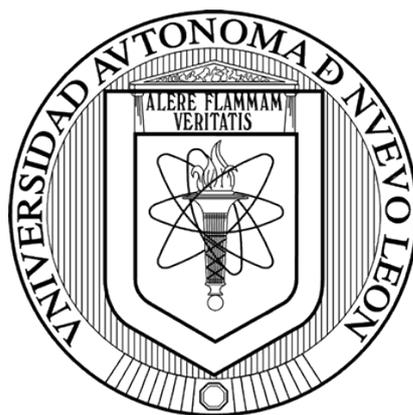


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA DE POBLACIONES
SILVESTRES DE *HELICOVERPA ZEA* (BODDIE) (LEPIDOPTERA:
NOCTUIDAE) EN RELACIÓN CON SU HOSPEDERO

POR

Q.F.B. MARCELA MARTINEZ VALENZUELA

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

Octubre, 2013

**ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA DE POBLACIONES
SILVESTRES DE *HELICOVERPA ZEA* (BODDIE) (LEPIDOPTERA:
NOCTUIDAE) EN RELACIÓN CON SU HOSPEDERO**

Comité de Tesis

Dra. Patricia Tamez Guerra
Director de Tesis

Dr. Ricardo A. Gómez Flores
Secretario

Dra. Magdalena Iracheta Cárdenas
Vocal 1

Dr. Edgar Mendoza Gamboa
Vocal 2

Dr. Carlos Fco. Sandoval Coronado
Vocal 3

Dra. Patricia Pietrantonio
Asesor Externo

Dr. José A. Valadez Lira
Asesor Externo

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por la beca de maestría No. 418967, por el apoyo al proyecto 2011-049 del Texas A&M University and Conacyt, Collaborative Research Grant Program, y al **Programa de Apoyo a la Investigación en Ciencia y Tecnología (PAICYT) UANL, CA760-11.**

A la Dra. **Patricia Tamez Guerra**, por haberme brindado la oportunidad de ingresar a su laboratorio y darme su confianza para llevar a cabo este proyecto. Por guiarme y apoyarme en el camino a mi realización como Maestra en Ciencias. Por tener siempre palabras de aliento que me fortalecieron en los momentos difíciles.

A mi comité de tesis conformado por el **Dr. Ricardo Gómez Flores, Dra. Magdalena Iracheta Cárdenas, Dr. Edgar Mendoza Gamboa** y al **Dr. Carlos Francisco Sandoval Coronado**, por el aporte profesional que me brindaron y formar parte en la realización de este proyecto.

Al **Dr. José Alberto Valdez Lira**, por brindarme su paciencia y su tiempo en ser mi maestro y por corregirme oportuna y puntualmente para que todos los objetivos de este trabajo se llevaran a cabo.

A la **Dra. Patricia Pientrantonio**, por su hospitalidad y por brindarnos las instalaciones para realizar los análisis de las muestras colectadas en los campos de la Universidad de Texas A&M.

A la **Dra. Gabriela Damas Buenrostro**, por brindarme su apoyo en la realización de este proyecto.

A la **Dra. Julissa Ek Ramos y Cesar Valencia**, por su apoyo en la colección de muestras y su hospitalidad en mi estancia en la Universidad de Texas A&M.

AL **Dr. Abraham Octavio Rodríguez de la Fuente**, por brindarme su conocimiento para poder realizar los análisis estadísticos.

A la **Dra. Deyanira Quistian Martínez**, por permitirme usar las instalaciones del vivero y poder crecer mis plantas de algodón.

Al **Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna**, por ayudarme a esclarecer dudas en mi trabajo práctico.

A mis **Maestros de la Maestría en Ciencias con Acentuación en Microbiología**, por transmitirme sus conocimientos y su experiencia para crecer profesionalmente en el área.

A mis compañeros de laboratorio de inmunología e inmunología, en especial a todos los que forman parte de la **Unidad de Formulación de Biológicos**, a la **Unidad de Inmunología y Acarreadores de Drogas** y a la **Unidad de Virología** por haberme hecho sentir parte de su familia, por brindarme siempre su ayuda y poder así, sacar adelante este hermoso proyecto.

DEDICATORIA

A mi familia,
Porque su paciencia, apoyo y amor me ayudan a salir adelante cada día.

A mi esposo, *Aldo*
A mi hija, *Coral*
A mi madre, *Elvira*
A mi padre, *Luis Antonio*
A mi hermana, *Mariana*
A mis abuelos, *Adalberto, Luis, María y Magdalena*

Gracias por creer siempre en mí y hacer que este sueño sea una realidad.

Marcela Martínez Valenzuela

*“La imaginación es más importante que el conocimiento. El conocimiento es limitado.
La imaginación abarca todo el mundo.”
(Albert Einstein)*

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIA	iv
LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
ABREVIATURAS	xii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT	xv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	5
2.1 Respuesta inmune en insectos	5
2.2 Reacciones celulares de insectos	7
2.3 Respuesta humoral de insectos	8
2.4 Péptidos antimicrobianos en insectos	9
2.5 Péptidos antimicrobianos en lepidópteros	10
2.6 Ficha técnica de <i>Helicoverpa zea</i>	11
2.7 Control de <i>H. zea</i>	13
2.8 <i>Bacillus thuringiensis</i>	15
2.9 Espectro de actividad de las proteínas Cry	16
2.10 Mecanismo de acción de proteínas Cry	17
2.11 Resistencia a <i>Bt</i>	19
2.12 Siembra experimental de maíz transgénico en México	24
2.13 <i>Helicoverpa zea</i> y <i>Helicoverpa armigera</i>	25

3. HIPÓTESIS	27
4. OBJETIVOS.....	28
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	28
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
5. METODOLOGÍA	29
5.1 Material biológico.....	30
5.1.1 Larvas de <i>Helicoverpa zea</i> de laboratorio.....	30
5.1.2 Larvas de <i>Helicoverpa zea</i> de campo.....	30
5.1.3 Formulado a base de <i>Bt</i> utilizado	31
5.2 Material vegetal	32
5.2.1 Plantas de campo.....	32
5.2.2 Plantas de laboratorio.....	33
5.3 Amplificación de transcritos en <i>H. zea</i> usando secuencias de <i>H. armígera</i>	33
5.3.1 Diseño de oligonucleótidos	34
5.3.2 Extracción de ARN de <i>H. zea</i>	34
5.3.3 Cuantificación de ARN	36
5.3.4. Síntesis de ADNc	36
5.3.5 Estandarización de condiciones para la amplificación de transcritos de PAMs.....	37
5.4 Bioensayos.....	37
Tratamiento 1. Algodón transgénico.....	38
Tratamiento 2. Algodón convencional.....	38
Tratamiento 3. BACTOSPEINE®	38
Tratamiento 4. Dieta artificial.....	38
5.5 Análisis de la expresión de los genes mediante densitometría	39
5.6 Detección de plantas transgénicas	39
5.7 Análisis estadístico	40
6. RESULTADOS	41
6.1 Detección de transcritos por PCR punto final	41
6.2 Análisis de la secuencia de nucleótidos/aminoácidos de los genes de inmunidad (PAMs) de <i>H. zea</i>	42

6.2.1	Reporte de las secuencias de PAMs caracterizadas en <i>H. zea</i> en la base de datos GenBank	43
6.2.2	Análisis comparativo de las secuencias de los genes GLO y CEC entre el lepidóptero <i>H. zea</i> y otros insectos.....	44
6.3	Efecto de <i>Bt</i> sobre los niveles de expresión de transcritos de PAMs en bioensayos de laboratorio	46
6.4	Colecta de plantas transgénicas y larvas de <i>H. zea</i> de México y E.U.A. ..	47
6.4.1	Larvas	47
6.4.2	México	47
6.4.3	E.U.A.	48
6.5	Identificación de proteínas Cry en plantas colectadas	50
6.5.1	México	50
6.5.2	E.U.A.	50
6.6	Análisis comparativo de la expresión de PAMs y <i>LIS</i>	51
6.6.1	Expresión de transcritos de PAMs y <i>LIS</i> entre CM y CMt.	55
7.	DISCUSIÓN.....	58
8.	CONCLUSIONES.....	67
	ANEXO 1	68
	ANEXO 2.....	69
	LITERATURA CITADA.....	78

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla I. Asociaciones entre los principales tipos de cristales de <i>Bacillus thuringiensis</i> , las proteínas Cry y su espectro de actividad insecticida.	16
Tabla II. Tipos de tratamientos que fueron empleados en los cultivos muestreados, plantas transgénicas, productos químicos, hongos entomopatógenos	32
Tabla III. Secuencias de los oligonucleótidos diseñados	35
Tabla IV. Tamaño de amplicón y temperaturas de alineamiento de los genes amplificados.	41
Tabla V. MÉXICO: Estados seleccionados y cultivos muestreados.....	48
Tabla VI. Cantidad de larvas analizadas ordenadas por estadio de crecimiento y estado donde se colectaron.....	48
Tabla VII. Cantidad de larvas encontradas en cada cultivo y etapa de crecimiento ..	49
Tabla VIII. Relación de daño observado durante los muestreos realizados en seis campos experimentales de algodón del College Station, TX.....	49
Tabla IX. Proteínas Cry encontradas en las muestras analizadas en México.	50
Tabla X. Detección de toxinas Cry de <i>Bacillus thuringiensis</i> en los cultivos de algodón colectados de diferentes campos experimentales del College Station, TX..	51

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Sistema inmune innato en insectos.	7
Figura 2. Plaga principal del maíz, <i>Helicoverpa zea</i>	12
Figura 3. Daños ocasionados por <i>H. zea</i> a bellota de algodón y a mazorca.	13
Figura 4. Morfología de espora y cristal de <i>Bt</i>	16
Figura 5. Modo de acción de proteínas Cry	19
Figura 6. Siembra experimental de maíz transgénico durante el periodo 2009-2012.	24
Figura 7. Diseño experimental del proyecto	29
Figura 8. Vista aérea de campos de cultivo en College Station, TX.	33
Figura 9. Tirillas de inmunodetección de proteínas Cry para detectar: Cry 1Ab/1Ac, Cry3Bb1, Cry34Ab1, Cry2A y Cry1F.	39
Figura 10. Detección por RT-PCR punto final de los transcritos que codifican para péptidos antimicrobianos.	42
Figura 11. Cromatogramas de secuencias de nucleótidos de productos de PRC obtenidos del secuenciador de ADN ABI3130xl de la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA (USSDNA) del Instituto de Biotecnología de la UNAM. ...	43
Figura 12. Análisis de identidad de la secuencia de aminoácidos del gen <i>GLO</i> de <i>Helicoverpa zea</i> utilizando el programa BLAST protein (NCBI).	44

Figura 13. Árbol filogenético de las secuencias de aminoácidos de los genes *GLO* (A), *CEC* (B), *PGRP C* (C) y *GAL* (D) encontrados en el lepidóptero *H. zea* y su ubicación al compararlos contra otros insectos..... 45

Figura 14. Comparación de las secuencias de aminoácidos de las secuencias de *GLO* (A) y *CEC* (C) entre diferentes insectos. 46

Figura 15. Niveles de expresión de ADN obtenidos por densitometría (densidad relativa), de transcritos de *PGRP C*, *CEC*, *GAL*, *GLO* y *LIS*, en larvas de *H. zea* de 2do estadio de los bioensayos en algodón convencional (LBA) y algodón transgénico (LBA_t) a 6, 12, 24 y 36 horas y de los campos de cultivo de algodón convencional (CA) y algodón transgénico (CA_t)..... 52

Figura 16. Niveles de expresión de ADN obtenidos por densitometría (densidad relativa), de transcritos de *PGRP C*, *CEC*, *GAL*, *GLO* y *LIS*, en larvas de *H. zea* de 4to estadio de los bioensayos en algodón convencional (LBA) y algodón transgénico (LBA_t) a 6, 12, 24 y 36 horas y de los campos de cultivo de algodón convencional (CA) y algodón transgénico (CA_t)..... 53

Figura 17. Niveles de expresión de ADN obtenidos por densitometría (densidad relativa), de transcritos de *PGRP C*, *CEC*, *GAL*, *GLO* y *LIS*, en larvas de *H. zea* de 5to estadio de los bioensayos en algodón convencional (LBA) y algodón transgénico (LBA_t) a 6, 12, 24 y 36 horas y de los campos de cultivo de algodón convencional (CA) y algodón transgénico (CA_t)..... 54

Figura 18. Niveles de expresión de ADN obtenidos por densitometría (densidad relativa), de transcritos de *PGRP C*, *CEC*, *GAL*, *GLO* y *LIS*, en larvas de *H. zea* de 2do, 4to y 5to estadio de los bioensayos en algodón convencional (LBA) y algodón transgénico (LBA_t) a 6, 12, 24 y 36 horas y de los campos de cultivo de algodón convencional (CA) y algodón transgénico (CA_t)..... 54

Figura 19. Niveles de expresión de ADN obtenidos por densitometría (densidad relativa), de transcritos de *PGRP C*, *CEC*, *GAL*, *GLO* y *LIS*, en larvas de *H. zea* de 2do estadio colectadas de los campos de cultivo de maíz convencional (CM) y maíz transgénico (CM_t).. 55

Figura 20. Niveles de expresión de ADN obtenidos por densitometría (densidad relativa), de transcritos de *PGRP C*, *CEC*, *GAL*, *GLO* y *LIS*, en larvas de *H. zea* de

4to estadio colectadas de los campos de cultivo de maíz convencional (CM) y maíz transgénico (CMt).. 56

Figura 21. Niveles de expresión de ADN obtenidos por densitometría (densidad relativa), de transcritos de *PGRP C*, *CEC*, *GAL*, *GLO* y *LIS*, en larvas de *H. zea* de 5to estadio colectadas de los campos de cultivo de maíz convencional (CM) y maíz transgénico (CMt).. 57

ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ACT	Actina
ARN	Ácido ribonucleico
<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
CA	Campos de algodón
CAt	Campos de algodón <i>Bt</i>
CEC	Cecropina
CM	Campos de maíz
CMt	Campos de maíz <i>Bt</i>
C	Cultivo convencional
Ct	Cultivo transgénico
°C	Grados centígrados
GAL	Galiomicina
GLO	Gloverina
Ha	Hectárea
LB	Bioensayo de laboratorio

LBBt	Bioensayo de laboratorio con BACTOSPEINE®
LBA	Bioensayo de laboratorio con algodón convencional
LBA_t	Bioensayo de laboratorio con algodón transgénico
LIS	Lisozima
MIP	Manejo integrado de plagas
RI	Respuesta inmune
RIH	Respuesta inmune humoral
RIC	Respuesta inmune celular
PAMs	Péptidos antimicrobianos
rpm	Revoluciones por minuto
Seg	Segundos
PGRP C	Proteína de Reconocimiento de Peptidoglucano C
PO	Fenoloxidasa
PPO	Profenoloxidasa
pb	Pares de bases
OPs	Organofosforados
μL	Microlitros

RESUMEN

El insecto plaga *Helicoverpa zea* Boddie genera pérdidas agrícolas importantes, por lo que se ha considerado dentro de los cuatro insectos plaga de mayor importancia en el cultivo de maíz y algodón en América. Su control se dificulta debido a que ha mostrado desarrollo de resistencia a químicos y frente a ciertas toxinas Cry de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) que están presentes en formulaciones comerciales o se expresan en cultivos transgénicos. Dicha resistencia se debe a cambios en la actividad enzimática, alteración de los sitios receptores, microbiota del intestino, etc. Debido a que las poblaciones del insecto se exponen a gran variedad de plantas hospederas, quizá este factor también influya en su resistencia a *Bt* o sus toxinas, y por ende permita su sobrevivencia. Entre los marcadores de la respuesta inmune innata de insectos a los microorganismos e incluso a insecticidas como organofosforados, se encuentran los péptidos antimicrobianos (PAMs), los cuales no se han reportado en *H. zea*, sólo la enzima lítica lisozima (que no es PAM). Por lo anterior expuesto, el presente trabajo se enfocó en determinar la expresión de genes codificantes a cuatro PAMs: *PGRP C*, galiomicina (*GAL*), cecropina (*CEC*) y gloverina (*GLO*), además de lisozima (*LIS*), y evaluar si existían diferencias relacionadas con su etapa de crecimiento, su planta hospedera y su exposición a *Bt*, tanto al producto comercial o a las toxinas presentes en cultivos transgénicos. La amplificación de estos transcritos se analizaron entre larvas del 2do, 4to y 5to estadio de campo presentes en cultivos transgénicos (Ct) o convencionales (C) en diferentes áreas geográficas de México y EUA, o de laboratorio (LB), después de exponerlas a plantas de algodón convencional y transgénico (LBA y LBA_t) y al producto comercial de *Bt* Biobit® (LBB_t) en dieta artificial. Además se tomaron muestras de las plantas donde se colectaron las larvas de cultivos de maíz (CM) de Sinaloa, Coahuila, Durango, Tamaulipas, Guanajuato y Estado de México, o muestras de algodón (CA) de Durango y Texas. En ciertas plantas se detectaron las proteínas Cry1Ab/Cry1Ac (consorcio), Cry1F y Cry2Ab de *Bt* (CM_t o CA_t). En las larvas se detectaron todos los PAMs y *LIS*. En larvas de 2do estadio se analizó el ARN de larvas completas, mientras que en las de 4to y 5to sólo el del intestino. Las secuencias de *LIS*, *PGRP C*, *GAL* y *GLO* detectadas se ingresaron al GenBank, incluyendo la del gen endógeno Actina (*ACT*): *LIS*, KF282765; *PGRP C*, KF282764; *GAL*, KF169742; *GLO*, KF527285 y *ACT*, KF282766. En general, en larvas de 4to estadio, la expresión fue mayor con el tratamiento LBA a la hora 36, mientras que en larvas de 5to estadio, la expresión mayor de PAMs y *LIS* se observó a las 24 y 36 horas. Al analizar CM y CM_t se observó una mayor expresión de los PAMs y *LIS* en larvas del 2do (ejido La Uva, CM_t) y 5to estadio (tres ejidos), CM y CM_t) colectadas del estado de Sinaloa. En larvas de 4to estadio, los mayores valores de expresión se distribuyeron entre el Ejido Venecia, Dgo. (*PGRP C*), en la parcela 2 de Méx (*CEC*) y en Guasave, Sin. (*GAL*, *GLO* y *LIS*). Se concluyó que la mayor expresión de PAMs y *LIS* en larvas alimentadas con dieta artificial se presentaba por un mayor tiempo de exposición a *Bt*, con cultivos en maíz-*Bt*, o cultivos de maíz sometidos a estrés hídrico o variedades forrajeras.

ABSTRACT

Helicoverpa zea Boddie is considered one of the most important insect pests in maize and cotton in America, since it causes substantial agricultural losses. This pest has shown resistance development to chemicals and several *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) Cry toxins present in commercial formulations or expressed in transgenic crops, failing its control in field. This resistance is due to changes in enzyme activity, alteration of binding receptors, gut microbiota changes, etc. Since insect populations are exposed to a variety of host plants, this factor may also influence on its resistance to *Bt* Cry toxins, allowing pest survival. Among the innate immune response markers to bioinsecticides or chemical insecticides, including organophosphorus), antimicrobial peptides (AMPs) have been reported to be produced by several insects, but not by *H. zea*, in which the lytic enzyme lysozyme is the only reported. The present study was focused on determining the expression of genes encoding four AMPs: *PGRP C*, galiomicina (*GAL*), cecropin (*CEC*) and gloverina (*GLO*), in addition to lysozyme (*LYS*), to assess differences related to larvae growth instar, host plant and *Bt* exposure, as a commercial product or as Cry toxins in transgenic crops. Transcripts amplification was analyzed among 2nd, 4th and 5th instar collected from conventional (C) or transgenic crops (Ct) in field, in different geographical areas from Mexico and the U.S.A., or exposed in laboratory bioassays (LB), after exposure to conventional cotton plants (LBA), *Bt*-cotton (LbAt) or *Bt* commercial product Biobit® (LB*Bt*) on artificial diet. In addition, maize plant samples where larvae were collected (CM) from Sinaloa, Coahuila, Durango, Tamaulipas, Guanajuato, and Mexico states, or cotton samples (CA) from Durango and Texas, and Cry toxin were evaluated using immune-strips to detect Cry1Ab/ Cry1Ac (consortium), Cry1F and Cry2Ab. If positive, plants were labeled as CMt or CAAt for *Bt*-maize or *Bt*-cotton, respectively. Among 2nd instar, RNA from the whole larva was analyzed due to its small size, whereas for 4th and 5th instar larvae, only gut was analyzed. All AMPs and Lys were detected in *H. zea* larvae and sequences were reported in the GenBank: Lys, KF282765; *PGRP C*, KF282764; *GAL*, KF169742; *GLO*, KF527285; and actine (used as positive control); *ACT*, KF282766. Comparing immune markers between 2nd instar larvae from CA and CAAt, and compared with LBA and LbAt, the expression of all AMPs and *LYS* was higher in Ejido Carolinas, Durango state. Within 4th and 5th instar larvae, the AMPs and *LYS* expression in LB*Bt* treatment was increased after 36 h or after 24 and 36 h, respectively. Among maize samples (CM and CMt fields), 2nd instar larvae collected from Ejido La Uva, Sinaloa (CMt), showed the highest expression level of all AMPs and *LYS*. In fact, the highest expression in 2nd and 5th instar larvae were collected from Sinaloa state. In 4th instar larvae, highest expression values were distributed between the Ejido Venecia, Durango (*PGRP C*), in Parcel 2, Mex (*CEC*) and in Guasave, Sinaloa (*GAL*, *GLO* and *LIS*). Data demonstrated that *H. zea* larvae feeding on artificial diet increase immune response markers after longer *Bt* exposure period; whereas in field either by *Bt*-maize, under drought stress (Sinaloa) or forage maize stimulates immune response.

1. INTRODUCCIÓN

En México, la práctica agrícola nacional se ve afectada por un gran número de especies animales (esencialmente insectos) y de microorganismos que afectan a las plantas cultivadas en todas las etapas de su crecimiento. En particular existe una especie de insecto que agrava esta situación, atacando principalmente plantas de maíz y algodón en el territorio nacional: *Helicoverpa zea* (Boddie). Este insecto lepidóptero es una plaga polífaga que infesta plantas silvestres como cultivadas, permanece activa todo el año y llega a ser causa de grandes pérdidas económicas en cultivos de México. Durante mucho tiempo se han recurrido a los insecticidas químicos para su control, generándose resistencia en lepidópteros como es el caso de *H. zea* (Hopkins y Pietrantonio, 2010; Hopkins y col., 2011; Pietrantonio y col., 2007).

En años recientes, el uso de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) ha servido para tratar de controlar de manera biológica las poblaciones de este insecto plaga (Stone y Sims, 1993), sólo o en combinación con insecticidas químicos, evitando la común biomagnificación de éstos últimos en el ambiente (Bartels y Hutchison, 1995). *Bt* es una bacteria entomopatógena Gram positiva que durante la fase de esporulación de su crecimiento forma inclusiones parasporales de naturaleza cristalina tóxicas para insectos, conocidas como proteínas Cry o δ -endotoxinas. En lepidópteros, el insecto ingiere los cristales de forma inactiva (protoxina) y en el intestino medio, al estar en contacto con un medio alcalino y proteasas específicas la "degradan" a su forma activa (toxina). Una vez activada por proteólisis, las toxinas Cry se unen a los receptores presentes en la membrana de borde de cepillo del

intestino medio del insecto y se forman poros, impidiendo el movimiento de los solutos en el epitelio, siendo permeable a iones, lo que provoca que las células se vuelvan incapaces de regular la presión osmótica, causando, vómito, diarrea y la subsecuente muerte del insecto (Gill y col., 1992; Sauka y Benintende, 2008).

Sin embargo, la gran diversidad de hospederos que presenta este insecto impiden su control, aunado a que en maíz las larvas del insecto ingresan a la mazorca y es muy difícil que el químico llegue a penetrar al sitio donde se instalan y alimentan, además de que las toxinas de la planta pueden contribuir a la mortalidad del insecto *per se* (Fescemyer y col., 2013).

El gusano alodonero *H. zea* ha desarrollado resistencia a ciertas toxinas Cry de *Bt* en estudios de laboratorio, provocada por cambios en la acción proteolítica de su intestino, a deficiencias en la unión de la toxina a las moléculas de su membrana intestinal y a la existencia de un mecanismo capaz de eliminar las toxinas que les resultarían dañinas (Tamez-Guerra, 2010), e incluso a la carga microbiana por lo tanto el insecto logra sobrevivir. También se ha observado que la sobrevivencia podría estar relacionada a que el sistema inmune del insecto esté disminuido o aumentado (Chattopadhyay y col., 2004). En evaluaciones de laboratorio, al realizar exposiciones sistemáticas y generacionales de algunas toxinas Cry se ha observado un desarrollo de resistencia a las toxinas Cry1Ac y Cry2Ab, que se expresan en algunos "eventos" de plantas transgénicas de maíz y algodón (Anilkumar y col., 2008; Caccia y col., 2010), e incluso en campo (Tabashnik y Carrière, 2010). De igual forma, en el insecto *Helicoverpa armígera* (Hübner), otra plaga de importancia agrícola estrechamente relacionada a *H. zea* ubicada en Europa, se ha visto un

incremento en los alelos de resistencia a Cry2Ab en poblaciones presentes en campos algodoneiros de Australia (Downes y col., 2010a). Esto es un indicativo del potencial incremento de poblaciones resistentes de *H. zea* que se podría llegar a tener en el futuro, especialmente porque comparten los mismos sitios receptores para las toxinas Cry1Ac (Hernández-Rodríguez y Ferré, 2005) y Cry2Ab (Hernández-Rodríguez y col., 2008). Asimismo, se ha discutido la posibilidad de que la resistencia a *Bt* que presenta este insecto sea influenciada a la respuesta inmune y que los marcadores de inmunidad sean los mismos que se puedan presentar en *H. zea* (Ma y col., 2005; Campbell y col., 2008), pero esto no se ha comprobado.

Para evitar el desarrollo de resistencia de *H. zea* a *Bt*, principalmente en cultivos transgénicos, se han hecho estudios para entender los factores involucrados en dicho desarrollo, incluyendo además de receptores de toxina, actividad enzimática y otros ya mencionados (Tamez-Guerra, 2010), que son el tipo de planta (algodón o maíz) y el área geográfica donde se presenta la plaga (Cory y Hoover, 2006; Head y col., 2010). A pesar de que se ha demostrado que la respuesta inmune innata puede jugar un papel en esto (Ma y col., 2005), existe muy poca información relacionada a este insecto. De hecho, no se encontró información de las secuencias de PAMs en las bases de datos como NCBI que apoyaran el análisis de la respuesta inmunológica en base a PAMs de este insecto. Debido a la gran similitud genética que existe entre *H. zea* y *H. armígera* las secuencias génicas de PAMs de esta plaga nos permitieron realizar una búsqueda más profunda en cuanto aquellos que pudiesen estar ligados a la respuesta inmune humoral de *H. zea*.

Por ello resultó necesario analizar poblaciones de campo de *H. zea* y buscar diferencias en la susceptibilidad a *Bt* para tener un mayor conocimiento de la ecología y fisiología de esta plaga. El objetivo de este estudio fue determinar si la respuesta inmune humoral está ligada a la expresión de PAMs en poblaciones de campo de *H. zea* presentes en cultivos de algodón y maíz que alteran su susceptibilidad a *Bt*. Los resultados generados podrán contribuir al manejo integrado de esta plaga e incluso se podrán usar como marcadores de resistencia de *H. zea* a *Bt* en el futuro.

2. ANTECEDENTES

2.1 Respuesta inmune en insectos

La clase Insecta está conformada por el grupo de animales invertebrados más diverso y abundante con más de 1 millón de especies descritas (Vilmos y Kurucz, 1998). Entre los principales órdenes de insectos están los odonatos, ortópteros, dípteros, hemípteros, coleópteros, himenópteros y lepidópteros. En la naturaleza están expuestos a gran variedad de patógenos como depredadores, ectoparásitos y endoparásitos, es por ello que han desarrollado sistemas de protección que incluyen barreras físicas resistentes, como la cutícula y barreras selectivas como la membrana peritrópica (Vargas-Albores y Ortega-Rubio., 1994). En su necesidad de protegerse de organismos que evaden las barreras físicas o protección inespecífica, los insectos desarrollaron sistemas de defensa inmunológica complejos y efectivos, aparentemente diferente al sistema inmune adquirido de los vertebrados. Desde 1930 se conoce que la respuesta inmune de insectos se manifiesta a manera de reacciones humorales y celulares (Vilmos y Kurucz, 1998).

Sin embargo, la respuesta inmune innata es conservada entre todos los organismos y estas respuestas son activadas o desencadenadas inmediatamente (en pocos segundos) después de encontrarse con un agente nocivo (Beckage, 2008). Estudios recientes revelan que la respuesta inmune innata presenta gran especificidad, además de tener la capacidad de distinguir entre diferentes clases de microorganismos (Hoffmann, 2003). Los mecanismos de respuesta de insectos frente a patógenos son rápidos y puede llegar a perdurar algunos días. Esto les ofrece cierta resistencia

contra infecciones microbianas (Vilmos y Kurucz, 1998). Los insectos se vuelven menos susceptibles a infecciones posteriores del mismo patógeno después de una respuesta inmune innata prolongada (James y Xu, 2012). Además sus mecanismos de defensa comparten características básicas con el sistema inmune de los vertebrados (Vilmos y Kurucz, 1998). En la actualidad se sabe que la inmunidad en los insectos se compone de tres partes, protección del insecto del ambiente exterior mediante barreras físicas y químicas, la respuesta humoral y la respuesta celular (James y Xu, 2012).

El sistema inmune innato de los insectos consiste de órganos compuestos de diferentes tipos de células, más una variedad de células circulando libremente en la hemolinfa. Los componentes del sistema inmune son: cuerpo graso, ganglio linfático y los hemocitos que se originan en el mesodermo. El cuerpo graso se compone de tejido adiposo unido a la superficie interna de la cutícula y se encuentra distribuido en todos los segmentos del insecto. El cuerpo graso es un órgano biosintético, grande funcionalmente, análogo al hígado de los mamíferos y es responsable de la síntesis de los PAMs. El ganglio linfático está compuesto de pequeños pares de lóbulos pericárdicos, su función es formar hemocitos en los estadios de larva y de adulto. Los hemocitos son células activas y están involucradas en todos los mecanismos de defensa del insecto. En la respuesta inmune humoral las reacciones que se llevan a cabo son la melanización, coagulación de la hemolinfa y la síntesis de PAM's. En las reacciones celulares los microorganismos son fagocitados, atrapados por la formación de nódulos, o encapsulados por hemocitos (Vilmos y Kurucz., 1998).

2.2 Reacciones celulares de insectos

Las células con actividad fagocítica representan una sub-población de los hemocitos en los insectos. Las células granulares y plasmocitos son las responsables de la fagocitosis. Durante la formación de nódulos, los hemocitos forman agregados para atrapar a las bacterias. Los nódulos pueden adherirse a los tejidos o pueden ser encapsulados. Una lectina de insectos, conocida como escolexina se encontró involucrada en la formación de nódulos en *Manduca sexta*. La escolexina es producida por células epidermales y células del intestino medio sobre heridas o infecciones bacterianas. La encapsulación es un mecanismo de defensa multicelular donde una cápsula de capas superpuestas de hemocitos se forma alrededor de los protozoarios, nemátodos y huevos de larvas de insectos parásitos. La encapsulación no induce la expresión de genes antimicrobianos pero puede asociarse con melanización, en la cual contribuye a la eliminación del patógeno (Vilmos y Kurucz., 1998).

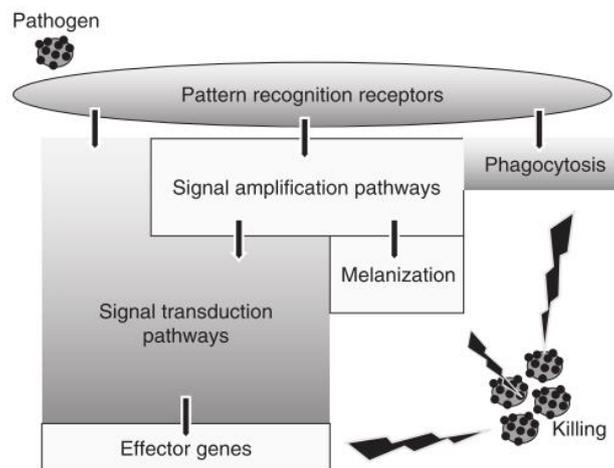


Figura 1. Sistema inmune innato en insectos (Tomado de Beckage, 2008).

2.3 Respuesta humoral de insectos

La melanización es una reacción de defensa presente en invertebrados. La enzima que cataliza la síntesis de la melanina es la fenoloxidasa (O-difenoloxígeno-óxido reductasa), la cual es capaz de oxidar los fenoles a quinonas, que posteriormente polimerizan en forma no enzimática a la melanina. La cual tiene propiedades fungistáticas. La vía de la melanización se activa por los hemocitos, se liberan serin-proteasas, desencadenando la cascada fenoloxidasa (Vargas y Ortega., 1994).

Se ha visto que en invertebrados con un sistema circulatorio abierto suceden las reacciones de coagulación para cicatrización de heridas y la inactivación de patógenos (Beckage, 2008).

En el caso de la coagulación de la hemolinfa en insectos, se han descrito dos mecanismos. Uno de ellos fue descrito en la cucaracha *Leucophaea maderae* y en la langosta *Locusta migrator*, donde la polimerización de las proteínas coagulables es catalizada por la transglutaminasa dependiente de Ca^{+2} liberada por los hemocitos. Las proteínas coagulables son lipoforina y la proteína vitelogenina. El otro tipo de coagulación ha sido mejor estudiado en cangrejo herradura *Limulus polyphemus* (L.) y en otros artrópodos, sugiriéndose la existencia del mismo sistema para *Drosophila*. En el cangrejo herradura, la coagulación mediada por el LPS o el (1-3)- β -D-glucano es activada por medio de la cascada de serin-proteasas. Las cascadas de serin-proteasas en insectos juegan un papel dual, debido a que los componentes intermediarios de la coagulación de la hemolinfa (factor B y enzimas de precoagulación con dominios tipo defensina y la formación de melanina) son tóxicos para los microorganismos (Vilmos y Kurucz, 1998).

El tercer tipo de reacción humoral ocurre mediante la síntesis de novo de péptidos PAMs. El cuerpo graso es el principal sitio para la síntesis de los PAMs. Sin embargo, los hemocitos, las células epiteliales cuticulares, el intestino, la glándula salival y el tracto reproductivo son capaces de producir factores antimicrobianos. Los PAMs son diversos en estructura. Todos los péptidos maduros son anfipáticos, son moléculas que actúan en las membranas y por lo tanto, eliminan las células blanco mediante lisis (Vilmos y Kurucz, 1998).

2.4 Péptidos antimicrobianos en insectos

La respuesta inmune humoral de los insectos, se basa principalmente en la síntesis de péptidos antibacterianos y péptidos o polipéptidos antifúngicos catiónicos con amplio espectro de actividad. Estas moléculas se producen principalmente en el cuerpo graso y posteriormente, son liberados a la hemolinfa osangre en mamíferos (Lamberty y col., 1999). El contacto con microorganismos induce la transcripción de PAMs, encontrándose un número muy elevado a las 6 h, y se ve disminuido 3 días después de la infección (Beckage, 2008).

En la actualidad se han caracterizado alrededor de 150 péptidos antimicrobianos de varias especies de insectos. Estos péptidos presentan gran diversidad estructural, algunos presentan patrones comunes, es por ello, que se han agrupado en 4 familias: (i) cecropinas (ii) péptidos ricos en cisteínas (iii) péptidos ricos en prolina (iv) péptidos o polipéptidos ricos en glicina. El grupo de las cecropinas fue el primer grupo de péptidos antimicrobianos inducible que fue caracterizado. Lo conforman péptidos catiónicos lineares de 4kDa en lepidópteros y dípteros. Son provistos de residuos de cisteína y consisten en α -hélices unidas por una bisagra corta. Las

cecropinas se especializan en eliminar a las bacterias Gram-negativas (Lamberty y col., 1999).

El segundo grupo lo forman los péptidos ricos en cisteínas, los péptidos contienen de 1 a 4 puentes disulfuro con masas moleculares en un rango de 2 a 6 kDa. Las defensinas son los péptidos antimicrobianos más abundantes en los insectos, contienen 6 residuos de cisteína con tres puentes disulfuro y actúan exclusivamente contra bacterias Gram positivas (Lamberty y col., 1999). Sin embargo, el número y tipo de péptidos antimicrobianos varía entre especies de insectos, además algunos péptidos son conservados entre muchas especies como en el caso de las cecropinas y defensinas. En *Drosophila melanogaster* (Meigen), el análisis genómico ha encontrado por lo menos 30 diferentes PAMs. La mayoría de los PAMs de insectos actúan alterando la membrana bacteriana. Las mayores concentraciones de PAMs son encontradas en tejidos de animales expuestas a microorganismos. Las superficies epiteliales secretan péptidos antimicrobianos de la barreras epitelial y de las estructuras granulares (Beckage, 2008).

2.5 Péptidos antimicrobianos en lepidópteros

En lepidópteros se han reportado varios péptidos antimicrobianos en respuesta a una lesión séptica. Estos péptidos presentan gran diferencia a péptidos de otros grupos de insectos. El primer reporte de PAMs y de moléculas antifúngicas inducibles hecho en lepidópteros fue gracias al trabajo de Lamberty y col. (1999), donde pudieron identificar un PAM antifúngico inducible rico en cisteína al cual llamaron heliomicina y al hacer la comparación de la secuencia se encontró la

semejanza a las defensinas de otros grupos de insectos, y podría representar el prototipo de defensina de insectos lepidópteros. Sin embargo, la actividad antifúngica observada para este péptido llevó a clasificarlo en el grupo de péptidos antifúngicos tales como defensinas vegetales y drosomicina. Los PAMs más caracterizados en lepidópteros son las atacinas y las cecropinas. En *Trichoplusia ni* (Hübner) se han encontrado genes involucrados en la respuesta inmune, entre los que se encuentran: atacina, cecropina, defensina, gloverina, gallerimicina, hemolina, lebocina y lisozima que son específicas para diferentes tipos de microorganismos como hongos, bacterias e incluso virus (Tamez-Guerra y col., 2008; Ericsson y col., 2009).

En el insecto plaga *H. armígera* se encontró que la expresión de diversos PAMs mediante qRT-PCR después de la exposición a la bacteria Gram-positiva *Bt*, a la bacteria Gram-negativa *KleibSELLA pneumoniae*, al hongo *Candida albicans* y al nucleopolihedrovirus recombinante *Autographa californica* que expresa la proteína verde fluorescente (AcMNPV-GFP), se encontró disminución en la expresión de los péptidos: proteínas de reconocimiento de péptidoglicanos *PGRP C*, cecropina, galiomicina, gloverina, lisozima, moricina, atacina y gallerimicina (Wang y col., 2010).

2.6 Ficha técnica de *Helicoverpa zea*

La subfamilia Heliothentinae tiene 10 especies de *Heliothis* y una de *Helicoverpa* que se encuentran ampliamente distribuidas por todo el continente Americano. Principalmente, en el sur de Estados Unidos y diferentes regiones de México. El

gusano de la yema *H. virescens* (Fabricius) y el gusano algodonero *H. zea* (Boddie) son las plagas más relevantes debido a su gran impacto agrícola (Molina y col., 2010) (Figura 2).

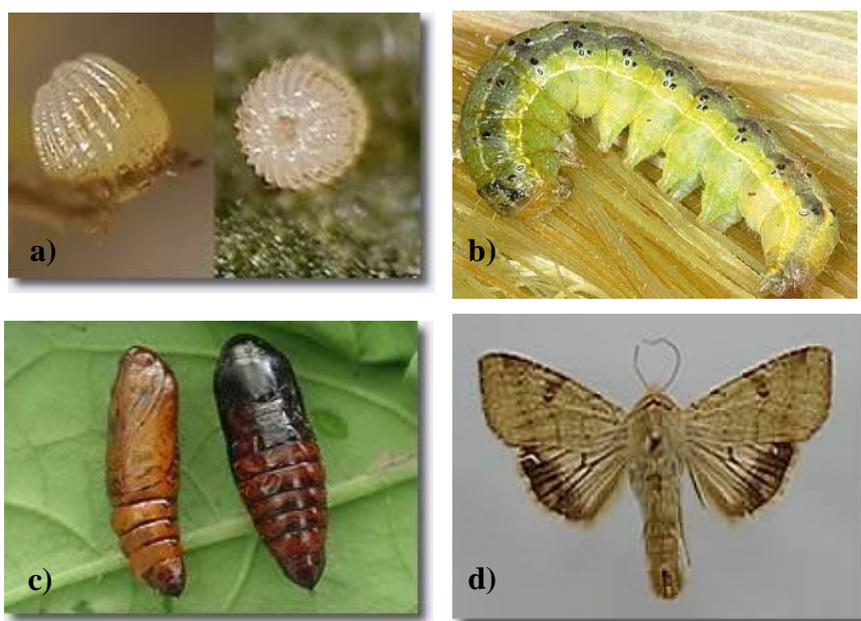


Figura 2. Plaga principal del maíz *Helicoverpa zea*. a) Huevo, b) larva estadio tardío, c) Pupa, d) Adulto (http://platina.inia.cl/entomologia/p_tomate_alibre/heliothis1.htm)

H. zea es una plaga polífaga, que permanece activa todo al año e infesta una gran variedad de cultivos (Blanco y col., 2007). Dada su naturaleza polífaga puede ser identificada con diferentes nombres comunes; gusano elotero del maíz, gusano bellotero, gusano del tomate, gusano de la vaina de soya, gusano de sorgo, gusano algodonero entre otros. A pesar de la gran cantidad de hospederos silvestres, el gusano elotero es una plaga importante de una gran variedad de plantas cultivadas, especialmente de algodón *Gossypium hirsutum* L. y maíz *Zea mays* L. (Molina y col., 2010) (Figura 3).

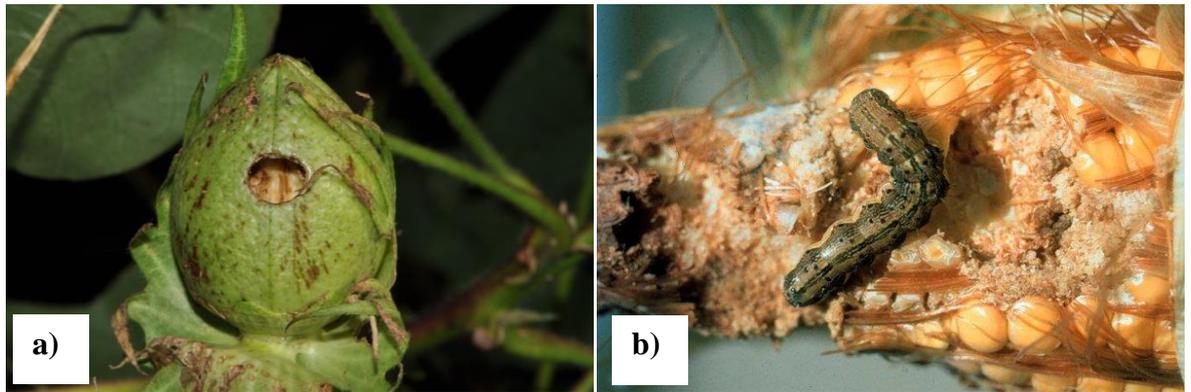


Figura 3. Daños ocasionados por *H. zea* a bellota de algodón (a) y a mazorca (b).
(www.ipmworld.umn.edu)

2.7 Control de *H. zea*

Debido a la necesidad de tener alimentos del campo con calidad suficiente para alimentar a la sociedad, desde hace varias décadas se han usado productos químicos para mitigar daños causados por plagas de insectos en cultivos de primera necesidad (James y Xu, 2012).

El uso de estos productos, si bien ha ayudado a disminuir y/o controlar la devastación de cultivos, también ha ocasionado problemas ambientales severos como es el caso de la biomagnificación de compuestos químicos en el ambiente. Dentro de los químicos más conocidos tenemos los organoclorados, como el DDT, que fue el primer químico en usarse, funciona acumulándose en los tejidos grasos y en el sistema nervioso de los insectos, controlando principalmente poblaciones de mosquitos y pulgas, ayudando al control en la diseminación de enfermedades humanas transmitidas por estos vectores. A pesar de estas ventajas, el DDT permanece estable en el ambiente durante mucho tiempo, se biomagnifica debido a que se acumula primero en animales de los niveles inferiores de la cadena trófica

como peces, pelícanos y caimanes por ejemplo, de esta manera llegan al último nivel de la cadena alimenticia (James y Xu, 2012).

Además de los organoclorados, existen otros químicos como organofosforados (OPs), organosulfurados y carbamatos, los cuales no se biomagnifican, pero pueden ser tóxicos para los seres humanos, como es el caso de los OPs. También, otros pueden causar daño a especies de insectos benéficos, como abejas, tal como lo hacen los carbamatos y organoclorados (Chattopadhyay y col., 2004). Aunado a que se ha encontrado que estos insecticidas químicos llegan a causar resistencia en las especies a las que va dirigida su actividad, lo que requiere que se incrementen las dosis de aplicación para asegurar su efectividad. Es por ello, que desde la década de los 90's cuando los bioinsecticidas surgieron tuvieron aceptación y han jugado un papel de gran importancia gracias a su efectividad, espectro de actividad dirigido a especies blanco, lo que disminuye los daños a fauna benéfica presentes en los cultivos. Además tienen la característica de ser biodegradables. Otro aspecto que es importante y que toman en cuenta los agricultores al seleccionar un producto, es su tiempo de vida después de aplicarlo, afortunadamente hoy en día el empleo de cultivos transgénicos brinda protección duradera a los cultivos, lo que genera beneficios en la producción de alimentos sin poner en riesgo la calidad del medio ambiente (McDougall, 2009).

Dentro de los organismos usados en el control biológico destacan tres especies de bacterias conocidas por producir toxinas insecticidas con gran importancia biotecnológica, agrícola y económica, *Xenorhabdus nematophilus*, *Photorhabdus luminescens* y *Bt*. *Bt* representa el 90% del mercado de los bioinsecticidas debido a la

actividad y especificidad de sus proteínas Cry. En la actualidad existen plantas transgénicas cultivadas que expresan las proteínas Cry (Chattopadhyay y col., 2004).

2.8 *Bacillus thuringiensis*

Bt es un bacilo Gram-positivo, aerobia estricta, de flagelación peritrica, que mide de 3 a 5 μm de largo por 1 a 1.2 μm de ancho. Se ha aislado de todas partes del mundo, y de muy diversos sistemas, como suelo, agua, hojas de plantas, insectos muertos, telarañas, etc.(Figura 4).

Bt es una bacteria entomopatógena, que durante su ciclo de vida presenta dos fases principales: crecimiento vegetativo y esporulación, donde en la primera las bacterias se duplican por bipartición, y la segunda, pasa a estado de espora (Soberón y Bravo, 2007). Es en la fase de esporulación donde *Bt* forma inclusiones parasporales que contienen uno o más cuerpos cristalinos de naturaleza proteica y poseen actividad insecticida. El cristal proteínico, está constituido por proteínas denominadas Cry o Cyt.

Las toxinas Cry también se conocen como δ -endotoxinas o toxinas *Bt*, y son tóxicos para distintos invertebrados, especialmente para larvas de insectos (Sanahuja y col., 2011). Son inocuas para vertebrados y otros insectos no blanco de su actividad. El nombre de proteína Cry procede de las iniciales de la palabra en inglés “*crystal*” representando estas proteínas la base para el control biológico a nivel mundial.

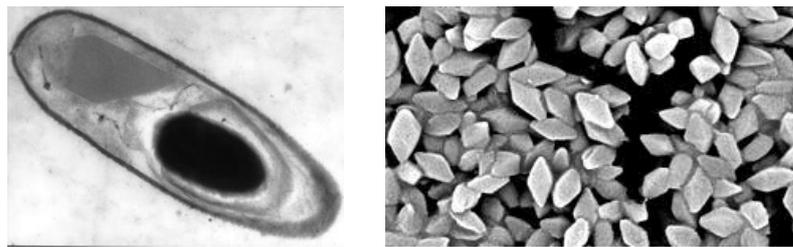


Figura 4. Morfología de espora y cristal de *Bt* (Sanchis, 2010).

2.9 Espectro de actividad de las proteínas Cry

Los cristales parasporales se clasifican de acuerdo a su morfología en bipiramidales, cúbicos, cuadrados aplanados, esféricos y otras formas atípicas menos frecuentes. En algunos casos existen asociaciones entre la morfología del cristal, la proteínas Cry, el peso molecular de las proteínas y el espectro de actividad (Sanahuja y col., 2011) (Tabla I).

Tabla I. Asociaciones entre los principales tipos de cristales de *Bacillus thuringiensis*, las proteínas Cry y su espectro de actividad insecticida

Tipo de cristal	Grupo	Peso molecular (kDa)	Toxicidad
Bipiramidal	Cry1	130	Lepidópteros
Cúbico	Cry2	65	Lepidópteros y coleópteros
Cuadrado aplanado	Cry3	72	Coleópteros
Esférico	Cry4A, Cry4B, Cry10 y Cry11	135,128, 78, 72	Dípteros

Se ha encontrado actividad insecticida de las δ -endotoxinas contra lepidópteros, coleópteros, dípteros, himenópteros, ácaros y también contra otros invertebrados como nemátodos, gusanos planos y protozoarios. Existen 376 genes *cry* que están clasificados en base a la similitud de sus secuencias. De esta manera tenemos genes

cry1, cry2, cry3, cry4, cry9, cry10, cry11, cry15 por mencionar algunos (Sauka y Benintende., 2008).

Los cuerpos de inclusión pueden estar formados por proteínas Cry de una o varias clases que se agrupan entre sí mediante puentes disulfuro. Las proteínas de la clase Cry1, son las consideradas tóxicas para larvas del orden lepidóptera. Sin embargo, la toxicidad de las proteínas Cry1 no se restringe sólo a lepidópteros, algunos tipos de proteínas Cry también son tóxica para coleópteros y dípteros (Soberón y Bravo 2007).

Dentro del orden lepidóptera, existen muchas especies susceptibles a las proteínas, entre ellas encontramos Arctiidae, Bombycidae, Crambidae, Danainae, Gelechiidae, Geometridae, Gracillariidae, Hepialidae, Lasiocampidae, Lycaenidae, Lymantriidae, Noctuidae, Pieridae, Plutellidae, Pyralidae, Sphingidae, Thaumetopoeidae y Tortricidae (Sanahuja y col., 2011).

2.10 Mecanismo de acción de proteínas Cry

Los cristales inactivos producidos durante la esporulación, presentes en las plantas *Bt* o productos comerciales a base de *Bt*, son ingeridos por larvas de insectos y las protoxinas pasan al intestino medio. El pH alcalino y la acción de proteasas como tripsina y quimiotripsina, activan a las proteínas pasando de protoxina a la formación de pequeños polipéptidos tóxicos que llevarán a la muerte de la plaga (Chattopadhyay y col., 2004). Las toxinas activas se unen a receptores específicos en la membrana de borde de cepillo de las células epiteliales del intestino medio del insecto donde ocurre un cambio conformacional en su estructura. La agregación de

las proteínas Cry permite la formación de un poro en el epitelio del intestino medio, que hace a la membrana permeable a iones, así como a pequeñas partículas como sacarosa, perdiéndose el equilibrio osmótico. Finalmente hay lisis celular. (Sauka y Benintende, 2008). El intestino medio de los insectos se paraliza y las esporas invaden los tejidos (Schnepf y col., 1998). Sin embargo, es necesario que después de que *Bt* causa daño en el epitelio intestinal, las bacterias entéricas de la microbiota del intestino del insecto le causen septicemia para que se haya muerte del insecto (Broderick y col., 2006) (Figura 5).

En el mercado hay una gran cantidad de proteínas Cry usadas para el control de insectos plaga. Sin embargo, para el control del gusano algodonero *H. zea* los productos transgénicos contienen los genes *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry2Ab*, *cry3Bb1*, *cry1F* y *cry1Fa* (Sauka y Benintende, 2008).

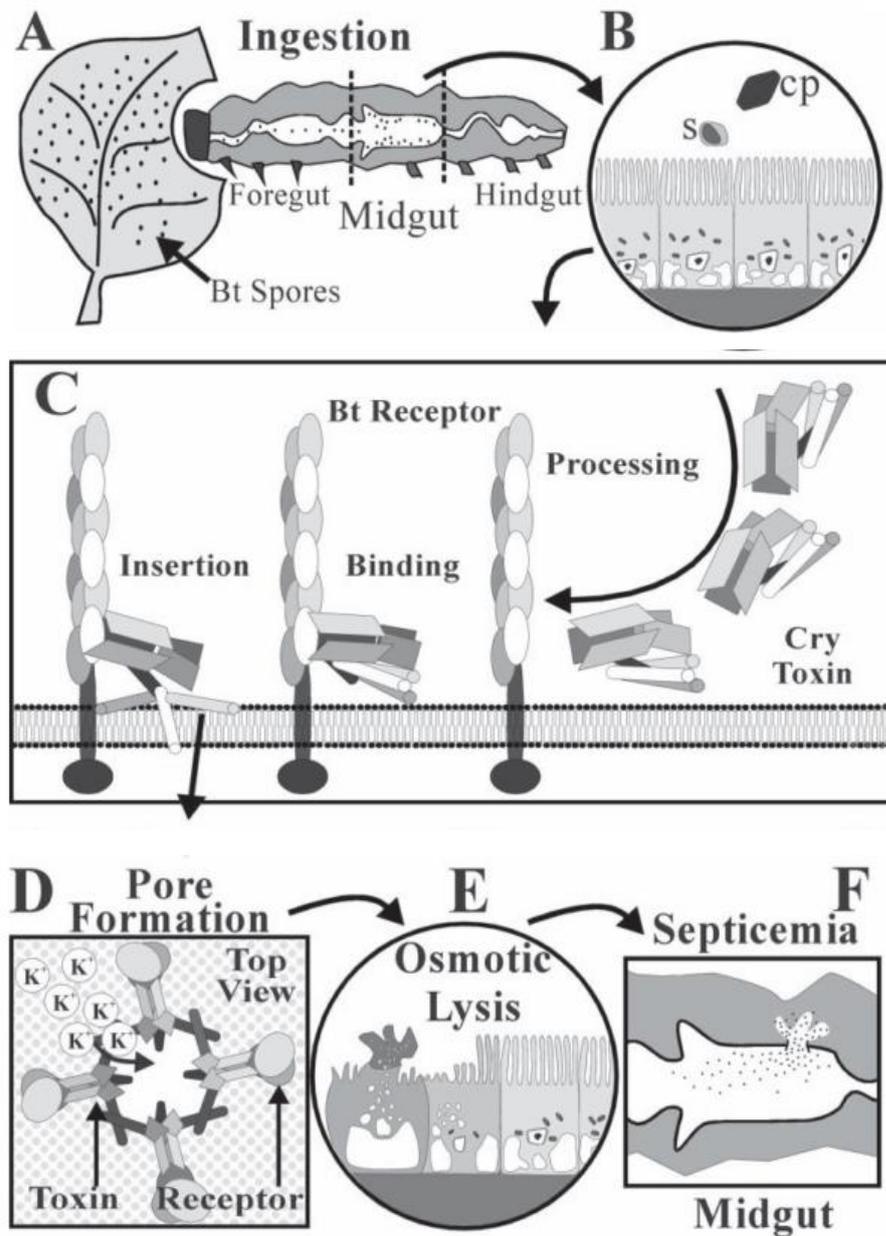


Figura 5. Modo de acción de proteínas Cry (Tomado de Whalon y Wingerd, 2003).

2.11 Resistencia a *Bt*

Desde su aparición en el mercado los productos comerciales a base de *Bt* se han aplicado en cultivos comerciales, principalmente en zonas monitoreadas con resistencia a insecticidas químicos. Tiempo después de ser empleado para combatir

las plagas se registraron los primeros casos de resistencia a productos basados en *Bt*. Esta resistencia a *Bt* se debe a la existencia de plagas genéticamente variables que poseen cambios en los receptores de unión a la toxina o están dotadas de un mecanismo para eliminar dichas toxinas, por lo cual no son susceptibles a las δ -endotoxinas y persiste el daño por dichos insectos en los campos de cultivo (Sanchis, 2010). Por ejemplo, al realizar estudios en *Plodia interpunctella* (Hübner), empleando la toxina Cry1Ab marcada con I¹²⁵, encontraron que había una reducción en la unión de dicha toxina que se podía relacionar con una disminución de su toxicidad en una cepa resistente (cepa 343-R) al compararla con una cepa susceptible a *Bt* (Van Rie y col., 1990).

Sin embargo, el papel de las proteasas intestinales en el desarrollo de resistencia a *Bt* se usó por primera vez en la cepa de *P. interpunctella* (cepa 198^R), resistente a *Bt var entomocidus*, donde se encontró que los insectos resistentes activaban más lentamente la protoxina Cry1Ac que los insectos susceptibles, y que ello se debía a que los primeros carecían de una tripsin-proteasa en su intestino, supuestamente implicada en el procesado de las protoxinas Cry (Oppert y McGaughey, 1994).

En una cepa de *H. virescens* (YHD2) con niveles muy altos de resistencia para las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1A y Cry1F, la única diferencia apreciable frente a una cepa susceptible, fue la pérdida total de la unión de la toxina Cry1Aa. En esta especie, las toxinas Cry1A comparten un sitio común. Un segundo sitio es compartido por las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac, y un tercer sitio uno sólo Cry1Ac. En la cepa resistente YHD2, el sitio compartido por las toxinas Cry1A estaría alterada, y

en los otros dos sitios de unión no modificados, no jugarían un papel importante en la toxicidad (Lee, 1995).

A diferencia de lo encontrado en las poblaciones resistentes anteriores, dos estudios previos, llevados a cabo de forma independiente, demostraron que no existía una clara asociación entre la unión de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac, y la resistencia de éstas en dos cepas resistentes de *H. virescens*. En uno de los estudios se observó que en los individuos resistentes había sólo una disminución de la unión entre 2 y 4 veces, al compararla con la encontrada en los insectos susceptibles, pero estas diferencias eran compensadas por la concentración de sitios de unión. En otro estudio, no se encontraron diferencias significativas en la afinidad y concentración de los sitios de unión entre las larvas resistentes y sensibles. En un estudio posterior, se observó que había pequeñas diferencias en la velocidad del procesado proteolítico de las toxinas, entre la cepa resistente y una cepa susceptible, y que los insectos resistentes parecían tener una capacidad mayor de reparación del daño producido por la toxina en el epitelio intestinal (Forcada y Martínez, 1999).

Se ha visto que la herencia de la resistencia en una cepa de *H. virescens*, seleccionada con una cepa de *Pseudomonas fluorescens* que había sido modificada para producir la protoxina Cry1Ab, era autosómica, parcialmente dominante y en la cual participan diversos factores génicos. En otra cepa de *H. virescens*, cepa YHD2, demostraron que la resistencia a Cry1Ab y Cry1Ac, era parcialmente recesiva y era debida a un único *locus* o un grupo de *loci* estrechamente ligados (Armstrong y Stone, 1995).

En una cepa de *H. virescens* (YHD2), seleccionada con Bt var *kurstaki* HD-73 (que sólo produce la toxina Cry1Ac), se observó una considerable resistencia cruzada a las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1F. En base a los modelos de receptores y al mecanismo de resistencia descrita en *P. xylostella*, parece claro que la resistencia cruzada entre toxinas del grupo Cry1A, y entre éstas y Cry1F, sea debido a la pérdida de unión de dichas toxinas al receptor compartido. La resistencia cruzada a Cry1J, así como la encontrada en el cepa YHD2 de *H. virescens*, es muy probable que también sea debida a la alteración de un receptor común, aunque todavía no existen datos publicados al respecto (Sayyed y Wright, 2000).

En cuanto a los fenómenos de resistencia encontrados en reportes recientes de lepidópteros, se ha descrito el modo de acción de las toxinas Cry1A. Se han agrupado estos eventos como el “modo 1” en insectos que han desarrollado resistencia, en el cual se ha caracterizado a la herencia recesiva, con valores de resistencia a más de 500 veces, debido a la reducción de la unión de Cry1A, y se ha observado resistencia cruzada con Cry1C. Este denominado fenómeno de “modo 1” se ha caracterizado en tres especies de lepidópteros plaga; *H. virescens*, *Pectinophora gossypiella* (Saunders) y *H. armigera*. Este “modo 1” es causado por mutaciones en la unión de la toxina Cry1A al dominio 12 del receptor cadherina en intestino medio, presumiblemente fue removido o modificado el sitio de unión. En otra especie en *P. xylostella* el “modo 1” ligado a la modificación en cadherina, no está relacionado a la resistencia, pero similar a *P. interpunctella* el fenómeno de resistencia está ligado a la solubilización de la protoxina mediado por proteasas (Heckel y col., 2007).

En un estudio donde se monitorearon poblaciones de campo de *H. zea* en el sur de E.U.A., después de que se informó de problemas de control en de esta plaga en el campo, se encontró una disminución en su susceptibilidad a las toxinas Cry1Ac y Cry2Ab, ambas presentes en algodón transgénico, en bioensayos de laboratorio. En este estudio, en bioensayos de laboratorio con dieta artificial se observó un incremento de resistencia a Cry2Ab de 0% al 50% en el transcurso de exposición sistemática y continua durante 3 años (Tabashnik y Carrière, 2010; Tabashnik y col., 2009). Los resultados de laboratorio de poblaciones obtenidas en campo hicieron suponer que los problemas de control de población previamente reportada se debían a la evolución de resistencia de esta plaga a ambas toxinas (Tabashnik y Carrière, 2010; Tabashnik y col., 2009). Mientras que la reducción en la susceptibilidad a la toxina Cry2Ab no fue cuestionada, la diferencia en la susceptibilidad a Cry1Ac fue cuestionada pues se ha observado desde que se inició su evaluación en cultivos transgénicos (Moar y col., 2008), en donde se ha relacionado la sobrevivencia de las larvas al movimiento de las mismas entre las partes de la planta en donde haya una menor expresión o no hay expresión de la toxina. A este respecto, los resultados de monitoreo de resistencia a Cry1Ac entre poblaciones de campo de *H. zea* no han mostrado un incremento, quizá como resultado de una combinación de factores incluyendo el establecimiento de los refugios (donde se siembra algodón tradicional), las aplicaciones de insecticida y el algodonoero *Bt* con genes en pirámide, además del ajuste fisiológico asociado con el desarrollo de resistencia a Cry1Ac en *H. zea* (Moar y col., 2010).

2.12 Siembra experimental de maíz transgénico en México

Pese a la existencia de la moratoria de facto, que prohibía la siembra experimental y comercial de maíz transgénico en México, la siembra de maíz transgénico en nuestro país es una realidad desde el año 2009. Se conoce como transgénico u Organismo Genéticamente Modificado (OGM), al organismo vivo cuyo material genético ha sido modificado debido a que se le introdujeron genes de otras especies.

En el 2010 se aprobó la siembra de maíz transgénico a los estados de Chihuahua (102 Ha), Chihuahua, Coahuila y Durango (1.7 Ha), Durango y Coahuila (0.5 Ha), Nayarit (0.1 Ha), Sinaloa (26.2 Ha), Sonora (8.3 Ha) y Tamaulipas (21.2 Ha). En el 2011 los estados beneficiados fueron Baja California Sur (1.3 Ha), Nayarit (0.8 Ha), Sinaloa (31 Ha), Sonora (0.1 Ha) y Tamaulipas (14.7 Ha). En el 2012 solamente se aprobó el permiso para el estado de Nayarit con 2.5 Ha (Senasica, 2012) (Figura 6).

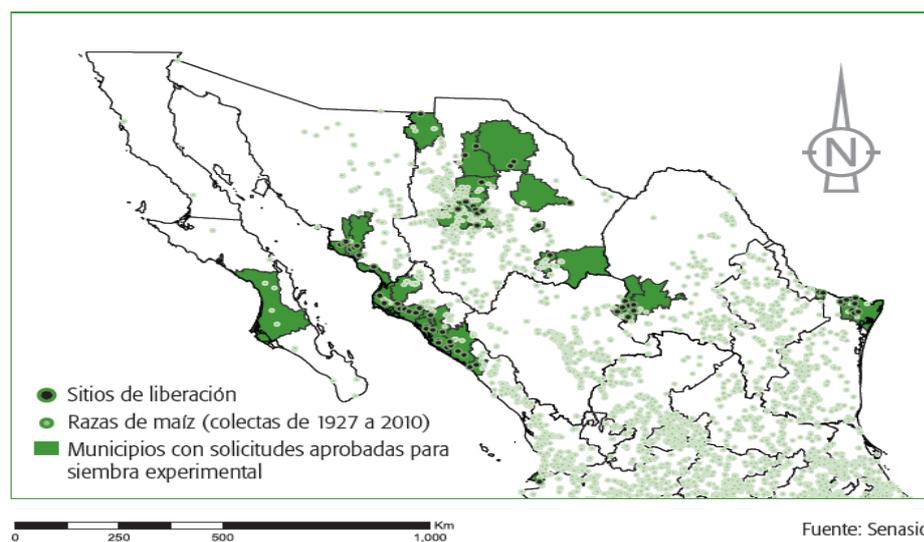


Figura 6. Siembra experimental de maíz transgénico durante el periodo 2009-2012.

2.13 *Helicoverpa zea* y *Helicoverpa armigera*

Helicoverpa armigera es una plaga estrechamente relacionada a *H. zea* que se presenta en Europa y la evolución de resistencia a toxinas de *Bt* ha sido muy similar a lo reportado para *H. zea* en América. Después de que se reportó una baja en el control de poblaciones de este insecto en poblaciones presentes en campo en Australia, se realizaron estudios para determinar si realmente existía resistencia a alguna de las toxinas que expresaban los eventos que se cultivaban en esa zona. Los resultados mostraron que de las toxinas presentes en algodón transgénico, la resistencia a Cry1Ac está mucho menor en este insecto comparado con Cry2Ab (Downes y col., 2007). Este grupo de investigadores monitorearon la presencia de alelos de resistencia entre las poblaciones de Heliothines y observaron que en el transcurso de 5 años, la cantidad de alelos encontrados fue creciendo exponencialmente (Downes y col., 2010a) no sólo entre poblaciones de *H. armigera*, sino inclusive para *Helicoverpa punctigera* (Wallengren) (Downes y col., 2010b) en las que se calculó un incremento de resistencia de 8 veces. Por el contrario, en el norte de China la evaluación de desarrollo de resistencia a la toxina Cry1Ac realizados del 2002-2008, indicaron que la frecuencia de alelos de resistencia ha permanecido baja, sugiriendo que el refugio natural puede haber retrasado su evolución (Gao y col., 2010).

El conocimiento de la alta similitud genética entre *H. armigera* originaria del viejo mundo y *H. zea* del nuevo mundo, enfatiza la necesidad de considerar a ambas especies para construir las estrategias para el manejo de las plagas (Behere y col., 2007).

Con estos antecedentes mostramos la importancia de evaluar la relación entre respuesta inmune y planta hospedera para determinar si influyen en las diferencias en la susceptibilidad a *Bt* de las poblaciones de campo de *H. zea*.

3. HIPÓTESIS

Existe variación en la expresión de transcritos de péptidos antimicrobianos que conforman la respuesta inmunológica humoral de *Helicoverpa zea* relacionada con plantas hospederas, su exposición a *Bacillus thuringiensis* o a toxinas Cry presentes en cultivos transgénicos.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

- Analizar la expresión de péptidos antimicrobianos entre poblaciones silvestres de *Helicoverpa zea* presentes en cultivos de maíz y algodón de diferentes áreas geográficas de México y E.U.A., además de a un producto comercial a base de *Bacillus thuringiensis*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comprobar la posibilidad de amplificar transcritos de péptidos antimicrobianos presentes en *Helicoverpa zea*, usando secuencias de ARNm reportadas en *Helicoverpa armígera*.
- Comparar la expresión de péptidos antimicrobianos de *Helicoverpa zea* en bioensayos con plantas convencionales o transgénicas y después de exponer a dieta artificial y a cristales y esporas de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) usando un producto comercial.
- Colectar larvas de *H. zea* y hojas y/o frutos de su planta hospedero en diferentes áreas geográficas de México y E.U.A.
- Detectar la presencia de proteínas Cry de *Bt* en las plantas colectadas.
- Determinar la relación entre la expresión de péptidos antimicrobianos entre las poblaciones de *H. zea* colectadas de diferentes cultivos y/o áreas geográficas de México y E.U.A.

5. METODOLOGÍA

5.1 Diseño experimental

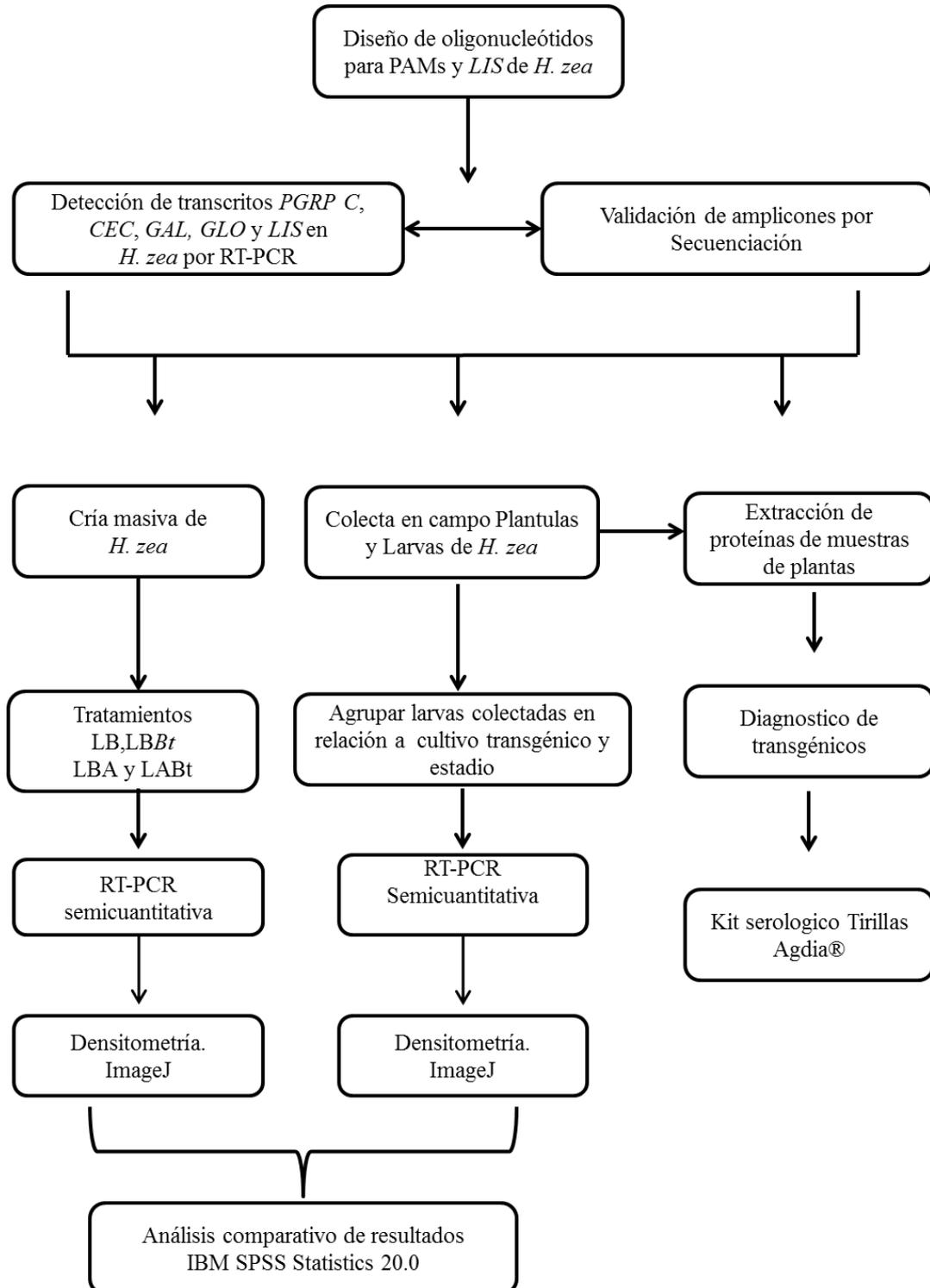


Figura 7. Diseño experimental del proyecto.

A menos que se indique otra cosa, los reactivos empleados se adquirieron en Sigma-Aldrich Química, S. de R.L. de C.V., Toluca, Estado de México, MX.

5.2 Material biológico

*5.2.1 Larvas de *Helicoverpa zea* de laboratorio*

Se utilizaron larvas de 2do, 4to y 5to estadio de la cría de larvas de importancia agrícola del laboratorio de Formulación de Biológicos de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Las cepas se mantuvieron en dieta artificial (Tamez-Guerra y col., 2006), en incubación, a una temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y humedad relativa del $75\% \pm 10\%$.

*5.2.2 Larvas de *Helicoverpa zea* de campo*

En campos de cultivo de maíz y algodón de diferentes zonas geográficas de México y Estados Unidos de América se realizaron colectas en busca de larvas de *H. zea*.

El muestreo fue por colectas aleatorias, que incluyeron cultivos transgénicos y cultivos convencionales. Los campos seleccionados fueron: Cofradía, La Palma, Casa Blanca, Tamazula, La Uva y Guasave en Sinaloa. El Pilar y Compuertas Francisco I. Madero en Coahuila. Ejido Venecia, Ejido Carolinas, INIFAP, Paso Nacional en Durango. Diferentes parcelas del estado de México (Parcela 1 a Parcela 8), Tamaulipas y Guanajuato. En Estados Unidos las colectas se realizaron en campos experimentales de la Universidad de Texas AyM.

Se colectaron larvas de 2do, 4to y 5to estadio y se colocó una larva por tubo. Se usaron tubos de 15 mL con 10 mL de etanol al 70% para conservar las muestras. Los tubos se etiquetaron de manera individual indicando el lugar del muestreo, la fecha y

la planta hospedera donde se colectó. Posteriormente, se transportaron de los lugares de colecta a la Unidad de Formulación de Biológicos del Laboratorio de Inmunología y Virología de la FCB-UANL, donde se mantuvieron en refrigeración a 4°C hasta su análisis (Hopkins y col., 2011). Al igual que en los bioensayos, las larvas de 2do estadio se procesaron completas y se usaron 5 larvas del mismo tratamiento como una muestra. El intestino medio de las larvas de 4to estadio fue removido y se tomaron de 2 a 3 intestinos medios del mismo campo como una muestra. Fue el mismo caso para las larvas de 5to estadio.

5.2.3 Formulado a base de *Bt* utilizado

El producto comercial Bactospeine® DF (Valent BioSciences de México, S.A. de C.V.) cuyo ingrediente activo es *Bt* var *kurstaki* cepa HD-1, la cual contiene las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2A, y se recomienda para el control biológico de *H. zea*.

BACTOSPEINE®

Ingrediente activo:

Bacillus thuringiensis var. *kurstaki*

con una potencia de 32,000 unidades Internacionales por mg de producto

No menos de:..... 10.30

(Equivalente a 103 g de I.A./kg)

Ingredientes inertes:

Diluyentes, humectantes y dispersantes

No más de:..... 89.70

Total: 100.00



5.3 Material vegetal

5.3.1 Plantas de campo

En el caso de México como material vegetal se utilizaron muestras de hojas y frutos de plantas de maíz (*Zea mays* L.) y algodón (*Gossypium hirsutum* L.) colectadas en Coahuila, Durango, Estado de México, Guanajuato, Sinaloa y Tamaulipas.

En Estados Unidos la selección de los campos se realizó en base a que se tenían reportes del incremento de aplicación a químicos, mediante la rotación en la aplicación de piretrinas y carbamatos para el control del incremento de poblaciones de *H. zea* resistentes/tolerantes que manifestaban niveles bajos en la susceptibilidad (Departamento de Entomología, TAMU, College Station, Texas).

Se muestrearon cinco cultivos *Bt* y 2 cultivos no-*Bt* a los que se les asignó un número del 1 al 6 y fueron analizados en busca de larvas de *Helicoverpa zea* (Tabla II).

Tabla II. Tipos de tratamientos que fueron empleados en los cultivos muestreados, plantas transgénicas, productos químicos, hongos entomopatógenos

No.	<i>Bt</i>	Químicos	<i>Beauveria bassiana</i>	Coordenadas
1	—	—	+	30 31'25.92" N 96 24'04.00" W
2	+	—	—	30 31'27.21"N 96 24'02.70"W
3	—	+	—	30 31'22.87"N 96 24'04.06"W
4	+	+	—	30 32'08.51"N 96 25'14.76"W
5	—	+	—	30 32'12.00"N 96 25'11.96"W
6	+	+	—	30 32'47.68"N 96 27'22.78"W

Los cultivos se ubicaron en las afueras de la ciudad College Station. En la Figura 8 se muestra una vista aérea de la localización de los cultivos muestreados.

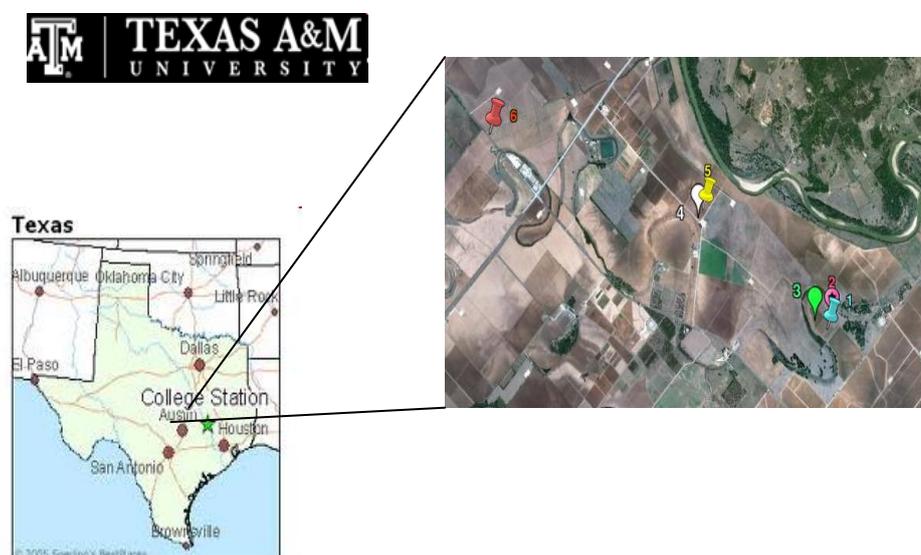


Figura 8. Vista aérea de campos de cultivo en College Station, TX.

5.3.2 Plantas de laboratorio

Se crecieron plantas de algodón convencional y algodón transgénico (evento DP1133B2RF) de las semillas proporcionadas por la Dra. Julissa Ek Ramos de la Universidad de Texas AyM.

5.4 Amplificación de transcritos en *H. zea* usando secuencias de *H. armígera*

Para comprobar si con las secuencias de ARNm reportadas en *Helicoverpa armigera* se podrían amplificar transcritos de péptidos antimicrobiales presentes en *Helicoverpa zea*, accedimos a la base de datos de secuencias genéticas “GenBank” en la página del NCBI y buscamos las secuencias de PAMs anotadas de *Helicoverpa armígera*. Encontramos los PAMs cecropina-1 (GU182916), cecropina-2

(GU182909), cecropina-3 (GU182910), atacina (GU182917), lisozima (GU182915), gallerimicina (GU182913), gloverina (GU182908), moricina (GU182911), cobatoxina (GU182912), galiomicina (GU182907), proteína de reconocimiento a peptidoglicano *PGRP C* (GU182906), además de otros genes de inmunidad.

5.4.1 Diseño de oligonucleótidos

De las secuencias de ARNm de *Helicoverpa zea* se seleccionaron los genes actina (control endógeno) y el PAM lisozima. A partir de la base de datos de *H. armígera* fueron seleccionados los genes de PAMs cecropina 1, galiomicina, gallerimicina, gloverina, GGBP, moricina y *PGRP C*, para realizar el diseño de los oligonucleótidos. Se realizó el diseño de oligonucleótidos específicos tomando como referencia el codón de inicio y el codón de término para la amplificación completa de los genes (Tabla III).

5.4.2 Extracción de ARN de *H. zea*.

Para la extracción de ARN de intestino medio de los insectos, se homogenizó cada muestra con 1 mL de Tri-Ragent (Ambion, Inc., Austin, TX, USA) en un tubo eppendorf de 1.5 mL. Se incubó durante 10 min a temperatura ambiente para inhibir RNAsas y lisar las células. Posteriormente, se añadieron 200 µL de cloroformo, se mezcló con un vortex durante 15 seg incubó 10 min a temperatura ambiente.

Tabla III. Secuencias de los oligonucleótidos diseñados

Gen	Acceso GenBank	Reportados en:	Secuencia
Actina	AF286059.1	<i>H. zea</i>	ACTF: ATGTGCGACGAGGAAGTTGC ACTR: GCCATGTACGTCGCCATCCA
Cecropina	GU182916.1	<i>H. armigera</i>	CECF: ATGAACTTCTCAAGGATATTTT CECR: TTAACCTAAAGCTTTGGCTTCA
Galiomicina	GU182907.1	<i>H. armigera</i>	GALF: ATGGTGAAGAGCTACCGTTCCG GALR: TTATGTTTCACACCAACAGTTG
Gallerimicina	GU182913.1	<i>H. armigera</i>	GLLF: GGCACGAAGGGCTTGNTTTAAT GLLR: TTATCGAAGACATTGGCAGCCA
Gloverina	GU182908.1	<i>H. armigera</i>	GLOF: TCATTATTCGGTCGTGGAGGCT GLOR: TTAAAAGTCGTGTTCAATCTTT
GNBP	EU325562.1	<i>H. armigera</i>	GNBF: ATGTGGTCGGTGTTAGTGGGCG GNBR: TTACAAAGCCCAAATGCGAACG
Lisozima	FJ535250.1	<i>H. zea</i>	LISF: ATGCAGAAGCTAACTTTGTTCG LISR: TTAGCAGTTGCTAAGATCAGGC
Moricina	GU182911.1	<i>H. armigera</i>	MORF: ATGAAGTTCACTAAAGTACTTG MORR: TTAGTGCCTCTTTTTTGGCTTG
PGRP C	JX082167.1	<i>H. armigera</i>	PGRF: ATGGCGTTTAAATTGCTAGTGT PGRR: TTATGCCGAAGTAGTTGCAGCA

Se centrifugó a 13,600 rpm durante 10 min. Se recuperó la fase incolora y se transfirió a un tubo eppendorf limpio y estéril de 1.5 mL. Se precipitó el ARN usando 500 μ L de isopropanol frío y centrifugando la muestra a 13,600 rpm durante 10 min. La pastilla de ARN se lavó con 500 mL de etanol al 70% en agua con 0.1% de dietilpicrocarbonato por litro (DEPC) y se centrifugó durante 5 min a 13,600 rpm. Por último la pastilla con el ARN se re-suspendió en 50 μ L de agua DEPC e incubó a 65°C durante 10 min para ser almacenado a -70°C.

5.4.3 Cuantificación de ARN

El ARN obtenido se cuantificó en un NanoDrop Lite (Thermo Scientific®, Palm Beach, FL, USA) y se ajustó a 0.2 μ g/ μ L para todas las muestras.

5.4.4 Síntesis de ADNc

A partir del ARN extraído del intestino medio de los insectos, se llevó a cabo la síntesis de la hebra de ADN complementaria (ADNc) al ARN mediante la reacción de retro-transcripción (RT-PCR), usando el kit Improm-II Reverse Transcription System (PROMEGA®, Madison, Wisconsin, USA).

En tubos eppendorf de 0.2 mL se prepararon las reacciones con volumen final de 50 μ L. Para cada reacción se usaron 10 μ g de ARN, 10 μ l de buffer de reacción 5X (250 mM Tris-HCl a pH 8.3, 375 mM KCl, 50 mM Dithiothreitol), 5 μ L de 25 mM MgCl₂, 0.5 μ L de inhibidor de ribonucleasas (RNAsin), 2 μ L de dNTPs, 1 μ L de oligo dT12-18 y 200 unidades de transcriptasa reversa del virus de la leucemia

Moloney Murina (MMLV); ajustando el volumen con agua libre de nucleasas. Se incubó la reacción en termociclador (Maxigen Gradient, Axigen Scientific, Union City, CA) a 45°C durante 120 min. Finalmente, se inactivó la enzima a 65°C durante 10 min.

5.4.5 Estandarización de condiciones para la amplificación de transcritos de PAMs

Se empleó la técnica de PCR semicuantitativa usando oligonucleótidos específicos (Tabla 2) con la finalidad de identificar los transcritos que codifican para PAMs en *H. zea* a partir del ADNc obtenido. Se utilizó un volumen final de 20 µL de los siguientes componentes: 10 µL de buffer GoTaq® Green Master (2X), 5 µL de ADN templado (1µg de ADNc), y 1 µL de cada primer (10 pmol) y 3 µL de agua libre de nucleasas.

Los transcritos de los PAMs se amplificaron en 40 ciclos en un termociclador. Cada ciclo consistió de un paso de desnaturalización a 94°C durante un minuto, un paso de alineamiento de 50 - 65°C durante un minuto, y un paso de extensión a 72°C durante un minuto. Se analizaron 5 µL de la muestra amplificada en un gel de agarosa al 1.5% y se observó con la tinción de bromuro de etidio bajo luz UV, usando un transiluminador UVP (VWR, Radnor, PA, USA).

5.5 Bioensayos

Para realizar los bioensayos se utilizaron larvas de 2do, 4to y 5to estadio de la cría del laboratorio.

Se realizaron 4 tratamientos: Algodón transgénico, algodón convencional, BACTOSPEINE® y dieta artificial. Cada grupo de larvas utilizadas se sometió sólo a un tratamiento. Todos los tratamientos se hicieron por triplicado.

Tratamiento 1. Algodón transgénico.

Consistió en someter a las larvas a 6, 12, 24 y 36 horas a una mezcla de 10mL de dieta artificial (Tabla 3) con 0.1g de hojas de diferentes tamaños de planta transgénica de algodón DP1133B2RF que expresa proteínas Cry1Ab/1Ac.

Tratamiento 2. Algodón convencional

Consistió en someter a las larvas a 6, 12, 24 y 36 horas a una mezcla 10mL de dieta artificial (Tabla 3) con 0.1 g de hojas de diferentes tamaños de planta de algodón convencional, la cual no expresa ninguna proteína Cry.

Tratamiento 3. BACTOSPEINE®

Consistió en someter a las larvas a 6, 12, 24 y 36 horas a una mezcla de dieta artificial (Tabla 3) con 200 Unidades producto comercial BACTOSPEINE que contiene una mezcla de cristales (Cry1Ab/1Ac) y esporas de *Bacillus thuringiensis* subespecie *kurstaki*.

Tratamiento 4. Dieta artificial

Consistió en someter a las larvas a 6, 12, 24 y 36 horas a dieta artificial (Anexo 1) como control del tratamiento Bactospeine®. Transcurridos los tiempos mencionados para cada tratamiento, se realizó la extracción de ARN (ver apartado 5.3.2), cuantificación del ARN obtenido (ver apartado 5.3.3), síntesis del ADNc (ver apartado 5.2.4) y finalmente detección de los transcritos de PAMs mediante PCR usando las condiciones establecidas en la estandarización (apartado 5.3.5). Debido a su tamaño pequeño, las larvas de 2do estadio se procesaron completas y se usaron 5 larvas del mismo tratamiento como una muestra. El intestino medio de las larvas de

4to fue removido y se tomaron de 2 a 3 intestinos medios del mismo tratamiento como una muestra. Para las larvas de 5to estadio se utilizó el mismo criterio que para las larvas de 4to estadio.

5.6 Análisis de la expresión de los genes mediante densitometría

Para el análisis de las bandas del gen constitutivo de *H. zea* y de todos los PAMs se utilizó el programa ImageJ. La unidad de medición fue la densidad relativa.

5.7 Detección de plantas transgénicas

La detección de las proteínas Cry en plantas transgénicas se realizó utilizando dos kits de tiras inmuno-reactivas de Agdia® “*Bt*-Cry1Ab/1Ac ImmunoStrip®” y “Quad Trait ImmunoStrip® Test”. Así mismo, se determinó de esta manera si las plantas colectadas presentan alguna de las proteínas Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Ab, Cry3Bb1, Cry1F y Cry1Fa de *Bt* (Figura 9).

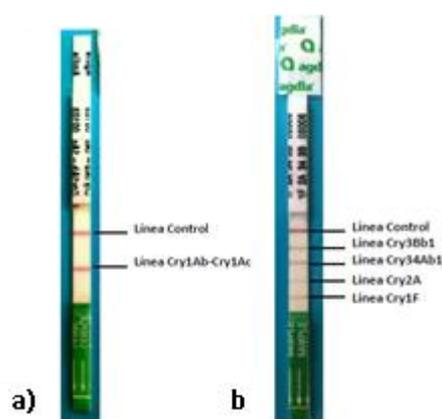


Figura 9. Tirillas de inmunodetección de proteínas Cry para detectar: A) Cry 1Ab/1Ac, B) Cry3Bb1, Cry34Ab1, Cry2A y Cry1F.

5.8 Análisis estadístico

Se realizaron tres repeticiones de cada tratamiento y se compararon contra un control no tratado a todas las horas de exposición entre larvas del mismo estadio. Las muestras de CA y CA_t se analizaron comparándolas con LBA y LBA_t respectivamente, cada estadio por separado, excepto la de 3er estadio de Texas-Campo 5 que se comparó con larvas de 2do y 4to estadio. Se comparó la expresión en CM y CM_t en tres análisis diferentes, uno para cada estadio (2do, 4to y 5to estadio) (Anexo 2). Estos resultados se analizaron por medio de análisis de varianza (ANOVA) mediante el software SPSS versión 20 y se analizaron las diferencias significativas con un límite de confianza de 0.05, para observar diferencias en relación al control y así poder identificar las variantes en la mortalidad con *Bt*.

6. RESULTADOS

6.1 Detección de transcritos por PCR punto final

En el lepidóptero *H. zea* se analizaron transcritos que codifican para los genes involucrados en su respuesta inmunológica. Como control endógeno se utilizó la proteína constitutiva actina. La detección se realizó por medio de la técnica de RT-PCR convencional utilizando oligonucleótidos para cada gen. Los transcritos de los genes gallerimicina, GNBP y moricina no se lograron amplificar. El gen constitutivo se detectó a 414 pb, cecropina a 188 pb, galiomicina a 221 pb, gloverina a 330 pb, lisozima a 428 pb y *PGRP C* a 706 pb. Las temperaturas de alineamiento y los tamaños de los amplicones de los genes que se lograron amplificar se muestran en la tabla IV.

Tabla IV. Tamaño de amplicón y temperaturas de alineamiento de los genes amplificados.

Gen	Tamaño de amplicón	Temperatura de alineamiento
Actina	414 pb	53.6°C
Cecropina	188 pb	53°C
Galiomicina	221 pb	60.2°C
Gloverina	330 pb	52.6°C
Lisozima	428 pb	59.4°C
PGRP C	639 pb	57.7°C

Mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% se comprobó la expresión génica de los PAMs al compararse el tamaño de la banda obtenida con el marcador de peso

molecular. En la figura 10 se muestra una fotografía de los transcritos obtenidos y el marcador de peso molecular utilizado.

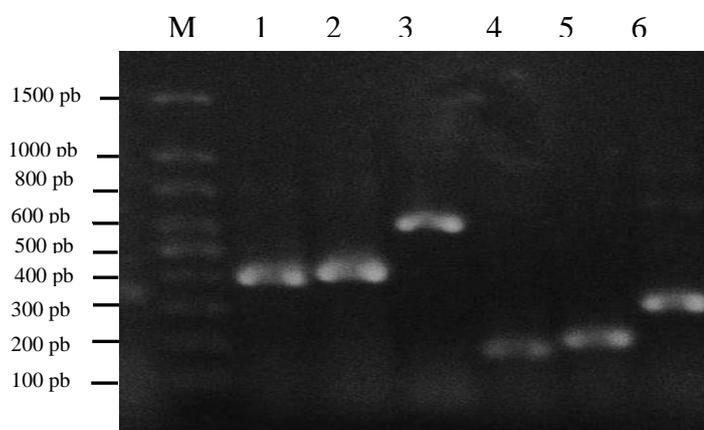


Figura 10. Detección por RT-PCR punto final de los transcritos que codifican para péptidos antimicrobianos. PAGE-SDS, en agarosa al 1.5%. M= marcador 100 pb (Promega), 1 = Actina (control endógeno), 2= Lisozima, 3= Proteína de reconocimiento de peptidoglucanos (*PGRP C*), 4= Cecropina, 5= Galiomicina, 6= Gloverina.

6.2 Análisis de la secuencia de nucleótidos/aminoácidos de los genes de inmunidad (PAMs) de *H. zea*

Las secuencias de nucleótidos obtenidas de los cromatogramas (Figura 11), fueron procesadas por el programa Clustal W/BioEdit V7.0 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>), con el cual tras el alineamiento, se obtuvo la secuencia deducida de aminoácidos. Utilizando el programa *BLAST protein* (NCBI, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>), se encontró que los genes amplificados en *H. zea* poseen un porcentaje entre el 96% y 100% de homología con las secuencias de los PAMs de *H. armigera* (Figura 12).

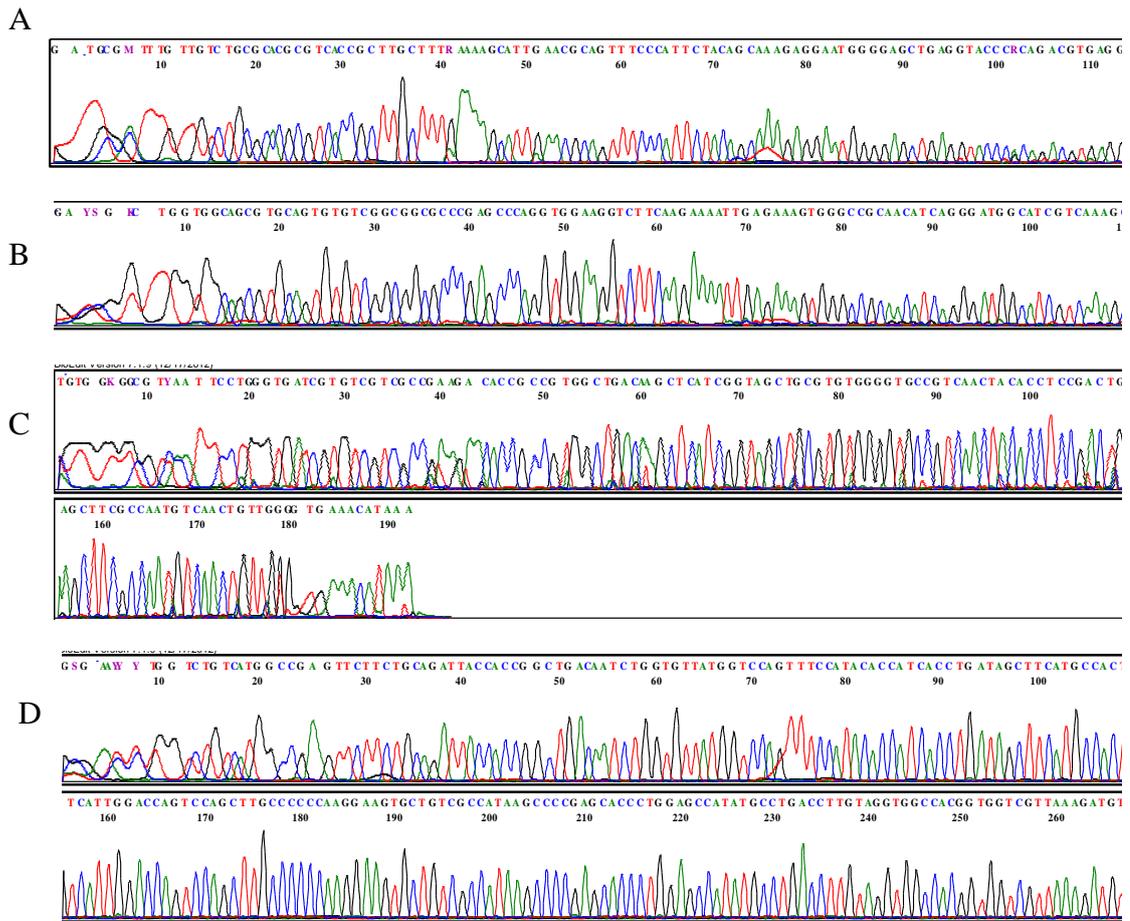


Figura 11. Cromatogramas de secuencias de nucleótidos de productos de PRC obtenidos del secuenciador de ADN ABI3130xl de la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA (USSDNA) del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

6.2.1 Reporte de las secuencias de PAMs caracterizadas en H. zea en la base de datos GenBank

Después de analizar los cromatogramas con las secuencias de nucleótidos de productos de PRC obtenidos del secuenciador de ADN ABI3130xl de la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA (USSDNA) del Instituto de Biotecnología de la UNAM (México DF), suscribimos las secuencias para publicarlas en la base de datos del GenBank.

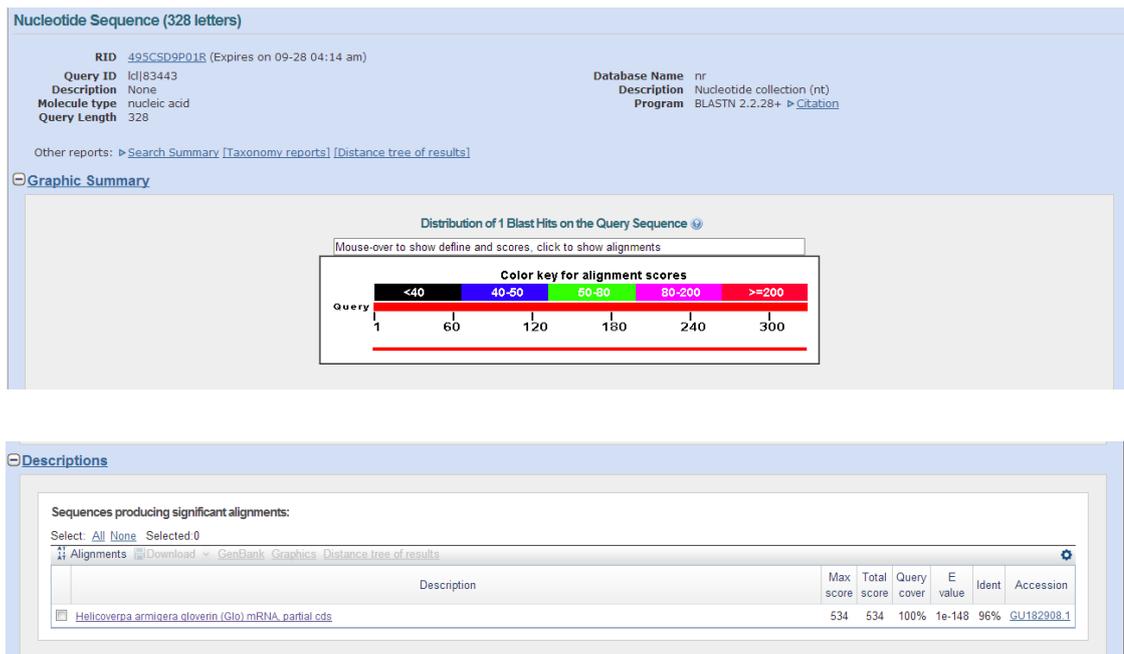


Figura 12. Análisis de identidad de la secuencia de aminoácidos del gen *GLO* de *Helicoverpa zea* utilizando el programa BLAST protein (NCBI).

Con esto, se lograron añadir a la base de datos el gen *PGRP C* (KF282764) (Martinez y col., 2013-C), Galiomicina (KF169742) (Martinez y col., 2013-A) y Gloverina (KF527285) (Martinez y col., 2013-B).

6.2.2 Análisis comparativo de las secuencias de los genes *GLO* y *CEC* entre el lepidóptero *H. zea* y otros insectos.

Con la finalidad de observar la relación filogenética entre las secuencias, se elaboró un árbol filogenético con el programa MEGA 5.1 utilizando Neighbor Joining Tree como algoritmo para determinar la matriz de distancias. Se construyó un árbol filogenético para observar la relación evolutiva de cada PAM (Figura 13). Solamente se encontró un aminoácido diferente entre las secuencias de *CEC* de *H. zea* y *H. armigera* (Figura 14-B). Tras el alineamiento, se encontraron 2 cambios de aminoácidos entre la secuencia de *GLO* y *CEC* de *H. zea* y *H. armigera* (Figura 14).

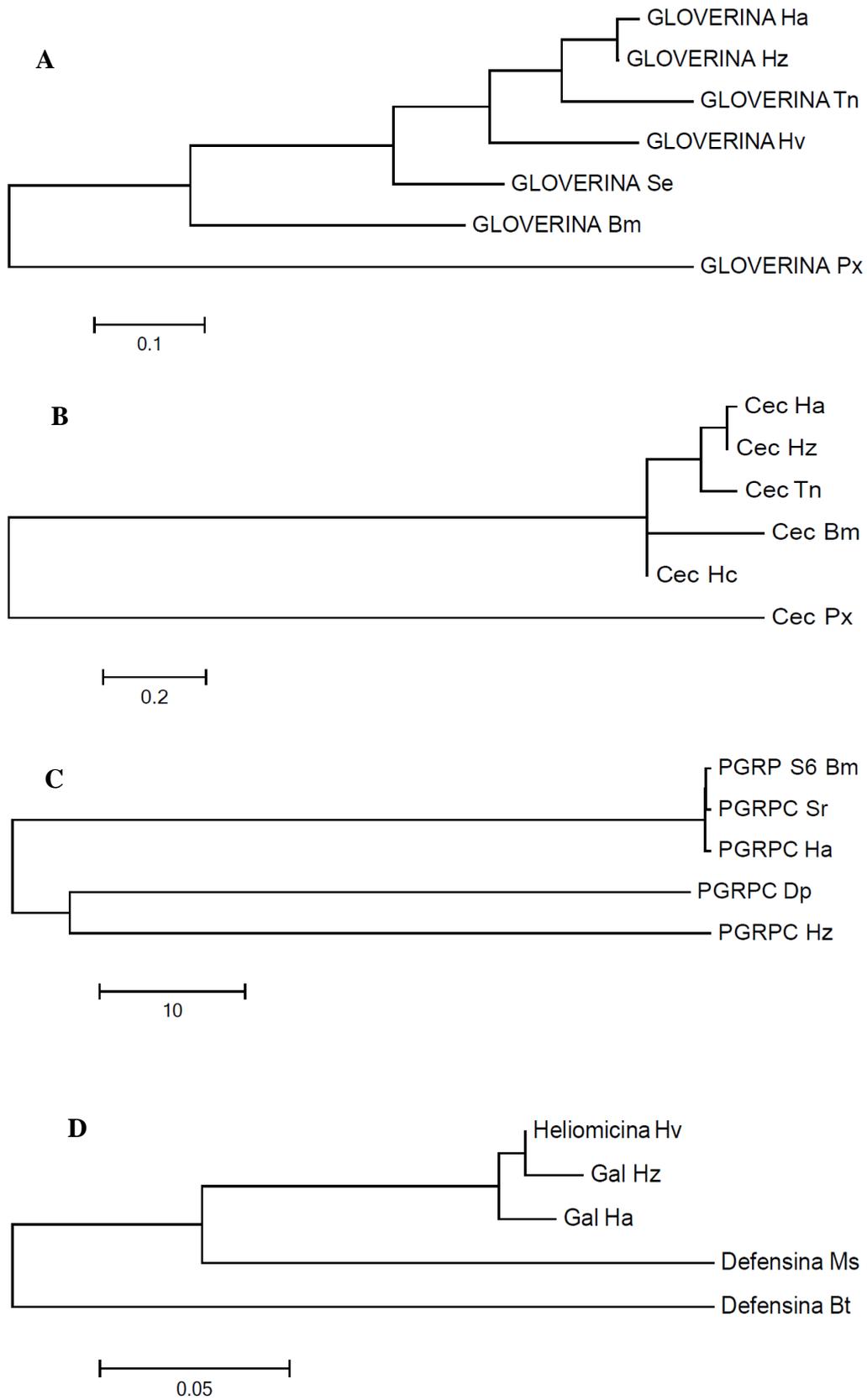


Figura 13. Árbol filogenético de las secuencias de aminoácidos de los genes *GLO* (A), *CEC* (B), *PGRP C* (C) y *GAL* (D) encontrados en el lepidóptero *H. zea* y su ubicación al compararlos contra otros insectos.

($p < 0.05$) en la expresión del PAM *CEC* en larvas de 2do estadio a las 6, 12, 24 y 36 horas con el tratamiento LBA en comparación con LBA_t. Para larvas de 4to estadio la expresión de *CEC* fue mayor ($p < 0.05$) a 6, 12 y 24 horas con el tratamiento LB en comparación del tratamiento de exposición a *Bt* LBB_t. En el caso del PAM *GAL* se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) al comparar los tratamientos LB y LBB_t a 6, 12 y 24 horas de exposición en larvas de 4to estadio, siendo mayor la expresión de *GAL* en LBA. Con los PAMs *PGRP C* y *GLO* no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos analizados.

6.4 Colecta de plantas transgénicas y larvas de *H. zea* de México y E.U.A.

6.4.1 Larvas

En todos los campos de cultivo se buscaron de manera exhaustiva larvas de 2do, 4to y 5to estadio. Sin embargo, no en todos los campos se logró obtener la cantidad de larvas ideal para el análisis.

6.4.2 México

Se realizaron colectas en 6 estados de la república mexicana que fueron elegidos basados en diferentes aspectos; presentan problemas de debastación de cultivos por el insecto *H. zea*, la disponibilidad y facilidad para el traslado de las muestras. En la tabla V se muestran los estados seleccionados y los tipos de cultivos muestreados. En todos los estados muestreados se colectaron muestras de maíz. Sólo en el estado de Durango colectaron además muestras de algodón.

Tabla V. MÉXICO: Estados seleccionados y cultivos muestreados

Estado	Muestra
Coahuila	Maíz
Durango	Maíz
	Algodón
Estado de México	Maíz
Guanajuato	Maíz
Sinaloa	Maíz
Tamaulipas	Maíz

En la tabla VI se muestra la cantidad de larvas que se usó para el análisis de cada estado.

Tabla VI. Cantidad de larvas analizadas ordenadas por estadio de crecimiento y estado donde se colectaron

Estadio de larvas	Estado de recolección					
	Sinaloa	Coahuila	Durango	Tamaulipas	Estado de México	Guanajuato
2do	35	10	20	0	5	0
4to	15	0	12	3	12	3
5to	12	0	9	0	27	0

6.4.3 E.U.A.

A diferencia de la cantidad de muestras encontradas en estados de México como Sinaloa o Durango donde se encontraron muchas larvas, en los campos experimentales de Texas AyM sólo se encontraron 3 larvas de *H. zea*. En la tabla VII se indica la cantidad de larvas encontradas en cada campo muestreado.

Tabla VII. Cantidad de larvas encontradas en cada cultivo y etapa de crecimiento

Campo	Cantidad de larvas encontradas	Estadio de las larvas
1	—	—
2	—	—
3	—	—
4	2	2do y 5to
5	1	3ero
6	—	—

A pesar de buscar de manera exhaustiva en los 6 campos de cultivo, fueron muy pocas las larvas encontradas. Se buscó presencia de daño en las plantas, tanto en las hojas como en los frutos. En la tabla VIII se presentan el material vegetal que fue encontrado. Se señala el tipo de daño y el tejido donde se localizó.

Tabla VIII Relación de daño observado durante los muestreos realizados en seis campos experimentales de algodón del College Station, TX

Campo	Muestras analizadas	Tipo de daño
1	Hojas y bellotas	Sin daño
2	Bellotas y hojas	Bellota perforada
3	Hojas	Sin daño
4	Bellotas y hojas	Perforaciones profundas y hojas perforadas
5	Hojas y bellotas	Perforaciones profundas en bellotas y hojas perforadas
6	Hojas	Sin daño

6.5 Identificación de proteínas Cry en plantas colectadas

Tras analizar las plantas colectadas con los kits de tiras inmuno-reactivas “*Bt*-Cry1Ab/1Ac ImmunoStrip®” y “Quad Trait Immuno Strip® Test” de Agdia Inc. (Elkhart, IN, USA), se logró detectar la presencia de proteínas Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1F y Cry2Ab. Sólo se encontraron plantas *Bt* en los campos de Texas. Usando las tirillas no se encontraron plantas *Bt* en los campos de México.

6.5.1 México

Al realizar los análisis con las inmunitirillas, se encontró que las muestras de México fueron negativas para proteínas Cry1Ab/1Ac, Cry3Bb1, Cry34Ab1, Cry2A, Cry1F (Tabla IX).

Tabla IX. Proteínas Cry encontradas en las muestras analizadas en México.

Estado	Planta analizada	Proteína Cry
Coahuila	Maíz	Negativo
Durango	Maíz	Negativo
	Algodón	Negativo
Estado de México	Maíz	Negativo
Guanajuato	Maíz	Negativo
Sinaloa	Maíz	Negativo
Tamaulipas	Maíz	Negativo

6.5.2 E.U.A.

El consorcio de las toxinas Cry1Ab/1Ac de *Bt* fueron las que predominaron en los campos de algodón de College Station, TX. Este consorcio se detectó en los campos 1, 3, 5, 6 y 7, seguida por la toxina Cry1F, encontrada en los campos 1, 3, 5 y 6 y la

toxina Cry2A encontrada solamente en los campos 1 y 6. Las toxinas Cry34Ab1 y Cry3Bb1 no se encontraron en ningún campo de cultivo (Tabla X).

Tabla X. Detección de toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* en los cultivos de algodón colectados de diferentes campos experimentales del College Station, TX.

Campo	Cry1Ab/1 Ac	Cry1F	Cry2A	Cry34Ab1	Cry3Bb1
1	•	•	•	—	—
2	—	—	—	—	—
3	•	•	—	—	—
4	—	—	—	—	—
5	•	•	—	—	—
6	•	•	•	—	—
7	•	—	—	—	—

6.6 Análisis comparativo de la expresión de PAMs y LIS

Los datos obtenidos se analizaron utilizando la prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra para determinar su normalidad. Las muestras que presentaron distribución normal se sometieron al análisis de varianza factorial y en caso de encontrar diferencias, se sometieron a una prueba de comparación de medias. Por otra parte, los datos que no presentaron distribución normal se sometieron a un ANOVA factorial no paramétrico Scheirer Ray Hare, encontrándose los siguientes resultados.

En larvas de 2do estadio del Ejido Carolinas, Durango, se encontró la mayor expresión del gen LIS ($p = 0.015$) en comparación con 12 horas de tratamiento LBA y del PAM CEC ($p < 0.001$) al compararlo con 6, 12, 24 y 36 horas de exposición al tratamiento LBA. La expresión de GAL fue significativamente mayor a las 24 horas

($p = 0.035$) en larvas de 2do estadio del tratamiento LBA comparada con la expresión de *GAL* en larvas de 2do estadio del Ejido Carolinas. Al comparar la expresión de los genes *PGRP C* y *GLO*, no se encontraron diferencias significativas entre LBA, LBA_t, CA y CA_t (Figura 15).

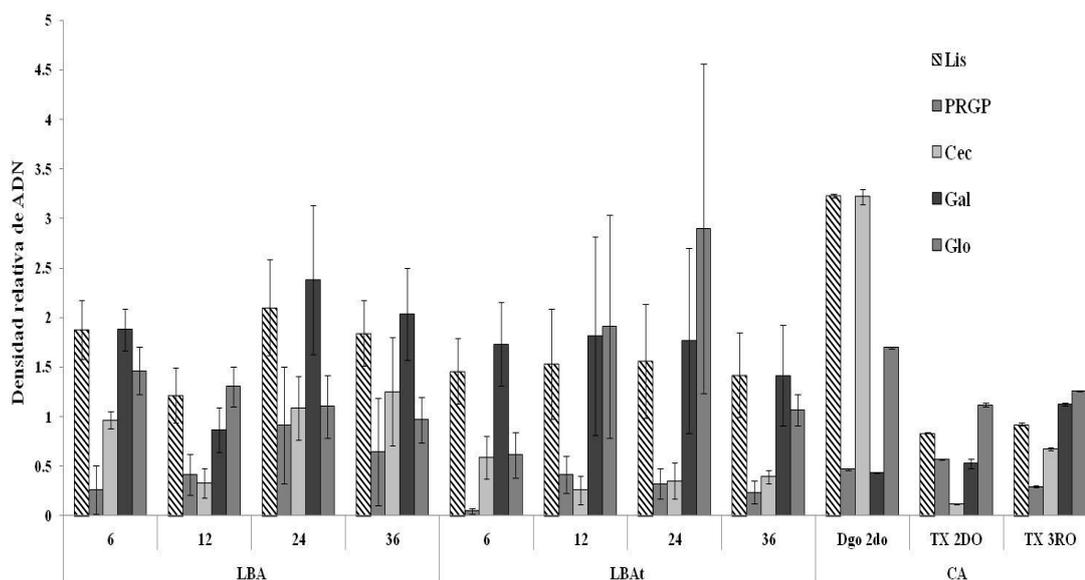


Figura 15. Niveles de expresión de ADN obtenidos por densitometría (densidad relativa), de transcritos de *PGRP C*, *CEC*, *GAL*, *GLO* y *LIS*, en larvas de *H. zea* de 2do estadio de los bioensayos en algodón convencional (LBA) y algodón transgénico (LBA_t) a 6, 12, 24 y 36 horas y de los campos de cultivo de algodón convencional (CA) y algodón transgénico (CA_t). Las barras sobre las columnas indican los valores de error estándar. Promedio de tres repeticiones.

Al realizar los análisis estadísticos correspondientes en larvas de 4to estadio, solamente encontramos diferencias en la expresión del PAM *GLO*, donde su expresión fue significativamente mayor ($p = 0.026$) a las 36 horas con el tratamiento LBA comparado con la expresión de *GLO* de larvas de Durango de 4to estadio. Al comparar la expresión de transcritos de los PAMs *PGRP C*, *CEC*, *GAL* y la enzima lítica *LIS*, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos LBA, LBA_t, CA y CA_t (Figura 16).

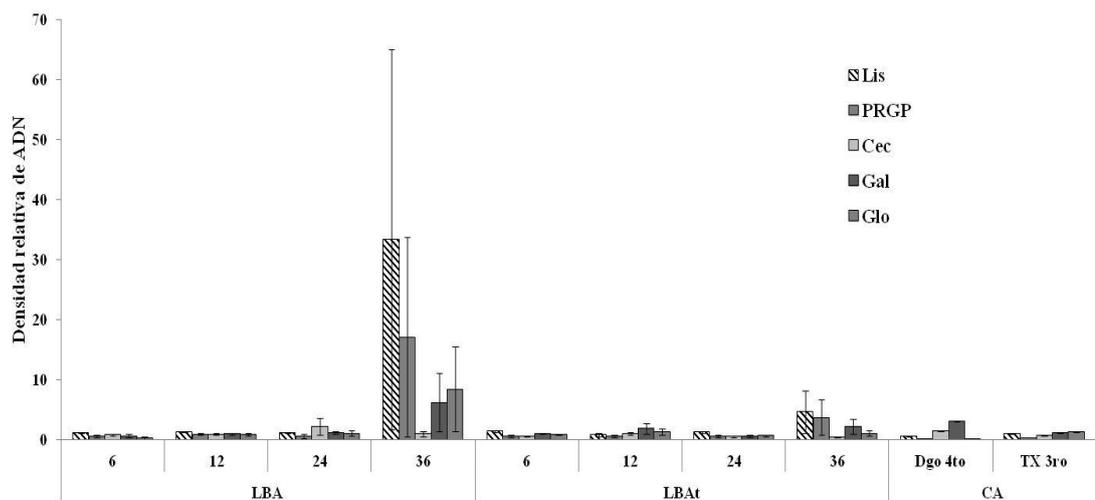


Figura 16. Niveles de expresión de ADN obtenidos por densitometría (densidad relativa), de transcritos de *PGRP C*, *CEC*, *GAL*, *GLO* y *LIS*, en larvas de *H. zea* de 4to estadio de los bioensayos en algodón convencional (LBA) y algodón transgénico (LBAt) a 6, 12, 24 y 36 horas y de los campos de cultivo de algodón convencional (CA) y algodón transgénico (CA). Las barras sobre las columnas indican los valores de error estándar. Promedio de tres repeticiones.

En larvas de 5to estadio de los tratamientos LBA y LBAt, la expresión del gen *LIS* fue mayor ($p = 0.005$) a las 36 horas en comparación con 6, 12 y 24 horas de estos tratamientos. La expresión de *PGRP C* en larvas de 5to estadio fue significativamente mayor a 12 y 36 horas con el tratamiento LBA comparado con la exposición de 6 horas, 24 horas y las larvas de Texas de 5to estadio. Además, en larvas de 5to estadio del tratamiento LBA, la expresión de *GAL* fue significativamente mayor a las 24 horas ($p 0.048$) comparada con la expresión de *GAL* en larvas de 5to estadio de Texas (Figura 17).

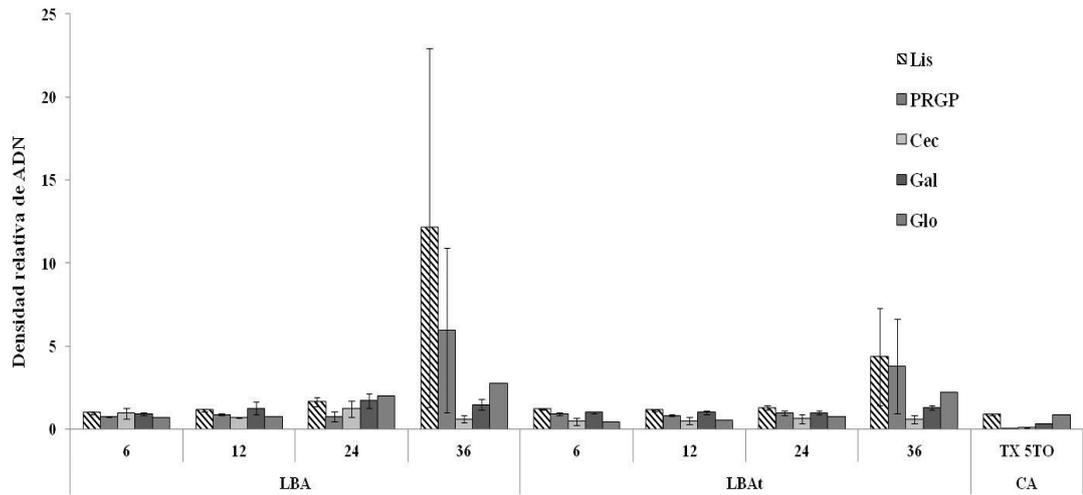


Figura 17. Niveles de expresión de ADN obtenidos por densitometría (densidad relativa), de transcritos de *PGRP C*, *CEC*, *GAL*, *GLO* y *LIS*, en larvas de *H. zea* de 5to estadio de los bioensayos en algodón convencional (LBA) y algodón transgénico (LBAt) a 6, 12, 24 y 36 horas y de los campos de cultivo de algodón convencional (CA) y algodón transgénico (CA). Las barras sobre las columnas indican los valores de error estándar. Promedio de tres repeticiones.

Al comparar la expresión de transcritos de los PAMs, *CEC* y *LIS* no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos LBA, LBAt, CA y CA (Figura 18).

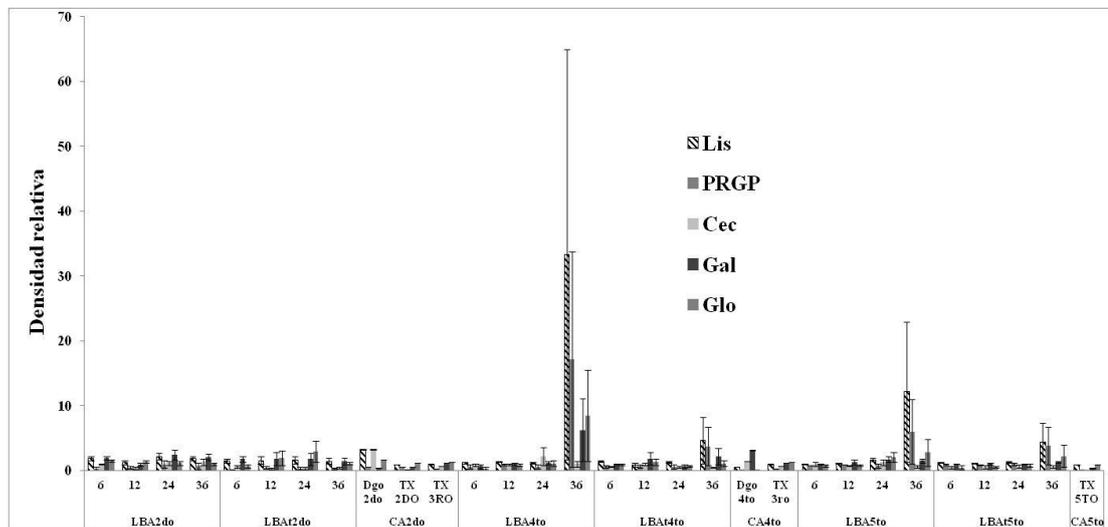


Figura 18. Niveles de expresión de ADN obtenidos por densitometría (densidad relativa), de transcritos de *PGRP C*, *CEC*, *GAL*, *GLO* y *LIS*, en larvas de *H. zea* de 2do, 4to y 5to estadio de los bioensayos en algodón convencional (LBA) y algodón transgénico (LBAt) a 6, 12, 24 y 36 horas y de los campos de cultivo de algodón convencional (CA) y algodón transgénico (CA). Las barras sobre las columnas indican los valores de error estándar. Promedio de tres repeticiones.

6.6.1 Expresión de transcritos de PAMs y LIS entre CM y CMt.

Al hacer el análisis estadístico con las densidades relativas de los transcritos de los PAMs y LIS de todos los campos muestreados tenemos que en larvas de 2do estadio analizadas la mayor expresión de todos los PAMs: *PGRP C* ($p < 0.01$), *CEC* ($p < 0.01$), *GAL* ($p < 0.01$), *GLO* ($p < 0.01$) y *LIS* ($p < 0.01$) fue en el Ejido La Uva (Figura 19).

En larvas de 4to estadio muestreadas de CM y CMt la mayor expresión del transcrito del PAM *PGRP C* fue en el Ejido Venecia, Dgo. ($p < 0.01$). En el caso del PAM *CEC*, la mayor expresión se encontró en la Parcela 2, Méx. ($p < 0.01$). En Guasave, Sin. se encontró la mayor expresión de los PAMs *GAL* ($p < 0.01$) y *GLO* ($p < 0.01$) y de la enzima lítica *LIS* ($p < 0.01$) (Figura 20).

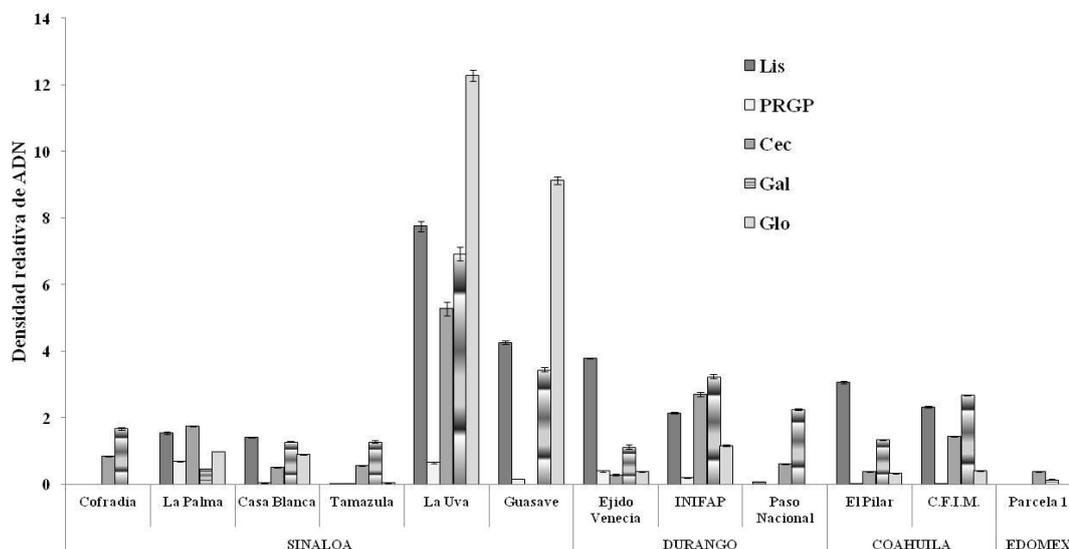


Figura 19. Niveles de expresión de ADN obtenidos por densitometría (densidad relativa), de transcritos de *PGRP C*, *CEC*, *GAL*, *GLO* y *LIS*, en larvas de *H. zea* de 2do estadio colectadas de los campos de cultivo de maíz convencional (CM) y maíz transgénico (CMt). Las barras sobre las columnas indican los valores de error estándar. Promedio de tres repeticiones.

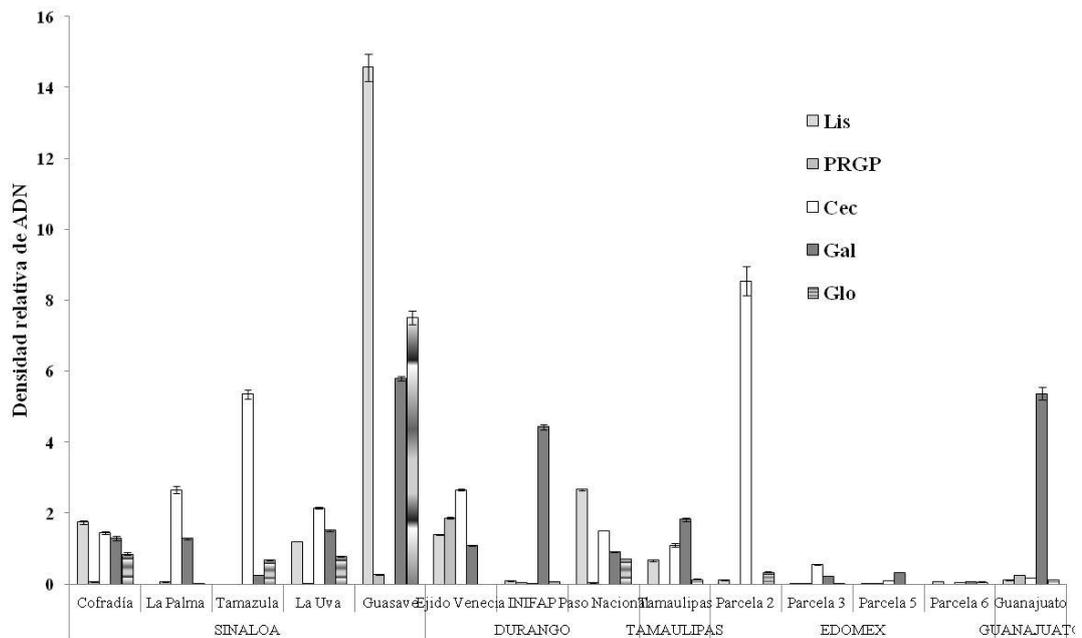


Figura 20. Niveles de expresión de ADN obtenidos por densitometría (densidad relativa), de transcritos de *PGRP C*, *CEC*, *GAL*, *GLO* y *LIS*, en larvas de *H. zea* de 4to estadio colectadas de los campos de cultivo de maíz convencional (CM) y maíz transgénico (CMT). Las barras sobre las columnas indican los valores de error estándar. Promedio de tres repeticiones.

Con el análisis que se realizó para larvas de 5to estadio se encontró que la mayor expresión de *PGRP C* y *LIS* fue en el Ejido Cofradía, Sin. ($p < 0.01$). *GAL* se encontró mayormente expresada en el Ejido la Palma, Sin. ($p < 0.01$). La expresión de los transcritos de los PAMs *CEC* y *GLO* tuvieron la mayor expresión en Tamazula, Sin ($p < 0.01$) (Figura 21).

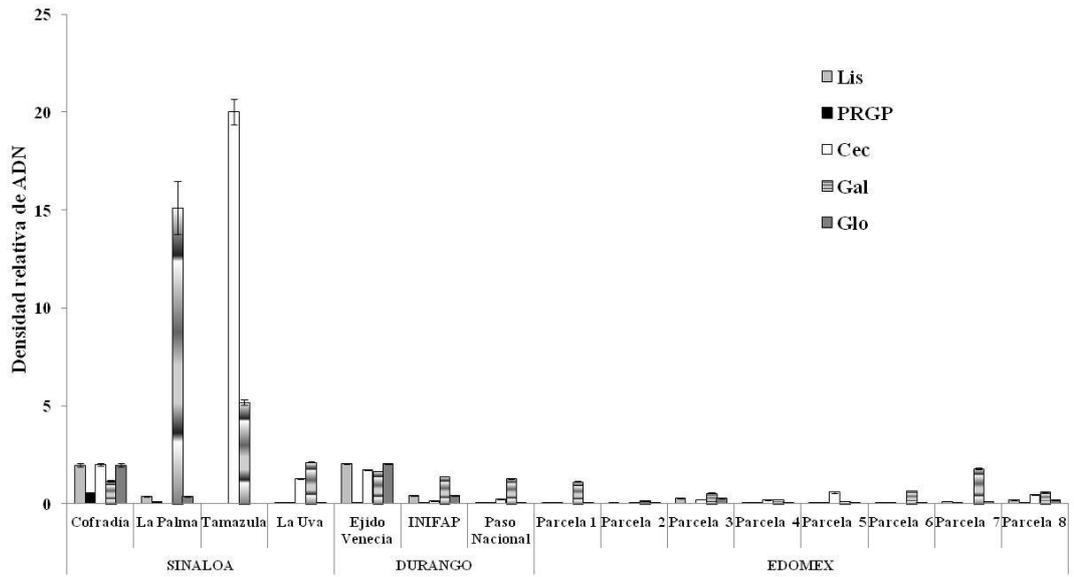


Figura 21. Niveles de expresión de ADN obtenidos por densitometría (densidad relativa), de transcritos de *PGRP C*, *CEC*, *GAL*, *GLO* y *LIS*, en larvas de *H. zea* de 5to estadio colectadas de los campos de cultivo de maíz convencional (CM) y maíz transgénico (CMt). Las barras sobre las columnas indican los valores de error estándar. Promedio de tres repeticiones.

7. DISCUSIÓN

La devastación de cultivos a causa del lepidóptero *Helicoverpa zea* constituye un problema agrícola ya que causa pérdidas parciales o totales de frutos y semillas de interés comercial, resultando en muchos casos pérdidas económicas importantes (Molina y cols., 2010). El problema con esta plaga es que algunas poblaciones de campo han desarrollado resistencia a ciertos insecticidas químicos (Hopkins y Pietrantonio, 2010; Hopkins y cols., 2011; Pietrantonio y col., 2007) y ha mostrado diferencias en la susceptibilidad a *Bt* (Moar y col., 2008), lo que permite que algunos insectos sobrevivan en campo después de exponerse a plantas transgénicas-*Bt*. Tanto la alimentación a diferentes variedades de cultivos (Chambers y Schneider, 2012), la exposición a insecticidas químicos (James y Xu, 2012) o a bioinsecticidas como *Bt* (Broderick y cols., 2010; Naseri y Namin, 2012) pueden alterar la respuesta inmune de insectos. En este estudio nuestro objetivo fue determinar diferencias en la respuesta inmune ligada a la expresión de PAMs y *LIS* en poblaciones de *H. zea* expuestas a *Bt* en laboratorio y campo en cultivos de algodón y maíz.

H. zea y *H. armigera* son especies de lepidópteros plaga en cultivos en el continente americano y europeo, respectivamente. Para detectar los PAMs de *H. zea* se utilizaron oligonucleótidos diseñados a partir de las secuencias reportadas en *H. armigera*, debido a que un estudio de ADN mitocondrial del citocromo oxidasa subunidad I (COI) de las dos especies puso de manifiesto la homología entre ambas. Debido a la cercanía genética en este gen COI se utiliza en estudios filogenéticos para el diseño de oligonucleótidos, para la discriminación o la identificación de especies (Behere y cols., 2007). Por todo ello se decidió tomar como referencia las

secuencias de ARNm de PAMs de *H. armigera* registradas en la base de datos del NCBI. Los genes que se intentaron amplificar se seleccionaron para identificar y caracterizar los PAMs en *H. zea* debido a que no se han reportado en esta especie, y para estudiar los mecanismos de inducción o represión inmunológica cuando las larvas se alimentaban de diferentes fuentes y ambientes (Ericsson y col., 2009; James y Xu, 2012; Tamez-Guerra y col., 2008). Entre los PAM's analizados a partir de oligonucleótidos de *H. armigera*, fue posible amplificar transcritos de *PGRP C*, *CEC*, *GAL* y *GLO* (Fig. 10). Una vez obtenidas las secuencias se prosiguió a obtener su porcentaje de identidad con la herramienta bioinformática *nucleotide BLAST* (NCBI) (Fig. 12). A partir de los datos que recibimos de la secuenciación (Fig. 11) se dedujo su secuencia de aminoácidos y de esta manera observamos diferencias a nivel de proteína (Fig. 14). A partir de la secuencia de aminoácidos, elaboramos un árbol filogenético para cada gen caracterizado (Fig. 13). Observamos la variación genética que presentan nuestras secuencias con las secuencias de *H. armigera* y otras especies de insectos.

Cabe señalar, que no fue posible obtener el producto de amplificación de todos los genes seleccionados en un principio, probablemente por fallas en la estandarización de las temperaturas de alineamiento utilizadas o porque los genes *GGBP*, *gallerimicina* y *moricina* de *H. armigera* no presentan homología con *H. zea*.

Al comparar las secuencias de los genes *GLO* y *CEC* de PAMs de *H. zea* y *H. armigera* encontramos entre 1 y 2 aminoácidos diferentes respectivamente. Lo anterior comprueba la presencia de los genes de inmunidad en *H. zea* y el porcentaje de homología existente entre en ambas especies. Por otra parte, no se encontró alta homología entre los genes *GAL* y *PGRP C* de *H. zea*, al compararlos con los

reportados en *H. armigera*, ya que presentan 97% y 96% de identidad con *H. armigera*, respectivamente, con una mayor cantidad de aminoácidos diferentes entre las secuencias comparadas.

Al analizar la represión y/o activación de transcritos de PAMs y *LIS* en larvas de *H. zea* por la exposición a *Bt*, sus proteínas Cry y diferentes variedades de plantas, alimentadas con dieta artificial y expuestas a *Bt* en laboratorio, los resultados mostraron un incremento en la expresión de los marcadores de inmunidad al incrementarse el tiempo de exposición. Esto podría estar relacionado a la resistencia natural que presenta la plaga (Moar y col., 2008).

Como parte de los objetivos de este trabajo eran relacionar las diferencias en susceptibilidad a la exposición a *Bt* con la respuesta inmune de *H. zea*. En este estudio combinamos bioensayos con un producto a base de esporas y cristales (BACTOSPEINE®), plantas de algodón-*Bt*, y la expresión de transcritos de PAMs y *LIS* de larvas de *H. zea* expuestas por diferentes tiempos. Al comparar los niveles de expresión de los PAMs y *LIS* entre los campos de algodón de México (CA), Texas (CA y CA_t) con los bioensayos de laboratorio, sólo la *CEC* (Ejido Carolinas), la *LIS* (Ejido Carolinas) y *GAL* (LBA 24 horas) en larvas de 2do estadio y *GLO* (LBA 36 horas) en larvas de 4to estadio mostraron diferencias significativas en su expresión en relación al control (Fig. 18). En los bioensayos de laboratorio, el aumento en la expresión de PAMs no siempre fue proporcional con la exposición a *Bt* o a plantas de algodón-*Bt*. Nosotros observamos que a menor tiempo de exposición a dieta artificial sin *Bt*, era mayor la expresión de los genes *CEC* y *GAL*, es decir, se observó un efecto de represión, similar a lo reportado por Ericsson y col. (2009) con el también lepidóptero *Trichoplusia ni*. De forma similar, la expresión de *CEC* fue

significativamente mayor en LBA que en LBA_t a 6, 12, 24 y 36 horas de exposición en larvas de 2do estadio, lo que indica que el algodón-*Bt* reprime la expresión de este PAM en larvas de 2do estadio, sin importar cuanto tiempo de exposición tenga. Además, nuestros resultados confirmaron la sobrevivencia de una proporción reducida de población en un campo de cultivo con algodón-*Bt* de Texas, en donde se colectaron larvas del 3er estadio. Al analizar por inmuno-detección la presencia de toxinas Cry en muestras de bellotas y las hojas recién colectadas de la planta de donde se colectaron las larvas, dieron positivo para la presencia de Cry1Ab/1Ac, Cry2A, Cry1F (Tabla X).

En los bioensayos, a excepción de los PAMs, se estimuló la expresión de *LIS* durante un mayor tiempo de exposición, tanto con algodón convencional como en algodón-*Bt*. A este respecto, a pesar de que se ha reportado que larvas de *H. zea* pueden sobrevivir en Cry1Ac que expresan el algodón *Bt*, sin embargo aún no se ha observado la evolución de resistencia en campo a esta toxina como posible teoría en los procesos de desarrollo de resistencia, sólo se ha observado una relación en los alelos de resistencia de *H. armigera* (Downes y col., 2007) y *H. punctigera* (Downes y col., 2007) a Cry2Ab en algodón-*Bt* en Australia. A este respecto, en un estudio realizado por el equipo de Anilkumar y col. (2008) ellos lograron seleccionar en laboratorio una población de *H. zea* que presentó una resistencia de hasta 150 veces más a la toxina Cry1Ac comparado con la dosis que mataba a una población susceptible. Ellos demostraron que esta población resistente era estable y no presentaba alteraciones asociadas al costo fisiológico de resistencia. Posteriormente, el mismo grupo determinó en ensayos de laboratorio si las larvas de población de *H. zea* resistentes a la toxina Cry1Ac tenían mayores tasas de supervivencia si se alimentaban de bellotas de un cultivo de algodón de campo. En dicho evento, la

población resistente a Cry1Ac no pudo completar el desarrollo hasta pupa al alimentarse de bellotas de algodón *Bt*, a pesar de ser resistentes a mayor cantidad de toxina Cry1Ac que la presente en las bellotas. Debido a que la mortalidad observada para *H. zea* resistente a Cry1Ac expuesta al algodón-*Bt* fue mayor de lo esperado, investigaron si la toxina interactuaba con el gossipol u otros compuestos presentes en la planta de algodón, agregándolos en polvo a dieta artificial. Estos bioensayos mostraron que la toxina Cry1Ac más el polvo de algodón no permitieron alcanzar el estado de pupa de la cepa resistente, pero no se observaron diferencias en la susceptibilidad a gossipol entre las cepas. Es decir, las combinaciones de Cry1Ac con gossipol o de algodón en polvo eran sinérgicas contra la cepa resistente, pero no contra la susceptible (Anilkumar y col., 2009). Esto podría explicar el por qué en campo no se han incrementado los alelos de resistencia a Cry1Ac en poblaciones de *H. zea*.

Al contrario de lo observado con algodón, en larvas de *H. zea* alimentadas en campos de maíz-*Bt* se estimuló la expresión de los PAMs. Este efecto se observó principalmente en larvas obtenidas de cultivos de maíz-*Bt* de Sinaloa. Esto muy probablemente se deba a que durante la temporada de cultivo se tuvo una fuerte sequía en esa zona, por lo cual pensamos que el resultado fue acumulativo (evento de *Bt* y estrés por sequía), ambos presentes en los ejidos de Sinaloa que mostraron una mayor expresión de los marcadores de inmunidad evaluados (Figuras 19-21).

Sin embargo, al medir la expresión de los PAMs de *H. zea* de campo y compararlo con bioensayos de laboratorio bajo condiciones controladas de exposición a *Bt* utilizando la técnica de RT-PCR semicuantitativa, observamos diferencias importantes en la expresión de los mismos, en dichos transcritos del mismo campo

aparecen elevados o reprimidos (Figuras 15-21) con excepción a los analizados de larvas del 2do estadio del ejido la Uva, en Sinaloa (Figura 19), en donde prevalecieron condiciones de sequía durante el periodo de muestreo y recolección de muestras y se comprobó que la planta era el evento MON-810 de maíz-*Bt* (Takano, 2013). En este ejido en particular, y en el estado de Sinaloa en general, se tuvieron problemas importantes de sequía, mayores a los presentados en otros estados del país de donde se analizaron muestras. Las diferencias en la expresión de PAMs entre los mismos campos y los bioensayos impiden realizar un acercamiento real del comportamiento de los PAMs y *LIS* y poder así utilizarlo como una herramienta en el combate de la resistencia en insectos plaga. A pesar de ello, logramos ver que existen diferentes variedades de plantas en el territorio nacional y dentro de los mismos estados, lo que genera variación en la expresión de PAMs por *H. zea*. Como se sabe este comportamiento ocurre en el lepidóptero *T. ni* en larvas de 2do, 3ro, 4to y en el estadio de pupa con los PAMs GLO, PGRP C y LIS con previa exposición a *Bt* (Tamez-Guerra y col., 2008).

Las investigaciones realizadas en diferentes estados de México y en Texas, EUA nos han permitido conocer el comportamiento de los PAMs y *LIS* de *H. zea* en campos de maíz en larvas de 2do, 4to y 5to estadio, teniendo mayor expresión de PAMs en larvas de 2do estadio del campo de maíz transgénico de la Uva Sinaloa alimentadas del evento MON810 de maíz-*Bt*. El nivel de expresión alto en los PAMs y *LIS* de larvas de 4to estadio de campos convencionales no concuerda con lo reportado en lepidópteros; sin embargo, indica que la misma variabilidad genética de la planta induce una diferente respuesta de PAMs en estas larvas, donde algunos se sobre-expresan mientras que otros se reprimen. Sólo *PGRP C* y *LIS* se encontraron sobre-expresados en larvas de 5to estadio de un campo de maíz-*Bt* en Sinaloa (Cofradía),

que si bien al evaluar la presencia de toxinas Cry por inmuno-detección con las tirillas dieron negativos, (Tabla X). Además, en larvas de 5to estadio del Ejido Venecia, al igual que en Cofradía, se encontró el máximo nivel de expresión de *LIS*. Cabe señalar que en el Ejido Venecia, Durango, se siembra maíz forrajero, el cual estimula la expresión de este gen de manera similar al maíz transgénico y al sometido al estrés por sequía.

Los demás PAMs sobre-expresados en campos de maíz convencional también de Sinaloa, variedades seleccionadas para resistir condiciones de sequía, indican que la variedad de maíz y/o el estrés por sequía estimulan la expresión de genes de inmunidad, los cuales le permiten sobrevivir y llegar a causar daños significativos en las plantas (Westbrook y López, 2010). A este respecto, en plantas de algodón los resultados de los estudios de dinámica de poblaciones y migración de *H. zea* demostraron que este fenómeno disminuyó debido a la sequía, la expansión de la mancha urbana y la introducción de maíz transgénico *Bt* al estado de Texas. Es decir, se ha relacionado directamente la reducción de poblaciones de *H. zea* por condiciones de sequía y el alimentarse de productos de *Bt* o sus toxinas (Westbrook y López, 2010). En este estudio, nosotros observamos que al presentarse ambas condiciones (sequía y exposición a *Bt*) se observaban diferencias significativas en la expresión de transcritos de PAMs y *LIS*. Esto es de gran importancia para manejar la abundancia, conocer el rango geográfico y el manejo de poblaciones de *H. zea* en relación al cambio potencial el clima, y al uso de variedades transgénicas que son tolerantes a la sequía y las condiciones de alta temperatura (Figuras 19-21).

Al analizar CM y CMt del territorio Mexicano al azar, se encontró una diferencia significativa en la expresión de los PAMs y *LIS* entre campos independientemente

del estado al que pertenezcan. En general, la mayor expresión de PAMs y *LIS* fue en campos de Sinaloa, convencionales o campos *Bt*, además esto concordó con una temporada de sequía. Por otra parte, la variedad que se siembra generalmente es la garañón, pero debido a la sequía se sembró la cobra. Un análisis por PCR punto final, reveló la presencia del consorcio Cry1Ab/Cry1Ac en los ejidos Casa Blanca, La Uva y Cofradía, todos localizados en el estado de Sinaloa (Takano, 2013). En particular, en larvas del 2do estadio colectadas del ejido La Uva se encontró el mayor nivel de expresión en todos los PAMs y *LIS*. Y en larvas de 4to estadio la mayor expresión de la mayoría de los PAMs se encontró en Guasave, Sinaloa y en larvas de 5to estadio fue en Cofradía y Tamazula, Sinaloa (Figuras 19-21).

El uso de plantas de algodón y maíz modificadas genéticamente busca ser la alternativa más efectiva para controlar poblaciones de insectos lepidópteros debido a que el uso de insecticidas químicos es cada vez más agresivo para el ambiente y menos efectivo para las plagas (Larbouga y col., 2013). Es por ello que la detección de genes *Bt* en plantas resulta muy útil para realizar el monitoreo de las poblaciones de insectos. En este trabajo, la detección de proteínas Cry en las plantas colectadas se realizó utilizando una prueba inmuno-enzimática de tirillas reactivas. Sin embargo, la eficacia de esta técnica para rastrear estas proteínas depende de que la cantidad de proteína expresada sea suficiente y que la estructura de la proteína esté íntegra. Esto pudiera afectarse por procesos de almacenaje, preservación y agentes físicos como la temperatura, la cual pueda dañar de manera temporal o permanente la estructura de la proteína e impedir su reconocimiento por el anticuerpo de captura de la prueba. Este mismo efecto pudiera ser causado por un agente químico como el alcohol etílico. En este proyecto, se utilizó alcohol etílico al 70% para preservar las muestras de plantas obtenidas de diferentes regiones de la república y transportarlas hasta el lugar de

trabajo. A pesar de que las muestras fueron sometidas a lavados para eliminar completamente el etanol al 70% no fue posible detectar proteínas Cry en ninguna de estas. Sin embargo, mediante un análisis de biología molecular realizado por Takano (2013), utilizando oligonucleótidos específicos para proteínas Cry se logró determinar la presencia de estas proteínas en campos de maíz de Sinaloa. Además la dificultad para detectar las proteínas Cry en las plantas preservadas en etanol al 70% fue por la poca cantidad de proteína expresada en las hojas analizadas, lo cual hace a la técnica inmuno-detección poco confiable para este fin. Ello hace que la PCR sea el recurso más recomendado en la detección de proteínas debido a que resulta difícil dañar al ADN con un agente químico como el etanol y además es altamente sensible, es decir, su efectividad no se ve afectada por la expresión de la proteína sino, solamente se necesita la presencia del gen para ser positiva. Este problema no ocurrió con tejido fresco de las plantas analizadas justo en el momento en que fueron colectadas, pudiéndose detectar con facilidad y certeza las proteínas presentes.

Debido a nuestros resultados encontrados en nuestra investigación y la asociación de la detección de toxinas y genes *Bt* en plantas resulta muy útil para realizar el monitoreo de las poblaciones de insectos, y poder estipular la fisiología y defensas de las plagas como una alternativa para el control biológico integrado. Dicha alternativa nos proporcionara información para rotar los bioinsecticidas y utilizar a los genes de inmunidad innata como blancos y biomarcadores como una perspectiva de control y prevalencia de la relación a resistencia/tolerancia a cultivos *Bt*.

8. CONCLUSIONES

- Se lograron amplificar genes de inmunidad por RT-PCR en *Helicoverpa zea*, usando secuencias de ARNm reportadas en *Helicoverpa armígera*.
- En bioensayos de laboratorio con larvas en dieta artificial con el algodón-*Bt* se reprime la expresión de *CEC* en 2do y en 4to BACTOSPEINE® reprime *CEC* y *GAL*. A diferencia de la exposición a algodón en campo y el de invernadero. La expresión de *PGRP C* y *LIS* se reprime en 2do al igual que *GAL* en larvas alimentadas con algodón de campo.
- Con mayor tiempo de exposición a algodón (convencional o *Bt*) se estimula la expresión de *LIS* en larvas del 5to estadio. Y a mayor tiempo de exposición de algodón en invernadero (LBA), se estimula la expresión de *GLO* en larvas de 4to estadio comparado con algodón de campo (CA).
- La técnica para la detección cualitativa de proteínas Cry utilizando un kit serológico Agdia®, no es efectiva cuando los tejidos de las plantas son preservados en alcohol, en la detección de proteínas Cry1Ab/1Ac, Cry2A, Cry1F. A diferencia de análisis en tejido fresco.
- El nivel de expresión de PAMs en larvas de *H. zea* fue dependiente de la variedad y condiciones del cultivo del que se alimentó.
- En larvas de *H. zea*, de campos de maíz, la mayor expresión de PAMs y *LIS* se presenta en cultivos sometidos a estrés por sequía y en cultivos transgénicos-*Bt* del estado de Sinaloa.
- El evento MON810 de maíz-*Bt* y el estrés por sequía del cultivo estimulan la expresión de PAMs y *LIS* en larvas de 2do estadio que se alimentaron del mismo, al igual que *PGRP C* y *LIS* en larvas de 5to estadio.

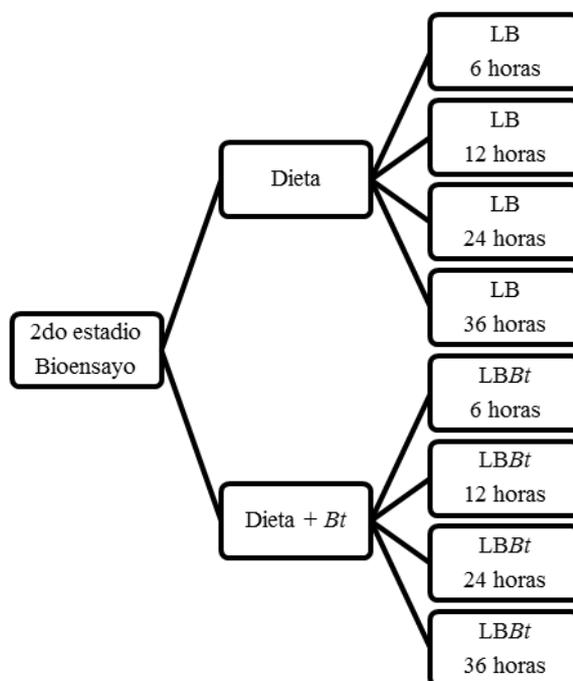
ANEXO 1

Componentes de la dieta artificial

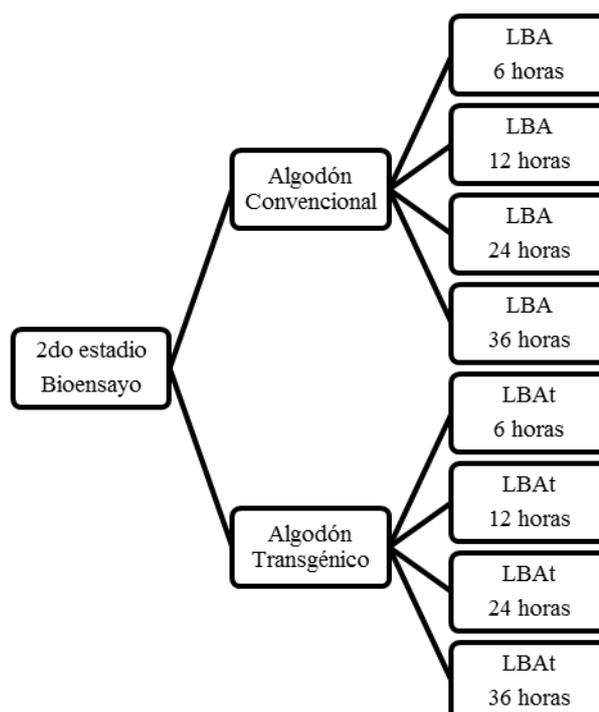
Harina de soya	Pantotenato de calcio
Germen de trigo	Niacin-amina
Sales de Wesson	Riboflavina
Sacarosa	Ácido fólico
Ácido Sórbico	Tiamina
Ácido Metilbenzóico	Piridoxina
Ácido Ascórbico	Biotina
Agar	Vitamina B12

ANEXO 2

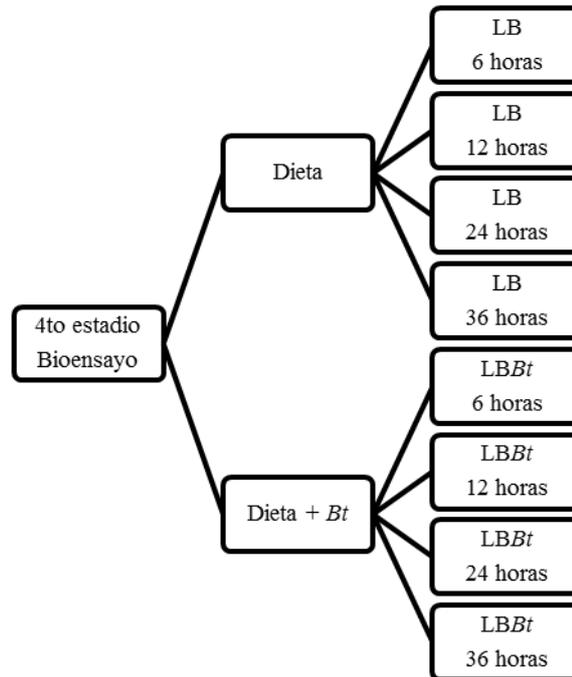
1. Bioensayos: Dieta artificial (LB) 2do estadio/BACTOSPEINE®(LBBt) 2do estadio



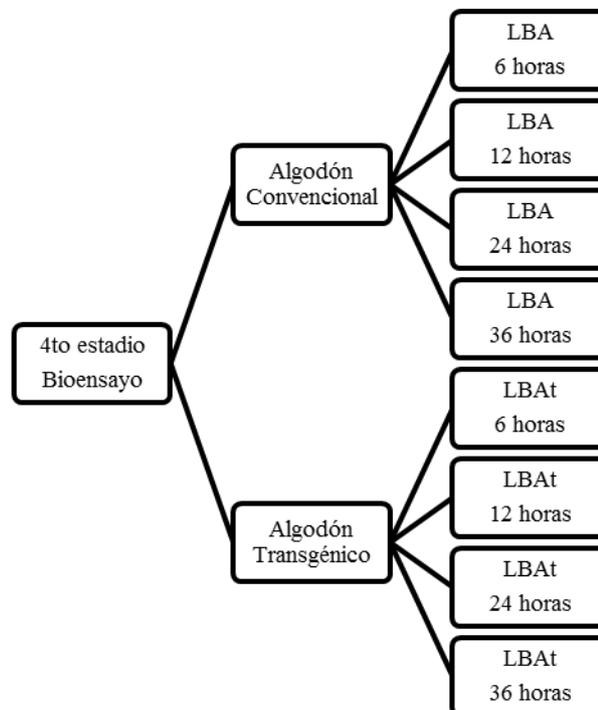
2. Bioensayos: Algodón convencional (LBA) 2do estadio/Algodón transgénico (LBA_t) 2do estadio



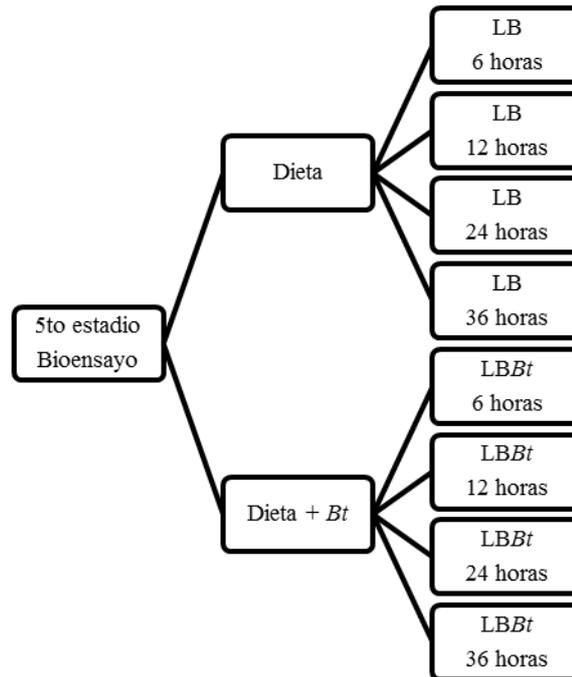
3. Bioensayos: Dieta artificial (LB) 4to estadio/BACTOSPEINE®(LBBt) 4to estadio



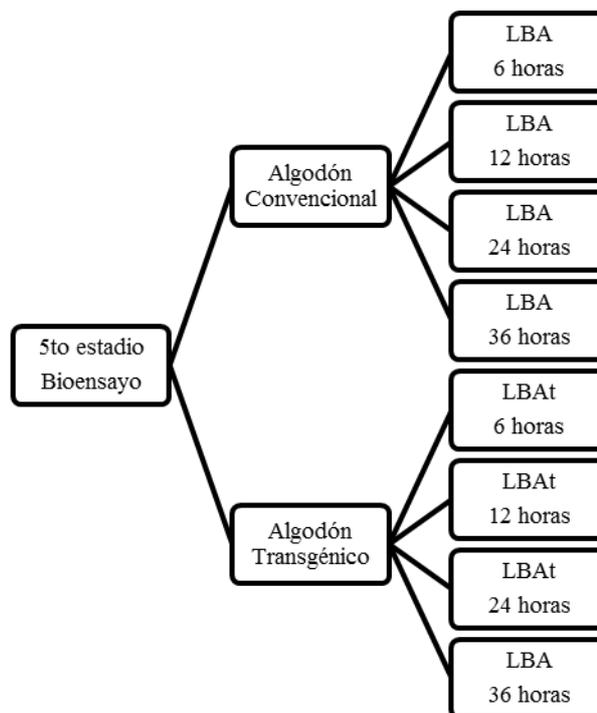
4. Bioensayos: Algodón convencional (LBA) 4to estadio/Algodón transgénico (LBA_t) 4to estadio



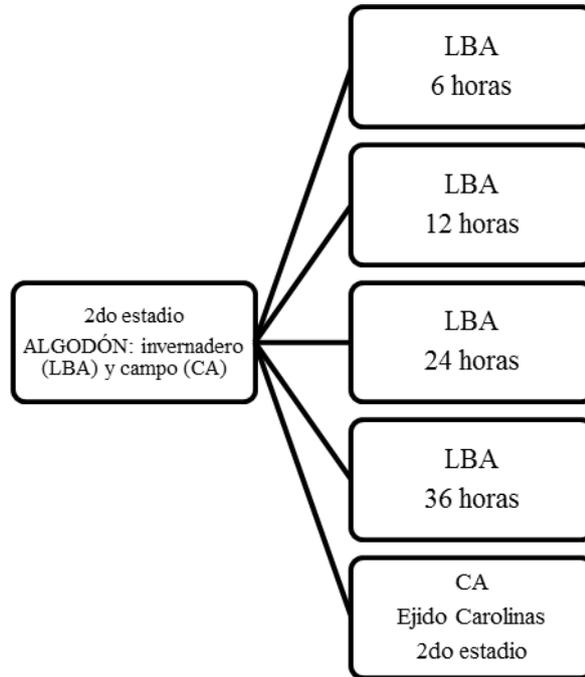
5. Bioensayos: Dieta artificial (LB) 5to estadio/BACTOSPEINE®(LBBt) 5to estadio



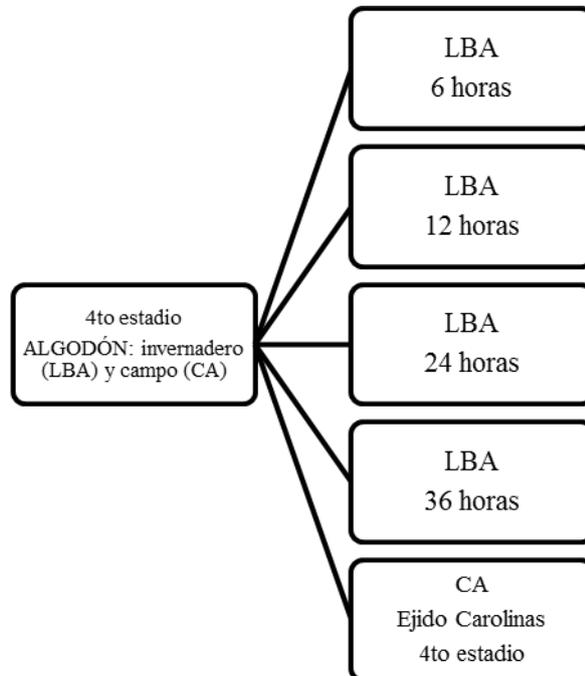
6. Bioensayos: Algodón convencional (LBA) 5to estadio/Algodón transgénico (LBA_t) 5to estadio



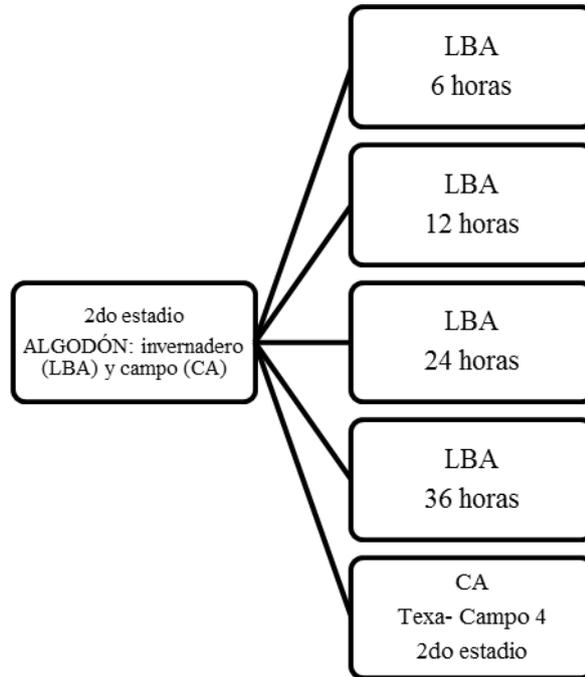
7. Algodón convencional (LBA) 2do estadio/Ejido Carolinas (CA) 2do estadio



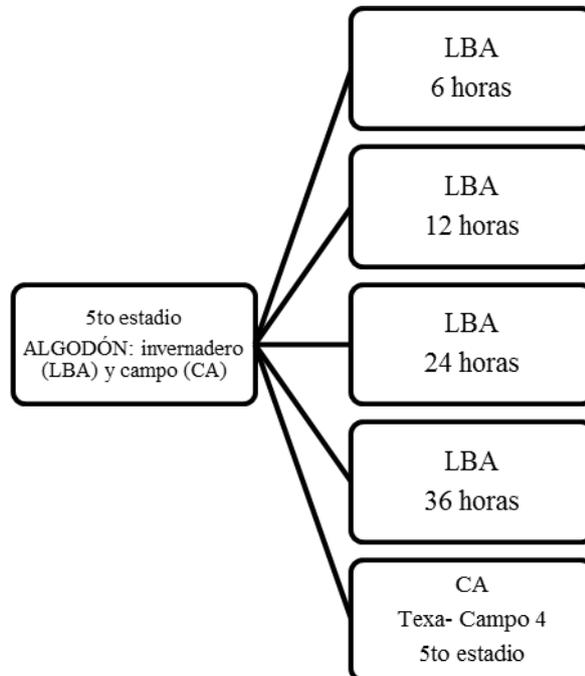
8. Algodón convencional (LBA) 4to estadio/Ejido Carolinas (CA) 4to estadio



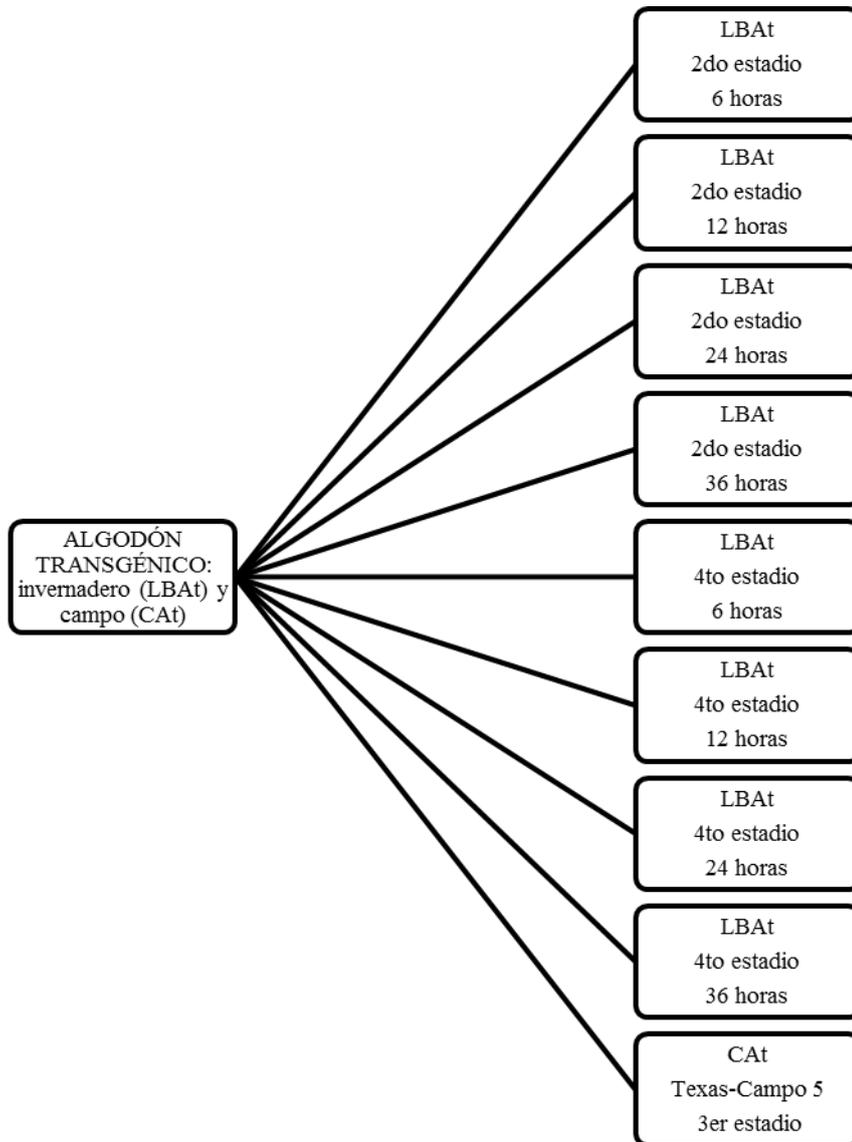
9. Algodón convencional (LBA) 2do estadio/Texas-Campo 4 (CA) 2do estadio



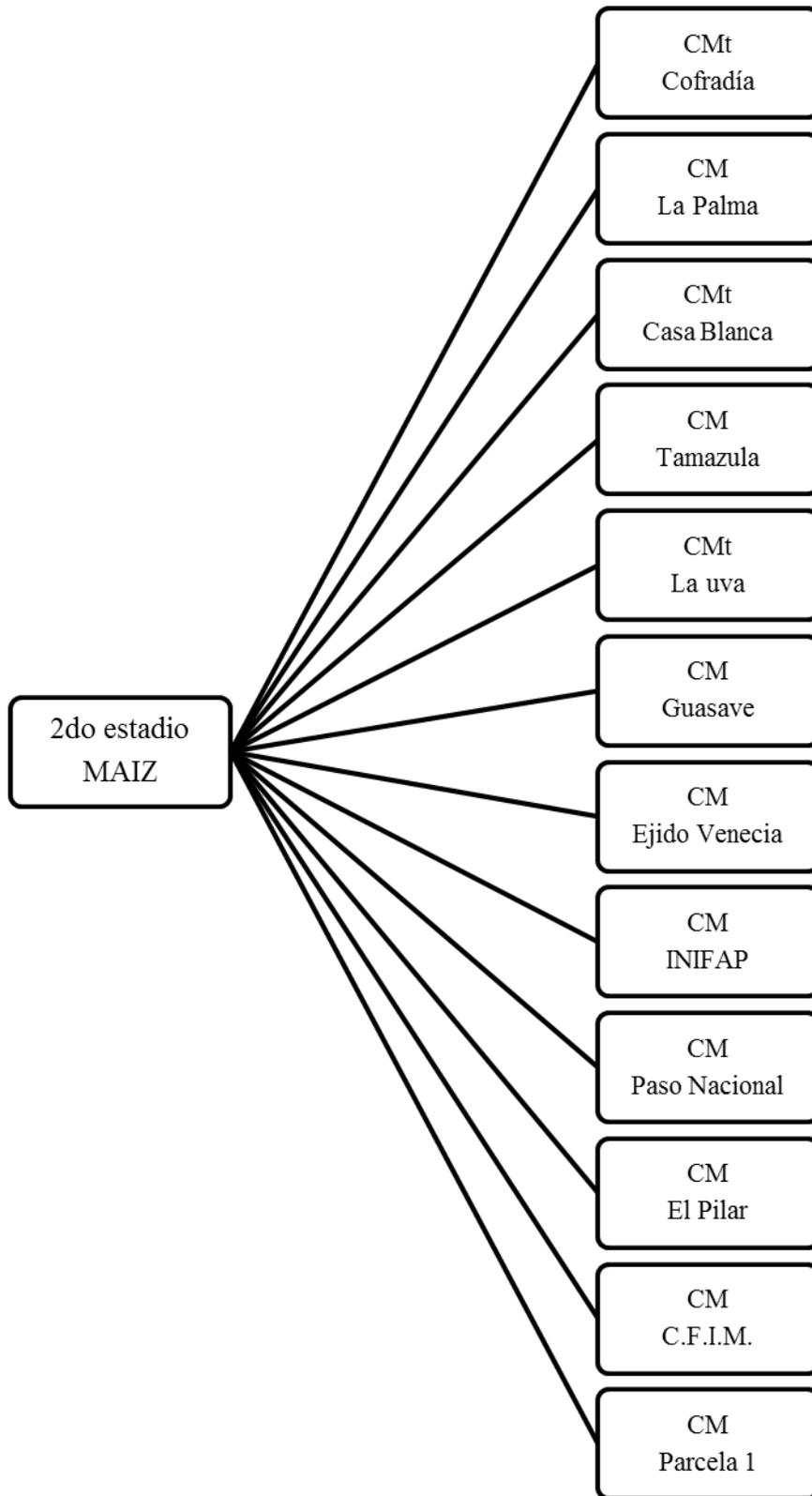
10. Algodón convencional (LBA) 5to estadio/Texas-Campo 4 (CA) 5to estadio



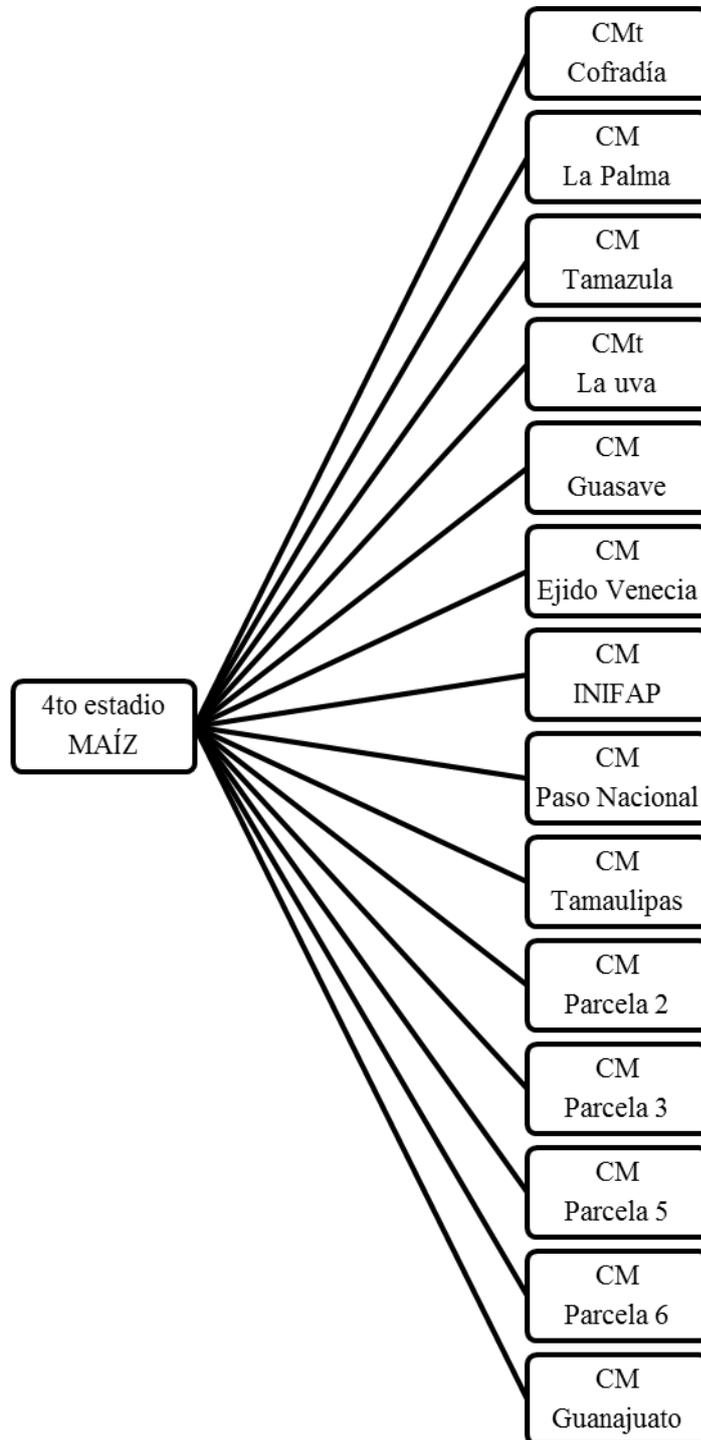
11. Algodón Transgénico (LBAAt) 2do y 4to estadio/Texas-Campo 5 (CA) 3er estadio



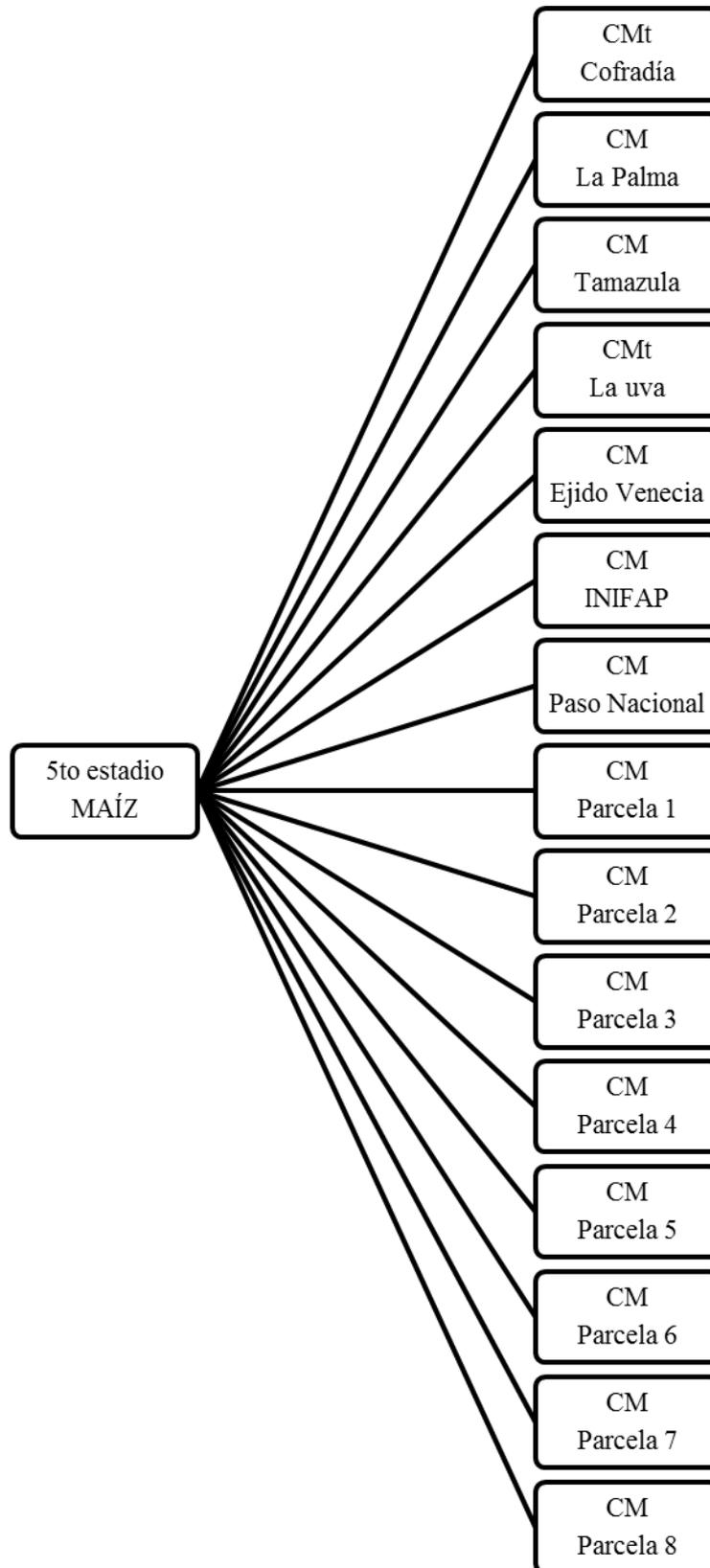
12. Campos de maíz (CM) 2do estadio/Campos de maíz transgénico (CMt) 2do estadio



13. Campos de maíz (CM) 4to estadio/Campos de maíz transgénico (CMt) 4to estadio



14. Campos de maíz (CM) 5to estadio/Campos de maíz transgénico (CMt) 5to estadio



LITERATURA CITADA

- Anilkumar, K. J., Pusztai-Carey, M., and Moar, W. J. 2008. Fitness costs associated with Cry1Ac-resistant *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae): a factor countering selection for resistance to *Bt* cotton? *Journal of Economic Entomology*. 101 (4): 1421-1431.
- Anilkumar, K., Sivasupramaniam, S., Head, G. Orth, R., Van Santen, E., and Moar, W. 2009. Synergistic interactions between Cry1Ac and natural cotton defenses limit survival of Cry1Ac-resistant *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) *Bt* cotton. *Journal of Chemical Ecology*. 35 (7): 785-795.
- Armstrong, C.L., and Stone, T. 1995. Field evaluation of European corn borer control in progeny of 173 transgenic corn events expressing an insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. *Crop Science*. 35: 550-557.
- Bartels, D. W., Hutchison, W. D. 1995. On-farm efficacy of aerially applied *Bacillus thuringiensis* for European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) and corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae) control in sweet corn. *Journal of Economic Entomology*. 88 (2): 380-386.
- Behere, G.T., Tay, W.T., Russell, D. A., Heckel, D.G., Applenton, B.R., Kranthi, K.R., and Batterham, P. 2007. Mitochondrial DNA analysis of field populations of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and of its relationship to *H. zea*. *BMC Evolution Biology*. 7:117.
- Beckage, N. E., 2008. *Insect immunology*. 1 ed. San Diego, CA: Elsevier.
- Blanco, C.A., Terán-Vargas, A.P., López, Jr. J.D., Kauffman, J.V., Wei, X. 2007. Densities of *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in three plant hosts. *Florida Entomologist*. 90(4): 742-750.
- Bourgou, L., Sanfo, D., Tiemtore C. B., Traore, O., Sanou, J., and Traore, K. 2013. Assessment of Bollgard II cotton pollen mediated transgenes flow to conventional cotton in the farming conditions of Burkina Faso. *African Journal of Biotechnology*, 12(33): 5192-5199.
- Broderick, N. A., Raffa, K. F., & Handelsman, J. (2006). Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(41), 15196-15199.
- Broderick, N. A., Raffa, K. F., & Handelsman, J. (2010). Chemical modulators of the innate immune response alter gypsy moth larval susceptibility to *Bacillus thuringiensis*. *BMC microbiology*, 10(1), 129.
- Caccia, S., Hernández-Rodríguez, C.S., Mahon, R.J., Downes, S., James, W., y col. 2010. Binding site alteration is responsible for field-isolated resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry2A insecticidal proteins in two *Helicoverpa* species. *PLoS ONE* 5(4): e9975. doi:10.1371/journal.pone.0009975
- Campbell, P. M. 2008. Diversity of aminopeptidases, derived from four lepidopteran gene duplications, and polycalins expressed in the midgut of *Helicoverpa armigera*: Identification of proteins binding the δ -endotoxin, Cry1Ac of *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38(7): 685-696.
- Chambers, M. C., Schneider, D S. 2012. Pioneering immunology: insect style. *Current Opinion in Immunology*. 24: 10-14.
- Chattopadhyay, A., Bhatnagar, N.B., and Bhatnagar, R. 2004. Bacterial insecticidal toxins. *Critical Review of Microbiology*. 30(1): 33-54.

- Cory, J. S., y Hoover, K. (2006). Plant-mediated effects in insect–pathogen interactions. *Trends in ecology y evolution*, 21(5), 278-286.
- Downes, S., Mahon, R., and Olsen, K. (2007). Monitoring and adaptive resistance management in Australia for *Bt*-cotton: current status and future challenges. *J. Invertebr. Pathol.* 95: 208–213.
- Downes, S., Mahon, R. J., Rossiter, L., Kauter, G., Leven, T., Fitt, G., and Baker, G. 2010a. Adaptive management of pest resistance by *Helicoverpa* species (Noctuidae) in Australia to the Cry2Ab *Bt* toxin in Bollgard II® cotton. *Evolutionary Applications*. 3 (5-6): 574-584.
- Downes, S., Parker, T., and Mahon, R. 2010b. Incipient resistance of *Helicoverpa punctigera* to the Cry2Ab *Bt* toxin in Bollgard II® Cotton. *PLoS ONE* 5(9): e12567. doi:10.1371/journal.pone.0012567
- Ericsson, J.D., Janmaat, A.F., Lowenberger, C., and Myers J.H. 2009. Is decreased generalized immunity a cost of *Bt* resistance in cabbage loopers *Trichoplusia ni*? *Journal of Invertebrate Pathology*. 100: 61-67.
- Fescemyer, H. W., Sandoya, G. V., Gill, T. A., Ozkan, S., Marden, J. H., y Luthe, D. S. 2013. Maize toxin degrades peritrophic matrix proteins and stimulates compensatory transcriptome responses in fall armyworm midgut. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 43(3): 280-291.
- Forcada, C., and Martínez, R. 1999. Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry 1Ac in three strains of *Heliothis virescens*: Protoytic and SEM study of the larval midgut. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 31: 257-272.
- Gao, Y.L., An, J.J., Liu, C.X., and Wu, K.M. 2010. Monitoring of *Bt* resistance from field-collected *Helicoverpa armigera* population in Northern China. *Southwestern Entomology*. 35: 75-81.
- Gill, S. S., Cowles, E. A., and Pietrantonio, P. V. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annual Review of Entomology*. 37: 615 -634.
- Head, G., Jackson, R. E., Adamczyk, J., Bradley, J. R., Van Duyn, J., Gore, J., Hardee, D.D., Leonard, B.R., Luttrell, R., Ruberson, J., Mullins, J.W., Orth, R.G., Sivasupramaniam, S., and Voth, R. 2010. Spatial and temporal variability in host use by *Helicoverpa zea* as measured by analyses of stable carbon isotope ratios and gossypol residues. *Journal of Applied Ecology*. 47 (3): 583-592.
- Heckel, D.G., Gahan, L.J., Baxter, S.W., Zhao, J.Z., and Shelton, A.M. 2007. The diversity of *Bt* resistance genes in species of Lepidoptera. *Journal of Invertebrate Pathology*. 95: 192–197.
- Hernández-Rodríguez, C.S., and Ferré, J. 2005. Common Receptor for *Bacillus thuringiensis* Toxins Cry1Ac, Cry1Fa, and Cry1Ja in *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa zea*, and *Spodoptera exigua*. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(9): 5627–5629.
- Hoffmann, J. A. (2003). The immune response of *Drosophila*. *Nature*. 426(6962): 33-38.
- Hernandez-Rodriguez, C.S., Van Vliet, A., Bautsoens, N., Van Rie, J., Ferré, J. 2008. Specific binding of *Bacillus thuringiensis* Cry2A insecticidal proteins to a common site in the midgut of *Helicoverpa* Species. *Applied and Environmental Microbiology*. 74: 7654-7659.
- Hopkins, B.W., Longnecker, M.T., and Pietrantonio, P.V. 2011. Transcriptional overexpression of *CYP6B8/CYP6B28* and *CYP6B9* is a mechanism associated with cypermethrin survivorship in field-collected *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) moths. *Pest Management Science*. 67: 21–25.
- Hopkins, B.W., and Pietrantonio, P. V. 2010. Differential efficacy of three commonly used pyrethroids against laboratory and field-collected larvae and adults of

- Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) and significance for pyrethroid resistance management. *Pest Management Science*. 66: 147–154.
- James, R.R., and Xu, J. 2012. Mechanisms by which pesticides affect insect immunity. *Journal of Invertebrate Pathology*. 109: 175-182.
- Lamberty, M., Ades, S., Uttenweiler-Joseph, S., Brookhart, G., Bushey, D., Hoffmann, J.A., and Bulet, P. 1999. Isolation from the lepidopteran *Heliothis virescens* of a novel insect defensin with potent antifungal activity. *The Journal of Biological Chemistry*. 274 (14): 9320-9326.
- Lee, M.K. 1995. Resistance to *Bacillus thuringiensis* CryIA delta-endotoxins in a laboratory-selected *Heliothis virescens* strain is related to receptor alteration. *Applied and Environmental Microbiology*. 61(11): 3836-3842.
- Ma, G., Roberts, H., Sarjan, M., Featherstone, N., Lahnstein, J., Akhurst, R., and Schmidt, O. (2005). Is the mature endotoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* inactivated by a coagulation reaction in the gut lumen of resistant *Helicoverpa armigera* larvae?. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35(7), 729-739.
- Martinez-Valenzuela, M., Tamez-Guerra, P., Valadez-Lira, J.A., Damas G., and Gomez-Flores, R. 2013. *Helicoverpa zea* galiomicin (GALI) partial CDS, Accession: KF169742. *Helicoverpa zea* gloverin (GLO) partial CDS, Accession: KF527285. *Helicoverpa zea* peptidoglycan recognition protein PGRP C, Accession: KF282764.
- McDougall, P. 2009. Facts and figures: The status of global agriculture. CropLife International. <http://www.croplife.org/library/attachments/eab5d7c1-5b80-492b-b52b-d3de8819eb77/2/Facts%20And%20Figures%202009.pdf>
- Mehlo, L., Gahakwa, D., Nghia, P.T., Loc, N.T., Capell, T., Gatehouse, J.A., Gatehouse, A.M.R., and Christou, P., 2005. An alternative strategy for sustainable pest resistance in genetically enhanced crops. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 102: 7812–7816.
- Moar, W., T. Dennehy, K. Anilkumar and G. Head. 2010. Bt resistance in *Helicoverpa zea* (Boddie): from biology to monitoring. *Southwestern Entomologist*. 35 (3): 395-398.
- Moar, W., Roush, R., Shelton, A., Ferre, J., MacIntosh, S. Leonard, B. R., and Abel, C. 2008. Field-evolved resistance to *Bt* toxins. *Nature Biotechnology*. 26 (10): 1072-1074.
- Molina, O.J., Hutchison, W.D., and Blanco, C.A. 2010. Estado actual de *Helicoverpa zea* y *Heliothis virescens* dentro de un panorama cambiante en el sur de los Estados Unidos de Norteamérica y México. *Southwestern Entomologist*. 35 35(3): 347-354.
- Naseri, B., & Namin, F. R. 2012. Lysozyme activity and some fitness parameters of *Helicoverpa armigera* on five maize hybrids. *Journal of Crop Protection*. 1: 17-25.
- Oppert, B., and McGaughey, W. 1994. Altered protoxin activation by midgut enzymes from *Bacillus thuringiensis* resistant strain of *Plodia interpunctella*. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 198: 940-947.
- Pietrantonio, P.V., Junek, T.A., Parker, R., Mott, D., Siders, K., Troxclair, N., Vargas-Camplis, J., Westbrook, J.K., and Vassiliou, V.A. 2007. Detection and evolution of resistance to the pyrethroid cypermethrin in *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Texas. *Environmental Entomology*. 36 (15): 1174-1188.
- Sayed, A., and Wright, D.J. 2000. Genetic and biochemical approach for characterization of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin CryIAC in a field population of the diamondback moth. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 1509-1516.

- Sanahuja, G., Banakar, R., Twyman, R.M., Capell, T., and Christou, P. 2011. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnology Journal*. 9(3): 283-300.
- Sanchis, V. 2010. From microbial sprays to insect-resistant transgenic plants: history of the biopesticide *Bacillus thuringiensis*. A review. *Agronomy for sustainable development*.
- Sauka, D.H., and Benintende, G.B. 2008. *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Revista Argentina de Microbiología*. 40: 124-140.
- Senasica. (Abril de 2012). Maíz transgénico en México. *El surco*, págs. 1-3.
- Schnepf, E., Crickmore, N., van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R., and Dean, D.H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Review*. 62(3): 775-806.
- Soberon, M., and Bravo, A. 2007. Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación. *Biotecnología* 303-314.
- Stone, T.B., and Sims, S.R. 1993. Geographic susceptibility of *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) to *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Economic Entomology*. 86: 989-994.
- Tabashnik, B.E., and Carrière, Y. 2010. Field-evolved resistance to *Bt*: cotton bollworm in the U.S. and pink bollworm in India. *Southwestern Entomologist*. 35 (3), 417-424.
- Tabashnik, B.E., Van Rensburg, J.B.J., and Carriere, Y. 2009. Field-evolved insect resistance to *Bt* crops: definition, theory, and data. *Journal of Economic Entomology*. 102: 2011-2025.
- Takano, A.M. 2013. Detección de transgenes en plantas de maíz (*Zea mays* L.) y algodón (*Gossypium hirsutum* L.) cultivadas en México empleando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Tesis de licenciatura. FCB-UANL.
- Tamez-Guerra, P. 2010. A review of U.S. and Mexican cooperation to develop insect resistance management and monitoring methods for surveying transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* proteins: 2003 to 2010. *Southwestern Entomologist*. 35 (3): 373-382.
- Tamez-Guerra, P, and Behle, R.W. 2011. Biotechnology and derived products. *In: Biological Control of Insect Pests*. N. M. Rosas-Garcia (Ed.). Stadium Press LLC USA. <http://www.vedamsbooks.com/no103115/biological-control-insect-pests-ninfa-m-rosasgarcia> ISBN: 1-933699-27-2. pp 165-231.
- Tamez-Guerra, P., Damas, G., Iracheta, M.M., Oppert, B., Gomez-Flores, R., and Rodríguez-Padilla, C. 2006. Differences in susceptibility and physiological fitness of Mexican field *Trichoplusia ni* strains exposed to *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Economic Entomology*. 99(3): 937-945
- Tamez-Guerra, P., Valadez-Lira, J.A., Alcocer-González, J.M., Oppert, B., Gomez-Flores, R., Tamez-Guerra, R.S., and Rodríguez-Padilla, C. 2008. Detection of genes encoding antimicrobial peptides in Mexican strains of *Trichoplusia ni* (Hübner) exposed to *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 98: 218-227.
- Vachon, V., Laprade, R., and Schwartz, J. L. 2012. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: A critical review. *Journal of Invertebrate Pathology*. 111(1): 1-12.
- Van Rie, J., Mcgaughey, W.H., Johnson, D.E., Barnett, B.D., and Van-Mellaert, H. 1990. Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science*. 247: 72-74.
- Vargas-Albores, F., and Ortega-Rubio, A. 1994. El sistema inmune humoral de los insectos. *Tópicos de investigación y Posgrado*. IV(1): 21-28.

- Vilmos, P., and Kurucz, E. 1998. Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunology Letters*. 62(2): 59-66.
- Wang, Q., Liu, Y., He, H.-J., Zhao, X.-F., and Wang, J.-X. 2010. Immune responses of *Helicoverpa armigera* to different kinds of pathogens. *BMC Immunology*. 11: 9.
- Whalon, M. E., & Wingerd, B. A. (2003). Bt: mode of action and use. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 54(4), 200-211.
- Westbrook, J.K. and López, J.D. 2010. Long-distance migration in *Helicoverpa zea*: what we know and need to know. *Southwestern Entomologist*. 35 (3), 355-360.