

# Biología y Biotecnología de la Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB). BioCubaFarma.

**Unidad Ejecutora Principal del Resultado:** Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB). BioCubaFarma.

**Autor Yg principal Yg:** Pilar Téllez Rodríguez, Camilo Ayra Pardo

**Otros autores:** Ivis Morán-Bertot, Lianet Rodríguez-Cabrera, Ángela E. Sosa Espinoza\*, Osvaldo Oliva Barbón, Milagros Ponce Castillo, Albis Riverón Hernández, Daily Hernández Hernández, Claudia Rodríguez de la Noval.

**Colaboradores:** María Pilar Rodríguez, Yanyleisis Fernández Parlá, Yohan Trimiño Enrique, Suriam Valdes Fernández, Fidel Rodríguez León, Luis Valentín Pozo, Siomara Portillo Mezquía, Ivón Menéndez Valdés.

**Autor para la correspondencia:** Pilar Téllez Rodríguez

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Ave 31 entre 158 y 190. Cubanacán, Playa. Apartado Postal 6162 Fax: 273 1779. Teléfono: 271 6022 Ext. 3156. E. mail: pilar.tellez@cigb.edu.cu

**Filiación:** CIGB. División de Plantas.

\*CIGB Sección de Seguridad Biológica, Química y Radiológica.

## RESUMEN

Desde 1996 hasta la fecha, los cultivos-Bt (que expresan proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) poseen una superficie sembrada a nivel mundial que supera los 560 millones de hectáreas acumuladas y se prevé que continúe creciendo. La tendencia al incremento está dada por los múltiples beneficios económicos y ambientales que reportan a los países productores. Con el propósito de salvaguardar esta tecnología del riesgo intrínseco de la insecto-resistencia se utilizan diferentes estrategias de manejo, la de 'alta dosis/refugio' es la más empleada en estos manejos. Esta estrategia se refiere al uso de toxinas Bt que ejercen un control eficaz de la plaga, en combinación con un área sembrada con plantas no-Bt en proximidad al cultivo-Bt. El área del refugio se recomienda para aliviar la presión de selección ejercida sobre la plaga, promoviendo el desarrollo de una población susceptible, lo que permite mantener baja la frecuencia de alelos de resistencia en la población. Esta estrategia asume que la ovoposición ocurre al azar, a través de las plantaciones de Bt y refugio. En nuestro trabajo se examinó la ovoposición y la supervivencia de *Spodoptera frugiperda*, en plantaciones de maíz-Bt y su refugio en el área experimental del CIGB durante seis temporadas del cultivo. Posteriormente los datos obtenidos se evaluaron por medio de modelos de simulación y se analizó su impacto sobre la evolución de la insecto-resistencia. Este trabajo **informa por primera vez** que la ovoposición de *S. frugiperda* por planta fue siempre superior en el maíz-Bt que en el refugio, cuando el daño producido por la plaga en el refugio es significativamente superior. Los modelos de simulación mostraron que este comportamiento del insecto acelera su resistencia por la toxina Bt a la cual está expuesto. Este trabajo aporta **nuevos elementos para optimizar el manejo de la insecto-resistencia en los cultivos-Bt y sugiere intervenciones dirigidas a controlar la densidad poblacional de la plaga en el campo**. El trabajo cuenta con una publicación en la revista de alto impacto **BMC Biology (F.I. 7.98)**, presentaciones en congresos internacionales y avales de personalidades reconocidas en la temática y del sistema regulatorio nacional.

### Introducción:

Los cultivos transgénicos constituyen una revolución tecnológica que ha incrementado de manera eficiente las producciones agrícolas. A pesar de la polémica generada en torno a esta tecnología, es incuestionable la acelerada adopción de la misma particularmente en países en desarrollo. Actualmente los cultivos transgénicos ocupan 181 millones de hectáreas a nivel mundial (Clive James, 2015). Dentro de estos cultivos sobresalen la plantas transgénicas que expresan las toxinas insecticidas de *B. thuringiensis*. Los cultivos Bt, como se les ha denominado, revolucionaron la tecnología del control de plagas con un manejo más efectivo, menor uso de los pesticidas e incremento de las producciones. El maíz y el algodón son los cultivos Bt dominantes, y las plagas principales contra las que están diseñados estos cultivos son especies de los órdenes Lepidóptera y/o Coleóptera.

La principal amenaza del éxito prolongado de los cultivos Bt es la evolución de mecanismos de resistencia de los insectos plaga. La resistencia a las toxinas Bt, es controlada frecuentemente por el efecto único de genes con resistencia recesiva a altas dosis de la toxina Bt (Carrière Y y col. 2010). Con el propósito de salvaguardar esta tecnología del riesgo intrínseco de la manifestación en campo de la insecto-resistencia, se hace uso de diferentes estrategias de manejo, la de 'alta dosis/refugio' ha sido recomendada con éxito para el control de este tipo de resistencia. Bajo esta estrategia la mayor cantidad de adultos 'plaga' son susceptibles y emergen del área refugio. Estos individuos se aparean con cualquier polilla homocigótica resistente, que haya emergido del campo Bt, (Huang F y col. 2011; Gould F, 1998), generando una progenie heterocigótica susceptible a la alta dosis de la toxina.

Uno de los primeros casos de insecto resistencia en cultivos Bt fue documentado para *S. frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) en el maíz Bt-Cry1F, con del evento TC1507 en Puerto Rico, (Storer NP y col. 2010). Se consideran dos causas principales en el problema de la resistencia en general: la no estricta adherencia al requerimiento de plantar el refugio (Gassmann AJ y col. 2011; Kruger M, y col. 2011) y que la dosis de la toxina Cry1Fa, expresada en estas plantas, fue baja o variable para conseguir la muerte de los insectos heterocigóticos resistentes (Tabashnik BE y col. 2008, Storer NP y col. 2010, Gassmann AJ y col. 2011).

Hasta el momento se consideraba que la ovoposición de los adultos plagas ocurre al azar, para el funcionamiento del refugio. Los estudios de Hellmich R. y col. 1999, Kjaer C. y col. 2010, Lei Z. y col. 2009 encontraron que las hembras adultas no discriminan entre cultivos transgénicos y sus líneas isogénicas para depositar sus huevos. Sin embargo, estos experimentos solo estudiaron el número de huevos en las plantas sin daños, por tanto esta metodología ignora cualquier efecto potencial posterior provocado por la alimentación de las larvas. El efecto del daño es significativo ya que la liberación de volátiles durante la alimentación de las larvas puede disuadir a la polilla durante la ovoposición. Este comportamiento puede reducir la competencia intraespecífica o la detección por enemigos naturales que utilicen los volátiles de las plantas como señales para la alimentación (De Moraes C y col. 2001, Harmon JP y col. 2003).

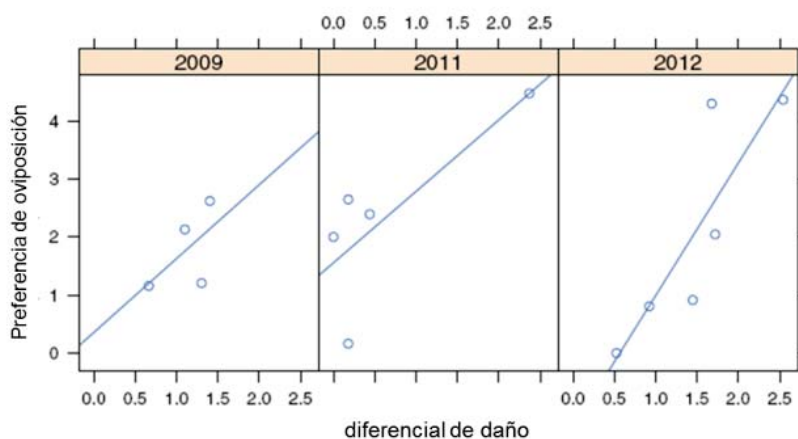
El presente estudio tuvo como objetivo probar la hipótesis de que la preferencia de ovoposición de *S. frugiperda*, puede responder a los diferentes niveles de daño foliar en el maíz convencional en comparación con el maíz Bt. Los estudios de campo cubrieron los períodos seco y húmedo de nuestro país, de condiciones climáticas similares al vecino Puerto Rico, donde fue documentada por primera vez la resistencia en *S. frugiperda* al maíz Bt-Cry1Fa (Storer NP y col. 2010).

## Resultados y Discusión

*La preferencia de ovoposición de S. frugiperda por el maíz Bt esta correlacionada con el nivel de daño en el refugio*

Los datos para el análisis se obtuvieron durante los períodos seco y húmedo desde el 2009 al 2012, en la parcela experimental del CIGB y se tomó en cuenta el daño provocado por la palomilla del maíz según una escala de cuatro niveles. Los resultados de estas observaciones revelaron que pasados los 20 a 25 días después de la siembra, el daño provocado por *S. frugiperda* en la variedad transgénica FR-Bt1 era imperceptible a diferencia del encontrado en la variedad FR-28. El daño observado en la variedad convencional fue alto y estadísticamente significativo respecto a la variedad transgénica (test no paramétrico Kruskal Wallis).

El conteo de puestas de huevo en los dos cultivares durante los seis períodos evaluados reveló que el número encontrado por planta en la variedad Bt, es superior al de la variedad convencional. Según una predicción de ovoposición al azar, lo esperado era de 309 puestas en el refugio; sin embargo solo se hallaron 145 (47%). Al realizar un análisis de la abundancia de *S. frugiperda* y el daño encontrado en el refugio se obtuvo que en la medida que se incrementa el daño en este último, existe una significativa preferencia de ovoposición por el maíz Bt (figura a).



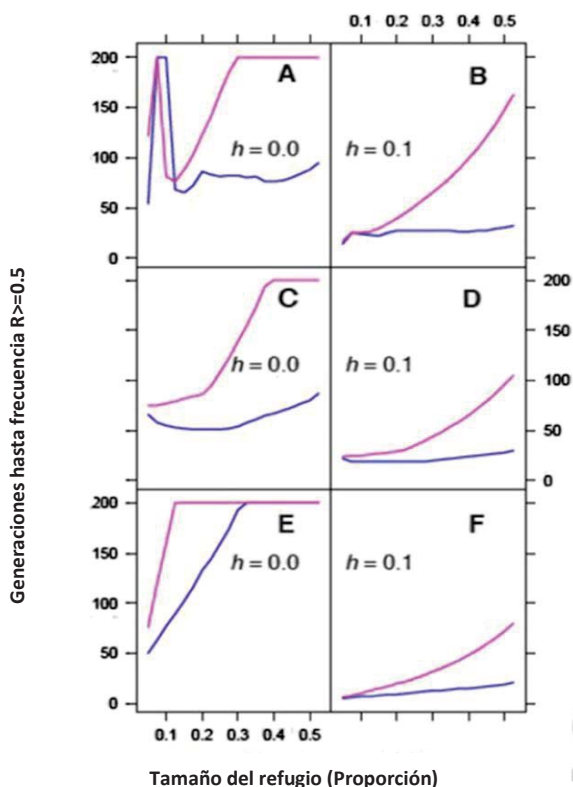
**Figura a:** Marcada preferencia de ovoposición de *Spodoptera frugiperda* con el incremento de daño en el refugio, (df = 1.4, SE = 0.38, t = 3.67, P =0.0037)

*La ovoposición de S. frugiperda, preferentemente en el maíz Bt, tiene un efecto importante en la evolución de la insecto-resistencia*

En este trabajo se investigó el efecto del daño foliar como limitante para la ovoposición en la evolución de la insecto resistencia. Para la realización de los modelos se emplearon los datos obtenidos en campo y resultados provenientes de estudios anteriores. La densidad de larvas en el refugio determinó la tendencia de ovoposición en estos modelos. Se consideraron diferentes regímenes de manejo de la plaga. Los tres escenarios simulados fueron: 1 - modelo de la aplicación de un plaguicida en el refugio, basado en un umbral de 0.25 puestas de huevo por planta, 2- modelo de predación natural exclusivamente en el refugio y, por último, 3- un modelo de predación natural en el maíz Bt y su contraparte convencional.

Los gráficos de la figura b muestran el resultado de estos análisis, que reflejan el comportamiento de la frecuencia de aparición de alelos de resistencia en los mencionados escenarios. Las curvas que representan el comportamiento de la ovoposición al azar, con resistencia recesiva (figura b: A, C y E curva magenta), muestran que el incremento del área de refugio proveerá de un buen control de la resistencia. En estos casos, refugios entre el 10 y el 30% serán apropiados para controlar la resistencia. Como excepción se logrará proveer de un buen control en un margen muy estrecho, con la aplicación de un plaguicida en refugios de menor tamaño. En cambio cuando los alelos son parcialmente dominantes no es posible ejercer ningún control teniendo en cuenta los parámetros establecidos en los modelos, figura b: B, D y F.

Las curvas que representan el comportamiento de la ovoposición, con resistencia recesiva, donde el daño foliar es una limitante para la ovoposición, se aprecia la aceleración de la resistencia, (figura b: A, C y E curva morada). El único escenario que permite un control de la resistencia bajo esta condición, es el escenario donde se maneja la densidad de la plaga en la totalidad del área (cultivo Bt y su refugio) con predadores naturales (figura b: E) y se incrementa el área del refugio por encima del 30%.



**Figura b:** Evolución de la insecto resistencia de una toxina Bt, con ovoposición al azar (purpura) y ovoposición obstaculizada por el daño foliar (azul oscuro).

$h=0$  (alelos de resistencia totalmente recesivos)

$h=0.1$  (alelos de resistencia parcialmente dominantes)

A y B Manejo del refugio con plaguicidas a partir de un umbral de 0.25 puestas de huevo por planta.

C y D Control de la densidad de la plaga por medio de enemigos naturales en el refugio.

E y F Control de la densidad de la plaga por medio de enemigos naturales en el Bt y su refugio.

## Discusión:

En este trabajo se demostró la marcada preferencia de ovoposición de *S. frugiperda* por las plantas Bt sobre las convencionales del refugio cuando este tiene alto nivel de daño, este comportamiento tiene implicaciones en la evolución de la insecto resistencia. Nuestro hallazgo concuerda con resultados de otros estudios, donde solo se utilizaron plantas convencionales. Sparks en 1979 demostró que la ovoposición en esta especie cambia en dependencia de la densidad larval y Signoretti y col. en 2012 probaron la preferencia de las hembras adultas por los volátiles de las plantas de maíz no dañadas.

Es importante destacar que en nuestro trabajo, se controló cualquier efecto de atracción provocado por el fondo genético de las plantas empleadas en el ensayo, ya que la variedad convencional empleada en el refugio (FR-28), es la variedad de origen de la transgénica (FR-Bt1) y el porcentaje de similitud entre ambas es de un 96.75%.

La conducta descrita para las hembras adultas de evitar plantas dañadas por individuos de la propia especie, al momento de la ovoposición, puede explicarse como un comportamiento adaptativo, que persigue la protección de la progenie de la competencia intra-específica (Penaflor y col., 2011 y Fatouro y col., 2012).

Los resultados del modelo presentado en este trabajo muestran que la dinámica poblacional de la plaga en el refugio, ejerce un fuerte impacto en la eficacia de la estrategia de “alta dosis/refugio”, siempre que el daño foliar determine la densidad larval. Esta conclusión está respaldada por reportes sobre la evolución de la resistencia de *S. frugiperda* al maíz Bt-Cry1F en Puerto Rico. El surgimiento de esta población resistente pudo estar influenciado por la ocurrencia de fuertes sequías, que provocaron la escasez de refugios naturales y por tanto la concentración de la plaga en los cultivos Bt irrigados y con un alto nivel de daño en el refugio. Se estima que la evolución de la resistencia en Puerto Rico ocurrió entre las 30 y 40 generaciones de la plaga, Storer y col. 2010.

**Nuestro hallazgo sobre la preferencia de ovoposición de *S. frugiperda* por plantas del maíz Bt sobre las plantas convencionales del refugio cuando el daño en este es severo, tiene un importante potencial en el manejo de la resistencia de los cultivos Bt y abre nuevas posibilidades de manejo para minimizar este riesgo.**

Entre las posibilidades de manejo sugerimos, plantar refugios que conserven su atractivo para la ovoposición, a pesar del daño causado por la plaga. Los manejos integrados de plagas sugieren el uso de feromonas, hospederos naturales entre otros.

Los cultivos Bt no son inmunes a la evolución de la insecto-resistencia, minimizar este riesgo permite prolongar su uso, que ha proporcionado un salto en el desarrollo agrícola de los países que han adoptado esta tecnología. Para cualquiera de los sistemas de plantas autoinsecticidas con una o varias toxinas de Bt, la eficacia del refugio puede requerir todavía del perfeccionamiento de su manejo, Ghimire M.N. y col. 2011, Roush R.T. 1998, Brévault T. y col. 2013.

La función del refugio puede verse disminuida por la preferencia de la plaga específica a ovopositar en plantas no dañadas, aspecto mucho más relevante en presencia de especies polivoltinas o en condiciones que favorecen que se solapen varias generaciones de la plaga.

Por tanto se impone una estrategia de manejo del refugio más sólida, donde converjan diferentes mecanismos para el control de la plaga del modo más amigable con el medio ambiente y prolongando el uso de esta tecnología.

## NOVEDAD CIENTÍFICA DEL TRABAJO

Se demostró por primera vez, que la preferencia de ovoposición de *S. frugiperda* por las plantas Bt, sobre las convencionales, es significativamente superior cuando existe alto nivel el daño en refugio. Este comportamiento tiene implicaciones en la evolución de la insecto-resistencia.

2011, 140:1–16.

## IMPORTANCIA PRÁCTICA PRINCIPAL DEL TRABAJO

En este trabajo se identifica la correlación positiva que existe entre la preferencia de ovoposición de *S. frugiperda* por el maíz-Bt y el daño foliar en el refugio. Esta correlación es un elemento a tener en cuenta para controlar la densidad poblacional de la plaga y lograr un manejo óptimo de la insecto-resistencia en plantas Bt. Este conocimiento permite trabajar en la dirección de aplicar estrategias de manejo asociadas al uso del maíz-Bt, que ejerzan un mejor control sobre la densidad poblacional de la plaga, y prolonguen el tiempo de vida de esta tecnología.

### Bibliografía:

Brévault T, Heuberger S, Zhang M, Ellers-Kirk C, Ni X, Masson L, Li X, Tabashnik BE, Carrière Y: Potential shortfall of pyramided transgenic cotton for insect resistance management. Proc Natl Acad Sci U S A 2013, 110:5806–5811.

Clive James, Global status of commercialized Biotech/GM crops: 2015

Carrière Y, Crowder DW, Tabashnik BE: Evolutionary ecology of insect adaptation to Bt crops. Evol Appl 2010, 3:561–573.

De Moraes C, Mescher M, Tumlinson J: Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel conspecific females. Nature 2001, 410:577–580.

Delgado J., Hernández J., Velázquez C., Rangel E. , Chaurand R. , Garcidueñas R. , Sánchez G. Evaluación y validación de la efectividad biológica de 14 insecticidas en maíz contra el gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*) en Valle de Santiago, Guanajuato.

Fatouros NE, Lucas-Barbosa D, Weldegergis BT, Pashalidou FG, van Loon JJ, Dicke M, Harvey JA, Gols R, Huigens ME: Plant volatiles induced by herbivore egg deposition affect insects of different trophic levels. PLoS One 2012, 7:8.

Gassmann AJ, Petzold-Maxwell JL, Keweshan RS, Dunbar MW: Field-evolved resistance to Bt maize by western corn rootworm. PLoS One 2011, 6:e22629.

Ghimire MN, Huang F, Leonard R, Head GP, Yang Y: Susceptibility of Cry1Ab-susceptible and -resistant sugarcane borer to transgenic corn plants containing single or pyramided *Bacillus thuringiensis* genes. Crop Prot 2011, 30:74–81.

Gould F: Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. Ann Rev Entomol 1998, 43:701–726.

Harmon JP, White JA, Andow DA: Oviposition behavior of *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) in response to potential intra- and interspecific interactions. Environ Entomol 2003, 32:334–339.

Hellmich R, Higgins L, Witkowski J, Campbell J, Lewis L: Oviposition by European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) in response to various transgenic corn events. J Econ Entomol 1999, 92:1014–1020.

Huang F, Andow DA, Buschman LL: Success of the high-dose/refuge resistance management strategy after 15 years of Bt crop use in North America. Entomol Exp Appl 2011, 140:1–16.

- Kieran O’Keeffe, Maize Growth & Development Chapter 2: Vegetative Growth| p19, PROCROP, State of New South Wales through NSW Department of Primary Industries 2009.
- Kjaer C, Damgaard C, Lauritzen A: Assessment of effect of Bt-oilseed rape on large white butterfly (*Pieris brassicae*) in natural habitats. *Entomol Exp Appl* 2010, 134:304–311.
- Kruger M, Van Rensburg J, Van den Berg J: Resistance to Bt maize in *Busseola fusca* (Lepidoptera: Noctuidae) from Vaalharts. *S Afr Environ Entomol* 2011, 40:477–483.
- Lei Z, Liu T, Greenberg S: Feeding, oviposition and survival of *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae) on Bt and non-Bt cottons. *Bull Entomol Res* 2009, 99:3.
- Penafior MF, Erb M, Robert CA, Miranda LA, Werneburg AG, Alda Dossi FC, Turlings TCJ, Bento JM: Oviposition by a moth suppresses constitutive and herbivore-induced plant volatiles in maize. *Planta* 2011, 234:207–215.
- Rabí O, Permuy N, Garcia E: Nueva variedad de maíz FR-28 con alto potencial de rendimiento. *Agrotécnia* 1997, 27:43–44.
- Raymond B, Sayyed AH, Hails RS, Wright DJ: Exploiting pathogens and their impact on fitness costs to manage the evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *J Appl Ecol* 2007, 44:768–780
- Roush RT: Two-toxin strategies for management of insecticidal transgenic crops: can pyramiding succeed where pesticide mixtures have not? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1998, 353:1777–1786.
- Signoretto AG, Penafior MF, Bento JM: Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), female moths respond to herbivore-induced corn volatiles. *Neotrop Entomol* 2012, 41:22–26.
- Sosa M. A. Estimación de daño de *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) en maíz con infestación natural en tres fechas de siembra en el noreste santafesino. INTA EEA Reconquista. Información para Extensión N° 70:39-45.2002
- Sparks AN: Review of the biology of the fall armyworm (Lepidoptera, Noctuidae). *Fla Entomol* 1979, 62:82–87
- Storer NP, Babcock JM, Schlenz M, Meade T, Thompson GD, Bing JW, Huckaba RM: Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. *J Econ Entomol* 2010, 103:1031–1038.
- Storer N, Kubiszak M, King JJ, Thompson G, Santos A: Status of resistance to Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: lessons from Puerto Rico. *J Invert Pathol* 2012, 110:294–300.
- Tabashnik BE, Gassmann AJ, Crowder DW, Carriere Y: Field-evolved resistance to Bt toxins. *Nat Biotechnol* 2008, 26:1074–1076
- The R Project for Statistical Computing. <http://www.r-project.org>.