



ZAMORANO
ESCUELA AGRICOLA PANAMERICANA
DEPARTAMENTO DE PROTECCION VEGETAL

EVALUACION DE TOXINAS
DE *Bacillus thuringiensis* (Berliner) EN
***Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)**
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

Tesis presentada como requisito parcial para optar al
título de Ingeniero Agrónomo en el grado
académico de licenciatura

Por

Ever Adalberto Hernández Hernández

Honduras, 6 de diciembre de 1997

El autor concede al Zamorano permiso para reproducir y distribuir copias de este trabajo para fines educativos. Para otras personas físicas y jurídicas se reservan los derechos del autor.

Ever Adalberto Hernández Hernández

Honduras, 6 de diciembre de 1997

**EVALUACIÓN DE TOXINAS DE *Bacillus thuringiensis*
EN *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

Por

Ever Adalberto Hernández Hernández

Aprobada:

Allan J. Hruska, Ph.D.
Asesor Principal

Michael Zeiss, Ph. D.
Cordinador PIA – DPV

Sarah Gladstone, Ph.D.
Asesor

Allan J. Hruska, Ph.D.
Jefe de Departamento DPV

Ronald D. Cave, Ph.D.
Asesor

Antonio Flores, Ph.D.
Decano Académico

Keith Andrews, Ph.D.
Director

DEDICATORIA

En primer lugar a Dios todopoderoso por haberme dado la fuerza e iluminación necesaria para salir adelante y poder confiar en mi.

A mis Padres Jorge y Elba por todo el amor, confianza y apoyo incondicional que me han brindado. Por enseñarme a valorar el trabajo y al mismo tiempo ayudarme a comprender que algunas veces los sacrificios son necesarios para poder cumplir una meta. Además, por haber sido siempre la estrella que guía mi camino ya que son el mejor ejemplo que cualquier hijo podría desear.

A mis Hermanos Jorge, Yonaldy y mi Cuñada Maricarmen por toda su ayuda, comprensión y apoyo en todo momento. A mis Ahijados Jorge Carlos y Jorge Manuel por ser aquella luz que siempre alegra mi vida.

A mis Abuelos Fidel e Isabel por haberme permitido ocupar un lugar muy especial en sus corazones, por todo su cariño y consejos tan oportunos en mi formación personal y profesional.

AGRADECIMIENTOS

Es difícil poder extender un agradecimiento cuando han sido tantas las personas que han contribuido en mi formación personal y profesional, sin embargo hay algunas personas a las cuales quisiera agradecer especialmente por haberme ayudado de una u otra forma a cumplir con esta meta.

A las dos familias Hernández (Abuelos, tíos abuelos, tíos, primos y sobrinos) por todo su apoyo, cariño y palabras de aliento en todo momento.

A la familia Palma García por haberme dado un hogar en este país, por todo su respaldo y por todas sus finas atenciones para conmigo.

Al Dr. Allan Hruska por su colaboración como asesor principal y por haberme demostrado ser no sólo un excelente consejero sino siempre un amigo. A la Dra. Sally Gladstone por su trato tan especial y por su valiosa ayuda en la realización de este trabajo.

Al Dr. Ronald Cave por haberme facilitado el laboratorio para la realización de los bioensayos y por su ayuda en la corrección de este documento. Al Dr. Fred Gould por facilitarme las toxinas para la investigación y al Ing. Mario Bustamante por su amistad, sus consejos y palabras de aliento.

A NIEM por todo su cariño, comprensión y por estar siempre en el lugar indicado cuando más lo necesitaba.

A todo el personal docente y de trabajo de campo de Zamorano, que a diario convivió conmigo y que me permitieron aprender de sus conocimientos y experiencias.

A todos mis compañeros del DPV y PIA en general, en especial a Iván, Fidel, Inti, Amilcar, Sandra, Julio, Bertha, Tanya, René, Francisco, Carlos, Diego, Hermes, Oscar, J. F. Pagán y J. F. Pérez por haberme permitido formar más que una amistad y por toda su ayuda, les deseo muchos éxitos.

Al Zamorano:

Por todos los conocimientos adquiridos y por enseñarme que la excelencia se encuentra dentro de uno mismo y que todos somos capaces de desarrollarla.

Por permitir que deje cuatro años de mi vida en este lugar y por cumplir uno de mis grandes anhelos: ser Ing. Agr. Zamorano. Muchas gracias.

AGRADECIMIENTOS A PATROCINADORES

A mi Familia por haberme ayudado durante estos cuatro años de estudio.

A la Decanatura Académica de Zamorano y a la Fundación W. K. Kellogg por ayudarme a financiar mis estudios durante el Programa de Agronomía.

A la Decanatura Académica de Zamorano, al Departamento de Protección Vegetal y a la Compañía Monsanto por ayudarme a financiar mis estudios del Programa de Ingeniería Agronómica.

RESUMEN

La mayoría de genes transferidos a plantas transgénicas han sido derivados de la bacteria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), la cual confiere a las plantas la capacidad de producir cristales proteínicos de características insecticidas. Para poder introducir esta tecnología en centroamérica es necesario evaluar el efecto de las toxinas *Bt* en las principales plagas de cultivos de alta importancia económica en la región. En el presente trabajo se evaluó el efecto de las siguientes toxinas *Bt*: Cry IA(b), Cry IA(c), Cry IC, Cry IF, Cry IIA y tres combinaciones de toxinas (Cry IA(c)-IC, Cry IA(c)-IF y Cry IC-IF) en el gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). Los objetivos de este fueron identificar las toxinas o combinaciones que causan mayor mortalidad en *S. frugiperda* y comparar la concentración y el tiempo letal medio de estas (CL_{50} y TL_{50}), determinar el efecto de las toxinas y combinaciones en el crecimiento de las larvas y evaluar la sobrevivencia y el efecto en el crecimiento bajo una exposición de cinco días. Se realizaron tres bioensayos. En el primero se evaluaron ocho concentraciones de 0.00128 a 100 $\mu\text{g/ml}$. En el segundo siete concentraciones de 2 a 128 $\mu\text{g/ml}$. En el tercero sólo la concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$. La toxina Cry IF causó mayor mortalidad y disminución en crecimiento que Cry IC, Cry IA(c)-IF y Cry IC-IF, que también produjeron efectos significativos en la mortalidad y el crecimiento de larvas. Sin embargo, no hubo diferencia entre las CL_{50} de estas cuatro. Las toxinas Cry IA(b), Cry IA(c), Cry IIA y la combinación Cry IA(c)-IC produjeron niveles de mortalidad muy bajos. La tasa de mortalidad de Cry IF fue afectada al reducir el tiempo de exposición a cinco días y Cry IA(c)-IF fue la que menos se vio afectada. El efecto en crecimiento fue similar al exponer cinco o quince días, con excepción de la toxina Cry IA(c).

INDICE GENERAL

Portada	i
Derechos de autor.....	ii
Página de firmas.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
AGRADECIMIENTOS A PATROCINADORES.....	vi
RESUMEN.....	vii
INDICE GENERAL.....	viii
INDICE DE FIGURAS.....	x
INDICE DE ANEXOS.....	xi
I. INTRODUCCION.....	1
II. MATERIALES Y METODOS.....	5
2.1 PREPARACION DE LA DIETA.....	5
2.2 BIOENSAYOS.....	5
2.2.1 Bioensayo 1: Efecto de cinco toxinas y tres combinaciones en la mortalidad y crecimiento de larvas de <i>S. frugiperda</i>	6
2.2.2 Bioensayo 2: Concentraciones intermedias.....	7
2.2.3 Bioensayo 3: Efecto de una exposición de cinco días a las toxinas y combinaciones en la mortalidad y crecimiento de larvas de <i>S. frugiperda</i>	8
2.3 ANALISIS DE RESULTADOS.....	8

III.	RESULTADOS.....	10
3.1	BIOENSAYO 1: EFECTO DE CINCO TOXINAS Y TRES COMBINACIONES EN LA MORTALIDAD Y EL CRECIMIENTO DE LARVAS DE <i>S. frugiperda</i>	10
3.1.1	Efecto de cinco toxinas y tres combinaciones en la mortalidad de larvas de <i>S. frugiperda</i>	10
3.1.2	Efecto de cinco toxinas y tres combinaciones en el crecimiento de larvas de <i>S. frugiperda</i>	15
3.2	BIOENSAYO 2: CONCENTRACIONES INTERMEDIAS.....	18
3.2.1	Concentración letal media (CL ₅₀).....	18
3.2.2	Tiempo letal (TL ₅₀ y TL ₉₀).....	15
3.3	BIOENSAYO 3: EFECTO DE UNA EXPOSICIÓN DE CINCO DIAS A LAS CINCO TOXINAS <i>Bt</i> Y TRES COMBINACIONES.....	19
3.3.1	Efecto de una exposición de cinco días a las toxinas y combinaciones en la mortalidad de larvas de <i>S. frugiperda</i>	19
3.3.2	Efecto de una exposición de cinco días a las toxinas y combinaciones en el crecimiento de larvas de <i>S. frugiperda</i>	20
IV.	DISCUSION.....	21
V.		
VI.	CONCLUSIONES.....	24
VII.		
VIII.	RECOMENDACIONES.....	25
IX.		
X.	BIBLIOGRAFIA.....	26
XI.		
XII.	ANEXOS.....	29

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Pag
1	Cristales de proteínas insecticidas y su especificidad de acción.....	2
2	Toxinas, combinaciones y concentraciones utilizadas en el bioensayo 1.....	7
3	Toxinas, combinaciones y concentraciones utilizadas en el bioensayo 2.....	8
4	Mortalidad (%) por concentración, de las toxinas y las combinaciones a los quince días de exposición.....	11
5	Análisis de varianza del promedio de mortalidad (%) de tres concentraciones (100, 20 y 4 µg/ml) de las toxinas y combinaciones, en la mortalidad de larvas de <i>S. frugiperda</i>	12
6	Mortalidad promedio (%) de tres concentraciones (100, 20 y 4 µg/ml) de las toxinas y combinaciones en larvas de <i>S. frugiperda</i>	12
7	Análisis de varianza del peso promedio (g) de larvas de <i>S. frugiperda</i> a los 15 días de exposición a las toxinas <i>Bt</i> y sus combinaciones.....	15
8	Peso (g) promedio de larvas de <i>S. frugiperda</i> a los 15 días de exposición a las toxinas <i>Bt</i> y sus combinaciones	15
9	Peso (g) promedio de larvas de <i>S. frugiperda</i> a los 15 días de exposición por concentración de las toxinas y combinaciones.....	17
10	Concentración letal media de dos toxinas <i>Bt</i> y dos combinaciones.....	18
11	Tiempo (días) necesario para matar el 50 % de la población de larvas de <i>S. frugiperda</i> bajo cuatro diferentes concentraciones de dos toxinas <i>Bt</i> y dos combinaciones.....	18
12	Tiempo (días) necesario para matar el 90 % de la población de larvas de <i>S. frugiperda</i> bajo cuatro diferentes concentraciones de dos toxinas <i>Bt</i> y dos combinaciones.....	19
13	Mortalidad (%) provodada por la concentración de 20 µg/ml de las toxinas y combinaciones bajo dos períodos de exposición.....	19
14	Peso (g) promedio de larvas de <i>S. frugiperda</i> bajo dos períodos de exposición A la concentración de 20 µg/ml, de las toxinas y combinaciones.....	20

INDICE DE FIGURAS

Figura	Pag
1 Efecto de las concentraciones de toxinas y combinaciones en la mortalidad de larvas de <i>S. frugiperda</i> a los 5 días de exposición.....	13
2 Efecto de las concentraciones de toxinas y combinaciones en la mortalidad de larvas de <i>S. frugiperda</i> a los 10 días de exposición.....	14
3 Efecto de las concentraciones de toxinas y combinaciones en la mortalidad de larvas de <i>S. frugiperda</i> a los 15 días de exposición.....	14
4 Efecto de las concentraciones de toxinas y combinaciones en el peso de larvas de <i>S. frugiperda</i> a los 15 días de exposición.....	16

INDICE DE ANEXOS

Anexo		Pag
1	Tipos de genes de las δ -endotoxinas, rango de acción y especificidad a hospederos.....	30
2	Registro de mortalidad de larvas de <i>S. frugiperda</i> a los quince días de exposición a las toxinas Cry IA(c), Cry IA(b), Cry IC y Cry IF (Bioes. 1).....	31
3	Registro de mortalidad de larvas de <i>S. frugiperda</i> a los quince días de exposición a la toxina Cry IIA y las combinaciones Cry IA(c)-IF y Cry IC-IF (Bioensayo 1).....	32
4	Registro de los pesos de larvas de <i>S. frugiperda</i> a los quince días de exposición a las toxinas Cry IA(c), Cry IA(b), Cry IC, Cry IF y Cry IIA (Bioensayo 1).....	33
5	Registro de los pesos de larvas de <i>S. frugiperda</i> a los quince días de exposición a la toxina Cry IA(c) y las combinaciones Cry IA(c)-IF y Cry IC-IF (Bioensayo 1).....	34
6	Registro de mortalidad de larvas de <i>S. frugiperda</i> a los quince días de exposición a las toxinas Cry IC, Cry IF y las combinaciones Cry IA(c)-IF y Cry IC-IF (Bioensayo 2).....	35
7	Registro de mortalidad de larvas de <i>S. frugiperda</i> diez días después de un período de exposición de cinco días a las toxinas Cry IA(c), Cry IA(b), Cry IC Cry IF y Cry IIA y las combinaciones Cry IA(c)-IC, Cry IA(c)-IF y Cry IC-IF (Bioensayo 3).....	36
8	Registro de los pesos (g) de larvas de <i>S. frugiperda</i> diez días después de un período de exposición de cinco días a las toxinas Cry IA(c), Cry IA(b), Cry IC Cry IF y Cry IIA y las combinaciones Cry IA(c)-IC, Cry IA(c)-IF y Cry IC-IF (Bioensayo 3).....	37
9	Análisis de varianza de los porcentajes de mortalidad de las réplicas de la toxina Cry IA(c).....	38
10	Análisis de varianza de la concentración letal media de las toxinas Cry IC, Cry IF y las combinaciones Cry IA(c)-IC y Cry IA(c)-IF.....	39

I. INTRODUCCION

El maíz es uno de los cultivos de mayor importancia para la región centroamericana ya que es un producto básico dentro del hábito alimenticio de la población. El control de plagas en este cultivo es fundamental, debido a que algunas de estas pueden provocar daños muy severos en las distintas etapas fenológicas de este cultivo.

La principal plaga del maíz en centroamérica es el gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). Este es un insecto lepidóptero que en su estado larval corta los tallos de plántulas a nivel del suelo, destruye los cogollos de plantas jóvenes y retrasa el crecimiento en plantas mayores (King y Saunders, 1984). Un estudio reciente en Nicaragua señala que cuando el 55 a 100% de las plantas están infestadas, las pérdidas pueden oscilar entre un 15 a un 73% (Hruska y Gould, 1997). La alta magnitud que alcanzan dichas pérdidas ha originado una constante búsqueda de diversas tácticas de controles culturales, biológicas y químicas que contribuyan a disminuir o detener su grave ataque.

La ingeniería genética ha desarrollado en los últimos años una de las alternativas más promisorias e innovadoras del siglo al producir cultivos agrícolas con genes que presentan resistencia o toxicidad contra insectos. En la actualidad, esta tecnología ha sido implementada exitosamente en Estados Unidos y Canadá en los cultivos de algodón, maíz, tomate y papa (Ely, 1993), donde la mayoría de los transgenes han sido derivados de la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Berliner) (*Bt*). Dichos cultivos, denominados cultivos *Bt*, expresan en sus tejidos los genes de la bacteria para producir cristales proteínicos de características insecticidas (Hruska, 1997).

Según Toenniessen (1997), estos cultivos transgénicos representan una gran esperanza para los países en desarrollo, ya que pueden contribuir en la disminución de los peligros a la salud y los daños al medio ambiente (ocasionados por el uso excesivo de plaguicidas) y al aumento de producción y rendimientos en muchos de los pequeños productores que no están empleando controles de plagas efectivos.

Bacillus thuringiensis es una bacteria gram positiva que se encuentra en el suelo bajo condiciones naturales con una persistencia y reproducción muy bajas, lo cual influye en su capacidad de afectar organismos susceptibles en el ambiente (Weinzerl y Henn, 1997). Firmin *et al.* (1994) confirman la baja adaptabilidad de esta bacteria en el ambiente en formulaciones de *Bt*, al encontrar que la luz ultravioleta combinada con la precipitación puede afectar su persistencia, siendo más estable bajo la obscuridad.

Actualmente se han identificado muchas cepas de *Bt* como por ejemplo *berliner* 1715, *kurstaki* HD-1, *aizawai* 7.29, *morrisoni* PG14, *tenebrionis*, *san diego*, *thomsoni* e *israelensis*. Estas cepas difieren en su composición (genes) y espectro de acción de los cristales proteínicos que poseen.

Las toxinas que produce *Bt* varían mayormente en su estructura, en cuanto a rangos de similaridad en la secuencia de aminoácidos. Por esta razón se dividen en cinco tipos de acuerdo al modo de acción y especificidad sobre las plagas:

- Delta-endotoxinas (δ).
- Beta-exotoxinas (β).
- Alpha-exotoxinas (α).
- Toxina antibiótica bacteriana
- Toxina de factor ratón.

El interés sobre esta bacteria se ha dado principalmente, por su capacidad de producir las δ -endotoxinas y se ha incrementado en los últimos años, pues se han descubierto nuevas actividades tóxicas contra muy diversos grupos de organismos (Cuadro 1). Las δ -endotoxinas están codificadas por distintas clases de genes, cuya especificidad varía para determinados tipos de plagas (Quintero, 1995) y puede llegar a variar incluso entre especies de un mismo género (Lereclus *et al.*, 1993) (Anexo 1).

Cuadro 1. Cristales de proteínas insecticidas (CPI) y su especificidad de acción.

CPI	Especificidad
Cry I	Lepidópteros
Cry II	Dípteros y lepidópteros
Cry III	Coleópteros
Cry IV	Dípteros
Cry V	Nemátodos
Cry VI	Nemátodos

Fuente: Quintero, 1995.

Las toxinas se insertan en la membrana del intestino medio donde causan una ruptura de los gradientes eléctricos de potasio y un aumento del pH de la hemolinfa. La mortalidad resulta del desequilibrio del contenido básico hipotónico del intestino medio y la hemolinfa (Castillo *et al.*, 1995). Los síntomas que se observan en los insectos son: cese de la ingesta, parálisis del intestino y tracto alimenticio, vómito, diarrea, parálisis total y finalmente la muerte que ocurre en una a siete horas en hospederos muy susceptibles y de dos a siete días en los menos susceptibles. Algunas veces la muerte resulta de septicemia después de la germinación de esporas vivas en el intestino.

Los productos derivados de *Bt* se han utilizado casi por tres décadas en la agricultura como insecticidas microbiales, siendo aceptados como productos biodegradables y de uso seguro para los humanos. Sin embargo, se han presentado ciertas limitantes sobre esta forma de protección de cultivos que permiten considerar el potencial de las plantas para expresar δ -endotoxinas a partir de la introducción de genes de *Bt* (Ely, 1993). Uno de estos aspectos es la protección del cultivo durante todo el ciclo, aún cuando son plagas que se encuentran dentro de la planta (barrenadores específicamente) y además no necesitan de condiciones ambientales específicas.

En su mayoría, los cultivos *Bt* han sido desarrollados para plagas que son claves en otras regiones y no se han evaluado aquellas que son de alta importancia económica en centroamérica. Por esta razón es necesario investigar cuales de estas toxinas producidas por la bacteria afectan este complejo de plagas, donde una de las principales es el gusano cogollero. Esta investigación permitiría a los genetistas, estudiar la posibilidad de introducir genes que codifican para la producción de las toxinas en plantas de maíz u otros cultivos ya adaptados a nuestras condiciones.

Nyouki *et al.* (1996) estudiaron el efecto de interacciones de esporas y δ -endotoxinas en *S. frugiperda* y *Pseudoplusia includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae), utilizando cuatro productos de *Bt* subespecie *kurstaki*: Dipel 2XTM (Cry IA(a), CryA(b), Cry IA(c) y Cry IIA), MVPTM, MYXTM (ambos basados en Cry IA(b) y Cry IA(c)) y MYDTM que es una formulación de esporas sin δ -endotoxinas. Las concentraciones utilizadas variaron con los productos: Dipel (835 a 7,500 $\mu\text{g/g}$ de dieta), MVPTM (21 a 125,000 $\mu\text{g/g}$ de dieta), MYXTM (105 a 100,000 $\mu\text{g/g}$ de dieta) y MYDTM (100 a 10,000 $\mu\text{g/g}$ de dieta). En la segunda fase de este estudio solamente se evaluó una concentración de MYDTM. Las concentraciones de MYXTM y MVPTM fueron dos veces más altas que las del ensayo preliminar.

Gardner (1988) encontró un efecto de sinergismo entre *Bt* y sus β -exotoxinas causando mortalidad en larvas de tercero y cuarto estadio de *S. frugiperda*, utilizando como fuente el Dipel WP (16,000 UI/mg).

Olivares (1997) realizó un estudio muy similar en *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Pyralidae), evaluando las toxinas Cry IA(b), Cry IA(c), Cry IC, Cry IF y Dipel® 4L con nueve concentraciones en un rango de 20 a 0.000256 $\mu\text{g/ml}$ de dieta. Se calculó la CL₅₀ de las toxinas y se encontró que Cry IA(c) y Cry IA(b) causaron mayor mortalidad en las concentraciones de 20 y 4 $\mu\text{g/ml}$. Además, las cuatro toxinas causaron una disminución en el desarrollo de las larvas en estas dos concentraciones más altas.

Por otro lado, se han realizado estudios en otros lepidópteros, investigando la susceptibilidad de insectos como *Heliothis virescens* (F.) y *Helicoverpa zea* (Boddie) a productos comerciales como Dipel y a la toxina IA(c) (Stone y Sims, 1993). También se han evaluado interacciones de *Bt* con productos fagoestimulantes en otros insectos plagas como: *H. zea*, *Lymantria dispar* (L.), *Ostrinia nubilalis* (Hübner) y *Plutella xylostella* (L.) (Farrar, 1995).

Una de las principales razones que impulsan la realización de estudios constantemente con *Bt* es que algunos insectos han desarrollado resistencia a las toxinas que produce dicha bacteria. Los insectos presentan muchas estrategias de adaptación. Pueden adaptar su proceso digestivo a nuevas plantas, desarrollar nuevos hábitos alimenticios o preferencias de palatabilidad, colonizar áreas con nuevas especies de plantas de las cuales pueden alimentarse o desarrollar mecanismos de desintoxicación para neutralizar las toxinas de las plantas (Harborne, 1988).

Gould (1997) señala que en la actualidad los estudios genéticos más completos de resistencia han sido conducidos usando la palomilla de los granos (*Plodia interpunctella* (Hubner) (Lepidoptera: Pyralidae)), la palomilla dorso de diamante (*P. xylostella*) y el bellotero del tabaco (*H. virescens*) por el alto nivel de resistencia que han alcanzado. Sin embargo, alrededor de diez especies más han demostrado su capacidad de desarrollar resistencia bajo condiciones experimentales de laboratorio.

El presente estudio forma parte de un proceso de adaptación de la tecnología de plantas transgénicas en centroamérica. La finalidad de todo este proceso es ofrecer a los agricultores una nueva alternativa que bajo un “programa de manejo adecuado”, pueda contribuir en el aumento de sus rendimientos y que brinde una mayor seguridad a la salud humana al disminuir las aplicaciones de plaguicidas en el ambiente. Dicho proceso va a requerir mucho tiempo en llevarse a cabo y se va a necesitar la colaboración de muchas instituciones de investigación, sector privado, educacionales e incluso gubernamentales para el desarrollo de plantas o cultivos transgénicos adaptados a la región.

En este trabajo se evaluaron cinco diferentes toxinas *Bt* sobre el gusano cogollero del maíz, estas fueron: Cry IA(b), Cry IA(c), Cry IC, Cry IF, Cry IIA y tres combinaciones de estas (Cry IA(c)-IC, Cry IA(c)-IF y Cry IC-IF). Los objetivos fueron: en primer lugar identificar las toxinas individuales o combinaciones de mayor letalidad para *S. frugiperda* y comparar la concentración letal media (CL₅₀) y el tiempo letal medio (TL₅₀) de estas. En segundo lugar determinar el efecto de las toxinas y combinaciones en el crecimiento o desarrollo de las larvas. Finalmente, se pretendió evaluar la capacidad de recuperación o sobrevivencia de larvas después de haber sido sometidas por un período de cinco días a las toxinas y combinaciones, así como el efecto en el crecimiento.

II. MATERIALES Y METODOS

El experimento se realizó en el Centro para el Control Biológico en Centro América (CCBCA) del Departamento de Protección Vegetal de Zamorano (Escuela Agrícola Panamericana). Los ensayos se ubicaron en un cuarto con dimensiones de 2.5 x 2.5 x 2.7 m de altura. Se utilizó un higrómetro para medir la temperatura y la humedad relativa que en promedio fueron de 27°C y 88%, respectivamente. El fotoperíodo bajo el cual se llevó a cabo fue de 12:12 horas (luminosidad:obscuridad).

Las larvas utilizadas en el experimento se obtuvieron del CCBCA, donde se maneja una cría de una raza nativa de Zamorano. En esta cría, las larvas se colocan en una dieta artificial (Green *et al.*, 1976). Cuando empupan se clasifican por tamaño y se distribuyen en jaulas para que al eclosionar los adultos puedan reproducirse y ovipositar.

2.1 PREPARACIÓN DE LA DIETA

Para todos los bioensayos se utilizó la dieta creada por Green *et al.* (1976), la cual es específica para larvas de lepidópteros. Para preparar la dieta se dejaban en remojo por un día 250 g de soya y 200 g de arroz (en grano) en 3400 ml de agua. Posteriormente se llevaba a ebullición, donde se agregaban 80 g de agar. Se mezclaban bien y se adicionaban 200 g de levadura, 200 g de proteína de soya y 140 g de caseína. Una vez que estos ingredientes estaban mezclados se apagaba la estufa y se agregaban los últimos ingredientes en este orden: 20 g de vitaminas, 18 g de ácido ascórbico, 9 g de ácido sórbico, 15 g de metil parabenceno, 250 mg de tetraciclina, 18 ml de formalina (al 40%) y 3 g de benlate.

Esta mezcla se pasaba a una licuadora de capacidad de 5 l donde se tenía por 3 minutos hasta lograr una mezcla homogénea. El siguiente paso era la adición de la toxina que fue la variante en la realización de los bioensayos.

2.2 BIOENSAYOS

Las toxinas *Bt* utilizadas en las pruebas fueron proporcionadas por el Dr. Fred Gould del Departamento de Entomología de la Universidad Estatal de Carolina del Norte, Raleigh. Dichas toxinas tenían las siguientes concentraciones: Cry IA(b) 15 g/l, Cry IA(c) 12.5 g/l, Cry IC 7.7 mg/g, Cry IF 15.0 g/l y Cry IIA 263.2 mg/ml.

Para la realización de los bioensayos se recolectaron masas de huevos de la cría del CCBCA y se repartieron en vasitos plásticos de 1 onza (Bio Serv¹), donde permanecieron hasta eclosionar. En este momento, sin haber sido sometidas a ningún tipo de alimentación previa, cada pequeña larva fue transferida individualmente a un vasito con la dieta más su tratamiento respectivo (toxinas individuales o combinaciones de estas a una concentración determinada).

Cada concentración se conformó por una cajilla plástica con capacidad para treinta vasitos de 1 onza. En cada vasito se colocó una larva, obteniendo entonces treinta larvas de primer estadio por réplica.

Para todas las pruebas, se realizaron tres repeticiones y para detectar diferencias en las replicas entre tratamientos por efecto de manejo o de la preparación de dieta, se utilizó un control que fue la toxina Cry IA(c).

En los bioensayos, las concentraciones más altas se obtuvieron utilizando la fórmula: $C_o * V_o = C_f * V_f$, donde: C_o es la concentración inicial de la toxina, V_o el volumen o cantidad de toxina a adicionar para obtener una cantidad de dieta (V_f) con una concentración determinada (C_f).

En cada vasito se colocó aproximadamente 6.7 ml de dieta artificial con su respectivo tratamiento. Una vez que la dieta tomaba una consistencia sólida se colocaba una larva por cada vasito con un pincel desinfectado con alcohol al 95% y se cerraba bien con tapas de cartón².

Se midió la mortalidad de larvas a los 5, 10 y 15 días después de haberlas transferido. En esta última fecha, se pesaron las larvas sobrevivientes en grupos de cinco a diez, en una balanza de 1 mg de precisión para determinar algún efecto de las toxinas en su desarrollo.

2.2.1 Bioensayo 1: Evaluación de cinco toxinas y tres combinaciones en la mortalidad y crecimiento de larvas de *S. frugiperda*.

Se dividió el bioensayo en dos fases, evaluando un total de ocho tratamientos (Cuadro 2). En la primera fase se evaluaron cinco toxinas individualmente y en la segunda fase, para identificar si existía sinergismo entre toxinas se realizaron tres combinaciones, utilizando aquellas que tuvieron un buen efecto en la mortalidad o el crecimiento de las larvas en la primera etapa del ensayo. Los niveles de tratamiento fueron ocho concentraciones³ más el testigo.

¹ Bio Serv, P.O.BOX 450. Frenchtown, N.J. 08825. Phone 908-996-2155. FAX 908-996-4123

² Tapaderas de cartón para copas plásticas #410 de 1 onza.

³ En el caso de las combinaciones de toxinas, las concentraciones se obtuvieron utilizando el 50% de cada toxina para poder llegar a las cantidades listadas en cada nivel.

Cuadro 2. Toxinas, combinaciones y concentraciones utilizadas en el bioensayo 1.

Tratamientos	Concentraciones ($\mu\text{g/ml}$)
Fase 1: Toxinas individuales	100
Cry IA(b)	20
Cry IA(c)	4.0
Cry IC	0.8
Cry IF	0.16
Cry IIA	0.032
Fase 2: <i>Combinaciones de toxinas</i>	0.0064
Cry IA(c) – Cry IC	0.00128
Cry IA(c) – Cry IF	0 (Testigo)
Cry IC – Cry IF	

Una vez que la dieta estaba preparada, se adicionó la toxina con una micropipeta de 10 a 100 μl , agregando según la concentración de la toxina, una cantidad específica para obtener la concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$ en cierta cantidad de dieta. Esto se hacía en una licuadora con capacidad para 1.25 l por 2 minutos.

De la dilución obtenida, 200 ml eran colocados en los 30 vasitos del nivel de 20 $\mu\text{g/ml}$. Otros 200 ml se distribuían en el nivel de 20 $\mu\text{g/ml}$ del bioensayo 3 y los 50 ml restantes se mezclaban con 200 ml de dieta sin toxina para obtener la concentración menor de 4 $\mu\text{g/ml}$. De esta forma, diluyendo 50 ml de la concentración obtenida en 200 ml de dieta sin toxina, se realizaban una serie de diluciones posteriores que permitían obtener las concentraciones menores a partir de las mayores, guardando siempre la relación de 1 a 5. El último paso era la adición de toxina para obtener la concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$. De esta forma se ahorra toxina ya que se necesitaba una menor cantidad de toxina para el nivel de 20 $\mu\text{g/ml}$ que se usó en dos bioensayos (1 y 3).

2.2.2 Bioensayo 2: Concentraciones intermedias

En dos de las combinaciones de toxinas en el bioensayo 1, se presentó una alta mortalidad en los niveles mayores. A pesar de esto, la gama de concentraciones utilizadas no fue adecuada para estimar la concentración letal media (CL_{50}) por medio de un análisis Probit. Por esta razón y con el objeto de validar los resultados del bioensayo 1, se llevó a cabo un nuevo ensayo con concentraciones intermedias no sólo para las dos combinaciones sino también para las dos toxinas individuales más efectivas (Cuadro 3), y así determinar si las CL_{50} de estas era diferente. Se utilizaron siete concentraciones más el testigo.

Cuadro 3. Toxinas, combinaciones y concentraciones utilizadas en el bioensayo 2.

Tratamientos	Concentraciones ($\mu\text{g/ml}$)
Toxinas individuales	128
Cry IC	64
Cry IF	32
<i>Combinaciones de toxinas</i>	16
Cry IA(c) – Cry IF	8
Cry IC – Cry IF	4
	2
	0 (Testigo)

La preparación de la dieta con toxina fue similar al bioensayo 1. La relación de las diluciones en este caso fue de 1 a 2, osea que de la dilución de 128 $\mu\text{g/ml}$ se colocaban 200 ml en los treinta vasitos de dicho nivel y los otros 200 ml se mezclaban con 200 ml de dieta sin toxina para obtener la concentración menor y así sucesivamente hasta llegar al nivel de 2 $\mu\text{g/ml}$.

La mortalidad de larvas se midió siempre a los 5, 10 y 15 días, pero además, se hicieron mediciones a los 3, 7, 9, 11 13 y 15 días para poder estimar el TL_{50} con mayor precisión.

2.2.3 Bioensayo 3: Efecto de una exposición de cinco días a las toxinas y combinaciones en la mortalidad y crecimiento de larvas de *S. frugiperda*.

Simultáneamente con el bioensayo 1, se realizó otra prueba para determinar si una larva podría recuperarse y sobrevivir después de haber sido sometida por cinco días a las toxinas. Se aplicaron los mismos ocho tratamientos (cinco toxinas individuales y tres combinaciones), pero en este sólo se utilizó la concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$ más el testigo. Como se mencionó en el bioensayo 1, 200 ml de la dilución inicial fueron utilizados para el nivel de 20 $\mu\text{g/ml}$ del bioensayo 3.

Se midió la sobrevivencia de larvas a los 5 días, fecha en la cual eran transferidas a una dieta normal sin toxina para evaluar posteriormente la mortalidad a los 10 y a los 15 días. Al día 15 siempre se pesaron las larvas sobrevivientes.

2.3 ANALISIS DE RESULTADOS

Todas las pruebas estadísticas aplicadas en los resultados obtenidos (Anexo 2-8), se realizaron en el “Sistema de Análisis Estadístico” (SAS Institute, 1989). En los bioensayos, no fue necesario hacer un ajuste en base a la toxina Cry IA(c) que se utilizó como control o estándar ya que los porcentajes de mortalidad y disminución en peso fueron estadísticamente similares entre las réplicas (Anexo 9). Las larvas que desaparecieron en los ensayos, no fueron tomadas en cuenta en el total de larvas expuestas en cada nivel.

En el bioensayo 1 se analizaron únicamente los porcentajes de mortalidad de las tres concentraciones más altas (100, 20 y 4 $\mu\text{g/ml}$) para la comparación entre toxinas. Esto se debió a que algunas toxinas presentaron inconsistencia en los resultados de las concentraciones menores a 4 $\mu\text{g/ml}$. Para determinar el efecto de las toxinas y concentraciones en la mortalidad de *S. frugiperda*, se realizó un análisis de varianza bifactorial (ANDEVA) y un análisis de contrastes. Además, se hizo una prueba de separación de medias por diferencia mínima significativa con la prueba Student Newman Keuls (SNK).

El análisis de contrastes se realizó para determinar en primer lugar, si es mejor utilizar las toxinas individuales o en combinaciones para matar las larvas de cogollero. En segundo lugar, identificar cual de las dos toxinas individuales más efectivas fue mejor (Cry IF y Cry IC). Se hizo otro contraste dentro de las combinaciones, comparando las que tenían la toxina Cry IF contra las que no la tenían para identificar si esta toxina es quien determina la mayor toxicidad. En el último contraste se compararon las dos combinaciones con Cry IF para identificar cual toxina (Cry IA(c) y Cry IC), presenta más sinergismo con Cry IF.

En cuanto al análisis del crecimiento de las larvas se hizo un ANDEVA bifactorial, un análisis de contrastes y una separación de medias con la prueba SNK (para toxinas y concentraciones). Debido a que las concentraciones del bioensayo 1, no fueron adecuadas para estimar la concentración letal media (CL_{50}) de las combinaciones Cry IA(c)-IF y Cry IC-IF, se realizó el bioensayo 2 para determinar la CL_{50} con el programa Probit de la Agencia de Protección al Medio Ambiente (EPA, versión 1.5). Para determinar diferencias entre las CL_{50} se realizó un ANDEVA. Además, se estimó el tiempo letal (TL_{50} y TL_{90}) ubicando los puntos correspondientes en el gráfico de mortalidad en el tiempo.

Para el bioensayo 3 se realizó un ANDEVA y una prueba de separación de medias con SNK, para determinar los efectos de una exposición de cinco días a las toxinas y combinaciones en la mortalidad y crecimiento de cogollero. Además, se hizo un análisis de contrastes pero para comparar el efecto de una exposición de cinco días con el efecto de una exposición de quince días.

III. RESULTADOS

Las larvas al ser colocadas en la dieta con toxina mostraron una reacción de repulsión en las toxinas más efectivas y en las concentraciones más altas (Cry IC, Cry IF y las dos combinaciones con Cry IF). En algunos casos se observó un efecto “antialimentario”, dónde las larvas se ubicaron en la parte alta de los vasitos plásticos o en las tapaderas de cartón y no sobre la dieta con toxina.

Muchas larvas si consumieron la dieta con las toxinas, ocasionándoles un efecto letal, pero más a mediano y largo plazo. Sin embargo, en algunas larvas que si se alimentaron de la dieta con toxina y no murieron, hubo una disminución en el desarrollo debido al bajo consumo de alimento. Estas observaciones coinciden con los efectos de las toxinas *Bt* en larvas de lepidópteros, señalados por Quintero (1995).

En las toxinas que fueron poco efectivas (Cry IA(b), Cry IIA y Cry IA(c) en las concentraciones bajas) las larvas se alimentaron logrando un buen desarrollo.

3.1 BIOENSAYO 1: EVALUACION DE CINCO TOXINAS Y TRES COMBINACIONES EN LA MORTALIDAD Y EL CRECIMIENTO DE LARVAS DE *S. frugiperda*

3.1.1 Efecto de cinco toxinas y tres combinaciones en la mortalidad de *S. frugiperda*

En la primera fase (evaluación de las cinco toxinas individuales), las toxinas Cry IF y Cry IC produjeron los porcentajes de mortalidad más altos (Cuadro 4).

En base a estos resultados, se realizaron tres combinaciones de toxinas en la segunda fase, las cuales fueron: Cry IC-IF, Cry IA(c)-IC y Cry IA(c)-IF. Las combinaciones de Cry IC-IF y Cry IA(c)-IF, demostraron un efecto de sinergismo al producir en las dos concentraciones más altas, una mayor mortalidad en las larvas de cogollero que la combinación de Cry IA(c)-IC.

Cuadro 4. Mortalidad (%) por concentración de las toxinas Cry IA(b) (a), Cry IA(c) (b), Cry IC (c), Cry IF (d), Cry IIA (e) y las combinaciones Cry IA(c)-IC (f), Cry IA(c)-IF (g) y Cry IC-IF (h) a los 15 días de exposición.

Concentración (µg/ml)	Mortalidad (%)	Concentración (µg/ml)	Mortalidad (%)	Concentración (µg/ml)	Mortalidad (%)
0.00128	10.1*a	100	23.5*a	20	81.0*a
20	8.0 a	20	16.0 a	100	78.0 a
100	7.9 a	0.8	5.7 a	4	41.2 bc
0.8	6.9 a	0.16	4.5 a	0.8	20.0 c
0.16	6.9 a	4	4.0 a	0.0064	13.3 c
4	5.6 a	0.032	3.9 a	0.00128	8.9 c
0.032	1.1 a	0.0064	3.9 a	0.16	8.1 c
0.0064	1.1 a	0 (Testigo)	2.9 a	0 (Testigo)	6.7 c
0 (Testigo)	1.1 a	0.00128	1.2 a	0.032	5.6 c

(a) Cry IA(b)

(b) Cry IA(c)

(c) Cry IC

Concentración (µg/ml)	Mortalidad (%)	Concentración (µg/ml)	Mortalidad (%)	Concentración (µg/ml)	Mortalidad (%)
20	99.6*a	0.16	11.5*a	100	45.0*a
100	93.0 a	100	8.9 a	20	24.0 ab
4	59.0 b	4	7.8 a	0.032	10.2 b
0.8	29.0 c	0.032	4.6 a	4	10.0 b
0.16	15.7 c	0.8	4.5 a	0.16	9.0 b
0.00128	6.7 c	0 (Testigo)	4.5 a	0.8	6.7 b
0.0064	4.5 c	20	3.5 a	0.00128	5.6 b
0 (Testigo)	2.4 c	0.0064	3.4 a	0.0064	4.5 b
0.032	2.2 c	0.00128	2.3 a	0 (Testigo)	2.2 b

(d) Cry IF

(e) Cry IIA

(f) Cry IA(c)-IC

Concentración (µg/ml)	Mortalidad (%)
100	95.0*a
20	76.0 a
4	23.0 b
0.8	18.0 b
0.032	11.1 b
0.00128	10.3 b
0.0064	4.5 b
0.16	10.0 b
0 (Testigo)	1.2 b

(g) Cry IA(c)-IF

Concentración (µg/ml)	Mortalidad (%)
100	94.0*a
20	56.0 b
4	18.0 c
0.8	10.0 c
0.16	4.6 c
0 (Testigo)	3.5 c
0.0064	3.4 c
0.00128	3.4 c
0.032	2.2 c

(h) Cry IC-IF

* Medias seguidas por la misma letra, dentro de la misma columna, no son significativas a un nivel de probabilidad del 5% según la prueba SNK.

Se detectaron diferencias altamente significativas ($P < 0.0001$), al comparar los porcentajes de mortalidad causados por las cinco toxinas individuales y las tres combinaciones, en las tres concentraciones mayores (100, 20 y 4 $\mu\text{g/ml}$) (Cuadro 5). En este análisis, el modelo utilizado fue capaz de explicar el 90% de la variabilidad entre los resultados ($R^2 = 0.902197$).

Cuadro 5. Análisis de varianza del promedio de tres concentraciones (100, 20 y 4 $\mu\text{g/ml}$) de las toxinas y combinaciones, en la mortalidad de larvas de *Spodoptera frugiperda*.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Pr > 0.05
Toxina	8	12.013	1.5016	48.88	0.0001
Réplica	2	0.0731	0.0731	2.38	0.1280
Concentración	2	2.6190	1.3095	42.63	0.0001
Toxina*Concentración	16	1.9174	0.1198	3.90	0.0001
Error	61	1.8739	0.0307		
Contrastes					
Comb's vs Ind's(^)	1	0.4389	0.4389	14.29	0.0004
Dentro de Ind's, IF vs IC	1	1.2189	1.2189	39.68	0.0001
Comb's con IF vs sin IF	1	0.1609	0.1609	5.24	0.0256
IA(c)-IF vs IC-IF	1	4.9088	4.9088	159.79	0.0001

^ Comb's = Combinaciones de toxinas Ind's = Toxinas individuales

Los niveles de mortalidad más altos se obtuvieron con la toxina Cry IF (Cuadro 6), la cual sobrepasó la mortalidad causada por el testigo en un 87%. Los porcentajes de mortalidad originados por las combinaciones Cry IA(c)-IF y Cry IC-IF y la toxina Cry IC, fueron estadísticamente similares entre sí, pero significativamente diferentes al efecto de los tratamientos Cry IA(c)-IC, Cry IA(c), Cry IA(b) y Cry IIA, de los cuales solamente la combinación difirió del testigo.

Cuadro 6. Mortalidad promedio (%) de tres concentraciones (100, 20 y 4 $\mu\text{g/ml}$) de las toxinas y combinaciones en larvas de *S. frugiperda*.

Tratamiento	Mortalidad (%)
Cry IF	90.01*a
Cry IA(c)-IF	72.18 b
Cry IC	68.06 b
Cry IC-IF	60.46 b
Cry IA(c)-IC	22.54 c
Cry IA(c)	12.48 cd
Cry IA(b)	5.14 d
Cry IIA	4.14 d
Testigo	2.84 d

*Promedios seguidos con la misma letra dentro de la misma columna no son significativos a un nivel de probabilidad del 5% según la prueba SNK.

Existen diferencias significativas entre usar las toxinas individuales o combinadas. La toxina Cry IF es quien determina la toxicidad en las combinaciones ya que hay una diferencia significativa entre usar combinaciones con esta toxina y sin ella. Por otro lado, las toxinas Cry IA(c) y Cry IC utilizadas en combinaciones, también tienen un efecto sobre la mortalidad de larvas siempre y cuando estén combinadas con Cry IF.

El patrón de mortalidad en todas las toxinas disminuyó gradualmente a partir de la concentración de 100 µg/ml hasta el nivel de 4 µg/ml. En algunas toxinas como Cry IA(c), Cry IA(b), Cry IIA y la combinación Cry IA(c)-IC, debajo de 4 µg/ml, se observó inconsistencia en los resultados al obtenerse una menor mortalidad de larvas en niveles más altos comparada con los más bajos.

El número de larvas muertas aumentó a medida que se extendió el período de exposición. A los cinco días, se observó cuáles toxinas y combinaciones fueron más tóxicas con respecto a los tratamientos menos efectivos (Figura 1). En este período, las toxinas Cry IA(c), Cry IA(b) y Cry IIA no provocaron más de un 10% de mortalidad. Sin embargo la toxina Cry IC provocó una mortalidad de 11-56% en los tres niveles más altos, al igual que Cry IF que causó una mortalidad de 25-65% en dichos niveles. La combinación más efectiva fue Cry IC-IF que obtuvo una mortalidad de 72% en el nivel de 100 µg/ml, seguida de Cry IA(c)-IF que causó un 70% en la misma concentración. La combinación que menor efecto tuvo fue Cry IA(c)-IC que en la concentración más alta, produjo solamente un 32% de mortalidad.

Producción de grano de fréjol terciopelo

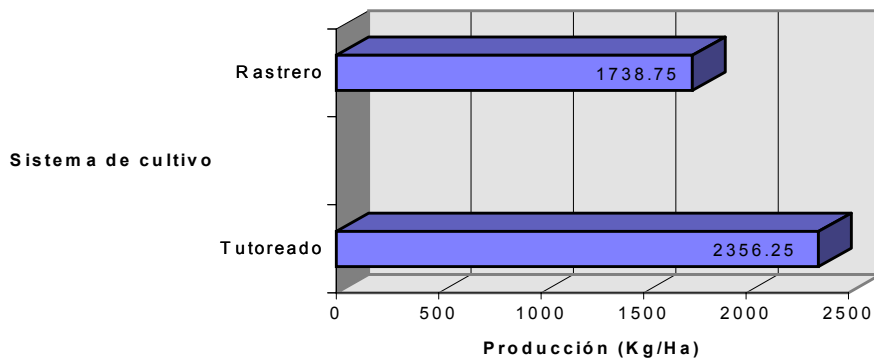
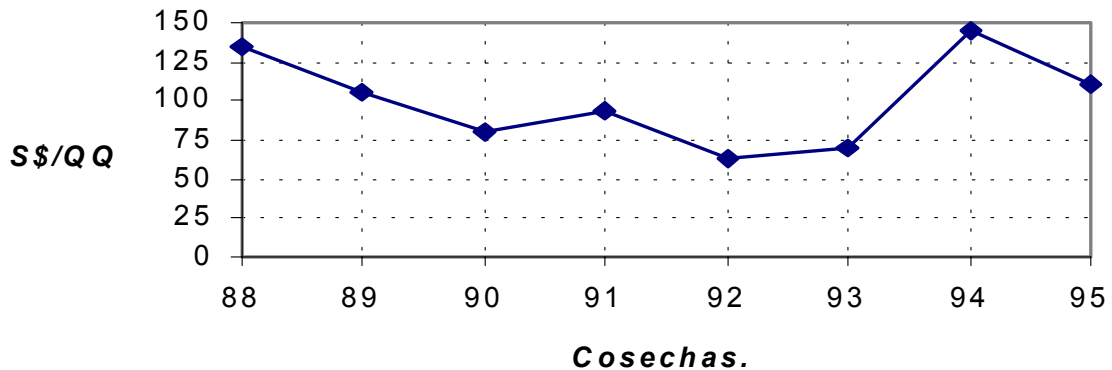


Figura 1. Efecto de las concentraciones de toxinas y combinaciones en la mortalidad de *Spodoptera frugiperda* a los 5 días de exposición.

Al décimo día se obtuvieron los mayores incrementos en mortalidad de larvas, con excepción de las toxinas Cry IA(b) y Cry IIA que no sobrepasaron ni el 10% (Figura 2). La toxina Cry IF alcanzó un 92 y 89% de larvas muertas en las concentraciones de 20 y 100 µg/ml, respectivamente. Cry IC aumentó su efecto hasta un 75% y la combinación



Cry IA(c)-IC también incrementó, pero en una menor proporción que las otras dos combinaciones (18% con respecto al día cinco, en el nivel más alto). Las combinaciones Cry IC-IF y Cry IA(c)-IF, produjeron una mortalidad de larvas de 91 y 95%, respectivamente, pese a poseer solamente la mitad de la concentración de cada toxina.

Figura 2. Efecto de las concentraciones de toxinas y combinaciones en la mortalidad de *Spodoptera frugiperda* a los 10 días de exposición.

Al día 15 el porcentaje de mortalidad siguió incrementando pero en una proporción mucho menor con respecto al décimo día de exposición. La toxina Cry IF alcanzó un 99% de mortalidad, seguido por las combinaciones Cry IA(c)-IF y Cry IC-IF con 95 y 94%, respectivamente (Figura 3).

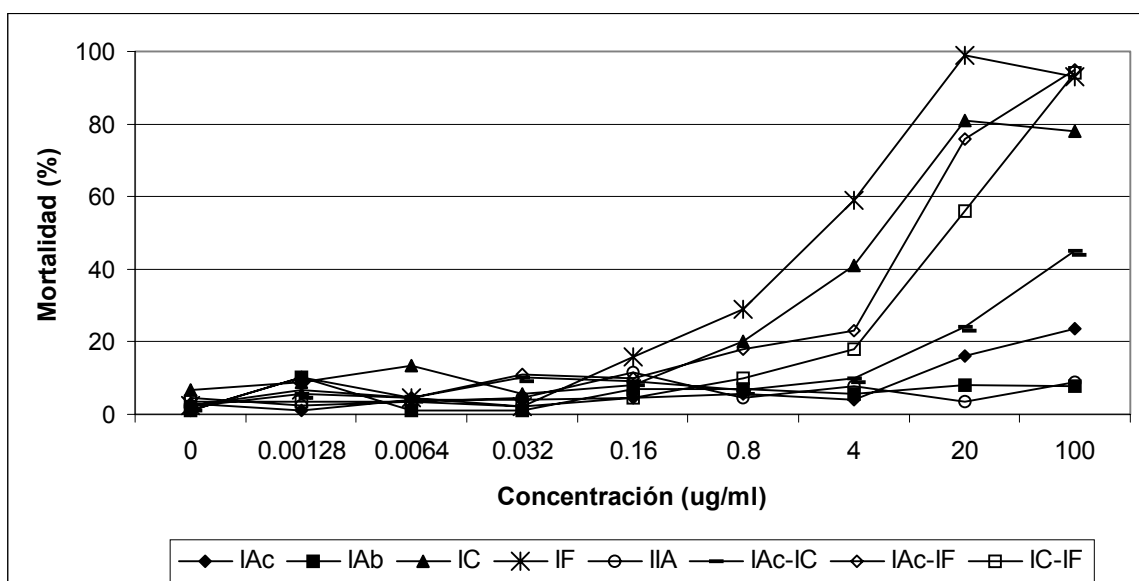


Figura 3. Efecto de las concentraciones de toxinas y combinaciones en la mortalidad de *S. frugiperda* a los 15 días de exposición.

El efecto letal en las combinaciones Cry IA(c)-IF y Cry IC-IF, se presentó solamente en las concentraciones más altas, a diferencia de las toxinas Cry IF y Cry IC cuyo patrón de mortalidad disminuyó gradualmente hacia las concentraciones más bajas. En general las concentraciones que difirieron significativamente ($P < 0.05$), de las demás fueron las de 100 µg/ml en los tratamientos Cry IF, Cry IA(c)-IF, Cry IC-IF y el nivel de 20 µg/ml de la toxina Cry IF.

3.1.2 Efecto de cinco toxinas y tres combinaciones en el crecimiento de *S. frugiperda*

En el experimento se encontraron diferencias altamente significativas en el desarrollo de las larvas entre las toxinas y combinaciones (Cuadro 7). El modelo utilizado fue capaz de explicar un 85% de la variabilidad expresada en los resultados ($R^2 = 0.845318$).

Cuadro 7. Análisis de varianza del peso promedio (g) de larvas de *S. frugiperda* a los 15 días de exposición a las toxinas *Bt* y sus combinaciones.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Pr > F
Toxina	8	1.6806	0.2101	42.59	0.0001
Concentración	7	1.7432	0.2490	50.49	0.0001
Toxina*Concentración	55	0.7711	0.0140	2.84	0.0001
Error	161	0.7941	0.0049		
Contrastes					
IF vs IC	1	0.0204	0.0204	4.14	0.0435
IA(c)-IF vs IC-IF	1	0.0052	0.0052	1.06	0.3047

La toxina que se diferenció de las demás, causando la mayor disminución en el desarrollo fue Cry IF. Esta logró reducir el peso de las larvas en un 71%, comparado con el peso de larvas que crecieron en dieta normal sin toxina o testigo (Cuadro 8).

Cuadro 8. Peso (g) de larvas de *S. frugiperda* a los 15 días de exposición a las toxinas *Bt* y sus combinaciones.

<i>Toxina</i>	Peso (g)
Testigo	0.3620 *a
Cry IIA	0.3496 a
Cry IA(b)	0.3285 a
Cry IA(c)	0.2415 b
Cry IA(c)-IC	0.2397 b
Cry IC	0.1975 bc
Cry IA(c)-IF	0.1746 c
Cry IC-IF	0.1710 c
Cry IF	0.1057 d

*Promedios seguidos con la misma letra no son significativos a un nivel de probabilidad

del 5% según la prueba SNK

La reducción del crecimiento ocasionada por las dos combinaciones con Cry IF (52%) fue significativamente diferente al testigo y los demás tratamientos, con excepción de Cry IC. Sin embargo, la disminución del desarrollo causada por Cry IC (45%), Cry IA(c) (33%) y la combinación de ambas (24%), no fue significativamente diferente entre sí, pero sí lo fue con respecto al testigo. Los efectos de las toxinas Cry IA(b) y Cry IIA en el peso de las larvas, fueron los únicos que no fueron significativamente diferentes del testigo.

La relación entre concentraciones de toxinas o sus combinaciones y el peso de larvas de *S. frugiperda* fue inversamente proporcional (Figura 4). Con excepción de las toxinas Cry IIA y Cry IA(b), todos los tratamientos mantuvieron un patrón de disminución en peso a partir del testigo, hasta la concentración más alta (100 µg/ml).

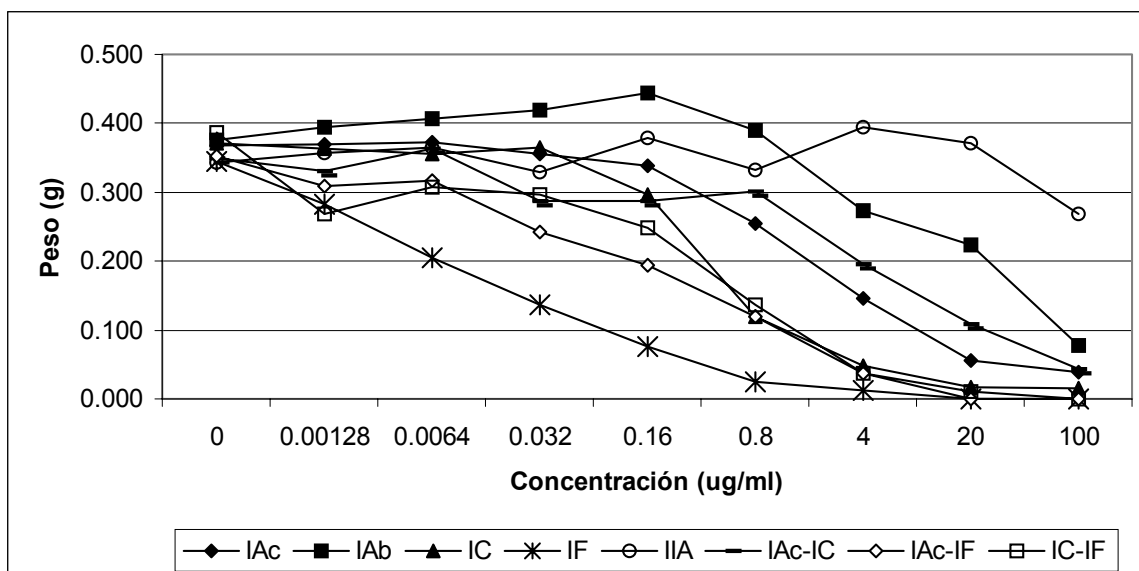


Figura 4. Efecto de las concentraciones de toxinas y combinaciones en el peso de larvas de *Spodoptera frugiperda* a los 15 días de exposición

En el análisis por concentraciones, no se encontraron diferencias significativas entre los pesos de los testigos en todos los tratamientos y repeticiones. Además, todas las toxinas

con excepción de Cry IIA, en el nivel de 100 µg/ml causaron una disminución significativa del crecimiento de las larvas (Cuadro 9).

Cuadro 9. Peso (g) promedio de larvas de *S. frugiperda* a los 15 días de exposición, por cada concentración de las toxinas Cry IA(b) (a), Cry IA(c) (b), Cry IC (c), Cry IF (d), Cry IIA (e) y las combinaciones Cry IA(c)-IC (f), Cry IA(c)-IF (g) y Cry IC-IF.

Concentración (µg/ml)	Peso (g)	Concentración (µg/ml)	Peso (g)	Concentración (µg/ml)	Peso (g)
100	0.0773 *a	100	0.0395 *a	100	0.0157 *a
20	0.2233 ab	20	0.0558 a	20	0.0173 a
4	0.2730 ab	4	0.1463 ab	4	0.0480 a
0 (Testigo)	0.3763 b	0.8	0.2548 b	0.8	0.1190 ab
0.8	0.3897 b	0.16	0.3387 b	0.16	0.2960 bc
0.00128	0.3947 b	0.032	0.3555 b	0.032	0.3560 c
0.0064	0.4070 b	0 (Testigo)	0.3680 b	0.00128	0.3630 c
0.032	0.4197 b	0.00128	0.3690 b	0.0064	0.3650 c
0.16	0.4437 b	0.0064	0.3720 b	0 (Testigo)	0.3713 c

(a) Cry IA(b)

(b) Cry IA(c)

(c) Cry IC

15 Concentración (µg/ml)	Peso (g)	Concentración (µg/ml)	Peso (g)	Concentración (µg/ml)	Peso (g)
100	0.0000 *a	100	0.2690 *a	100	0.0443 *a
20	0.0000 a	0.032	0.3300 a	20	0.1090 ab
4	0.0127 a	0.8	0.3323 a	4	0.1953 abc
0.8	0.0253 a	0 (Testigo)	0.3427 a	0.8	0.3023 bc
0.16	0.0730 a	0.00128	0.3563 a	0.16	0.2867 bc
0.032	0.1367 ab	0.0064	0.3647 a	0.032	0.2877 bc
0.0064	0.2057 ab	20	0.3720 a	0.00128	0.3297 c
0.00128	0.2830 b	0.16	0.3783 a	0 (Testigo)	0.3500 c
0 (Testigo)	0.3443 b	4	0.3943 a	0.0064	0.3627 c

(d) Cry IF

(e) Cry IIA

(f) Cry IA(c)-IC

16 Concentración (µg/ml)	Peso (g)
100	0.0010 *a
20	0.0075 ab
4	0.0370 ab
0.8	0.1187 ab
0.16	0.1947 abc
0.032	0.2417 bc
0.00128	0.3090 bc
0.0064	0.3157 bc
0 (Testigo)	0.3517 c

(g) Cry IA(c)-IF

Concentración (µg/ml)	Peso (g)
100	0.0085 *a
20	0.0113 a
4	0.0370 a
0.8	0.1363 ab
0.16	0.2483 bc
0.032	0.2960 bc
0.0064	0.3073 bc
0.00128	0.2687 bc
0 (Testigo)	0.3857 c

(h) Cry IC-IF

* Medias seguidas por la misma letra, dentro de la misma columna, no son significativas a un nivel de probabilidad del 5% según la prueba SNK.

3.2 BIOENSAYO 2: CONCENTRACIONES INTERMEDIAS

3.2.1 Concentración letal media (CL₅₀)

La toxina Cry IF fue la que obtuvo la menor concentración letal media, seguida por las dos combinaciones y la toxina Cry IC (Cuadro 10). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre las CL₅₀ de las toxinas Cry IF, Cry IC y las dos combinaciones Cry IA(c)-IF y Cry IC-IF (Anexo 10). El modelo fue capaz de explicar aproximadamente el 80% de la variabilidad entre los datos ($R^2 = 0.798266$).

Cuadro 10. CL₅₀ de dos toxinas *Bt* y dos combinaciones en larvas de *S. frugiperda*.

Toxina	CL ₅₀ (µg/ml de dieta)
Cry IC	11.555
Cry IC-IF	8.234
Cry IA(c)-IF	6.143
Cry IF	3.249

3.2.2 Tiempo letal (TL₅₀ y TL₉₀)

Las toxinas Cry IF y Cry IC-IF, son capaces de producir la muerte del 50% de las larvas más rápido que Cry IC y Cry IA(c)-IF (Cuadro 11). Sin embargo, el efecto letal de Cry IF puede adelantarse al de Cry IC-IF en las concentraciones de 32 y 16 µg/ml. La toxina Cry IC en una concentración de 16 µg/ml necesita un período de exposición mayor de quince días para matar el 50% de las larvas.

Cuadro 11. Tiempo (días) necesario para matar el 50 % de la población de *S. frugiperda* bajo cuatro diferentes concentraciones de dos toxinas *Bt* y dos combinaciones.

Toxina	Concentraciones			
	128 (µg/ml)	64 (µg/ml)	32(µg/ml)	16 (µg/ml)
Cry IC	4.1 días	5.0 días	6.7 días	> 15 días
Cry IF	3.5 días	4.6 días	5.6 días	5.8 días
Cry IC-IF	3.7 días	4.4 días	6.6 días	7.8 días
Cry IA(c)-IF	4.2 días	5.2 días	6.7 días	9.3 días

La combinación Cry IC-IF en una concentración de 128 µg/ml es capaz de matar el 90% de las larvas en tan sólo cinco días de exposición, incluso más rápido que Cry IF (Cuadro 12). No obstante, Cry IF es la única toxina cuyo efecto letal en el 90% de la población se encuentra en un período de seis a nueve días (entre la concentración mayor y la menor), ya que todas las toxinas a la concentración de 16 µg/ml necesitan más de quince días para matar el 90% de las larvas.

Cuadro 12. Tiempo necesario para matar el 90 % de la población de *S. frugiperda* bajo cuatro diferentes concentraciones de dos toxinas Bt y dos de sus combinaciones.

Toxina	Concentraciones			
	128 ($\mu\text{g/ml}$)	64 ($\mu\text{g/ml}$)	32 ($\mu\text{g/ml}$)	16 ($\mu\text{g/ml}$)
Cry IC	6.8 días	7.8 días	> 15 días	> 15 días
Cry IF	6.1 días	6.4 días	7.6 días	9.2 días
Cry IC-IF	5.0 días	6.8 días	11.7 días	> 15 días
Cry IA(c)-IF	5.8 días	6.9 días	10.7 días	> 15 días

3.3 BIOENSAYO 3: EFECTO DE UNA EXPOSICION DE CINCO DIAS A LAS TOXINAS Y COMBINACIONES

3.3.1 Efecto de una exposición de cinco días a las toxinas y combinaciones en la mortalidad de larvas de *S. frugiperda*.

La única toxina donde se detectaron diferencias entre el período de exposición de cinco y quince días fue Cry IF, la cual puede aumentar la tasa de mortalidad en 40% al prolongar el período de exposición (Cuadro 13). Las demás toxinas y combinaciones, producen efectos similares al exponerse cinco o quince días.

Cuadro 13. Mortalidad (%) provocada por la concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$ de de las toxinas y combinaciones bajo dos períodos de exposición.

Tratamiento	Corta exposición (5 días)	Exposición continua (15 días)
Cry IA(c)-IF	75.67 a	83.61 a
Cry IF	59.12 *a	99.67 b
Cry IC	34.52 a	80.70 a
Cry IC-IF	24.26 a	56.44 a
Cry IA(c)-IC	14.31 a	21.90 a
Cry IA(c)	10.93 a	22.06 a
Cry IA(b)	3.79 a	5.20 a
Cry IIA	1.48 a	1.14 a

* Medias seguidas por la misma letra dentro de la misma fila no son significativas a un nivel de probabilidad del 5% según la prueba SNK.

La combinación de Cry IA(c)-IF fue el tratamiento que obtuvo la menor reducción del porcentaje de mortalidad con respecto a la exposición continua durante quince días, lo cual indica que las larvas no tienen capacidad de recuperarse.

3.4.2 Efecto de una exposición de cinco días a las toxinas y combinaciones en el crecimiento de larvas de *S. frugiperda*

La única toxina que presentó una diferencia significativa entre ambos períodos de exposición fue Cry IA(c). Las demás toxinas y combinaciones pueden tener un efecto similar bajo ambos períodos de exposición.

Cuadro 14. Peso (g) promedio de larvas de *S. frugiperda* bajo dos períodos de exposición a la concentración de 20 µg/ml de las toxinas *Bt* y sus combinaciones.

Tratamiento	Corta exposición (5 días)	Exposición continua (15 días)
Cry IF	0.037 * a	0.000 a
Cry IA(c)-IF	0.133 a	0.005 a
Cry IC	0.129 a	0.017 a
Cry IC-IF	0.133 a	0.011 a
Cry IA(c)-IC	0.279 a	0.109 a
Cry IA(c)	0.277 a	0.027 b
Cry IA(b)	0.324 a	0.223 a
Cry IIA	0.422 a	0.372 a

* Medias seguidas por la misma letra dentro de la misma fila no son significativas a un nivel de probabilidad del 5%, según la prueba SNK.

IV. DISCUSION

Varios investigadores han estudiado en otras especies de *Spodoptera* spp. el efecto de las toxinas evaluadas en el presente estudio. Visser *et al.* (1990) encontraron una alta susceptibilidad en larvas de *Spodoptera exigua* (Hübner) a las toxinas Cry IC y Cry IF; que fueron dos de las toxinas que causaron mayor mortalidad en *S. frugiperda*. No encontraron ningún efecto de la toxina Cry IA(c), pero sí una baja actividad de Cry IA(b), lo cual no se dio en *S. frugiperda*. Estos resultados son muy importantes, pero muchas veces las condiciones de laboratorio no asemejan bien las del campo, por lo cual sería mejor evaluar estas toxinas en larvas recolectadas directamente del campo y de diferentes estadios para determinar si se da el mismo efecto que en el laboratorio. Esto contribuiría a tomar una decisión sobre recomendar la introducción de los genes de esta toxina en variedades de maíz adaptadas a la región.

Van Rie *et al.* (1989) reportan que la toxina Cry IC tiene un efecto muy activo en larvas de *Spodoptera littoralis* (Boisd.), y al igual que en *S. frugiperda*, las toxinas Cry IA(b) y Cry IA(c) tampoco provocan ningún efecto en la mortalidad. Por otro lado, en una tabla presentada por Frankenhuyzen (1993), donde hace una recopilación de varias investigaciones, no reporta ninguna actividad de la toxina Cry IIA en especies de *Spodoptera* spp, pero sí lo hace para otros lepidópteros como *H. virescens*, *L. dispar*, *T. ni* y varias especies de Diptera y Coleoptera. Este factor es importante desde el punto de vista de manejo integrado de plagas, ya que se deberían de evaluar estas toxinas en otras plagas de importancia en el cultivo del maíz como el gusano elotero (*H. zea*).

La baja actividad que demostraron las toxinas Cry IA(b), Cry IA(c) y Cry IIA en *S. frugiperda* demuestra por qué algunos productos de *Bt* como Dipel no ejercen un buen control de esta plaga al ser aplicados en el campo. Con relación a esto, Nyouki *et al.* (1996) realizaron un estudio con el producto Dipel 2XTM, formulado en base a las toxinas Cry IA(a), Cry IA(b), Cry IA(c) y Cry IIA, dónde aún con una dosis alta de 1000 µg/ml de dieta, no pudo matar más del 12.5% de las larvas expuestas. Si bien es cierto, en este estudio las toxinas Cry IF, Cry IC, Cry IA(c)-IF y Cry IC-IF tuvieron efectos positivos en *S. frugiperda*, falta todavía más investigación para poder utilizarlas con fines de control. Al realizar estudios posteriores, se debe partir de las concentraciones que demostraron algún efecto en este experimento e investigar si las larvas sobrevivientes después de los quince días son capaces de empupar y de reproducirse normalmente.

Es importante reconocer que el hecho que se pueda encontrar una toxina de base proteínica y que se pueda poner en una planta adecuada, no significa que se ha resuelto el problema de plagas en los cultivos (Gould, 1997). Los insectos tienen una gran capacidad de adaptarse por lo que es necesario estudiar su capacidad de desarrollar resistencia a estas toxinas. Esto puede contribuir al establecimiento de un programa de manejo de resistencia que permita retardar este proceso y al mismo tiempo, buscar nuevas alternativas de control de las poblaciones de esta plaga.

Dentro de estas alternativas, se debería investigar algún tipo de relación entre *Bt* y otros organismos como enemigos naturales o microorganismos como el virus de la poliedrosis nuclear (VPN). Además, sería de mucha importancia determinar el efecto que podría tener una aplicación de un químico suave a larvas que han sido afectadas en su desarrollo por las toxinas *Bt*, pero siempre dentro del contexto de manejo integrado de plagas.

Desde el punto de vista de manejo de resistencia, un resultado muy importante en este estudio es el sinergismo de las toxinas Cry IC y Cry IA(c) con Cry IF y más aún, que no existió diferencia entre las CL_{50} de las cuatro toxinas más efectivas (Cry IC, Cry IF, Cry IA(c)-IF y Cry IC-IF). Esto está muy relacionado con una estrategia fundamental en el manejo de resistencia utilizada por la compañía Monsanto. En esta, se busca una diversificación de fuentes de mortalidad para que una plaga retrase su proceso de desarrollo de resistencia y que su adaptación sea más despacio al tener más de un mecanismo letal. Sin embargo, existen evidencias de que algunas plagas han desarrollado resistencia a toxinas *Bt* después de la primera selección por una sola toxina, lo cual disminuye la posibilidad de tener éxito con esta táctica.

En el caso de *Bt* la mortalidad no es una variable determinante, ya que el modo de acción de las toxinas en el interior de la larva, permite que se de un proceso que avanza lentamente hasta que esta muere. El mayor interés en este caso, se encuentra en que la larva deja de alimentarse, lo cual se ve reflejado rápidamente en la disminución del desarrollo o crecimiento. Esta situación, desde el punto de vista de un productor es muy efectiva, ya que la larva se encuentra prácticamente muerta pues ha dejado de comer y por consecuencia también se ha detenido el daño al cultivo y las pérdidas del productor.

Un aspecto que se debe de considerar muy bien a este punto es si las toxinas van a poder expresarse en los tejidos de las plantas en la misma proporción de los bioensayos. Gelernter (1992) señala que cuando la proteína *Bt* se expresa en un organismo recombinado, se ha demostrado un aumento de persistencia y actividad insecticida.

Ya existen variedades de maíz *Bt* que tienen la capacidad de expresar en sus tejidos las toxinas *Bt* en un buen rango de concentraciones (Gould⁴, 1997, comunicación personal). Por ejemplo, la toxina Cry IA(b) es capaz de expresarse en diferentes partes de la planta. En las hojas puede alcanzar niveles de 25 $\mu\text{g/g}$ de materia seca en algunas variedades y 100 $\mu\text{g/g}$ de materia seca en otras. Es importante reconocer que estos niveles no se mantienen constantes durante todo el ciclo del cultivo, sino que varían de acuerdo a sus distintas etapas y generalmente van disminuyendo, pero hasta niveles suficientemente altos como para causar un efecto letal o en el desarrollo de la plaga.

En los bioensayos, se determinó que las toxinas más efectivas a partir del nivel de 0.8 $\mu\text{g/ml}$ de dieta causaron una disminución significativa del crecimiento de las larvas; incluso la toxina Cry IF a un nivel de 0.0064 $\mu\text{g/ml}$ de dieta, puede causar este efecto. Estos son niveles bastante bajos de expresión, que si se logran obtener en una planta podría contribuir al manejo de *S. frugiperda* en maíz, ya que la larva dejaría de alimentarse del cultivo y posiblemente muera posteriormente.

⁴ Fred Gould, Phd. Entomology Department, North Carolina State University. Box 7634. Raleigh, NC 27695. Tel: (919) 515-1647, Fax: (919) 515-2824. E-mail: fred_gould@ncsu.edu

Monsanto recomienda la distribución de semilla *Bt* con semilla normal en los campos, como una forma para mantener los genes de susceptibilidad en las poblaciones de plagas y retrasar el desarrollo de resistencia. El cuestionamiento principal a esto es que si una larva de *S. frugiperda* que se alimentó de una planta de maíz transgénica puede sobrevivir al pasar a una planta normal. En el bioensayo de exposición de cinco días, se pudo determinar que existe una disminución en los porcentajes de mortalidad causados por las toxinas al reducir el tiempo de exposición. Sin embargo, el efecto en el crecimiento sigue siendo significativo lo que indica que si una larva sobrevive, siempre va a verse afectada en su desarrollo. Un caso muy particular fue la combinación Cry IA(c)-IF, la cual demostró que una larva de cogollero que se expone por un período corto de tiempo, va a sufrir un efecto similar al que le hubiera sucedido bajo una exposición continua. Por el contrario, Cry IF demostró que su toxicidad aumenta significativamente, a medida que se alarga el período de exposición.

La tecnología de plantas transgénicas es un hecho que se va acercando más a nuestra realidad cada día. Actualmente, existen estudios realizados en los Estados Unidos que demuestran la factibilidad económica del uso de cultivos *Bt*, ya que se incurre en un ahorro significativo en los costos de fitoprotección, aunque se tenga que invertir un poco más en la semilla. Dichos cultivos no se han introducido legalmente en Mesoamérica, pero es muy probable que muy pronto puedan estar disponibles para la región; haciéndose necesario entonces, que se investigue su viabilidad económica y que cuanto antes se establezcan e implementen políticas reguladoras en cada país para asegurar su uso adecuado (Whalon y Norris, 1997).

V. CONCLUSIONES

Existen alternativas para el control de *S. frugiperda* dentro de todo el complejo de toxinas que produce *B. thuringiensis*. Una de estas es la toxina Cry IF, la cual produjo los niveles más altos de mortalidad y la mayor disminución en el desarrollo de las larvas en todos los bioensayos. Estos resultados, sólo se pueden generalizar para este insecto y no para otras especies.

La toxina Cry IC y las combinaciones de Cry IA(c)-IF y Cry IC-IF son menos tóxicas que Cry IF, pero también tienen un efecto significativo en la mortalidad y crecimiento de las larvas. En las combinaciones, la toxina que determina la toxicidad es Cry IF, y dentro de estas la más efectiva es Cry IA(c)-IF. Para matar el 50% de una población de larvas de *S. frugiperda*, se puede usar cualquiera de estas toxinas o combinaciones, pero es preferible usar Cry IF por tener una CL_{50} más baja y por provocar un efecto letal mucho más rápido que las demás toxinas (3.5 a 5.8 días).

Si se busca una tasa de mortalidad del 90%, se pueden utilizar las toxinas Cry IF, Cry IC, Cry IA(c)-IF y Cry IC-IF en un rango de concentraciones de 64 a 128 $\mu\text{g/ml}$. Ahora bien, si el nivel de expresión fuese de 16 a 32 $\mu\text{g/ml}$, la única toxina capaz de producir este efecto letal es Cry IF, mientras que las otras tres necesitarán más de quince días para producirlo.

La toxina Cry IF en concentraciones de 0.16 a 4 $\mu\text{g/ml}$, es capaz de reducir el peso de las larvas en un 80 y 96.5%, respectivamente, y en concentraciones mayores a 4 $\mu\text{g/ml}$ produce una mortalidad de casi un 100%. De todas las toxinas y combinaciones evaluadas, Cry IIA es la única incapaz de reducir el peso de las larvas en ninguna de las concentraciones, las demás a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$, ocasionaron reducciones de más de un 80%. Por otro lado, las toxinas Cry IC, Cry IC-IF y Cry IA(c)-IF en concentraciones de 4 a 20 $\mu\text{g/ml}$, junto con Cry IA(c) a 20 $\mu\text{g/ml}$, pueden reducir el peso más de un 87%.

En el caso de la exposición de cinco días a las toxinas, solamente las larvas sometidas a la toxina Cry IF tienen capacidad de recuperarse y reducir significativamente su tasa de mortalidad, no obstante, en cuanto al crecimiento el efecto sigue siendo igual en todas las toxinas.

Las toxinas Cry IF, Cry IC y las combinaciones Cry IA(c)-IF y Cry IC-IF pueden ser consideradas con un gran potencial para introducirse en plantas transgénicas y lograr los niveles de expresión necesarios para causar mortalidad en cogollero o una disminución en su desarrollo.

VI. RECOMENDACIONES

En primer lugar se deben de hacer más investigación antes de utilizar las toxinas con fines de control. Dentro de esta, se tienen estudios de resistencia y experimentación con larvas recolectadas directamente del campo y de diferentes estadios. Esto puede servir a tener una visión más clara del efecto de estas toxinas y así recomendar la introducción de los genes de estas toxinas en variedades de maíz adaptadas a la región.

Es necesario establecer un programa de manejo de resistencia para el uso de estas toxinas ya que un mal uso de estas puede permitir a los insectos desarrollar resistencia rápidamente y acabar con todos los beneficios que puede ofrecer esta tecnología. Una sugerencia para estudios posteriores es partir de las concentraciones que mostraron un efecto en este experimento e investigar si las larvas después de los quince días son capaces de empupar y de reproducirse normalmente. Además, sería de mucha utilidad monitorear con mayor precisión el momento en que las larvas dejan de consumir la dieta y cuando mueren.

Se recomienda investigar el efecto de *Bt* con enemigos naturales o con microorganismos como el virus de la poliedrosis nuclear (VPN). Se debe seguir investigando efectos de sinergismo entre otras toxinas y desde el punto de vista de manejo integrado de plagas, se deberían evaluar estas toxinas en otras plagas importantes de maíz como el gusano elotero.

VII. BIBLIOGRAFIA

- Castillo, P., N. Acosta y A. Ciliezar. 1995. Control microbiológico de plagas artrópodos. pag 51-72. En: R. Cave (ed.). Manual para la enseñanza del control biológico en América Latina. Zamorano Academic Press. Honduras.
- Ely, S. 1993. The engineering of plants to express *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins. pag 105-124. En: P.F. Entwistle, J.S. Cory, M. J. Bailey y S. Higgs (eds). *Bacillus thuringiensis*, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice. Wiley. England.
- Farrar, R.R. y R.L. Ridgway. 1995. Enhancement of activity of *Bacillus thuringiensis* Berliner against four Lepidopterous insect pests by nutrient-based phagoestimulants. *Journal of Entomological Science* 30(1): 29-42.
- Firmin, F.R. y R. Fuxa. 1994. Persistence of natural and genetically engineered insecticides based on *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Entomological Science* 29(3): 347-356.
- Gardner, W.A. 1988. Enhanced activity of selected combinations of *Bacillus thuringiensis* and Beta-Exotoxin against Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Journal of Economic Entomology* 81(2): 463-469.
- Gelernter, W.D. 1992. Application of biotechnology for improvement of *Bacillus thuringiensis* based products and their use for control of Lepidopteran pests in the Caribbean. *Florida Entomologist* 75(4): 487-492.
- Gould, F. 1997. Integración de plantas plaguicidas, creados por la Ingeniería Molecular, a la agricultura mesoamericana. Pag 7-39. En: A.J. Hruska y M. Lara (eds.). *Plantas Transgénicas *Bacillus thuringiensis* en la Agricultura Mesoamericana*. Zamorano Academic Press, Honduras.
- Green, G.L., N.C. Leppla y W.A. Dickerson. 1976. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. *Journal of Economic Entomology*. 69: 487-488.
- Hruska, A.J. 1997. Cultivos transgénicos en la agricultura mesoamericana. pag 1-6. En: A.J. Hruska y M. Lara (eds.). *Plantas Transgénicas *Bacillus thuringiensis* en la Agricultura Mesoamericana*. Zamorano Academic Press, Honduras.
- Hruska, A.J. y F. Gould. 1997. Fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) and *Diatraea lineolata* (Lepidoptera: Pyralidae): Impact of larval population level and temporal occurrence on maize yield in Nicaragua. *Journal of Economic Entomology* 90(2): 611-622.

- King, A.B.S. y J.L. Saunders. 1984. Las Plagas Invertebradas de Cultivos Anuales Alimenticios en América Central. ODA. London. 182 p.
- Lereclus, D., A. Delécluse y M. Lecadet. 1993. pag 37-60. En: P.F. Entwistle, J.S. Cory, M. J. Bailey y S. Higgs (eds). *Bacillus thuringiensis*, An Environmental Biopesticide: Theory and Practice. Wiley. England.
- Nyouki, F.F.R., J.R. Fuxa y A.R. Richter. 1996. Spore-Toxin interactions and sublethal effects of *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda* and *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae). Journal of Entomological Science 31(1): 52-62.
- Olivares, R. 1997. Evaluación de concentraciones de toxinas *Bacillus thuringiensis* en *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Pyralidae). Tesis Ing. Agr. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Honduras.
- Quintero, R. 1995. Biopesticidas compatibles con el medio ambiente: *Bacillus thuringiensis*, un modelo único. Biocontrol. 1(1): 41-55.
- Stone, T.B. y S.R. Sims. 1993. Geographic susceptibility of *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) to *Bacillus thuringiensis*. Journal of Economic Entomology 86(4): 989-994.
- Toenniessen, G. 1997. Prólogo. En: A.J. Hruska y M. Lara (eds.). Plantas Transgénicas *Bacillus thuringiensis* en la Agricultura Mesoamericana. Zamorano Academic Press, Honduras.
- Van Rie, J., S. Jansens, H. Höfte, D. Degheele y H. Van Mellaert. 1989. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins: importance of specific receptors on the brush border membrane of the midgut of target insects. Journal of Biochemistry 186: 239-247.
- Visser, B., E. Munsterman, A. Stoker y W.G. Dirke . 1990. A novel *Bacillus thuringiensis* gene encoding a *Spodoptera exigua* specific crystal protein. Journal of Bacteriology 172: 6783-6788.
- Weinzerl, R. Y T. Henn. 1997. Alternatives in insect management: biological and biorational approaches. Biological Control News 2(7): 56-63.
- Whalon, M. E. y D. L. Norris. 1997. Manejo de resistencia de plagas y despliegue de plantas transgénicas: perspectivas y recomendaciones en regulaciones para mesoamérica. pag 70-97. En: A.J. Hruska y M. Lara (eds.). Plantas Transgénicas *Bacillus thuringiensis* en la Agricultura Mesoamericana. Zamorano Academic Press, Honduras.

ANEXOS

Anexo 1. Tipos de genes de las δ -endotoxinas, rango de acción y especificidad a hospederos

<i>Tipo de gene</i>	<i>Peso molecular (kDaltons)</i>	<i>Rango de Hospederos</i>	<i>Ejemplos de insectos que controlan</i>
cry IA(a)	132.2	L	<i>Manduca sexta, Bombyx mori, Pieris brassicae, Plutella xylostella, Ostrinia nubilalis</i>
cry IA(b)	131	L	<i>Pieris brassicae, Manduca sexta, Heliothis virescens</i>
	130	L/D	<i>Pieris brassicae, Aedes aegypti</i>
cry IA(c)	133.3	L	<i>Heliothis virescens, Manduca sexta, Trichoplusia ni, Ostrinia nubilalis, Pieris brassicae</i>
cry IB	138	L	<i>Pieris brassicae</i>
cry IC	134.8	L	<i>Spodoptera littoralis, Spodoptera exigua, Mamestra brassicae, Pieris brassicae</i>
cry ID	132.5	L	<i>Manduca sexta, Spodoptera exigua</i>
cry IE	130	L	<i>Manduca sexta, Spodoptera littoralis, Spodoptera exigua</i>
cry IF	133.6	L	<i>Ostrinia nubilalis, Heliothis virescens, Spodoptera exigua</i>
cry IIA	70.9	L/D	<i>Heliothis virescens, Lymantria dispar, Manduca sexta, Aedes aegypti</i>
cry IIB	70.8	L	<i>Manduca sexta, Lymantria dispar, Heliothis virescens, Trichoplusia ni</i>
cry IIC	69.5	L	<i>Manduca sexta, Lymantria dispar, Trichoplusia ni</i>
cry IIIA	73.1	C	<i>Leptinotarsa decemlineata, Phaedon cochleariae</i>
cry IIIB	74.2	C	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>
cry IVA	134.4	D	<i>Aedes aegypti, Anopheles stephensi, Culex pipiens</i>
cry IVB	127.8	D	<i>Aedes aegypti, Anopheles stephensi</i>
cry IVC	77.8	D	<i>Aedes aegypti</i>
cry IVD	72.4	D	<i>Aedes aegypti, Culex pipiens</i>
cry VA	81.2	L/C	<i>Diabrotica spp., Leptinotarsa decemlineata, Ostrinia nubilalis</i>
cry tA	27.4	NE	

L = Lepidoptera

C = Coleoptera

D = Diptera

NE = No específico

Fuente: Lereclus *et al.*, 1993

Anexo 8. Registro de los pesos de larvas de *S. frugiperda* a los quince días, bajo un período de exposición de cinco días

a las toxinas Cry IA(c), Cry IA(b), Cry IC, Cry IF, Cry IIA y combinaciones Cry IA(c)-IC, Cry IA(c)-IF y Cry IF (Bioensayo 3).

Cry IA(c)				Cry IIA			
Concentración	R1	R2	R3	Concentración	R1	R2	R3
0.00128	0.333	0.357	0.307	0.00128	0.184	0.317	0.335
0.16	0.426	0.403	0.284	0.16	0.306	0.344	0.388
20	0.338	0.358	0.136	20	0.015	0.184	0.201

Cry IA(b)				Cry IA(c)-IC			
Conc	R1	R2	R3	Concentración	R1	R2	R3
0.00128	0.378	0.422	0.327	0.00128	0.475	0.542	0.227
0.16	0.346	0.408	0.379	0.16	0.483	0.457	0.267
20	0.332	0.418	0.222	20	0.153	0.243	0.441

Cry IC				Cry IA(c)-IF			
Conc	R1	R2	R3	Concentración	R1	R2	R3
0.00128	0.452	0.387	0.323	0.00128	0.184	0.317	0.335
0.16	0.389	0.399	0.312	0.16	0.306	0.344	0.388
20	0.165	0.168	0.055	20	0.015	0.184	0.201

Cry IF				Cry IC-IF			
Conc	R1	R2	R3	Concentración	R1	R2	R3
0.00128	0.469	0.380	0.302	0.00128	0.331	0.330	0.313
0.16	0.422	0.348	0.201	0.16	0.291	0.327	0.277
20	0.064	0.024	0.023	20	0.046	0.448	0.265

Anexo 9. Análisis de varianza de las réplicas de la toxina IA(c) (control)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Pr > F
Toxina	1	0.0134	0.0134	1.06	0.3250
Réplica	1	0.0338	0.0338	2.68	0.1301
Toxina * Réplica	2	0.0204	0.0102	0.81	0.4703
Error	11	0.1389	0.0126		

Anexo 10. Análisis de varianza de la CL_{50} de dos toxinas *Bt* y dos combinaciones en larvas de *Spodoptera frugiperda*

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Pr > F
Toxina	3	17.0195	5.6732	0.53	0.6845
Réplica	2	47.3900	47.3900	4.44	0.1028
Toxina * Réplica	3	11.3044	3.7681	0.35	0.7905
Error	4	211.5612	10.6698		

