

# SUSCEPTIBILIDAD DE *Helicoverpa zea* (Boddie) A LA $\delta$ -ENDOTOXINA Cry2Ab DE *Bacillus thuringiensis* BERLINER

## SUSCEPTIBILITY OF *Helicoverpa zea* (Boddie) TO $\delta$ -ENDOTOXIN Cry2Ab OF *Bacillus thuringiensis* BERLINER

Sotero Aguilar-Medel<sup>1</sup>, J. Concepción Rodríguez-Maciél<sup>1</sup>, Ovidio Díaz-Gómez<sup>2</sup>, José L. Martínez-Carrillo<sup>3</sup>, José López-Collado<sup>5</sup>, Carlos A. Blanco<sup>4</sup> y Angel Lagunes-Tejeda<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México. México. (popolocas@hotmail.com) (concho@colpos.mx). <sup>2</sup>Facultad de Agronomía. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Álvaro Obregón 64. 78000. San Luis Potosí, San Luis Potosí. <sup>3</sup>Campo Experimental Valle del Yaqui. CIR Noroeste, INIFAP. Sonora, México. <sup>4</sup>USDA-ARS Southern Insect Management Research Unit. 141 Experiment Station Rd., Stoneville, MS 38776. <sup>5</sup>Campus Veracruz. Colegio de Postgraduados. México.

### RESUMEN

El algodón Bollgard II<sup>®</sup> expresa las  $\delta$ -endotoxinas Cry1Ac y Cry2Ab de *Bacillus thuringiensis* Berliner, controla larvas de *Helicoverpa zea* (Boddie) y es probable que en un futuro cercano se empiece a utilizar en la agricultura mexicana. Sin embargo, se desconoce la susceptibilidad inicial a esta toxina en poblaciones de *H. zea*. El objetivo de este estudio fue determinar la susceptibilidad a la  $\delta$ -endotoxina Cry2Ab en larvas neonatas de cinco poblaciones (una susceptible y cuatro de campo) de *H. zea*. Los niveles de mortalidad observados fueron bajos (<43%) en las dosis evaluadas ( $\leq 5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). La concentración estimada de toxina necesaria para impedir que 50% de las larvas expuestas llegara al tercer ínstar o inhibición de desarrollo del 50% de las larvas tratadas (ID<sub>50</sub>) varió de 0.017 a 0.086  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , mientras que la ID<sub>95</sub> varió de 1.06 a 1.93  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . La concentración que redujo o inhibió 50% del peso de larvas tratadas (IP<sub>50</sub>) varió de 0.013 a 0.025  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , y la IP<sub>95</sub> de 0.5 a 1.48  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Los valores que se obtuvieron de toxicidad a la  $\delta$ -endotoxina Cry2Ab en larvas de *H. zea* se consideran como respuesta inicial o punto de referencia, dado que dicha toxina aún no se utiliza en campo y servirán para estimar la proporción de cambio a través del tiempo una vez que el algodón Bollgard II<sup>®</sup> se utilice en México.

**Palabras clave:** Algodonero transgénico, Bollgard II<sup>®</sup>, Cry2Ab2, gusano elotero, línea base.

### INTRODUCCIÓN

El cultivo del algodón en México se ha caracterizado por un uso irracional de insecticidas (Terán-Vargas *et al.*, 2005), lo que ha propiciado el desarrollo de resistencia de los insectos (Bujanos-Muñiz, 1983<sup>[6]</sup>; Martínez-Carrillo *et al.*,

Recibido: Mayo, 2006. Aprobado: Junio, 2007.

Publicado como ENSAYO en *Agrociencia* 41: 653-662. 2007.

<sup>6</sup> Bujanos-Muñiz, R. 1983. Susceptibilidad a insecticidas en *Heliothis* spp. (Lepidoptera: Noctuidae) en el sur de Tamaulipas, México. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México. 173 p.

### ABSTRACT

Bollgard II<sup>®</sup> cotton expresses the  $\delta$ -endotoxins Cry1Ac and Cry2Ab of *Bacillus thuringiensis* Berliner, controls larvae of *Helicoverpa zea* (Boddie), and will probably be used in the near future in Mexican agriculture. However, the initial susceptibility to this toxin in populations of *H. zea* is unknown. The objective of the present study was to determine the susceptibility to the  $\delta$ -endotoxin Cry2Ab in neonate larvae of five populations (one susceptible and four field populations) of *H. zea*. The observed mortality levels were low (<43%) in the evaluated doses ( $\leq 5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). The estimated concentration necessary to prevent 50% of the exposed larvae from reaching the third instar or inhibition of development of 50% of treated larvae (ID<sub>50</sub>) varied from 0.017 to 0.086  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , while the ID<sub>95</sub> varied from 1.06 to 1.93  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . The concentration that reduced or inhibited 50% of the weight of treated larvae (IP<sub>50</sub>) varied from 0.013 to 0.025  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , and the IP<sub>95</sub> from 0.5 to 1.48  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . The obtained toxicity values to  $\delta$ -endotoxin Cry2Ab in larvae of *H. zea* are considered as initial response or reference point, given that this toxin is still not used in the field and will serve to estimate the proportion of change over time once Bollgard II<sup>®</sup> is used in México.

**Key words:** Transgenic cotton, Bollgard II<sup>®</sup>, Cry2Ab2, corn borer, base line.

### INTRODUCTION

The cultivation of cotton in México has been characterized by an irrational use of insecticides (Terán-Vargas *et al.*, 2005), which has propitiated the development of resistance of the insects (Bujanos-Muñiz, 1983<sup>[6]</sup>; Martínez-Carrillo *et al.*, 1991). Pest control based on the use of insecticides has caused severe problems of environmental contamination, negative effects on

1991). El control de plagas sustentado en el uso de insecticidas ha ocasionado severos problemas de contaminación ambiental, efectos negativos en la salud humana (Bottrell y Adkisson, 1977) y dejar de cultivar una especie vegetal importante (Georghiou y Taylor, 1977), tal como ocurrió con el algodón en el sur de Tamaulipas en la época de los 70 (Adkisson, 1972). Afortunadamente, este tipo de escenarios no se ha repetido en los últimos años.

Como alternativa para reducir el uso de insecticidas convencionales y manejar con eficacia las principales plagas del algodón, en 1996 se empezó a utilizar a nivel mundial (Layton *et al.*, 1997) y en México (Martínez-Carrillo y Díaz-López, 2005) el algodón transgénico Bollgard<sup>®</sup> que expresa la  $\delta$ -endotoxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Bt). Esta toxina es efectiva para controlar larvas de *Heliothis virescens* (Fabricius) y *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Koziel *et al.*, 1993; Perlak *et al.*, 2001). Sin embargo es menos efectiva para controlar plagas importantes como *Helicoverpa zea* (Boddie) (J. E. Smith) (MacIntosh *et al.*, 1990).

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América aprobó el uso comercial del cultivar Bollgard II<sup>®</sup> en 2002 (EPA, 2006) y está disponible para los agricultores de dicho país desde 2003 (Akin y Layton, 2004). En un futuro cercano Bollgard II<sup>®</sup> también estará a disposición de los agricultores mexicanos (James, 2006) y será de gran utilidad en las áreas donde *H. zea* es una plaga importante, tal es el caso de La Comarca Lagunera y Chihuahua (Martínez-Carrillo y Díaz-López, 2005). Este cultivar, en adición a la  $\delta$ -endotoxina Cry1Ac, también expresa la  $\delta$ -endotoxina Cry2Ab que es muy efectiva para el control de *H. zea* (Sivasupramanian *et al.*, 2005).

Uno de los retos del uso de cultivos transgénicos como Bollgard<sup>®</sup> y Bollgard II<sup>®</sup>, consiste en retrasar el desarrollo de resistencia en las plagas objeto de control (Sims y Stone, 1991; Gould *et al.*, 1992; Moar *et al.*, 1995; De Maagd *et al.*, 1999; Tabashnik *et al.*, 2003; Luo *et al.*, 2007). Para mitigar el desarrollo de resistencia, es necesario que los agricultores siembren con algodón convencional áreas de refugio adyacentes al algodón transgénico (Gould y Tabashnik, 1998; Díaz *et al.*, 2005). Las zonas de refugio tienen como función permitir el desarrollo de individuos susceptibles, mismos que al llegar al estado adulto se espera copulen con aquellos que emerjan del algodón Bollgard<sup>®</sup> y se reduzca el riesgo de resistencia.

Las proporciones de las áreas a sembrar de Bollgard<sup>®</sup>: algodón convencional (refugio) que se han utilizado en México son 80:20 y 96:4. En el primer caso, por cada 100 ha de algodón, 80 ha se siembran con Bollgard<sup>®</sup> y 20 ha se dejan como

human health (Bottrell and Adkisson, 1977), and growers to cease cultivating a very important plant species (Georghiou and Taylor, 1977), as occurred with cotton in the south of Tamaulipas in the 1970's (Adkisson, 1972). Fortunately, this type of scenario has not been repeated in recent years.

In 1996 transgenic Bollgard<sup>®</sup> cotton, which expresses the  $\delta$ -endotoxin Cry1Ac of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Bt), came into use worldwide (Layton *et al.*, 1997) and in México (Martínez-Carrillo and Díaz-López, 2005) as an alternative for reducing the use of conventional pesticides and for the efficient management of the principal cotton pests. This toxin is effective for controlling larvae of *Heliothis virescens* (Fabricius) and *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Koziel *et al.*, 1993; Perlak *et al.*, 2001). However, it is not as effective for controlling important pests such as *Helicoverpa zea* (Boddie) (J. E. Smith) (MacIntosh *et al.*, 1990).

The Environmental Protection Agency of the United States of America approved the commercial use of the cultivar Bollgard II<sup>®</sup> in 2002 (EPA, 2006) and it has been available for the U.S. farmers since 2003 (Akin and Layton, 2004). In the near future, Bollgard II<sup>®</sup> will also be available to Mexican farmers (James, 2006) and will be of great usefulness in the areas where *H. zea* is an important pest, as is the case of La Comarca Lagunera and Chihuahua (Martínez-Carrillo and Díaz-López, 2005). This cultivar, in addition to the  $\delta$ -endotoxin Cry1Ac, also expresses the  $\delta$ -endotoxin Cry2Ab, which is very effective in the control of *H. zea* (Sivasupramanian *et al.*, 2005).

One of the challenges of the use of transgenic crops such as Bollgard<sup>®</sup> and Bollgard II<sup>®</sup>, is to delay the development of resistance in the target pests (Sims and Stone, 1991; Gould *et al.*, 1992; Moar *et al.*, 1995; De Maagd *et al.*, 1999; Tabashnik *et al.*, 2003; Luo *et al.*, 2007). To mitigate the development of resistance, it is necessary for the farmers to sow conventional cotton in refuge areas adjacent to the transgenic cotton (Gould and Tabashnik, 1998; Díaz *et al.*, 2005). The refuge zones have the function of allowing the development of susceptible individuals, which upon reaching adulthood will hopefully copulate with those that emerge from the Bollgard<sup>®</sup> cotton, thus reducing the risk of resistance.

The proportions of the areas to be sown with Bollgard<sup>®</sup>: conventional cotton (refuge) that have been used in México are 80:20 and 96:4. In the first case, for every 100 ha of cotton, 80 ha are sown with Bollgard<sup>®</sup> and 20 ha are left as refuge (the pests present in the refuge can be controlled by using

refugio (las plagas presentes en el refugio se pueden controlar usando insecticidas convencionales, excepto con formulaciones de insecticidas a base de Bt). En la opción 96:4, 96 ha corresponden a Bollgard® y 4 ha al refugio (el control de plagas en el refugio no está permitido). A la fecha, las poblaciones plaga objeto de control por parte del algodón Bollgard® mantienen su susceptibilidad a la  $\delta$ -endotoxina Cry1Ac, indicando la efectividad del programa de manejo de la resistencia implementado (Rodríguez *et al.*, 2005). Es probable que esta estrategia también se utilice en algodón Bollgard II®.

El conocimiento de la respuesta inicial de las poblaciones de insectos plaga a las  $\delta$ -endotoxinas de Bollgard® es un requisito indispensable para conocer la evolución de la resistencia una vez que dicho cultivar se utiliza comercialmente (Luttrell *et al.*, 1999; Ali y Luttrell, 2007). Los valores de respuesta que en el futuro se obtengan, se comparan con los valores de respuesta inicial para conocer la proporción de cambio a través del tiempo (Zhao *et al.*, 2001). Idealmente dichos valores deberían determinarse para todos los insecticidas. Desafortunadamente, en muchos casos se desconocen y por tanto se dificulta conocer la magnitud del cambio a través del tiempo.

El objetivo de la presente investigación consistió en determinar la respuesta inicial (línea base de respuesta) a la  $\delta$ -endotoxina Cry2Ab en poblaciones mexicanas de *H. zea* procedentes de diversas áreas algodoneras del norte de México.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Poblaciones

Se utilizaron cuatro poblaciones de campo de *H. zea* procedentes de las siguientes áreas algodoneras: La Laguna (Ejidos Florida y Las Vegas, municipio de Francisco I. Madero; Ejidos Coyote y Compuertas, municipio de Matamoros; Ejido Urquizo, municipio de San Pedro de las Colonias, Coahuila), La Huasteca (municipios de Mante y Altamira, Tamaulipas), Delicias (Ejido Lázaro Cárdenas, municipio de Meoqui, Chihuahua) y Juárez (Ejido Esperanza, municipio de Praxedis Gilberto Guerrero y Ejido Tres Jacales, municipio de Guadalupe, Chihuahua).

Para cada población, durante el ciclo de cultivo primavera-verano del 2003, al menos 300 larvas de diferentes instares se recolectaron de algodón convencional. Las larvas se llevaron al laboratorio de Toxicología del Colegio de Postgraduados en Montecillo, Estado de México y se criaron hasta la generación F1. Las larvas neonatas de la generación F1 se utilizaron para realizar los ensayos.

Como referencia de susceptibilidad se utilizó una población que proporcionó el Centro Internacional del Mejoramiento del Maíz y Trigo (CIMMYT), ubicado en Texcoco, Estado de México. Esta población se recolectó en campo hace 15 años y desde entonces

convencional insecticidas, except with formulations of insecticides based on Bt). In the option 96:4, 96 ha correspond to Bollgard® and 4 ha to the refuge (pest control is not permitted in the refuge). Up until now, the target pest populations of Bollgard® maintain their susceptibility to the  $\delta$ -endotoxin Cry1Ac, indicating the effectiveness of the implemented resistance management program (Rodríguez *et al.*, 2005). It is likely that this strategy will also be used in Bollgard II®.

Knowledge of the initial response of the insect pest populations to the  $\delta$ -endotoxins of Bollgard® is indispensable for knowing the evolution of the resistance once this cultivar is used commercially (Luttrell *et al.*, 1999; Ali and Luttrell, 2007). The response values obtained in the future are compared with the initial response values to know the proportion of change through time (Zhao *et al.*, 2001). Ideally, these values should be determined for all of the insecticides. Unfortunately, in many cases they are unknown and therefore it is difficult to know the magnitude of the change through time.

The objective of the present investigation was to determine the initial response (response base line) to the  $\delta$ -endotoxin Cry2Ab in Mexican populations of *H. zea* from diverse cotton growing areas of northern México.

## MATERIALS AND METHODS

### Populations

Four field populations of *H. zea* were used from the following cotton growing areas: La Laguna (Ejidos Florida and Las Vegas, municipality of Francisco I. Madero, Ejidos Coyote and Compuertas, municipality of Matamoros; Ejido Urquizo, municipality of San Pedro de las Colonias, Coahuila), La Huasteca (municipalities of Mante and Altamira, Tamaulipas), Delicias (Ejido Lázaro Cárdenas, municipality of Meoqui, Chihuahua) and Juárez (Ejido Esperanza, municipality of Praxedis Gilberto Guerrero and Ejido Tres Jacales, municipality of Guadalupe, Chihuahua).

For each population, during the spring-summer growing season of 2003, at least 300 larvae of different instars were collected from conventional cotton. The larvae were taken to the Toxicology Laboratory of the Colegio de Postgraduados in Montecillo, State of México and were bred to generation F1. The newborn larvae of generation F1 were used to carry out the assays.

As susceptibility reference, a population was used that was provided by the Centro Internacional del Mejoramiento del Maíz y Trigo (CIMMYT), located in Texcoco, State of México. This population was collected in the field 15 years ago and has been maintained under laboratory conditions since then, free of selection pressure with insecticides.

se ha mantenido en condiciones de laboratorio, libre de presión de selección con insecticidas.

#### Cría de *H. zea*

Las larvas recolectadas en campo se colocaron individualmente en vasos con 10 mL de dieta artificial (Cotton Bollworm; Southland Products Inc). Los individuos se mantuvieron en una cámara de cría a  $27 \pm 1$  °C, humedad relativa de  $70 \pm 5\%$  y un fotoperiodo de 14:10 horas luz: oscuridad. Una vez que las larvas pasaron a pupas, éstas se lavaron con hipoclorito de sodio al 0.5%, se enjuagaron con agua corriente y se colocaron en jaulas de  $25 \times 25 \times 35$  cm. Los adultos se alimentaron con miel de abeja al 10%. Las hembras ovipositaron sobre la tela que recubría a la jaula y los huevos se recolectaron cada 24 h durante ocho días.

#### $\delta$ -endotoxina Cry2Ab

Se utilizó tejido de la planta de maíz transgénico previamente deshidratado y liofilizado que contiene la  $\delta$ -endotoxina Cry2Ab a una concentración de 0.56% (Monsanto Comercial S.A. de C.V. México). Esta toxina se mantuvo, durante el periodo de los ensayos, a  $-14$  °C, en un recipiente herméticamente cerrado. Las concentraciones que se utilizaron en los ensayos se prepararon con agar al 0.2% (Bacto Nutrient Agar Dehydrated; DIFCO Laboratorios) como diluyente. Con la finalidad de tener una suspensión homogénea en cada concentración utilizada, la dilución parental se agitó, con un mezclador magnético (Thermolyne; Marca CIMAREC), durante una hora antes de utilizarse para preparar la siguiente dilución, o 2 min antes de utilizarla en los ensayos.

#### Procedimiento experimental

Se utilizó el método de ensayo descrito por Sims *et al.*, (1996), que consiste en colocar un mililitro de dieta artificial (Tobacco Bollworm; Southland Products Inc) en cada cavidad de una charola para bioensayo (Bio-Assay Tray Bio-BA-128; C-D Internacional, Inc). Una hora después que la dieta solidificó y enfrió, se depositaron 200  $\mu$ L de la concentración requerida de la  $\delta$ -entoxina Cry2Ab en cada cavidad, sobre la superficie de la dieta artificial.

Después de 24 h de depositada la  $\delta$ -endotoxina, se colocó en cada cavidad de ensayo una larva neonata; las cavidades se cubrieron con un plástico transparente autoadherible (Pull N' Peel Tab Bio-Cv-16; C-D Internacional, Inc.), que tiene micro perforaciones que permiten el intercambio gaseoso. Las charolas de ensayo se transfirieron a la cámara de cría. A los cinco días de haber expuesto las larvas neonatas a las diferentes concentraciones, se evaluaron los siguientes parámetros: a) porcentaje de mortalidad, b) porcentaje de larvas que llegaron al tercer instar c) porcentaje de reducción de peso respecto al testigo sin tratar. Se consideró larva muerta la que no presentaba movimientos al ser pinchada con una aguja de disección.

Después de determinar la ventana biológica, es decir, el intervalo entre 0 y 100% de respuesta en cada ensayo, se introdujeron al menos 10 concentraciones seriales intermedias que cubrieran dicho

#### Breeding of *H. zea*

The larvae collected in the field were individually placed in recipients with 10 mL of artificial diet (Cotton Bollworm; Southland Products Inc.). The individuals were maintained in a breeding chamber at  $27 \pm 1$  °C, relative humidity of  $70 \pm 5\%$  and a photoperiod of 14:10 hours light:darkness. Once the larvae passed to the pupa stage, they were washed with sodium hypochlorite at 0.5%, rinsed with running water and placed in cages measuring  $25 \times 25 \times 35$  cm. The adults were fed with honey bee at 10%. The females laid eggs on the cloth covering the cage and the eggs were collected every 24 h during eight days.

#### $\delta$ -endotoxin Cry2Ab

Tissue from the previously dehydrated and lyophilized transgenic maize plant containing the  $\delta$ -endotoxin Cry2Ab at a concentration of 0.56% (Monsanto Comercial S. A. de C. V. México) was used. This toxin was maintained, during the period of the assays, at  $-14$  °C, in a hermetically closed container. The concentrations used in the assays were prepared with agar at 0.2% (Bacto Nutrient Agar Dehydrated, DIFCO Laboratories) as diluter. In order to have a homogeneous suspension in each concentration used, the parental dilution was agitated with a magnetic mixer (Thermolyne; CIMAREC), during one hour prior to being used to prepare the next dilution, or 2 min before being used in the assays.

#### Experimental procedure

The method used was that described by Sims *et al.* (1996), which consists of placing a milliliter of artificial diet (Tobacco Bollworm; Southland Products Inc) in each cavity of bioassay tray (Bio-Assay Tray Bio-BA-128; C-D Internacional, Inc.). One hour after the diet had solidified and cooled, 200  $\mu$ L of the required concentration of the  $\delta$ -endotoxin Cry2Ab were deposited in each cavity, on the surface of the artificial diet.

Twenty-four hours after the  $\delta$ -endotoxin was deposited, a neonate larva was placed in each assay cavity; the cavities were covered with self-adhering transparent plastic (Pull N' Peel Tab Bio-Cv-16; C-D Internacional, Inc.), which has micro perforations that allow gas exchange. The assay trays were transferred to the breeding chamber. When the larvae had been exposed for five days to the different concentrations, the following parameters were evaluated: a) percentage of mortality, b) percentage of larvae that reached the third instar, c) percentage of weight reduction with respect to the untreated control. A larva was considered dead when did not show any movements when pricked with a dissection needle.

After determining the biological window, that is, the interval between 0 and 100% of response in each assay, at least 10 intermediate serial concentrations were introduced that covered the interval and five replicates were carried out on different days. The sample size was 32 larvae per dose per replicate, and each replicate

intervalo y se realizaron cinco repeticiones en diferentes días. El tamaño de muestra fue de 32 larvas por dosis por repetición y cada repetición incluyó un testigo al cual sólo se le aplicó 200  $\mu$ L de la solución de agar al 0.2%.

**Análisis de datos**

Las variables porcentaje de larvas que llegaron al tercer instar y porcentaje de reducción de peso respecto al testigo sin tratar, se sometieron a un análisis Probit, mediante el procedimiento Proc Probit del paquete estadístico SAS (SAS, 2000). La respuesta de las poblaciones se consideró no significativamente diferente cuando sus correspondientes límites de confianza al 95% se traslapaban. La respuesta relativa (RR) se obtuvo dividiendo el valor observado de la concentración que ocasionaba 50% (ID<sub>50</sub> o IP<sub>50</sub>) o 95% (ID<sub>95</sub> o IP<sub>95</sub>) de la respuesta de la población de campo, entre el valor correspondiente de la población susceptible (Robertson y Preisler, 1992). La mortalidad en los testigos sin tratar fue  $\leq 10\%$  y se corrigió mediante la fórmula de Abbott (Abbott, 1925).

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**Porcentaje de mortalidad**

Se obtuvo una correlación positiva ( $0.8 \geq r \leq 0.9$ ;  $p \leq .05$ ) entre la concentración de  $\delta$ -endotoxina Cry2Ab y el porcentaje de mortalidad en todas las poblaciones evaluadas. Sin embargo, los niveles de mortalidad observados fueron menores de 43% aun en la concentración más alta ( $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Cuadro 1), lo que coincide con los datos de Gore *et al.* (2005). En consecuencia, no fue posible estimar las concentraciones que matarían 50 (CL<sub>50</sub>) y 95% (CL<sub>95</sub>) de las larvas expuestas.

**Inhibición del desarrollo al tercer instar (ID)**

Las concentraciones de la  $\delta$ -endotoxina Cry2Ab que se requirieron para impedir que 50% de larvas expuestas llegaran al tercer instar o inhibición del desarrollo al 50% (ID<sub>50</sub>) variaron de 0.017 (Juárez) a 0.086 (Delicias)  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Cuadro 2). La población Juárez mostró mayor susceptibilidad que el resto de las poblaciones, dado que su ID<sub>50</sub> fue  $0.017 \mu\text{g mL}^{-1}$  y los límites de confianza al 95% de la ID<sub>50</sub> no se traslaparon con el resto de las poblaciones. No hubo diferencia significativa entre las poblaciones Laguna, Huasteca, Delicias y susceptible (Cuadro 2). La ID<sub>95</sub> varió de 1.06 (Juárez) a  $1.93 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Delicias). A este nivel de respuesta los límites de confianza de las poblaciones de campo evaluadas se traslaparon con los observados en la población susceptible (Cuadro 2). Los valores de RR<sub>50</sub> y RR<sub>95</sub> fueron bajos ( $0.66$  a  $1.2 \times$ ).

included a control to which only 200  $\mu$ L of the agar solution at 0.2% was applied.

**Data analysis**

The variables percentage of larvae that reached the third instar, and percentage of weight reduction with respect to the untreated control, were subjected to a Probit analysis, by means of the procedure Proc Probit of the SAS statistical package (SAS, 2000). The response of the populations was considered significantly different when their corresponding confidence limits at 95% overlapped. The relative response (RR) was obtained by dividing the observed value of the concentration that caused 50% (ID<sub>50</sub> or IP<sub>50</sub>) or 95% (ID<sub>95</sub> or IP<sub>95</sub>) of the response of the field population, into the corresponding value of the susceptible population (Robertson and Preisler, 1992). The mortality in the untreated controls was  $\leq 10\%$  and was corrected by the Abbott formula (Abbott, 1925).

**RESULTS AND DISCUSSION**

**Percentage of mortality**

A positive correlation ( $0.8 \geq r \leq 0.9$ ;  $p \leq 0.5$ ) was obtained between the concentration of  $\delta$ -endotoxin Cry2Ab and the percentage of mortality in all of the populations evaluated. However, the mortality levels observed were less than 43% even in the highest concentration ( $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Table 1), which coincides with the data of Gore *et al.* (2005). Consequently, it was not possible to estimate the concentration that would kill 50 (CL<sub>50</sub>) and 95% (CL<sub>95</sub>) of the exposed larvae.

**Cuadro 1. Porcentaje de mortalidad corregida de larvas neonatas de *H. zea* expuestas durante cinco días a la  $\delta$ -endotoxina Cry2Ab de *B. thuringiensis*.**

**Table 1. Percentage of corrected mortality of neonate larvae of *H. zea* exposed during five days to the  $\delta$ -endotoxin Cry2Ab of *B. thuringiensis*.**

Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	Población				
	La Laguna	Huasteca	Delicias	Juárez	Susceptible
0.001	0.0	0.7	0.0	0.0	1.3
0.005	3.8	2.6	5.1	0.0	4.4
0.01	3.8	2.6	3.8	0.0	3.8
0.025	9.5	5.8	9.6	2.6	5.7
0.05	12.7	10.3	10.3	3.2	2.1
0.1	13.9	6.5	13.5	3.9	5.7
0.5	20.9	13.6	20.5	11.6	13.4
1.0	22.8	21.3	26.9	23.2	29.9
5.0	32.3	31.0	35.9	38.1	42.7
r <sup>†</sup>	0.8	0.9	0.8	0.9	0.9

n = 160 larvas evaluadas por dosis en cada población.

† = Coeficiente de correlación.

**Cuadro 2. Análisis Probit del porcentaje de larvas neonatas de *H. zea* que no se desarrollaron al tercer instar (ID) a los cinco días de estar expuestas a la  $\delta$ -endotoxina Cry2Ab de *B. thuringiensis*.**

**Table 2. Probit analysis of the percentage of neonate larvae of *H. zea* that did not develop to the third instar (ID) after five days of exposure to the  $\delta$ -endotoxin Cry2Ab of *B. thuringiensis*.**

Población	n	Pendiente $\pm$ ES	ID <sub>50</sub> <sup>†</sup> $\mu\text{g mL}^{-1}$ (CL al 95%)	ID <sub>95</sub> <sup>†</sup> $\mu\text{g mL}^{-1}$ (CL al 95%)	$\chi^2$	RR <sub>50</sub> <sup>¶</sup>	RR <sub>95</sub> <sup>¶</sup>
La Laguna	1280	1.14 $\pm$ 0.1	0.043 (0.029-0.062)	1.18 (0.52-2.76)	17.74	0.67	0.74
Huasteca	1120	1.20 $\pm$ 0.1	0.065 (0.044-0.095)	1.53 (0.67-3.72)	13.22	1.01	0.96
Delicias	1280	1.22 $\pm$ 0.2	0.086 (0.052-0.142)	1.93 (0.63-6.09)	29.32	1.34	1.20
Juárez	1440	0.92 $\pm$ 0.5	0.017 (0.014-0.021)	1.06 (0.71-1.73)	10.74	0.39	0.66
Susceptible	1280	1.18 $\pm$ 0.1	0.064 (0.044-0.093)	1.59 (0.70-3.80)	17.22		

<sup>†</sup> Concentración de  $\delta$ -endotoxina Cry2Ab de *B. thuringiensis* capaz de impedir que el 50 (ID<sub>50</sub>) o el 95% (ID<sub>95</sub>) de larvas expuestas lleguen al tercer instar después de cinco días de exposición.

<sup>¶</sup> Respuesta relativa = ID<sub>50(95)</sub> de la población de campo / ID<sub>50(95)</sub> de la población susceptible.

### Inhibición del peso de las larvas expuestas respecto al testigo (IP)

Para reducir 50% del peso de las larvas neonatas de *H. zea* expuestas en relación al testigo sin tratar (IP<sub>50</sub>), se requirieron concentraciones de  $\delta$ -endotoxina Cry2Ab que variaron de 0.013 (Juárez) a 0.025  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Susceptible) (Cuadro 3). De acuerdo al valor de RR<sub>50</sub>, Juárez fue la población más susceptible con una IP<sub>50</sub> de 0.013  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Las poblaciones Laguna, Huasteca y Delicias no fueron estadísticamente diferentes a la susceptible de referencia debido a que sus límites fiduciales al 95% se traslaparon. Los valores de RR<sub>50</sub> en cada población fueron <1 (Cuadro 3). Para reducir 95% del peso de las larvas, respecto al testigo sin tratar (IP<sub>95</sub>) se requirieron concentraciones

### Inhibition of development to the third instar (ID)

The concentrations of the  $\delta$ -endotoxin Cry2Ab that were required to prevent 50% of the exposed larvae from reaching the third instar or 50% inhibition of development (ID<sub>50</sub>) varied from 0.017 Juárez to 0.086 (Delicias)  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Table 2). The Juárez population showed higher susceptibility than the rest of the populations, given that its ID<sub>50</sub> was 0.017  $\mu\text{g mL}^{-1}$  and the confidence limits at 95% of the ID<sub>50</sub> did not overlap with the rest of the populations. There was no significant difference among the populations Laguna, Huasteca, Delicias and susceptible (Table 2). The ID<sub>95</sub> varied from 1.06 (Juárez) to 1.93  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Delicias). At this response level the confidence limits of the field populations evaluated overlapped with those observed

**Cuadro 3. Análisis Probit del porcentaje de inhibición de peso de larvas neonatas de *H. zea* expuestas durante cinco días a la  $\delta$ -endotoxina Cry2Ab de *B. thuringiensis*.**

**Table 3. Probit analysis of the percentage of weight inhibition of neonate larvae of *H. zea* exposed five days to the  $\delta$ -endotoxin Cry2Ab of *B. thuringiensis*.**

Población	n	Pendiente $\pm$ ES	IP <sub>50</sub> <sup>†</sup> $\mu\text{g mL}^{-1}$ (CL al 95%)	IP <sub>95</sub> <sup>†</sup> $\mu\text{g mL}^{-1}$ (CL al 95%)	$\chi^2$	RR <sub>50</sub> <sup>¶</sup>	RR <sub>95</sub> <sup>¶</sup>
La laguna	1280	1.05 $\pm$ 0.1	0.016 (0.011-0.026)	0.62 (0.26-1.56)	13.4	0.64	0.41
Huasteca	1440	0.98 $\pm$ 0.06	0.022 (0.017-0.028)	1.08 (0.69-1.85)	3.9	0.88	0.73
Delicias	1440	0.95 $\pm$ 0.06	0.019 (0.015-0.024)	1.03 (0.66-1.80)	7.1	0.76	0.69
Juárez	1440	1.04 $\pm$ 0.07	0.0103 (0.010-0.017)	0.5 (0.33-0.86)	11.1	0.52	0.34
Susceptible	1440	0.93 $\pm$ 0.06	0.025 (0.019-0.032)	1.48 (0.93-2.63)	5.9		

<sup>†</sup> Concentración de  $\delta$ -endotoxina Cry2Ab de *B. thuringiensis* capaz de reducir en 50 (IP<sub>50</sub>) o el 95% (IP<sub>95</sub>) el peso de las larvas expuestas en relación al testigo sin tratar.

<sup>¶</sup> Respuesta relativa = IP<sub>50(95)</sub> de la población de campo / IP<sub>50(95)</sub> de la población susceptible.

de  $\delta$ -endotoxina Cry2Ab de 0.5 a 1.48  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Cuadro 3). A este nivel de respuesta, la población Juárez fue más sensible que la población susceptible dado que sus límites fiduciales no se traslaparon y su  $\text{RR}_{95}$  fue de 0.34 $\times$ ; el resto de los valores de  $\text{RR}_{95}$  fueron inferiores a 1.0 $\times$ .

Los resultados muestran que la  $\delta$ -endotoxina Cry2Ab fue más tóxica para la población Juárez que para la susceptible, situación similar encontraron Alí *et al.* (2003 y 2006) al evaluar el desarrollo larval en presencia de la  $\delta$ -endotoxina Cry1Ac en *H. zea*. Esto ocurre porque la susceptibilidad tiene una distribución normal (Tanaka y Noppun, 1989).

La variación que se observó en la respuesta a la  $\delta$ -endotoxina Cry2Ab en las poblaciones de campo evaluadas fue baja en relación con otros estudios. Al nivel de la  $\text{ID}_{95}$  y de la  $\text{IP}_{95}$ , la variación entre las poblaciones de campo fue inferior a 2 $\times$  (Cuadros 2 y 3). Stone y Sims (1993) documentaron una variación de 16 $\times$  en la respuesta de *H. virescens* a la  $\delta$ -endotoxina Cry1Ac. Alí *et al.* (2004) determinaron una variación de 3 a 7 $\times$  en la  $\text{CL}_{50}$  a la  $\delta$ -endotoxina Cry2Ab en poblaciones de *H. zea* que se desarrollaban en cultivos no transgénicos y 25 $\times$  en aquellas provenientes de cultivos transgénicos.

Las poblaciones de *H. zea* evaluadas han sido, desde 1996, seleccionadas en campo por la  $\delta$ -endotoxina Cry1Ac que expresa el algodón Bollgard<sup>®</sup> (Rodríguez *et al.*, 2005). Dicho cultivo se ha utilizado en México para el control de *H. virescens* y *P. gossypiella*, pero además ejerce un control moderado de *H. zea*. Las larvas de *H. zea* se han seleccionado con dicha toxina en superficies amplias que se cultivan con Bollgard<sup>®</sup>. Por ejemplo, en Chihuahua, *H. zea* está presente y en ese lugar se siembra 49% de todo el algodón Bollgard<sup>®</sup> de México (Martínez-Carrillo y Díaz-López, 2005). Se estima que la exposición a  $\delta$ -endotoxina Cry1Ac no ha cambiado la susceptibilidad de *H. zea* a la  $\delta$ -endotoxina Cry2Ab dado que no existe evidencia de resistencia cruzada entre ambas (English *et al.*, 1994; Adamczyk *et al.*, 2001; Stewart *et al.*, 2001; Luo *et al.*, 2007).

A nivel mundial no existen casos documentados de resistencia a las  $\delta$ -endotoxinas que expresa el algodón Bollgard II<sup>®</sup>; sin embargo, existen casos de resistencia a la  $\delta$ -endotoxina Cry2Ab cuando los individuos se seleccionan en condiciones de laboratorio (Mahon *et al.*, 2007).

La evaluación de la utilidad de un programa de manejo de la resistencia a las  $\delta$ -endotoxinas que expresa ya sea Bollgard<sup>®</sup> o Bollgard II<sup>®</sup> consiste en determinar, mediante ensayos biológicos, la respuesta inicial a las  $\delta$ -endotoxinas antes de que su uso en campo altere la composición genética de la población

in the susceptible population (Table 2). The values of  $\text{RR}_{50}$  and  $\text{RR}_{95}$  were low (0.66 to 1.2 $\times$ ).

#### Inhibition of the weight of the exposed larvae with respect to the control (IP)

To reduce 50% of the weight of the exposed neonate larvae of *H. zea* with respect to the untreated control ( $\text{IP}_{50}$ ), concentrations of  $\delta$ -endotoxin Cry2Ab were required, varying from 0.013 (Juárez) to 0.025  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Susceptible) (Table 3). According to the value of  $\text{RR}_{50}$ , Juárez was the most susceptible population with an  $\text{IP}_{50}$  OF 0.013  $\mu\text{G mL}^{-1}$ . The Laguna, Huasteca and Delicias populations were not statistically different from susceptible reference population, given that their fiducial limits at 95% overlapped. The values of  $\text{RR}_{50}$  in each population were <1 (Table 3). To reduce 95% of the larvae weight, with respect to the untreated control ( $\text{IP}_{95}$ ) concentrations of  $\delta$ -endotoxin Cry2Ab from 0.5 to 1.48  $\mu\text{g mL}^{-1}$  were required (Table 3). At this response level, the Juárez was more sensitive than the susceptible population given that its fiducial limits did not overlap and its  $\text{RR}_{95}$  was 0.34 $\times$ ; the rest of the values of  $\text{RR}_{95}$  were lower than 1.0 $\times$ .

The results show that the  $\delta$ -endotoxin Cry2Ab was more toxic for the Juárez population than for the susceptible one. A similar situation was found by Alí *et al.* (2003 and 2006) when evaluating larval development in the presence of the  $\delta$ -endotoxin Cry1Ac in *H. zea*. This occurs because the susceptibility has a normal distribution (Tanaka and Noppun, 1989).

The variation that was observed in the response to the  $\delta$ -endotoxin Cry2Ab in the field populations evaluated was low with respect to other studies. At the level of the  $\text{ID}_{95}$  and of the  $\text{IP}_{95}$ , the variation among the field populations was lower than 2 $\times$  (Tables 2 and 3). Stone and Sims (1993) documented a variation of 16 $\times$  in the response of *H. virescens* to the  $\delta$ -endotoxin Cry1Ac. Alí *et al.* (2004) determined a variation from 3 to 7 $\times$  in the  $\text{CL}_{50}$  to the  $\delta$ -endotoxin Cry2Ab in populations of *H. zea* that developed in non-transgenic crops and 25 $\times$  in those from transgenic crops.

Since 1996, the evaluated populations of *H. zea* have been selected in the field by the  $\delta$ -endotoxin Cry1Ac expressed by Bollgard<sup>®</sup> cotton (Rodríguez *et al.*, 2005). This crop has been used in México for the control of *H. virescens* and *P. gossypiella*, but it also exerts a moderate control of *H. zea*. The larvae of *H. zea* have been selected with this toxin in broad surfaces grown with Bollgard<sup>®</sup>. For example, *H. zea* is present in Chihuahua, where 49% of all of the Bollgard<sup>®</sup> cotton of México is sown (Martínez-Carrillo and Díaz-López, 2005). It is estimated that

objeto de control (Matten *et al.*, 2004) y determinar los cambios en dicha respuesta a través de los años mediante la utilización de una dosis que permita distinguir fenotipos resistentes de susceptibles o dosis de diagnóstico (Matten *et al.*, 2004).

Los valores de ID<sub>50</sub>, ID<sub>95</sub>, IP<sub>50</sub>, IP<sub>95</sub> que se presentan corresponden a la respuesta de poblaciones de *H. zea* que no han sido seleccionadas con la  $\delta$ -endotoxina Cry2Ab. Por tanto, se consideran como respuesta inicial o punto de referencia a considerar en estudios que se realicen cuando las poblaciones evaluadas sean seleccionadas con el algodón Bollgard II<sup>®</sup>.

La perspectiva de la utilidad del algodón Bollgard II<sup>®</sup> en México es mayor que la observada en Bollgard<sup>®</sup>, dado que el primero controla un espectro de plagas más amplio (Stewart *et al.*, 2001; Hagerty *et al.*, 2005) y la resistencia de *H. zea* podría ser lenta debido a la presencia de superficies amplias de refugio constituidas por el maíz convencional. Dicho cultivo ocupa más de 8.4 millones de ha en México (SAGARPA, 2001); en Coahuila, Durango, Tamaulipas y Chihuahua se siembran anualmente alrededor de 30 000, 177 000, 78 000 y 187 000 ha de maíz convencional, respectivamente (SAGARPA, 2005) y en esas superficies de cultivo, *H. zea* se desarrolla y las larvas de esta plaga no están expuestas a la  $\delta$ -endotoxina Cry2Ab dado que en México no se siembra maíz transgénico; además, *H. zea* tiene la capacidad de migrar cientos de km (Bergvinson, 2005). Estos factores podrían contribuir a retrasar el desarrollo de resistencia a las toxinas de Bt.

## CONCLUSIONES

Los valores de ID<sub>50</sub> (0.017–0.086  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), ID<sub>95</sub> (1.06–1.93  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), IP<sub>50</sub> (0.0103–0.022  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) y de IP<sub>95</sub> (0.5–1.08  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) observados como respuesta de las poblaciones de campo de *H. zea* a la  $\delta$ -endotoxina Cry2Ab corresponden a los que exhiben poblaciones que no han sido previamente seleccionadas con dicha  $\delta$ -endotoxina y por tanto se documentan como valores iniciales de respuesta para esta especie para estudios posteriores.

## LITERATURA CITADA

- Abbott, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18: 265-267.
- Adamczyk, J. J., L. C. Adams, and D. D. Hardee. 2001. Field efficacy and seasonal expression profiles for terminal leaves of single and double *Bacillus thuringiensis* toxin cotton genotypes. *J. Econ. Entomol.* 94: 1589-1593.
- Adkisson, P. L. 1972. The integrated control of insect pest of cotton. *Proc. Tall Timbers Conf. Ecol. Anim. Contr. Habitat Manag.* 4: 175-188.

exposure to  $\delta$ -endotoxin Cry1Ac has not changed the susceptibility of *H. zea* to the  $\delta$ -endotoxin Cry2Ab, given that there is no evidence of cross resistance between the two (English *et al.*, 1994; Adamczyk *et al.*, 2001; Stewart *et al.*, 2001; Luo *et al.*, 2007).

At world level, there are no documented cases of resistance to the  $\delta$ -endotoxins expressed by Bollgard II<sup>®</sup>; however, there are cases of resistance to the  $\delta$ -endotoxin Cry2Ab when the individuals are selected under laboratory conditions (Mahon *et al.*, 2007).

The evaluation of the usefulness of a management program of resistance to the  $\delta$ -endotoxins expressed either by Bollgard<sup>®</sup> or Bollgard II<sup>®</sup> consists of determining, through biological assays, the initial response to the  $\delta$ -endotoxins before their use in the field alters the genetic composition of the target population (Matten *et al.*, 2004) and of determining the changes in this response through the years by using a dose that makes it possible to distinguish resistant phenotypes from susceptible ones or diagnostic doses (Matten *et al.*, 2004).

The values of ID<sub>50</sub>, ID<sub>95</sub>, IP<sub>50</sub>, IP<sub>95</sub> that are presented correspond to the response of *H. zea* populations that have not been selected with the  $\delta$ -endotoxin Cry2Ab. Therefore, they are considered as initial response or reference point to be considered in studies to be carried out when the evaluated populations are selected with Bollgard II<sup>®</sup> cotton.

The perspective of the utility of Bollgard II<sup>®</sup> cotton in México is greater than that observed in Bollgard<sup>®</sup>, given that the former controls a broader spectrum of pests (Stewart *et al.*, 2001; Hagerty *et al.*, 2005) and the resistance of *H. zea* could be slow due to the presence of broad refuge surfaces comprised of conventional maize. This crop occupies over 8.4 million ha in México (SAGARPA, 2001); in Coahuila, Durango, Tamaulipas and Chihuahua approximately 30 000, 177 000, and 187 000 ha of conventional maize are sown each year, respectively (SAGARPA, 2005). In these crop surfaces, *H. zea* develops and the larvae of this pest are not exposed to the  $\delta$ -endotoxin Cry2Ab, given that transgenic maize is not sown in México; in addition, *H. zea* has the capacity to migrate hundreds of km (Bergvinson, 2005). These factors could contribute to retarding the development of resistance to the toxins of Bt.

## CONCLUSIONS

The values of ID<sub>50</sub> (0.017–0.086  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), ID<sub>95</sub> (1.06–1.93  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), IP<sub>50</sub> (0.0103–0.022  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) and of IP<sub>95</sub> (0.5–1.08  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) observed as response of the field populations of *H. zea* to the  $\delta$ -endotoxin Cry2Ab correspond to those exhibit by populations



- Akin, D. S., and M. B. Layton. 2004. Temporal expression profiles and bioactivity of single (Bollgard) and dual-toxin (Bollgard II) Bt cotton. *In: Proceedings of the Beltwide Cotton Conference*, 5-9 January 2003, San Antonio, TX. National Cotton Council of America, San Antonio, TX. pp. 1422-1429.
- Ali, M. I., and R. G. Luttrell. 2007. Susceptibility of bollworm and tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) to Cry2Ab2 insecticidal protein. *J. Econ. Entomol.* 100: 921-931.
- Ali, M. I., R. G. Luttrell, G. Horn, and Y. Young III. 2004. Baseline susceptibilities of cotton insects to transgenic insecticidal proteins and chemical insecticides in Arkansas. *In: Proceedings of the Beltwide Cotton Conference*, 5-9 January 2004, San Antonio Tx. National Cotton Council of America, Memphis TN. pp: 1693-1699.
- Ali, M. I., R. G. Luttrell, G. Horn, and Y. Young III. 2006. Susceptibilities of *Helicoverpa zea* and *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) populations to Cry1Ac insecticidal protein. *J. Econ. Entomol.* 99: 164-175.
- Ali, M. I., R. G. Luttrell, S. Y. Young III, C. Allen, and L. Luttrell. 2003. Monitoring insect resistance in Arkansas to chemical insecticides and Bt-endotoxins. *In: Proceedings of the Beltwide Cotton Conference*, 5-9 January 2003, Memphis, TN. National Cotton Council of America, Memphis TN. pp: 1138-1149.
- Bergvinson, D. J. 2005. *Heliothis/Helicoverpa* problem in the Americas: biology and management. *In: H. C. Sharma (ed.), Heliothis/Helicoverpa* management: emerging trends and strategies for future research. Science Publisher Inc. USA. pp: 7-37.
- Bottrell, D. G., and P. L. Adkisson. 1977. Cotton insect pest management. *Annu. Rev. Entomol.* 22: 451-481.
- De Maagd, R. A., D. Bosch, and W. Stiekkema. 1999. *Bacillus thuringiensis* toxins-mediated insect resistance in plants. *Trends Plant Sci.* 4: 9-13.
- Díaz, N., J. E. Pérez, y J. M. De la Fuente. 2005. Algodón Bollgard. *In: Valdivia E., F. J. Trujillo, y J. Sánchez (eds), Bioseguridad y protección fitosanitaria en la globalización comercial.* Universidad Autónoma Chapingo-Colegio de Postgraduados. México. pp: 174-180.
- English, L., H. L. Robbins, M. A. Tersch, C. A. Kulesza, D. Ave, D. Coyle, C. S. Jany, and S. L. Slatin. 1994. Mode of action of CryIIA: a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. *Insect Biochem and Molecular Biol.* 24: 1025-1035.
- EPA (U.S. Environmental protection Agency). 2006. Biopesticides registration action document-*Bacillus thuringiensis* plant-incorporated protectants (protocol://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/pips/pip\_list.htm).
- Georghiou, G. P., and C. E. Taylor. 1977. Genetic and biological influences in the evolution of insecticide resistance. *J. Econ. Entomol.* 70: 319-323.
- Gore, J. Adamczyk J. J., and Blanco, C. A. 2005. Selective feeding of tobacco budworm and bollworm (Lepidoptera: Noctuidae) on meridic diet with different concentrations of *Bacillus thuringiensis* proteins. *J. Econ. Entomol.* 98: 88-94.
- Gould, F., and B. E. Tabashnik. 1998. Bt-cotton resistance management. *In: M. Mellon and J. Rissler (eds.), Now or never: serious new plans to save a natural pest control.* Cambridge, MA: Union of Concerned Scientist. pp. 67-105.
- Gould, F., A. Martínez-Ramírez, A. Anderson, J. Ferre, F. J. Silva, and W. J. Moar. 1992. Broad-spectrum resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 701-726.
- Hagerty, A. M., A. L. Kilpatrick, S. G. Turnipseed, M. J. Sullivan, and W. C. Bridges. 2005. Predaceous arthropods and lepidopteran pests on conventional Bollgard, and Bollgard II cotton under untreated and disrupted conditions. *Environ. Entomol.* 34: 105-114.
- that have not been previously selected with the  $\delta$ -endotoxin and therefore are documented as initial response values for this species for later studies.
- End of the English version—
- \*—
- James, C. 2006. Global status of commercialized biotech/GM crops. (<http://www.isaaa.org/>).
- Kozziel, M. K., F. L. Belang, C. Bowman, N. B. Carozzi, R. Crenshaw, L. Crossland, J. Dawson, N. Desai, M. Hill, S. Kadwell, K. Launis, K. Lewis, D. Addox, K. Mcpherson, M. R. Mefhji, E. Merlin, R. Rhodes, G. W. Warren, M. Wright, and S. Evola. 1993. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology* 11: 194-200.
- Layton, M. B., M. R. Williams, and S. Stewart. 1997. Bt-cotton in Mississippi: the first year. *Proceedings of the Beltwide Cotton Conference*, 6-10 January 1997. New Orleans, Louisiana. National Cotton Council of America, New Orleans LA. pp: 861-863.
- Luo, S., K. Wu, Y. Tian, G. Liang, X. Feng, J. Zhang, and Y. Guo. 2007. Cross-resistance studies of Cry1Ac-resistant strains of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to Cry2Ab. *J. Econ. Entomol.* 100: 909-915.
- Luttrell, R. G., L. Wan, and K. Knighten. 1999. Variation in susceptibility of noctuid (Lepidoptera) larvae attacking cotton and soybean to purified endotoxin proteins and commercial formulations of *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* 92: 21-32.
- MacIntosh, S. C., T. B. Stone, R. S. Sims, P. L. Hunts, J. T. Greenplate, P. G. Marrone, J. F. Perlak, D. A. Fischhoff, and R. L. Fuchs. 1990. Specificity and efficacy of purified *Bacillus thuringiensis* against agronomically important insects. *J. Environ. Entomol.* 56: 258-266.
- Mahon, R. J., K. M. Olsen, K. A. Garsia, and S. R. Young. 2007. Resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry2Ab in a strain of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia. *J. Econ. Entomol.* 100: 894-902.
- Martínez-Carrillo, J. L., and N. Díaz-López. 2005. Nine years of transgenic cotton in México, adoption and resistance management results. *In: Proceedings of the Beltwide Cotton Conference*, 4-7 January 2005, New Orleans, Louisiana. National Cotton Council of America, Memphis TN. pp: 1368-1372.
- Martínez-Carrillo, J. L., J. J. Pacheco, y A. Hernández. 2002. Manejo integrado de plagas del algodón en el sur de Sonora. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Centro de Investigación Regional del Noroeste, Campo Experimental Valle del Yaqui. Folleto Técnico No. 46. 68 p.
- Martínez-Carrillo, J. L., L. P. Schouet, Jr., and T. A. Millar. 1991. Responses of populations of the tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) from Northwest Mexico to pyrethroids. *J. Econ. Entomol.* 84: 363-366.
- Matten, S., R. L. Hellmich, and A. Reynolds. 2004. Current resistance management strategies for Bt corn in the United States. *In: Koul O., and G. S. Dhaliwal (eds), Transgenic crop protection: concepts and strategies.* Science Publishers. USA. pp: 261-288.
- Moar, W. J., M. Pustai-Carey, H. van Faasen, D. Bosch, R. Frutos, C. Rang, K. Luo, and M. J. adang. 1995. Development of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac resistance by *Spodoptera exigua* (Lepidoptera. Noctuidae). *Applied. Environm. Microbiol.* 61: 2086-2092.

- Perlak, J. F., M. Oppenhuizen, K. Gustafson, R. Voth, S. Sivasupramaniam, D. Heering, B. Carey, R. A. Ihrig, and J. K. Roberts. 2001. Development and commercial use of Bollgard cotton in the USA—early promises versus today’s reality. *The Plant J.* 27: 489-501.
- Robertson, J. L., and H. K. Preisler. 1992. Pesticide bioassays with arthropods. CRC, Boca Raton, FL.
- Rodríguez, J. C., J. L. Martínez, U. Nava, M. Berdegue, R. Haces, J. M. De la Fuente, N. Díaz, y J. E. Pérez. 2005. *In: Valdivia E., F. J. Trujillo, y J. Sánchez (eds), Bioseguridad y protección fitosanitaria en la globalización comercial.* Universidad Autónoma Chapingo-Colegio de Postgraduados. México. pp: 181-184.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación). 2001. Anuario estadístico de la producción agrícola. (protocol://www.sagarpa.gob.mx).
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación). 2005. Anuario estadístico de la producción agrícola. (protocol://www.sagarpa.gob.mx).
- SAS (SAS Institute). 2000. SAS/STAT guide for personal computers, version 8.1. SAS Institute, Cary, NC. 1686 p.
- Sims, S. B., and T. B. Stone. 1991. Genetic basis of tobacco budworm resistance to an engineered *Pseudomonas fluorescens* expressing the delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* kurstaki. *J. Invertebr. Pathol.* 57: 206-210.
- Sims, S. B., J. T. Greenplate, T.B. Stone, M. A. Caprio and F. L. Gould. 1996. Monitoring strategies for early detection of Lepidoptera resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins. *In: T. M. Brown (ed.), Molecular Genetics and Evolution of Pesticide Resistance.* ACS Symposium Series No. 645. American Chemical Society, Washington, DC. pp: 229-242.
- Sivasupramaniam, S., L. G. Ruschke, J. A. Osborn, M. E. Oppenhuizen, J. T. Greenplate, and W. J. Mullins. 2005. Bollgard II: improvement in efficacy and spectrum against lepidopteran pest of cotton. *In: Proceedings of the Beltwide Cotton Conference, 4-7 January 2005, New Orleans, Louisiana.* National Cotton Council of America, Memphis TN. 1302 p.
- Stewart, S. D., J. J. Adamczyk, Jr., K. S. Knighten, and F. M. Davis. 2001a. Impact of Bt cottons expressing one or two insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis* Berliner on growth and survival of noctuid (Lepidoptera) larvae. *J. Econ. Entomol.* 94: 752-760.
- Stewart, S. D., J. J. Adamczyk, Jr., K. S. Knighten, and F. M. Davis. 2001b. Impact of Bt cottons expressing one or two insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis* Berliner on growth and survival of noctuid (Lepidoptera) larvae. *J. Econ. Entomol.* 94: 752-760.
- Stone, T.B., and S. R. Sims. 1993. Geographic susceptibility of *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) to *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* 86: 989-994.
- Tabashnik, B., Y. Carrière, T. J. Dennehy, S. Morin, M. S. Sisterson, R. T. Roush, A. M. Shelton, and J. Z. Zhao. 2003. Insect resistance to transgenic Bt crops: lessons from the laboratory and field. *J. Econ. Entomol.* 96: 1031-1038.
- Tanaka, Y., and V. Noppun. 1989. Heritability estimates of phentoate resistance in the diamond-back moth. *Entomol. Exp. Appl.* 52: 39-47.
- Terán-Vargas, A. P., J. C. Rodríguez, C. A. Blanco, J. L. Martínez-Carrillo, J. Cibrián-Tovar, H. Sánchez-Arroyo, L. A. Rodríguez-Del-Bosque, and D. Stanley. 2005. Bollgard cotton and resistance of tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) to conventional insecticides in the Southern Tamaulipas, Mexico. *J. Econ. Entomol.* 98: 2203-2209.
- Zhao, J. Z., Y. X. Li., H. L. Collins, J. Cao, E. D. Earle, and A. M. Shelton. 2001. Different cross-resistance patterns in the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac. *J. Econ. Entomol.* 94: 1547-1552.