



Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro

Dirección de Investigación

Subdirección de Programación y Evaluación

**U A A A N**  
**RECIBIDO**  
**R O**  
15 DIC 2017  
HORA: \_\_\_\_\_  
SUBDIRECCIÓN DE PROGRAMACIÓN Y EVALUACIÓN

Proyecto de Investigación 2018

Unidad:	SALTILLO	División:	AGRONOMÍA	Departamento:	PARASITOLOGÍA
Tema estratégico (ANA/PEP):	( ANA) BIOTECNOLOGÍA: CONSERVACIÓN, Desarrollo en investigación relacionada con la caracterización y diversidad genética. CULTIVO Algodón, Manejo integrado de plagas.				
Línea de investigación:	ENTOMOLOGÍA (RESISTENCIA DE PLAGAS)				
Título del proyecto:	MONITOREO DE LA RESISTENCIA DE INSECTOS A LAS TOXINAS CRY DE <i>Bacillus thuringiensis</i> EN CULTIVOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS Y EVALUACIÓN DE SU EFECTO SOBRE POBLACIONES DE ARTRÓPODOS NO BLANCO EN MÉXICO.				
Presupuesto solicitado (Máximo \$75,000)	\$ 75,000	El proyecto es:	Nuevo	Continuación	X
Tipo de investigación:	Básica	X	Aplicada	Tecnológica	e-mail del responsable
Vinculación:	Si	X	No	Fondos concurrentes:	
Cooperante(s):	ING. JAIME CHÁVEZ MÁRQUEZ (TÉCNICO CERTIFICADO EN ALGODÓN)				
Entidad (es):	COAHUILA	Municipio (s):	SAN PEDRO		
Localidades:	RINCÓN DEL BUITRE, RANCHO DE LA UAAAN, LOCALIDAD SAN PEDRO DE LAS COLONIAS				
A realizar durante el(los) año(s):	2018-2019				
Participantes		Adscripción (Clave Depto.)	Expediente No	Firma	
Responsable	DR. LUIS ALBERTO AGUIRRE URIBE	PARASITOLOGÍA	0899		
Colaborador:	DRA. MIRIAM SÁNCHEZ VEGA	PARASITOLOGÍA	100069		
Colaborador:	DR. ERNESTO CERNA CHÁVEZ	PARASITOLOGÍA	3563		
Colaborador:	DRA. YISA MARÍA OCHOA FUENTES	PARASITOLOGÍA	3948		
Colaborador:	DR. MARIANO FLORES DÁVILA	PARASITOLOGÍA	1920		
Colaborador:	DR. AGUSTÍN HERNANDEZ JUÁREZ	PARASITOLOGÍA	4187		
Tesista:		Grado por obtener	Matrícula	Firma	
Programa Docente:					
Tesista:					
Programa Docente:					
Tesista:					
Programa Docente:					
Firma y sello	Vo. Bo.		Autoriza		
Nombre	DR. ERNESTO CERNA CHÁVEZ Jefe de Departamento		Dr. Armando Robledo Olivo Subdirector de Programación y Evaluación		

• Cada Jefe de Departamento deberá dejar copia para su archivo

## Protocolo para Proyecto de Investigación 2018

### 1.-Título del proyecto

Presupuesto solicitado:

Monitoreo de la resistencia de insectos a las toxinas Cry de <i>Bacillus thuringiensis</i> en cultivos genéticamente modificados y evaluación de su efecto sobre poblaciones de artrópodos no blanco en México	\$ 75,000 00
--	--------------

### 2.- introducción

Los cultivos genéticamente modificados (GM) para resistencia a insectos está mediado por la proteína cristal (Cry) producida por *Bacillus thuringiensis* (Berliner) (Bt), denominada  $\delta$ -endotoxina, de tal modo que hojas, tallos y polen expresen esta proteína con actividad insecticida selectivamente, ante el ataque de insectos plaga de importancia económica, principalmente del orden Lepidoptera y Coleoptera (Silva, 2005a, 2005b)

México, en superficie con cultivos agrobiotecnológicos se encuentra en la posición 16 con dos cultivos genéticamente modificados, introducidos en fase comercial: soya y algodón tolerante a herbicida y algodón resistente a insectos, con aproximadamente 0.2 millones de hectáreas (James, 2014). El cultivo de algodón GM, se siembra principalmente en los estados de Baja California, Chihuahua, Coahuila, Durango, Sinaloa, Sonora y Tamaulipas (SAGARPA-SIAP, 2016). En el caso de maíz para los años de 2009-2013 se realizaron los primeros ensayos en campo, los cuales demostraron la eficacia de la biotecnología para el control de plagas, con resultados coherentes con la experiencia internacional (James 2010; Piña y Solleiro, 2013).

Las  $\delta$ -endotoxinas Cry de los cultivos Bt actúan en las plagas objetivo mediante la unión a sitios específicos y alterando las membranas del intestino medio del insecto, sin embargo, la evolución de resistencia a estas toxinas por las plagas podría interrumpir dichos beneficios y plantea una amenaza constante para su uso sostenible en la agricultura (Gahan *et al.*, 2007)

Es evidente que cuando se emplea constantemente un insecticida en la lucha contra una plaga, es factible que insectos susceptibles desarrollen resistencia, situación que los cultivos Bt cumplen perfectamente, cuya expresión de la toxina Cry es constante; eliminando no solo la posibilidad de seguir utilizando estas proteínas como medida de control de plagas, sino también predisponiendo a las plagas al uso de productos a base de *B. thuringiensis*. Además, la entrada de nuevos cultivos GM, que comparten plagas blanco de Bt (caso algodón y maíz), podría traer consigo falta de eficacia del nuevo cultivo, mucho antes de su establecimiento (Harwood *et al.* 2005; Marvier *et al.* 2007).

### Objetivos

Monitorear y detectar niveles de resistencia en especies de campo sujetas a presión de selección a las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* de cultivos genéticamente modificados y generar información sobre la proporción de resistencia en zonas agrícolas con cultivos Bt del estado de Coahuila

Monitorear el flujo de poblaciones de insectos blanco de los cultivos genéticamente modificados a cultivos convencionales hospederos y detectar niveles de resistencia

### Hipótesis

La presión de selección de los cultivos genéticamente modificados a plagas manifestará resistencia a la toxina Cry de *Bacillus thuringiensis*.

### 3 -Revisión de Literatura

Desde hace 15 años, la ingeniería genética, también llamada tecnología del ADN recombinante, se está aplicando para obtener plantas genéticamente modificadas (GM), resistentes a insectos y tolerantes a herbicidas existiendo un gran potencial para introducir otras características deseables en la planta. Esta nueva tecnología es considerada como un instrumento alternativo para modificar y mejorar los cultivos, particularmente en el caso del algodón donde las pérdidas por insectos y malezas son altamente significativas. El alto costo del control químico de los insectos y las malezas, justifica el desarrollo de plantas genéticamente modificadas, no solo para reducir el costo de producción, sino también el deterioro del medio ambiente (Silva, 2005a)

Los cultivos genéticamente modificados (GM) que producen toxina de *Bacillus thuringiensis* (Bt), reducen la dependencia de insecticidas químicos convencionales, proporcionando beneficios económicos, en la salud y son una alternativa ecológica, en comparación con los insecticidas químicos, son menos perjudiciales para la vida silvestre, debido a su baja toxicidad en los vertebrados y organismos benéficos (Tabashnik *et al.*, 2002).

Actualmente el maíz y algodón son los cultivos con mayor adopción biotecnológica, con el mayor número de eventos GM con la característica de resistencia a insectos aprobados para su siembra y/o experimentación, 115 para el maíz y 42 para el algodón (ISAAA, 2015). En nuestro país se ha autorizado para su siembra experimental algunos cultivos genéticamente modificados, como algodón, trigo, alfalfa, frijol y limón mexicano, así como maíz para resistencia a insectos y tolerante a herbicida, en sus fases experimental y piloto (SAGARPA-SENASICA, 2016). Con respecto al maíz, su homólogo transgénico para resistencia a insectos ha sido motivo de gran debate; en nuestro país, este debate ha sido causal de generar moratorias o suspensión que impide realizar ensayos en campo con maíz biotecnológico (James, 2010; Piña y Solleiro, 2013).

En un agroecosistema se presenta toda una red trófica que incluye a artrópodos pertenecientes o no a los órdenes bajo control y que están en contacto con los cultivos Bt. La siembra generalizada de estos cultivos y el aumento en su aplicación expone a los organismos no blanco a las toxinas útiles para controlar plagas (Harwood *et al.* 2005, Marvier *et al.* 2007) y aun cuando los efectos documentados en el caso del maíz Bt en campo son prácticamente inexistentes, es posible que variedades transgénicas presenten un riesgo para la comunidad de artrópodos, alterando de esa manera la biodiversidad (Dively y Rose, 2002; Dutton *et al.*, 2003; Obrist *et al.*, 2006). La mayoría de ellos entrarían en contacto con la proteína Cry al consumir partes de la planta directa o indirectamente en las cadenas tróficas pudiendo quedar expuestos a la acción tóxica, a pesar de que la proteína expresada posee una alta especificidad respecto a insectos blanco, debido a las condiciones necesarias para solubilizar, activar y unir las proteínas y que se desconoce la presencia del receptor a la toxina Bt en aparatos digestivos no blanco (Groot y Dicke, 2002; Bruck *et al.*, 2006). Se ha manejado la hipótesis de una posible reducción de la biodiversidad por el impacto de la tecnología Bt sobre los organismos no blanco; una de las preocupaciones de los investigadores desde la creación de los transgénicos y su liberación como cultivos comerciales, a corto y largo plazo (O'Callaghan *et al.*, 2005).

#### 4 - Procedimiento Experimental

##### **Obtención y establecimiento de especímenes:**

Susceptibles a las toxinas Cry de Bt. Para el desarrollo de esta investigación es necesario contar con colonias de insectos que sean susceptibles a las toxinas Cry de Bt, por lo que se requiere recolectar especímenes vivos correspondientes a insectos principalmente del Orden Lepidoptera como: *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), *Helicoverpa zea* (Boddie), *Heliothis virescens* (Fabricius), *Spodoptera exigua* (Hübner), *Diatraea saccharalis* (Fabricius), *Eoreuma loftini* (Dyar), en cultivos convencionales hospederos de estas plagas y que no sean cultivos GM o que se encuentren cercanos, por lo que las recolectas se realizarán principalmente en estados del sur del país que no cuentan con contacto con OGMs.

Los insectos colectados se identificarán en el laboratorio de taxonomía de insectos, se purificarán y se segregarán en laboratorio de manera constante, para contar con líneas bases de susceptibilidad permanentemente, en el área de cámaras bioclimáticas de cría de insectos en las instalaciones del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Saltillo.

Resistentes a las toxinas Cry de Bt. En el caso de los insectos resistentes a las toxinas Cry de Bt, la recolecta se iniciará en zonas donde se cultiva algodón GM y principalmente en donde este asociado o cercano a cultivos hospederos de las plagas blanco del Orden Lepidoptera (*S. frugiperda* J. E. Smith, *H. zea* Boddie, *H. virescens* Fabricius, *S. exigua* Hübner, *D. saccharalis*, Fabricius, *E. loftini*, Dyar), como maíz, las zonas a realizar las recolectas serán pertenecientes al estado de Coahuila, por lo que se considerará en primer lugar la Región lagunera, en los municipios de Matamoros, San Pedro, Torreón, Viesca y Francisco I. Madero.

Se recolectará cada semana especímenes vivos en cultivos GM como en cultivos hospederos convencionales se trasladarán al laboratorio para su identificación y crianza con dieta artificial y se generará una población de campo (F1), para ser comparadas con una colonia susceptible de laboratorio. El trabajo se realizará en los laboratorios de taxonomía de insectos, en el área de cámaras bioclimáticas de cría de insectos y el laboratorio de toxicología de insecticidas en las instalaciones del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Saltillo.

Condiciones del área de cría y/o mantenimiento. Los especímenes inmaduros se colocarán en recipientes de plástico con dieta artificial (Southland Product Inc. Lake Village, Arkansas, E. E. U. U.), con los requerimientos nutricionales específicos a cada una de las especies de insectos, para obtener las fases de pupa y adultos. En recipientes de 20 L.

de capacidad aproximadamente, recubierta en su parte superior de tela fina de algodón, utilizada como sustrato para la oviposición de los adultos; huevecillos se recogerán e incubarán en cajas de Petri con papel filtro hasta la eclosión y la obtención de larvas de primer estadio, las cuales serán utilizadas en los bioensayos para determinar los niveles de resistencia. Las condiciones del área de cría oscilarán en un rango de 25-30°C, 55-70% humedad relativa y fotoperiodo de 14 h día por 10 h de oscuridad, o las requeridas por cada especie. La alimentación de adultos, se basará en una solución azucarada con 20 g de miel, 20 g de azúcar y 6 g de ácido ascórbico·L<sup>-1</sup> (Burd *et al.*, 2003, Akhurst *et al.*, 2003; Ali *et al.*, 2006).

Fuente de toxinas Cry de Bt. Se utilizarán las  $\delta$ -endotoxinas de *B. thuringiensis* necesarias para realizar las pruebas de resistencia, como la Cry1Ac, Cry2Ab, Cry1Ba, Cry1Ca, Cry1Da, Cry1Ea y Cry1Fa así como cualquier otra toxina Cry o toxinas Cry mutantes que se tengan disponibles y sean requeridas.

### Bioensayos para determinar niveles de resistencia

Se trabajará con dos líneas en cada especie de estudio (línea campo y una línea susceptible de laboratorio). Los bioensayos se realizarán aproximadamente de 20-30 días después de la recolecta de especímenes en campo, esto con el objetivo de utilizar la generación F1 de campo y no segregar la población. Se utilizará la toxina de interés, con una dosis diagnóstica CL99=1.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de dieta (Siegfried *et al.*, 2000, Blanco *et al.*, 2009), que representa el límite para detener el desarrollo de larvas de primer estadio más allá de la muda (concentración inhibitoria de la muda), dosis que se derivará en nueve concentraciones (Blanco *et al.*, 2009), tanto bajas como altas; además de incluirse dosis más altas de 3.2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de dieta y 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de dieta (Siegfried *et al.*, 2000, Tabashnik *et al.*, 2005), esta última dosis reportada que mata a casi todas las larvas susceptibles y heterocigotos de gusano rosado, pero poco o ninguno de los homocigotos resistentes (Tabashnik *et al.*, 2000). El bioensayo consiste en colocar larvas de primer estadio (Ali *et al.*, 2006) de la primera generación (F1=línea de campo) de 24 horas de edad sin alimentar, en recipientes de 33 mL con 4-6 g de dieta artificial inoculada con 1  $\mu\text{g}$  de toxina Cry por mL de dieta (Tabashnik *et al.*, 2000; Tabashnik *et al.*, 2005). Para este estudio se someterán 25 larvas en cada concentración, además de un control sin toxina, replicado tres veces en cada línea de insectos. De igual manera se realizará el procedimiento anterior en la línea susceptible de laboratorio para posteriormente realizar la comparación de resistencia. Los datos de mortalidad de ambas líneas se registrarán a los 7 + 1 días de establecido el experimento (Blanco *et al.*, 2009).

### Análisis de datos

La evaluación de los datos de mortalidad será usando un análisis Probit utilizando el software SAS (PROC PROBIT) (SAS Institute, 2002) para estimar el valor de la CL50 y el margen de fiabilidad (límite fiducial) al 95% de significancia y las líneas de regresión de la concentración-mortalidad (Tabashnik *et al.*, 2005). En caso de mortalidad en el control, esta será corregida mediante la fórmula de Abbott (1925), con una mortalidad máxima aceptada de 10%. La proporción de resistencia se determinará dividiendo la CL50 de la línea campo, entre la CL50 de la línea susceptible de laboratorio.

### Cronograma de Actividades para el 2018

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Recolectas de insectos presuntamente resistentes a la toxina Cry de Bt (en contacto con OGMs)				X	X	X	X	X				
Establecimiento de crianza y generación de F1 presuntamente resistentes a la toxina Cry de Bt					X	X	X	X	X	X	X	X
Bioensayos para determinar niveles de resistencia (20-30 días después de recolecta en campo)				X	X	X	X	X	X	X	X	X
Obtención de resultados y análisis estadísticos de datos.									X	X	X	X
Preparación de un primer artículo para publicación y envío a revista arbitrada	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Mantenimiento de colonias de insectos susceptibles y resistentes a la toxina Cry de Bt.	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Pruebas de estandarización para extracción de ADN y	X	X	X									

PCR, para determinar resistencia													
Extracción de ADN y PCR				X	X	X	X	X	X				

Cronograma de distribución de presupuesto para el 2018

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Compra de material e insumos de la dieta para el mantenimiento y establecimiento de colonias de insectos susceptibles y resistentes.	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Establecimiento de bioensayos				X	X	X	X	X	X	X	X	X
Salidas de campo para la obtención de material biológico, larvas susceptibles y larvas resistentes			X	X	X	X	X	X				
Compra de insumos para biología molecular (kit de extracción de ADN y PCR, iniciadores, enzimas, buffer, entre otros).	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Duración total del proyecto

Año de Inicio	2018	Año estimado de conclusión	2020
---------------	------	----------------------------	------

5.-Productos Esperados

Se obtendrán colonias de insectos plaga objetivo resistente a la toxina Cry de Bt, representativas de áreas productoras de OGMs en el estado de Coahuila, útiles para futuros trabajos.  
 Generar información sobre el monitoreo y evolución de la resistencia a OGMs, y con las herramientas suficientes para la toma de decisiones y contribución en el manejo del cultivo.  
 Se publicarán al menos dos artículos en revistas indexadas nacionales o internacionales de acuerdo a los resultados obtenidos.  
 Se graduará a dos estudiantes de licenciatura con tesis derivada de este proyecto de investigación.

6.-Literatura Citada

Abbott, W.S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18: 265-267.

Akhurst, R. J. James, L. and Beard C. 2003. Resistance to the Cry1Ac  $\delta$ -Endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in the Cotton Bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology* 96 (4):1290-1299.

Ali, M. I., R. G. Luttrell and S. Y. Young III. 2006. Susceptibilities of *Helicoverpa zea* and *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) Populations to Cry1Ac Insecticidal Protein. *Journal of Economic Entomology* 99(1):164-175.

Blanco, C. A., D. A. Andow, A. A. Craig, D. V. Sumerford, G. Hernández, J. D. López, L. Adams, A. Groot, L. Rogers, R. Parker, G. Payne, O. P. Perera, A. P. Teran-Vargas and A. Azuara-Dominguez. 2009. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac Resistance Frequency in Tobacco Budworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology* 102 (1):381-387.

Bruck, J. D., M. D. Lopez, L. C. Lewis, J. R. Prasifka and R. D. Gunnarson. 2006. Effects of Transgenic *Bacillus thuringiensis* Corn and Permethrin on Nontarget Arthropods. *J. Agric. Urban Entomol.* 23(3): 111-124.

Burd, A. D., Gould, F., Bradley, J.R., Van, D. J. W. and Moar, W.J. 2003. Estimated Frequency of Nonrecessive Bt Resistance Genes in Bollworm, *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae) in Eastern North Carolina. *Journal of Economic Entomology* 96(1):137-142.

Dively, G. P. and R. Rose. 2002. Effects of Bt transgenic and conventional insecticide control on the non-target natural enemy Community in sweet corn. 1st International Symposium on Biological Control of Arthropods. Forest Health Technology Enterprise Team. United States. 265-274 pp.

Dutton, A., J. Romeis and F. Bigler. 2003. Assessing the risks of insect resistant transgenic plants on entomophagous arthropods: Bt-maize expressing Cry1Ab as a case study. *BioControl* 48:611-636.

Gahan, L. J., F. Gould, J. D. Lopez, S. Micinski and D. G. Heckel. 2007. A Polymerase Chain Reaction Screen of Field Populations of *Heliothis virescens* for a Retrotransposon Insertion Conferring Resistance to *Bacillus thuringiensis* Toxin. *Journal of Economic Entomology* 100(1):187-194.

Groot, A. T. and M. Dicke. 2002. Insect-resistant transgenic plants in a multi-trophic context. *The Plant Journal*. 31(4):

- Harwood, J. D., W. G. Wallin and J. J. Obrycki. 2005. Uptake of Bt endotoxins by nontarget herbivores and higher order arthropod predators: molecular evidence from a transgenic corn agroecosystem. *Mol. Ecol.* 14: 2815–2823.
- International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications (ISAAA). 2015. Base de datos de aprobación de GM. Consulta: 10 Noviembre 2015. Disponible en: <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/default.asp>
- James, C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2010. International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications (ISAAA). Brief No. 42. Executive Summary. 2010. ISAAA. Ithaca, NY. Consulta: 10 Noviembre 2015. Disponible en <http://www.isaaa.org>
- James, C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2014. International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications (ISAAA). Brief No. 49-2014. Executive Summary. 2014. ISAAA. Ithaca, NY. Consulta: 10 Noviembre 2015. Disponible en <http://www.isaaa.org>
- Marvier, M., C. McCreedy, J. Regetz and P. Kareiva. 2007. A Meta-Analysis of Effects of Bt Cotton and Maize on Nontarget Invertebrates. *Science* 316: 1475-1477.
- Obrist, L. B., A. Dutton, J. Romeis and F. Bigler. 2006. Biological Activity of Cry1Ab Toxin Expressed by Bt Maize Following Ingestion by Herbivorous Arthropods and Exposure of the Predator *Chrysoperla carnea*. *BioControl*. 51:31-48.
- O'Callaghan, M., T. R. Glare, E. P. J. Burgess and L. A. Malone. 2005. Effects of plants genetically modified for insect resistance on nontarget organisms. *Annual Review of Entomology*. 50: 271-292.
- Piña, S. y J. L. Solleiro. 2013. México. En: Solleiro, R. J. L. y I. R. Castañón (eds) Introducción al ambiente del maíz transgénico: Análisis de ocho casos en Iberoamérica, México: AgroBio México y CambioTec, México. pp 341-410.
- SAS Institute. 2002. The SAS System for Windows. Release 9.0. SAS, Institute. Cary N. C. U.S.A.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA)- Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). 2015. Resoluciones a solicitudes de permisos de liberación al ambiente de Organismos Genéticamente modificados. 2008-2015. Consulta: 21 de febrero de 2016. Disponible en: <http://www.senasica.gob.mx/?id=6496>
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA)-Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Consulta: 21 de febrero de 2016. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/agricultura-produccion-anual/>
- Siegfried, B. D., T. Spencer and J. Nearman. 2000. Baseline Susceptibility of the Corn Earworm (Lepidoptera: Noctuidae) to the Cry1Ab Toxin from *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Economic Entomology*. 93(4): 1265-1268.
- Silva, C. C. A. 2005a. Algodón genéticamente modificado. Editorial AGRO-BIO Bogotá, Colombia. 47 Págs.
- Silva, C. C. A. 2005b. Maíz Genéticamente Modificado. AGRO-BIO Bogotá, Colombia. Pág. 60.
- Tabashnik, B. E., A. L. Patin, T. J. Dennehy, Y. Liu, Y. Carrière, M. A. Sims, and L. Antilla. 2000. Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* in field populations of pink bollworm. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97 (24): 12980-12984.
- Tabashnik, B. E., R. W. Biggs, D. M. Higginson, S. Henderson, D. C. Unnithan, G. C. Unnithan, C. E. Kirk, M. S. Sisterson, T. J. Dennehy, Y. Carriere and S. Morin. 2005. Association between resistance to Bt Cotton and Cadherin Genotype in Pink Bollworm. *Journal Economic Entomology* 98(3): 635-644.
- Tabashnik, B. E., T. J. Dennehy, M. A. Sims, K. Larkin, G. P. Cabeza, W. J. Moar and Y. Carriere. 2002. Control of Resistant Pink Bollworm (*Pectinophora gossypiella*) by Transgenic Cotton That Produces *Bacillus thuringiensis* Toxin Cry2Ab. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(8): 3790-3794.