. exigua* a los 5 dde tuvo una IP₅₀ de 0.05 $\mu\text{g/mL}$ e IP₉₅ de 3.6 $\mu\text{g/mL}$, la ID₅₀ fue de 0.035 $\mu\text{g/mL}$ y el valor de ID₉₅ fue 0.19 $\mu\text{g/mL}$ mientras que a los 7 dde la IP₅₀ fue de 0.05 $\mu\text{g/mL}$, la IP₉₅ de 3.7 $\mu\text{g/mL}$, la ID₅₀ tuvo un valor de 0.55 $\mu\text{g/mL}$ y la ID₉₅ fue de 14.1 $\mu\text{g/mL}$. La DD de *S. frugiperda* fue de 5 $\mu\text{g/mL}$ mientras que para *S. exigua* fue de 0.05 $\mu\text{g/mL}$, siendo ésta más susceptible a cry2Ab que la primera. Cinco días de exposición a la toxina es el mejor tiempo para la evaluación de cry2Ab en estas especies. Las líneas base de respuesta y las dosis de diagnóstico obtenidas son una referencia para futuras investigaciones en estas y otras poblaciones de *S. frugiperda* y *S. exigua*.

1. INTRODUCCIÓN

El combate de plagas agrícolas con insecticidas convencionales es severamente limitado por la resistencia que han desarrollado los insectos, provocando un incremento en el número de aplicaciones de insecticidas, y por consiguiente un aumento en la emisión de contaminantes al ambiente, eliminación de enemigos naturales y altos costos de producción. Debido a lo anterior, se han buscado nuevas alternativas de control, entre las que resaltan el uso racional de insecticidas de bajo impacto al ambiente y a la salud humana, como las δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) (Rodríguez 1997; Akin *et al.* 2001; Aguilar 2002).

El efecto insecticida de la bacteria *B. thuringiensis* sobre larvas de algunas especies de lepidópteros, coleópteros y dípteros se conoce desde hace más de 100 años (Tanada y Kaya 1993). Por décadas, distintas formulaciones de esta bacteria se han utilizado como bioinsecticidas para el control de varias especies de insectos de importancia agrícola (Stone y Sims 1993; Sivasupramaniam *et al.* 2001). Sin embargo, su baja e impredecible efectividad como bioinsecticida provocó que su uso no fuera importante (Luttrell 1992; Aguilar 2002).

Con la reciente introducción de cultivos transgénicos que expresan las δ -endotoxinas de *B. thuringiensis* y su actual uso extensivo, se ha iniciado una nueva era en el control de plagas y con ello el riesgo del desarrollo de resistencia a dichas toxinas (Stone y Sims 1993; Sims *et al.* 1996; Burd *et al.* 2000; Nava e Ibarra 2000; Siegfried *et al.* (2000); Moulton y Dennehy 2001).

Para detectar el posible desarrollo de la resistencia a *B. thuringiensis* en el campo, es conveniente diseñar y aplicar estrategias de manejo. Dentro de este esquema, la evaluación periódica constituye un elemento esencial en la detección, en etapas tempranas, de fenotipos resistentes (Siegfried *et al.* (2000); Sims *et al.* 1996). Actualmente existen programas para medir cambios en la susceptibilidad a las δ -endotoxinas de *B. thuringiensis* (Stone y Sims 1993; Sims *et al.* 1996; Sumerford y Solomon 1999).

Desde la introducción en 1996, del algodónero Bollgard[®] (Monsanto Co.), que expresa la δ -endotoxina de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, cry1Ac, la investigación se ha enfocado básicamente a la evaluación de la respuesta de poblaciones de gusano tabacalero *Heliothis virescens* (Fabricius) y gusano bellotero *Helicoverpa zea* (Boddie) (Ashfaq y Young 1999; Akin

et al. 2001; Martínez *et al.* 2001; Aguilar 2002). Sin embargo, durante este periodo los agricultores e investigadores han observado un bajo control sobre gusano soldado *Spodoptera exigua* (Hübner) y gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Adamczyk *et al.* 2001; Akin *et al.* 2001; Sivasupramaniam *et al.* 2001). Para resolver este problema, se ha adicionado también la δ -endotoxina cry2Ab a plantas de algodónero *Gossypium hirsutum* Linneaus (Ashfaq y Young 1999; Akin *et al.* 2001; Adamczyk *et al.* 2001) y maíz *Zea mays* Linneaus.

Se tiene documentada la respuesta de poblaciones de *H. virescens*, *He. zea* y *S. exigua* a la toxina cry1Ac y poca información se tiene de la respuesta con cry2Ab. Ya que la δ -endotoxina cry2Ab es de uso reciente en México, es necesario desarrollar protocolos de investigación para conocer los niveles iniciales de susceptibilidad en *S. frugiperda* y *S. exigua*.

2. ANTECEDENTES

En 1993, Stone y Sims sugieren que por el uso extensivo de *Bacillus thuringiensis* como bioinsecticida es necesario implementar estrategias de manejo de resistencia para detectar posibles cambios en la susceptibilidad de las plagas objetivo a esta bacteria, por lo que es necesario establecer la línea base de respuesta. Para ello, alimentaron en dieta artificial contaminada con δ -endotoxina cry1Ac purificada de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* a larvas recién emergidas (L1) de diversas poblaciones de *Heliothis virescens* y *Helicoverpa zea* y evaluaron a los 7 días. Encontraron que, para la δ -endotoxina cry1Ac purificada, las concentraciones letales medias (LC₅₀) en *H. virescens* variaron de 0.04 a 0.32 $\mu\text{g/mL}$, mientras que para *He. zea* la LC₅₀ varió de 0.45 a 7.4 $\mu\text{g/mL}$, ellos sugieren que esta diferencia de susceptibilidad entre las especies se debe a que *He. zea* tiene un mayor rango de hospederas y por consecuencia tiene un mayor número de enzimas detoxificadoras, lo que le provee de mayor tolerancia a la δ -endotoxina de *B. thuringiensis*. Además observaron gran variabilidad de respuesta en las diferentes poblaciones tratadas, tanto en *H. virescens* como en *He. zea*.

En 1996, Sims *et al.* sugieren también que, el uso extensivo de cultivos que expresan la toxina de *B. thuringiensis* durante todo el ciclo, puede incrementar el riesgo de desarrollo de resistencia a las δ -endotoxinas, por lo que es importante implementar estrategias de manejo que permitan detectar a tiempo la presencia de fenotipos resistentes, un componente de las estrategias es una efectiva evaluación de la resistencia y ésta se determina generalmente calculando las dosis letales cincuenta (LD₅₀) pero la respuesta a las δ -endotoxinas de *B. thuringiensis* sobre mortalidad en las plagas objetivo es ambiguo, por lo que ellos compararon la respuesta sobre mortalidad e inhibición del desarrollo larval. Mezclaron proteína 63-kDa de cry1Ac purificada de *B. thuringiensis* en dieta estándar para lepidópteros, colocaron la mezcla en cada uno de los pocillos de una charola y confinaron larvas L1 de *H. virescens* y *He. zea* con una película plástica con micro ventilaciones, incubaron a 28° C y evaluaron a los 7 días el número de sobrevivientes, pesaron en grupos de 10 a 48 larvas y calcularon el peso promedio. Encontraron que para la proteína 63-kDa de cry1Ac purificada la LC₉₉ fue de 3.3 $\mu\text{g/mL}$ en *H. virescens* y de 6,661 $\mu\text{g/mL}$ para *He. zea*, mientras que la concentración efectiva que inhibe en un 99% el desarrollo larval (EC₉₉) fue de 0.058 $\mu\text{g/mL}$ para *H. virescens* y 28.8 $\mu\text{g/mL}$ para *He. zea*. Sugieren que debido a la alta variabilidad de respuesta en cuanto a mortalidad de las poblaciones de lepidópteros, calcular la LC₉₉ no es el parámetro más apropiado para detectar

fenotipos resistentes, en cambio calcular las concentraciones efectivas (EC_{99}) que inhiben el desarrollo larval es un parámetro más consistente para detectar cambios en la susceptibilidad, estas EC_{99} también previenen el desarrollo de larvas al tercer ínstar.

En 1999, Ashfaq y Young realizaron estudios con *Spodoptera exigua* para determinar el efecto de la δ -endotoxina cry1Ac expresada en algodoneos transgénicos, ya que se ha documentado que esta δ -endotoxina es menos efectiva sobre especies de spodóptera. Alimentaron larvas del primero, tercer y quinto ínstar con hojas de algodónero transgénico por 1, 2, 3, 4, y 7 días, cambiaron las hojas diariamente, transcurrido el tiempo de cada tratamiento se transfirieron los individuos sobrevivientes a dieta artificial libre de toxina y evaluaron número de larvas sobrevivientes, el tiempo en que llegaron de larva a pupa, y de pupa a adulto. Encontraron baja mortalidad en todos los instares tratados, el periodo larval se incrementó en el primer y tercer ínstar pero no en el quinto, el peso pupal disminuyó conforme aumentó el tiempo de exposición, hubo reducción de peso cuando se transfirieron las larvas de dieta no contaminada a hojas de algodónero transgénico, observaron también que al pasar larvas de las hojas de algodónero transgénico a dieta normal, éstas se recuperaron y desarrollaron mejor que aquellas que permanecieron hasta la formación de pupa en las hojas de algodónero transgénico. Estos datos indican que aunque la mortalidad es baja, no mas del 20.8% de mortalidad a los 7 días, hay un efecto adverso expresado en reducción de peso de pupas y aumento en el tiempo de desarrollo de las larvas.

En el año 2000, Siegfried *et al.* sugieren que el aumento en el uso de insecticidas derivados de *B. thuringiensis* está incrementando la intensidad de selección de poblaciones expuestas a las δ -endotoxinas, por lo que es necesario desarrollar efectivas estrategias de evaluación de la resistencia capaces de detectar a tiempo los cambios en la susceptibilidad. Resaltan que un paso inicial para la implementación de estas estrategias incluye el desarrollo de técnicas de bioensayo apropiados y el establecimiento de las líneas base de respuesta y que los datos obtenidos proveen a su vez de información para desarrollar bioensayos de diagnóstico que detecten más eficientemente poblaciones resistentes. Ellos establecieron la línea base de respuesta de varias poblaciones de *He. zea* a la δ -endotoxina cry1Ab de cultivos de algodónero y maíz transgénico que expresan cry1Ac y cry1Ab respectivamente. Confinaron por 7 días, larvas L1 de *He. zea* en recipientes de charolas de bioensayo que contenían dieta artificial cubierta por una capa de diferentes concentraciones de δ -endotoxina cry1Ab, evaluaron la mortalidad y la inhibición del desarrollo de las larvas. Encontraron que los valores de EC_{50}

variaron de 2.67 a 13.31 ng/cm² y las LC₅₀ variaron de 70.3 ng/cm² a 221.3 ng/cm²; los datos de inhibición de desarrollo fueron más sensibles que los de mortalidad.

En el 2001, Moulton y Dennehy consideran que el uso intensivo de algodoneos transgénicos no solo aumenta el riesgo del desarrollo de resistencia de las plagas principales a las δ -endotoxinas de *B. thuringiensis*, sino también las plagas secundarias están involucradas en este fenómeno como *S. exigua*. Ellos colocaron larvas L1 de diversas poblaciones de *S. exigua* en vasos con 5 g de dieta artificial tratada a diferentes concentraciones de δ -endotoxina cry1Ac entre 8 y 12 días y evaluaron el peso de las larvas; algunas poblaciones fueron seleccionadas en dieta contaminada con 1000 μ g de cry1Ac. Calcularon las I₅₀, tomando como criterio a aquella concentración que redujo el peso larval en un 50%. Encontraron que las I₅₀ de las diferentes poblaciones variaron de 0.0477 a 4.31 μ g de cry1Ac por gramo de dieta (μ g/g); una cepa tuvo una I₅₀ de 2.43 μ g/g antes de seleccionarla y llegó hasta 17.4 μ g/g después de la selección, demostrando que es posible que *S. exigua* desarrolle resistencia a esta toxina.

En el año 2001, Akin *et al.* resaltan que los algodoneos transgénicos que expresan sólo la δ -endotoxina cry1Ac (BOLLGARD[®]), controlan bien algunos lepidópteros como el complejo de belloteros, pero esta tecnología es poco efectiva contra otros lepidópteros, tales como el complejo de spodóptera, ante esto Monsanto Company desarrolló una nueva variedad de algodoneo que expresa dos toxinas de *B. thuringiensis* (BOLLGARD[®] II), insertando los genes que expresan tanto cry1Ac como cry2Ab. Ellos compararon la eficacia en campo de los algodoneos transgénicos comparados contra un algodoneo no transgénico, evaluando número de individuos del complejo de de belloteros e individuos de plagas secundarias (ocasionales), daño en terminales, bellotas, cuadros y semillas. Encontraron que no hubo diferencia significativa en cuanto a daño por complejo de belloteros en los algodoneos transgénicos pero si hay diferencia significativa con el algodoneo no transgénico; el algodoneo que expresa solo cry1Ac presentó una reducción del 79% de presencia de belloteros y 14% de reducción de presencia de de *S. frugiperda* mientras que el algodoneo que expresa las dos δ -endotoxinas presentó 96% de reducción de presencia tanto de belloteros como de *S. frugiperda*, ambos en comparación con el algodoneo no transgénico. Los datos sugieren que la inserción de la δ -endotoxina cry2Ab provee de mejor control contra un mayor rango de lepidópteros.

En México, Nava e Ibarra (2000) evaluaron el efecto de algodoneos transgénicos y no transgénicos sobre poblaciones de campo de *S. exigua* en la Comarca Lagunera, Coahuila.

Colectaron larvas de cultivos transgénicos y no transgénicos, las alimentaron en laboratorio con hojas del cultivo del que provenían hasta la etapa adulta, evaluaron el número de larvas sobrevivientes y el peso de larvas y pupas, así como la fecundidad. Encontraron que el porcentaje de larvas sobrevivientes expuestas a hojas libres de toxina fue del 76% mientras que, de las larvas expuestas a hojas con δ -endotoxina sobrevivieron solo el 26%, además los individuos expuestos a la δ -endotoxina en comparación con las no expuestas, presentaron reducción de peso en larvas y pupas así como reducción en la fecundidad cuando los progenitores fueron colectados y expuestos a algodoneos transgénicos. Los datos indican que los algodoneos transgénicos tienen un efecto negativo sobre el desarrollo, peso y fecundidad en *S. exigua*.

Martínez *et al.* (2001) Iniciaron desde 1997 bioensayos para obtener la línea base de respuesta en poblaciones mexicanas de *H. virescens* en el Valle del Yaqui, Sonora. Aplicaron 200 μ L de diferentes concentraciones de δ -endotoxina cry1Ac sobre un mililitro de dieta artificial contenida en cada uno de los recipientes de una charola para bioensayos, colocaron una larva L1 en cada recipiente y las confinaron con una película plástica con micro ventilaciones, a los 5 días evaluaron mortalidad, peso de larvas y larvas que alcanzaron el tercer instar. Encontraron que evaluar la mortalidad no es el parámetro mas adecuado para discriminar fenotipos resistentes, por lo que es mejor usar como dosis de diagnóstico (DD) a la concentración que previene el desarrollo de larvas al tercer instar, usando la concentración 0.05 μ g/mL como DD. Concluyen que las poblaciones evaluadas responden a esta concentración y no han sufrido cambios en la susceptibilidad a través del tiempo.

En el año 2002, Aguilar realizó bioensayos en diferentes poblaciones de *He. zea* de las zonas algodoneas del país. Añadió un mililitro de dieta artificial en cada uno de los recipientes de la charola para bioensayos, al solidificar la dieta aplicó 200 μ L de distintas concentraciones de δ -endotoxina cry1Ac, diluyó la toxina en solución agua-agar al 0.2%, colocó una larva recién emergida en cada recipiente y confinó con una película plástica con micro ventilaciones, incubó por 5 días en condiciones controladas ($27 \pm 1^\circ$ C, $70 \pm 5\%$ H. R. y 14 h luz:oscuridad), evaluó mortalidad, larvas desarrolladas al tercer instar y reducción de peso de larvas con respecto al testigo. El parámetro más representativo fue la inhibición del peso (IP). Encontró que las IP_{50} variaron de 0.002 a 0.005 μ g/mL mientras que las IP_{95} fluctuaron de 0.238 a 1.215 μ g/mL y que los límites de confianza se traslaparon en todos los casos, lo que indica que las poblaciones evaluadas presentan una susceptibilidad a cry1Ac similar y ésta no ha cambiado a través del

tiempo; sugiere que la variable mas indicada para evaluar la susceptibilidad a las δ -endotoxinas es la de IP.

En México, con la siembra extensiva de algodoneros que expresan la δ -endotoxina cry1Ac desde 1996, se ha evaluado la respuesta de poblaciones mexicanas de *H. virescens* y *He. zea* a esta δ -endotoxina, obteniendo las líneas bases y las dosis de diagnóstico, y sólo se conoce el efecto de cry1Ac en *S. exigua*, pero no se han obtenido líneas base de respuesta.

Con los recientes brotes de *S. exigua* y *S. frugiperda*, este año se introdujo la variedad de algodonoero que expresa tanto la δ -endotoxina cry1Ac como la cry2Ab (J. C. Rodríguez, Comunicación personal) debido a esto, estas plagas comenzaran a ser seleccionados con la δ -endotoxina cry2Ab. Por éste motivo, es importante conocer la susceptibilidad inicial a esta δ -endotoxina y la evolución de los cambios en dicha susceptibilidad. Por lo anterior, el presente trabajo, pretende iniciar la línea base de respuesta de *S. frugiperda* y *S. exigua* a la δ -endotoxina cry2Ab y obtener las dosis de diagnostico, por lo que se establecieron los siguientes objetivos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Determinar la susceptibilidad a la δ -endotoxina cry2Ab de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Berliner) en poblaciones de campo de gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) y gusano soldado *Spodoptera exigua* (Hübner) procedentes del Valle del Yaqui, Sonora.

3.2 Objetivos particulares

- a) Determinar la línea base de respuesta de *S. frugiperda* a la δ -endotoxina cry2Ab de *B. thuringiensis*, después de 5 y 7 días de exposición.
- b) Obtener las concentraciones que inhiben en 50 y 95 por ciento el peso (IP₅₀ e IP₉₅) y el desarrollo de larvas al tercer ínstar (ID₅₀ e ID₉₅) en *S. frugiperda* después de 5 y 7 días de exposición a la δ -endotoxina cry2Ab de *B. thuringiensis*.
- c) Obtener la dosis de diagnóstico de la δ -endotoxina cry2Ab de *B. thuringiensis* para *S. frugiperda*.
- d) Determinar la línea base de respuesta de *S. exigua* a la δ -endotoxina cry2Ab de *B. thuringiensis*, después de 5 y 7 días de exposición.
- e) Obtener las concentraciones que inhiben en 50 y 95 por ciento el peso (IP₅₀ e IP₉₅), y el desarrollo de larvas al tercer ínstar (ID₅₀ e ID₉₅) en *S. exigua* después de 5 y 7 días de exposición a la δ -endotoxina cry2Ab de *B. thuringiensis*.
- f) Obtener la dosis de diagnóstico de la δ -endotoxina cry2Ab de *B. thuringiensis* para *S. exigua*.

4. BIOLOGÍA DE ORGANISMOS

4.1 *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)

4.1.1 Ciclo de vida

S. frugiperda es un artrópodo de la clase Hexapoda, orden Lepidóptera y familia Noctuidae (Metcalf y Flint 1965; Borror y DeLong 1971; Coronado y Márquez 1994), también conocido con el nombre vulgar de gusano cogollero. El adulto es una palomilla de color café grisáceo con una mancha clara en medio de las alas anteriores, miden de 2 a 3 cm de largo y de 3 a 3.5 cm de expansión alar, las alas anteriores son ligeramente mas pequeñas y de un color más claro. Las hembras pueden variar de un color gris a café con manchas claras; los machos poseen varias manchas claras en las alas anteriores. Durante el día se puede encontrar al adulto en el verticilo o cogollo de las plantas de maíz o en las grietas del suelo. Las hembras depositan varias masas de huevecillos. En toda su vida, cada hembra puede depositar hasta 1,000 huevecillos en masas de 40 a 300 generalmente en el envés de las hojas (Pacheco 1985, 1994).

Los huevecillos son esféricos color verde aperlado y están cubiertos por pelillos o escamas de color gris rosáceo del abdomen de la propia hembra. Los huevecillos desarrollados son color café claro y la larva emerge a los 4 ó 5 días después de la oviposición (Pacheco 1985, 1994).

Las larvas recién emergidas son de color amarillento o verde claro con la cabeza y el escudo pronotal muy oscuro y brillante. En el inicio de su desarrollo son de hábitos gregarios y el área foliar que consumen es pequeña; al poco tiempo se dispersan y se establecen en el cogollo. El canibalismo es común, por lo que no es frecuente encontrar más de una larva desarrollada por cogollo. Al alcanzar estadios mayores, las larvas pueden medir hasta 3.5 cm de longitud, toman un color café grisáceo o verdoso con tres bandas longitudinales más claras, la cutícula está cubierta por gránulos microscópicos. Los pináculos setíferos dorsales son de color negro y en el último segmento abdominal se observan 4 puntos negros en forma de cuadro (Pacheco 1985, 1994).

Después de pasar por 6 estadios, la larva migra al suelo donde se entierra para pupar. Ésta pupa mide entre 1.8 y 2.0 cm y es de color café rojizo. El adulto emerge luego de unos 7 días de formada la pupa (Anónimo 1983; Pacheco 1985, 1994)

4.1.2 Importancia

S. frugiperda es una de las plagas más importantes del maíz en México y en las regiones tropicales y subtropicales de América. Está ampliamente distribuido y se ha observado causando daños en los estados de Baja California Norte y Sur, Sonora, Sinaloa, Nayarit, Michoacán, Chihuahua, Durango, San Luis Potosí, Guanajuato, Tamaulipas, Hidalgo, Puebla, Estado de México, Guerrero, Veracruz, Oaxaca, Chiapas (Pacheco 1985).

Además del maíz, puede afectar a otros cultivos como sorgo, arroz, frijol, papa, cebolla, pepino, col, camote, cacahuate, soya y algodónero (Metcalf y Flint 1965; Sánchez *et al.* 1982). En Sinaloa se le ha observado como trozador de tallos en chile Bell Pepper y atacando frutos de berenjena (Gastélum 1999)

En maíz, causa daños al cultivo en su etapa larval y se puede presentar desde la emergencia de la planta hasta la etapa de floración. Se caracteriza por atacar el cogollo y frutos (elotes), también puede atacar como barrenador del tallo en las plantas pequeñas, causando la muerte del cogollo (Pacheco 1985).

Los primeros estadios larvales se alimentan de las hojas, sin romper el parénquima, causando "descarnaduras", dando la apariencia de orificios. Si el ataque ocurre al inicio del ciclo vegetativo, las plantas pueden morir; en estadios larvales más avanzados pueden cortar el tallo a nivel del suelo. Si las infestaciones son severas, las larvas pueden barrenar la mazorca, destruyendo los granos y favoreciendo la entrada de otros insectos y/o patógenos oportunistas. En nuestro país, se han registrado pérdidas de hasta el 60% (Pacheco 1994; Gastélum 1999).

4.1.3 Manejo

El manejo de esta plaga puede ser a través de a) prácticas culturales, b) control químico y c) enemigos naturales

a) Prácticas culturales

Con la labranza se logra exponer a las pupas a la acción del ambiente y enemigos naturales o quedar más enterradas de lo normal y evitar la emergencia de los adultos. También disminuye el número de pupas con la siembra de plantas a altas densidades y riegos pesados cuando la planta lo requiere. Se recomienda evitar el desarrollo de malezas que pueden ser hospederas

temporales. Además, la fertilización con amoníaco anhidro y polisulfuro de calcio disminuyen las infestaciones de ésta plaga (Gastélum, 1999).

b) Control Químico

Para detectar la plaga a tiempo, es recomendable muestrear el cultivo en sus etapas iniciales, sobretodo donde la incidencia de la plaga es alta. Se ha determinado que el control de *S. frugiperda* después del cuarto estadio es antieconómico (Pacheco 1994).

De los insecticidas autorizados por la Comisión Intersecretarial para el Control del proceso y uso de Plaguicidas Fertilizantes y Sustancias Tóxicas (CICOPLAFEST) para el control de esta plaga están: alfa-cipermetrina, azadiractina, *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, beta-cipermetrina, carbarilo, carbofurán, cipermetrina, clorpirifós etílico, cyflutrín, deltametrina, diazinón, diflubenzurón, endosulfán, fenvalerato, forato, lambda-cyhalotrina, metomilo, metoxifonozide, tiodicarb, triclorfón, zeta- cipermetrina, triclorfón y paratión metílico (Anónimo 1999). Cabe señalar que el manejo de insecticidas varía de región a región y cada una tiene sus propias recomendaciones.

c) Enemigos naturales

De los enemigos naturales que controlan esta plaga existen tres tipos: 1) Los depredadores entre los que destacan las crisopas, las cinchas piratas, chinches ojonas y chinche nabis (Metcalf y Flint 1965, Machain 1975, Pacheco 1985, Gastélum 1999). 2) Los parasitoides entre los que destacan las avispas de *Trichogramma* spp, algunos taquinidos e incluso algunos nemátodos (Metcalf y Flint 1965; Machain 1975; Pacheco 1985, 1994; Tanada y Kaya 1993; Gastélum 1999) y 3) Los patógenos, entre ellos están los virus de la poliedrosis, algunos hongos entomopatógenos y la bacteria *B. thuringiensis* (Tanada y Kaya 1993).

4.2 *Zea mays* L.

El maíz o *Zea mays* L., es el cultivo con mayores usos a todos niveles; desde alimento básico humano, como forraje animal, materia prima en la industria de la transformación de la que se obtienen almidón, aceite, proteínas, edulcorantes e incluso combustible (Reyes 1990).

Z. mays es una Tracheophyta de la clase Angiosperma, subclase Monocotiledoneae y Orden Graminales. A nivel nacional es el cultivo de mayor importancia, según datos del Servicio de Información Estadística Agroalimentaria y Pesca (SIAP) en el año 2001 se sembraron en nuestro país 6, 880,740 hectáreas y 7, 172,659 hectáreas en el 2002; en el estado de Sonora se sembraron casi 40,000 hectáreas en los ciclos primavera- verano y otoño-invierno en el año 2002 (SIAP 2003).

Esta planta presenta una raíz pivotante con tallo erecto formado por nudos y entrenudos; las hojas son largas y angostas con venación paralelinerve, tiene flores estaminadas y pistiladas; el fruto desde el punto de vista botánico es carióspside, el término agrícola es semilla. Es una planta anual con un manejo tan variado como razas o variedades existen; las hay desde muy precoces (80 días de siembra a cosecha) hasta muy tardías (200 días). Es sensible a temperaturas bajas por tiempo prolongado y requiere de buena cantidad de agua, desarrollándose mejor en suelos francos que permitan el buen desarrollo de la raíz y la absorción de nutrientes (Reyes 1990; Ortega *et al.* 1999).

Durante la floración las temperaturas elevadas, el estrés hídrico, la salinidad, la compactación del suelo y el pH alcalino tanto del suelo como del agua, son factores que disminuyen la producción de maíz. La falta de agua retrasa el desarrollo vegetativo de la planta, del jilote y la emisión de estigmas, provocando asincronía floral, aborto de embriones y una polinización baja, lo que en consecuencia baja la producción de grano. Cuando se le provee de agua suficiente al cultivo, no hay efectos negativos aún cuando las temperaturas alcancen los 28 a 35° C. Por arriba de los 35° C, la viabilidad del polen se reduce drásticamente, especialmente en híbridos no adaptados a las altas temperaturas, las cuáles acortan el ciclo del cultivo, provocando que los rendimientos se reduzcan. El maíz puede desarrollarse a temperaturas que fluctúan entre 8 y 38° C; siendo la ideal una temperatura de alrededor de los 25° C (Ortega *et al.* 1999).

Aunado a los factores abióticos que afectan su desarrollo, existen factores bióticos como la maleza, las plagas y patologías causadas por hongos y bacterias. El maíz es severamente atacado por diversos insectos en todas sus etapas y estructuras (raíz, tallo, hojas, flores y frutos). Del complejo de plagas, la mas importante en México es *S. frugiperda*; además de ésta, se encuentran *Phyllophaga spp*, *Diabrotica spp*, *Agrotis sp*, *He. zea*, *Diatraea grandiosella* Dyar, *Rhopalosiphum maidis* (Fitch) *Tetranychus sp* y varias especies de trips como *Caliothrips phaseoli* (Hood) (Félix 1984; Anónimo 2000).

4.3 *Spodoptera exigua* (Hübner)

4.3.1 Ciclo de vida

Esta plaga al igual que *S. frugiperda*, es un artrópodo de la clase Hexapoda, Orden Lepidóptera, familia Noctuidae (Metcalf y Flint 1965; Borror y DeLong 1971; Coronado y Márquez 1994) y se le conoce vulgarmente como gusano soldado. Las palomillas son de color café grisáceo y miden alrededor de 1.5 cm con una expansión alar de 3.2 cm. Las alas anteriores son de color café con una mancha circular pálida o naranja cerca del centro; las alas posteriores son blancas con venación café. La hembra oviposita unos 500 a 600 huevecillos sobre las hojas en masas de 50 a 150 cada grupo (Pacheco 1985, 1994) y los cubre con escamas de su propio cuerpo (Rude y Kelly 1984).

Las larvas emergen al cabo de 3 a 5 días (Hogg y Gutiérrez 1980; Pacheco 1994). En los primeros estadios se alimentan en forma gregaria de las hojas y forman una telaraña de seda, luego se dispersan a otras plantas. Pasan por 5 estadios larvales, las larvas de estadios iniciales son de color verde claro con la cabeza negra, los estadios más avanzados pueden alcanzar hasta 2.5 cm de largo, presentan tonalidades del gris-verdoso al verde-olivo, eventualmente se tornan casi negras, poseen bandas laterales a lo largo del cuerpo y pueden tener bandas delgadas de color claro en el dorso así como una banda muy oscura a la altura de los espiráculos, la cuál está limitada por consistentes bandas claras angostas. Generalmente tienen un punto negro a cada lado del cuerpo, arriba del segundo par de patas verdaderas; el periodo larvario dura entre 10 y 16 días (Machain 1975; Rude y Kelly 1984; Pacheco 1994).

La pupa se forma en el suelo en un capullo de seda muy suelto. Las pupas son de color café y el adulto emerge al cabo de 6 a 7 días (Rude y Kelly 1984; Pacheco 1985, 1994). Hogg y Gutiérrez (1980), documentan que un ciclo completo ocurre en 490 días grado con un umbral de desarrollo de 12.2° C.

4.3.2 Importancia

Esta especie tiene una distribución mundial con un amplio rango de hospederos. Se le ha documentado como plaga en cultivos de algodón, ajonjolí, cártamo, linaza, soya, cacahuate y girasol (Pacheco 1994). En México, es común en Sonora y Baja California; en el Valle del

Yaqui, ataca cultivos como ajonjolí, frijoli, melón, sandía, zacate forrajero, pastizales y alfalfa (Machain 1975; Pacheco 1985); además de los cultivos de cebolla, col, coliflor, chícharo, chile, espárrago, tomate, lechuga, papa, pepino, arroz, alfalfa, entre otros (Lagunes *et al.* 1994).

La importancia de ésta plaga estriba en su habilidad para desarrollar altas densidades de población, en especial en regiones del trópico húmedo y una gran resistencia a insecticidas (Pacheco 1985; Hernández *et al.* 1988; Martínez *et al.* 2002).

Las larvas de *S. exigua*, son voraces y pueden destruir las plántulas de algodónero completamente, llegando a ser un gran problema en la post-emergencia. Las larvas pequeñas se alimentan de la cutícula de las hojas, dejando visible la venación (esqueletonización). Las larvas de estadios avanzados comen de manera irregular en las hojas y pueden llegar a dañar el botón floral o cuadro, flores y bellotas, retrasando la fructificación. El daño causado a las bellotas difiere al daño que causa *H. virescens*, pues el gusano soldado se asocia más al daño de las brácteas, follaje y daño en el tercio superior de la bellota, en comparación a *H. virescens* que daña la base de la misma (Rude y Kelly 1984; Martínez *et al.* 2002).

4.3.3 Manejo

Igual que con *S. frugiperda*, para su control se recurre principalmente a tres tipos de manejos: a) prácticas culturales, b) control químico y c) enemigos naturales (Hernández *et al.* 1988; Martínez *et al.* 2002).

a) Prácticas culturales.

La labranza permite exponer las pupas del suelo a la intemperie y a depredadores, también, eliminar la maleza hospedera reduce drásticamente su población.

b) Control Químico

Esta plaga se puede controlar químicamente con varios insecticidas, pero este manejo debe realizarse sólo cuando los umbrales económicos de daño lo indiquen ya que esta plaga desarrolla resistencia rápidamente. Los insecticidas autorizados por la CICOPAFEST en algodónero son el acefate, azadiractina, *Bacillus thuringiensis*, bifentrina, cipermetrina, clorfenapir, clorpirifós etílico, cyflutrín, diflubenzurón, esfenvalerato, fenvalerato, hexaflumurón, lambda-cyhalotrina, metamidofós, metomilo, monocrotofós, methoxifonozide, permetrina,

profenofós, spinosad, sulprofós, tebuconazole, thiodicarb, triazofós, triclorfón, carbarilo + permetrina y profenofós + cipermetrina (Anónimo 1999) Al igual que para *S. frugiperda*, cada región tiene sus recomendaciones específicas y momento de aplicación. En el Valle del Yaqui, clorpirifós es un producto efectivo contra esta plaga, otros productos como spinosad y benzoato de emamectina también son recomendados (Martínez *et al.* 2002).

c) Enemigos naturales

S. exigua tiene muchos enemigos naturales, muchos de los depredadores, ectoparasitoides y patógenos documentados para *S. frugiperda* también atacan de manera natural a *S. exigua*.

Las infestaciones iniciales en plantas pequeñas son generalmente controladas por depredadores, entre los más comunes se encuentran las crisopas y la chinche ojona (Machain 1975; Pacheco 1994).

De entre los ectoparasitoides se encuentran las avispidas, algunos taquínidos que suelen parasitar en cierta medida a larvas de *S. exigua*, también algunas moscas como *Bonnetia compta* (Fall.) y *Mermis nigrensces* (Duj) (Rude y Kelly 1984; Pacheco 1985, 1994). Entre los patógenos más comunes están los virus de la poliedrosis y la bacteria *B. thuringiensis* (Tanada y Kaya 1993).

4.4 *Gossypium hirsutum* L.

El algodónero o *Gossypium hirsutum* L. es una planta Tracheophyta, de la clase Angiosperma, subclase Dicotiledoneae y Orden Malvales. Se le clasifica por su uso como una planta (textil) de fibra suave siendo ésta la más importante del mundo; también se le clasifica como una oleaginosa ya que de la semilla se extraen aceites de alta calidad para consumo humano, además, se usa la pasta de la semilla para alimentación animal (Battenberg 1969; Sánchez *et al.* 1982).

La siembra de esta cultivo en nuestro país es afectada por la caída del precio internacional de esta fibra, además de los altos costos de producción, incluidos los costos por combate de plagas (Martínez *et al.* 2002). En el año 2002 se sembraron en nuestro país 40,483 hectáreas (SIAP 2003).

La raíz es pivotante, el tallo principal es erecto y está integrado por nudos y entrenudos, tiene ramas vegetativas y fructíferas. Las ramas vegetativas son monopodiales y las fructíferas simpodiales. Las hojas básicamente se constituyen por pecíolo y limbo, éste último generalmente tiene 5 lóbulos y varía el color, textura, y pubescencia entre especies.

La flor es completa (verticilos, cáliz, corola, androceo y gineceo) pedicelada y con brácteas. El fruto es una cápsula esférica u ovoide, al madurar se abre y emerge la fibra. Al conjunto de brácteas y flor se le denomina comúnmente como "cuadro", "papalote" o "gallito" y al fruto o cápsula "bellota" o "bola", cuando la bellota se deshidrata emerge la fibra de las semillas, y se le denomina "capullo". Las semillas son de color marrón oscuro o negro (Battenberg 1969; Sánchez *et al.* 1982; Rojano 1998).

Esta planta puede cultivarse en diversos tipos de suelos, pero se desarrolla mejor en suelos profundos, bien aireados, que no estanquen el agua y con buenos niveles de materia orgánica; el pH óptimo es de entre 5.1 y 7.0, puede cultivársele desde 0 hasta a mas de 1000 metros sobre el nivel medio del mar (msnmm), el algodnero tiene un umbral mínimo de desarrollo de 12.8° C y 30° C máximo, fuera de estos rangos se tiene una tasa cero de desarrollo (Martínez *et al.* 2002).

Además de los factores abióticos que afectan el desarrollo de este cultivo, están los bióticos, entre los que destacan: las enfermedades causadas por patógenos, la maleza y las plagas.

Existe un gran número de insectos que afectan al algodnero; las principales plagas son el picudo del algodnero *Anthonomus grandis* Boheman, el gusano tabacalero *H. virescens*, el gusano bellotero *He. zea* (complejo de belloteros) y gusano soldado *S. exigua* (Hübner); ésta última aparece sobre todo cuando se han suprimido los insectos benéficos. Rara vez se puede presentar el gusano cogollero *S. frugiperda*; además están el gusano trozador *Agrotis ipsilon* (Hufnagel), *Lygus hesperus* Knighth, *Bemisia argentifolii* Perring & Bellows, *Aphis gossypii* Glovery y las chicharritas del género *Empoasca* (Sánchez *et al.* 1982; Rude y Kelly 1984; Martínez *et al.* 2002).

Aunque a *S. exigua* se le considera un plaga secundaria en el algodnero, en 1996 y 1997 se presentó como un problema importante en las zonas algodneras del norte de Sonora, como Caborca, y el Valle de Guaymas (Martínez *et al.* 2002).

4.5 *Bacillus thuringiensis* (Berliner)

Bacillus thuringiensis es una bacteria con propiedades insecticidas contra plagas de importancia médica, veterinaria, agrícola, forestal y de granos almacenados. Se conocen variedades con propiedades insecticidas específicas como *B. thuringiensis* var. *israelensis* que es efectiva contra larvas de mosquitos y simúlidos; *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* contra coleópteros; y *B. thuringiensis* var. *kurstaki* contra larvas de varias especies de lepidópteros, como por ejemplo, *H. virescens*, *He. zea*, *S. exigua*, *S. frugiperda* y *Trichoplusia ni* (Hübner) (Tanada y Kaya 1993).

Esta bacteria pertenece a la familia Bacillaceae, habita en el suelo, es gram-positiva y produce uno o varios cuerpos parasporales o cristales proteínicos (endosporas) en la célula esporangial, también llamados inclusiones cristalinas o cristaloides. En la mayoría de los casos, la proteína cristalina es una protoxina, por lo que llamar al cristal proteico como δ - endotoxina es incorrecto, en realidad la δ - endotoxina está contenida en las protoxinas (proteínas cristalinas), ésta fue la primera toxina detectada en *B. thuringiensis* y es la mas estudiada de todas las toxinas entomocidas.

Los cristales tienen varias formas y tamaños; el tamaño varía en función del número de cristales que se formen en cada esporangio. La mayoría de las variedades que tienen efecto contra lepidópteros poseen un cristal bipiramidal. En la variedad *kurstaki* existen cristales bipiramidales que tienen efecto sobre lepidópteros y cristales ovoides que tienen efecto contra lepidópteros y dípteros. En otras variedades estos cristales pueden ser triangulares, cuboidales, aplanados, en forma de barra, o amorfos (Tanada y Kaya 1993). En la variedad *israelensis* los cuerpos parasporales son esferoidales.

Los genes que codifican para la formación de los cristales proteicos son muchos; la mayoría de ellos se localizan en plásmidos; en algunas variedades dichos genes se encuentran tanto en los plásmidos como en el cromosoma bacteriano. Cada variedad de *B. thuringiensis* puede tener un número diverso de plásmidos responsables de la síntesis de protoxinas; éstos plásmidos portan varios genes (genes Cry) a veces idénticos. Además, *B. thuringiensis* puede tener diferentes transposones que contribuyen a aumentar la diversidad genética de estos cristales (Devidas 1992).

No hay uniformidad en cuanto a la nomenclatura y clasificación de los genes Cry. Basándose en la especificidad tóxica de la estructura primaria de las proteínas, se han establecido 4 clases de genes, los genes Cry I, son específicos contra lepidópteros, los Cry II, para dípteros y

lepidópteros, Los Cry III, para coleópteros específicamente y los genes Cry IV, para dípteros (Tanada y Kaya 1993; Gastélum 2001). Devidas (1992) documenta un grupo más con efectos contra nemátodos (genes Cry VI). Por otra parte, se les han asignado "patotipos" según su espectro de hospederos. El patotipo A incluye especies patógenas de lepidópteros; el patotipo B contiene a los patógenos de dípteros y aquellos que tienen efectos sobre coleópteros pertenecen al patotipo C.

Por otro lado existen controversias con aquellas bacterias de la variedad *kurstaki* que produce dos tipos de toxinas, una de ellas con efecto en lepidópteros y la otra en dípteros. Por ello se han seleccionado a algunas variedades de *B. thuringiensis* como referencias estándar, así la variedad *kurstaki* y *aizawai* controlan lepidópteros, la variedad *israelensis* controlan larvas de dípteros acuáticos, la variedad *berliner* actúa contra larvas de la palomilla de la cera y la variedad *tenebrionis* es efectivo contra larvas de coleópteros (Devidas 1992; Tanada y Kaya 1993).

Las variedades de *B. thuringiensis* que se han utilizado en formulaciones comerciales pertenecen las variedades *thuringiensis*, *dendrolimus*, *galleriae*, *israelensis*, *aizawai* y *kurstaki*, de ésta última variedad se obtienen las toxinas cry2Ab y cry1Ac que son insertados en cultivos como el maíz y algodón para el control, entre otras plagas, de *S. frugiperda* y *S. exigua* (Tanada y Kaya 1993; Voth.*et al.* 2001)

4.5.1 Activación, Efecto y Modos de Acción de las toxinas.

La activación de la proteína inicia al entrar en contacto con las enzimas del intestino medio del insecto que tiene un pH alcalino, mismo que es necesario para la disolución del cristal y la subsiguiente acción de las enzimas proteolíticas para activar la endotoxina (Devidas 1992).

La primera reacción patológica es la parálisis del intestino y las partes bucales. El efecto de la toxina ocurre en pocos minutos después de la ingestión; la larva puede experimentar "vómitos y diarreas", inhibiendo así el consumo de alimento, detienen su desarrollo y llegan a morir por inanición. Este proceso puede llevar algunos días o semanas (Devidas 1992; Tanada y Kaya 1993). Las larvas afectadas se alejan de los sitios comunes de alimentación a otras áreas del follaje donde se muestran más visibles, se mueven torpemente, cambian de color, mueren y se momifican (Gastélum 2001).

Se han propuesto varias teorías sobre el modo de acción de las toxinas de *B. thuringiensis*. Una sugiere el efecto de la toxina sobre la membrana celular, lo que ocasiona alteración de los gradientes eléctricos como incremento de iones K^+ y Na^+ en la hemolinfa, incremento en el pH hemolinfal y un decremento en el pH intestinal, modificación del transporte de iones en el intestino medio y un efecto en la regulación de iones en la membrana celular, inhibición de la bomba de K^+ , provocando un cambio en el pH intracelular, iones Ca^+ e incremento en el consumo de oxígeno. Con estas alteraciones se provoca una lisis celular (Devidas 1992; Tanada y Kaya 1993).

Otra teoría (Lisis osmótico- coloidal) sugiere que la toxina se une a los receptores de las células epiteliales del intestino medio creando poros en la membrana celular, propiciando un desequilibrio iónico por la penetración de iones K^+ , al alterarse la presión osmótica se produce una entrada excesiva de agua a las células y éstas se lisan, el pH baja por compensación con el pH hemolinfático. La alteración del pH lleva por consecuencia la proliferación de bacterias y el insecto muere por septicemia y daños en los tejidos (Devidas 1992; Tanada y Kaya 1993; Gastélum 2001) (Figura 3).

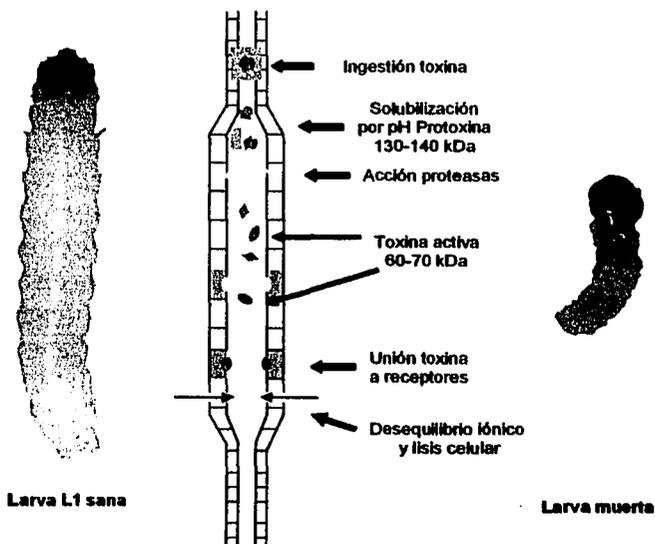


Figura 1. Proceso de activación y modo de acción de la toxina de *Bacillus thuringiensis*

5. ÁREA DE ESTUDIO.

5.1 Campo Experimental Valle del Yaqui (CEVY)

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Entomología del Valle del Yaqui (CEVY) en Cd. Obregón, Sonora. Este campo experimental es uno de los 83 Campos Experimentales que dependen del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) en México y es el más importante del Centro de Investigación Regional del Noroeste (CIRNO).

El CEVY se encuentra en la zona sur del estado de Sonora en el paralelo 27° 22' de latitud norte y a 109° 53' de longitud oeste, a una altura de 39 msnmm, ubicado en un lote de 100 hectáreas en el Valle del Yaqui, su actual extensión de 282,612 hectáreas con disponibilidad de riego es la más importante desde el punto de vista agrícola.

En el 80% del área del Valle predominan los climas muy seco cálido, seco muy cálido y semicálido en la zona costera y central, el otro 20% de la zona tiene climas semiseco muy cálido y semicálido, templado semicálido semihúmedo y templado subhúmedo en la zonas de mayor altitud y algunas cordilleras de la Sierra Madre Occidental. La temperatura mínima extrema es de -1.8° C y la máxima extrema 44.2° C. La precipitación promedio del año es de 280 mm, ocurriendo ésta durante el verano (junio – octubre).

Los suelos del Valle del Yaqui van desde el aluvión ligero, aluvión pesado, barrial profundo, barrial compactado y barrial pedregoso. El agua de riego utilizada en el Valle del Yaqui proviene de las presas sobre la cuenca del río Yaqui y de pozos profundos.

La superficie anual de siembra está condicionada a la disponibilidad de agua en el sistema de las presas del río Yaqui, en el ciclo otoño- invierno predomina el trigo, maíz y cártamo, en el ciclo primavera- verano, el algodón (Jiménez 1999).

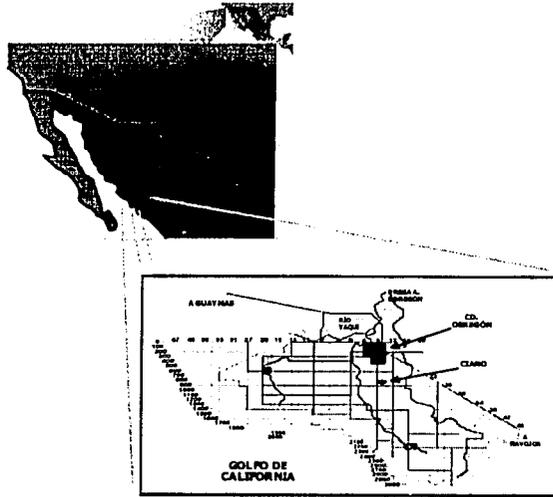


Figura 2. Mapa. Localización del Valle del Yaqui, Sonora, México.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material Biológico

La colonia de *Spodoptera frugiperda* se inició a partir de varias masas de huevecillos recolectados de un cultivo de maíz, el 30 de mayo del 2002 en el Valle del Yaqui. La colonia de *Spodoptera exigua* se inició de larvas que se recolectaron de un cultivo de garbanzo del Valle del Yaqui, en abril del mismo año. Las dos especies fueron criadas hasta su evaluación en el Laboratorio de Entomología del INIFAP en el Campo Experimental del Valle del Yaqui (CEVY), en Cd. Obregón, Sonora.

6.2 Crianza de Insectos

Los huevecillos de *S. frugiperda* se depositaron en un contenedor con dieta artificial (Anexo 1.4) para esperar la eclosión de los huevecillos y se mantuvieron en cámaras de crianza a una temperatura de 24° C, a 70% de humedad relativa (HR) y un período de 14:10 horas luz:oscuridad. Cuando las larvas emergieron y se desarrollaron hasta el segundo ínstar o larva 2 (L2) y/o tercer ínstar o larva 3 (L3), se pasaron a pequeños vasos de plástico con dieta artificial (Anexo 1.1 y 1.5) y en cada uno de ellos se colocaron de 3 a 4 larvas y se taparon. Los vasos se mantuvieron en la misma cámara de crianza antes mencionada.

Las larvas de *S. exigua* se depositaron directamente en los vasos de plástico con dieta artificial y se mantuvieron en una cámara de crianza a 20° C, 70% de humedad relativa y 14:10 horas luz:oscuridad. A ambas especies se les revisó periódicamente para cambiar la dieta. Este proceso se repitió hasta la obtención de las pupas.

Las pupas se colocaron en contenedores (Anexo 1.6) hasta la obtención de adultos. Conforme emergieron los adultos, se transfirieron, sin sexarlos, a contenedores para adultos y se les suministró agua azucarada al 10% (Anexo 1.2 y 1.3). En cada contenedor se colocaron aproximadamente 70 adultos de *S. frugiperda* y aproximadamente 100 adultos de *S. exigua*. A cada especie se le mantuvo en la cámara de crianza correspondiente.

Cada cuatro días se recolectaron los huevecillos y se repitió el método de crianza hasta la tercera generación para *S. frugiperda* y la quinta generación para *S. exigua*.

6.3 Toxina cry2Ab

La toxina utilizada para los bioensayos la proporcionó Monsanto Comercial S. A. de C. V. con una pureza es de 5.6 ± 0.4 mg/g de cry2Ab por peso (0.56%).

La toxina está incluida en tejido vegetal deshidratado de una planta de maíz transgénico.

6.4 Bioensayos

Se utilizó el método descrito por Sims *et al.* (1996) con algunas modificaciones. En cada uno de los recipientes contenidos en las charolas de bioensayo (Anexo 2.1) se colocó un mililitro de dieta artificial (Anexo 2.2) y se dejó enfriar; una vez que solidificó la dieta se agregaron en cada recipiente 200 μ L de la δ -endotoxina cry2Ab a la concentración deseada (Anexo 2.4, 2.5 y 2.6). La solución madre y las concentraciones se diluyeron con agar al 0.2% (Anexo 2.3).

Con la ayuda de un pincel se colocó una larva recién emergida (L1) en cada recipiente de las charolas (Anexo 2.7) y se confinaron con una película plástica adherente con micro ventilaciones. Las dosis evaluadas tanto para *S. frugiperda* como para *S. exigua*, fueron 20, 15, 10, 7.5, 5, 2.5, 1, 0.5, 0.1, 0.05 y 0.01 μ g/ mL de ingrediente activo de δ -endotoxina cry2Ab y un testigo (agar al 0.2%) paralelo al bioensayo. Se hicieron cuatro repeticiones en el tiempo, con un tamaño de muestra de 61 a 64 organismos tratados por cada dosis, para obtener entre 761 a 767 organismos tratados en cada uno de los cuatro bioensayos.

Las charolas con las larvas del bioensayo se mantuvieron en una cámara bajo condiciones controladas (26° C, 60% H. R. y 12:12 horas luz:oscuridad) hasta el día de la evaluación.

6.5 Evaluaciones

Las evaluaciones se realizaron a los 5 y 7 días después del inicio de la exposición de las larvas a la δ -endotoxina (5 y 7 dde). Se evaluó el porcentaje de mortalidad, el porcentaje de inhibición del peso (IP) respecto al testigo y el porcentaje de larvas que no alcanzaron el tercer instar (inhibición del desarrollo al tercer instar, ID).

6.6 Análisis estadísticos

El porcentaje de inhibición de peso y el porcentaje de inhibición de desarrollo al tercer ínstar se transformaron, para lograr normalidad, a la función arcoseno de la raíz cuadrada de la respuesta/100 y se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA, $\alpha=0.05$) y de significancias (Tukey $\alpha=0.05$) con el paquete Statistical Analysis System (SAS). Además, los mismos datos se sometieron a un análisis probit para obtener las líneas base de respuesta Log concentración- porcentaje de inhibición de peso y Log concentración- porcentaje de inhibición del desarrollo al tercer ínstar, para con ellas, calcular las IP_{50} e IP_{95} respectivamente, así como las ID_{50} e ID_{95} . También se determinaron las dosis de diagnóstico según Aguilar (2002) tomando como criterio a aquella dosis que inhibiera en un cien por ciento el desarrollo de larvas L3. Los datos de porcentaje de mortalidad se registraron pero no se analizaron estadísticamente debido a que los valores observados fueron bajos aún en las concentraciones altas de δ -endotoxina cry2Ab.

7. RESULTADOS

7.1 *Spodoptera frugiperda* después de cinco días exposición

El número de individuos de *S. frugiperda* tratados después de cinco días de exposición (5 dde), varió de 61 a 64 larvas. Esta variación se debió a la manipulación de las larvas, ya que por estática, las larvas se adherían a la película plástica en el momento de confinarlas. Esto ocurrió en todos los bioensayos.

La concentración 5 µg/mL presentó el mayor porcentaje de mortalidad con 18.8%, las concentraciones 15 y 20 µg/mL presentaron el 15.6% y las demás concentraciones no rebasaron 11.1% (Cuadro 1).

Las concentraciones de 5 a 20 µg/mL presentaron los porcentajes de inhibición de peso (IP) más altos, éstos fluctuaron entre 96.29 y 98.25%. Las concentraciones 0.1 a 20 µg/mL son significativamente diferentes al testigo, mientras que 0.01 y 0.05 µg/mL no son significativamente diferentes del testigo (Tukey $\alpha = 0.05$) (Cuadro 1).

A partir de la concentración 5 hasta 20 µg/mL se presentó un 100% de inhibición del desarrollo de larvas del tercer ínstar o L3 (ID), sin embargo, desde la concentración 2.5 µg/mL se obtuvo el 95.31% de ID. Todas las concentraciones son significativamente diferentes del testigo a excepción de la concentración 0.01 µg/mL. (Tukey $\alpha = 0.05$) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Porcentajes de mortalidad, de inhibición de peso y de inhibición del desarrollo de larvas de *Spodoptera frugiperda* después de cinco días de exposición a distintas concentraciones de la δ - endotoxina cry2Ab de *Bacillus thuringiensis*.

Concentración µg/mL	n	Mortalidad (%)	Inhib. Peso		Inhib. Desarrollo	
			(%) ^A	+ SE ^B	(%) ^C	+ SE
Testigo	64	0.0	0.00 c	0.00	10.93 c	5.33
0.01	64	0.0	34.25 c	11.17	12.50 c	5.70
0.05	61	6.6	42.80 c	13.84	33.96 bc	11.72
0.10	63	1.6	48.99 b	20.41	44.79 bc	15.96
0.50	63	11.1	76.45 ba	11.83	70.31 ba	18.28
1.00	63	11.1	79.03 ba	10.86	76.56 ba	14.06
2.50	64	7.8	91.46 ba	3.40	95.31 a	4.69
5.00	64	18.8	97.80 a	0.37	100.00 a	0.00
7.50	64	7.8	96.29 a	1.05	100.00 a	0.00
10.00	63	9.5	96.97 a	0.67	100.00 a	0.00
15.00	64	15.6	97.05 a	0.70	100.00 a	0.00
20.00	64	15.6	98.25 a	0.36	100.00 a	0.00

^A Porcentaje de Inhibición del peso de las larvas tratadas con respecto al peso de las larvas del testigo.

^B Error estándar de la media.

^C Porcentaje de inhibición del desarrollo de larvas al tercer ínstar.

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

Los valores tan bajos de mortalidad no permitieron calcular la línea de respuesta Log concentración- mortalidad (Figura 3), sin embargo el efecto adverso de la δ -endotoxina se expresó en IP e ID.

La concentración que inhibió en un 50% el peso de las larvas (IP₅₀) fue de 0.06 μ g/mL y la que inhibió el 95% del peso (IP₉₅) fue la concentración 6.5 μ g/mL, según el análisis probit (Raymond 1985) (Cuadro 7, Figura 4).

De acuerdo al análisis probit (Raymond 1985) la concentración que inhibe en un 50% el desarrollo de larvas del tercer ínstar (ID₅₀) fue de 0.13 μ g/mL, la que inhibió en un 95% (ID₉₅) fue la concentración 5.2 μ g/mL (Cuadro 7, Figura 5).

La dosis de diagnóstico (DD) se determinó tomando a la mínima concentración que inhibe en un 100% el desarrollo de larvas al tercer ínstar (Aguilar 2002). En *S. frugiperda* a los 5 dde la concentración de 5.0 μ g/mL inhibió en un 100% la formación de larvas L3 (Cuadro 1, Figura 6), por lo que a esta concentración se le determinó como la DD (Cuadro 7).

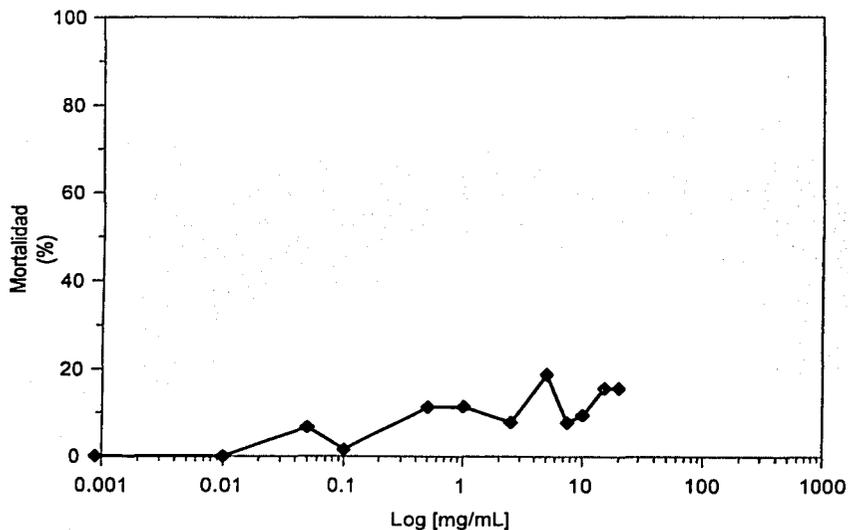


Figura 3. Porcentaje de mortalidad de larvas de *Spodoptera frugiperda* después de cinco días de exposición a la δ -endotoxina cry2Ab de *Bacillus thuringiensis*.

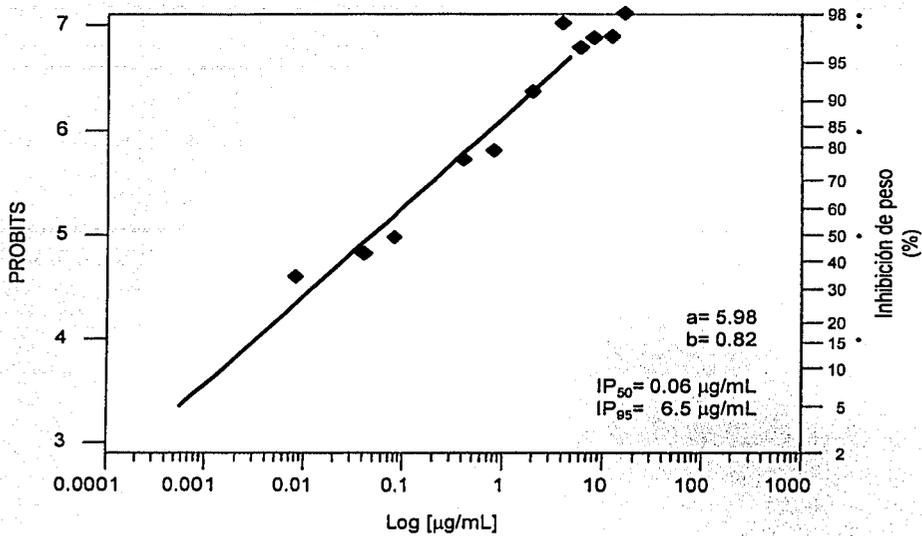


Figura 4. Porcentaje de inhibición de peso de larvas de *Spodoptera frugiperda* después de cinco días de exposición a la δ -endotoxina cry2Ab de *Bacillus thuringiensis*.

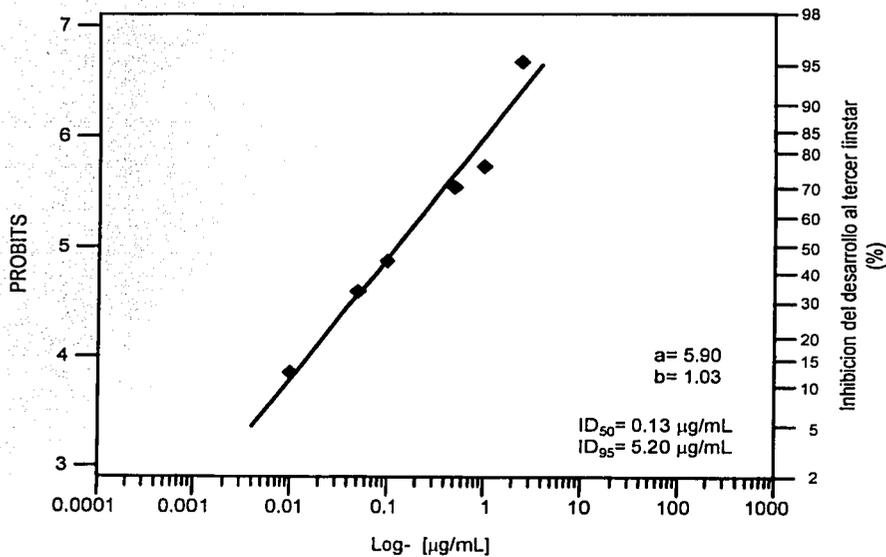


Figura 5. Porcentaje de inhibición de desarrollo de larvas al tercer instar de *Spodoptera frugiperda* después de cinco días de exposición a la δ -endotoxina cry2Ab de *Bacillus thuringiensis*.

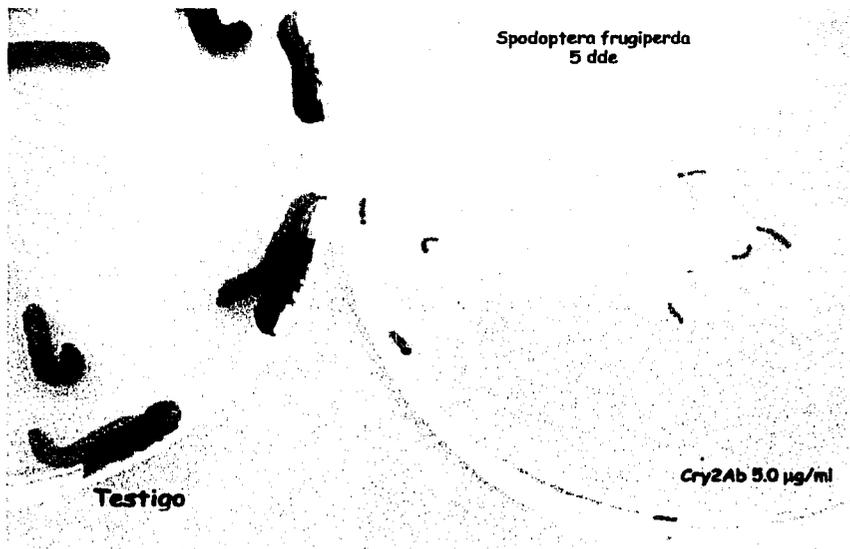


Figura 6. Larvas de *Spodoptera frugiperda* después de cinco días de exposición a 5.0 µg/mL de la δ -endotoxina cry2Ab de *Bacillus thuringiensis* en comparación con el testigo.

7.2 *Spodoptera frugiperda* después de siete días de exposición

El número de larvas tratadas de *S. frugiperda* después de siete días de exposición (7dde) varió de 63 a 64 por concentración, por las mismas causas ocurridas en *S. frugiperda* a los 5 dde. El porcentaje de mortalidad fluctuó de 0.0% a 30.2%, siendo las concentraciones 7.5 y 10 µg/mL las que presentaron el porcentaje mas alto con un 30.2% (Cuadro 2).

El porcentaje de IP varió de 20.07% a 98.37%, las concentraciones 10 y 20 µg/mL tuvieron los porcentajes mas altos (98.37 y 98.23% respectivamente), todas las concentraciones fueron significativamente diferentes del testigo (Tukey $\alpha=0.05$) (Cuadro2).

Con respecto al porcentaje de ID, el porcentaje fluctuó de 1.56% a 95.31%. La concentración 20 µg/mL tuvo el porcentaje de ID mas alto (95.31%), las concentraciones 0.01 y 0.1 no son significativamente diferentes del testigo, las demás concentraciones son significativamente diferentes del testigo (Tukey $\alpha=0.05$) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Porcentajes de mortalidad, de inhibición de peso y de inhibición de desarrollo de larvas de *Spodoptera frugiperda* después de siete días de exposición a distintas concentraciones de la δ -endotoxina cry2Ab de *Bacillus thuringiensis*.

Concentración (µg/mL)	n	Mortalidad (%)	Inhib. Peso		Inhib. Desarrollo	
			(%) ^A	± SE ^B	(%) ^C	± SE
Testigo	64	0.0	0.00 c	0.00	3.12 d	1.80
0.01	64	1.6	20.07 bc	10.05	1.56 d	1.56
0.05	64	7.8	41.26 b	8.86	23.44 dc	6.44
0.10	64	0.0	29.82 b	11.22	6.25 d	4.42
0.50	63	19.0	85.19 a	1.49	62.19 cba	8.99
1.00	64	21.9	82.10 a	8.22	51.56 c	16.01
2.50	64	18.8	93.51 a	1.00	76.56 ba	5.33
5.00	64	25.0	94.27 a	2.86	76.56 ba	14.06
7.50	63	30.2	93.49 a	1.65	83.96 ba	4.37
10.00	63	30.2	98.37 a	0.24	88.75 ba	4.87
15.00	63	22.2	97.96 a	0.43	93.44 a	4.72
20.00	64	25.0	98.23 a	0.82	95.31 a	4.69

^A Porcentaje de Inhibición del peso de las larvas tratadas con respecto al peso de las larvas del testigo.

^B Error estándar de la media.

^C Porcentaje de inhibición del desarrollo de larvas al tercer instar.

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

Aunque el porcentaje de mortalidad obtenido fue mayor al observado en gusano cogollero a 5 dde, se consideró que los datos no reunieron la información necesaria para calcular la línea de respuesta Log concentración-mortalidad (Figura 7), no así el porcentaje de IP que, según el análisis probit (Raymond 1985) presentó una $IP_{50} = 0.1$ µg/mL e $IP_{95} = 5.4$ µg/mL (Cuadro 7, Figura 8). La ID_{50} calculada fue de 1.1 µg/mL, mientras que la ID_{95} fue de 19.6 µg/mL según el análisis probit (Cuadro 7, Figura 9).

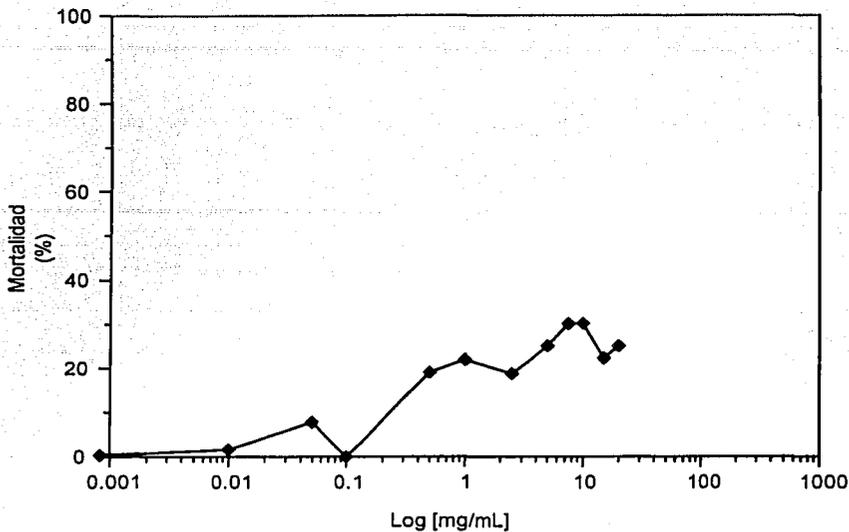


Figura 7. Porcentaje de mortalidad de larvas de *Spodoptera frugiperda* después de siete días de exposición a la δ -endotoxina cry2Ab de *Bacillus thuringiensis*.

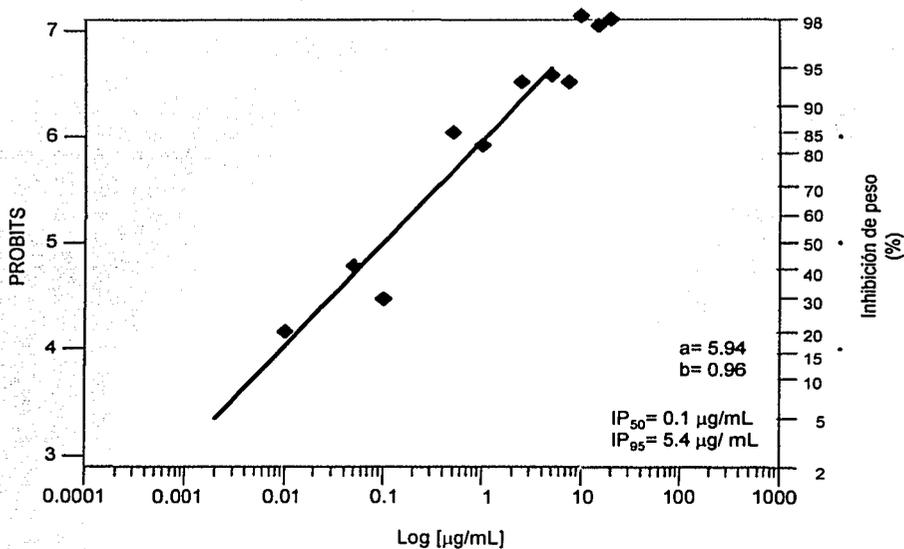


Figura 8. Porcentaje inhibición de peso de larvas de *Spodoptera frugiperda* después de siete días de exposición a la δ -endotoxina cry2Ab de *Bacillus thuringiensis*.

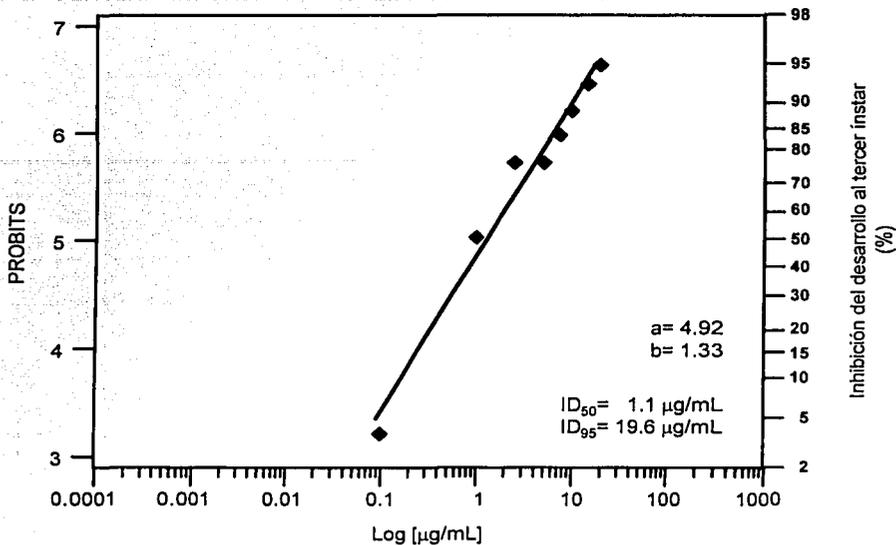


Figura 9. Porcentaje del inhibición de desarrollo de larvas al tercer instar de *Spodoptera frugiperda* después de siete días de exposición a la δ -endotoxina cry2Ab de *Bacillus thuringiensis*.

El alto valor de ID_{95} se debe quizá a que en todos los tratamientos se presentaron larvas L3, aunque con bajos porcentajes, un aspecto importante es que en las concentraciones más altas no se observaron instares mayores a L3 (Cuadro 3) y hubo un atraso en el desarrollo en cuanto a peso con respecto al testigo (Figura 10).

De las 64 larvas tratadas en el testigo, el 42.19% de ellas llegaron al cuarto y quinto instar; incluso se presentó el 1.56% de larvas L6, mientras que de las 63 larvas tratadas a 10 µg/mL tan solo el 11.11% llegaron al tercer estadio y ninguna larva en estadios mayores; en la concentración de 20 µg/mL se observaron apenas el 4.69% de larvas en tercer instar y ninguna larva en ningún otro estadio mayor de un total de 64 larvas tratadas (cuadro 3).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 3. Larvas vivas de *Spodoptera frugiperda* a los siete días de exposición a diferentes concentraciones de la δ - endotoxina cry2Ab de *Bacillus thuringiensis*.

Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	n	Porcentaje relativo de larvas vivas por instar					
		Primero	Segundo	Tercero	Cuarto	Quinto	Sexto
Testigo	64	1.56	1.56	10.94	42.19	42.19	1.56
0.01	64	0.00	0.00	6.25	68.75	23.44	0.00
0.05	64	4.69	10.94	18.75	39.06	18.75	0.00
0.10	64	1.56	4.69	23.44	57.81	12.50	0.00
0.50	63	12.70	30.16	22.22	15.87	0.00	0.00
1.00	64	17.19	12.50	18.75	28.13	1.56	0.00
2.50	64	26.56	31.25	17.19	6.25	0.00	0.00
5.00	64	17.19	34.38	12.50	10.94	0.00	0.00
7.50	63	20.63	33.33	12.70	3.17	0.00	0.00
10.00	63	22.22	36.51	11.11	0.00	0.00	0.00
15.00	63	36.51	34.92	4.76	1.59	0.00	0.00
20.00	64	40.63	29.69	4.69	0.00	0.00	0.00

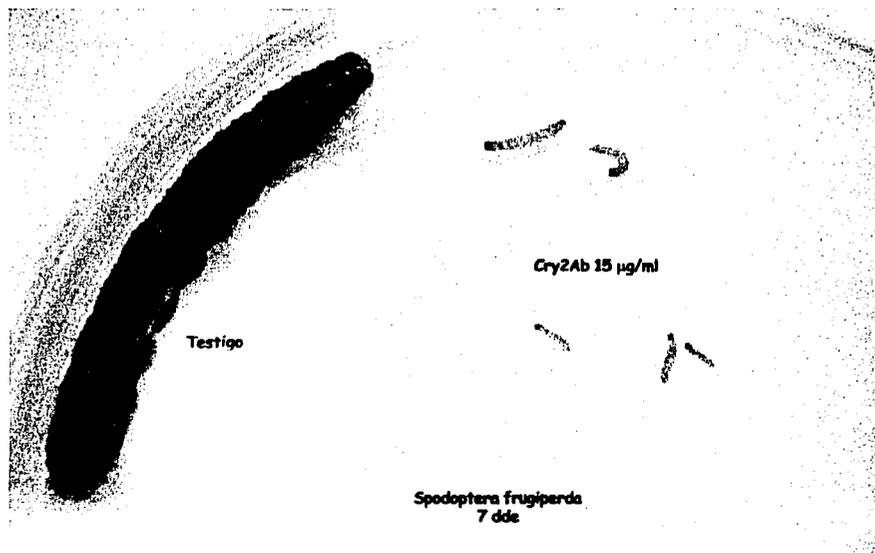


Figura 10. Larvas de *Spodoptera frugiperda* siete días después de exposición a 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la δ -endotoxina cry2Ab de *Bacillus thuringiensis* en comparación con el testigo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

7.3 *Spodoptera exigua* después de cinco días de exposición (5 dde)

El número de larvas tratadas de *S. exigua* 5 dde fue de 64 larvas, excepto en la concentración 0.5 que fue de 63, debido a la manipulación de las larvas. El porcentaje de mortalidad varió de 1.6% a 35.9 %, éste último fue el máximo porcentaje de mortalidad observado en la concentración 20 µg/ mL (Cuadro 4).

El porcentaje de IP mas alto fue para la dosis 7.5 µg/mL con 96.59%. Pero a partir de 0.5 µg/mL, el porcentaje de IP fue de más del 90%. Todos los tratamientos son significativamente diferentes del testigo a excepción de la concentración 0.01 µg/mL (Tukey $\alpha=0.05$) (Cuadro 4).

A partir de la concentración 0.5 µg/mL, el porcentaje de ID es del 100%; en las demás concentraciones, el porcentaje de ID varió de 18.75 a 85.94%, de igual forma que el porcentaje de IP, todos los tratamientos son significativamente diferentes que el testigo a excepción de la concentración 0.01 µg/mL (Tukey $\alpha=0.05$) (Cuadro 4).

Cuadro. 4 Porcentajes de mortalidad, de inhibición de peso y de inhibición de desarrollo de larvas de *Spodoptera exigua* después de cinco días de exposición a distintas concentraciones de la δ -endotoxina cry2Ab de *Bacillus thuringiensis*.

Concentración (µg/mL)	n	Mortalidad (%)	Inhib. Peso		Inhib. Desarrollo	
			(%) ^A	+ SE ^B	(%) ^C	+ SE
Testigo	64	0.0	0.00 d	0.00	18.75 c	6.25
0.01	64	1.6	4.37 d	5.17	25.00 c	14.66
0.05	64	10.9	55.90 c	6.40	73.44 b	4.69
0.10	64	4.7	77.54 b	1.47	85.94 b	1.56
0.50	63	7.9	91.25 ba	0.57	100.00 a	0.00
1.00	64	12.5	93.89 a	0.95	100.00 a	0.00
2.50	64	12.5	96.14 a	0.23	100.00 a	0.00
5.00	64	14.1	94.99 a	0.33	100.00 a	0.00
7.50	64	28.1	96.59 a	0.23	100.00 a	0.00
10.00	64	21.9	94.90 a	0.73	100.00 a	0.00
15.00	64	20.3	93.72 a	1.76	100.00 a	0.00
20.00	64	35.9	96.05 a	0.46	100.00 a	0.00

^A Porcentaje de Inhibición del peso de las larvas tratadas con respecto al peso de las larvas del testigo.

^B Error estándar de la media.

^C Porcentaje de inhibición del desarrollo de larvas al tercer instar.

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

Aún cuando el porcentaje de mortalidad fue mayor en *S. exigua* 5 dde que en *S. frugiperda* 5 y 7 dde (35.9%) estos valores no permitieron calcular la línea de regresión Log concentración-mortalidad (Figura 11).

La IP_{50} fue de $0.05 \mu\text{g/mL}$ y la IP_{95} fue de $3.6 \mu\text{g/mL}$ (Cuadro 7, Figura 12). La ID_{50} y la ID_{95} fueron 0.035 y $0.19 \mu\text{g/mL}$ respectivamente, según al análisis probit (Cuadro 7, Figura 13). La DD corresponde a la concentración de $0.5 \mu\text{g/mL}$, ya que inhibió en un 100% la formación de larvas L3 (Cuadro 7, Figura 14), tal como lo sugiere Aguilar (2002).

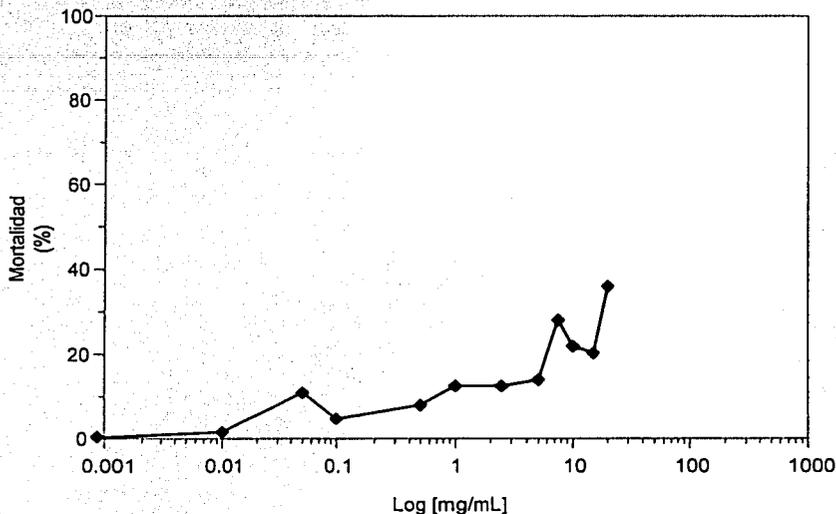


Figura 11. Porcentaje de mortalidad de larvas de *Spodoptera exigua* después de cinco días de exposición a la δ -endotoxina cry2Ab de *Bacillus thuringiensis*.

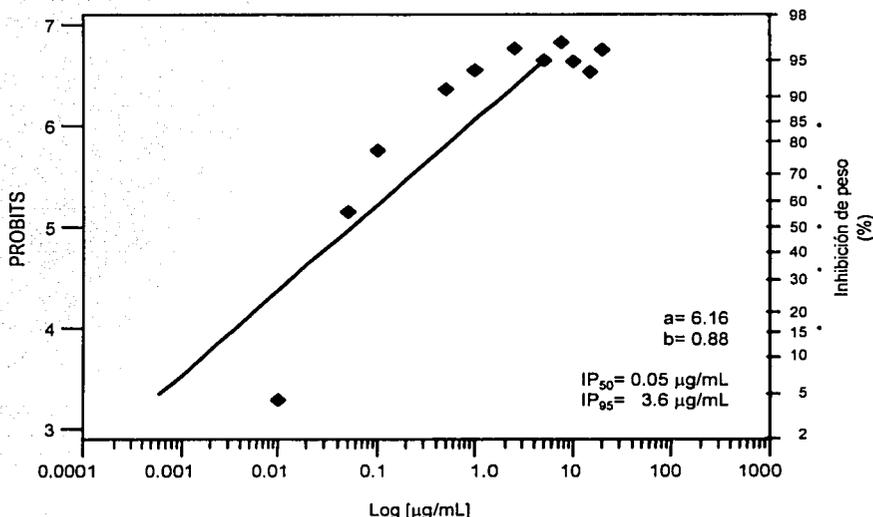


Figura 12. Porcentaje de inhibición de peso de larvas de *Spodoptera exigua* después de cinco días de exposición a la δ -endotoxina cry2Ab de *Bacillus thuringiensis*.

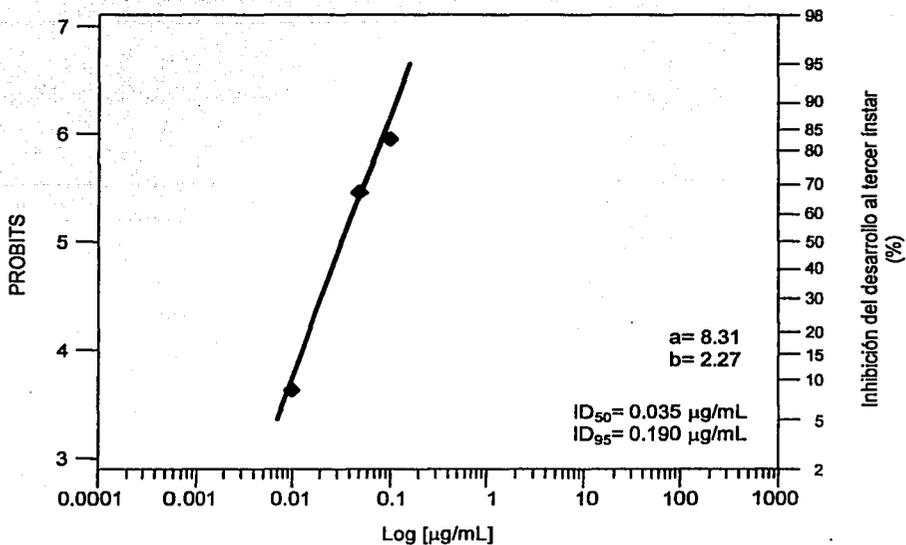


Figura 13. Porcentaje de inhibición del desarrollo de larvas al tercer instar de *Spodoptera exigua* después de cinco días de exposición a la δ -endotoxina cry2Ab de *Bacillus thuringiensis*.

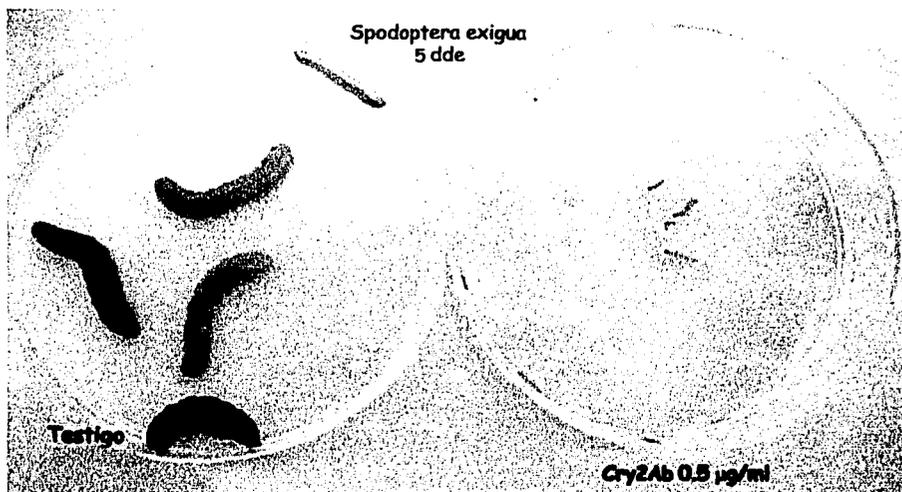


Figura 14. Larvas de *Spodoptera exigua* después de cinco días de exposición a 0.5 µg/mL de la δ -endotoxina cry2Ab de *Bacillus thuringiensis* en comparación con el testigo.

7.4 *Spodoptera exigua* después de siete días de exposición (7 dde)

El número de larvas tratadas de *S. exigua* 7 dde fue de 64 en cada concentración, sólo el testigo tuvo 63 larvas tratadas, esta diferencia en el número de individuos se debió a la manipulación de las larvas.

El porcentaje de mortalidad fluctuó entre 1.6 y 23.4%, el mayor porcentaje de mortalidad fue para las concentraciones 5, 10 y 15 $\mu\text{g/mL}$ (Cuadro 5).

La concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$ presentó el porcentaje de IP mas alto, con 98.44%; sin embargo, a partir de 1.0 $\mu\text{g/mL}$, el porcentaje de IP fue superior al 90%. Todos los tratamientos son significativamente diferentes del testigo (Tukey $\alpha=0.05$) (Cuadro 5).

Con respecto al porcentaje de ID, las concentraciones con los mayores valores fueron 10 y 20 $\mu\text{g/mL}$, con un 95.31 y 98.43% respectivamente. Todos los tratamientos son significativamente diferentes del testigo (Tukey $\alpha=0.05$) (Cuadro 5).

Cuadro 5. Porcentajes de mortalidad, de inhibición de peso y de inhibición de desarrollo de larvas de *Spodoptera exigua* después de siete días de exposición a distintas concentraciones de la δ -endotoxina cry2Ab de *Bacillus thuringiensis*.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	n	Mortalidad (%)	Inhib. Peso		Inhib. Desarrollo	
			(%) ^A	+ SE ^B	(%) ^C	+ SE
Testigo	63	0.0	0.00 e	0.00	3.13 f	1.80
0.01	64	3.1	21.01 d	7.38	6.25 ef	2.55
0.05	64	7.8	57.42 c	2.50	23.44 def	5.34
0.10	64	1.6	62.46 c	5.13	18.75 ef	6.75
0.50	64	6.3	79.52 cb	5.27	40.63 cde	9.72
1.00	64	9.4	91.67 ba	0.92	64.03 bcd	3.93
2.50	64	6.3	94.25 ba	0.90	79.68 abc	6.44
5.00	64	23.4	94.77 ba	1.65	87.50 ab	7.65
7.50	64	20.3	97.23 a	0.39	93.75 ab	2.55
10.00	64	23.4	97.20 a	0.40	95.31 a	2.99
15.00	64	23.4	97.58 a	0.86	92.18 ab	4.68
20.00	64	21.9	98.44 a	0.09	98.43 a	1.56

^A Porcentaje de Inhibición del peso de las larvas tratadas con respecto al peso de las larvas del testigo.

^B Error estándar de la media.

^C Porcentaje de inhibición del desarrollo de larvas al tercer instar.

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

El bajo porcentaje de mortalidad observado no permitió calcular la línea base de respuesta Log concentración- mortalidad (Figura 15). Los valores de la IP_{50} y la IP_{95} son de 0.05 y 3.7 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente (Cuadro 7, Figura 16), la $ID_{50}=0.55$ $\mu\text{g/mL}$ y la $ID_{95}=14.1$ $\mu\text{g/mL}$ (Cuadro 7, Figura 17) según el análisis probit (Raymond 1985).

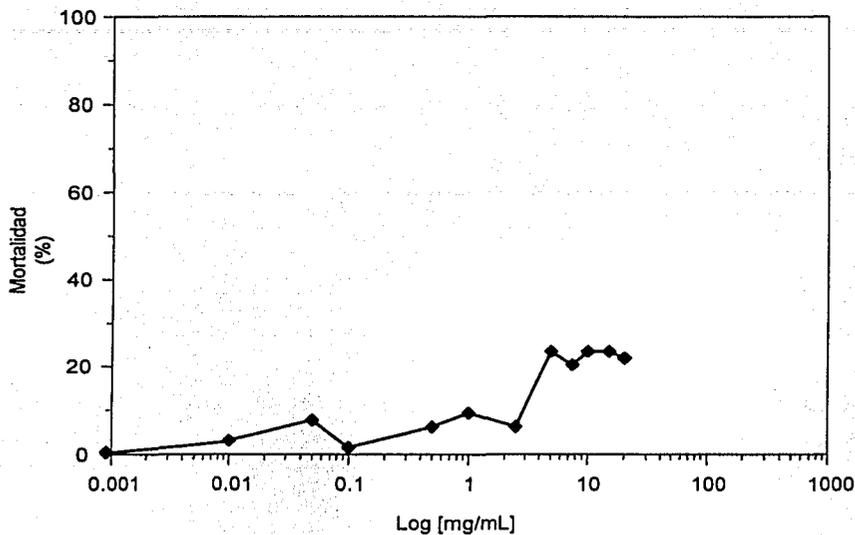


Figura 15. Porcentaje de mortalidad de larvas de *Spodoptera exigua* después de siete días de exposición a la δ -endotoxina cry2Ab de *Bacillus thuringiensis*.

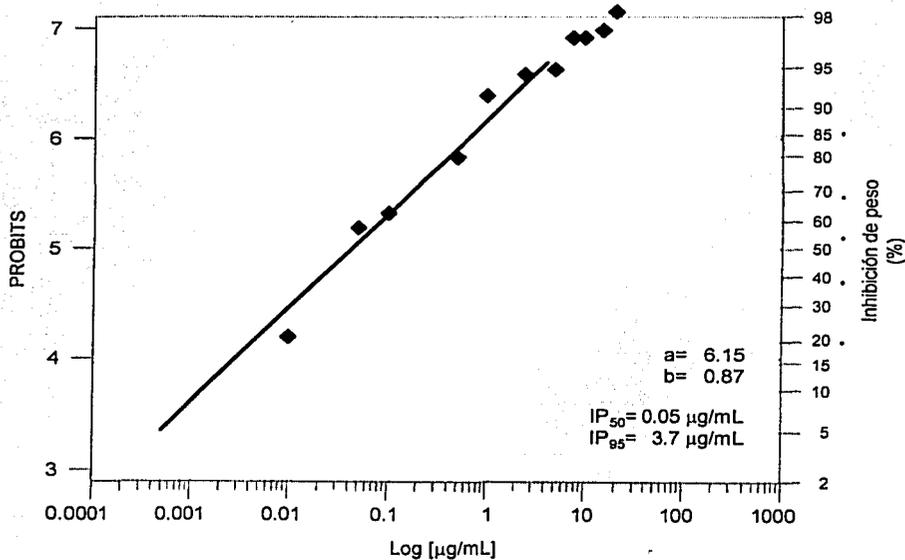


Figura 16. Porcentaje de inhibición de peso de larvas de *Spodoptera exigua* después de siete días de exposición a la δ -endotoxina cry2Ab de *Bacillus thuringiensis*.

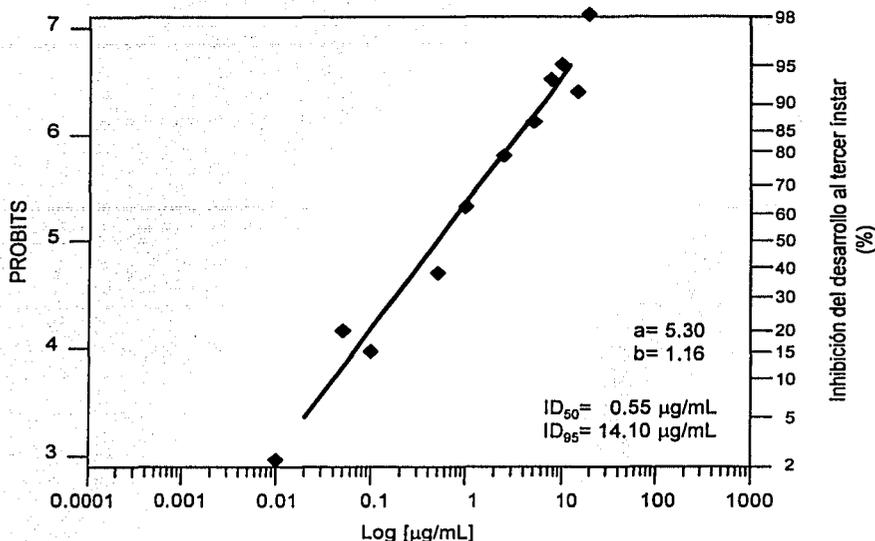


Figura 17. Porcentaje de inhibición del desarrollo de larvas al tercer Instar de *Spodoptera exigua* después de siete días de exposición a la δ -endotoxina cry2Ab de *Bacillus thuringiensis*.

En las concentraciones 10 y 20 $\mu\text{g/mL}$ se obtuvieron los porcentajes mas bajos de Larvas L3 con 4.69 y 1.56% respectivamente. Cabe señalar que en estas concentraciones no se observaron individuos en estadios de desarrollo mayores a L3, a diferencia del testigo en el cual un 65.08% de larvas se desarrollaron hasta el quinto Instar (Cuadro 6, Figura 18).

Cuadro 6. Larvas vivas de *Spodoptera exigua* a los siete días de exposición a diferentes concentraciones de la δ - endotoxina cry2Ab de *Bacillus thuringiensis*.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	n	Porcentaje relativo de larvas vivas por instar				
		Primero	Segundo	Tercero	Cuarto	Quinto
Testigo	63	1.59	1.59	11.11	20.63	65.08
0.01	64	1.56	1.56	9.38	57.81	26.56
0.05	64	7.81	7.81	23.44	50.00	3.13
0.10	64	1.56	15.63	23.44	53.13	4.69
0.50	64	4.69	29.69	25.00	34.38	0.00
1.00	64	18.75	35.94	26.56	9.38	0.00
2.50	64	23.44	50.00	15.63	4.69	0.00
5.00	64	20.31	43.75	9.38	3.13	0.00
7.50	64	31.25	42.19	4.69	1.56	0.00
10.00	64	28.13	43.75	4.69	0.00	0.00
15.00	64	28.13	40.63	6.25	1.56	0.00
20.00	64	28.13	48.44	1.56	0.00	0.00

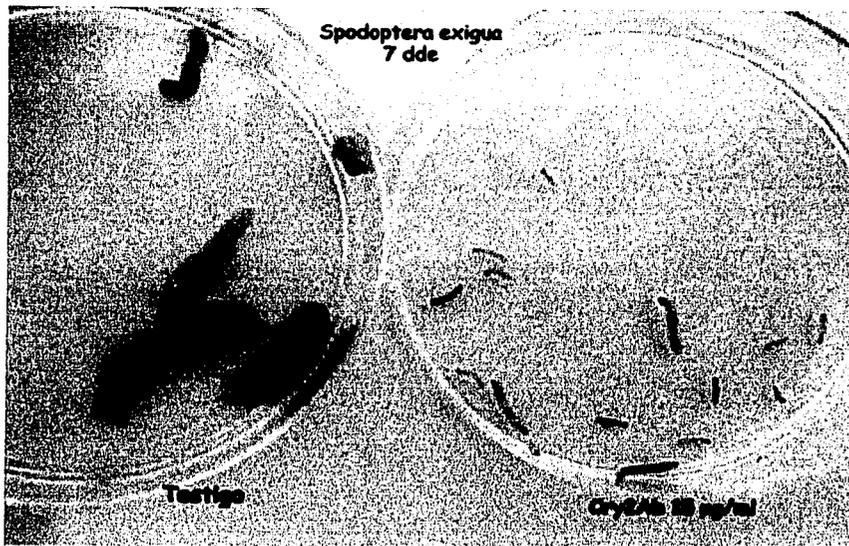


Figura 18. Larvas de *Spodoptera exigua* después de siete días de exposición a 15 µg/mL de la δ -endotoxina cry2Ab de *Bacillus thuringiensis* en comparación con el testigo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 7. Dosis de diagnóstico, análisis probit de la inhibición de peso e inhibición de desarrollo al tercer instar de larvas de *Spodoptera frugiperda* y *Spodoptera exigua* por efecto de la δ - endotoxina cry2Ab de *Bacillus thuringiensis*.

Especie	DDE ^A	n	DD ^B ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	INHIBICIÓN DE PESO			INHIBICIÓN DEL DESARROLLO AL TERCER INSTAR		
				Pendiente \pm SE ^C	IP ₅₀ ^D $\mu\text{g}/\text{mL}$ (95% LC)	IP ₉₅ ^D $\mu\text{g}/\text{mL}$ (95% LC)	Pendiente \pm SE	ID ₅₀ ^E $\mu\text{g}/\text{mL}$ (95% LC)	ID ₉₅ ^E $\mu\text{g}/\text{mL}$ (95% LC)
<i>Spodoptera frugiperda</i>	5	761	5.0	0.81 \pm 0.0492	0.06 (0.0003-0.001)	6.5 (4.3 - 10.4)	1.03 \pm 0.078	0.13 (0.1 - 0.2)	5.2 (3.2 - 9.8)
	7	764	--	0.96 \pm 0.11	0.10 (0.05 - 0.2)	5.4 (2.0 - 14.6)	1.33 \pm 0.098	1.1 (0.9 - 1.4)	19.6 (14.7 - 28.1)
<i>Spodoptera exigua</i>	5	767	0.5	0.87 \pm 0.053	0.05 (0.03 - 0.07)	3.6 (2.5 - 5.7)	2.27 \pm 0.34	0.035 (0.026 - 0.043)	0.19 (0.13 - 0.33)
	7	767	--	0.87 \pm 0.053	0.05 (0.03 - 0.07)	3.7 (2.5 - 5.8)	1.16 \pm 0.64	0.55 (0.44 - 0.68)	14.1 (10.44 - 20.13)

^A Días de exposición.

^B Dosis de diagnóstico.

^C Pendiente y Error estándar de la media.

^D IP₅₀ e IP₉₅ son la dosis que inhibe en un 50 y 95% el peso de larvas tratadas con respecto al testigo.

^E ID₅₀ e ID₉₅ son la dosis que inhibe en un 50 y 95% el desarrollo de larvas al tercer instar.

8. DISCUSIÓN

Stone y Sims (1993), Sims *et al.* (1996) y Siegfried *et al.* (2000) sugieren que por el uso extensivo de algodoneros transgénicos que expresan las δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* durante todo el ciclo, las plagas objetivo pueden desarrollar cierta tolerancia a dichas endotoxinas por lo que es importante implementar estrategias de manejo que permitan detectar a tiempo la presencia de fenotipos resistentes, para ello es necesario evaluar los cambios en la tolerancia a las δ -endotoxinas y un componente de las estrategias es una efectiva evaluación de la resistencia. Sumerford y Solomon (1999) coinciden en que para un buen manejo de la resistencia es necesario una constante evaluación de la tolerancia de las plagas, así mismo, Moulton y Dennehy (2001) consideran que el uso intensivo de algodoneros transgénicos (algodoneros Bt) no solo promueven el desarrollo de resistencia a las δ -endotoxinas de las plagas principales, sino también las plagas secundarias están involucradas en este fenómeno, como por ejemplo *Spodoptera exigua*.

De acuerdo a lo anterior, el generar líneas base de respuesta que nos permitan obtener información de referencia para detectar posibles cambios en la respuesta a esta u otras δ -endotoxinas en una o varias poblaciones de insectos plaga a través del tiempo, es realmente importante. La relevancia de la presente investigación radica en el establecimiento de las primeras líneas base de respuesta de cry2Ab en poblaciones de *S. frugiperda* y *S. exigua* que no han sido expuestas a dicha endotoxina. Los datos obtenidos en este trabajo permitirán tener un marco de referencia para nuevas evaluaciones.

Los resultados indican que el porcentaje de mortalidad ocasionado por cry2Ab en *S. exigua* fue mayor al observado en *S. frugiperda*, pero aún así los porcentajes no rebasaron el 35.9%. Los bajos porcentajes de mortalidad ya han sido documentados por Ashfaq y Young (1999), quienes indican que las δ -endotoxinas de *B. thuringiensis* ejercen niveles de mortalidad bajos sobre larvas de *S. exigua*; ellos documentan un 20% y 20.8% de mortalidad en larvas expuestas a hojas de algodonero transgénico. También se ha encontrado este fenómeno sobre otras especies de lepidópteros como *Helicoverpa zea* a cry1Ac y cry1Ab, Sims *et al.* (1996) documentan una concentración letal noventa y nueve a cry1Ac (CL₉₉) de 6,661 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y Aguilar (2002) una CL₉₅ de entre 280.3 y 860.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Siegfried *et al.* (2000) documentan para cry1Ab valores de LC₅₀ de entre 70.3 y 221.3 ng/cm^2 , estos valores indican bajos efectos sobre mortalidad.

Este fenómeno se puede atribuir a la gran variabilidad de respuesta de las poblaciones de lepidópteros a las δ -endotoxinas de *B. thuringiensis*, sin embargo el efecto principal de éstas no

se refleja en la mortalidad sino en el desarrollo de los individuos, reflejándose en inhibición de peso (IP) e inhibición de desarrollo (ID). Este efecto lo documentan Siegfried *et al.* sobre larvas de *He. zea* tratadas con cry1Ab, donde encontraron que los datos de inhibición de desarrollo fueron más sensibles que los de mortalidad, también Ashfaq y Young (1999) y Nava e Ibarra (2000) observaron que al someter larvas de *S. exigua* a hojas de algodónero transgénico hubo reducción de peso de larvas y pupas.

Ante esto, Sims *et al* (1996) sugieren que el efecto de inhibición de desarrollo sea el parámetro más importante a utilizar para medir el efecto de las δ -endotoxinas de *B. thuringiensis*, ellos manejan concentración efectiva que inhibe en un 99% el peso (EC_{99}) en comparación con el testigo. Moulton y Dennehy (1999) calculan la concentración que inhibe en un 50% el peso de larvas (I_{50}) y Aguilar (2002) obtiene la reducción de peso (IP) e inhibición de desarrollo de larvas al tercer ínstar (ID). En el presente trabajo se obtuvieron la inhibición de peso (IP) e inhibición de desarrollo de larvas al tercer ínstar (ID).

Los bioensayos realizados para establecer las líneas base de respuesta tanto para *S. frugiperda* como para *S. exigua*, indicaron que de las variables evaluadas, el porcentaje de mortalidad no es el mejor parámetro para medir el efecto de la δ -endotoxina cry2Ab ya que los bajos porcentajes de mortalidad obtenidos no permitieron establecer la línea de respuesta Log concentración-mortalidad para ninguna de las especies y las otras variables, inhibición de peso e inhibición de desarrollo al tercer ínstar mostraron ser las mejores variables para medir el efecto de cry2Ab.

La IP_{50} de *S. exigua* a los 5 dde fue de 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Cuadro 7) siendo éste un valor similar al documentado por Moulton y Dennehy (1999) para cry1Ac en una raza susceptible de *S. exigua* con un valor de 0.0477 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La IP_{50} de *S. frugiperda* a los 5 dde fue de 0.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (cuadro 7) un valor también similar al reportado por Sims *et al.* (1996) para cry1Ac, en *Heliothis virescens* con una EC_{99} de 0.058 $\mu\text{g}/\text{mL}$, aunque no es recomendable hacer comparaciones de la respuesta entre las diferentes δ -endotoxinas ni entre especies distintas, la similitud de los datos antes mencionados nos pueden indicar la respuesta general de los lepidópteros a las δ -endotoxinas de *B. thuringiensis*, además de que no existen datos de la respuesta de *S. frugiperda* y *S. exigua* a la δ -endotoxina cry2Ab.

Las ID_{95} de *S. frugiperda* y *S. exigua* a los 5 dde con valores de 5.2 y 0.19 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente, fueron menores que las ID_{95} a los 7 dde que tuvieron valores de 19.6 en *S. frugiperda* y 14.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en *S. exigua* (Cuadro 7), esto se debe a que en los bioensayos a los 7 dde hubo desarrollo de larvas L3 hasta en las dosis mas altas, de cualquier modo, éstas larvas

estuvieron en menor proporción y presentaron un retraso en el desarrollo con respecto sus testigos, este retraso en el desarrollo llevaría a una mayor exposición a depredadores, parasitoides o enfermedades en campo.

Las larvas del tercer estadio observadas en las dosis altas a los 7 dde no necesariamente implican un menor efecto de la δ -endotoxina, ya que los porcentajes de IP fueron de más del 90% a partir de la concentración 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en *S. frugiperda* y 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en *S. exigua*.

La presencia de estas larvas L3 a los 7 dde podría explicarse por el hecho que dichas larvas tuvieron el tiempo suficiente para acceder la capa de alimento no contaminado y por lo tanto tuvieran condiciones favorables para su desarrollo, tal como lo indican Ashfaq y Young (1999) cuando encontraron que, una vez que retiraron larvas de *S. exigua* de las hojas de algodónero transgénico que expresa la δ -endotoxina cry1Ac y las colocaron en dieta no tratada, éstas sobrevivieron y se desarrollaron mejor que aquellas que permanecieron en dieta tratada. Por lo que se sugiere que la evaluación de estas plagas se realice a los 5 dde.

Con respecto a las dosis de diagnóstico (DD) se utilizó el criterio de Aguilar (2002), quien define a ésta como la concentración que inhibe totalmente la formación de larvas L3 durante el periodo de exposición de las larvas a dichas δ -endotoxinas. Siguiendo este criterio, la DD para *S. frugiperda* fue de 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y para *S. exigua* fue de 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (cuadro 7).

La DD determinada para *S. exigua* es menor que para *S. frugiperda*, sugiriendo que la primera es mas sensible a cry2Ab que la segunda, este mismo fenómeno se ha encontrado en la respuesta de *H. virescens* y *He. zea* a la δ -endotoxina cry1Ac, tal y como Sims *et al* (1996) documentan. Ellos expusieron por siete días larvas L1 de varias poblaciones de *H. virescens* y *He. zea* en dieta artificial mezclada con δ -endotoxina cry1Ac y encontraron una EC_{99} de 0.058 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para las poblaciones de *H. virescens* y de 28.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para las de *He. zea*. Stone y Sims (1993) documentan valores de LC_{50} entre 0.04 y 0.32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *H. virescens*, mientras que para *He. zea* obtuvieron valores entre 0.45 y 7.39 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y sugieren que la diferencia de susceptibilidad entre estas especies se debe a que *He. zea* tiene un mayor rango de hospederas y por consecuencia tiene un mayor número de enzimas detoxificadoras, lo que le provee de mayor tolerancia a cry1Ac, pero esto no lo podemos aplicar al complejo de spodóptera ya que es precisamente *S. exigua* la especie que tiene un mayor rango de hospederas que *S. frugiperda* y resultó ser la mas susceptible a cry2Ab.

Con base en los resultados obtenidos en la presente investigación se sugieren las siguientes recomendaciones:

Realizar Bioensayos de las poblaciones estudiadas a través del tiempo para observar los posibles cambios en la susceptibilidad a la δ -endotoxina cry2Ab así como en otras poblaciones de *S. exigua* y *S. frugiperda*.

Utilizar para *S. frugiperda* la concentración 5.0 $\mu\text{g/mL}$ y para *S. exigua* la concentración 0.5 $\mu\text{g/mL}$ como dosis de diagnóstico en México, y en los bioensayos, evaluar a los 5 dde.

9. CONCLUSIONES

1. Los porcentajes de mortalidad obtenidos con la δ -endotoxina cry2Ab tanto para *Spodoptera frugiperda* como para *Spodoptera exigua* fue inferior al 35.9% en las concentraciones más altas que se usaron, por lo que no fue posible determinar la línea Log concentración-mortalidad ni la concentración letal mediana (CL₅₀) en ninguna de las dos especies.
2. El efecto de la δ -endotoxina se expresó en porcentaje de inhibición de peso (IP) respecto al testigo y porcentaje de inhibición de desarrollo de larvas al tercer ínstar (ID), en las dos especies.
3. La IP₅₀ de *Spodoptera frugiperda* 5 dde fue de 0.06 $\mu\text{g/mL}$, la IP₉₅ fue de 6.5 $\mu\text{g/mL}$ mientras que la ID₅₀ y la ID₉₅ fueron de 0.13 y 5.2 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. En los bioensayos a los 7 dde la IP₅₀ y la IP₉₅ fueron de 0.1 y 5.4 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, la ID₅₀ tuvo un valor de 1.1 $\mu\text{g/mL}$ mientras que la ID₉₅ fue de 19.6 $\mu\text{g/mL}$.
4. La IP₅₀ de *Spodoptera exigua* 5 dde, fue de 0.05 $\mu\text{g/mL}$, la IP₉₅ fue de 3.6 $\mu\text{g/mL}$, mientras que la ID₅₀ y ID₉₅ fueron de 0.035 $\mu\text{g/mL}$ y 0.19 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. En los bioensayos a los 7 dde, la IP₅₀ y la IP₉₅ fueron de 0.05 y 3.7 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, la ID₅₀ tuvo un valor de 0.55 $\mu\text{g/mL}$ mientras que la ID₉₅ fue de 14.1 $\mu\text{g/mL}$.
5. La dosis de diagnóstico (DD) para *Spodoptera frugiperda* fue de 5.0 $\mu\text{g/mL}$ de δ -endotoxina cry2Ab y la de *Spodoptera exigua* fue la concentración 0.5 $\mu\text{g/mL}$.
6. Con base a los resultados de DD obtenidos en el presente trabajo, *Spodoptera exigua* fue más sensible a la δ -endotoxina cry2Ab, que *Spodoptera frugiperda*.
7. La evaluación del efecto de la δ -endotoxina cry2Ab en estas especies debe evaluarse a los cinco días de exposición y no después de 7 días.

10. ANEXOS

Anexo 1. Crianza de insectos

La crianza se realizó con dieta artificial (León 1978) y se llevó a cabo en el laboratorio de Entomología del CEVY.

1.1 Elaboración de dieta artificial para criar larvas

Ingredientes

250 g soya molida
500 g maíz molido
150 g levadura de cerveza
30 g de germen de trigo
7.5 g de ácido sórbico
15 g de ácido ascórbico
12.5 g de ácido metil p-hidroxibenzóico (M.P.H.)
75 g de agar
100 g de cloruro de colina
4.5 L agua Destilada
15 mL. formaldehído
20 mL. teragrán (vitaminas)

Procedimiento

Se refrigeró el agua destilada a 4° C por 24 h, transcurrido ese tiempo se le agregó el agar y se batió hasta disolver bien, luego se puso a calentar hasta punto de ebullición.

Se mezclaron la soya, el maíz, la levadura de cerveza, el germen de trigo, el ácido sórbico, el M.P.H. y el cloruro de colina, con un litro de agua destilada a temperatura ambiente y se agregó el ácido ascórbico disuelto en un poco de alcohol (96°).

El agar caliente se añadió a la mezcla antes descrita y se batió hasta homogeneizar, cuando la temperatura bajó se agregaron el formaldehído y las vitaminas y se siguió batiendo.

La dieta se vació en un recipiente y se dejó enfriar para después refrigerarla.

1.2 Elaboración de agua azucarada al 10%

Se pesaron 50 g de azúcar y se vaciaron a en un vaso de p.p. con 500 mL de agua destilada, se mezcló muy bien hasta disolver bien el azúcar y se vació a la pizeta.

1.3 Preparación de contenedores para adultos.

Se colocó papel tipo servitoalla a los lados de la caja sostenidas con cinta adherente, en el fondo se colocó otro papel servitoalla, se puso un recipiente plástico con algodón empapado en la solución azucarada al 10%. En la parte superior del contenedor se colocó una capa doble de papel servitoalla para colocarla antes de la tapa.

1.4 Preparación de contenedores para eclosión de huevecillos

Se colocó papel bond en el fondo del contenedor y se untó una solución de formol 0.1%, sobre ese papel se colocaron dos tiras de dieta artificial, se colocó en la parte superior del contenedor una capa doble de papel servitoalla antes de colocar la tapa.

1.5 Preparación de recipientes para alimentación de larvas (L3- L6)

Se colocó un trozo de aproximadamente 2 gramos dieta artificial en el fondo del vaso y se presionó la dieta ligeramente para "adherir" la dieta en el fondo, se taparon y se colocaron sobre bases de cartón para huevo.

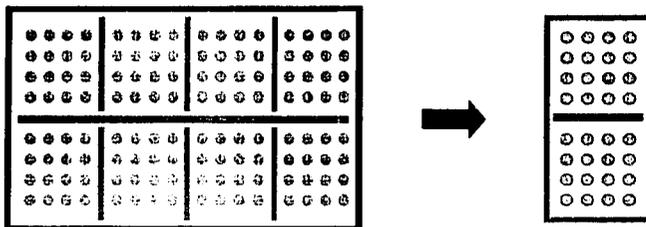
1.6 Preparación de contenedores para pupas

Se colocó papel servitoalla a los lados de la caja sostenidas con cinta adherente, en el fondo se colocó otro papel servitoalla, se introdujo un vaso plástico pequeño con un algodón empapado en solución azucarada al 10%, para que cuando emergieran los adultos pudieran alimentarse hasta que se les transfiriera a los contenedores para adultos.

Anexo 2. Bioensayo

2.1 Características de las charolas para bioensayos.

Las charolas tienen 128 recipientes de 2 mL de capacidad cada uno. Se cortaron transversalmente formando charolas más pequeñas con 2 grupos de 16 recipientes cada uno. En los recipientes de las charolas pequeñas se agregó 1 mL de dieta artificial, luego 200 μ L de la δ -endotoxina, posteriormente se colocó la larva L1 y por último se tapó con una película plástica adherente con micro ventilaciones.



2.2 Elaboración de dieta artificial para bioensayos.

Se pesaron 17.5 g de dieta (lote: 060101TBW, Southland Products Inc. 870- 265- 3747), se vaciaron a un recipiente mezclador, se agregó agua destilada caliente y se batió hasta tener una mezcla homogénea.

Con una pipeta de liberación automática se colocó 1 mL de dieta artificial en cada recipiente de la charola para bioensayos y se dejó enfriar la dieta.

2.3 Elaboración de solución de agar al 0.2%.

Se pesó 1 g de agar bacteriológico y se vació a un vaso de precipitados con 500 mL de agua destilada, se agitó ligeramente, se calentó a punto de ebullición, se retiró del fuego y se siguió mezclando durante un minuto.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.4 Elaboración de solución madre (10 µg/mL) de δ-endotoxina cry2Ab de *Bacillus thuringiensis*

Se pesaron 0.178 g de δ-endotoxina cry2Ab, se vació a un vaso de precipitados con 100 mL de agar 0.2%, se colocó el magneto y se agitó por 1 hora.

La solución madre se vació a un matríz aforado de 100 mL y se etiquetó, se mantuvo en refrigeración a 4° C.

2.5 Elaboración de diluciones

Se cubrieron con papel aluminio los frascos viales y se etiquetaron cada uno con la concentración que les correspondió.

Con una pipeta de 10 mL se vaciaron al frasco vial los mililitros de solución 0.2% (dilutor) para luego añadir la solución y cantidad de toxina como sigue:

Solución madre [10µg/ mL]

15 mL de solución madre [10 µg/mL] + 5 mL de solución de agar 0.2% para obtener [7.5 µg/mL]

10 mL de solución madre [10 µg/mL] + 10 mL de solución de agar 0.2% para obtener [5 µg/ mL]

10 mL de [5 µg/mL] + 10 mL de solución de agar 0.2% para obtener [2.5 µg/mL.]

2 mL de solución madre [10 µg/mL] + 18 mL de solución de agar 0.2% para obtener [1 µg/mL.]

2 mL de [5 µg/mL] + 18 mL de solución de agar 0.2% para obtener [0.5 µg/mL.]

2 mL de [1 µg/mL] + 18 mL de solución de agar 0.2% para obtener [0.1 µg/mL.]

2 mL de [0.5 µg/mL] + 18 mL de solución de agar 0.2% para obtener [0.05 µg/mL.]

2 mL de [0.1 µg/mL] + 18 mL de solución de agar 0.2% para obtener [0.01 µg/mL.]

Hechas las diluciones se cerró el frasco con su correspondiente tapa, se agitaron los frascos y se refrigeraron.

2.6 Aplicación de la δ-endotoxina cry2Ab a las charolas de bioensayo con dieta.

Las charolas para bioensayo preparadas con dieta se etiquetaron con la dosis que correspondía, se agregó la concentración de δ-endotoxina cry2Ab deseada iniciando siempre con el testigo

(solución de agar 0.2%) y luego, de la dosis mas baja a la mas alta. Se utilizó una puntilla limpia para cada dosis.

Con la pipeta de liberación automática, se agregaron 200 μ L de δ -endotoxina sobre la dieta de cada recipiente de la charola de bioensayos, se extendió la solución moviendo la charola circularmente para cubrir toda la dieta, las charolas se mantuvieron sin tapar a 20 + 2° C de temperatura, 70% humedad relativa con la finalidad de permitir que la solución con la δ -endotoxina solidificara.

2.7 Colocación de larvas en charolas tratadas (exposición a toxina)

Con ayuda de un pincel se colocó una larva recién emergida (L1) en cada recipiente de las charolas con dieta y la toxina o con agar sin toxina en el caso del testigo, se tapó la charola con una película plástica adherente y se etiquetó la charola con la fecha de inicio de exposición.

Cuando se terminó de colocar las larvas en las charolas éstas se llevaron a la cámara de bioensayos que se mantuvo a 26° C de temperatura, 60% de humedad relativa y 12:12 horas luz:oscuridad durante 5 y 7 días después del inicio de exposición de la larva a la toxina.

11. LITERATURA CITADA

Aguilar, M. S. 2002. Susceptibilidad del gusano bellotero *Helicoverpa zea* Boddie (Lepidoptera: Noctuidae) a la δ -endotoxina cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* Berliner var. *kurstaki*. Tesis de Maestría en ciencias. Colegio de Postgraduados. 60 p.

Adamczyk, Jr., J. J., K. Bew, L. C. Adams and D. D. Hardee. 2001. Evaluation of BollgardII® (CV. DP50BII) in the Mississippi delta: Field efficacy against various Lepidoptera while profiling season-long expression of Cry1Ac and Cry2Ab. Proceedings of the Beltwide Cotton Conference. Vol. 2:835-837.

Anónimo. 1983. Guía para la asistencia técnica agrícola, área de influencia del campo agrícola experimental, Valle del Fuerte. SARH, INIFAP. Guía técnica. Tercera edición.

Anónimo 1999. Guía de plaguicidas autorizados de uso agrícola. SAGAR, Comisión Nacional. de Sanidad Agropecuaria, Dirección General de Sanidad vegetal. 504 p.

Anónimo. 2000. Guía para la asistencia técnica agrícola del Valle del Fuerte. INIFAP, CIRNO, CEVAF.

Akin, D. S., S. D. Stewart and K. S. Knighten. 2001. Field efficacy of cotton expressing two insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Proceedings of the Beltwide Cotton Conference. Vol. 2:1041-1043.

Ashfaq, M. and S. Y. Young, 1999. Effect of transgenic Bt-Cotton on larval mortality and development of Beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). Proceedings of the Beltwide Cotton Conference. Vol. 2:1032-1034.

Battenberg, V. M. 1969. Know How to produce more Cotton. Ed. Board. München, Germany. 107 pp.

Borror, D. J. and D. M. DeLong. 1971. An Introduction to the study of insects. N. Y. 438-440 p.

Burd, A. D., J. R. Bradley, Jr., J. W. Van Duyn, and F. Gould. 2000. Resistance of Bollworm, *Helicoverpa zea*, to CryIA(c) toxin. Proceedings of the Beltwide Cotton Conference. Vol. 2:923-926.

Coronado, P. R. y A. Márquez. 1994. Introducción a la entomología, morfología y taxonomía de insectos. Ed. Limusa. México. 282 p.

Devidas, P. 1992. Bt mode of action: Approaches, pp 15- 28. In Anónimo [Ed.], Seminar Proceedings of Global management of insecticide resistance in the 90's. Abbot Laboratories.

Félix, F. E. 1984. Importancia del cultivo del maíz en México. Memoria XII simposio Nacional. De Parasitología agrícola. 267- 273 p.

Gastélum, L. R. 1999. Identificación y manejo de las principales plagas que atacan al maíz en Sinaloa. Panorama Agropecuario. Año 9, No. 94. 9-11 p.

Gastélum, L. R. 2001. El papel de *Bacillus thuringiensis* en el manejo integrado de plagas. Panorama Agropecuario. Año 11, No. 116. 10- 12 p.

Jiménez, G. E. 1999. El Campo Experimental Valle del Yaqui: su importancia en la producción agrícola del sur de sonora. SAGAR, INIFAP. Folleto informativo No. 1. 68 pp.

Hernández, J. A., J. L. Martínez, J. J. Pacheco, J. X. Uvalle, L. M. Tamayo, E. Contreras, E. Ortiz, y S. Valenzuela. 1988. Guía para producir algodón en el sur de Sonora. Folleto para productores No. 17. SARH, INIFAP. 24 pp.

Hogg, D. B. and A. P. Gutierrez. 1980. A model of the flight Phenology of the beet armyworm (Lepidoptera- Noctuidae) in central California. Hilgardia. Vol. 48:4. 36 p.

Lagunes, T. A., M. J. C Rodríguez, D. Mota. 1994. Combate Químico de Plagas Agrícolas en México. Colegio de Postgraduados, Instituto de Fitosanidad. México. 274 p

León, L. R. L. 1978. Procedimiento para evaluar insecticidas en laboratorio. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Centro de Investigaciones Agrícolas del Noroeste (CIANO). Publ. Especial CIANO No. 27. 38 p

Luttrell, R. G. 1992. Effectiveness of Bt on resistant insects, pp 47-48. *In* Anónimo [Ed.], Seminar Proceedings of Global management of insecticide resistance in the 90's. Abbot Laboratories.

Machain, L. M. 1975. Principales plagas de los cultivos del valle de Mexicali y sus enemigos naturales. Folleto técnico No. 57. INIFAP. 50 pp.

Martínez, C. J. L., U. Nava-Camberos y J. C. Rodríguez Maciel. 2001. Generating a resistance data base in *Heliothis virescens* populations from areas planted with Bt-transgenic cotton in Mexico. Proceedings of Resistance 2001, 24-26 September. 2-21p.

Martínez, C. J. L., J. J. Pacheco, A. Hernández. 2002. Manejo integrado de plagas del algodón en el sur de Sonora. SARH, INIFAP, CIRNO; CEVY. Folleto técnico No. 46. 68 p.

Metcalf, C. L., W. P. Flint. 1965. Insectos destructivos e insectos útiles. Sus costumbres y su control. Editorial Continental. S. A.

Moulton, J. K. y T. J. Dennehy. 2001. Beet Armyworm resistance to Cry1Ac. Proceedings of the Beltwide Cotton Conference. Vol. 2:989-991.

Nava, C. U. y F. N. Ibarra. 2000. Development, survival and fecundity of the Beet armyworm on Bt and non-Bt Cotton. Proceedings of the Beltwide Cotton Conference. Vol.2:1337-1339.

Ortega, C. A., O. Cota, J. M. Cortés, J., O. H. Moreno. 1999. Producción de Maíz de verano en el sur de Sonora. SAGAR, INIFAP, CIRNO. Folleto para productores No. 32. 44p.

Pacheco, M. F. 1985. Plagas de los cultivos agrícolas en Sonora y Baja California. Libro técnico No. 1. SARH. CIANO. Obregón, Son. 414 pp.

Pacheco, M. F. 1994. Plagas de los cultivos Oleaginosos en México. Libro técnico No. 3. SARH. CIANO. Obregón, Son.

Raymond, M., 1985. présentation d' un programme d'Analyse Log- probit Pour Micro- Ordinateur. Cah. ORSTOM, Sér. Ent. Med et Parasitol., vol. 22: 117-121.

Reyes, C. P. 1990. El maíz y su cultivo. AGT Editor S. A. 460 p.

Rude, P. A and J. Kelly C. 1984. Integrated pest management for cotton in the western region of the United States. Publication 3305. Univ. of California.

Rodríguez, M. J. C. 1997. Manejo de la resistencia a Insecticidas, pp., *In*. Rodríguez, J. C. [Compilador]. Colegio de Postgraduados, Instituto de Sanidad. México.

Rojano, G. A. L. 1998. Tópicos selectos de la producción agrícola actual. Algunos aspectos del cultivo de algodón en la comarca lagunera. Tesis UNAM. Ingeniero Agrícola. 58 p.

Sánchez, P. A., F. R. Kirchner, E. López. N. Paulin, C. R. Usami. 1982. Manuales para educación agropecuaria, Cultivos de Fibras. Ed. Trillas. México. 84 p.

Servicio de información y estadística agroalimentaria y pesquera (SIAP). <http://www.siea.sagarpa.gob.mx>. SIEA.

Siegfried, B. D., T. Spencer and J. Nearman. 2000. Baseline susceptibility of the corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae) to the cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis*. J. Econ. Entomol. 93:1265-1268.

Sims, S. R., J. T. Greenplate, T. B. Stone, M. A. Caprio, F. L. Gould. 1996. Monitoring strategies for early detection of Lepidoptera resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins. *Resistant Pest Management*. Vol. 9, no. 1. 21-24.

Sivasupramaniam, S., V. Kabuye, T. Malvar, L. Ruschke, P. Rhan, and J. Greenplate, 2001. Hybrid *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins provide enhanced spectrum of activity against lepidopteran pest of cotton. *Proceedings of the Beltwide Cotton Conference*. Vol. 2:837-840.

Stone, T. B. and S. R. Sims. 1993. Geographic susceptibility of *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) to *Bacillus thuringiensis*. *J. of Econ. Entomol.* 86: 994p.

Sumerford, D. V. and W. L. Solomon. 1999. Monitoring for tolerance to Cry1Ac in populations of tobacco budworm and cotton bollworm: Summer 1998. *Proceedings of the Beltwide Cotton Conference*. Vol.2:1237-1239.

Tanada, Y. and H. K. Kaya. 1993. *Insect Pathology*. A. Press Inc. 666 p

Voth, R. D., J. T. Greenplate, J. E. Mann and J. W. Mullins. 2001. Bollgard®II Cotton Thechnical review. Abstract. *Proceedings of the Beltwide Cotton Conference*. Vol.2:830-830.