



Original Article/Artículo Original

***Heliothis virescens* (Fabricius, 1777) and *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) (Lepidoptera: Noctuidae) Population on Transgenic and Non-Transgenic Cotton and their BT toxin resistance**

Poblaciones de *Heliothis virescens* (Fabricius, 1777) y *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) (Lepidoptera: Noctuidae) asociadas a algodón transgénico y no transgénico y su resistencia a la toxina Bt

Guzmán-Morales, D.C.¹, Castillo Reyes, F.³, González-Vázquez, V. M.¹, García-Martínez, O.², Aguirre-Uribe, L. A.², Tiscareño-Iracheta, M. A.⁴, Aguilar-González, C. N.¹, Rodríguez-Herrera, R.^{1,*}

¹Departamento de investigación en Alimentos, Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, Coahuila, México.

²Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

³Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Saltillo, Saltillo, Coahuila, México.

⁴Escuela de agronomía, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. S.L.P. México.

Cite this paper/Como citar este artículo: Guzmán-Morales, D. C., Castillo Reyes, F., González-Vázquez, V. M., García-Martínez, O., Aguirre-Uribe, L. A., Tiscareño-Iracheta, M. A., Aguilar-González, C. N., Rodríguez-Herrera, R. (2018). *Heliothis virescens* (Fabricius, 1777) and *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) (Lepidoptera: Noctuidae) Population on Transgenic and Non-Transgenic Cotton and their BT toxin resistance. *Revista Bio Ciencias* 5(nesp1), e441. doi: <https://doi.org/10.15741/revbio.05.nesp.e441>



ABSTRACT

In this study, the population dynamics of *Helicoverpa zea* and *Heliothis virescens* on transgenic and non-transgenic cotton cultivated in the Northern region of Mexico was determined. In order to perform this study, sampling of insects during the cotton phenological phases: floral bud, flowering, acorn formation, and opening was realized. In addition, the amplification of DNA regions encoding the glycosyltransferase to determine resistance to BT cotton was performed. Results showed that: in agricultural areas planted with transgenic cotton in Coahuila, *H. virescens* was not observed, however,

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: January 30th 2018.

Accepted/Aceptado: June 22nd 2018.

Available on line/Publicado: October 16th 2018.

RESUMEN

En el presente trabajo se determinó la dinámica poblacional de los insectos *Heliothis virescens* y *Helicoverpa zea*, asociados al algodón transgénico y no transgénico. Para ello, se realizó el muestreo de insectos durante la fase fenológica: prefloración, periodo de floración y periodo de apertura de bellotas; así como la amplificación de regiones de DNA, que codifican la glicosiltransferasas para determinar el grado de evolución a la resistencia a *Bacillus thuringiensis* (Bt). Se observó nula incidencia de *Heliothis virescens* en el cultivo transgénico en poblaciones de Coahuila, sin embargo, se observó la incidencia de *Heliothis virescens* en algodón transgénico en Tamaulipas. Esta incidencia de campo pudiera deberse a que *H. virescens* ha desarrollado resistencia al algodón Bt. Además, se determinó una mayor diversidad de alelos del gen que codifica para glicosiltransferasas en la especie

*Corresponding Author:

Rodríguez-Herrera, R., Universidad Autónoma de Coahuila, Departamento de investigación en Alimentos, Facultad de Ciencias Químicas. Saltillo, Coahuila, México. E-mail: raul.rodriguez@uadec.edu.mx

the incidence of *H. virescens* was observed in transgenic cotton in Tamaulipas. This field incidence of *H. virescens* may be a consequence that the insect has developed resistance to Bt cotton. In addition, a higher allele diversity of the glycosyltransferase gene in *H. virescens*, when this insect was collected on transgenic cotton than those insects collected on non-transgenic cotton was determined.

KEY WORDS

Transgenic-cotton, Lepidoptera, Bt toxin resistance.

Introduction

Cotton is susceptible to different insect pests among them: cotton weevil *Anthonomus grandis* (Firmino *et al.*, 2013), Cotton stainers *Dysdercus* spp. (Shah 2014); red spider *Tetranychus urticae* (Guo *et al.*, 2015), aphids *Aphis gossypii* (Ramalho *et al.*, 2012), whitefly *Bemisia tabaci* (Ashfaq *et al.*, 2014) and pink bollworm *Pectinophora gossypiella* (Tabashnik *et al.*, 2002). Besides Lepidoptera Noctuidae, among them, cotton warbler *Heliothis virescens* (Blanco, 2012) and corn earworm *Helicoverpa zea* (Deplania *et al.*, 2008) represent some of the most important pests in Mexico, due to the severity of the damage, wide distribution and diversity of crops attacked. The damage and behavior of both species are similar in cotton. *H. virescens* is capable of causing a 100 % loss in cotton by flower and acorn destruction, it can also attack tender portion of leaves and other vegetative parts of growth (Loera *et al.*, 2008). In addition, *H. virescens* is difficult to control when attacking corn crops.

In Mexico, and especially in the La Laguna region for more than 12 years, several varieties of transgenic cotton have been cultivated, which have been planted in three quarters of the commercial lots, and the remaining area is planted with non-transgenic cotton, this circumstance undoubtedly implies an effect on the evolution of specific pest insect populations and could affect the genetic diversity of pest insects from other crops. The native varieties planted by the farmers constitute a reservoir of genes of world importance, but often, the production is not spectacular, their importance is that they retain valuable genetic information for resistance to pests and adverse environmental conditions (Diamond, 2002). Currently, the transgenic species increase their aptitude

H. virescens cuando las plantas de algodón transgénico se compararon con el algodón no transgénico.

PALABRAS CLAVE

Algodón transgénico, lepidóptera, Resistencia a toxina Bt.

Introducción

El cultivo de algodón es susceptible a diferentes plagas, entre las cuales se encuentran: el picudo del algodnero (*Anthonomus grandis*) (Firmino *et al.*, 2013), chinche manchadora (*Dysdercus* spp.) (Shah, 2014), araña roja (*Tetranychus urticae*) (Guo *et al.*, 2015), pulgones (*Aphis gossypii*) (Ramalho *et al.*, 2012), mosca blanca (*Bemisia tabaco*) (Ashfaq *et al.*, 2014) y gusano rosado (*Pectinophora gossypiella*) (Tabashnik *et al.*, 2002). Además de los lepidópteros noctuidae, dentro de los que destacan el gusano bellotero (*Heliothis virescens*) (Blanco, 2012) y el gusano elotero *Helicoverpa zea* (De polanía *et al.*, 2008), que representan uno de los grupos de plagas más importantes en México por la severidad de los daños que provocan y por su amplia distribución y diversidad de cultivos atacados; el daño y comportamiento de ambas especies es similar en algodón. *H. virescens* es capaz de causar el 100 % de pérdida en algodnero al destruir cuadros, flores y bellotas, además puede atacar porciones tiernas de hojas y otras partes vegetativas de crecimiento (Loera *et al.*, 2008). El daño es variable de acuerdo a la eficacia del control, que generalmente se hace con base en insecticidas (Loera *et al.*, 2008). No obstante, *H. virescens* es difícil de controlar cuando ataca al cultivo de maíz.

En México, especialmente en la región de La Laguna en el estado de Coahuila y en el Norte del estado de Tamaulipas, desde hace más de 12 años, se han cultivado diversas variedades de algodón transgénico, las cuales han sido plantadas en tres cuartas partes de lotes comerciales, mientras que en el área restante se siembra algodón no transgénico; esta circunstancia implica sin duda un efecto en la evolución de las poblaciones de insectos plaga específicos y pudiera afectar a la diversidad genética de insectos plaga de otros cultivos. Las variedades nativas plantadas por los agricultores, constituyen un reservorio de genes de importancia mundial, pero a menudo la producción no es espectacular; su importancia radica en que conservan la información genética valiosa para la resistencia a las plagas y condiciones ambientales adversas (Diamond,

and therefore, they are being sown freely and there may be the possibility that they cross with native varieties, and it is possible that the native races are at risk of disappearance or of contamination with transgenic genes, which may affect in epistatic form to the host genome (Rissler & Mellon 1996; Turrent, 2010).

Coates *et al.* (2008) reported *Bacillus thuringiensis* endotoxin-resistant insects and notes that it is a great challenge for the use of these biopesticides. The majority of Bt resistance mechanisms in selected field populations or in the laboratory are due to recessive mutations that interfere with the activation of insect receptors. However, there are occasional examples of dominant or semi-dominant mechanisms with unusual characteristics. The mechanisms involved in resistance to Bt toxins are due to the loss of carbohydrate-glycolipids since Bt toxins bind directly and specifically to glycolipids, which makes this carbohydrate binding dependent and relevant for the *in vivo* action of the toxin (Griffitts *et al.*, 2005). This loss of glycolipids has been associated with the loss of at least two genes encoding glycosyltransferases. These enzymes work in the intestine conferring susceptibility to the toxin (Griffitts *et al.*, 2003). Under this perspective, studies to understand the dynamics of resistance development of insects to these transgenic plants are vital. The objectives of this work were: to determine the populations of *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* associated with transgenic and non-transgenic cotton and identify the differences of the glycosyltransferase gene alleles that confer resistance to the *Bacillus thuringiensis* toxins in the insect (*Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea*) cotton pests.

Material and Methods

Sampling sites

During the period from April 2011 to June 2012, field planted with transgenic cotton crop in three Mexican states were identified; 1) samples from Torreon, San Pedro de Las Colonias and Saltillo counties from the state of Coahuila, 2) samples from Rio Bravo, Tamaulipas; and 3) samples of non-transgenic cotton from the state of Chiapas were obtained. In all the sites (Table 1) the lepidoptera's larva of *Heliothis* and *Helicoverpa* were collected through random sampling on plants from commercial fields. Some larvae were preserved in a

2002). Actualmente, las especies transgénicas aumentan su aptitud, por lo tanto están siendo sembradas libremente; y puede existir la posibilidad que se crucen con variedades nativas, por lo tanto, es posible que las razas autóctonas estén en riesgo de desaparición o de contaminación con genes transgénicos, que pueden afectar en forma epistática al genoma huésped (Rissler & Mellon, 1996; Turrent, 2010).

Coates *et al.* (2008), reportaron insectos resistentes a las endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* (Bt), y señalan que es un gran desafío para el uso de estos bioplaguicidas. La mayoría de los mecanismos de resistencia a Bt en poblaciones seleccionadas de campo o en el laboratorio, se debe a mutaciones recesivas que interfieren con la activación de los receptores en el insecto. Sin embargo, hay ejemplos ocasionales de mecanismos dominantes o semi-dominantes con características inusuales. Los mecanismos implicados en la resistencia a las toxinas Bt, es debido a la pérdida de glicolípidos de hidratos de carbono, ya que las toxinas de Bt se unen directamente y específicamente a los glicolípidos, lo que hace que esta unión a carbohidratos sea dependiente y relevantes para la acción de la toxina *in vivo* (Griffitts *et al.*, 2005). Esta pérdida de glicolípidos se ha asociado a la pérdida de al menos dos genes que codifican para glicosiltransferasas; estas enzimas funcionan en el intestino confiriendo susceptibilidad a la toxina (Griffitts *et al.*, 2003). Bajo esta perspectiva, es de vital importancia los estudios para entender la dinámica de desarrollo de resistencia de los insectos a estas plantas transgénicas. Los objetivos de este trabajo fueron: determinar las poblaciones de *Heliothis virescens* y *Helicoverpa zea* asociadas a algodón transgénico y no transgénico, e identificar las diferencias de los alelos de gen glicosiltransferasas que confieren resistencia a las toxinas de *Bacillus thuringiensis* en las especies insectíles *H. virescens* y *H. zea* plagas del algodón.

Material y Métodos

Sitios de muestreo

Durante abril de 2011 a mayo de 2012, fueron identificados en dos estados, lotes sembrados con algodón transgénico: 1) En el estado de Coahuila, donde se muestrearon lotes en los municipios de Torreón, San Pedro de las Colonias y Saltillo, 2) En Tamaulipas, donde se muestrearon lotes en el municipio de Río Bravo, y 3) En el estado de Chiapas se muestrearon lotes con algodón no transgénico. En todos los lotes (Tabla 1), larvas de lepidópteros de *Heliothis* y *Helicoverpa* de diferente estadio larval, fueron recogidas mediante un muestreo aleatorio, de las plantas dentro de las parcelas

Table 1.
Lepidoptera parasitic in transgenic and non-transgenic cotton from different Mexican regions.

Tabla 1.
Organismos insectiles parasitando algodón transgénico y no transgénico en diferentes áreas productivas de México.

Region	Specie	Larvae	Adults	Cultivars
Coahuila	<i>H. zea</i>	1	314	Transgenic cotton
Tamaulipas	<i>H. virescens</i>	23	0	Transgenic cotton
	<i>H. zea</i>	56	0	Transgenic cotton
Chiapas	<i>H. virescens</i>	4	0	Non transgenic cotton

plastic bottle with ethanol 70 %, and other larvae were allowed to continue their life cycle to corroborate their identification at the species level.

Taxonomic identification

Lepidoptera larvae were identified using the dichotomous key (Stehr, 2005). The larvae collected and maintained in alcohol were divided into two groups according to their morphological characteristics for identification of the corresponding specie. These larvae were then used for DNA isolation. On the other hand, the subgroup that was allowed to continue their life cycle was placed in plastic containers with moistened soil to promote their metamorphosis and complete the pupa phase until the adult stage under laboratory conditions, to corroborate their taxonomy at the level of specie.

DNA isolation

From each larva, a tissue sample (0.1 g) was used for DNA isolation. To remove ethanol from preservation, the larvae were placed on filter paper and for rapid alcohol evaporation, they were placed in a gas extraction hood for about 5 minutes or until the ethanol odor disappeared. Subsequently, a fragment from each larva was placed in liquid nitrogen for 12 hours. The insect tissue was macerated using an MP cell disruptor (6 m / s for 60 seconds) and the "D" MPbio matrix (FastPrep®). DNA isolation was performed using the AxyPrep Miniprep Genomic Blood DNA Kit procedure. DNA integrity was determined by gel electrophoresis on 1 % agarose. DNA quantification was performed on an Epoch™ brand plate reader BioTek microplate spectrophotometer with Take3™ model 8x2 and DNA quantification by the Gen5 1.11 program.

establecidas comercialmente. Algunas larvas se conservaron en botellas de plástico que contienen alcohol etílico (70 %), y a otras larvas se les permitió continuar su ciclo de vida para corroborar su identificación a nivel de especie.

La identificación taxonómica de insectos

Las larvas de Lepidóptera se identificaron utilizando la clave dicotómica por Stehr (2005). Las larvas recogidas y mantenidas en alcohol, fueron divididas en dos grupos: en función de sus características morfológicas y correspondientes a la especie identificada. Posteriormente, se utilizaron estas larvas para el aislamiento de DNA. Por otro lado, a un subgrupo de larvas, se les permitió continuar su ciclo de vida, para ello se colocaron en recipientes de plástico con tierra húmeda para promover su metamorfosis, y así completar la fase de pupa y luego a adulto en condiciones de laboratorio, para la corroboración taxonómica a nivel de especie.

Aislamiento de DNA

De cada larva se recogió una muestra de tejido (0.1 g), para la extracción de DNA. Para eliminar el etanol producto de la conservación, las larvas se colocaron en papel de filtro; para la rápida evaporación del alcohol los tejidos se colocaron en una campana de extracción de humos durante aproximadamente 5 minutos o hasta que el olor a etanol desapareció. Posteriormente, el fragmento de cada larva se colocó en nitrógeno líquido durante 12 horas. El tejido del insecto se maceró, usando un disruptor de células MP (6 m/s por 60 segundos) y la matriz MPbio "D" (FastPrep®). El aislamiento de DNA, se realizó utilizando el procedimiento del Kit AxyPrep Blood DNA genómico Miniprep. La integridad del DNA, se determinó mediante electroforesis en gel en 1 % de agarosa. La cuantificación de DNA, se llevó a cabo en un lector de placas de marca Epoch™, un espectrofotómetro de

DNA amplification

Polymerase chain reaction (PCR) was performed to amplify the OnBreGalt5 (β -1, 3-Galactosyltransferase) gene using the primers pair: (Onb3GalT5-F1) (5'CGTGACAATGATGTCGTTCAA3') and (Onb3GalT5-R1) (5' TGCTGCGGCACTAAGCCCAC3'), which were previously designed by Coates *et al.* (2008). PCR was carried out in a final volume of 23 μ L, integrated as follows: 14.5 μ L of sterile deionized water, 2.5 μ L of 10X buffer, 1 μ L of MgCl₂ (50 mM), 0.5 μ L of dNTPs (10 mM), 2 μ L of each primer (10 pmol), 0.5 μ L of Taq polymerase (5 U/L) and 2 μ L of the DNA sample (100 ng/L). The PCR amplification program was: denaturation at 95 °C for 2.5 min, hybridization at 69.7 °C for 0.30 minutes and polymerization at 72 °C for 1 minute for 40 cycles using a P_x2 thermal cycling thermocycler. The amplified products were visualized by 1.5 % agarose gel electrophoresis. 100 bp ladder DNA marker (Invitrogen™) was used as a reference.

Statistical analysis

The amplified bands in each case were coded as presence (1) and absence (0). From the binary code matrix obtained, the following parameters were estimated: allele frequencies, genotype frequencies, population genetic balance, and Wright statistics (F_{IS} , F_{IT} and F_{ST}). We then used genetic parameters to compare intra-specie and inter-species diversity of the insect populations collected in transgenic and non-transgenic cotton. All analyzes were performed using the Genepop statistical package (4.0.10).

Results and Discussion

Insect species collected

From the 12 years that Bt transgenic cotton has been cultivated in the La Laguna, Coahuila and North Tamaulipas, these type of cotton has covered $\frac{3}{4}$ parts of the cultivated area, and to date, there has been no information on the population dynamics of *Heliothis virescens* and their resistance evolution to Bt plants over time, which could certainly have affected insect populations. For the specific case of La Laguna, in Table 1, it was not possible to collect *H. virescens* attacking the cotton, which is what would be expected, but it was possible to capture *H. virescens* when the sex pheromone was used, indicating that the primary

microplacas BioTek con Take3™ modelo 8x2 y la cuantificación de DNA, por el programa Gen5 1.11.

Amplificación de DNA

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se llevó a cabo para amplificar el gen OnBreGalt5 (β -1, 3-Galactosyltransferase) utilizando los iniciadores (Onb3GalT5-F1) (5'CGTGACAATGATGTCGTTCAA3') y (Onb3GalT5-R1) (5'TGCTGCGGCACTAAGCCCAC3'), que fueron previamente diseñados por Coates *et al.* (2008). La PCR se llevó en un volumen final de 25 μ L, integrado como sigue: 14.5 μ L de agua desionizada estéril, 2.5 μ L de tampón 10X, 1 μ L de MgCl₂ (50 mM), 0.5 μ L de dNTPs (10 mM), 2 μ L de cada iniciador (22:00), 0.5 μ L de Taq polimerasa (5 U/L) y 2 μ L de la muestra de DNA (100 ng/L). El programa de amplificación de la PCR fue: desnaturalización a 95 °C durante 2:30 minutos, hibridación a 69.7 °C durante 0:30 minutos y polimerización a 72 °C por 1 minuto durante 40 ciclos utilizando un termociclador ciclo térmico P_x2. Los productos amplificados se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. Un marcador de 100 pb de DNA de escalera (Invitrogen™), se utilizó como referencia.

Análisis estadístico

Las bandas amplificadas en cada caso, se codificaron como presencia (1) y ausencia (0). Con datos de la muestra codificadas con el código binario, se estimaron los parámetros siguientes: frecuencias alélicas, frecuencias genotípicas, el equilibrio genético de la población y estadística Wright (F_{IS} , F_{IT} y F_{ST}). Después, se utilizaron los parámetros genéticos para comparar intraespecie y la diversidad entre las especies de las poblaciones de insectos recogidos en cultivo transgénico y no transgénico. Todos los análisis se realizaron con el paquete estadístico Genepop (4.0.10).

Resultados y Discusión

Especies insectiles colectadas

De los 12 años que se tiene cultivando algodón transgénico Bt, en la región de La Laguna en el estado de Coahuila y en el Norte del estado de Tamaulipas, México, este tipo de algodón cubre tres cuartas partes del área cultivada, y a la fecha, se ha carecido de información de la dinámica poblacional de *Heliothis virescens* y su evolución de la resistencia a plantas Bt a través del tiempo, lo que sin duda pudiera haber afectado las poblaciones insectiles. Para el caso específico de la región de La Laguna en el estado de Coahuila, México, en la Tabla 1 se puede observar que en este estudio, no

insect was present in the growing area. However, it was possible to collect *Helicoverpa zea* that traditionally attacks corn in cotton orchards at very low density.

For the Northern region of Tamaulipas, it was possible to detect both species *Heliothis virescens* and *H. zea*, although in different proportions (Table 1). The proportion of *H. zea* is higher than that of *H. virescens*, this presence in transgenic cotton implies that the population of *H. virescens* has modified its genetic structure due to the selection pressure of maize-cotton. These differences in the presence of *H. virescens* in cotton in both regions can be explained by the fact that maize plays an important role as a secondary host by acting as a pressure factor. For the case of La Laguna, maize is mainly for forage purposes, which implies that it is harvested in an immature state for its silage and this prevents that the insect biological cycle is completed, in contrast in the North of Tamaulipas, corn is produced for grain obtaining, what of certainly helps the insect to complete its biological cycle and then field is used to grow cotton. This behavior could be the reason that *H. virescens* is generating resistance when feeding on transgenic maize and later on transgenic cotton.

The absence of insect species in plants due to the toxicity of Cry 1Ab protein has already been reported by Flint *et al.* (1996) who observed a reduction in the infestation of *P. gossypiella* pinkworm larvae on transgenic cotton lines in contrast to non-transgenic lines. The reduction varied from 93 to almost 100 % and reflects the condition present in the lines containing the Bollgard gene and is highly resistant to this pest. In the same trend, Henneberry & Forlow (2000) determined survival of *P. gossypiella* larvae less than 0.1 cm in transgenic cotton lines.

Although initially, the introduction of a transgenic gene for insect resistance may be effective, Flint *et al.* (1996) demonstrated that the number of *P. gossypiella* larvae of the fourth instar was practically zero in fields planted with transgenic cotton which have the Bollgard gene, but not in control plants. Over time and if producers do not have proper handling, resistance to insects can be overwhelmed by the evolution of genes for resistance in insects towards that transgenic gene.

fue posible coleccionar a *H. virescens* atacando el algod6n que es lo que se esperaba, pero si fue posible capturar a *H. virescens* cuando se utiliz6 feromona sexual, lo que indica que el insecto primario si estaba presente en el 6rea de cultivo. Sin embargo, se logro coleccionar a *H. zea* que tradicionalmente ataca a maiz en algod6n a muy baja densidad.

Para la regi6n Norte de Tamaulipas, M6xico, fue posible detectar a ambas especies (*H. virescens* y *H. zea*), aunque en proporciones diferentes (Tabla 1). Siendo mayor la proporci6n de *H. zea* que de *H. virescens*; esta presencia en algod6n transg6nico, implica que la poblaci6n de *H. virescens* ha modificado su estructura gen6tica producto de la presi6n de selecci6n maiz-algod6n. Estas diferencias de la presencia, sobre todo de *H. virescens*, en algod6n en ambas regiones puede explicarse a raz6n de que el maiz juega un rol importante como hospederero secundario. Para el caso de La Laguna en el estado de Coahuila, el maiz es sembrado con fines forrajeros, lo que implica que se ha cosechado en estado inmaduro para su ensilado, y esto pudiera evitar que el insecto complete su ciclo biol6gico. En contraste, para el Norte de Tamaulipas, donde el maiz es sembrado para producci6n de grano, lo que de cierta manera pudiera ayudar a que el insecto complete su ciclo biol6gico, y as6 en su fase adulta arribar a los cultivos del algod6n y continuar con el ciclo. Este comportamiento pudiera ser la causa de que *H. virescens* est6 generando resistencia al alimentarse de maiz y posteriormente de algod6n transg6nico.

La ausencia de especies de insectos en las plantas debido a la toxicidad de la prote6na Cry 1Ab, ya se ha reportado por Flint *et al.* (1996), quienes observaron una reducci6n en la infestaci6n de larvas del gusano rosado *P. gossypiella* en l6neas de algod6n transg6nicas, en contraste con las no transg6nico. La reducci6n vari6 de 93 % a casi 100 %, reflejando la condici6n presente en las l6neas que contienen el gen Bollgard y son altamente resistentes a esta plaga. En la misma tendencia, Henneberry & Jech (2000), determinaron una supervivencia de las larvas de *P. gossypiella* menos de 0.1 cm en las l6neas de algod6n transg6nicas.

Aunque en un principio la introducci6n de un gen transg6nico para la resistencia a insectos puede ser eficaz, Flint *et al.* (1996) demostraron que el n6mero de larvas de *P. gossypiella* de cuarto instar, fue pr6cticamente cero en campos sembrados con algod6n transg6nico que tienen el gen Bollgard, pero no en el control. Con el tiempo, y si no

Table 2.
Amplified bands by PCR from genes encoding glycosyltransferases from *Heliothis virescens* larvae and adults.

Tabla 2.
Bandas amplificadas por PCR de los genes que codifican glicosiltransferasas de larvas y adultos de *Heliothis virescens*.

Alleles	Transgenic cotton		Non-transgenic cotton	
	Frequency	F _{IS}	frequency	F _{IS}
350	0.2333	-0.2727	0.5000	-1.0000
400	0.5333	-0.5849	0.5000	-1.0000
450	0.2000	-0.2174		
600	0.03333	0.0000		
Total		-0.3684		-1.0000

Allelic Diversity

Through PCR different bands were amplified as potential genes encoding glycosyltransferase. It was possible to amplify a greater number of DNA bands of *Heliothis virescens* collected from transgenic cotton compared to non-transgenic cotton (Table 2), this may be due to mutations occurred when these insects were subjected to a selection pressure when feeding on transgenic tissue. On the other hand, it is interesting

se tiene un manejo adecuado de la resistencia a insectos, esta puede ser sobrepasada por la evolución de genes para resistencia en los insectos hacia ese gen transgénico.

Diversidad alélica

Mediante la reacción en cadena de polimerasa, se amplificaron diferentes bandas como posibles genes que codifican la glicosiltransferasa. Se logró amplificar un mayor número de bandas de DNA de *H. virescens* colectados de algodón transgénico, en comparación con el algodón no

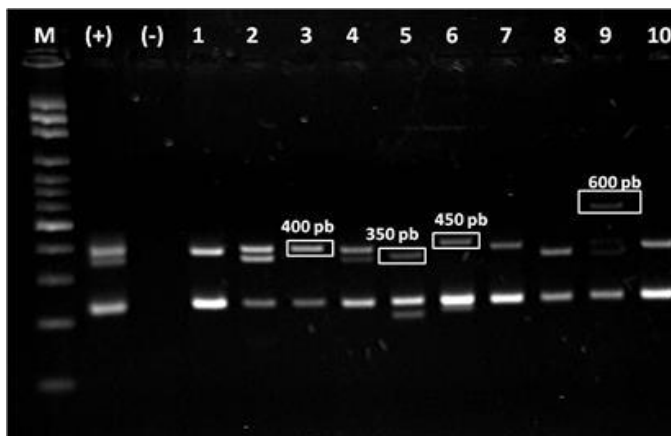


Figure 1. DNA amplicons obtained with OnBreGalt5 primers in samples collected in a transgenic cotton plant. M: 100 bp marker, (-) negative control, (+) positive control, Lane 3: 31-2, Coahuila. Lane 5: 63-1, Tamaulipas. Lane 6: 59-2, Tamaulipas. Lane 9: 89-4, Tamaulipas.

Figura 1. Amplicones de DNA obtenidos con los iniciadores OnBreGalt5 en muestras de colectadas en planta de Algodón transgénico. M: marcador 100pb, (-) control negativo, (+) control positivo, Carril 3: 31-2, Coahuila. Carril 5: 63-1, Tamaulipas. Carril 6: 59-2, Tamaulipas. Carril 9: 89-4, Tamaulipas.

Table 3.
Amplified bands by PCR from genes encoding glycosyltransferases from
***Heliothis virescens* larvae and adults and their F_{IS} value.**
Tabla 3.
Bandas amplificadas por PCR de genes que codifican para
glicosiltransferasa en larvas y adultos of *Helicoverpa zea* y sus valores F_{IS} .

Alleles	Transgenic cotton	
	Frequency	F_{IS}
250	0.2576	0.9231
300	0.0303	-0.0159
350	0.2576	-0.1736
400	0.2727	-0.0541
450	0.0909	-0.0847
600	0.0909	-0.0847
Total		0.1554

to note that only in DNA from insects found in transgenic cotton was it possible to amplify two bands with a molecular weight of 450 and 600 bp (Figure 1), which shows that there are regions of DNA in the genome of *H. virescens* that could code for proteins conferring Bt resistance.

For *Helicoverpa zea* a higher amplification pattern was observed in contrast to *H. virescens* when DNA was obtained from insect attacking directly to transgenic cotton (Table 3). The fragments amplified for the glycosyltransferases gene could be correlated with the presence of sequences in the insects, thus presenting a greater synthesis of proteins that inhibit the effect of the biological insecticide, and therefore a greater tolerance and consumption of plant tissue.

Hardy-Weinberg Model

Table 4 shows the frequency of homozygotes and heterozygotes in the *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* populations collected from transgenic cotton and showing that there is a tendency for an excess of heterozygotes and a deficiency of homozygotes. One possible explanation may be due to the reproductive isolation to which these populations have been subjected and which implies that there is no random crossing between individuals or by selective pairing. Checa *et al.* (1998) points out that the cause of the increase in homozygosity is due to genes involved in the character being selected and genes that are in linkage disequilibrium with them. Another possible

transgénico (Tabla 2), esto puede ser debido a mutaciones ocurridas al estar sometidos estos insectos a una presión de selección al alimentarse de tejido transgénico. Por otra parte, es interesante observar que, sólo del DNA proveniente de insectos encontrados en algodón transgénico, se amplificaron dos bandas con un peso de 450 y 600 pb (Figura 1), lo que demuestra que hay regiones de DNA en el genoma de *H. virescens* que podrían codificar para cualquier proteína que confiera resistencia BT.

Para *H. zea*, se observó un patrón de amplificación mayor en contraste con *H. virescens*, cuando el DNA se obtuvo de insectos colectados directamente atacando algodón transgénico (Tabla 3). Los fragmentos amplificados para el gen glicosiltransferasas, pudieran correlacionarse con la presencia de secuencias en los insectos, así que al presentar una mayor síntesis de proteínas que inhiben el efecto del insecticida biológico, provocaría mayor tolerancia a las proteínas de este gen y consumo de tejido de la planta.

Equilibrio de Hardy-Weinberg

La Tabla 4, muestra la frecuencia de homocigotos y heterocigotos en las poblaciones *H. virescens* y *H. zea* recogidos en el algodón transgénico, mostrando una tendencia a un exceso de heterocigotos y una deficiencia de homocigotos. Una posible explicación pudiera ser, debido al aislamiento reproductivo al que se han sometido estas poblaciones y que incide que no ocurra un cruzamiento aleatorio entre individuos, o bien por un apareamiento selectivo. Checa *et al.* (1998), señalaron que la causa del aumento en la homocigosidad, se debe a los genes implicados en el carácter que se está

Table 4.

Observed and expected frequency of homozygotes and heterozygotes under the Hardy-Weinberg model in *Helicoverpa zea* and *Heliothis virescens* sampled in transgenic cotton.

Tabla 4.

Frecuencia observada y esperada de homocigotos y heterocigotos bajo el modelo de Hardy-Weinberg en *Helicoverpa zea* y *Heliothis virescens* muestreados en el algodón transgénico.

Region	Population	Specie	Homozygotes		Heterozygotes	
			E	O	E	O
La Laguna	Ávila Camacho TC	HZ	5.2609	2	6.7391	10
	Ejido la Fe TC	HZ	0.3333	0	1.6667	2
Tamaulipas	Field 1 TC	HV	3.0588	0	5.9412	9
	Field 2 TC	HZ	4.9189	9	14.0811	10
	Field 3 TC	HV	2.1818	2	3.8182	4

TC = transgenic cotton, NTC = non transgenic cotton, HV = *Heliothis virescens*, HZ = *Heliothis zea*.

AT = algodón transgénico, ANT = algodón no transgénico, HV = *Heliothis virescens*, HZ = *Heliothis zea*.

Table 5.

Wright statistics in *Helicoverpa zea* and *Heliothis virescens* populations collected on transgenic cotton.

Tabla 5.

Estadísticos de Wright en poblaciones de individuos de *Helicoverpa zea* y *Heliothis virescens* colectados sobre algodón transgénico.

Population	Wright Parameter		
	F_{IS}	F_{ST}	F_{IT}
Chiapas NTC	-1.000000		
Ávila Camacho TC (Coahuila)	-0.517241		
Ejido la Fe TC (Coahuila)	-0.333333		
Sitio 1 TC (Tamaulipas)	-0.565217		
Sitio 3 TC (Tamaulipas)	0.289641	0.189687	0.373183

TC = transgenic cotton, NTC = non transgenic cotton

AT = algodón transgénico, ANT = algodón no transgénico

cause could be small population size or sampling-related effects (genetic drift) and can be measured using the F_{SI} statistic (Cañon et al., 2007).

Wright statistics

The genetic structure of the two insect species was inferred by the Wright F statistics (F_{IT} , F_{ST} , and F_{IS}) (Wright, 1978) in each of the sampled insect populations. The F_{IS} values in the insect populations collected on transgenic cotton were negative except for the transgenic cotton population obtained from Tamaulipas. In this case,

seleccionando y de los genes que están en desequilibrio de ligamiento con ellos. Otra posible causa pudiera ser, el tamaño reducido de la población o a efectos relacionados con el muestreo (deriva genética), y puede ser medido mediante el estadístico F_{SI} (Cañon et al., 2007).

Estadísticos de Wright

La estructura genética de las dos especies de insectos, se infirió mediante los estadísticos F de Wright (F_{IT} , F_{ST} y F_{IS}) (Wright, 1978), en cada una de las poblaciones de insectos muestreadas. Los valores de F_{IS} en las poblaciones de insectos colectados en algodón

F_{IS} estimates the deficiency of heterozygotes as a consequence of the reproductive isolation, which entails a non-random cross-breeding of individuals, that is, it measures the inbreeding coefficient and values can range from 0 to 1 (Checa *et al.*, 1998). Therefore, the data suggest that the insect populations collected in Tamaulipas transgenic cotton might be that there is no random mating or that this result is a selection effect of individuals who present tolerance to the biological insecticide produced by the transgenic plants, since the more susceptible die and those with the tolerance gene survive (Table 5).

The negative values of the populations (Table 5) indicate higher levels of observed heterozygosity than expected under equilibrium, which may be a consequence of the so-called Wahlund effect, as a result of recent crosses between animals belonging to genetically different lines or these excesses of heterozygotes could be the result of negative associative mating (Cañon *et al.*, 2007).

Conclusions

It was possible to determine the diversity of the alleles, in which a greater variation in the *H. virescens* species was observed when insects from the transgenic cotton plants were compared with those from the non-transgenic cotton, the variation is attributed to possible mutations that arise by the selection pressure on Bt toxins-transgenic cottons. This was corroborated by the greater number of genome sequences observed from the transgenic cotton crop represented by specific fragments of 450 and 600 bp.

Referencias

- Ashfaq, M., Hebert, P.D.N., Mirza, M.S., Khan, A.M., Mansoor, S., Shah, G.S. and Zafar, Y. (2014). DNA Barcoding of *Bemisia tabaci* Complex (Hemiptera: Aleyrodidae) Reveals Southerly Expansion of the Dominant Whitefly Species on Cotton in Pakistan. *PLoS ONE* 9(8): e104485. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104485>
- Blanco, C.A. (2012). *Heliothis virescens* and Bt cotton in the United States. *GM Crops Food*, 3(3): 201-212. <https://doi.org/10.4161/gmcr.21439>
- Cañon, J., Cortes, O., García, D., García-Atance, M.A., Tupac-Yupanqui, I. and Dunner, S. (2007). Distribución de la variabilidad genética en la raza de lidia. *Revista Archivos de Zootecnia*, 56: 391-396. http://www.uco.es/organiza/servicios/publica/az/php/img/web/01_08_30_03DistribucionCanon.pdf
- Checa, M.L., Vega, J.L., García-Atance, M.A., Vallejo M. and Dunner, S. (1998). Distribución de la variabilidad genética en poblaciones de ponis españoles: resultados preliminares. *Revista Archivos de Zootecnia*, 47: 169-174. <http://>

transgénico, fueron negativos, a excepción de la población de algodón transgénico de Tamaulipas, México. En este caso, el F_{IS} estima la deficiencia de heterocigotos como consecuencia del aislamiento reproductivo, lo cual conlleva un cruzamiento no aleatorio de individuos, es decir, mide el coeficiente de endogamia, y los valores pueden ir de 0 a 1 (Checa *et al.*, 1998). Por lo tanto, los datos sugieren que las poblaciones de insectos colectados en algodón transgénico de Tamaulipas, México, pudiesen ser debidas a que no hay apareamiento aleatorio, o a que este resultado, es un efecto de selección de individuos que presentan tolerancia al insecticida biológico, producido por las plantas transgénicas, ya que los más susceptibles mueren y los que presentan el gen de tolerancia sobreviven (Tabla 5).

Los valores negativos de las poblaciones (Tabla 5), indican mayores niveles de heterocigosis observada que la esperada bajo equilibrio, lo que puede ser consecuencia del denominado efecto Wahlund, como producto de cruzamientos recientes entre animales pertenecientes a líneas genéticamente diferentes, o bien estos excesos de heterocigotes, podrían ser el resultado de apareamiento asociativo negativo (Cañon *et al.*, 2007).

Conclusiones

Fue posible determinar la diversidad de los alelos, en los que se observó una mayor variación en la especie *H. virescens*, cuando las plantas de algodón transgénico se compararon con el algodón no transgénico, la variación se atribuye a posibles mutaciones que surgen por la presión de selección de las toxinas de Bt en los algodones transgénicos. El cual fue corroborado por el mayor número de secuencias del genoma observados en los insectos provenientes del cultivo de algodón transgénico, representado por fragmentos específicos de 450 y 600 pb, y ausentes en los insectos provenientes del cultivo de algodón no transgénico.

- helvia.uco.es/xmlui/bitstream/handle/10396/3377/05_10_10_06checha.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Coates, B.S., Sumerford, D.V. and Lewis, L.C. (2008). Segregation of European corn borer, *Ostrinia nubilalis*, aminopeptidase 1, cadherin, and bre5-like alleles, from a colony resistant to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxins, are not associated with F2 larval weights when fed a diet containing Cry1Ab. *Journal of Insect Science*, 8(21): 1-8. <https://doi.org/10.1673/031.008.2101>
- De polanía, I. Z., Álvarez, R. J. A., Arévalo, M.H.A., Mejía, C. R., and Bayona, R.M.A. (2008). Susceptibilidad de cuatro noctuidos plaga (Lepidoptera) al gene Cry1Ac del *Bacillus thuringiensis* incorporado al algodónero. *Revista Colombiana de Entomología*, 34(1): 41-50. https://www.researchgate.net/profile/Helber_Maldonado/publication/285943966_Susceptibility_of_four_noctuid_pests_Lepidoptera_to_the_Cry1Ac_gene_of_Bacillus_thuringiensis_incorporated_into_cotton/links/5ae25ba9aca272fdaf8fb080/Susceptibility-of-four-noctuid-pests-Lepidoptera-to-the-Cry1Ac-gene-of-Bacillus-thuringiensis-incorporated-into-cotton.pdf
- Diamond, J. (2002). Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. *Nature*, 418: 700-707. <https://doi.org/10.1038/nature01019>
- Firmino, A.A.P., Fonseca, F.C.dA., de Macedo, L.L.P., Coelho, R.R., Antonino de Souza Jr, J.D., Togawa, R.C., Silva-Junior, O.B., Pappas-Jr., G.J., Mattar da Silva, M.C., Engler, G. and Grossi-de-Sa, M.F. (2013). Transcriptome Analysis in Cotton Boll Weevil (*Anthonomus grandis*) and RNA Interference in Insect Pests. *PLoS ONE* 8(12): e85079. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085079>
- Flint, H.M., Antilla, L., Leggett, J.E. and Parks, N.J. (1996). Seasonal Infestation by Pink Bollworm *Pectinophora gossypiella* (Saunders) of Transgenic Cotton Containing the BollGard™ Gene, planted in commercial fields in central Arizona. *Southwestern Entomologist*, 21: 229-235.
- Griffitts, J.S., Haslam, S.M., Yang, T., Garczynski, S.F., Mulloy, B., Morris, H., Cramer, P.S., Dell, A., Adang, M.J. and Aroian, R.V. (2005). Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. *Science*, 307(5711): 922-5. <https://doi.org/10.1126/science.1104444>
- Griffitts, J.S., Huffman, D.L., Whitacre, J.L., Barrows, B.D., Marroquin, L.D., Muller, R., Brown, J.R., Henet, T., Esko, J.D. and Aroian, R.V. (2003). Resistance to a bacterial toxin is mediated by removal of a conserved glycosylation pathway required for toxin-host interaction. *Journal Biological Chemistry*, 278(46): 45594-602. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308142200>
- Guo, Y.Y., Tian, J.C., Shi, W.P., Dong, X.H., Romeis, J., Naranjo, S.E., Hellmich, R.L. and Shelton, A.M. (2015). The interaction of two-spotted spider mites, *Tetranychus urticae* Koch, with Cry protein production and predation by *Amblyseius andersoni* (Chant) in Cry1Ac/Cry2Ab cotton and Cry1F maize. *Transgenic Research*, 25(1): 33-44. <https://doi.org/10.1007/s11248-015-9917-1>
- Henneberry, T.J. & Jech, L.F. (2000). Seasonal Pink Bollworm *Pectinophora gossypiella* (Saunders), Infestations of transgenic and non-transgenic Cottons. *Southwestern Entomologist*, 25(4): 273-286.
- Loera, G.J., López, A. J. and Reyes, R.M.A. (2008). Complejo *Heliothis virescens* y *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae), en Casos de Control Biológico en México. Arredondo, B.H.C y Rodríguez del Bosque, L.A (Ed). Mundi Prensa México. 57-74.
- Ramalho, F.S., Fernandes, F.S., Nascimento, A.R.B., Nascimento Júnior, J. L., Malaquias, J. B. and Silva, C.A.D. (2012). Feeding Damage from Cotton Aphids *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Heteroptera: Aphididae), in Cotton with Colored Fiber Intercropped with Fennel. *Annals of the Entomological Society of America*, 105(1): 20-27. <https://doi.org/10.1603/AN11122>
- Rissler, J. & Mellon, M. (1996). *The Ecological Risks of Engineered Crops*. Cambridge, MA: MIT Press. USA. 192 pp.
- Shah, S.I.A. (2014). The Cotton Stainer (*Dysdercus koenigii*): An Emerging Serious Threat for Cotton Crop in Pakistan. *Pakistan Journal of Zoology*, 46(2): 329-335. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.873.1091&rep=rep1&type=pdf>
- Stehr, F.W. (2005). *Inmature insects*. Ed. Kendal/Hunt Publishing Co. USA. 749 pp.
- Tabashnik, B.E., Dennehy, T.J., Sims, M.A., Larkin, K., Head, G.P., Moar, W.J. and Carrière, Y. (2002). Control of Resistant Pink Bollworm (*Pectinophora gossypiella*) by Transgenic Cotton That Produces *Bacillus thuringiensis* Toxin Cry2Ab. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8): 3790-3794. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.8.3790-3794.2002>

- Turrent, F.A., Cortés, F.J.I., Espinosa, C.A., Mejía, A.H. and Serratos, H.J.A. (2010). ¿Es ventajosa para México la tecnología actual de maíz transgénico?. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 1(4): 631-646. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342010000400015
- Wright, S. (1978). *Evolution and the Genetics of Population*, Vol. IV. Variability Within and Among Natural Populations. The University of Chicago Press, Chicago.