

EFFECTO LETAL Y SUBLETAL DE LA PROTEÍNA Cry2Ab DE *Bacillus thuringiensis* BERLINER EN GUSANO ELOTERO *Helicoverpa zea* BODDIE (Lepidoptera: Noctuidae)

Anayely Rosales-Juárez¹, ✉ Sotero Aguilar-Medel¹, José Luís Martínez-Carrillo², Jaime Mejía-Carranza¹, Martha Elena Mora-Herrera¹, Rómulo García-Velasco¹.

¹Centro Universitario Tenancingo, Universidad Autónoma del Estado de México. Km 1.5 Carretera Tenancingo-Villa Guerrero. 52400 Tenancingo, Estado de México.

²Instituto Tecnológico de Sonora, 5 de Febrero 818 sur, Ciudad Obregón, Sonora, México.

✉ Correo: soteromex@hotmail.com.

RESUMEN. *Bacillus thuringiensis kurstaki*, es la bacteria más ampliamente usada para el control de lepidópteros como gusano elotero *Helicoverpa zea* Boddie, un insecto polífago que afecta a cultivos básicos, hortícolas, ornamentales y especies silvestres. El objetivo de este trabajo fue evaluar en condiciones de laboratorio el efecto letal y subletal de la proteína Cry2Ab de *B. thuringiensis kurstaki* en *H. zea*. Los resultados indicaron que la mortalidad de larvas a los 27 días con 5 µg ml⁻¹ de la proteína fue del 87.1%, de pupas del 94.1%, lo que se demuestra que la mortalidad se incrementó al aumentar las concentraciones de la proteína y a través del tiempo. El peso de las larvas, pupas y adultos se redujo, así como el número de larvas que llegaron al estado de adulto y el ciclo de vida de los insectos para alcanzar el estado de pupa y adulto se prolongó. Los resultados sugieren que la combinación de efectos letales y subletales de *B. thuringiensis* pueden tener implicaciones importantes sobre la dinámica poblacional del gusano elotero.

Palabras clave: Gusano elotero, efecto letal, efecto subletal, *Bacillus thuringiensis*.

Lethal and sublethal effects of the *Bacillus thuringiensis* protein Cry2Ab Berliner in corn earworm *Helicoverpa zea* Boddie (Lepidoptera: Noctuidae)

ABSTRACT. *Bacillus thuringiensis kurstak*, is the most widely used bacteria for Lepidoptera control such as the corn earworm *Helicoverpa zea* Boddie. This polyphagous insect attacks a wide variety of crops including basic grain crops and horticultural, ornamental and wild species. The objective of this study was to evaluate under laboratory conditions the lethal and sublethal effects of the protein Cry2Ab of *B. thuringiensis kurstaki* on *H. zea* populations. Results indicated a mortality of 87.1% on larvae and 94.1% on pupae 27 days after application of 5 µg ml⁻¹ of the *Bt* protein. Weight of larvae, pupae, and adults was reduced and also the number of adults that reached this stage, as compared to an untreated control. On the other hand, the life period to reach the pupae and adult stage was prolonged. These results suggest that the combinations of lethal and sublethal effects of *B. thuringiensis* may have important implications on the population dynamics of the corn earworm.

Key words: corn earworm, lethal and sublethal effects, *Bacillus thuringiensis*.

INTRODUCCIÓN

Los efectos letales y subletales son provocados al someter a los organismos vivos a concentraciones de un toxico el cual resulta perjudicial para su desarrollo, los efectos letales provocan en los individuos la mortalidad, y los efectos subletales son aquellos en el que los individuos se exponen a concentraciones bajas de un toxico, el cual se degrada a través del tiempo por acción de factores ambientales como: la luz, la temperatura y la humedad. Los efectos subletales son imperceptibles, sin embargo, pueden afectar a mediano y largo plazo a las poblaciones de los individuos expuestos (Rosales-Juárez *et al.*, 2014). Existen estudios donde se

han evaluado los efectos letales y subletales tanto con insecticidas convencionales, así como con bioinsecticidas, por ejemplo *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* (Btk) es el bioinsecticida más común usado para el control de lepidópteros, entre ellos el gusano elotero *Helicoverpa zea* Boddie (Lepidoptera: Noctuidae), un insecto polífago que afecta a cultivos básicos y hortícolas (Souza *et al.*, 2007), así como a frutales y por lo menos a 76 plantas silvestres (Blanco *et al.*, 2007). Esta larva se alimenta del follaje, llegando a causar la pérdida total de los cultivos. Btk, una vez activado por el fluido alcalino del intestino del insecto, libera protoxinas que se convierten en moléculas tóxicas (Gill *et al.*, 1992), causando así la muerte de los insectos, esta muerte es provocada por la ruptura de las células y una eventual destrucción del intestino (Yu, 2008). En la actualidad, existen estudios sobre los efectos letales que provoca *B. thuringiensis*, pero aún sigue siendo escasa la información de los efectos subletales que provoca esta bacteria. Por ello, la presente investigación tuvo como objetivo evaluar en condiciones de laboratorio, los efectos letales y subletales de la proteína Cry2Ab de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* en gusano elotero *H. zea* Boddie.

MATERIALES Y MÉTODO

Cría del gusano elotero. Los experimentos se realizaron con larvas de *H. zea* provenientes de una colonia que se ha mantenido en el laboratorio de Entomología por más de tres años en el Centro Universitario UAEMex Tenancingo y se continuó criando en una cámara de cría en condiciones controladas: temperatura de $27\pm 1^{\circ}\text{C}$, humedad relativa del $75\pm 5\%$ y un fotoperiodo de 13:11 h luz: oscuridad. Las larvas se alimentaron con una dieta artificial (Corn earworm, Southland Products, Inc.) hasta obtener pupas, las cuales se colocaron en jaulas entomológicas (25x25x35 cm) para la emergencia de los adultos, mismos que fueron alimentados con agua azucarada al 10% (agua destilada y azúcar). Las hembras ovipositaron en tela "Tull", esta tela se cambió cada 24 horas durante el periodo de oviposición. Se obtuvieron larvas neonatas (larvas ≤ 12 h de edad) con las cuales se realizaron los bioensayos correspondientes.

Proteína. Para la proteína Cry2Ab se utilizó tejido de maíz modificado genéticamente y liofilizado que contienen la proteína a una concentración de 0.6%.

Bioensayos. Los bioensayos consistieron en alimentar en todo el estado larval del gusano elotero con dieta artificial contaminada usando concentraciones con 0.001, 0.01, 0.1, 1 y $5\ \mu\text{g ml}^{-1}$ con la proteína de *B. thuringiensis*. La dieta contaminada se reemplazó cada 72 h (3 días) para evitar exponer las larvas a una proteína degradada. En los primeros seis días de evaluación, cada larva fue alimentada con 1 ml de dieta, en este tiempo, la dieta y las larvas fueron colocadas en charolas para bioensayos (Bio-Assay Tray Bio-BA-128: C-D Internacional, Inc) con 128 cavidades, en cada cavidad se colocó una larva neonata confinada con un plástico transparente autoadherible (PULL N' PEEL Tab Bio-Cv-16; C-D International, Inc.). Posteriormente, se alimentaron con 5 ml de dieta, los cuales, tanto la dieta como las larvas se colocaron en vasitos de plástico del número 0 (Envases Primo Cuevas® S.A. de C.V. Ecatepec, Estado de México, Méx.), para favorecer el intercambio gaseoso de los vasitos, en la tapa se realizó una pequeña perforación. Al momento de transferir las larvas a la nueva dieta (cada 72 h), se evaluaron los porcentajes de mortalidad. Las larvas fueron pesadas individualmente a los 3 y 12 días; posteriormente se evaluaron otras variables: tiempo (días) que alcanzaron el estado de pupa, peso de las pupas, tiempo (días) que llegaron al estado adulto y finalmente el peso de los adultos. Los porcentajes de mortalidad en los tratamientos se ajustó mediante el uso de la fórmula Abbott (Abbott, 1925).

Diseño experimental y análisis estadístico. Se utilizó el diseño experimental de bloques completos al azar con cinco tratamientos para cada proteína con su respectivo testigo absoluto y con tres repeticiones. Para cada concentración se iniciaron con 50 larvas neonatas. En total, se utilizaron 900 larvas (50 larvas X 6 concentraciones X 3 repeticiones = 900 larvas neonatas). Los resultados se sometieron a un análisis de varianza y a una prueba de comparación de medias con Tukey con un nivel de significancia del 95% ($P \leq 0.05$) con el programa Infostat (Balzarini *et al.*, 2008).

RESULTADOS

Mortalidad. La mortalidad de las larvas se incrementó a través del tiempo, por ejemplo, a los tres días, la mortalidad varió de 4% con $0.001 \mu\text{g ml}^{-1}$ (concentración más baja) hasta 26.0% con $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ (concentración más alta), y previo a la formación de pupas (en la novena evaluación a los 27 días) la mortalidad fluctuó de 57.3% en la concentración más baja, hasta el 87.1% en la concentración más alta. La mortalidad también se incrementó al aumentarse la concentración en cada fecha de evaluación. En todas las fechas, la menor mortalidad se registró con la concentración más baja ($0.001 \mu\text{g ml}^{-1}$), y la mayor mortalidad se registró en la concentración más alta ($5 \mu\text{g ml}^{-1}$) en casi todas las fechas de evaluación. En las concentraciones intermedias (0.001 , 0.1 y $1 \mu\text{g ml}^{-1}$), en general siempre presentaron mortalidades similares entre ellas, y en ocasiones fueron iguales con la concentración más baja o con la concentración más alta (Tukey, $P \leq 0.05$). En el estado de pupa, la menor mortalidad fue del 61.5% con la concentración baja; con 0.01 y $0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$ las mortalidades fueron estadísticamente iguales 67.3 y 69.2%, le siguió $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ con el 75.9% y el mayor porcentaje de mortalidad fue del 91.4% en la concentración más alta (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 1). Los efectos de *B. thuringiensis* se manifestaron durante todo el desarrollo larval, produciendo en las larvas deshidratación y rompimiento celular.

Cuadro 1. Porcentaje de mortalidad acumulada corregida a través del tiempo de larvas de *H. zea* alimentadas con dieta contaminada con diferentes concentraciones de la proteína Cry2Ab de *B. thuringiensis*.

| Concentración $\mu\text{g ml}^{-1}$ | . Periodo larval (días) | | | | |
|----------------------------------------|-------------------------|------------|-------------|-------------|------------|
| | 3±E* | 6±E* | 9±E* | 12±E* | 15±E* |
| 0.001 | 4.0±0.0a | 12.7±5.5a | 12.3±7.7a | 19.0±11.6a | 24.8±12a |
| 0.01 | 8.0±0.0ab | 15.7±8.0ab | 20.9±6.8a | 21.5±8.2a | 35.9±8.3a |
| 0.1 | 10.0±3.5ab | 18.6±8.3ab | 24.5±11.6ab | 30.7±14.0ab | 39.4±7.2ab |
| 1 | 14.0±2.0b | 25.9±5.1ab | 28.3±6.9ab | 37.2±7.9ab | 46.1±9.0ab |
| 5 | 26.0±4.0c | 30.2±5.6b | 34.1±4.7b | 51.2±3.3b | 62.3±6.0b |
| Concentración $\mu\text{g ml}^{-1}$ | Periodo larval (días) | | | | |
| | 18±E* | 21±E* | 24±E* | 27±E* | Pupas±E* |
| 0.001 | 40.5±11.7a | 47.9±9.5a | 53.5±6.2a | 57.3±3.1a | 61.5±1.4a |
| 0.01 | 51.8±2.8a | 52.7±1.4a | 58.2±2.0a | 58.2±2.0a | 67.3±2.0ab |
| 0.1 | 52.7±3.5a | 59.1±3.5a | 61.8±5.9a | 63.7±4.3a | 69.2±2.2ab |
| 1 | 57.1±5.1ab | 65.5±7.2ab | 67.3±7.8a | 68.3±7.1a | 75.9±1.5b |
| 5 | 78.8±13.6b | 82.3±10.1b | 85.2±8.6b | 87.1±11.7b | 91.4±13.1c |

*Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $P \leq 0.05$).

E Error Estándar de la media.

Peso de larvas a los 3 y 12 días. A los 3 y 12 días el peso se redujo al aumentar la concentración de la proteína, principalmente a los 12 días.

A los 3 días, el peso promedio en el testigo fue de 2.9 mg, en el rango de 0.001 a 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ el peso promedio fue de 0.6 mg, mientras que en la concentración más alta (5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) pesaron 0.02 mg, es decir, 2.8 mg menos que las larvas testigo. Estadísticamente, el peso de las larvas entre el rango de concentraciones intermedias (0.001, 0.01, 0.1 y 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$) fueron iguales, pero diferentes entre el testigo y la concentración más alta (Tukey, $P \leq 0.05$). A los 12 días, sólo en las concentraciones de 0.001 y 0.01 $\mu\text{g ml}^{-1}$ el peso de las larvas fueron iguales estadísticamente, en las otras concentraciones fueron diferentes incluyendo al testigo (Tukey, $P \leq 0.05$). En esta fecha, el mayor peso se registró en el testigo, el cual fue de 470.9 mg, y el menor fue observado en la concentración más alta (5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) donde el peso promedio fue de 144.4 mg, es decir, la diferencia entre el testigo y la concentración más alta es de 326.5 mg (Cuadro 2).

Tiempo en llegar al estado de pupa. En el testigo, las pupas se formaron a los 16.7 días, y en la concentración más alta ($\mu\text{g ml}^{-1}$) fue a los 25.7 días. En las otras concentraciones, los tiempos requeridos estuvieron dentro de este rango. La diferencia para que las larvas se desarrollaran al estado de pupa entre el testigo y la concentración más alta fue de 9 días. Todos los tratamientos fueron estadísticamente diferentes entre sí (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 3).

Cuadro 2. Efecto de diferentes concentraciones de la proteína Cry2Ab de *B. thuringiensis* en *H. zea* sobre el peso promedio de larvas a los 3 y 12 días, peso de pupas y adultos.

| Concentración $\mu\text{g ml}^{-1}$ | Peso en mg | | | |
|----------------------------------------|-----------------------------|------------------------------|--------------------|------------------|
| | Larvas (3 días \pm E*) | Larvas (12 días \pm E*) | Pupas \pm E* | Adulto \pm E* |
| TESTIGO | 2.9 \pm 0.9a | 470.9 \pm 23a | 404.9 \pm 12.0a | 89.1 \pm 8.6a |
| 0.001 | 0.7 \pm 0.6b | 399.4 \pm 1.9b | 323.0 \pm 9.5ab | 71.4 \pm 2.6ab |
| 0.01 | 0.8 \pm 0.7b | 387.5 \pm 8.9b | 306.2 \pm 5.7ab | 68.6 \pm 1.0ab |
| 0.1 | 0.6 \pm 0.6b | 226.8 \pm 22.6bc | 217.9 \pm 10.2ab | 54.2 \pm 4.2bc |
| 1 | 0.4 \pm 0.3b | 162.6 \pm 39.1c | 156.6 \pm 19.1ab | 53.2 \pm 3.5bc |
| 5 | 0.02 \pm 0.03c | 144.4 \pm 15.2d | 140.1 \pm 8.4b | 33.4 \pm 29.0c |

*Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $P \leq 0.05$).

E Error Estándar de la media.

Cuadro 3. Efecto de diferentes concentraciones de la proteína Cry2Ab de *B. thuringiensis* en *H. zea* sobre el tiempo de desarrollo (días) de las larvas neonatas a pupa y adulto.

| Concentración $\mu\text{g ml}^{-1}$ | N ¹ | N ² | T ¹ \pm E* | N ³ | T ² \pm E* |
|----------------------------------------|----------------|----------------|-------------------------|----------------|-------------------------|
| TESTIGO | 150 | 69.3 | 16.7 \pm 0.5a | 63.3 | 26.7 \pm 0.8a |
| 0.001 | 150 | 26.7 | 17.7 \pm 0.7ab | 14.7 | 28.8 \pm 0.3b |
| 0.01 | 150 | 21.3 | 19.7 \pm 0.7abc | 10.0 | 29.9 \pm 0.6bc |
| 0.1 | 150 | 22.7 | 21.0 \pm 2.2bcd | 11.3 | 30.1 \pm 0.2c |
| 1 | 150 | 16.7 | 24.3 \pm 0.3cd | 3.3 | 32.5 \pm 0.5d |
| 5 | 150 | 6.0 | 25.7 \pm 1.5d | 1.3 | 33.0 \pm 0.1d |

N¹ Número de larvas expuestas a las diferentes concentraciones de la proteína Cry2Ab

N² Porcentaje de larvas que llegaron al estado de pupa.

N³ Porcentaje de larvas que llegaron al estado de adulto.

T¹ Tiempo transcurrido en días desde larvas neonatas al estado de pupa.

T² Tiempo transcurrido en días desde larvas neonatas al estado de adulto.

*Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $P \leq 0.05$).

E Error Estándar de la media.

Peso de pupas. El peso promedio de las pupas testigo fue de 404.9 mg, en el rango de concentraciones de 0.001 a 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$, el peso fluctuó entre 399.4 y 162.6 mg, y en la concentración más alta (5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) fue de 140.1 mg, es decir, 264.8 mg menos que en el testigo. Estadísticamente, el peso de las pupas entre las concentraciones intermedias de 0.001 a 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ fueron iguales, pero diferentes con el testigo y la concentración más alta (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 2).

Tiempo en llegar al estado adulto. Las larvas testigo se desarrollaron al estado adulto en 26.7 días, en tanto que en las concentraciones 0.001, 0.01, y 0.1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ a los 28.8, 29.9 y 30.1 días respectivamente, con las concentraciones de 1 y 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ se desarrollaron a los 32.5 y 33.0 días. La diferencia en tiempo para que las larvas se desarrollaran al estado adulto entre el testigo y la concentración más alta fue de 6.3 días. Todos los tratamientos fueron diferentes estadísticamente, con la excepción de las concentraciones más altas (1 y 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$), las cuales fueron iguales (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 3).

Peso de adultos. Estadísticamente, el mayor peso se registró en el testigo cuyo peso promedio de los adultos fueron de 89.1 mg, le siguieron 0.001 y 0.01 $\mu\text{g ml}^{-1}$ con 71.4 y 68.6 mg respectivamente, posteriormente 0.1 y 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ con 54.2 y 53.2 mg y finalmente 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ con 33.4 mg, la diferencia entre el testigo y la concentración más alta fue de 55.7 mg (Tukey, $P \leq 0.05$) (Cuadro 2).

DISCUSIÓN.

Los resultados obtenidos en este trabajo permitió demostrar que al incrementar la concentración de la proteína, el porcentaje de mortalidad aumentó; por ejemplo, a los tres días, con 0.001 $\mu\text{g ml}^{-1}$ la mortalidad fue de 4.0%; a los 27 días de exposición, la mortalidad fue de 57.3%. En el caso de la concentración de 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$, a los 27 días, la mortalidad fue del 87.1%.

Estudios realizados por Silva *et al.* (2010), mostraron que *Peumus boldus* Molina provocó el 67.5% de mortalidad a una concentración del 8% y concentraciones menores al 2% no superaron el 40% de mortalidad. El peso de las larvas también estuvo en función de la concentración y del tiempo de exposición, debido a que el peso se redujo conforme se incrementó la concentración de la proteína. Esta misma tendencia fue observada por Zeener de Polonia *et al.* (2009), al utilizar larvas de *H. zea* con la proteína Cry1Ac, pero los pesos larvales no coinciden debido a que los pesos fueron menores: de 35.7 mg con 0.01 $\mu\text{g ml}^{-1}$, mientras que con 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ pesaron sólo 13.7 mg a los 20 días de desarrollo larval, esto puede ser por que las condiciones del laboratorio no fueron las mismas. Otro efecto subletal, es el retraso para alcanzar el estado de pupa y adulto. Las larvas, al detener parcial o completamente su alimentación, la cual depende de la concentración y el tiempo de exposición a la toxina, posiblemente también se afectan varias funciones fisiológicas relacionadas con su desarrollo, como por ejemplo, el proceso de muda y la metamorfosis (Stapel *et al.*, 1998) y por ello, se prolongó el tiempo para que las larvas se desarrollaran al estado de pupa y adulto. Los resultados de este estudio concuerdan con los reportados por Dong *et al.* (2013), quienes indican que la toxicidad de Spinosad sobre *Spodoptera exigua* a las 48 y 72 horas con tratamientos de 0.317 y 0.293 mg kg^{-1} , los efectos

subletales se mostraron en la reducción del peso y prolongación del periodo larval. En general, los resultados concuerdan con los obtenidos por Rosales-Juárez *et al.* (2014), quienes evaluaron los efectos subletales de *B. thuringiensis* en larvas de gusano cogollero y demostraron que la mortalidad se incrementó al aumentar la concentración de la proteína, el peso de larvas, pupas y adultos se reduce, y el ciclo de vida se prolongó al incrementar la concentración de la proteína.

CONCLUSIÓN

Las concentraciones evaluadas de la proteína Cry2Ab de *B. thuringiensis* en larvas de *H. zea*, afectaron significativamente el desarrollo de esta especie en todos sus estados de desarrollo. La mortalidad de las larvas aumentó conforme se incrementaron las concentraciones de la proteína, a los 27 días, la mortalidad fue del 87.1% en la concentración más alta (5 µg ml⁻¹). Por otra parte, el peso de larvas, pupas y adultos se redujo al incrementar la concentración de la proteína, habiendo diferencias de peso entre las larvas testigo y la concentración más alta; a los 3 y 12 días fueron del 2.8 y 326.5 mg respectivamente, de pupas fue de 264.8 mg y de adultos de 55.7 mg. También se incrementó el tiempo para la formación de pupas y adultos.

LITERATURA CITADA

- Abbott, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18: 265-267.
- Balzarini, M. G., González, L., Tablada, M., Casanoves, F., Di Rienzo, J. A. y C. W. Robledo. 2008. *Infostat. Manual del Usuario*, Editorial Brujas, Córdoba, Argentina.
- Blanco, C. A., Teran-Vargas, A. P., López, J. D., Kauffman, J. V. y X. Wei. 2007. Densities of *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in three plant hosts. *Florida Entomol.* 90: 742-750.
- Gill, S. S., Cowles, E. A. y P. V. Pietrantonio. 1992. The mode on action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu. Rev. Entomol.* 37:615-636.
- Rosales-Juárez, A., Aguilar-Medel, S y J. L. Martínez-Carrillo. 2014. Efecto subletal de la proteína Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* Berliner en gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). *Entomología Mexicana.* 13: 190-195
- Silva, G., Rodríguez, J. C., Lagunes, A., Llanderal, C., Alatorre, R., Shelton, A. M. y C. A. Blanco. 2010. Toxicidad del aceite esencial de *Peumus boldus* Molina sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) y *Helicoverpa zea* Boddie. Tesis Doctoral. Colegio de Postgraduados. México. pp. 68-88.
- Souza, M., Gassman, A. J., Crowder, D. W. y Y. Carrière. 2008. Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory. *Nature Biotechnology.* 26: 199-2002.
- Stapel, J. O., Deborah, J. W., Ruberson, J. R. y W. L. Joe. 1998. Development and behavior of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in choice fest with Food substrates containg toxins of *Bacillus thuringiensis*. *Biological control.* 11: 29-37.
- Yu, S.J. 2008. *The toxicology and biochemistry of insecticides.* CRC Press. Boca Florida. USA.
- Wang, J, A. Boets., J. Van Rie y G. Ren G. 2003. Characterization of cry1, cry2 and cry9 genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from China. *J. Invertebr. Pathol.* 82: 63-71.
- Zeener de Polonia, I., Álvarez, R. A. y M. H. Arévalo. 2009. Respuestas de *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae), Procedente del Piedemonte Llanero Colombiano, a la Toxina Cry1Ac del *Bacillus thuringiensis*. *Southwestern Entomologist.* 35: 85-98.