



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE BABAHOYO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA



TRABAJO DE TITULACIÓN

Componente práctico del Examen de Grado de carácter
Complejivo, presentado al H. Consejo Directivo de la Facultad, como
requisito previo a la obtención del título de:

INGENIERO AGRÓNOMO

TEMA:

“Inserción de la proteína Cry de *Bacillus thuringiensis* y su
expresión como bio insecticida en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.)”

AUTOR:

Alex Steven Llanos Marmolejo

TUTOR:

Ing. Agr. Walter Oswaldo Reyes Borja, PhD

Babahoyo – Los Ríos – Ecuador

2021

DEDICATORIA

A Dios quien me da la bendición y fortaleza para avanzar día a día en mis estudios, a mis queridos padres, Danilo Llanos y Nerida Marmolejo Vera, por su sacrificio, dedicación, y apoyo incondicional durante todos estos años de estudio y por esta razón el más magnánimo estímulo para dar cumplimiento a unos de mis más grandes objetivos de mi vida.

AGRADECIMIENTO

Mi agradecimiento profundo a la Universidad Técnica de Babahoyo, Facultad de Ciencias agrícolas, por haberme dado la oportunidad de culminar mis estudios. A mi Tutor de tesis Ing. Walter Reyes PhD. por su aporte desinteresado a la superación de nuevas generaciones de profesionales que con su sabiduría y excelencia en el área de investigación ha brindado sus conocimientos. A mis maestros formadores de juventudes profesionales y a mis compañeros.

RESUMEN

El cultivo de maíz (*Zea mays* L.), juega un papel importante en aspectos de seguridad alimentaria, ya sea en la alimentación humana, así como en la alimentación animal. Por su amplia distribución e incidencia durante todo el año, el gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* Smith, 1797) es una de las plagas más nocivas de las regiones tropicales de América, el uso de insecticidas de origen sintético ha sido la principal herramienta para controlar poblaciones a un nivel que no ocasionen daños económicos. No obstante, una herramienta de la biotecnología para minimizar las pérdidas ocasionadas por el gusano cogollero, ha sido utilizada mediante la aplicación de la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt). El presente estudio tuvo como objetivos Describir el proceso de inserción de la proteína Cry de *Bacillus thuringiensis* y detallar los efectos como bio insecticida. Los genes que codifican para las proteínas Cry, se han utilizado ampliamente en cultivos modificados genéticamente, estos cultivos transgénicos pueden producir cristales de Bt que se vuelven resistentes a los insectos. Se recomienda establecer programas biotecnológicos para aislar cepas de Bt para la elaboración de bio insecticidas a partir de las proteínas Cry para su aplicación en el manejo integrado de plagas del cultivo de maíz y otros rubros.

Palabras clave: *Bacillus thuringiensis*, proteínas Cry, cultivos transgénicos.

SUMMARY

The cultivation of corn (*Zea mays* L.) plays an important role in aspects of food safety, whether in human food, as well as in animal nutrition. Due to its wide distribution and incidence throughout the year, the fall armyworm (*Spodoptera frugiperda* Smith, 1797) is one of the most harmful pests in the tropical regions of America. The use of synthetic insecticides has been the main tool to control populations at a level that does not cause economic harm. However, a biotechnology tool to minimize the losses caused by the fall armyworm has been used by applying the *Bacillus thuringiensis* (Bt) bacterium. The present study aimed to describe the insertion process of the Cry protein from Bt and to detail the effects as a bio-insecticide. The genes that code for Cry proteins have been used extensively in genetically modified crops, these transgenic crops can produce Bt crystals that become resistant to insects. It is recommended to establish biotechnological programs to isolate Bt strains for the elaboration of bio-insecticides from Cry proteins for their application in the integrated pest management of corn crops and other items.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, Cry proteins, transgenic crops.

Contenido

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
RESUMEN	iv
SUMMARY	v
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	3
MARCO METODOLÓGICO.....	3
1.1. Definición del tema caso de estudio.....	3
1.2. Planteamiento del problema.....	3
1.3. Justificación	4
1.4. Objetivos	5
1.4.1. General	5
1.4.2. Específicos.....	5
1.5. Fundamentación teórica.....	5
1.6. Proceso de inserción de la proteína Cry.....	5
1.6.1. Importancia del cultivo de maíz	5
1.6.2. Principales insectos plagas en el cultivo de maíz.....	6
1.6.3. Control de insectos plaga en el cultivo de maíz.....	8
1.6.4. Bio insecticidas a base de <i>Bacillus thuringiensis</i>	9
1.6.5. Plantas de maíz modificado genéticamente	11
1.6.6. Efectos de la Proteína Cry en cultivares de maíz	12
1.6.7. Métodos de inserción de los genes de <i>Bacillus</i> en maíz. ...	14
1.7. Hipótesis	16
1.8. Metodología de la investigación	16
CAPÍTULO II.....	17

RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN	17
2.1. Desarrollo del caso	17
2.2. Situaciones detectadas (hallazgos)	17
2.2.1. Proceso de inserción de la proteína Cry.....	17
2.2.2. Efectos de la Proteína Cry en cultivares de maíz	18
2.3. Soluciones planteadas	19
2.4. Conclusiones	20
2.5. Recomendaciones (propuestas para mejorar el caso)	20
BIBLIOGRAFÍA.....	22

INTRODUCCIÓN

El cultivo de maíz (*Zea mays* L.), juega un papel importante en aspectos de seguridad alimentaria, ya sea en la alimentación humana, así como en la alimentación animal. Además, a partir de este rubro, es posible producir una amplia gama de productos, tales como: combustibles, bebidas, polímeros, entre otros (Early et al. 2018).

En las últimas décadas, el cultivo de maíz experimentó un alto nivel tecnológico y dejó de ser un cultivo de subsistencia, destacándose en un cultivo comercial más eficiente (Contini et al. 2019). Sin embargo, estas tecnologías se ven seriamente afectadas por problemas fitosanitarios. Entre ellos, los insectos plagas, los mismos que reducen significativamente la productividad (Oerke y Dehne 2004).

El gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* Smith, 1797) (Lepidóptera: Noctuidae) es una de las plagas más nocivas de las regiones tropicales de América. Por su amplia distribución e incidencia durante todo el año (Mendes et al. 2011), el uso de insecticidas de origen sintético ha sido la principal herramienta para controlar poblaciones a un nivel que no ocasionen daños económicos.

Sin embargo, en muchas ocasiones no se ha logrado dicho propósito, lo cual resulta en mayor riesgo de contaminación y aumento de costos de producción (Polato y Oliveira 2011). Además de eso, las herramientas químicas son frecuentemente incompatibles con métodos de control biológico (Early et al. 2018).

Aunque los métodos culturales y biológicos sean viables técnicamente, factores como: extensión del área cultivada, fechas de siembra y nivel tecnológico de los productores, la adopción de estos métodos de control es limitado (Mendes et al. 2011)

No obstante, una herramienta de la biotecnología para minimizar las

pérdidas ocasionadas por el gusano cogollero, ha sido utilizada mediante la aplicación de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Portela-Dussán et al. 2013)

Los productos a base de la introducción de los genes Cry de Bt, han sido satisfactorios en el control de insectos plagas. La bacteria Bt se caracteriza por la producción de un cristal paraesporal en la célula madre, la cual contienen delta-endotoxinas activas, afectan especialmente larvas de Lepidópteros (Akram Ahmadpour et al. 2017).

CAPÍTULO I

MARCO METODOLÓGICO

1.1. Definición del tema caso de estudio

El presente documento trata sobre la temática correspondiente a Inserción de la proteína Cry de *Bacillus thuringiensis* y su expresión como bio insecticida en el cultivo de maíz.

El uso de herramientas tecnológicas en el campo de la biotecnología, ha permitido reducir significativamente la carga química en el cultivo de maíz a partir de la inserción de bacteria Bt mediante la expresión de las toxinas Cry.

1.2. Planteamiento del problema

El cultivo de maíz es uno de los principales rubros que genera ingresos económicos a todos los actores involucrados en el agro negocio. Durante su ciclo vegetativo es afectado por un sin número de problemas fitosanitarios, entre ellos, *Spodoptera frugiperda*. Este insecto ocasiona daños significativos al cultivo, ocasionando mermas en la productividad.

Ante esta situación, los productores hacen uso de diferentes ingredientes activos (solos y combinados) para controlar las poblaciones de *S. frugiperda*, a fin de evitar daños económicos. Sin embargo, el uso indebido de herramientas químicas resulta en resurgencia de la plaga, aumento de costos de producción y daños ambientales.

1.3. Justificación

La importancia del cultivo de maíz se caracteriza por las diversas formas de uso, la misma que va desde la alimentación animal hasta la industria de alta tecnología.

Sin embargo, el cultivo de maíz, durante su ciclo de vida es afectada por un sin número de plagas, las mismas que merman significativamente la productividad, ocasionado pérdidas millonarias en todo el mundo.

Entre las plagas, el principal insecto invasor del cultivo de maíz es *S. frugiperda*. Para el manejo de las poblaciones de este insecto, las prácticas más comunes son: el uso de tratamientos químicos en la semilla y aplicaciones consecutivas de insecticidas de amplio espectro. No obstante, estas prácticas no han sido satisfactorias.

El uso de herramientas tecnológicas a partir de la biotecnología se ha logrado aprovechar los beneficios de la bacteria Bt mediante la expresión de las toxinas Cry. Esta tecnología ocupa el segundo lugar entre las plantas genéticamente modificadas con mayor empleo y distribución, seguido de las plantas resistentes a herbicidas.

Este tipo de tecnología permite reducir significativamente la carga química en el cultivo de maíz, ya que la toxina es producida por la misma planta.

Ante lo expuesto, con la presente revisión bibliográfica, se plantea describir el modo de acción de las toxinas de Bt ante la ocurrencia de poblaciones de *S. frugiperda* en el cultivo de maíz.

1.4. Objetivos

1.4.1. General

- Conocer el proceso de inserción de la proteína Cry de *Bacillus thuringiensis* y su expresión como bio insecticida en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.).

1.4.2. Específicos

- Describir el proceso de inserción de la proteína Cry de *Bacillus thuringiensis* y su expresión como bio insecticida en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.)
- Detallar los efectos de la proteína Cry de *Bacillus thuringiensis* y su expresión como bio insecticida en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.).

1.5. Fundamentación teórica

1.6. Proceso de inserción de la proteína Cry.

1.6.1. Importancia del cultivo de maíz

En la actualidad, en el mundo se produce cerca de 2,4 billones de toneladas (t) de granos. Mientras que en la cosecha 2019 y 2020 se alcanzó 1,12 billones de t de producción. Ese volumen representa más del 45 % del total de granos producidos en el mundo (Eicholz et al. 2020).

A nivel mundial, el maíz es uno de los cultivos alimentarios básicos. En el mundo, ocupa el segundo lugar después del trigo en producción. El maíz es un cultivo versátil que se cultiva en una variedad de zonas agroclimáticas (Rajesh Singh y Kumar 2017).

El cultivo de maíz es un cultivo de importancia, ya sea económica como social. Representa para los pequeños, medianos y grandes productores la mayor versatilidad de sustentabilidad alimentaria. Es decir, el hombre lo puede consumir

bajo diferentes formas de preparación. Además, la parte aérea de la planta puede ser suministrada a los animales a través de su ensilaje (Acosta 2009).

Además de ser empleado para la alimentación humana y animal, es destinado a la producción de biocombustible (etanol), fabricación de diversos productos como medicamentos, pegamentos y otros (Eicholz et al. 2020).

En Ecuador, en el año 2016 la superficie sembrada fue de 485 696 ha y la producción alcanzada fue 1 667 704 t, el rendimiento promedio por ha fue aproximadamente 3,17 t, siendo la producción de maíz orientada principalmente a los tipos duro y suave de color amarillo; el rendimiento promedio del maíz amarillo duro en los años 2015 y 2016, considerando dos ciclos de siembra fue superior a 5,0 t ha⁻¹; este aumento significativo en la productividad podría atribuirse principalmente a la utilización de híbridos de altamente productivos (Caviedes 2019).

1.6.2. Principales insectos plagas en el cultivo de maíz

El cultivo de maíz es producido en épocas y zonas climáticamente propicias al desarrollo de innumerables especies de insectos y de otros organismos fitófagos. Durante las etapas fenológicas del cultivo, existe la presencia de especies de artrópodos, aunque no todos sean considerados plagas desde el punto de vista económico (Valicente 2015).

Las regiones productoras de maíz presentan un sin número de insectos plagas que afectan desde la semilla, plántulas y plantas en las primeras fases de desarrollo, cuyos daños se traducen en la reducción de poblaciones de plantas y succión de savia, acompañado de inyección de toxinas(chinches). En el caso de los defoliadores, pueden ocasionar la reducción significativa de área fotosintética y en caso de los insectos chupadores, la transmisión de agentes fitopatogénicos (Eicholz et al. 2020).

Respecto a esto, en las zonas dedicadas a la producción intensiva de maíz

(monocultivo), existe una sobre oferta de alimentos para los insectos plagas durante todo el año. Sin embargo, para clasificar la plaga en principal o secundaria, se debe considerar la importancia del daño que causa en el cultivo (Urretabizkaya 2018).

No obstante, el monitoreo de la ocurrencia de los insectos plagas en el cultivo, definiendo las plagas principales y secundarias es fundamental en la toma de decisiones respecto al manejo de las poblaciones de insectos. El monitoreo debe ser realizado para todos los insectos durante el ciclo, es decir, desde el inicio hasta la producción del cultivo (Gray 2011).

En la Tabla 1, se presenta un listado de las principales plagas que afectan el cultivo de maíz.

Tabla 1. Principales insectos plagas que afectan el cultivo de maíz.

Nombre científico	Órgano que afecta
<i>Diloboderus</i> sp	Raíz
<i>Phyllophaga</i> sp	Raíz
<i>Diabrotica</i> sp	Raíz
<i>Elasmopalpus lignosellus</i>	Tallo
<i>Agrotis ipsilon</i>	Tallo
<i>Spodoptera frugiperda</i>	Tallo – hoja
<i>Dichelops melacanthus</i>	Tallo
<i>Mocis latipes</i>	Hoja
<i>Rhopalosiphum maidis</i>	Hoja
<i>Dalbulus maidis</i>	Hoja

<i>Frankliniella</i> sp	Hoja
<i>Peregrinus maidis</i>	Tallo – hoja
<i>Helicoverpa zea</i>	Panícula
<i>Diatraea saccharalis</i>	Tallo
<i>Euxesta</i> sp	Tallo

(Valicente 2015, Eicholz et al. 2020)

1.6.3. Control de insectos plaga en el cultivo de maíz

Entre las estrategias del manejo, el reconocimiento junto al monitoreo de plagas primarias o secundarias, es fundamental para la toma de decisiones de qué y cuándo aplicar las diferentes herramientas de manejo integrado (Little et al. 2019).

Una de las estrategias más usada es el tratamiento de semillas, con este método se procura evitar daños de insectos del suelo, principalmente en áreas de monocultivo (Valicente 2015). También es importante el uso de herramientas químicas que presenten cierto grado de selectividad a los enemigos naturales (Nyamwasa et al. 2018).

Respecto al control cultural en el cultivo de maíz, existen diversas prácticas de manejo que se implementan en las zonas productoras, cuyo fin es crear condiciones desfavorables al desarrollo de la plaga. Entre ellas se cita: la destrucción de residuos de cosecha, eliminación de plantas hospederas y en combinación con el control biológico, se realizan aplicaciones de biocontroladores para parasitar las pupas de insectos plagas (Urretabizkaya 2018).

Por otro lado, el uso de las herramientas químicas para el control de insectos plaga en el cultivo de maíz, es la práctica más común hace muchos años. Entre los principales ingredientes activos para el control de insectos plaga

se menciona los carbamatos, inhibidores de síntesis de quitina, neonicotinoides, espinosinas, órganos fosforados, piretroides y otros (Flores 2010).

No obstante, los efectos que posee la aplicación de estas herramientas químicas han sido adaptados efectivamente, siendo una estrategia de amplio espectro y de acción rápida. Sin embargo, el uso indiscriminado de insecticidas ha contribuido de manera significativa a la reducción de enemigos naturales, contaminación del medio ambiente e intoxicación de personas (Cruz et al. 2015).

Por lo anterior expuesto, es necesario el uso de herramientas más amigables con la salud de las personas y el medio ambiente. El uso de insecticidas biológicos es considerado una de las alternativas más viable y segura. Este método de control consiste en utilizar organismos vivos para controlar poblaciones de insectos plagas (Carreras 2011).

Entre los microorganismos entomopatógenos, se destaca la bacteria *Bacillus thuringiensis*, la cual ha sido objeto de diversos estudios en el control de insectos plaga, debido a su mecanismo de acción, el mismo que produce parálisis intestinal e impide que la plaga siga alimentándose una vez ingerida (Bravo y Salazar 2011).

Este método de control no es del todo aceptable, debido al tiempo requerido para ejercer su acción, lo cual se prolonga más en comparación a los efectos obtenidos con insecticidas de síntesis química. Sin embargo, a pesar de ello se ha considerado utilizar este método de control en sistemas de producción cuyo objetivo es reducir la carga química (Hernández-Trejo et al. 2019).

1.6.4. Bio insecticidas a base de *Bacillus thuringiensis*

En la actualidad, existe la necesidad de contar con herramientas seguras y efectivas para el control de plagas, alternativas a los insecticidas de síntesis química (Hernández-Trejo et al. 2019).

Dicho esto, el uso de bio insecticidas fue ganando importancia debido a su eficacia y menor impacto con el medio ambiente. El control con insecticidas

biológicos consiste en utilizar enemigos naturales y sus productos para disminuir poblaciones de plagas (Rodríguez et al. 2016).

El microorganismo más exitoso en cumplir con los objetivos del control biológico es la bacteria *Bacillus thuringiensis*, este posee una toxicidad selectiva debido a su corto rango de especificidad y gracias a ello genera un impacto muy bajo en el medio ambiente (Sauka y Benintende 2008).

B. thuringiensis es una bacteria gram positiva, que mide entre 3 y 5 μm de largo por 1 a 1,2 μm de ancho. Es un microorganismo anaerobio facultativo y su característica principal es que durante el proceso de esporulación produce una inclusión parasporal formada por uno o más cuerpos cristalinos de naturaleza proteica, que son tóxicos para diferentes insectos del orden lepidóptero, coleóptero, dípteros, himenópteros y ortópteros. Además, actúa controlando poblaciones de nematodos, protozoarios, hongos, y algunos otros organismos. Estas proteínas se llaman Cry (del inglés, Crystal) y constituyen la base del insecticida biológico más difundido a nivel mundial (Sauka y Benintende 2008).

Los cristales de *B. thuringiensis* son ingeridos y luego solubilizados en el intestino medio del insecto plaga, tras lo cual se liberan las proteínas cristalinas en forma de protoxinas. Estas no producirán el daño por sí misma, sino que deberán ser procesadas por enzimas proteasas intestinales para generar las toxinas activas que llevarán a la muerte de la larva (Bravo et al. 2004).

Bajo su forma monomérica, las toxinas atraviesan la membrana peritrófica y se unen de forma univalente a la caderina, con gran afinidad en la cara apical de la membrana epitelial. Luego, se inicia una cascada de señalización dependiente del ion magnesio que sería responsable de la muerte celular (Griko et al. 2007).

Desde su descubrimiento como bio insecticida microbiano, *B. thuringiensis* ha sido ampliamente utilizado para controlar plagas de importancia económica. La gran variedad de formulaciones a base de cristales complejos de esporas destinados a ser ingeridos por el insecto objetivo, son el resultado de muchos años de investigación (Nava-Pérez et al. 2012).

No obstante, se han hecho muchos esfuerzos para aumentar la efectividad en campo de los bio insecticidas, estos avances tienden a enfatizar el uso de ingredientes específicos o métodos para alcanzar este efecto particular deseado. Además, se ha incursionado en el uso de diferentes químicos orgánicos e inorgánicos que protejan contra la luz solar. Así como también, aumentar la persistencia como consecuencia del mejoramiento de la formulación (Rosas-García 2008).

1.6.5. Plantas de maíz modificado genéticamente

Las plantas modificadas genéticamente ofrecen ventajas fundamentales en relación q las técnicas convencionales de mejoramiento genético. Entre estas ventajas se cita que:

- Los genes que se van a incorporar pueden provenir de cualquier especie, por ejemplo, un gen de una bacteria del suelo puede insertarse en el genoma del maíz.
- Se puede introducir un único gen nuevo preservando en su descendencia el resto de los genes de la planta original.
- El proceso de modificación demora mucho menos tiempo que el necesario para el mejoramiento por cruzamiento.

Para la producción de un cultivo transgénico deben cumplirse esencialmente tres etapas: introducción del gen de interés en las células vegetales (transformación); regeneración de la planta completa a partir de las células transformadas, y transferencia - por cruzamiento- de la característica deseada a variedades de alto rendimiento (Levitus 2006).

El mayor avance en el uso de la bacteria *B. thuringiensis* ha sido la transformación de diferentes cultivares con la finalidad de expresar las toxinas Cry. Estas plantas modificadas, también conocidas como “plantas *Bt* “presenta ventaja respecto a los bio insecticidas, pues no necesita la aplicación de formulaciones a base de *B. thuringiensis*, ya que la propia planta se encarga de producir la toxina (Pinto 2008).

Así, cuando las larvas de lepidóptero intentan alimentarse de la hoja o del tallo del maíz *Bt*, las toxinas Cry se activan en el sistema digestivo del insecto y se adhieren a su epitelio intestinal, alterando el equilibrio osmótico del intestino. Esto provoca la parálisis del sistema digestivo del insecto el cual deja de alimentarse y muere a los pocos días (Levitus 2006).

Respecto a esto, hay relatos en que señalan la pérdida de resistencia de las plantas *Bt* a *S. frugiperda*. Este fenómeno ocurre comúnmente en los cultivos mejorados genéticamente, considerando que todo ser vivo tiene habilidades de readecuarse bajo situaciones de estrés (Soares et al. 2017).

A pesar de las variaciones de la resistencia en ciertos materiales de maíz *Bt*, es importante que la cantidad de proteína Cry sea producida en cantidades suficientes para asegurar el control de las plagas sin que se perjudique la producción (Burtet et al. 2017).

1.6.6. Efectos de la Proteína Cry en cultivares de maíz

Esta bacteria puede encontrarse en el suelo, residuos de granos, polvo, agua, materia vegetal, insectos y otros ambientes. La bacteria *B. thuringiensis* (*Bt*) puede ser caracterizada por su habilidad de formar cristales proteicos durante la fase estacionaria y o esporulación. El cristal proteico también llamado delta-endotoxinas posee propiedades insecticidas específicas. Este cristal proteico es responsable del 20 – 30 % de la proteína total de la célula y puede tener varias formas: piramidal, esféricos, rectangulares, cuboides e irregulares (Figura 1).

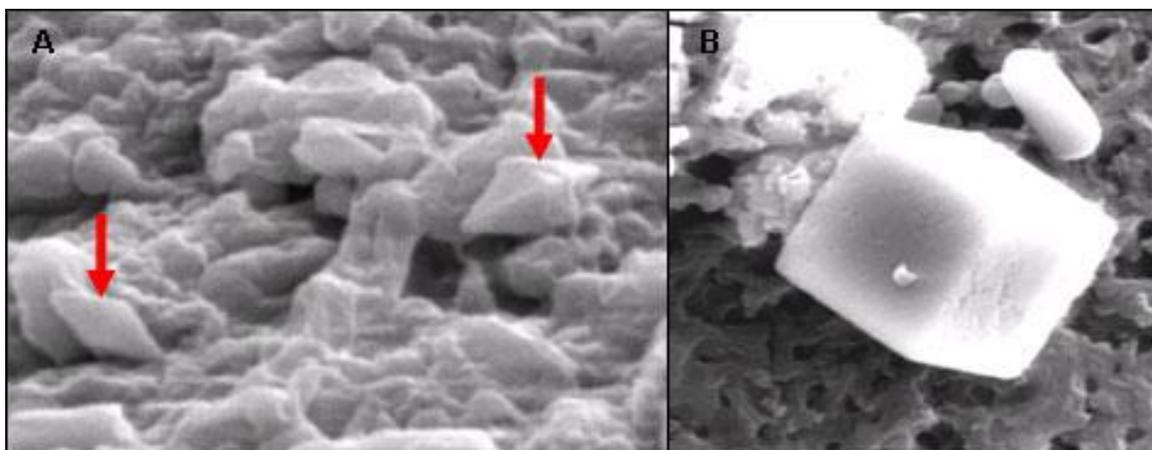


Figura 1. Cristal de cepas de *Bacillus thuringiensis*. (A) forma piramidal, (B) forma cuboide (Valicente y Souza 2004).

Cepas diferentes de *Bt* pueden mostrar variación en el grado de toxicidad. Siendo que una cepa puede ser altamente toxica contra una especie de plaga, mientras que la misma cepa puede permanecer inactiva con otra. Existen algunas combinaciones que muestran toxicidad sinérgica en relación con los lepidópteros. Por tal motivo, las cepas aisladas deben ser evaluadas *in vitro* contra *S. frugiperda* y posterior caracterización de las cepas más eficientes, considerando apenas las que presenten eficacia superior al 75 % (Carneiro et al. 2009).

La reacción a la cadena polimerasa (PCR) es una de las técnicas moleculares más usadas en la caracterización de *B. thuringiensis*. Respecto a esto, se caracterizó una colección mexicana y se determinó que genes de las cepas cry1D y cry1C resultaron más tóxicos para *S. frugiperda* y *S. exigua* (Bravo et al. 1998).

No obstante, la principal limitante de la transgénesis es la falta de precisión respecto al lugar de la inserción del transgén en el genoma receptor, con posibles efectos negativos en la expresión de otros genes. Por ello, se han desarrollado nuevos métodos que permiten elevar el porcentaje de éxito mediante la incorporación del ADN recombinante en sitios específicos del genoma de las células receptoras, como las tecnologías de “dedos de Zinc” –ZFNs–20, “TALENs”21 y otras, que procuran llevar a cabo una recombinación homóloga o un cambio de bases en la región específica del ADN a modificar (Jouve de la Barreda 2020).

En el proceso de aislamiento e identificación de la bacteria *B. thuringiensis* se deben seguir los siguientes procedimientos:

- Colecta de muestra y proceso de aislamiento (Baig y Mehnaz 2010)
- Identificación (Logan 2009)
- Formación de cristales de parasporales
- Construcción de un banco de cepas nativas de *B thuringiensis*
- Elaboración de bioensayos para seleccionar las cepas nativas más eficaces
- Extracción de ADN mediante lisis celular (Juárez-Pérez et al. 1997)

- Amplificación de genes Cry (Ben-Dov et al. 1997)

Para la producción de maíz *Bt*, existen tres requisitos básicos: 1) regeneración *in vitro* del tejido vegetal que será transformado, 2) la inserción del gen Cry en el genoma del maíz, 3) la construcción genómica, con genes Cry y marcadores de selección (Carneiro et al. 2009).

1.6.7. Métodos de inserción de los genes de *Bacillus* en maíz.

Para controlar lepidópteros y coleópteros, los genes que expresan las proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) son transferidos a los cultivos. Los cultivos Bt expresan continuamente proteínas insecticidas (δ -endotoxina), que se derivan de la bacteria del suelo *Bacillus thuringiensis* (Bt) Berliner. Estos cultivos están diseñados para defenderse de los herbívoros de coleópteros y lepidópteros.

La expresión de proteínas Bt puede cambiar algunas características defensivas de las plantas frente a algunos organismos. Por ejemplo, se encontró que varios cultivares de maíz Bt y una línea de algodón Bt eran más susceptibles a daños por pulgón que sus respectivas isolíneas no Bt en el laboratorio y / o en el campo (Hagenbucher et al. 2013).

Las proteínas Cry se encuentran entre los ingredientes insecticidas activos de estos pesticidas, y los genes que codifican las proteínas Cry se han introducido en cultivos agrícolas utilizando biotecnología moderna.

Las secuencias del gen Cry a menudo se modifican para permitir una expresión eficaz en planta y se han modificado varias proteínas Cry para aumentar la actividad biológica contra la plaga. Además, los dominios de proteínas Cry diferentes pero conservadas estructuralmente se pueden combinar para producir proteínas quiméricas con propiedades insecticidas mejoradas (Houbraken et al. 2020).

El uso extensivo de plaguicidas microbianos Bt en todo el mundo se debe probablemente a su especificidad contra un número limitado de especies de

insectos objetivo que limita en gran medida el potencial de impactos en organismos benéficos y no objetivo (NTO; selectividad mediada por receptores de proteínas Bt Cry) y falta de la persistencia ambiental de las proteínas Cry.

Debido a la eficacia, seguridad para humanos y NTO, y perfil de persistencia ambiental favorable de las formulaciones microbianas de Bt, las proteínas activas en estas formulaciones se han aislado y optimizado para su expresión en plantas para producir cultivos genéticamente modificados (GM) que son resistentes a los insectos objetivo (Koch et al. 2015).

Bt es una bacteria aeróbica grampositiva que se encuentra en una variedad de ambientes al aire libre. Cuando los nutrientes u oxígeno son insuficientes para el crecimiento vegetativo, la bacteria esporula, produciendo una espora y un cuerpo paraesporal que contiene una o más proteínas cristalinas insecticidas. Se sabe que los microbios Bt producen tres tipos principales de proteínas insecticidas: proteínas Cry (para cristales), proteínas Cyt (para citolíticos) y toxinas que se producen y secretan durante el crecimiento vegetativo (Sissener et al. 2011).

La diversidad dentro y entre estas clases de proteínas proporciona actividad contra una variedad de insectos larvarios. Las proteínas VIP, que se producen y secretan durante la etapa de crecimiento vegetativo, tienen actividad contra especies de insectos coleópteros y lepidópteros (Zhang et al. 2021).

Aunque cada uno de estos componentes contribuye a la actividad insecticida general de los productos microbianos de Bt, las proteínas Cry se consideran el componente más importante de las formulaciones comerciales de Bt. Es por esta razón que la mayoría de los cultivos transgénicos disponibles comercialmente con actividad insecticida se han desarrollado para expresar una o más proteínas Bt Cry, que son el foco de esta revisión (Scholtz et al. 2010).

Un componente esencial de las propiedades insecticidas altamente selectivas de la mayoría de las proteínas Cry es el requisito de que la toxina interactúe con uno o más receptores específicos. Muchos estudios han demostrado que la superficie epitelial del tracto gastrointestinal de insectos y

mamíferos no objetivo, incluidos los humanos, carece de receptores de proteína Cry específicos de alta afinidad (Reiner et al. 2014).

1.7. Hipótesis

Ho= La inserción de la proteína Cry de *Bacillus thuringiensis* y su expresión en el cultivo de maíz *Bt* no controla poblaciones de insectos plagas en el cultivo de maíz.

Ha= La inserción de la proteína Cry de *Bacillus thuringiensis* y su expresión en el cultivo de maíz *Bt* controla poblaciones de insectos plagas en el cultivo de maíz.

1.8. Metodología de la investigación

Para el desarrollo de la presente revisión bibliográfica titulada “Inserción de la proteína Cry de *Bacillus thuringiensis* y su expresión como bio insecticida en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.)”, se obtuvo información de artículos científicos, revistas, libros y demás fuentes confiables.

La información relacionada con el tema propuesto se compiló bajo técnicas de análisis, parafraseo, síntesis y resumen, tratando que esta información referente sea comprendida por el lector.

CAPÍTULO II

RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Desarrollo del caso

La finalidad de este documento fue recolectar información referente a la “Inserción de la proteína Cry de *Bacillus thuringiensis* y su expresión como bio insecticida en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.)”. Considerando que el cultivo de maíz juega un papel importante en aspectos de seguridad alimentaria, ya sea en la alimentación humana, así como en la alimentación animal.

Este cultivo durante su ciclo de vida es afectado por un sin número de plagas. Sin embargo, el control químico es comúnmente empleado por los productores para reducir los daños ocasionados por insectos plagas. Ante eso, uso de métodos de control más amigables con la salud del trabajador, consumidor y con el medio ambiente resulta necesario.

La bacteria *B. thuringiensis* ha sido ampliamente estudiada y se ha logrado modificar genéticamente en cultivares de maíz con la finalidad de que los materiales *Bt* puedan expresar las toxinas Cry y otorgarles a estos materiales modificados, cierta resistencia a ante la ocurrencia de plagas.

2.2. Situaciones detectadas (hallazgos)

2.2.1. Proceso de inserción de la proteína Cry

- El cultivo de maíz es utilizado en la alimentación humana y animal, así como también es ampliamente usado en la industria. Este rubro se produce en todas las regiones del Ecuador y representa una fuente de ingresos para muchas familias.
- En el país se cultivan aproximadamente 315 071 ha de maíz duro y es considerado el segundo cultivo transitorio de importancia nacional después del arroz (INEC 2021).

- En Ecuador, existe una amplia gama de cultivares de maíz, los mismos que varían en: costo, características agronómicas, resistencia o tolerancia a plagas, potencial de rendimiento, adaptabilidad a diferentes condiciones agroecológicas, entre otras características.
- Durante su ciclo vegetativo, el cultivo de maíz enfrenta un sin número de problemas fitosanitarios ocasionados por insectos, hongos, bacterias, virus, malezas, entre otras plagas.
- Respecto a los problemas fitosanitarios ocasionados por insectos, el uso indiscriminado de insecticidas de síntesis química para minimizar los daños en cultivo, han ocasionado severos problemas en la salud de los agricultores, daños en el medio ambiente y aumento de los costos de producción. A su vez, la ocurrencia de insectos plagas cada vez es más agresiva y el rendimiento va disminuyendo progresivamente (Quijije 2019).
- Existe la necesidad de integrar herramientas seguras y efectivas para el control de plagas, alternativas a los insecticidas de síntesis química. Esto estimula considerablemente el interés en usar biocontroladores para reducir poblaciones de plagas. Entre los biocontroladores más exitoso en cumplir este objetivo, que además mantiene potencial para seguir desarrollándose, es la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Sauka y Benintende 2008).
- Esta bacteria ha sido objeto de diversos estudios ya que cuenta con características promisoras en la búsqueda de proteínas insecticidas y consecuentemente, en la obtención de genes codificantes (Crickmore 2006).
- *B. thuringiensis* posee varios genes con propiedades insecticidas, entre ellas destaca la proteína Cry, la misma que actúa como toxinas específicas y biodegradables, que afectan a los insectos plagas, especialmente a los del orden lepidóptero (Soares et al. 2017).

2.2.2. Efectos de la Proteína Cry en cultivares de maíz

- Los genes que codifican para las proteínas Cry, se han utilizado ampliamente en cultivos modificados genéticamente, estos cultivos transgénicos pueden producir cristales de Bt que se vuelven resistentes a los insectos.

- Con los avances tecnológicos, el fitomejorador cuenta con herramientas basadas en la metodología del ADN recombinante, la misma que le permite introducir características deseables de un organismo a otro, de una manera más precisa y eficiente con el fin de mejorar los cultivos (Levitus 2006).
- Sin embargo, el mismo autor indica que para la producción de un cultivo transgénico se debe cumplir tres etapas: introducción del gen de interés en las células vegetales; regeneración de la planta completa a partir de las células transformadas, y transferencia - por cruzamiento- de la característica deseada a variedades de alto rendimiento.
- Ante lo expuesto, Ecuador es un país libre de cultivos y semillas transgénicas (Art. 401 de la Constitución). Sin embargo, países como EEUU, Brasil, Argentina, Canadá, India, Paraguay, China, Sudáfrica, Pakistán, Bolivia y Uruguay presentan un gran nivel de adopción (> de 1 millón de ha cultivadas con transgénicos) de cultivos genéticamente modificados (ISAAA 2014).
- El maíz *Bt* produce en sus tejidos proteínas Cry. Así, cuando las larvas de los insectos plaga intentan alimentarse de la hoja o del tallo del maíz Bt, mueren.
- Para control de lepidópteros, hay cinco proteínas Bt disponibles comercialmente en maíz (Cry1Ab, Cry1F, Cry1A.105, Cry2Ab y Vip3A) y dos proteínas para el control de coleópteros en maíz (Cry3A y Cry3Bb). Los primeros maíces Bt expresaban solo una proteína, pero la tendencia hoy en día es apilarlas para ampliar el espectro de control y contribuir a retrasar la selección de resistencia en insectos (ArgenBio 2015).

2.3. Soluciones planteadas

- La biotecnología agrícola está enfocada a dar soluciones a problemas de baja productividad y pérdidas económicas ocasionadas por factores bióticos y abióticos, con énfasis a una agricultura más sustentable.
- El manejo integrado de plagas es una estrategia inteligente que reduce los daños económicos en el cultivo de maíz. Entre las estrategias incluyen:

insecticidas botánicos, metabolitos microbianos y plantas transgénicas.

- El uso de tecnologías como maíz *Bt* dentro del manejo integrado de plagas debe ser conducida obedeciendo los siguientes factores: implementación de áreas de refugios de plagas, rotación de cultivos para romper ciclos de plagas, monitoreo constante y adopción de medidas de control complementarias.

2.4. Conclusiones

Por lo anteriormente detallado se concluye:

- Para satisfacer la creciente demanda de alimentos, el desarrollo de programas biotecnológicos enfocados a la producción sustentable, son necesarios en el manejo integrado de plagas en el cultivo de maíz.
- Las cepas de *B. thuringiensis* y el sin número de toxinas que producen, permite la producción de bio insecticidas y también permite el uso de los genes que codifican la toxina para el desarrollo de plantas transgénicas.
- Las proteínas *Cry* presentan alto grado de toxicidad para insectos plagas del orden lepidóptero, coleóptero, himenoptero y hemíptero. Además, son inocuas para el hombre y el medio ambiente.

2.5. Recomendaciones (propuestas para mejorar el caso)

Por lo anteriormente detallado se recomienda:

Las universidades, centros de investigación, ONG, entre otros, establecer

programas biotecnológicos para aislar cepas de *B. thuringiensis* para la elaboración de bio insecticidas a partir de las proteínas *Cry* para su aplicación en el manejo integrado de plagas del cultivo de maíz y otros rubros.

BIBLIOGRAFÍA

Acosta, R. 2009. EL CULTIVO DEL MAÍZ, SU ORIGEN Y CLASIFICACIÓN. EL MAIZ EN CUBA. Cultivos Tropicales 30(2).

Agro-, A; Tolerancia, I. 2015. Los cultivos transgénicos en Argentina y en el mundo. Cuaderno de biodiversidad (43):9.

Akram Ahmadpour, S; Farokhinejad, R; Mehrabi-Koushki, M. 2017. Further characterization and pathogenicity of *Didymella microchlamydospora* causing stem necrosis of *Morus nigra* in Iran. *Mycosphere* . DOI: <https://doi.org/10.5943/mycosphere/8/7/3>.

Antonia Hernández-Trejo; Benigno Estrada Drouaillet; Raúl Rodríguez-Herrera; José Manuel García Giron; Sara Alejandra Patiño-Arellano; Eduardo Osorio-Hernández. 2019. Importancia del control biológico de plagas en maíz (*Zea mays*L.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* .

Antonio Polato, S; Cristina Oliveira, N. 2011. EFICIÊNCIA DO CONTROLE DA LAGARTA-DO-CARTUCHO NA CULTURA DO MILHO EM FUNÇÃO DE DIFERENTES HORÁRIOS DE APLICAÇÃO DE INSETICIDA. *Campo Digital* .

Baig, DN; Mehnaz, S. 2010. Determination and distribution of cry-type genes in halophilic *Bacillus thuringiensis* isolates of Arabian Sea sedimentary rocks (en línea). *Microbiological Research* 165(5):376–383. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2009.08.003>.

Ben-Dov, E; Zaritsky, A; Dahan, E; Barak, Z; Sinai, R; Manasherob, R; Khamraev, A; Troitskaya, E; Dubitsky, A; Berezina, N; Margalith, Y. 1997. Extended screening by PCR for seven cry-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis* (en línea). *Applied and Environmental Microbiology* 63(12):4883–4890. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.63.12.4883-4890.1997>.

Bravo, A; Gómez, I; Conde, J; Muñoz-Garay, C; Sánchez, J; Miranda, R; Zhuang, M; Gill, SS; Soberón, M. 2004. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* . DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.08.013>.

Bravo, A; Sarabia, S; Lopez, L; Ontiveros, H; Abarca, C; Ortiz, A; Ortiz, M; Lina, L; Villalobos, FJ; Peña, G; Nuñez-Valdez, M-E; Soberón, M; Quintero, R.

1998. Characterization of cry Genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* Strain Collection (en línea). *Applied and Environmental Microbiology* 64(12):4965–4972. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.64.12.4965-4972.1998>.

Burtet, LM; Bernardi, O; Melo, AA; Pes, MP; Strahl, TT; Guedes, JVC. 2017. Managing fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), with Bt maize and insecticides in southern Brazil (en línea). *Pest Management Science* 73(12):2569–2577. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.4660>.

Carreras, B. 2011. Aplicaciones de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* en el control de fitopatógenos. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria* . DOI: https://doi.org/10.21930/rcta.vol12_num2_art:222.

Caviedes, G. 2019. Producción de semilla de maíz en el Ecuador: retos y oportunidades. *CI Avances En Ciencias E Ingenierías* 11(1). DOI: <https://doi.org/doi.org/10.18272/aci.v11i1.1100>.

Contini, E; Mota, MM; Marra, R; Borghi, E; Miranda, RA de; Silva, AF da; Silva, DD da; Machado, JR de A; Cota, LV; Costa, RV da; Mendes, SM. 2019. Milho-Characterização e Desafios Tecnológicos. *Embrapa* 5(1).

Crickmore, N. 2006. Beyond the spore – past and future developments of *Bacillus thuringiensis* as a biopesticide (en línea). *Journal of Applied Microbiology* 101(3):616–619. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02936.x>.

Cruz, G dos S; Teixeira, VW; de Oliveira, JV; Teixeira, AAC; Araújo, AC; Alves, TJ de S; da Cunha, FM; Breda, MO. 2015. Histological and Histochemical Changes by Clove Essential Oil Upon the Gonads of *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *International Journal of Morphology* . DOI: <https://doi.org/10.4067/s0717-95022015000400034>.

Early, R; González-Moreno, P; Murphy, ST; Day, R. 2018. Forecasting the global extent of invasion of the cereal pest *Spodoptera frugiperda*, the fall armyworm. *NeoBiota* . DOI: <https://doi.org/10.3897/neobiota.40.28165>.

Eicholz, E; Bredemeier, C; Bermudez, F; Machado, J; Garrafa, M; Bispo, B; Aires, F. (2020). Informações técnicas para o cultivo do milho e sorgo na região subtropical do brasil: safras 2019/20 e 2020/21. Sete Lagoas - MG, s.e.

Flores, F. 2010. Manejo de plagas en el cultivo de maíz. *Inta* :1–7.

Gray, ME. 2011. Relevance of traditional integrated pest management (IPM) strategies for commercial corn producers in a transgenic agroecosystem: A

bygone era? *Journal of Agricultural and Food Chemistry* . DOI: <https://doi.org/10.1021/jf102673s>.

Griko, NB; Rose-Young, L; Zhang, X; Carpenter, L; Candas, M; Ibrahim, MA; Junker, M; Bulla, LA. 2007. Univalent binding of the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis* to a conserved structural motif in the cadherin receptor BT-R1. *Biochemistry* . DOI: <https://doi.org/10.1021/bi700769s>.

Hagenbucher, S; Wäckers, FL; Wettstein, FE; Olson, DM; Ruberson, JR; Romeis, J. 2013. Pest trade-offs in technology: reduced damage by caterpillars in Bt cotton benefits aphids (en línea). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 280(1758):20130042. DOI: <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.0042>.

Holdsworth, R; Hurley, CK; Marsh, SGE; Lau, M; Noreen, HJ; Kempenich, JH; Setterholm, M; Maiers, M. 2009. The HLA dictionary 2008: a summary of HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5, and -DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B, -C, -DR, and -DQ antigens. (en línea). *Tissue antigens* 73(2):95–170. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2008.01183.x>.

Houbraken, J; Kocsubé, S; Visagie, CM; Yilmaz, N; Wang, XC; Meijer, M; Kraak, B; Hubka, V; Bensch, K; Samson, RA; Frisvad, JC. 2020. Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. *Studies in Mycology* . DOI: <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2020.05.002>.

INEC. (2015). Encuesta de superficie y producción agropecuaria continua. Quito, Ecuador, s.e. DOI: <https://doi.org/10.4206/agrosur.1974.v2n2-09>.

ISAAA. (2014). *Agricultural Biotechnology*. Los Baños, s.e.

Jojoa Bravo, C; Salazar González, C. 2011. Evaluación in vitro de insecticidas biorracionales para el control de *Agrotis ipsilon* Hüfnagel. *Revista de Ciencias Agrícolas* .

Jouve de la Barreda, N. 2020. [From transgenesis to gene edition. Bioethical and applied considerations]. (en línea). *Cuadernos de bioetica : revista oficial de la Asociación Española de Bioética y Ética Médica* 31(103):387–401. DOI: <https://doi.org/10.30444/CB.78>.

Juárez-Pérez, VM; Ferrandis, MD; Frutos, R. 1997. PCR-based approach for detection of novel *Bacillus thuringiensis* cry genes (en línea). *Applied and Environmental Microbiology* 63(8):2997–3002. DOI:

<https://doi.org/10.1128/aem.63.8.2997-3002.1997>.

Koch, MS; Ward, JM; Levine, SL; Baum, JA; Vicini, JL; Hammond, BG. 2015. The food and environmental safety of Bt crops (en línea). *Frontiers in Plant Science* 06. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00283>.

Levitus, G. 2006. Biotecnología en maíz. *In Ed, 2 (ed.)*. s.l., ILSI - ARGENTINA. p. 80.

Little, CM; Chapman, TW; Hillier, NK. 2019. Considerations for insect learning in integrated pest management. s.l., s.e. DOI: <https://doi.org/10.1093/jisesa/iez064>.

Logan, NA. (2009). *Bacillus*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Springer. s.l., s.e.

Mendes, SM; Boregas, KGB; Lopes, ME; Waquil, MS; Waquil, JM. 2011. Respostas da lagarta-do-cartucho a milho geneticamente modificado expressando a toxina Cry 1A(b) (en línea). *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 46(3):239–244. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2011000300003>.

Nava-Pérez, E; García-Gutiérrez, C; Jesús, ; Camacho-Báez, R; Lorena Vázquez-Montoya, E. 2012. Bioplaguicidas: una opción para el control biológico de plagas. *Ra Ximhai* 8:17–29.

Nyamwasa, I; Li, K; Rutikanga, A; Rukazambuga, DNT; Zhang, S; Yin, J; Ya-zhong, C; Zhang, XX; Sun, X. 2018. Soil insect crop pests and their integrated management in East Africa: A review. s.l., s.e. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.11.017>.

Oerke, E-C; Dehne, H-W. 2004. Safeguarding production—losses in major crops and the role of crop protection (en línea). *Crop Protection* 23(4):275–285. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2003.10.001>.

Pinto, L. 2008. Genes cry de *Bacillus thuringiensis* aplicados na engenharia genética de plantas, conferindo resistência a insetos-praga (en línea). *Neotropical Biology and Conservation* 3(3):159–168. DOI: <https://doi.org/10.4013/nbc.20083.07>.

Portela-Dussán, DD; Chaparro-Giraldo, A; López-Pazos, SA. 2013. La biotecnología de *Bacillus thuringiensis* en la agricultura (en línea). *Nova* 11(20):87. DOI: <https://doi.org/10.22490/24629448.1031>.

Quijije, MK. 2019. Análisis económico del rendimiento de los híbridos de

maíz INIAP H-551 y Trueno NB 7443 mediante sistemas de labranza convencional y mínima y su impacto ambiental en el cantón Mocache. s.l., UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO. 92 p.

Rajesh Singh, DSJ; Kumar, A. 2017. Studies on Path Coefficient Analysis in Maize (*Zea mays* L.) for Grain Yield and Its Attributes. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6(4):2851–2856. DOI: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.604.327>.

Reiner, D; Lee, RY; Dekan, G; Epstein, MM. 2014. No adjuvant effect of *Bacillus thuringiensis*-maize on allergic responses in mice. *PLoS ONE* 9(8). DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103979>.

Rodríguez, L; Morán, I; Ayra, C; Téllez, P; Hernández, D; Rodríguez, C; Ponce, M; Silva, J. 2016. Functional identification of three new genes involved in resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Plutella xylostella*. *Biotechnología Aplicada* .

Rosas-García, NM. 2008. Avances en el desarrollo de formulaciones insecticidas a base de *Bacillus thuringiensis* Advances in developing *Bacillus thuringiensis*-based insecticide formulations. *Rev. Colomb. Biotecnol* (1):49–63.

Sauka, D; Benintende, G. 2008. *Revista Argentina de Microbiología* 40(2):124–140.

Scholtz, ND; Halle, I; Dänicke, S; Hartmann, G; Zur, B; Sauerwein, H. 2010. Effects of an active immunization on the immune response of laying Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) fed with or without genetically modified *Bacillus thuringiensis*-maize. *Poultry Science* 89(6). DOI: <https://doi.org/10.3382/ps.2010-00678>.

Sissener, NH; Hemre, GI; Lall, SP; Sagstad, A; Petersen, K; Williams, J; Rohloff, J; Sanden, M. 2011. Are apparent negative effects of feeding GM MON810 maize to Atlantic salmon, *Salmo salar*, caused by confounding factors? *British Journal of Nutrition* 106(1). DOI: <https://doi.org/10.1017/S0007114510005726>.

Soares, M; Domingos Vasconcelos, E; Cordeiro Braz, LC; Ramos, JP; Carliane, ; Coelho Da Silva, R; Sofiatti, V; Cavalcanti, R; Santos, D. 2017. Estimativa de mortalidade de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com milho Bt (2B655PW) em ambiente Semiárido. *In Anais do II Simpósio de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Semiárido*. Sumé-PB, s.e. p. 1–9.

Urretabizkaya, N. (2018). Manejo Integrado de plagas asociadas al cultivo de maíz. Estrategias de control. s.l., s.e.

Valicente, FH. 2015. Manejo integrado de pragas na cultura do milho. Circular técnica Embrapa Milho e Sorgo .

Valicente, FH; Souza, IRP. 2004. Cultivo e preparo de *Bacillus thuringiensis* para microscopia eletrônica de varredura. *In XXV Congresso Nacional de Milho e Sorgo*. s.l., s.e. p. 146 p.

Zhang, L; Yu, R; Yu, Y. 2021. Analysis of metabolites and metabolic mechanism in Bt transgenic and non-transgenic maize. *Microchemical Journal* 169. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106544>.