

EFFECTO DE LAS PROTEÍNAS Cry1C Y Cry9Aa DE *Bacillus thuringiensis* Berliner 1915 EN *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith 1797 (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

Anayely Rosales-Juárez¹✉, Sotero Aguilar-Medel¹, Jaime Mejía-Carranza¹, María Alejandra Bravo de la Parra²

¹Centro Universitario Tenancingo. Universidad Autónoma del Estado de México. K. m. 1.5 Carretera Tenancingo-Villa Guerrero. C. P. 52400 Tenancingo, Estado de México.

²Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México, Ap. Postal 510-3, Cuernavaca, C. P. 62250 Morelos, México.

✉ Autor de correspondencia: anayely1406@hotmail.com

RESUMEN. El objetivo de este estudio fue evaluar en condiciones de laboratorio la efectividad de dos proteínas: Cry1C y Cry9Aa de *B. thuringiensis* en dos poblaciones mexicanas de *S. frugiperda*, colectadas en campo: Laguna (Coahuila) y Valle del Fuerte (Sinaloa), y como referencia una colonia de laboratorio Susceptible. Los resultados indicaron que con la proteína Cry1C, los valores de CL₅₀ (Concentración letal que mata el 50 %) fueron de 65.4, 71.4 y 77.2 ng/cm² en Laguna, Susceptible y Valle del Fuerte, respectivamente. Las CL₉₅ (Concentración letal que mata el 95 %) fueron superiores a 35,000 ng/cm² para las tres poblaciones. La CE₅₀ (Concentración que inhibe el 50 % del peso) fue 0.79, 1.32 y 4.07 ng/cm² en Valle del Fuerte, Laguna y Susceptible, respectivamente. La proporción de resistencia de la mortalidad fue < 3 veces y la proporción de resistencia respecto a la inhibición de peso fue < 1 vez entre las poblaciones de campo. Con 5000 ng/cm² de la proteína Cry9Aa sólo se registró el 12.5 % de mortalidad. Dado los porcentajes de mortalidad y la inhibición de peso, se concluye que las proteínas Cry1C y Cry9Aa no son una alternativa para el control de *S. frugiperda*.

Palabras clave: *Spodoptera frugiperda*, Efectividad, Resistencia.

Effect of Cry1C and Cry9Aa proteins from *Bacillus thuringiensis* Berliner 1915 on *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith 1797 (Lepidoptera: Noctuidae)

ABSTRACT. The objective of this study was to evaluate under laboratory conditions the effectiveness of two proteins: Cry1C and Cry9Aa of *B. thuringiensis* in two Mexican populations of *S. frugiperda*, collected in field: in Laguna (Coahuila) and Valle del Fuerte (Sinaloa), and as a reference a Susceptible laboratory colony. Results indicated that with the Cry1C protein, the values of CL₅₀ (50 % lethal concentration) were 65.4, 71.4 and 77.2 ng/cm² in Laguna, Susceptible and Valle del Fuerte, respectively. The CL₉₅ (95 % lethal concentration) were greater than 35,000 ng/cm² for all three populations. The CE₅₀ (Concentration that inhibits 50 % of weight) was 0.79, 1.32 and 4.07 ng/cm² in Valle del Fuerte, Laguna and Susceptible, respectively. The resistance ratio of mortality was < 3 times and the resistance ratio to weight inhibition was < 1 time among field populations. With 5000 ng/cm² of the Cry9Aa protein, only 12.5 % mortality was recorded. Given mortality rates and weight inhibition, it is concluded that Cry1C and Cry9Aa proteins are not an alternative to *S. frugiperda* control.

Keywords: *Spodoptera frugiperda*, Effectivity, Resistance.

INTRODUCCIÓN

El gusano cogollero *S. frugiperda* (J.E. Smith), es una plaga nativa de las regiones tropicales de América y se distribuye desde el sur de Canadá hasta Argentina (Rodríguez y Marín, 2008). En los últimos años se ha reportado que causa daños en otros continentes (Hruska, 2019) como; África (Goergen, 2016), Asia (FAO, 2019) y Australia (FAO, 2020). Es una especie polífaga, la cual se reporta infestando a más de 186 especies de plantas (Casmuz *et al.*, 2010), aunque Montezano *et al.*, (2018), han reportado hasta 353 plantas hospederas. En México, es una plaga primaria y de importancia

económica (Sena *et al.*, 2009) entre los cultivos que ataca están maíz (*Zea mays* L.), algodón (*Gossypium hirsutum* L.), sorgo (*Sorghum vulgare* L.), soya (*Glycine max* L.), cacahuate (*Arachis hypogaea* L), arroz (*Oryza sativa* L.), forrajes y pastos (Nagoshi y Meagher, 2004; Murúa *et al.*, 2008). El uso de productos a base de *B. thuringiensis* Berliner (Bt), representan una alternativa al uso intensivo de insecticidas convencionales, es un entomopatógeno con acción insecticida (Bravo *et al.*, 2007). Bt, es una bacteria gram positiva que produce proteínas denominadas δ -endotoxinas que se acumulan en inclusiones paraesporales o cristales durante su fase de esporulación. Estos cristales con actividad insecticida son conocidas como toxinas Cry y Cyt (Bravo *et al.*, 2007) que controlan a insectos de los órdenes Coleóptera, Díptera, Hymenoptera, Hemiptera, Blattaria y Lepidóptera (incluida *S. frugiperda*) (van Frankenhuyzen, 2009). Por ingeniería genética, las toxinas Cry y Vip (Proteínas Insecticidas Vegetales) también se han empleado en productos biotecnológicos como las plantas genéticamente modificadas que expresan uno o más genes de proteínas Cry, resultando en plantas Bt que producen su propio insecticida (Soberón *et al.*, 2007). Sin embargo, la efectividad en el control de insectos plaga por las plantas Bt y la efectividad de los bioinsecticidas, está en riesgo por la evolución de la resistencia de los insectos plaga a tales proteínas (Zhang *et al.*, 2011), por lo que es necesario evaluar si todas las proteínas Cry realmente son efectivas para el control de plagas importantes como es el caso de gusano cogollero. Por ello, en este trabajo se planteó como objetivo evaluar la efectividad de las proteínas Cry1C y Cry9Aa de *B. thuringiensis* de dos poblaciones de *S. frugiperda* provenientes de: Laguna (Comarca Lagunera, Torreón, Coahuila) y Valle del Fuerte (Valle del Fuerte, Sinaloa) y comparar los resultados de toxicidad de estas proteínas con una colonia susceptible de laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODO

Cría de *S. frugiperda*. La cría de gusano cogollero se inició con insectos en estado larvario de dos poblaciones de campo identificadas como “Laguna” de Torreón, Coahuila y otra como “Valle del Fuerte” de la región del Valle del Fuerte, Sinaloa; y como referencia se empleó una colonia identificada como “Susceptible” que se ha mantenido por más de tres años en el laboratorio. Las colonias se mantuvieron en una cámara de cría en condiciones controladas de temperatura de 25 ± 2 °C, humedad relativa de 75 ± 5 % y un fotoperiodo de 13:11 h luz: oscuridad. Las larvas fueron alimentadas con una dieta merídica (Fall Armyworm, Southland Products, Inc.) hasta obtener las pupas; éstas se colocaron en jaulas entomológicas (25 x 25 x 30 cm) para la emergencia de los adultos, mismos que se alimentaron con agua destilada azucarada al 10 % con miel de maple (Karo®). Posterior al apareamiento, las hembras ovipositaron por siete días sobre tela de “Tull”; que se cambió cada 24 h durante el periodo de oviposición. Se obtuvieron larvas neonatas (larvas ≤ 12 h de edad) con las cuales se realizaron los bioensayos.

Proteínas. Las proteínas Cry1C y Cry9Aa de Bt fueron proporcionadas por el Instituto de Biotecnología (IBT-UNAM) de la Universidad Nacional Autónoma de México, a una concentración por volumen de 2.72 y 0.20 mg/mL⁻¹, respectivamente. La presentación de dichas proteínas fue en estado líquido, almacenada entre 0 ± 2 °C.

Bioensayos. Los bioensayos consistieron en colocar un mililitro de dieta merídica en cada cavidad de la charola para bioensayos (Bio-Assay Tray Bio-BA-128: C-D Internacional, Inc). Sobre la dieta solidificada se depositaron 200 μ L⁻¹ de la proteína a la concentración deseada, esta fue suspendida en un solvente al 1 % (agua destilada + agar Banto™), las cuales fueron homogenizadas con un agitador Vortex (T-Genie2, Scientific Industries), después que la superficie de la dieta estuviera seca se colocó una larva neonata (< 12 h), las charolas se confinaron con un plástico transparente

autoadherible (Pull N' Peel Tab Bio-Cv-16; C-D International, Inc.) que tiene microperforaciones y permiten la entrada de oxígeno. Posteriormente, las charolas se colocaron en la cámara de cría en las condiciones ambientales anteriormente mencionadas. A los siete días se evaluaron los porcentajes de mortalidad y reducción de peso con respecto al testigo en donde únicamente se le aplicaron 200 μL^{-1} de agar al 1 %. El tamaño de muestra fue de 32 larvas/dosis/repetición. En cada repetición se incluyó un testigo. La mortalidad se determinó a siete días de tratamiento y se ajustó mediante la fórmula de Abbott (Abbott, 1925), la mortalidad máxima aceptable para el testigo fue del 10 %. Las larvas muertas y aquellas que no rebasaron el primer instar se consideraron como muertas.

Análisis estadístico. Los datos de porcentaje de mortalidad y de inhibición de peso se analizaron usando el modelo Probit (Finney, 1971) para estimar los valores de $\text{CL}_{50, 95}$, así como los límites de confianza (IC) al 95 % mediante el procedimiento Proc Probit en el paquete estadístico SAS Studio University Edition 9.4 (SAS Studio, 2012-2016). Las Relaciones de Resistencia (RR) al nivel de CL_{50} (RR_{50}) y CL_{95} (RR_{95}) se calcularon dividiendo los valores de $\text{CL}_{50, 95}$ de la población de campo / $\text{CL}_{50, 95}$ de la población susceptible, y para inhibición de peso se obtuvo dividiendo $\text{CE}_{50, 95}$ de la población de campo / $\text{CE}_{50, 95}$ de la población susceptible, como lo sugiere Storer *et al.* (2010).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mortalidad. Los resultados de mortalidad de *S. frugiperda* de las poblaciones Valle del Fuerte, Laguna y Susceptible expuestas a diferentes proteínas de *B. thuringiensis* se presenta en los Cuadro 1 y 2. Los valores de CL_{50} con la proteína Cry1C fueron de 72.2 ng/cm^2 en la población Valle del Fuerte, 65.4 ng/cm^2 para la Laguna y 72.4 ng/cm^2 en la susceptible. La CL_{95} fue de 36,256 ng/cm^2 para Valle del Fuerte y 40,615 ng/cm^2 para la Laguna, y la susceptible presentó un valor de 35, 142 ng/cm^2 .

En general, los valores de CL_{50} y CL_{95} de la proteína Cry1C entre las tres poblaciones (Valle del Fuerte, Laguna y Susceptible) fueron estadísticamente iguales debido a que sus límites de confianza se traslaparon con una probabilidad del 95 %. Resultados similares obtuvieron Hernández-Martínez *et al.* (2008), quienes evaluaron nueve toxinas de Bt contra *Spodoptera exigua* Hübner en dos colonias de laboratorio, los valores de CL_{50} de la proteína Cry1Ca fue de 90 ng/cm^2 (LF 95 % = 42-197) en una colonia de Francia; 333 ng/cm^2 (LF 95 % = 120-1070) para la población Netherlands, en la Unión Europea. Por su parte Avisar *et al.* (2009), determinaron que las plantas que expresan la proteína Cry1Ca fueron tolerantes al daño de *Spodoptera littoralis* Keller *et al.* (1996), creen que se la tolerancia a las proteínas Bt puede deberse al aumento de la actividad de las proteasas intestinales que tienen esta especie, ya que degradan e inactivan a la proteína Cry1C. Por lo contrario, Bravo *et al.* (1998), mostraron que la cepa nativa IB126 que contienen genes de Cry1C y Cry1D fueron tóxicos para *S. frugiperda* y *S. exigua* con valores de CL_{50} de 22 ng/cm^2 (15-30), 22 ng/cm^2 (16-31), respectivamente, asociando dichos resultados a la combinación de proteínas.

Los valores de las proporciones de resistencia RR_{50} fueron de 0.73x en Valle del Fuerte y 1.24x en la Laguna; y en el caso de la RR_{95} , estos fueron de 0.21x en Valle del Fuerte y 0.23x en la población de la Laguna (Cuadro 1). Esto indica que las poblaciones de campo muestran las mismas respuestas con relación a la colonia susceptible a la proteína Cry1C.

En el caso de la proteína Cry9Aa, en la población Valle del Fuerte, la toxicidad fue baja, ya que con 5000 ng/cm^2 sólo se registró el 12.5 % de mortalidad, debido a esto, no se pudo realizar el análisis Probit para estimar CL_{50} y CL_{95} , reflejando que esta proteína no es una alternativa para el control de *S. frugiperda* Naimov *et al.* (2014), reportan de igual forma que Cry9Aa producida por *B. thuringiensis* no tiene actividad insecticida contra *S. exigua*; sin embargo, en su estudio clonaron un nuevo gen que codifica una protoxina con alta actividad insecticida contra *S. exigua*, este gen

es Cry9Aa5. El presente estudio demuestra que la proteína Cry9Aa no es tóxica para *S. frugiperda*, pero si para otras especies como: *Plutella xylostella* L. (Longfa *et al.*, 2016), *Galleria mellonella* L., *Thaumetopoea pityocampa* Denis y Schiffermüller (Shevelev *et al.*, 1993).

Cuadro 1. Análisis probit de la mortalidad de larvas de *S. frugiperda* alimentadas con dieta mèridica contaminada con proteína Cry1C de *B. thuringiensis*.

Población	n	P±ES	CL ₅₀ (95 % CI)	CL ₉₅ (95 % CI)	χ ²	GI	Pr>- ChiSq	RR ₅₀	RR ₉₅
Valle del Fuerte	1024	0.69 ± 0.04	77.2 (53.8-114.5) a	36256 (15021-111444) a	1.67	5	0.89	1.08	1.03
Laguna	1024	0.58 ± 0.03	65.4 (45.2-97.7) a	40615 (16164-132275) a	2.93	5	0.70	0.91	1.15
Susceptible	1024	0.61 ± 0.04	71.4 (49.8-105.7) a	35142 (14531-108354) a	1.10	5	0.95		

Relación de Resistencia= CL₅₀₍₉₅₎ de la población de campo / CL₅₀₍₉₅₎ de la población susceptible. Valores con diferentes letras son significativamente diferentes a través del no traslape de los límites de confianza con una probabilidad del 95 % esto entre poblaciones a una sola proteína.

Cuadro 2. Mortalidad de *S. frugiperda* alimentada con la proteína Cry9Aa (0.20)† de *B. thuringiensis*.

Concentración (ng·cm ²)	N	Nº Muertos	% de Mortalidad
Testigo	64	0	0
1	64	5	7.8
10	64	5	7.8
100	64	6	9.4
1000	64	8	12.5
5000	64	8	12.5

n tratados. † Concentración original en mg·mL.

Inhibición de Peso. Para analizar la inhibición del crecimiento de las larvas se comparó el valor de inhibición del 50 % (CE₅₀) y 90 % (CE₉₀) por efecto de la proteína Cry1C con relación a las larvas testigo sin tratar. El valor más bajo de la CE₅₀ fue de 0.79 ng/cm² y se registró en la población Valle del Fuerte, y el valor más alto fue de 4.07 ng/cm² en la población susceptible. El valor más bajo y alto de la CE₉₀ fue de 116.2 y 394.6 ng/cm² para las poblaciones de la Laguna y susceptible, respectivamente (Cuadro 3). Registrándose diferencias estadísticas entre las tres poblaciones para CE₅₀, pero no para CE₉₀. En cuanto a reducción de peso se muestra que la proteína Cry1C, tiene un comportamiento más efectivo que los valores de mortalidad. Estos resultados coinciden con los

obtenidos por Hernández-Martínez *et al.* (2009), quienes determinaron que el valor de CE_{50} fue de 88 ng/cm² (20 - 155) con la proteína Cry1Ca en *S. exigua*. De igual forma, Du *et al.* (2019) afirman que *S. exigua* tiene la cadherina SeCad1b identificada como un receptor de Cry1C, lo que provoca que esta proteína tenga mayor toxicidad.

Al igual que con la mortalidad, también se estimaron las proporciones de resistencia con este parámetro, tanto a nivel de la CE_{50} (RR₅₀) como a nivel de la CE_{90} (RR₉₀). La RR₅₀ fue de 0.19x en Valle del Fuerte 0.32x en Laguna, y la RR₉₀ fue de 0.74x en Valle del Fuerte y 0.29x en Laguna (Cuadro 3).

Cuadro 3. Líneas base sobre inhibición de crecimiento en poblaciones *S. frugiperda* colectadas en: Valle del Fuerte, Sinaloa; La Laguna, Coahuila, por efecto de la proteína Cry1C de *B. thuringiensis* (CE, ng/cm²).

Población	N	CE_{50} (IC 95 %)a	CE_{90} (IC 95 %)a	RR ₅₀	RR ₉₀
Valle del Fuerte	1024	0.79(0.60-0.99)a	293.0(129.1-457.0)a	0.19	0.74
Laguna	1024	1.32(1.09-1.56)b	116.2(68.07-164.3)a	0.32	0.29
Susceptible	1024	4.07(3.41-4.72)c	394.6(240.7-548.4)a		

n: Número de individuos tratados. CE_{50} : Concentración de las proteínas (ng/cm²) que inhibe el 50 % del crecimiento de las larvas en un periodo de siete días. CE_{90} : Concentración de las proteínas (ng/cm²) que inhibe el 90 % del crecimiento de las larvas en un periodo de siete días. Valores con diferentes letras dentro de cada columna son significativamente diferentes a través del no traslape de los límites de confianza con una probabilidad del 95 %. Relación de Resistencia = $CE_{50(95)}$ de la población de campo / $CE_{50(95)}$ de la población susceptible.

En general, a pesar de que algunos estudios indican que las proteínas Cry1, Cry2 y Cry9 son útiles para el control de lepidópteros (Palma *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2015), los resultados de este estudio indican que las proteínas Cry9Aa y Cry1C no son efectivas para *S. frugiperda* por lo que no son una alternativa para su control. Actualmente, ya existen algunas variantes de dichas proteínas, tales como; Cry9Cb1, las cuales son efectivas para otras especies de lepidópteros, con alta actividad insecticida contra, *P. xylostella*, *Ostrinia furnacalis* y *Chilo suppressalis* (Shan *et al.*, 2019), en otro estudio sería interesante evaluar nuevos genes con *S. frugiperda*, ya que la variación en la respuesta a las proteínas Bt depende de la interacción de los genes en su medio (Rivero-Borja *et al.*, 2020).

CONCLUSIONES

Los resultados indican que las proteínas Cry1C y Cry9Aa no fueron tóxicas, por lo que no son una alternativa para el control de gusano cogollero *S. frugiperda*.

LITERATURA CITADA

- Abbott, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18: 265-267. <https://doi.org/10.1093/jee/18.2.265a>
- Avisar, D., Eilenberg, H., Keller, M., Reznik, N., Segal, M. and Sneh, B. 2009. *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1C as a potential bioinsecticide in plants. *Plant Science.* 176: 315-324. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.12.010>

- Bravo, A., S. S. Gill, and M. Soberón. 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*. 49: 423-435. DOI: 10.1016/j.toxicon.2006.11.022
- Bravo, A., Sarabia, S., López, L., Ontiveros, H., Abarca, C., Ortiz, A., Ortiz, M., Lina, L., J. Villalobos, F. J., Peña, G., María-Eugenia., Niñez-Valdez., Soberón, and Quintero. 1998. Characterization of cry Genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* Strain Collection. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4965–4972.
- Casmuz, A., M. L. Juárez, M. G. Socías, M. G. Murúa, S. Prieto, S. Medina, E. Willink, y G. Gastaminza. 2010. Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 69: 209–231. Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/3220/322028487010.pdf>
- FAO. 2019. Regional workshop for Asia sustainable management of fall armyworm. <http://www.fao.org/fall-armyworm/recursos/es/> (Consultada: 5 de marzo de 2020)
- FAO, 2020. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. <http://www.fao.org/fall-armyworm/faw-monitoring/faw-maps/es/> (Consultada: 5 de marzo 2020).
- Finney, D. J. 1971. *Probit analysis*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- Goergen, G., P. L. Kumar., S. B. Sankung., A. Togola and M. Tamo. 2016. First report of outbreaks of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera, Noctuidae), a new alien invasive pest in West and Central Africa. *PLOS ONE*. 11:1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165632>
- Du, L., G. Chen., L. Han and Y. Peng. 2019. Cadherin CsCad plays differential functional roles in Cry1Ab and Cry1C intoxication in *Chilo suppressalis*. *Scientific Reports*. 9: 44451-44455. DOI: 10.1038/s41598-019-44451-5
- Hernández-Martínez, P. Ferre, J. and Escriche, B. 2008. Susceptibility of *Spodoptera exigua* to 9 toxins from *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 97: 245-250. DOI: 10.1016/j.jip.2007.11.001
- Hruska, J. A. 2019. Fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) management by smallholders. *CAB Reviews*, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Viale delle Terme di Caracalla, Rome 00153, Italy. 14 No.43. pg 11. Recuperado de <https://www.cabi.org/cabreviews/FullTextPDF/2019/20193352460.pdf>
- Longfa, F., B. Wang., Z. Zhou., S. Yang., C. Shu., F. Song., A. Bravo., M. Soberón and J. Zhag. 2016. Oligomerization of Cry9Aa in solution without receptor binding, is not related with insecticidal activity. *Electronic Journal of Biotechnology*. 21: 54-57. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.02.005>
- Keller, M., Sneh, B., Strizhov, N., Prudovsky, E., Regev, A., Koncz, C., Schell, J. and Zilberstein, A. 1996. Digestion of delta-endotoxin by gut proteases may explain reduced sensitivity of advanced instar larvae of *Spodoptera littoralis* to Cry1C. *Insect Biochem Mol Biol* 26: 365–373. DOI: 10.1016/0965-1748(95)00102-6
- Montezano, D.G., A. Specht., D. R. Sosa-Gómez., V. F. Roque-Specht., J. C. Sousa-Silva., S. V. Paula-Moraes., J. A. Peterson and T. E. Hunt. 2018. Host plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas. *African Entomology*. 26(2):286–300. <https://doi.org/10.4001/003.026.0286>
- Murúa, M. G., M. T. Vera, S. Abraham, M. L. Juárez, S. Prieto, G. P. Head, and E. Willink. 2008. Fitness and mating compatibility of *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) populations from different host plant species and regions in Argentina. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 101, 639-649. DOI: 10.1603/0013-8746(2008)101[639:FAMCOS]2.0.CO;2

- Nagoshi, R. D., and R. L. Meagher. 2004. Behavior and distribution of the two fall armyworm host strains in Florida. *Fla. Entomol.* 87: 440-448. Recuperado de <https://naldc.nal.usda.gov/download/13380/PDF>
- Naimov, S., Nedyalkova, R., Staykov, N., Weemen-Hendriks, M., Minkov, I. and R.A. de Maagd. 2014. A novel Cry9Aa with increased toxicity for *Spodoptera exigua* (Hübner). *J. Invertebr. Pathol.* 115: 99–101. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2013.11.003>
- Palma, L., Muñoz, D., Berry, C., Murillo, J. and P. Caballero. 2014. *Bacillus thuringiensis* toxins: An overview of their biocidal activity. *Toxins.* 6: 3296–3325. DOI: 10.3390/toxins6123296
- Rivero-Borja, M., J. C. Rodríguez-Maciel., J. A. Urzúa Gutiérrez., G. Silva-Aguayo., D. I. Chandrasena., N. C. Felix-Bermudez. and N. P Storer. 2020. Baseline of Susceptibility to the Cry1F Protein in Mexican Populations of Fall Armyworm. *J. Econ. Entomol.* 113: 390–398. DOI: 10.1093/jee/toz280
- Rodríguez, D. L. A. y A. J. Marín. 2008. Insectos plaga y su control, pp. 29–46 In Rodríguez, M. R, De León, C. [eds.], *El cultivo del maíz. Temas selectos 1*. Colegio de Postgraduados, Mundi Prensa, México.
- SAS Institute Inc., 2012-2016. SAS/STAT: Statistical Analysis System: *Studio University Edition 9.4*. SAS Institute Inc., Cary, NC. USA.
- Shevelev, A. B., Svarinsky, M. A., Karasin, A. I., Kogan, Ya. N., Chestukhina, G. G. and V. M. Stepanov. 1993. Primary structure of cryX1 the novel δ endotoxin related gene from *Bacillus thuringiensis* spp. *galleriae*. *FEBS Lett.* 336: 79–82. DOI: 10.1016/0014-5793(93)81613-5
- Soberón, M., L. Pardo-López, I. López, I. Gómez, B. E. Tabashnik, and A. Bravo. 2007. Engineering modified Bt toxins to counter insect resistance. *Science.* 318: 1640-1642. DOI: 10.1126/science.1146453
- Shan, Y., Shu, C., He, K., Cheng, X., Geng, L. Xiang, W. and J. Zhang. 2019. Characterization of a Novel Insecticidal Protein Cry9Cb1 from *Bacillus thuringiensis*. *J. Agric. Food Chem.* 67: 3781–3788. DOI: 10.1021/acs.jafc.9b00385
- Silva, M. C., Siqueira, H. A. A., Silva, L. M., Marques, E. J. and R. Barros. 2015. Cry proteins from *Bacillus thuringiensis* active against diamondback moth and fall armyworm. *Neotrop. Entomol.* 44: 392–401. DOI: 10.1007/s13744-015-0302-9
- Storer, N. P., J. M. Babcock, M. Schlenz, T. Meade, G. D. Thompson, J. W. Bing, and R. M. Huckaba. 2010. Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. *J. Econ. Entomol.* 103: 1031–1038. DOI: 10.1603/ec10040
- Van Frankenhuyzen, K. 2009. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *J. Invertebr. Pathol.* 101:1-16. DOI: 10.1016/j.jip.2009.02.009
- Zhang, H., Yin, W., Zhao, J., Jin, L., Yang, Y., Wu, S., Tabashnik, B. E. and Wu, Y. 2011. Early warning of cotton bollworm resistance associated with intensive planting of Bt cotton in China. *PLoS ONE* 6: e22874. DOI: 10.1371/journal.pone.0022874