

Susceptibilidad de cuatro nóctuidos plaga (Lepidoptera) al gene Cry1Ac del *Bacillus thuringiensis* incorporado al algodónero

Susceptibility of four noctuid pests (Lepidoptera) to the Cry1Ac gene of *Bacillus thuringiensis* incorporated into cotton

INGEBORG ZENNER DE POLANÍA¹, J. ALONSO ÁLVAREZ RODRÍGUEZ², HELBER ADRIAN ARÉVALO MALDONADO³, RODOLFO MEJÍA CRUZ⁴, MARTÍN A. BAYONA R.⁵

Resumen: Las plantas transgénicas con genes de *Bacillus thuringiensis* (Bt) que codifican para la producción de toxinas, eficaces contra algunas plagas, son consideradas útiles dentro del manejo de insectos. Sin embargo, estas variedades no controlan satisfactoriamente a todos los noctuidos plagas y, además, inducen a su resistencia. Se evaluaron diversas poblaciones de variantes locales de *Heliothis virescens*, *Helicoverpa zea*, *Spodoptera frugiperda* y *S. sunia* para conocer su susceptibilidad a la toxina Cry1Ac de la variedad Bollgard® sembrada en Colombia. El Cry1Ac, se obtuvo de un gene de Bt clonado en *Escherichia coli* y de MVP® (protoxina encapsulada en *Pseudomonas*). Se expusieron larvas neonatas a dosis seriadas incorporadas a dieta merídica y, también, alimentadas con tejido fresco de algodón transgénico. Se determinó el peso de larvas y pupas sobrevivientes y la emergencia de los adultos. Los resultados, se sometieron a ANAVA y las concentraciones letales (CL) se obtuvieron mediante análisis Probit. Se encontró una aceptable susceptibilidad de *H. virescens*, CL₅₀ de 3,52 y 3,81 µg/mL, en los periodos 2005A y 2006A respectivamente, y un 100% de mortalidad al alimentar las neonatas con hojas terminales. La CL₅₀ para *H. zea* varió entre 3,42 y 6,12 µg/mL; a medida que aumentaba la dosis de la toxina disminuía el peso y se obtuvo un alto porcentaje de pupas deformes. Para *Spodoptera* spp., las CL₅₀ oscilaban entre 192 y 1.178 µg/mL mostrando su resistencia a la toxina. Se concluye que actualmente el algodón transgénico proporciona un control satisfactorio de los Heliothine pero no del complejo *Spodoptera*.

Palabras clave: Organismo genéticamente transformado. Toxina Bt. Belloteros. *Spodoptera* spp. Comportamiento.

Abstract: Transgenic plants possessing genes of the bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt) which codify for toxin production effective against some pests, are considered useful within the management of insects. However, these commercial cultivars do not control satisfactorily all noctuids, and besides, at a distance, induce resistance. Diverse populations of native *Heliothis virescens*, *Helicoverpa zea*, *Spodoptera frugiperda* and *S. sunia* strains were evaluated to determine the susceptibility to the toxin Cry1Ac of the cultivar Bollgard®, planted in Colombia. Cry1Ac was obtained from a Bt gene cloned in *Escherichia coli* and from MVP® (protoxin encapsulated in *Pseudomonas*). Neonate larvae were exposed to seriated dose of the toxin, incorporated within meridic diet and also fed with fresh transgenic cotton tissue. Weight and adult emergency of the survivors were determined. Results were submitted to an Anova and LC was obtained by Probit analysis. An acceptable susceptibility of *H. virescens*, LC₅₀ of 3.52 and 3.81 µg/mL, 2005A y 2006A, respectively, and a 100% mortality when feeding neonates with terminal leaves was found. LC₅₀ for *H. zea* varied from 3.42 to 6.12 µg/mL; as the toxin dose increased, the pupal weight decreased and a high percentage of deformed pupae were observed. For *Spodoptera* spp., LC₅₀ oscilated between 192 y 1.178 µg/mL, showing its resistance to the toxin. It was concluded that, at the moment, the transgenic cotton provides satisfactory control of the Heliothine, but no of the *Spodoptera* complex.

Key words: Genetically transformed organisms. Bt toxin. Bollworms. *Spodoptera* spp. Behaviour.

Introducción

Desde que el hombre se volvió sedentario y se dedicó a la agricultura intensiva en forma de monocultivos en extensas áreas, le ha tocado luchar contra las plagas, con énfasis en los insectos herbívoros. Al encontrar algún método de control siempre pensó haber ganado la batalla, lo cual fue especialmente cierto con el advenimiento del control químico. La destrucción de la fauna benéfica y el surgimiento de resistencia a los insecticidas, logró hacer recapacitar y formular nuevos conceptos que finalmente se concentraron en un manejo integrado de las plagas. Este manejo tampoco ha sido aceptado por muchos agricultores por requerir atención especial a los cultivos, monitoreo y a menudo es considerado demasiado costoso

y dispendioso. Dentro de los programas de MIP, el último “método de control” incorporado ha sido el uso de cultivares “insecticidas” transgénicos que contienen proteínas Cry de la bacteria del suelo *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1915 (Bt), las cuales protegen las plantas contra la alimentación de larvas de algunas plagas del orden Lepidoptera (Gustafson *et al.* 2006; Carrière *et al.* 2001).

Las plantas transgénicas, entre ellas el algodónero (*Gossypium hirsutum* L., 1793) que poseen genes Bt que codifican para la producción de toxinas Cry, eficaces contra algunas plagas, son por lo tanto consideradas útiles como herramientas dentro del MIP. Pueden evitar aplicaciones de insecticidas químicos contra algunos nóctuidos, los cuales deterioran el ambiente, pero no controlan ácaros, ni áfidos o moscas blancas. El

¹ Ph.D. Autor para correspondencia. Ingeniera agrónoma, Ph. D. Facultad de Ingeniería Agronómica, Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A, Calle 222 No. 54-37, Bogotá, D.C., izenner@udca.edu.co.

² Ph.D. (Q.E.P.D.).

³ Estudiante Facultad de Ingeniería Agronómica, Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A, Calle 222 No. 54-37, Bogotá, D.C. jelber2000@gmail.com.

⁴ M.Sc. Facultad de Ingeniería Agronómica, Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A, Calle 222 No. 54-37, Bogotá, D.C. rmejia@udca.edu.co.

⁵ M.Sc. Facultad de Medicina, Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A, Calle 222 No. 54-37, Bogotá, D.C. mabayona@udca.edu.co.

control de las plagas objetivo con las variedades transgénicas y la consecuente ausencia del control químico pueden resultar en el aumento de poblaciones de estas plagas secundarias. Así, se cambia el panorama, se presentan problemas nuevos y difíciles; ante todo existe luego la posibilidad de que los insectos chupadores adquieran mayor importancia y su manejo aumente el costo de producción, ya incrementado por el valor de la semilla del cultivar transgénico (ICAC 2005).

El gene Cry1Ac introducido al algodón Bollgard (Monsanto Company, St. Louis, MO) que se siembra desde el año 2003 en Colombia, expresa cristales proteicos con actividad insecticida contra algunos lepidópteros, especialmente los belloteros. Esta variedad, de acuerdo con Jackson *et al.* (2003), provee control absoluto en los estados productores de algodón de los Estados Unidos contra *Heliothis virescens* (F., 1777), pero muestra ocasionalmente problemas de eficacia contra *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850). Esta toxina no ejerce controles satisfactorios de *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Garczynski *et al.* 1991; Bohorova *et al.* 1997; Ayra-Pardo *et al.* 2006), noctuido común en el algodón en nuestro medio.

A nivel mundial, una de las preocupaciones asociadas al algodón Bt corresponde a la posibilidad del desarrollo de resistencia de las poblaciones plagas objetivo, basado en selección por resistencia al Cry1Ac, particularmente para los belloteros *H. virescens*, *H. zea* y *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1805) (Lepidoptera: Noctuidae) (Ali *et al.* 2006; Jackson *et al.* 2007; Rausher 2001; Bird y Akhurst 2005). Además, el manejo de la resistencia se ha vuelto mucho más complejo y costoso, debido a que los refugios se establecen de manera mandatoria y existen consideraciones estratégicas de selección múltiple de cultivos transgénicos a través de las regiones agrícolas (Ali *et al.* 2006).

Antes de la comercialización de los cultivos transgénicos aparecieron las preocupaciones y los llamados de atención sobre la evolución de resistencia por parte de los insectos plagas al *B. thuringiensis*. En 1985, se alertó a la comunidad internacional sobre el riesgo de desarrollo de resistencia de insectos al Bt (McGaughey 1985). Bajo condiciones de laboratorio ya se seleccionaron hace algunos años razas que pueden cumplir su ciclo biológico en cultivos transgénicos (Tabashnik *et al.* 2003). Al trabajar con la raza HD-1 y una formulación comercial del *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki*, Stone *et al.* (1989) demostraron el potencial del *H. virescens* para desarrollar resistencia a la delta - endotoxina del Bt. Presión de selección, ejercida durante cuatro generaciones en el laboratorio sobre una población de *S. frugiperda* con una formulación comercial de Bt (mezcla de cinco toxinas, incluyendo Cry1Ac) mostró un incremento de 4,6 veces en la CL_{50} (Borrero y Zenner de Polanía 1998).

Las siembras comerciales de algodón transgénico se iniciaron en 1996 en Estados Unidos y Australia. Durante este primer año se plantaron 1.800.000 acres en Estados Unidos (National Cotton Council 1997); James (2005) citado por Tabashnik *et al.* (2006) menciona que a nivel mundial en el año 2005, se sembraron 26 millones de hectáreas de algodón y maíz transgénico, área que podría permitir la adquisición rápida de resistencia a la toxina incorporada de las plagas clave. La tolerancia y resistencia de las plagas al Cry1Ac, entre otras causas, ocasionaron insatisfacción en EE.UU. y Australia, lo cual llevó a la construcción de una segunda generación del algodón Bt, denominados algodones “gene-piramidales”: el Bollgard II que contiene los genes Bt que codifican la producción de las endotoxinas Cry1Ac y Cry2Ab, efectivas con-

tra larvas de lepidópteros (Greenplate *et al.* 2003) y el Wide Strike (Dow AgroSciences) que produce las endotoxinas Cry1Ac y Cry1F (Pellow *et al.* 2002, citado por Jackson 2007). El Cry1Ac incorporado al Bollgard todavía controla satisfactoriamente a *Heliothis* spp., pero no es eficaz contra otros lepidópteros plaga; el Cry adicional del Bollgard II es considerado también eficiente contra *S. frugiperda*, *S. exigua* (Hübner, 1808), *Pseudoplusia includens* (Walter, 1857) y *Trichoplusia ni* (Hübner, 1803) (ICAC 2004). De acuerdo con Haile *et al.* 2004, citados por ICAC (2005), el algodón Wide Strike, una variedad que también posee incorporados dos genes, aislados del Bt, el Cry1Ac y el Cry1F, muestra protección durante todo el desarrollo fenológico de la planta contra un amplio espectro de insectos del orden Lepidoptera, entre los cuales figuran los belloteros (complejo Heliothine), *S. frugiperda*, *S. eridania* (Cramer, 1782), *S. exigua*, *Pectinophora gossypiella* (Saunders, 1843), *T. ni*, *P. includens* y *Agrotis ipsilon* (Hufnagel, 1766). Las regulaciones de Monsanto prohíben comparaciones directas, presumiblemente en condiciones de campo, entre las variedades Bollgard, Bollgard II y WideStrike™ (ICAC 2005); menciona en este contexto que, el desempeño en el rendimiento varía dependiendo del sitio, de la presión y del complejo de plagas presentes, incluso, si la variedad WideStrike™ se cultivara bajo las mismas condiciones.

Algodones transgénicos transformados para producir una novedosa proteína del Bt, la Vip3A, ya se están evaluando comercialmente en EE.UU. La Vip3A es considerada única, ya que muestra actividad tanto en su fase vegetativa como en la fase de esporulación, mientras que las actividades de las proteínas Cry1 y Cry2 se limitan a la fase de esporulación (Estruch *et al.* 1996). La proteína VIP es una exotoxina, también derivada de la bacteria del suelo *B. thuringiensis*, estructural, funcional y bioquímicamente diferente a las delta endotoxinas. Se expresa en todas las partes de la planta, incluyendo los componentes florales, para proteger la planta (ICAC 2004). Estudios recientes para evaluar la posibilidad de existencia de resistencia cruzada de razas resistentes de *H. virescens* al Cry1Ac al VIP3A, mostraron la ausencia de esta resistencia cruzada. La utilización de líneas de algodón que producen la proteína VIP, podría por lo tanto atrasar la evolución de la resistencia al Cry1Ac del bellotero (Jackson *et al.* 2007).

No todos los sistemas de producción de algodón son satisfactorios para el uso de variedades transgénicas y dadas las presiones competitivas del sector biotecnológico que desarrolla estos productos, es posible que en su diseño no se contemplen aspectos para el desarrollo de un cultivar óptimo (ICAC 2005). La razón de las fallas identificadas en algunos casos pueden estar en la presión de selección, en la variación en la expresión y actividad de la toxina por estacionalidad, en efectos de sitio, en desarrollo fenológico, en otros estresantes bióticos y abióticos y en efectos somaclonales (Halcomb *et al.* 1996).

Al formular este proyecto se desconocía literatura científica publicada en Colombia sobre los aspectos básicos y, a pesar del riesgo del desarrollo de resistencia, no se divulgó investigación sobre la susceptibilidad, expresada en concentración letal media (CL_{50} o CL_{80}), de *S. frugiperda*, *H. virescens* y *H. zea* al Cry1Ac incorporado al algodón transgénico que se está sembrando en el país. Tampoco, se conocía la concentración de la toxina en las partes vegetativas y reproductivas de la planta a través de su desarrollo fenológico bajo nuestras diversas condiciones climáticas y edáficas, ni se

publicaron recomendaciones validadas acerca del manejo de la variedad transgénica en cuanto a refugios y otros aspectos que podrían atrasar la posible adquisición de resistencia.

Por lo tanto, se propuso esta investigación para conocer la susceptibilidad de estas plagas al Cry1Ac y determinar simultáneamente la expresión de la toxina a través del desarrollo fenológico del algodón transgénico, para proponer a los cultivadores información concreta acerca del comportamiento y manejo de estas plantas transgénicas y del manejo de una posible resistencia. Conocer la línea base de susceptibilidad al Cry1Ac es indispensable para el monitoreo de la resistencia de los noctuidos involucrados en este estudio y, posteriormente poder alertar a los agricultores y tomar medidas para el manejo de la resistencia, mientras que la expresión y concentración del gene que codifica la toxina a través del desarrollo fenológico de las plantas transgénicas puede ser crítico para el manejo de las plagas.

Materiales y Métodos

El Cry1Ac empleado en los bioensayos se obtuvo de un gene del Bt, donado por el *Bacillus Genetic Sock Center* (EE.UU.), extraído de la cepa ECE-53 de *E. coli* recombinante mediante la metodología recomendada por Akhurst *et al.* (2003) y de MVP® (Cry1Ac encapsulado en *Pseudomonas*), proporcionado por Dow CropSciences. Para establecer la concentración de la proteína purificada, se utilizó el método Bradford y para el desarrollo de la curva patrón, se emplearon diluciones seriadas con concentraciones entre 100-1.000 µg/mL de la solución comercial MVP, la cual tiene formulación líquida del 20% de la toxina Cry1Ac. Las lecturas se hicieron en un espectrofotómetro Spectronic 601 digital a una longitud de onda de 565nm.

El material biológico para las crías se recolectó en cultivos de algodón y maíz no transgénicos en los departamentos del Tolima, Casanare y Meta. La cría de *H. zea* se inició a partir de larvas de los dos últimos instares, obtenidas de mazorcas atacadas procedentes del Pie de Monte Llanero, municipio de Villavicencio. Se permitió su desarrollo en el laboratorio hasta pupa sobre pedazos de mazorca tierna, en vasos plásticos de 40 mL con tapa inyectada. Una vez obtenidas las pupas, se determinó su sexo y se colocaron en frascos grandes de vidrio para esperar la emergencia de los adultos. Estos fueron alimentados con miel de abeja y para la oviposición se colocaron tiras de papel de color azul en el borde de los frascos. Con la descendencia parcial de diez parejas, aproximadamente 500 huevos, se inició la F₁, a partir de la cual se mantuvo la cría masiva y se realizaron los bioensayos. Una metodología similar se empleó para *H. virescens* iniciándose la cría partiendo de huevos recolectados en hojas terminales en diversos sitios del Tolima y en Villanueva (Casanare) y alimentando las larvas con dieta importada específica para esta especie. Las larvas de *S. frugiperda* y de *S. sunia* (Guenée, 1852) fueron criadas a partir de posturas con dieta importada para luego seguir los mismos procedimientos.

La susceptibilidad de las larvas neonatas se evaluó incorporando concentraciones seriadas del Cry1Ac a dietas merídicas específicas (importadas de Southland Products INC., EE.UU.). Las dosis empleadas para *H. virescens* y *H. zea* oscilaron entre 0,001 y 100 µg/mL, mientras aquellas empleadas para las larvas neonatas del cogollero del maíz variaron de 0,001 a 1000 µg/mL, y de 0,002 a 2000 µg/mL. Todos los bioensayos se rigieron por un diseño de bloques al azar, seis

repeticiones, cada una de ellas representada por un vaso plástico con dieta sobre la cual se colaron cinco larvas neonatas. La mortalidad se estimó a los siete días y los datos se sometieron a análisis Probit (SAS Institute Inc.) para determinar las concentraciones letales. El efecto de la alimentación con partes vegetales de plantas transgénicas sobre el desarrollo de las larvas de *H. virescens* y *S. frugiperda* se evaluó empleando en vez de la dieta con el Cry incorporado, tejido fresco transgénico. En siete repeticiones, diez larvas neonatas de la misma población por repetición, se colocaron sobre hojas terminales del algodón Bollgard; como testigo se emplearon hojas terminales de algodón convencional, sembrado en un refugio. Para algunas especies, se determinó con los sobrevivientes la duración del ciclo, el peso de las larvas, peso de las pupas y la emergencia de los adultos.

Para establecer la concentración del Cry1Ac, se tomaron, hojas y yemas terminales, botones florales, flores sin y con fecundación, sépalos, cápsulas, fibra y semillas, de un lote sembrado con semilla distribuida por "Cotton Seed Distributors". Las partes, se liofilizaron y pulverizaron para luego tomar muestras homogéneas del material, llevarlo en 250 µL de buffer de extracción PBS (0,55%) y depositarlo en tubos de microcentrifuga por 24 horas en solución, para la determinación de la proteína Cry1Ac por la técnica de micro Elisa, empleando el kit "Envirologix Qualiplate para Cry1Ab/Cry1Ac", kit diseñado para la detección cuantitativa para la proteína Cry1Ac en muestras de semillas y hojas de algodón Bollard®. La concentración, se midió utilizando un BioRad 'Benchmark' lector de microplacas (BioRad Laboratories; Tokio, Japón) a una longitud de onda de 450 nm. La lectura en línea de absorbancia se efectuó en un lector de Elisa Ref. Anthos 2020 (versión 2.0.5) en el laboratorio de investigaciones biotecnológicas de la Pontificia Universidad Javeriana. Todos los bioensayos se llevaron a cabo en el laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A, bajo condiciones de temperatura promedio de 24,9°C y humedad relativa de 70%.

Resultados y Discusión

Concentración toxina Cry1Ac en el tejido vegetal. En la hojas cotiledonares, tejido de ocho días de edad, la concentración de proteína específica Cry1Ac fue de 4,625 ppm lo cual coincide con Bird y Akhurst (2005) quienes encontraron 5,6 ppm. Las concentraciones de allí en adelante, se muestran en la Tabla 1. En general, se observó una disminución de la concentración a medida que aumenta la edad de la planta, exceptuando la concentración obtenida en la flor fecundada. Según Olsen *et al.* (2005) a medida que el cultivo se desarrolla, la concentración de la proteína disminuye, por ende en este primer estado fenológico la planta expresará la mayor concentración de proteína Cry1Ac. Los cambios detectados, de acuerdo a Olsen *et al.* (2005), se pueden traducir en una disminución de la eficacia; se pueden deber a cambios en el nivel de expresión del gene y/o la constitución fisiológica de la planta y pueden ser inducidos por las condiciones ambientales.

Gusano bollerero del algodonoero, *Heliothis virescens*. A las poblaciones, extremadamente altas y resistentes a todos los insecticidas empleados en su control, del gusano bollerero, se atribuye en parte las dos crisis algodonerías en Colombia siendo la plaga más importante durante los años 70s hasta comienzos de los 90s. A todos los insecticidas utilizados para su con-

Tabla 1. Concentración máxima de proteína tóxica Cry1Ac en tejidos vegetales de Bollgard®.

| Días después de la Siembra | 30 | 75 | 90 | 105 | 120 |
|----------------------------|-----------------------------|------|------|------|------|
| Tejido analizado | Concentración Cry1Ac en ppm | | | | |
| Hojas terminales | 4,42 | | | | |
| Yemas terminales | | | 3,76 | | |
| Botón floral | | | | | 1,67 |
| Flor sin fecundar | | 0,65 | | | |
| Flor fecundada | | 4,39 | | | |
| Cápsulas | | | | 1,82 | |
| Semilla | | | | | 4,75 |

tol, inclusive a los piretroides, que fueron la última arma esgrimida en forma masiva, mostró su capacidad para evolucionar a poblaciones resistentes. Luego, la plaga fue perdiendo importancia, su aparición se tornó esporádica y con bajas poblaciones, reduciéndose las aplicaciones para su control; llegando incluso a no reportar su presencia en algunas zonas del país durante una o más temporadas. En la actualidad, las poblaciones en los algodones convencionales, considerados “refugios”, son tan bajas o inclusive ausentes, por los menos en el departamento el Tolima, lo cual dificultó por un lado la obtención de muestras del insecto para los bioensayos y por el otro, la interpretación de los resultados. Durante el primer semestre del año 2007, las búsquedas de huevos de *H. virescens* en el área algodonera del municipio de El Espinal, por ejemplo, fue infructuosa, lo cual impidió la realización del bioensayo correspondiente.

El análisis Probit de los porcentajes de mortalidad, a los siete días, de las larvas de este bellotero recolectadas durante el semestre algodonero en el Tolima del año 2005, reveló una CL_{50} de 3,52 $\mu\text{g/mL}$, toxina total, (IC 95% 1,29 y 5,74 $\mu\text{g/mL}$), una pendiente de la línea de regresión de 1,1655 y un R^2 de 0,879. La CL_{80} correspondió a 6,09 $\mu\text{g/mL}$ (IC 95% entre 3,87 y 8,32 $\mu\text{g/mL}$). Se observa una alta confiabilidad de estos resultados. Esto, desde el punto de vista práctico, significó un control satisfactorio de la plaga durante este semestre. En el bioensayo simultáneo con material vegetal fresco, hojas terminales del algodón Bollgard, en comparación con el testigo de algodón convencional, se encontró que al cabo de cuatro días el 100% de las larvas sometidas al algodonero transgénico murieron sin haber mudado al segundo instar, mientras que las larvas alimentadas con algodón convencional sobrevivieron y se desarrollaron normalmente.

Los resultados del bioensayo realizado con la población obtenida de un refugio de El Espinal del primer semestre del año 2006, con las mismas dosis seriadas incorporadas a dieta merídica, mostraron una CL_{50} de 3,81 $\mu\text{g/mL}$ (IC 95% entre 1,36 y 6,14 $\mu\text{g/mL}$), una pendiente de la línea de regresión de 1,16741 y un R^2 de 0,917. La CL_{80} correspondió a 6,49 $\mu\text{g/mL}$ (IC 95% entre 4,01 y 8,51 $\mu\text{g/mL}$). Nuevamente, se observó una alta confiabilidad de los resultados, lo cual, todavía, asegura un buen control de la población analizada. El aumento de la concentración letal entre los dos semestres fue insignificante, lo cual se atribuye a la presencia de huéspedes alternos del *H. virescens*, durante el semestre no algodonero.

Resultados no muy diferentes fueron obtenidos por Rodríguez Chalarcá *et al.* (2007) al establecer la línea base para el

bellotero para tres poblaciones del Valle del Cauca y una de la costa norte del país. Las muestras del insecto procedentes de Buga, Palmira y Bugalagrande arrojaron, respectivamente, una DL_{50} de 3,2; 5,0 y 10,0 $\mu\text{g/mL}$, mientras que aquella obtenida para la población de la costa fue de 5,0 $\mu\text{g/mL}$. Estos y los anteriores resultados muestran la alta variabilidad de nuestras poblaciones de la plaga. Ali *et al.* (2006) estudiaron en los Estados Unidos la susceptibilidad de *H. virescens* de poblaciones de diversa procedencia, utilizando la misma metodología. Para una población de algodón obtuvieron una CL_{50} de 1,20 $\mu\text{g/mL}$ (IC 95%: 0,83-1,78), relativamente menor a la obtenida en los bioensayos con la población de El Espinal durante dos semestres seguidos. Esto comprueba lo ya mencionado por muchos autores que la susceptibilidad de las diversas poblaciones geográficas a la toxina del Bt varía enormemente y depende de los más diversos factores, entre bióticos y abióticos.

Las concentraciones calculadas 4,625 ppm y 4,422 ppm de la toxina en las hojas cotiledonares y en las hojas terminales respectivamente, donde el bellotero acostumbra colocar sus huevos y, se alimentan las larvas neonatas, explica la mortalidad obtenida. Esto comprueba para el control de esta población de *H. virescens* la eficacia del material transgénico, pero también la necesidad de manejar la posible futura resistencia al Cry1Ac con la siembra de algodón no transgénico en refugios de áreas adecuadas y a distancias apropiadas. Sin embargo, a medida que avanza el desarrollo de las plantas, como ya se mencionó, disminuye la concentración de la toxina de una manera marcada. Las concentraciones obtenidas (1,675 ppm en botones florales y 1,82 en cápsulas inmaduras) podrían todavía causar mortalidad a las larvas de primer instar, teniendo en cuenta las concentraciones enmarcadas dentro de los intervalos de confianza de las concentraciones letales encontradas en los dos bioensayos.

Como una ventaja de la población de *H. virescens* en el Tolima, para atrasar la ocurrencia de resistencia y prolongar la vida de la variedad transgénica, se considera la existencia de huéspedes alternos, la escobita girasol (*Lagaxea mollis*) y el pega pega, *Desmodium* sp., en ausencia del algodón. Durante el segundo semestre del 2005, se recolectó precisamente en esta última planta un alto número de larvas de todos los instares de la plaga, para repetir los bioensayos realizados durante el primer semestre. El 99% de las larvas resultó afectado por el parasitoide *Cardiochiles nigriceps* (Viereck, 1912) (Hymenoptera: Braconidae), impidiendo la realización de los trabajos. La presencia del parasitoide actuando sobre las larvas que se

desarrollan en la arvense, se debe tener muy en cuenta para futuros estudios para evaluar además el efecto de la toxina sobre este insecto benéfico.

Los insectos procedentes de Villanueva (Casanare), donde todavía no se ha sembrado algodón Bt, utilizados en otro bioensayo con material vegetal fresco, hojas terminales de algodón transgénico procedentes del Tolima, dio también como resultado una mortalidad del 100% al día siete de haberse iniciado el experimento, mientras que en el testigo no transgénico las larvas se desarrollaron normalmente. Esto podría también significar una alta susceptibilidad al Cry1Ac de la población de *H. virescens* de esa región.

A pesar de los resultados positivos obtenidos hasta el momento con el algodón transgénico Bollgard, no se debe discontinuar el monitoreo de la resistencia de *H. virescens* y, ante todo insistir en las siembras de refugios y la no destrucción de las arvenses mencionadas, escobita girasol y pega pega, sino más bien su conservación y hasta la siembra en los bordes de los lotes. Se debe recalcar que las poblaciones del bellotero durante la última década y específicamente los últimos tres años, incluyendo el primer semestre del año 2007, fueron muy bajas en el Tolima. La situación podría cambiar en cualquier momento y, si hay explosiones demográficas de la plaga como ocurre periódicamente en esta zona aldonera, esto podría traer consecuencias negativas, inclusive al sembrar fuera del Bollgard I, el Bollgard II, el WideStrike o el Vip3A, sino se maneja adecuadamente la prevención de la resistencia.

Gusano de la mazorca, *Helicoverpa zea*. Antes de ser liberadas las variedades transgénicas que poseen el gene Cry1Ac Lutrell *et al.* (1999), durante los años 1992 y 1993 estudiaron los Heliotinos de diversas regiones geográficas, encontrándose una variable susceptibilidad, la cual fue más acentuada para *H. zea* que para *H. virescens*. Aproximadamente diez años más tarde Ali *et al.* (2006) sugirieron una CL₅₀ mayor en comparación con aquella reportada por Lutrell *et al.* (1999), inclusive descubrieron, entre todas las poblaciones evaluadas recientemente, una variación de 130-veces entre las concentraciones letales. De acuerdo con Gore *et al.* (2003a), a pesar de la susceptibilidad del insecto al Cry1Ac, el algodón Bt (primera generación), no ha proporcionado controles adecuados bajo ciertas situaciones. Jackson *et al.* (2004) confirman estos hallazgos mediante estudios en condiciones de laboratorio y campo. Se considera que, fuera de la menor susceptibilidad de *H. zea* al Cry1Ac, controles no satisfactorios de la plaga son el resultado de la variación temporal y espacial en la expresión del Cry1Ac entre las partes de la planta (Adamczyk *et al.* 2001).

La mortalidad de la población autóctona del insecto procedente del Piedemonte llanero colombiano se evaluó mediante tres bioensayos. La CL₅₀ calculado a los siete días de haberse

iniciado los bioensayos con las larvas neonatas varió de 3,45 a 6,12 y la CL₈₀ de 7,12 a 10,19 µg/mL (Tabla 2). Los intervalos de confianza muestran que la CL₅₀ corresponde a un valor cercano a 5 µg/mL, lo cual es considerablemente menor que la CL₅₀, 10,06 µg/mL, obtenida para el promedio de todas las muestras de poblaciones de *H. zea* recolectadas durante dos años de maíz en Estados Unidos (Ali *et al.* 2006). Si se comparan las concentraciones letales medias con la concentración del Cry1Ac en el cultivar algodón de Bollgard®, el NuCOTN 33B de 8,56 ± 0,704 (ppm ± D.E) obtenidos por Adamczyk y Gore (2004), vemos la posibilidad de que algunos de los individuos de nuestra población de *H. zea* escapen a la acción de la toxina, si en la Orinoquía colombiana, específicamente en la zona aldonera de Villanueva, Casanare, se sembrara el algodón transgénico que tiene incorporado la toxina Cry1Ac.

Analizando estos datos, Zenner de Polanía *et al.* (2008), conceptúan que la variación entre las concentraciones letales entre los tres bioensayos indica una población genéticamente variable del gusano de la mazorca. El amplio rango de susceptibilidad al Cry1Ac podría tener como consecuencia la supervivencia y rápido desarrollo de tolerancia del insecto al Cry1Ac. Un aumento de los dos Heliotinos a poblaciones económicamente relevantes, podría poner en peligro el beneficio actual del Bollgard y requerir aplicaciones de insecticidas para prevenir pérdidas, como lo sugieren también Gore *et al.* (2003b). Igualmente, Jackson *et al.* (2003) mencionan una relativamente baja y variable susceptibilidad del bellotero al Cry1Ac en comparación con *H. virescens*, mientras que Stone y Sims (1993) determinaron una variación de valores de CL₅₀ de cuatro a 60 veces mayor que las estimadas para *H. virescens*. Varios autores evaluaron el beneficio y recomiendan para un aumento significativo del control del gusano de la mazorca, la adición de la segunda proteína, el Cry2Ab (Gore *et al.* 2003a; Jackson *et al.* 2003). Vale la pena también destacar los resultados obtenidos por Chitkowski *et al.* (2003) quienes determinaron la existencia de poblaciones mucho más bajas de *H. zea* en Bollgard II que en Bollgard. En nuestro caso, los valores de las concentraciones letales son, sin embargo, solamente un poco mayor para el gusano de la mazorca que para el bellotero, lo cual se podría deber a la ausencia del algodón Bt en el área de procedencia del *H. zea*. Sin embargo, si en el futuro la diferencia se acentúa, se considera que teniendo en cuenta la dificultad que existe para diferenciar a nivel de campo las larvas de las dos especies, la mayor susceptibilidad de *H. virescens* podría servir para distinguirlas entre sí.

La concentración de la toxina tuvo una marcada influencia sobre el desarrollo larval y pupal del insecto, expresada en la disminución del peso y el aumento en la duración del estado a medida que aumentaba la dosis. Concentraciones cercanas a 0

Tabla 2. Mortalidad de *Helicoverpa zea* en los tres bioensayos realizados con dieta merídica con dosis, µg/mL, seriadas del Cry1Ac incorporado (análisis Probit). (Modificado de Zenner de Polanía *et al.* 2008).

| Bioensayo | CL ₅₀ | IC 95% | CL ₈₀ | IC 95% | Pendiente | R ² |
|-----------|------------------|-----------|------------------|------------|-----------|----------------|
| I | 6,12 | 2,37-9,86 | 10,19 | 6,45-13,94 | 0,7364 | 0,88 |
| II | 3,45 | 1,85-5,24 | 7,12 | 5,42-8,80 | 0,8481 | 0,97 |
| III | 5,96 | 3,99-5,24 | 9,48 | 7,50-11,46 | 0,8537 | 0,67 |

IC = Intervalo de confianza, R² = Coeficiente de determinación.

mayores que 1,0 ppm ocasionaron alta mortalidad larval y un elevado porcentaje de pupas deformes. Sin embargo, entre los pesos logrados con dosis hasta 0,1 $\mu\text{g/mL}$ y el testigo absoluto no hubo diferencia estadísticamente significativa (Tabla 3) (Zenner de Polanía *et al.* 2008).

Al comparar el peso promedio de las pupas del testigo de la raza colombiana, $402,37 \pm 28,10$ (Tabla 3), con los pesos, $451,82 \pm 3,17$ y $418,83 \pm 5,27$, encontrados por Giolo *et al.* (2006) al utilizar dos dietas merídicas, se observa un peso significativamente bajo en el estudio actual y además una DMS mucho mayor. Las diferencias se podrían atribuir a deficiencias nutricionales en la dieta, a la variedad del gusano de la mazorca y a las condiciones ambientales de los laboratorios. Con una dieta, consistente en pedazos de mazorca tierna el peso de las pupas aumentó a $422 \mu\text{g} \pm 0,0639$. Se advierte la influencia de la calidad del alimento, de la variabilidad genética y de la procedencia sobre el peso de las pupas de *H. zea*, lo cual podría implicar una variación en la supervivencia del insecto en el algodón transgénico. Concentraciones mayores que 0,1 ppm en el tejido vegetal, atacado por *H. zea*, aunque no causarían un 100% de mortalidad, en teoría, sí disminuirían considerablemente la emergencia de adultos viables. Teniendo en cuenta la concentración máxima obtenida en botones florales y cápsulas inmaduras, partes del algodón afectadas preferencialmente por la plaga (Tabla 1), la posibilidad de una marcada supervivencia de la plaga al algodón transgénico que se siembra en el país es poco probable.

Cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* y gusano rasputín, *S. sunia*. Si con las plagas Heliotinas, se considera el algodón transgénico justificado desde el punto de vista de su costo y adopción, con *Spodoptera frugiperda* se observa todo lo contrario. Sus poblaciones se han incrementado a niveles y daños tan altos desde que se inició la siembra de estos cultivares que, ya algunos técnicos y agricultores manifiestan que sus siembras no son competitivas.

El complejo *Spodoptera* es considerado en nuestro medio un grupo de especies insectiles de mayor importancia económica en el algodón, mientras que en Estados Unidos, donde se crearon y evaluaron los algodones transgénicos no tiene importancia en este cultivo y no fue por lo tanto considerado como plaga objetivo. A pesar de que varios autores mencionaron que el Cry1Ac no ejerce controles satisfactorios del *S. frugiperda* (Garczynski *et al.* 1991; Bohorova *et al.* 1997; Ayra-Pardo *et al.* 2006), las indicaciones iniciales de los productores de semilla, sí incluyeron a la plaga dentro de las controladas por la variedad transgénica sembrada en el país.

Los resultados de los primeros tres bioensayos realizados durante el año 2005, comprueban lo expresado por los autores mencionados; así mismo, Zenner de Polanía *et al.* (2005) concluyeron que: 1) Después de solo una generación de alimentación con tejido vegetal de algodón transgénico, el ciclo de vida de la plaga se alarga, lo cual podría disminuir el número de generaciones por año, 2) la concentración de la Δ -endotoxina Cry1Ac existente en cotiledones, hojas terminales y botones florales del algodón utilizado como alimento para las larvas, no causa mortalidad alguna al insecto, pero sí influye negativamente en el peso de las pupas, 3) El menor peso de las pupas, tanto de machos como de hembras, no afecta la fertilidad y fecundidad de la plaga.

Posteriormente, trabajando con larvas neonatas del cogollero, procedentes de posturas recolectadas en hojas de algodón transgénico de El Espinal (Tolima), y alimentándolas con hojas cotiledonales, se observó un desarrollo inicial normal durante el primer instar, el cual tuvo una duración promedio de $2,5 \pm 0,5$ días. Se alimentaron sobre el envés de las hojas cotiledonales, ocasionando las ventanitas características del daño inicial de la plaga. La duración del II instar fue muy homogénea, la totalidad de las larvas mudaron al cabo de tres días. Durante el III instar se comenzó a observar un comportamiento anormal, aunque, exceptuando dos larvas, todas lograron entrar al cuarto instar, al cabo de cuatro días en promedio. Luego, sin embargo, dejaron de alimentarse, se encogían y construían un tipo de celda, como para iniciar la transformación en pupa. Inicialmente, se pensaba en un posible efecto de la toxina del Bt, pero luego se constató que estaban parasitadas por el parasitoide huevo-larva *Chelonus insularis* (Cresson, 1865) (Hymenoptera: Braconidae). El porcentaje de parasitismo fue del 90,47% y en el testigo (alimentado con dieta merídica) del 100%.

Los primeros adultos del parasitoide emergieron a los 27 días del inicio del experimento; este dato coincide con aquel obtenido por Medina *et al.* (1988), quienes encontraron que el ciclo del *C. insularis* corresponde a 29,05 días de huevo a la emergencia del adulto. Un 83,60% de los parasitoides alcanzó el estado adulto, lo cual indica que la alimentación de las larvas parasitadas de *S. frugiperda* con tejido fresco de algodón transgénico, cotiledones y hojas terminales, no tuvo efecto negativo sobre el desarrollo normal del parasitoide, por lo menos hasta el estado adulto.

C. insularis es uno de los parasitoides más eficientes del cogollero del maíz y se encuentra distribuido desde el norte de la Argentina hasta el sur de Estados Unidos (Ashley 1983; Cruz

Tabla 3. Peso promedio de las pupas sobrevivientes de *Helicoverpa zea* de los bioensayos I y II (Modificado de Zenner de Polanía *et al.* 2008).

| Dosis $\mu\text{g/mL}$ | Peso mg \pm DMS | Estadísticos | | | |
|------------------------|-------------------------|------------------|----------|-------|--|
| | | Coefficiente Var | t (0,05) | D.S. | |
| Testigo | $402,37 \pm 28,10^a$ | 15,75 | 2,08 | 63,37 | |
| 0,001 | $365,24 \pm 35,20^{ab}$ | 13,47 | 2,26 | 49,20 | |
| 0,01 | $389,72 \pm 43,80^a$ | 14,63 | 2,30 | 57,02 | |
| 0,1 | $332,3 \pm 46,00^{ab}$ | 14,95 | 2,44 | 49,69 | |
| 1,0 | $304,10 \pm 67,00^b$ | 13,84 | 3,18 | 42,09 | |

Promedios, dentro de la misma columna, seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Tabla 4. Concentraciones letales, µg/mL, de *Spodoptera frugiperda* y *S. sunia* alimentados con dieta merídica con dosis seriadas de incorporadas (Probit) (semestre 2005A).

| Especie | Día | CL ₅₀ | IC 95% | CL ₈₀ | IC 95% | R ² | Pendiente |
|----------------------|-----|------------------|--------------|------------------|---------------|----------------|-----------|
| <i>S. sunia</i> | 8 | 1178,2 | 723,0-1830,5 | 2635,1 | 1016,1-2715,5 | 0,99 | 0,0141 |
| | 12 | 1004,4 | 586,8-1830,3 | 1200,6 | 880,9-2822,5 | 0,99 | 0,0168 |
| | 16 | 608,0 | 360,2-2304,0 | 2437,2 | 630,3-3838,8 | 0,99 | 0,0216 |
| | 20 | 603,6 | 359,5-1255,9 | 1306,2 | 633,9-2101,1 | 0,99 | 0,0216 |
| <i>S. frugiperda</i> | 8 | 932,2 | 576,3-2318,8 | 1305,4 | 852,9-3567,6 | 0,99 | 0,013 |
| | 12 | 688,9 | 286,0-9203,9 | 1019,9 | 544,3-16154,5 | 0,99 | 0,013 |
| | 16 | 745,3 | 612,1-907,4 | 3734,7 | 3067,5-4547,2 | 0,99 | 0,018 |
| | 20 | 290,3 | 232,1-363,1 | 1213,9 | | 0,99 | 0,021 |

IC = Intervalo de Confianza, R² = Coeficiente de determinación.

et al. 1991; Fernández y Clavijo 1984). La ausencia de un efecto negativo de la toxina del Bt incorporada al algodón, del cual se alimenta su huésped el cogollero del maíz, sobre el desarrollo del parasitoides es positivo, pero se debe primordialmente a la dosis subletal del Cry1Ac en el follaje, la cual no ocasiona la muerte a la plaga. Si la mortalidad de la plaga hubiese sido alta, lo mismo hubiera ocurrido con el insecto benéfico.

La posibilidad de recolectar en el campo posturas del cogollero parasitadas por *C. insularis* es relativamente alta, ante todo durante la segunda generación del cogollero (Zenner de Polanía et al. 2006). Por esta razón no se deben emplear las larvas procedentes de estas posturas para la realización de bioensayos, sino criarlas hasta la F₂ y así asegurar la ausencia del parasitismo.

Las posturas del cogollero, empleadas para el tercer ensayo fueron recolectadas en un lote de algodón transgénico en El Espinal, criadas hasta la F₂ y las larvas neonatas que emergieron empleadas directamente. Simultáneamente, se realizó la misma evaluación para el gusano Rasputín, *S. sunia*, plaga importante en el Tolima y a veces confundido en el estado larval con el cogollero del maíz.

La respuesta dosis mortalidad calculada por Probit, a través de 20 días del desarrollo larval de las dos especies de *Spodoptera*, se consigna en la Tabla 4 y, en la Figura 1, se

ilustra el porcentaje de mortalidad observado durante este lapso. Los resultados muestran que el cogollero es un poco más susceptible a la toxina Cry1Ac que el gusano Rasputín, pero, ninguna de las dos especies puede ser controlada con el cultivar transgénico. La susceptibilidad de ambas especies aumenta lentamente a través del tiempo de exposición, lo cual es confirmado por la pendiente poco pronunciada de la línea respuesta dosis-mortalidad.

La Figura 1 muestra un porcentaje de mortalidad algo mayor de las larvas de *S. frugiperda* que de *S. sunia* a través del tiempo. A los 20 días, cuando las larvas del testigo de ambas especies ya estaban llegando al VI instar, y aquellas en la dieta con la dosis de 1,0 ppm al V instar, las que se desarrollaban con 1.000 ppm apenas llegaban al II instar. La dieta con 10 ppm de la toxina tuvo un efecto algo menor sobre el cogollero que sobre el gusano Rasputín durante los primeros 16 días y solo ocasionó una mortalidad del 16,66% y 13,33% a los 20 días, respectivamente. Esto, bajo condiciones de campo significa la ausencia de un control de las dos especies con el algodón transgénico sembrado actualmente en el país.

En la Tabla 5 se comparan las concentraciones letales calculadas de poblaciones del *S. frugiperda* procedentes del Meta y del Tolima y de diferentes huéspedes y en diferentes semestres. Analizando estos datos resalta inicialmente la similitud de las concentraciones letales (CL) medias obtenidas para las

Tabla 5. Respuesta dosis mortalidad para *Spodoptera frugiperda* en bioensayos realizados con dieta merídica con dosis, µg/mL, seriadas del Cry1Ac incorporado (análisis Probit).

| Procedencia y cultivo | CL ₅₀ | IC 95% | CL ₈₀ | IC 95% | Pendiente | r ² |
|-------------------------------------------------|------------------|--------------|------------------|---------------|-----------|----------------|
| El Espinal Soca Maíz 2005A | 932,1 | 576,2-2318,8 | 1305,4 | 852,9-3567,6 | 0,013 | 0,99 |
| Pto López Maíz 2006A | 715,3 | 581,1-888,4 | 1596,0 | 1296,7-1964,3 | 2,22 | 0,95 |
| El Espinal (Fase Migratoria) Pastos 2006A | 5,64 | 5,03- 6,32 | 17,6 | 15,7-19,7 | 2,63 | 0,74 |
| El Espinal Algodón 2006A | 93,72 | 605,8-794,3 | 1596,0 | 1123,2-1472,7 | 2,36 | 0,95 |
| El Espinal Soca Maíz 2006B | 191,97 | 174,0-211,6 | 1440,0 | 1305,8-1587,9 | 3,43 | 0,93 |

IC = Intervalo de confianza, r² = Coeficiente de determinación.

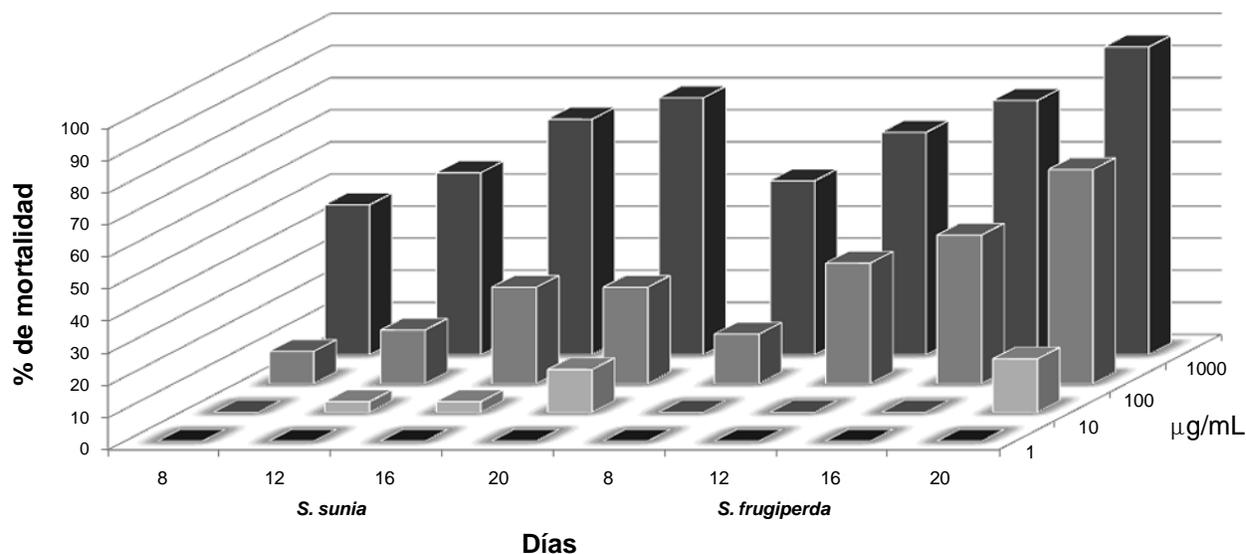


Figura 1. Porcentaje de mortalidad de *Spodoptera sunia* y *S. frugiperda* a través del tiempo de exposición a dosis seriadas del Cry1Ac incorporado en dieta meridica.

razas procedentes del Meta y del Tolima, obtenidas de maíz y algodón respectivamente. Este resultado confirma preliminarmente, para Colombia, lo observado por Martinelli *et al.* (2006) en el Brasil que las poblaciones de *S. frugiperda* que se desarrollan en maíz y en el algodón corresponden a la variante de maíz (Pashley *et al.* 1985), mientras que posibles diferencias genéticas entre estas poblaciones se deben más bien a variantes que se desarrollaron en diferentes regiones geográficas (Zenner de Polanía *et al.* 2007). En este contexto sería de gran interés desde el punto de vista manejo, comparar genéticamente poblaciones del cogollero procedentes de los Valles Interandinos colombianos, de la Costa Atlántica y de la Orinoquía recolectadas en las diversas especies huéspedes de la plaga.

La disminución considerable de la CL observada en larvas del cogollero procedentes de soca de maíz se atribuye a la dilución de la resistencia al Cry1Ac, debido al número de generaciones del insecto transcurrido en este cultivo y probablemente otro en la soca, lo cual podría sumar un total de cuatro generaciones sin presión de selección. La población se desarrolló en el semestre con veda para la siembra del algodón, así que no hubo migraciones entre cultivos de maíz y algodón transgénico, ni posibilidad de intercambio de genes que imparten resistencia. Esta ausencia de presión de selección en el segundo semestre del año en el departamento del Tolima, se debería aprovechar con siembras de maíz convencional, para lograr una mayor susceptibilidad del insecto al Cry1Ac y así lograr un manejo más adecuado de la plaga. Sin embargo, resalta la pronunciada pendiente de la línea de regresión (3,43), la cual indica que a medida que el insecto esté nuevamente sujeto a presión de selección, la tolerancia aumentará mucho más rápido que en ocasiones anteriores. Desde el punto de vista manejo del cogollero del maíz en el algodón transgénico, los datos aquí presentados confirman lo observado por Zenner de Polanía *et al.* (2005) que la toxina Cry1Ac en las concentraciones disponibles en la planta no ejercen un control de *S. frugiperda*.

Recomendaciones de manejo del algodón transgénico

Fuera de las exigencias de dejar refugios apropiados de algodón convencional para que las plagas controladas por la variedad transgénica se puedan desarrollar sin la presión de selección que, a la larga ocasiona el fenómeno de resistencia y hace que la tecnología pierda su efecto, se debe tener en cuenta en nuestro medio: 1) en los cultivos, huéspedes alternos, no utilizar productos con base en *B. thuringiensis* para el control de los insectos plagas del Orden Lepidoptera, 2) permitir, en el semestre no algodón refugios adicionales de sus huéspedes alternos, a pequeña escala, para el bellotero, *H. virescens*. 3) usar controles biológicos para el manejo del complejo *Spodoptera* en el maíz, el sorgo y el algodón transgénico y convencional.

Agradecimientos

A COLCIENCIAS y a la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A por la financiación del proyecto. Al Ingeniero Agrónomo Guillermo Álvarez Viecco, a Remolino S.A. y a FENALCE por su colaboración logística y técnica.

Literatura citada

- ADAMCZYK Jr., J. J.; GORE, J. 2004. Development of bollworms, *Helicoverpa zea*, on two commercial Bollgard® that differ in overall Cry1Ac levels. *Journal Insect Science* 4: 32.
- ADAMCZYK Jr., J. J.; HARDEE, D. D.; ADAMS, L. C.; SUMMERFORD, D. V. 2001. Correlating differences in larval survival and development of bollworm (Lepidoptera: Noctuidae) and fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) to differential expression of Cry1A(c) δ -endotoxin in various plant parts among commercial cultivars of transgenic *Bacillus thuringiensis* cotton. *Journal of Economic Entomology* 94 (1): 284-290.
- AKHURST, R. J.; JAMES, W.; BIRD, L. J.; BEARD, C. 2003. Resistance to the Cry1Ac Δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology* 96 (4): 1290-1299.

- ALI, M. I.; LUTRELL, R. G.; YOUNG, III, S. Y. 2006. Susceptibilities of *Helicoverpa zea* and *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) populations to Cry1Ac insecticidal protein. *Journal of Economic Entomology* 99 (1): 164-175.
- ASHLEY, T. R. 1983. Growth pattern alterations in fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* larvae after parasitization by *Apanteles marginiventris*, *Campoletis grioti*, *Chelonus insularis*, and *Eiphosoma vitticole*. *The Florida Entomologist* 66 (2): 260-266.
- AYRA-PARDO, C.; RODRÍGUEZ-CABRERA, L.; FERNÁNDEZ-PARLÁ, Y.; TÉLLEZ-RODRÍGUEZ, P. 2006. Increased activity of a hybrid Bt toxin against *Spodoptera frugiperda* larvae from a maize field in Cuba. *Biocología Aplicada* 23: 236-239.
- BIRD, L. J.; AKHURST, R. J. 2005. Fitness of Cry1A-resistant and -susceptible *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on transgenic cotton with reduced levels of Cry1Ac. *Journal of Economic Entomology* 98 (4): 1311-1319.
- BOHOROVA, N.; CABRERA, M.; ABARCA, C.; QUINTERO, R.; MACIEL, A. M.; BRITO, R. M.; HOISINGTON, D.; BRAVO, A. 1997. Susceptibility of four tropical lepidopteran maize pests to *Bacillus thuringiensis* Cry1-type insecticidal toxins. *Journal of Economic Entomology* 90 (2): 412-415.
- BORRERO, F.; ZENNER DE POLANÍA, I. 1998. Resistencia potencial de *Spodoptera frugiperda* a *Bacillus thuringiensis* subesp. *kurstaki*. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* 47: 18-23.
- CARRIÈRE, Y.; DENNEHY, T. J.; PEDERSEN, B.; HALLER, S.; ELLERS-KIRK, C.; ANTILLA, L.; LIU, Y-B.; WILLOTT, E.; TABASHNIK, B. 2001. Large-scale management of insect resistance to transgenic cotton in Arizona: can transgenic insecticidal crops be sustained? *Journal Economic Entomology* 94 (2): 315-325.
- CHITKOWSKI, R. J.; TURNIPSEED, S. G.; SULLIVAN, M. J.; BRIDGES, W. C. 2003. Field and laboratory evaluations of transgenic cottons expressing one or two *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* Berliner proteins for management of noctuid (Lepidoptera) pests. *Journal of Economic Entomology* 96 (3): 755-762.
- CRUZ, I.; REZENDE, M. A. A.; DELLA LUCIA, T. M. C. 1991. Biología de *Chelonus (Chelonus) insularis* (Cresson, 1865), parasitóide de ovo/lagarta de *Spodoptera frugiperda*. En: *Memorias Congreso Brasileiro de Entomología*. Recife. Sociedade Entomol. Brasil. 264 p.
- ESTRUCH, J. J.; WARREN, G. W.; MULLINS, M. A.; NYE, G. J.; CRAIG, J. A.; KOZIEL, M. G. 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proceeding National Academy of Science* 93: 5389-5394.
- FERNÁNDEZ B., R.; CLAVIJO A., S. 1984. Efecto de dos insecticidas (uno químico y otro biológico) sobre el parasitismo observado en larvas de *Spodoptera frugiperda* (S.) provenientes de parcelas experimentales de maíz. *Revista Facultad Agronomía*. 13: 101-109.
- GARCZYNSKI, S.F.; CRIM, J.W.; ADANG, M.J. 1991. Identification of putative insect brush border membrana-binding molecules specific to *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin by protein plot analysis. *Applied Environmental Microbiology* 57 (10): 2816-2820.
- GIOLO, F. P.; BUSATO, G. R.; GARCÍA, M. S.; MANZINI, C. G.; BERNARDI, O.; ZART, M. 2006. Biología de *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) (Lepidoptera: Noctuidae) em duas dietas artificias. *Revista Brasileira de Agrobiologia (Pelotas)*. 12 (2): 167-171.
- GORE, J.; LEONARD, B. R.; JONES, II. 2003a. Influence of agronomic hosts on the susceptibility of *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae) to genetically engineered and non-engineered cotton. *Environmental Entomology* 32 (1): 103-110.
- GORE, J.; LEONARD, B. R.; GABLE, R. H. 2003b. Distribution of bollworm, *Helicoverpa zea* (Boddie), injured reproductive structures on genetically engineered *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* Berliner cotton. *Journal of Economic Entomology* 96 (3): 699-705.
- GREENPLATE, T. J.; MULLINS, J. W.; PENN, S. R.; DAHM, A.; REICH, B. J.; OSBORN, J. A.; RAHN, P. R.; RUSCHKE, L.; SHAPPLEY, Z. W. 2003. Partial characterization of cotton plants expressing two toxin proteins from *Bacillus thuringiensis*: relative toxin contribution, toxin interaction, and resistance management. *Journal of Applied Entomology* 127: 340-347.
- GUSTAFSON, D.I.; HEAD, G. P.; CAPRIO, M. A. 2006. Modeling the impact of alternative hosts on *Helicoverpa zea* adaption to Bollgard cotton. *Journal of Economic Entomology* 99 (6): 2116-2124.
- HALCOMB, J. L.; BENEDICT, J. H.; COOK, B.; RING, D. R. 1996. Survival and growth of bollworm and tobacco budworm on nontransgenic and transgenic cotton expressing a Cry1A insecticidal protein (Lepidoptera: Noctuidae). *Environmental Entomology* 25 (2): 250-255.
- INTERNATIONAL COTTON ADVISORY COMMITTEE, ICAC. 2005. Concerns, apprehensions and risks of biotech cotton. *WideStrike™ approved for commercial production*. The ICAC Recorder 23 (1): 3-11.
- INTERNATIONAL COTTON ADVISORY COMMITTEE, ICAC. 2004. Update on genetically engineered cotton. The ICAC Recorder 22 (2): 14-17.
- JACKSON, R. E.; BRADLEY Jr., J. R.; VAN DUYN, J. W. 2003. Field performance of transgenic cottons expressing one or two *Bacillus thuringiensis* endotoxins against bollworm, *Helicoverpa zea* (Boddie). *Journal Cotton Science* 7: 57-64.
- JACKSON, R. E.; BRADLEY Jr., J. R.; VAN DUYN, J. W.; GOULD, F. 2004. Comparative production of bollworm, *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae) from transgenic cotton expressing either one or two *Bacillus thuringiensis* Berliner proteins with and without insecticide oversprays. *Journal of Economic Entomology* 97 (5): 1719-1725.
- JACKSON, R. E.; MARCUS, M. A.; GOULD, F.; BRADLEY Jr., J. R.; VAN DUYN, J. W. 2007. Cross-resistance responses of Cry1Ac-selected *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) to the *Bacillus thuringiensis* protein Vip3A. *Journal of Economic Entomology* 100 (1): 180-186.
- LUTRELL, R.G.; WAN, L.; KNIGHTEN, K. 1999. Variation in susceptibility of noctuid (Lepidoptera) larvae attacking cotton and soybean to purified endotoxin proteins and commercial formulations of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Economic Entomology* 92 (1): 21-32.
- MARTINELLI, S.; MONTRAZI BARATA, R.; ZUCCHI, M.I.; DE CASTRO SILVA-FILHO, M.; OMOTO, C. 2006. Molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations associated to maize and cotton crops in Brazil. *Journal Economic Entomology* 99 (29): 519-526.
- McGAUGHEY, W. H. 1985. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science* 229: 193-195.
- MEDINA T., M. C.; DÍAZ C., P.; LUQUE Z., J. E.; SIABATTO, P. A. 1988. Ciclo de vida y descripción de *Chelonus insularis* Cresson (Hymenoptera: Braconidae), parásito de *Spodoptera* spp. *Revista Colombiana de Entomología* 14 (1): 13-21.
- NATIONAL COTTON COUNCIL. 1997. Bt cotton requires vigilant management. *Cotton Physiology Today*. USA. 8(3): 25-36.
- OLSEN, K. M.; DALY, J. D.; FINNEGAN, E. J.; MAHON, R. J. 2005. Changes in Cry1Ac Bt transgenic cotton in response to two environmental factors: Temperature and insect damage. *Journal of Economic Entomology* 98 (4): 1382-1390.
- PASHLEY, D. P.; JOHNSON, S. J.; SPARKS, A. N. 1985. Genetic population structure of migratory moths: the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Annals Entomological Society of America* 78: 756-762.
- RAUSHER, M. D. 2001. Co-evolution and the plant resistance to natural enemies. *Nature*. 411:857-864.
- RODRÍGUEZ CHALARCA, J.; OSPINA SÁNCHEZ, C.M. 2007. Establecimiento de la línea base y seguimiento de la susceptibi-

- lidad de *Sacadodes pyralis* Dyar y *Heliothis virescens* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) a la proteína Cry1Ac del algodón Bt en Colombia. En: Resúmenes Congreso Sociedad Colombiana de Entomología. Cartagena. Julio 25, 26 y 27 de 2007, p. 138.
- STONE, T. B.; SIMS, R. S. 1993. Geographic susceptibility of *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) to *Bacillus thuringiensis*. *Journal Economic Entomology* 86: 989-994.
- STONE, T., SIMS, S.; MARRONE, P. 1989. Selection of tobacco budworm for resistance to a genetically engineered *Pseudomonas fluorescens* containing the delta-endotoxin of Bt subspecies *kurstaki*. *Journal of Invertebrate Pathology* 53: 228-234.
- TABASHNIK, B. E.; CARRIERE, Y.; DENNCHY, T. J.; MORIN, S.; SISTERTON, M. S.; ROUSH, R. T.; SHELTON, A. M.; ZHAO, J.Z. 2003. Insect resistance to transgenic Bt crops: lessons from the laboratory and fields. *Journal of Economic Entomology* 96 (4): 1031-1038.
- TABASHNIK, B. E.; BIGGS, R. W.; FABRICK, J.A.; GASSMANN, A.J.; DENNCHY, T. J.; CARRIERE, Y.; MORIN, S. 2006. High-level resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac and cadherin genotype in pink bollworm. *Journal of Economic Entomology* 99 (6): 2125-2131.
- ZENNER DE POLANÍA, I.; ÁLVAREZ R., J. A.; MEJÍA C., R.; BAYONA R., M. A. 2005. Influencia de la toxina Cry1Ac del *Bacillus thuringiensis* sobre el desarrollo del cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). *Revista U.D.C.A Actualidad. & Divulgación Científica* 8 (2): 129-139.
- ZENNER DE POLANÍA, I.; ÁLVAREZ, A.; BARRETO, S. 2006. Influence of parasitism by *Chelonus insularis* Cresson (Hymenoptera: Braconidae, Cheloninae) on the susceptibility of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) to insecticidas. *Neotropical Entomology* 35 (6): 818-822.
- ZENNER DE POLANÍA, I.; ARÉVALO MALDONADO, H. A.; MEJÍA CRUZ, R. 2007. El gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) y algunas plantas transgénicas. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* 1 (1): 103-113.
- ZENNER DE POLANÍA, I.; ÁLVAREZ RODRIGUEZ, J. A.; AREVALO MALDONADO, H. A. 2008. Respuestas de *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) a la toxina Cry1Ac del *Bacillus thuringiensis*. *Revista Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, CATIE, Costa Rica. (aceptado para publicación).

Recibido: 4-nov-2007 • Aceptado: 19-may-2008