

SUSCEPTIBILIDAD DE *Heliothis virescens* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) A LA PROTEÍNA Cry1Ac INCORPORADA A DIETAS MERÍDICAS

SUSCEPTIBILITY OF *Heliothis virescens* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) TO Cry1Ac PROTEIN INCORPORATED TO MERIDIC DIETS

Laura Romero¹, Helber Arévalo², William Duarte³, Rodolfo Mejía⁴

¹ I.A. Ingeniería Agronómica, U.D.C.A, lauraromeror@hotmail.com; ² I.A., c.M.Sc. Docente-investigador, Programa Ingeniería Agronómica, U.D.C.A, Calle 222 No. 55-37, Bogotá, D.C., harevalo@udca.edu.co; ³ I.A., M.Sc. Docente-investigador, Facultad Ingeniería Agronómica U.D.C.A, wduarte@udca.edu.co; ⁴ I.A., M.Sc. Docente-investigador, Facultad Ingeniería Agronómica U.D.C.A, rmejia@udca.edu.co

Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 15(2): 381 - 389, 2012

RESUMEN

Como alternativa de manejo a diversas plagas, se desarrollaron plantas modificadas que expresan proteínas letales contra insectos, a las cuales, pueden desarrollar resistencia las plagas, por la constante exposición a la proteína. Con el fin de monitorear los cambios en la susceptibilidad a la proteína Cry1Ac y determinar el efecto que ejerce la composición de la dieta meridica sobre la susceptibilidad de *Heliothis virescens*, se adelantaron bioensayos en el laboratorio de Biotecnología Agrícola de la U.D.C.A, con poblaciones colectadas en *Desmodium* sp., en el municipio El Espinal, Tolima. A las dietas ICRISAT, Greene y Shorey & Hale, se les incorporaron concentraciones seriadas de Cry1Ac, que oscilaban entre 0,01 y 100 ppm. Los bioensayos contaban con seis tratamientos, seis repeticiones y cada unidad experimental estaba representada por un vaso plástico con dieta, donde se colocaron una o cinco larvas neonatas. Con la mortalidad evaluada a los siete días, se determinó la concentración letal (CL₅₀). Se comprobó que la composición de la dieta influye en la respuesta de susceptibilidad. La CL₅₀ obtenida para *H. virescens*, en el 2011 (0,956ppm), indica que esta plaga perdió susceptibilidad a la Cry1Ac, expresada por el Bollgard®; sin embargo, esta variedad de algodónero todavía ejerce control sobre *H. virescens*. También se observó que la mortalidad obtenida con cinco larvas por unidad experimental estaba influenciada por el canibalismo y no por el consumo de Cry1Ac, sugiriendo que para los próximos ensayos se utilice, para eliminar el efecto que tiene el canibalismo sobre la mortalidad, solamente una larva por recipiente.

Palabras clave: Bellotero del algodónero, *Bacillus thuringiensis*, tolerancia, bioensayos.

SUMMARY

As an alternative for pest management, plants were developed to express lethal proteins against target insects, which may develop resistance due to their constant exposure to these proteins. To monitor changes in susceptibility to Cry1Ac protein and determine the effect exerted by the diet composition on the susceptibility of *Heliothis virescens*, bioassays were carried out in the U.D.C.A's laboratory of Agricultural Biotechnology with populations collected on *Desmodium* sp., at Espinal, Tolima. The diets employed were ICRISAT, Greene and Shorey & Hale, incorporating serial concentrations of Cry1Ac, ranging from 0.01 to 100 ppm. Bioassays consisted of six treatments and six replicates; each experimental unit was represented by a plastic cup with diet, in which one or five neonate larvae were placed. With the mortality assessed at day seven the lethal concentration (LC₅₀) was calculated. The diet composition influenced the susceptibility response. The LC₅₀ obtained for *Heliothis* in 2011 (0.956 ppm) indicates that this insect lost susceptibility to Cry1Ac expressed by Bollgard®; however, this plant variety still has control over the species. Results also showed that the mortality obtained with five larvae per experimental unit was influenced by cannibalism and not by the consumption of Cry1Ac, indicating that only one larva per container should be used to eliminate the effect of cannibalism on mortality.

Key words: Tobacco budworm, *Bacillus thuringiensis*, tolerance, bioassays.

INTRODUCCIÓN

Heliothis virescens (F.) (Lepidoptera: Noctuidae), conocido comúnmente como el bellotero del algodón, es una especie polífaga que, además del algodón, puede atacar cultivos de tabaco, de soya, de tomate y de girasol (Capinera, 2004), entre otros. En el algodón, la hembra deposita los huevos de forma individual en las hojas y yemas terminales; esta actividad, se lleva a cabo tan pronto se empiezan a formar las estructuras reproductivas de la planta (García, 1976; Hallman, 1978). El daño es producido por las larvas, especialmente, a partir del tercer instar (Bonacic *et al.* 2010), las cuales, atacan el tejido foliar inicialmente y, luego, descienden en búsqueda de órganos fructíferos y, al llegar a los botones florales, los perfora y le consume parcial o totalmente. Las estructuras afectadas abren sus brácteas y caen al suelo; si el insecto ataca las cápsulas, éstas no se desprenden, pero sufren pudriciones y son improductivas (Alcaraz, 1962; García, 1976). Este tipo de ataque genera reducciones en la calidad y en el rendimiento del algodón, por la pérdida de estructuras reproductivas o el manchado de la fibra.

Como alternativa de manejo de este y otros insectos plaga, en 1987, se desarrolló la primera planta modificada genéticamente, donde por medio de ingeniería genética, se le confirió resistencia a determinados insectos (Agro-Bio, 2012). En 1996, se dieron las primeras siembras comerciales de algodón Bt en Australia y en Estados Unidos (Perlak *et al.* 2001). En Colombia, las primeras siembras comerciales de una variedad de algodón Bt, se hicieron en el 2003, con la variedad Bollgard®, la cual, presenta resistencia a plagas, como *H. virescens*, *Helicoverpa zea*, *Trichoplusia ni*, entre otros (Cerón, 2004).

Zenner de Polanía & Borrero (1992) demostraron que en Colombia *H. virescens* había adquirido resistencia a diversos ingredientes activos de insecticidas, por la presión de selección ejercida por su constante uso, fenómeno que también se puede presentar con los insectos expuestos a variedades de algodón Bt, pues la constante exposición a una molécula puede generar cambios en la frecuencia de alelos susceptibles (Tabashnik *et al.* 2009), dando como respuesta una pérdida progresiva de susceptibilidad. Adicional a lo anterior, se ha reportado que algunas especies de lepidópteros han expresado resistencia a las toxinas del *B. thuringiensis*, cuando la toxina de esta bacteria ha sido aplicada como un bioplaguicida; tal es el caso de *Plutella xylostela* (Shelton *et al.* 1993) y *Trichoplusia ni* (Janmaat & Myers, 2003).

De otra parte, existen factores que influyen en el desarrollo de resistencia, ya que reducen la expresión de las proteínas dentro de la planta; dentro de esos factores, se encuentran las altas temperaturas (Chen *et al.* 2005), el anegamiento (Dong & Li, 2007), la etapa de desarrollo de la planta (Akhurst *et al.* 2003; Blanco *et al.* 2008), la baja cantidad de nitrógeno disponible para la planta (Bruns & Abel, 2003), el déficit de agua (Dong & Li, 2007), entre otros. A nivel de laboratorio también existen otros factores, como temperatura y humedad relativa (Álvarez *et al.* 1991), el tiempo de exposición de los individuos a la proteína (Blanco *et al.* 2005), la composición del alimento suministrado a los insectos (Blanco *et al.* 2009), entre los principales, que pueden afectar negativamente los resultados, alterando la interpretación de pérdida o ganancia de susceptibilidad.

Por esta razón, esta investigación evaluó, bajo condiciones de laboratorio, el efecto que tiene la composición de las dietas merídicas sobre la susceptibilidad de *Heliothis virescens*, procedente de plantas de *Desmodium* sp. de la zona de El Espinal (Tolima, Colombia), a la proteína Cry1Ac del *B. thuringiensis* y de paso monitorear los cambios en la susceptibilidad que haya experimentado *H. virescens*, como consecuencia del establecimiento de algodón genéticamente modificado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Larvas de *H. virescens* fueron colectadas en plantas de *Desmodium* sp., en el municipio de El Espinal (Tolima), situado a 4° 09' N y 74° 53' W, a 431 msnm, de bordes de lotes sembrados con algodón transgénico y convencional, para luego ser criadas en dieta ICRISAT (Tabla 1). Los ensayos, se llevaron a cabo en el laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A, situado a 2600 msnm, con condiciones de temperatura, humedad y fotoperiodo controladas temperatura 25±5°C, humedad relativa de 70±10% y un fotoperiodo de 0:24.

Cuando las larvas colectadas en campo se transformaron en pupas fueron puestas en un recipiente de plástico de 50 mL de capacidad, con tapa de cierre a presión (Envapac Ltda., Bogotá). Cuando los adultos emergían eran separados por sexos y ubicados por parejas en una cámara de apareamiento y oviposición, con el fin de garantizar la postura de huevos fecundados. Las cámaras de apareamiento y de oviposición consistían en frascos de vidrio, con capacidad de 3,5L. Estos frascos estaban cubiertos con tul de color blanco y con tiras de papel crepé, que colgaban del borde del frasco, para observar con mayor facilidad las posturas. Los adultos fueron alimentados diariamente con una mota de algodón saturada con una solución acuosa con el 10%, de azúcar y el 5%, de miel.

Tabla 1. Composición de las dietas merídicas para la evaluación de la mortalidad de *H. virescens*.

INGREDIENTES	ICRISAT Diet No. 3	Shorey & Hale (1965) (modificada)	Greene <i>et al.</i> (1976) (modificada)
Agua	212mL	325mL	402mL
Frijol blanco			29,2g
Frijol calima		100g	
Harina de garbanzo	75g		
Harina de soja			11,75g
Germen de trigo			23,5g
Levadura de cerveza	12g	15g	14,75g
Leche en polvo			8,9g
Metil paraben (Nipagina)	1,25g	1g	1,07g
Ácido ascórbico	1,17g	1,5g	1,4g
Ácido sórbico	0,75g	0,5g	0,7g
Tableta multivitamínica	1 tableta	1 tableta	2 tabletas
Ambramicina	0,04g		
Tetraciclina			0,025g
Formaldehído (38%)		1ml	1,4ml
Agar	4,37g	6g	5,45g

Para los bioensayos, se tomaron las posturas de la segunda generación de laboratorio (F_2). A las dietas, se le incorporaron concentraciones logarítmicas del Cry1Ac del gene del Bt, obtenida del insecticida MVP II® (Cry1Ac encapsulado, por *Pseudomonas* sp., proporcionado por Dow AgroSciences). Las dietas merídicas a utilizar fueron: ICRISAT diet 3 a base de harina garbanzo, preparada de acuerdo a la fórmula proporcionada por el doctor H. Sharma, del Instituto Internacional de Investigación en Cultivos para las Zonas Tropicales Semiáridas (ICRISAT) Patancheru, Andhra Pradesh, India (Arévalo & Zenner, 2009); Shorey & Hale (1965), hecha a base de harina de frijol, modificada por Bowling (1967) y preparada según Villacorta & Cobo (1978) y la dieta Greene *et al.* (1976), a base de harina de soja y de frijol blanco, modificada por Parra (2001) (García *et al.* 2006). La composición de estas dietas aparece descrita en la tabla 1. Las dosis evaluadas oscilaron entre 0,01 y 100 μ g de proteína / mL de dieta.

Para el primer semestre de 2010, se montó un bioensayo con cinco tratamientos, un testigo absoluto y seis repeticiones, donde cada unidad experimental estaba representada por un vaso plástico de 50mL, con tapa inyectada (Envapac Ltda., Bogotá), el cual, contenía aproximadamente 4g de la dieta correspondiente y, en el cual, se colocaron cinco larvas neonatas. Para el segundo semestre de 2010, el bioensayo

montado también contaba con cinco tratamientos, un testigo absoluto y treinta repeticiones, en el que cada unidad experimental consistía en un recipiente semejante al usado en el primer bioensayo, pero en donde solamente fue puesta una larva neonata. Para el 2011, se llevó a cabo un bioensayo, donde se determinó la susceptibilidad de larvas del bellotero, comparando el uso de una o de cinco larvas por unidad experimental, utilizando la dieta ICRISAT, seis tratamientos y 30 repeticiones para los ensayos de cinco y una larva por unidad experimental, respectivamente.

La mortalidad en todos los bioensayos, se evaluó a los siete días, tal como sugiere Martínez (2004). Los datos, se sometieron a análisis Probit (SAS Institute Inc. versión 9.2 (32) Español), para determinar la concentración letal media (CL_{50}). Además, de forma individual, se continuó la cría de las larvas sobrevivientes en cada uno de los tratamientos y repeticiones de los bioensayos del 2010, con el fin de obtener datos de peso de pupas, cuando este estado era alcanzado por las larvas de cada tratamiento. También se determinó la duración de estados. Se realizó un análisis de varianza con el complemento de Excel (MegaStat), para determinar si existían diferencias para la mortalidad entre las tres dietas con cada concentración de proteína y, posteriormente, una prueba de diferencias mínima significativa de Fisher (LSD).

Para confrontar los resultados obtenidos por el grupo de Fitosanidad de la U.D.C.A con poblaciones provenientes del mismo lugar en años anteriores, se procedió a correr los datos con el mismo código Probit (Yu, 2008), al que fueron sometidos los datos obtenidos en este experimento, con el fin de observar los cambios en la susceptibilidad de esta plaga a la proteína Cry1Ac, a través del tiempo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Influencia de la dieta: Blanco *et al.* (2009) mencionan que la composición de la dieta influye en la susceptibilidad de una colonia, lo que se puede corroborar al observar la tabla 2, en la que se encuentran las concentraciones letales medias, en cada una de las dietas; la Shorey & Hale es aquella que menor concentración necesita para causar mortalidad del 50% de la población. Para el caso del bioensayo del semestre A, la dieta que mayor concentración requirió para obtener la CL₅₀ fue la Greene (5,36µg de proteína / mL de dieta) y para el caso del semestre B fue la dieta ICRISAT (0,41µg de proteína/mL de dieta). Estos resultados concuerdan con los encontrados por Arévalo *et al.* (2011), donde los individuos mantenidos en la dieta Shorey & Hale exhibieron una mayor susceptibilidad a la proteína Cry, que los individuos alimentados con la dieta Greene e ICRISAT.

Las diferentes CL₅₀ obtenidas en cada una de las dietas muestran que el tipo de alimento influye en la respuesta de susceptibilidad, lo que Blanco *et al.* (2009) atribuyen a una alteración en la expresión de enzimas digestivas, por parte de algunos componentes del alimento. Esto puede explicar el valor obtenido en la CL₅₀ de los individuos mantenidos con la dieta ICRISAT, pues al existir una alteración en la expresión de dichas enzimas la activación de la toxina se da de forma más lenta, elevando valor en la CL₅₀.

Blanco *et al.* (2009) sugieren que la susceptibilidad expresada por una colonia es directamente proporcional a la cantidad de alimento consumido; lo contrario se observó en los insectos que se alimentaron con la dieta Shorey & Hale (Tabla 2), ya que fue esta la que tuvo un menor consumo aparente y la que menor concentración letal media arrojó. Esto se puede atribuir, posiblemente, a la baja calidad nutricional de la dieta, ya que al no aportar los nutrientes necesarios, hace las larvas más susceptibles a la acción de la toxina.

En la figura 1, se observaron diferencias significativas para el semestre A, en la concentración de 100µg de proteína / mL de dieta ($P > 0,04$); para el resto de las concentraciones, no se observó diferencia estadística. En las concentraciones 0,1; 1 y 10µg del semestre B, se detectaron diferencias altamente significativas, donde la probabilidad fue de $1,41 * 10^{-08}$; 0,0002 y 0,0035, respectivamente.

Como se observa en la figura 1, la dieta ICRISAT es la que menor mortalidad genera a *Heliothis*, mientras que la dieta Shorey & Hale es la que causa la mayor mortalidad, independientemente del semestre. Lo anterior apoya la idea que la dieta Shorey & Hale no aporta los nutrientes necesarios para el normal desarrollo del bellotero.

Influencia de la toxina: Para determinar la influencia que tiene la proteína en el desarrollo del insecto, las larvas sobrevivientes de los bioensayos fueron alimentadas con la dieta correspondiente sin proteína. Las dietas ICRISAT y Greene permitieron que las larvas pasaran a pupa, a diferencia de los individuos alimentados con la dieta Shorey & Hale, donde ninguna de las larvas pudo formar la crisálida, en ninguna de las concentraciones.

La duración del estado larval, se incrementó conforme aumentaba la concentración de la proteína (Figura 2). Las

Tabla 2. Concentraciones letales medias (CL₅₀) en las tres dietas meridicas, en los dos semestres de 2010.

Semestre	Dieta	CL ₅₀ (µg de proteína /mL de dieta)	
		Concentración	IC (95%)
A	ICRISAT	1,79	-
	Greene	5,36	2,11 - 17,66
	S & H	0,54	0,23 - 1,33
B	ICRISAT	0,41	0,007 - 76,05
	Greene	0,24	0,014 - 4,92
	S & H	0,016	0,008 - 0,027

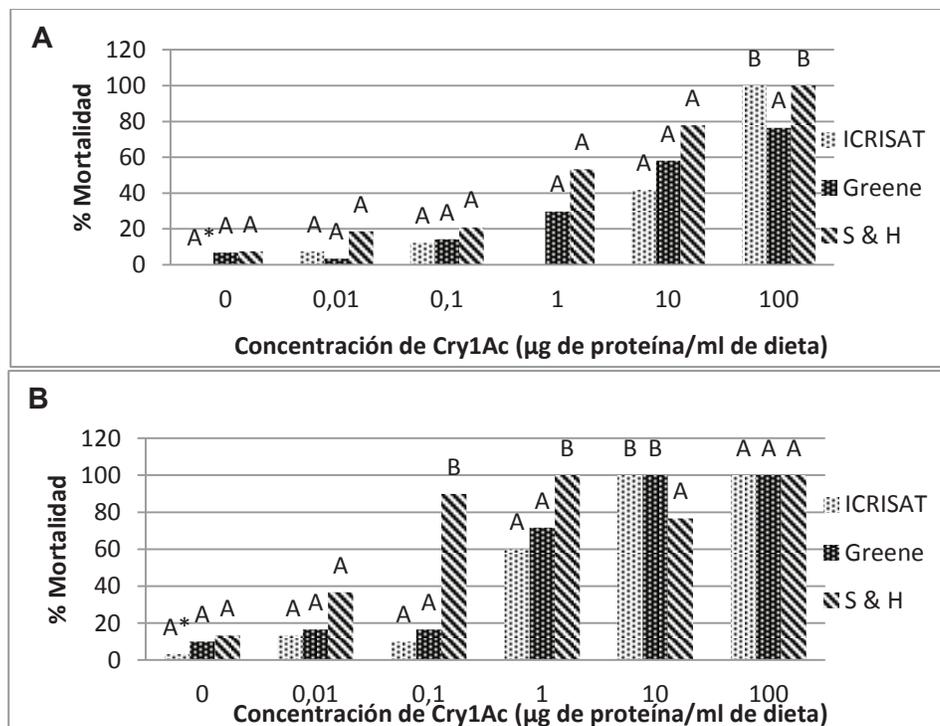


Figura 1. Mortalidad (%) de *Heliothis virescens* en tres dietas, para cada concentración de la proteína. A) Ensayo realizado en el primer semestre (2010A); B) Ensayo realizado en el segundo semestre (2010B).

*Las mortalidades seguidas de la misma letra no presentan diferencias significativas entre dietas para cada concentración, por la prueba de LSD protegida de Fisher, con un 95% de confianza.

larvas alimentadas con la dieta ICRISAT necesitaron 28,75; 35; 33,1 y 48,2 días para transformarse a pupas en las cuatro primeras concentraciones de Cry1Ac, respectivamente, mientras que con la dieta Greene necesitaron 35,4; 45,5 y 37 días, en las tres primeras concentraciones, respectivamente, lo que concuerda a lo encontrado por Arévalo & Zenner de Polanía (2010); además, esa dieta permitió a algunas larvas sobrevivir a la exposición de la proteína hasta 1µg de proteína / mL de dieta, mientras que las larvas alimentadas con Greene solamente sobrevivieron hasta la concentración de 0,1µg.

Como se observa en la figura 2, en la concentración 0,1 se presentaron diferencias ($P > f 0,0072$), siendo la dieta Greene la que menos posibilitó la formación de pupas en esa concentración. A diferencia de las concentraciones de 0 y 0,01 donde no se mostraron diferencias estadísticas entre las dos dietas. Estos resultados concuerdan con los hallados por Arévalo & Zenner de Polanía (2010), donde la dieta ICRISAT fue en la que las larvas requirieron un menor tiempo para la formación de la pupa.

Otra variable que permite determinar la influencia que tiene la dieta sobre el desarrollo del insecto es el peso de las pu-

pas. Arévalo & Zenner de Polanía (2010) encontraron que los pesos que se obtuvieron con la dieta Greene eran menores que los obtenidos con la dieta ICRISAT, lo cual, se confirma en la figura 3, en donde la dieta ICRISAT es la que presenta los mayores pesos, con 217; 199; 209 y 172mg en cada una de las concentraciones, respectivamente, mientras que en la dieta Greene, se obtuvieron pesos de 206mg (0ppm de Cry1Ac), 147mg (0,01 ppm de Cry1Ac), y 206mg (0,1 ppm de Cry1Ac). También, se puede observar que existen diferencias significativas entre los pesos en las dietas Greene e ICRISAT en las concentraciones de 0,01 ($P > f 8,99 * 10^{-06}$) y 0,1µg ($P > f 3,06 * 10^{-06}$).

El peso de las pupas es un indicador de la calidad nutricional de una dieta (Bustillo, 1979), pues con un mayor peso de las mismas existe una mayor posibilidad de supervivencia, lo que nuevamente sugiere que la dieta Shorey & Hale no cumple con los requerimientos nutricionales de esta especie, ya que ni siquiera se logró la obtención de pupas en ninguno de los tratamientos.

Al permitir el desarrollo de las larvas que sobrevivieron al bioensayo, se observó que la presión de selección ejercida

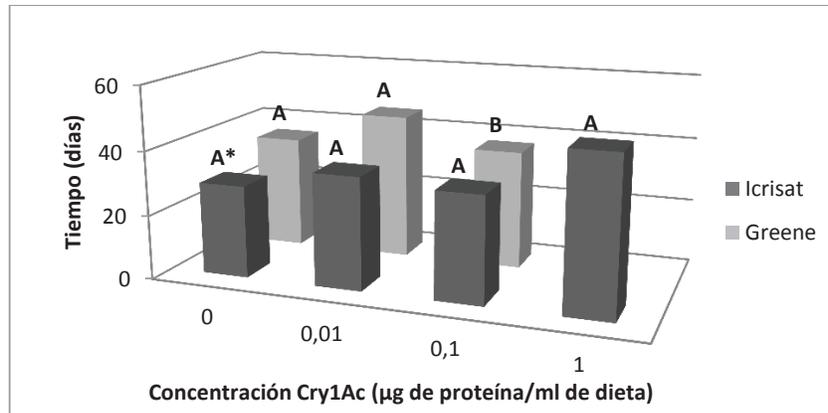


Figura 2. Duración promedio del estadio larval de *Heliothis virescens* de las larvas en dos dietas y concentraciones de la proteína Cry1AC.

*Los tiempos seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas entre dietas para cada concentración, por la prueba de LSD protegida de Fisher, con un 95% de confianza.

sobre la colonia *H. virescens* no permitió que ningún individuo completara su ciclo de vida, independientemente del tipo de alimento sobre el cual fue criado, lo que se ajusta a lo indicado por Gahan *et al.* (2010), donde se menciona que una alta concentración es letal para los insectos, pero una concentración baja altera el crecimiento de las larvas.

Cambios en la susceptibilidad: Al observar que existen diferentes formas, programas y versiones para obtener la concentración letal media, los datos obtenidos en este experimento, al igual que los datos logrados en los bioensayos realizados por el grupo de Fitosanidad de la U.D.C.A, con poblaciones del mismo lugar, en años anteriores, fueron sometidos al mismo algoritmo de programación para el pro-

grama del SAS, con el fin de poderlos comparar y observar los cambios en la susceptibilidad del bellotero.

En la figura 4, se observa una fluctuación en la susceptibilidad del insecto plaga, que disminuye entre el 2006 y el 2008, con CL₅₀ de 0,008 y 4,73ppm, respectivamente y que aumenta para el 2010 y el 2011, con 1,79 y 0,47ppm, respectivamente. La fluctuación en la susceptibilidad de *H. virescens* puede estar influenciada por la procedencia de los insectos, ya que la colonia colectada en 2008 era procedente de un lote de algodónero, genéticamente modificado, indicando que los individuos habían estado bajo presión de selección, haciéndolos menos susceptibles a la acción de la toxina, a diferencia de la colonia colectada para determinar la CL₅₀,

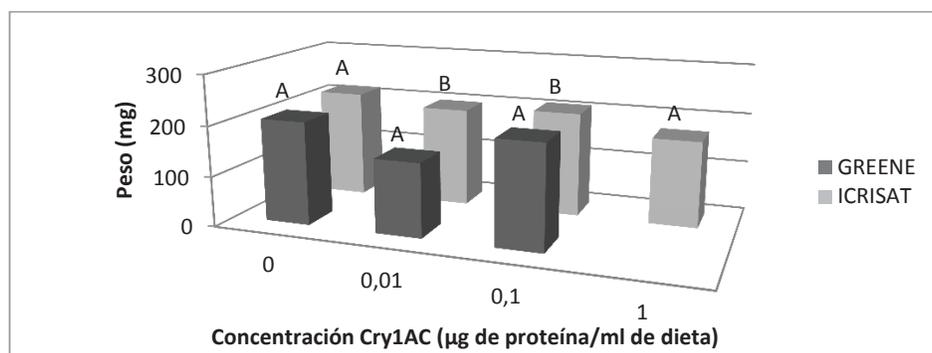


Figura 3. Peso promedio de pupas de *Heliothis virescens* en cada una de las concentraciones de la proteína, en las dietas ICRISAT y Greene.

*Los pesos seguidos de la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas entre dietas para cada concentración, por la prueba de LSD protegida de Fisher, con un 95% de confianza.

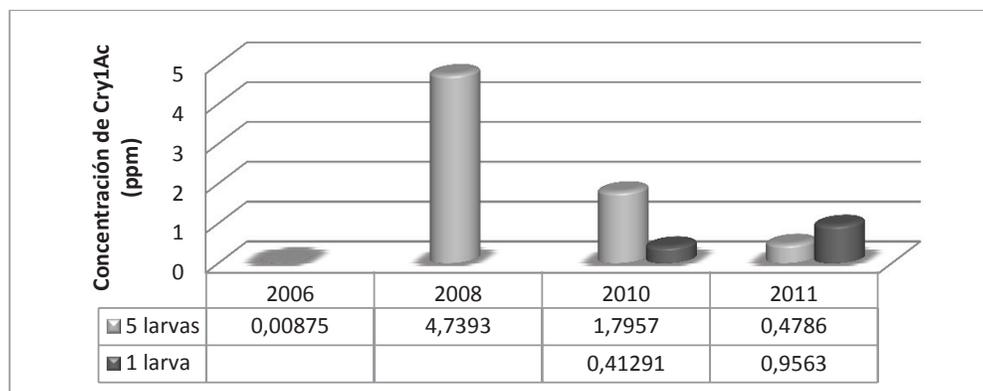


Figura 4. Concentraciones letales media de *Heliothis virescens*, a través del tiempo, con una y cinco larvas, por unidad experimental.

de 2010 y 2011, que provenía de plantas de *Desmodium* sp., que crecían en el borde de un lote sembrado con algodón convencional, en donde la baja o ausente presión de selección pudo haber incrementado la susceptibilidad de esta plaga al Cry1Ac.

Efecto unidad experimental: Un factor que puede estar influenciando la fluctuación en la susceptibilidad (Figura 4) es el número de larvas utilizadas por unidad experimental, pues se observó que la cantidad de insectos al final del ensayo era inferior al número de insectos puestos inicialmente, correspondiendo, posiblemente, al comportamiento de canibalismo que exhibe esta especie (Capinera, 2004). Este comportamiento, se observó con mayor frecuencia a medida que la concentración de la proteína aumentaba, pues las larvas tienden a evitar el alimento en donde existe una concentración de la proteína Cry (Gore *et al.* 2005), lo que las induce a consumir alimento con poca concentración de la proteína, llevándolas, eventualmente, a alimentarse de las otras larvas.

Como se muestra en la figura 4, la CL_{50} para el bioensayo, en donde se utilizaron cinco larvas por recipiente, se redujo 4,33 veces de 2010 al 2011, a diferencia de la CL_{50} , en la que se utilizó una larva por recipiente, que aumentó 1,99 veces, para el mismo período.

Estos resultados pueden estar influenciados por el canibalismo, puesto que la mortalidad se puede leer como consecuencia del aparente consumo de proteína y no a causa de dicho comportamiento. Así que los resultados obtenidos con el ensayo, donde se utilizó una larva, se puedan atribuir al consumo de la proteína Cry, razón por la cual, al momento de establecer un bioensayo, se debe tener en cuenta el comportamiento que presenta esta especie en la naturaleza, donde se observa que la hembra suele depositar los huevos individualmente y de forma aislada (Hallman, 1978; García, 1976).

De los resultados obtenidos en esta investigación, se concluye que, independientemente de la concentración letal media obtenida en ambos bioensayos en el último año, se observó que la susceptibilidad de *H. virescens* se mantiene dentro del rango que el algodón expresa de la proteína (1,67 a 4,42 ppm), reportado por Zenner de Polanía *et al.* (2008). Estas concentraciones permanecen por encima de la concentración máxima necesaria para controlar, por lo menos, la mitad de la población (1,95 ppm).

Álvarez *et al.* (1991) mencionan que la dinámica de las poblaciones de *H. virescens* no presentan ciclos definidos de infestación, por lo que, en cualquier momento, puede existir una alta densidad de esta plaga, razón por la cual, es importante seguir monitoreando la respuesta de susceptibilidad de esta especie a las proteínas Cry, con el fin de evitar la pérdida de esta herramienta en el manejo de plagas.

Los resultados confirmaron que la composición de las dietas merídicas utilizadas en bioensayos tienen influencia en la respuesta de susceptibilidad del bellotero, puesto que la dieta Shorey & Hale fue en la que se presentó una mayor susceptibilidad. Además, esta dieta no permitió completar el ciclo de vida de ninguno de los individuos. Del mismo modo, se observó que en la dieta ICRISAT se obtuvo un menor tiempo del estado larval, independiente de la concentración de la proteína, en comparación con las otras dos dietas; también fue la dieta en la que se presentaron los mayores pesos de pupas.

Además, se concluyó que la concentración letal media obtenida para *Heliothis virescens*, en el 2011 (0,956ppm), indica que el insecto ha perdido susceptibilidad a la proteína Cry1Ac expresada por el algodón Bollgard® I; sin embargo, este aun ejerce control sobre las larvas de esta especie, ya que el rango de expresión de la proteína es de 1,67 a 4,42 ppm de Cry1Ac.

Para el caso de *H. virescens*, que pone los huevos de forma individual, se sugiere que los bioensayos estén representados con una larva por unidad experimental, para aproximarse a lo que sucede en la naturaleza y, de esta manera, eliminar el efecto que tiene el canibalismo sobre los resultados de mortalidad.

Finalmente, es importante describir detalladamente los procedimientos y las herramientas utilizadas en un ensayo, con el fin de permitir a otros investigadores la reproducción del mismo y, de esta forma, evitar sacar conclusiones equivocadas sobre lo que realmente puede estar sucediendo, tanto en el experimento como en campo.

Agradecimientos: A la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A, por el apoyo financiero a la presente investigación. **Conflicto de intereses:** El artículo fue preparado y revisado con la participación de todos los autores, quienes declaramos que no existe ningún conflicto de intereses que ponga en riesgo la validez de los resultados presentados.

BIBLIOGRAFÍA

1. AGRO-BIO. 2012. Una historia de logros importantes para la agricultura. Disponible desde Internet en: <http://www.agrobio.org/fend/index.php?op=YXA9I2JXbDQmaW09I016UT0=> (con acceso el 26/05/12).
2. AKHURST, R.J.; JAMES, W.; BIRD, L.J.; BEARD, C. 2003. Resistance to the Cry1Ac α -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol. 96(4):1290-1299.
3. ALCARAZ, H. 1962. Instituto de Fomento Algodonero: Principales plagas del algodón en Colombia. Bol. Téc. 2:32-35.
4. ÁLVAREZ R., A.; SÁNCHEZ G., G.; ZENNER DE POLANÍA, I. 1991. Influencia de las condiciones ambientales en las poblaciones de *Heliothis* spp. (Lepidoptera: Noctuidae) en el algodón. Rev. ICA. 26:197-211.
5. ARÉVALO, H.A.; ZENNER DE POLANÍA, I. 2009. Evaluación de dietas merídicas para la cría en laboratorio de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 12(1):79-90.
6. ARÉVALO, H.A., ZENNER DE POLANÍA, I. 2010. Evaluation of meridic diets suitable for efficient rearing of *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae). Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 13(2):163-173.
7. ARÉVALO, H.A.; ZENNER DE POLANÍA, I.; ROMERO, L. 2011. Efecto de dietas merídicas en la toxicidad de la proteína cristalina (Cry) del *Bacillus thuringiensis* sobre tres plagas del algodón (Lepidoptera: Noctuidae). Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 14(1):39-48.
8. BLANCO, C.A.; ALI, I.; LITTRELL, R.; SIVASUPRAMANIAM, S.; MARTÍNEZ C., J. 2005. Susceptibility of four *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* reference colonies to a homogeneous Cry1Ac incorporated insect diet: implications for an area wide monitoring program. Belt Cotton Conferences. National Cotton Council of America. New Orleans, Louisiana. p.1226-1233.
9. BLANCO, C.A.; STORER, N.P.; ABEL, C.A.; JACKSON, R.; LEONARD, R.; LÓPEZ, J.D.; PAYNE, G.; SIEGFRIED, B.D.; SPENCER, T.; TERÁN V., A.P. 2008. Baseline susceptibility of tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) to Cry1F toxin from *Bacillus thuringiensis*. J. Econ. Ent. 101(1):168-173.
10. BLANCO, C.A.; GOULD, F.; VEGA A., P.; JURAT, F.; JUAN, L.; PERERA, O.P.; CRAIG, A. 2009. Response of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) strains to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac incorporated into different insect artificial diets. J. Econ. Entom. 102(4):1599-1606.
11. BONACIC, I.; FOGAR, M.; GÜEVARA, G.; SIMONELLA, M. 2010. Algodón. Manual de campo. INTA EEA Sáenz Peña. Argentina. p.23-24. Disponible desde Internet en: http://rian.inta.gov.ar/agronomia/Manual_Algodon.pdf (con acceso el 01/12/10).
12. BOWLING, C.C. 1967. Rearing of two lepidopterous pests of rice on a common artificial diet. Ann. Ent. Soc. Am. 60(6):1215-1216.
13. BRUNS, H.A.; ABEL, C.A. 2003. Nitrogen fertility effects on Bt δ -endotoxin and nitrogen concentrations of maize during early growth. Agronomy J. 95:207-211.
14. BUSTILLO, A.E. 1979. La nutrición en insectos. Sociedad Colombiana de Entomología. Medellín. Boletín de Divulgación. Número 2. 43p.

15. CAPINERA, J.L. 2004. Tobacco budworm, *Heliothis virescens* (Fabricius) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). University of Florida. IFAS Extension. 7p.
16. CERÓN, J. 2004. Productos Comerciales: Nativos y Recombinantes. En. Bravo, A.; Cerón, J. (eds) *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. Ed. Buena Semilla. (Colombia). p.123-147.
17. CHEN, D.; YE, G.; YANG, C.; CHEN, Y.; WU, Y. 2005. The effect of high temperature on the insecticidal properties of Bt cotton. *Environm. Experiment. Bot.* 53:333-342.
18. DONG, H.Z.; LI, W.J. 2007. Variability of endotoxin expression in Bt transgenic cotton. *J. Agr. Crop Sci.* 193:21-29.
19. GAHAN, L.J.; PAÚCHET, Y.; VOGEL, H.; HECKEL, D.G. 2010. An ABC transporter mutation is correlated with insect resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *PLoS Genet.* 6(12):1-11.
20. GARCÍA R., F. 1976. El Complejo *Heliothis*, sus huéspedes y sus hábitos. *Rev. Col. Entomol.* 2(3):75-94.
21. GARCÍA, M.S.; BUSATO, G.R.; GIOLO, F.P.; MANZONI, C.; BERNARDI, O.C.; ZART, M.; NUNES, A.M. 2006. Tabela de vida de fertilidade de *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) (Lepidoptera: Noctuidae) em duas dietas artificiais. *Rev. Bras. Agrocienc. (Pelotas)*. 12(1):51-55.
22. GORE, J.; ADAMCZYK, J.J.; BLANCO, A. 2005. Selective feeding of tobacco budworm and bollworm (Lepidoptera: Noctuidae) on meridic diet with different concentrations of *Bacillus thuringiensis* proteins. *J. Econ. Entomol.* 98(1):88-94.
23. GREENE, G.L.; LEPLA, N.C.; DICKERSON, W.A. 1976. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. *J. Econ. Entomol.* 69(4):487-488.
24. HALLMAN, G. 1978. Claves taxonómicas para las especies de *Heliothis* (Lepidoptera: Noctuidae) en Colombia. *Rev. Col. Entomol.* 4(3-4):61-69.
25. JANMAAT, A.F.; MYERS, J. 2003. Rapid evolution and the cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in greenhouse populations of cabbage loopers, *Trichoplusia ni*. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 270:2263-2270.
26. MARTÍNEZ, J.W. 2004. Evaluación de la toxicidad de *Bacillus thuringiensis*. En. Bravo, A.; Cerón, J. (eds) *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. Ed. Buena Semilla. (Colombia). p.207-232.
27. PARRA, J.R. 2001. Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico. Piracicaba: ESALQ. 134p.
28. PERLAK, F.J.; OPPENHUIZEN, M.; GUSTAFSON, K.; VOTH, R.; SIVASUPRAMANIAM, S.; HEERING, D.; CAREY, B.; IHRIG, R.A.; ROBERTS, J.K. 2001. Development and commercial use of Bollgard® cotton in the USA - early promises versus today's reality. *The Plant J.* 27(6):489-501.
29. SHELTON, A.M.; ROBERSON, J.L.; TANG, J.D.; PEREZ, C.; EIGENBRODE, S.D.; PRIESLER, H.K.; WILSEY, W.T.; COOLEY, R.J. 1993. Resistance of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) to *Bacillus thuringiensis* subspecies in the field. *J. Econ. Entomol.* 86:697-705.
30. SHOREY, H.H.; HALE, R.L. 1965. Mass-Rearing of the larvae of nine Noctuid species on simple artificial medium. *J. Econ. Entomol.* 58(3):522-524.
31. TABASHNIK, B.E.; VAN RENSBURG, J.B.J.; CARRIÈRE, Y. 2009. Field – evolved insect resistance to Bt crops: Definition, theory and data. *J. Econ. Entomol.* 102(6):2011-2025.
32. VILLACORTA, A.; COBO DE MARTÍNEZ, L.S. 1978. Efecto del modo de preparación de la dieta sobre el crecimiento y desarrollo de *Spodoptera frugiperda*. ICA (Colombia). p.96-103.
33. YU, S.J. 2008. The toxicology and biochemistry of insecticides. CRC Press. New York. p.93-102.
34. ZENNER DE POLANÍA, I.; BORRERO F., F. 1992. Panorama nacional de susceptibilidad del algodón a insecticidas. *Agr. Trop. (Colombia)*. 29(2):83-95.
35. ZENNER DE POLANÍA, I.; ÁLVAREZ, A.; ARÉVALO, H.; MEJÍA, R.; BAYONA, M. 2008. Susceptibilidad de cuatro noctuidos plaga (Lepidoptera) al gene Cry 1Ac del *Bacillus thuringiensis* incorporado al algodón. *Rev. Col. Entomol.* 34(1):41-50.

Recibido: Agosto 30 de 2012

Aceptado: Octubre 25 de 2012