



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS y FORESTALES

Dispersión y mortalidad de larvas de *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae) en híbridos de maíz convencional y transgénico *Bt*.
Potenciales implicancias para el manejo de la resistencia.

Tesis presentada para optar al título de Magister Scientiae en Protección Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata

Ing. Agr. Diego Ernesto Szwarc

Director

Dr. Eduardo Víctor Trumper

Codirectora

Dra. Nancy Mabel Greco

Jurados

Ing. Agr. (M. Sc.) Sara Cáceres

Ing. Agr. (Mg.) Marcela Lietti

Dr. Eduardo Virla

Fecha de defensa de tesis: 18 de diciembre de 2018

Dedicatoria

A mi esposa Yanina, por su amor, confianza, paciencia y acompañamiento a lo largo de este camino

A mi hijo Joaquín, lo más hermoso que tengo, su existencia hace que mi vida tenga un propósito

A mis padres, Erika y Ernesto, por su amor incondicional, por los valores transmitidos, por enseñarme a valorar el esfuerzo en cada logro y por dejarme volar detrás de mis sueños

A mis hermanas, Mariela y Claudia, por inculcarme la fe en Dios y la Virgen

En memoria de María Ana Sosa, por guiar mis primeros pasos en la entomología y contagiarme su pasión por esta fascinante disciplina

Agradecimientos

A Dios por darme el don de la vida

A mi director Dr. Eduardo Trumper, por su dedicación y apoyo a lo largo del desarrollo de este trabajo

A mi codirectora Dra. Nancy Greco, por su apoyo y generosa colaboración en la redacción de esta tesis

Al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, por brindarme la posibilidad de esta instancia de formación profesional

A mis compañeros de la Estación Experimental Agropecuaria de INTA Reconquista, especialmente al Director y a los integrantes del Área de Producción Vegetal por su apoyo y colaboración en ensayos, análisis de datos y redacción

A mis compañeras del laboratorio de Entomología, Daniela y Melina, por su compañerismo y aguante, sobre todo en momentos difíciles

A los demás integrantes del grupo del almuerzo, Marcelo y Luciano, por su comprensión y motivación desde el primer día

A mi compañera y amiga Ana Brach, por sus valiosos consejos, generosidad y hospitalidad

A mis compañeros de Maestría, especialmente a Eduardo, José, Matías, Juan y Raúl, por la amistad y los momentos compartidos durante el cursado

Finalmente, un especial agradecimiento al dúo dinámico, Andrés y Daniel, y también a Marcelo por su predisposición e incansable colaboración en los ensayos de campo y laboratorio. Fundamentalmente por mantener el humor intacto luego de largas horas compartidas bajo el sol del verano

Declaración

“Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original, producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no ha sido presentado, en forma parcial o total, como una tesis en esta u otra institución.”

Ing. Agr. Diego Ernesto Szwarc

Publicaciones derivadas de la tesis

Szwarc, D., Trumper, E. 2018. Movimiento y dispersión de larvas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) entre plantas de maíz *Bt* y convencional, potenciales implicancias para el manejo de la resistencia de insectos (MRI). XVI Jornadas Fitosanitarias Argentinas. 10-12 de octubre de 2018. Tucumán, Argentina. Rev. Agro. Noroeste Argent. Suplemento Vol. 38 (1). ISSN 0080-2069. 182-183.

TABLA DE CONTENIDOS

Dedicatoria	i
Agradecimientos	ii
Declaración	iii
Publicaciones derivadas de la tesis	iv
Tabla de contenidos	v
Lista de tablas	viii
Lista de figuras	xi
Abreviaturas	xiii
Resumen	xiv
Abstract	xv
Capítulo 1 Introducción general y antecedentes	1
1.1) El cultivo de Maíz	1
1.2) Principales plagas del maíz	2
1.3) Aspectos biológicos de <i>Spodoptera frugiperda</i> J. E. Smith y daños causados a la planta	2
1.4) Manejo de <i>Spodoptera frugiperda</i> en maíz	5
1.5) Resistencia de insectos a cultivos <i>Bt</i>	9
1.6) Manejo de la resistencia de insectos a cultivos <i>Bt</i>	9
1.7) El refugio integrado como táctica alternativa en la estrategia AD/R	12
1.8) Hipótesis y predicciones	17
1.9) Objetivos	19
1.9.1) Objetivo general	19

1.9.2) Objetivos específicos	19
1.10) Organización de la tesis	20
Capítulo 2 Movimiento, dispersión y supervivencia de <i>S. frugiperda</i> en diferentes configuraciones de siembra de maíz <i>Bt</i> y no <i>Bt</i>.....	21
2.1) Introducción.....	21
2.1.1) Objetivos específicos	24
2.2) Materiales y métodos.....	24
2.2.1) Sitio experimental	24
2.2.2) Población de <i>Spodoptera frugiperda</i>	25
2.2.3) Material vegetal.....	26
2.2.4) Prácticas culturales.....	26
2.2.5) Ensayo 1	27
2.2.6) Ensayo 2	31
2.3) Resultados	33
2.3.1) Ensayo 1	33
2.3.2) Ensayo 2	43
2.4) Discusión	45
Capítulo 3 Evaluación de susceptibilidad de diferentes estadios de <i>S. frugiperda</i> a las toxinas Cry1A.105 y Cry2Ab2 expresadas en hojas de maíz <i>Bt</i>.....	51
3.1) Introducción.....	51
3.1.1) Objetivo específico.....	53
3.2) Materiales y métodos.....	53
3.2.1) Sitio experimental	53
3.2.2) Material vegetal.....	54
3.2.3) Población de <i>Spodoptera frugiperda</i>	54
3.2.4) Procedimiento	54
3.2.5) Variables analizadas.....	55

3.3) Resultados	57
3.3.1) Eficacia de control de los distintos estadios larvales a los 7 días	57
3.3.2) Supervivencia de larvas de los distintos estadios alimentadas con hojas de maíz <i>Bt</i>	58
3.3.3) Cocientes de chances de supervivencia <i>Bt</i> – no <i>Bt</i> según estadios larvales..	60
3.3.4) Peso de pupas a las 48 h.....	61
3.4) Discusión	62
Capítulo 4 Discusión y Conclusiones generales	67
4.1) Discusión general	67
4.2) Significancia de esta investigación.....	75
4.3) Nuevos interrogantes	75
Bibliografía	77

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.1: Eventos <i>Bt</i> de maíz comercialmente disponibles en Argentina, características, toxinas expresadas, nombre comercial y empresas, año de aprobación y plaga blanco (Adaptado de Argenbio, 2018).....	7
Tabla 2.1: Criterios de bondad de ajuste de los modelos lineales mixtos estimados para el análisis del índice de movimiento	34
Tabla 2.2: Análisis de la varianza, pruebas de hipótesis marginales del modelo lineal mixto para medidas repetidas en el tiempo del índice de movimiento de larvas de <i>S. frugiperda</i> en plantas de maíz <i>Bt</i> y no <i>Bt</i> . Campañas agrícolas 2015/16 y 2016/17.....	34
Tabla 2.3: Criterios de bondad de ajuste de los modelos lineales mixtos explorados para el análisis del reencuentro de larvas.....	36
Tabla 2.4: Análisis de la varianza, pruebas de hipótesis marginales del modelo lineal mixto para medidas repetidas en el tiempo del reencuentro de larvas de <i>S. frugiperda</i> en plantas de maíz <i>Bt</i> y no <i>Bt</i> . Campañas agrícolas 2015/16 y 2016/17	37
Tabla 2.5: Criterios de bondad de ajuste de los modelos lineales mixtos ensayados para el análisis del índice de dispersión.....	38
Tabla 2.6: Análisis de la varianza, pruebas de hipótesis marginales del modelo lineal mixto para medidas repetidas en el tiempo del índice de dispersión de larvas de <i>S. frugiperda</i> en los tratamientos <i>Bt</i> , no <i>Bt</i> , ReB y ReB inv. Campañas agrícolas 2015/16 y 2016/17.....	38
Tabla 2.7: Pruebas de hipótesis secuenciales de los modelos ajustados para el índice de dispersión de larvas de <i>S. frugiperda</i> en los tratamientos <i>Bt</i> , no <i>Bt</i> , ReB y ReB inv. Campañas agrícolas 2015/16 y 2016/17	39
Tabla 2.8: Efectos fijos y coeficientes de los modelos ajustados para el índice de dispersión de larvas de <i>S. frugiperda</i> en los tratamientos <i>Bt</i> , no <i>Bt</i> , ReB y ReB inv. Campañas agrícolas 2015/16 y 2016/17	39

Tabla 2.9: Modelos de Índice de Dispersión de larvas de <i>S. frugiperda</i> en función del tiempo en días desde su liberación en la planta central de la unidad experimental, para los tratamientos <i>Bt</i> , no <i>Bt</i> , ReB y ReB inv.	39
Tabla 2.10: Análisis de la varianza, pruebas de hipótesis marginales (Wald) del modelo lineal generalizado para medidas repetidas en el tiempo de la supervivencia de larvas de <i>S. frugiperda</i> en los tratamientos <i>Bt</i> , no <i>Bt</i> , ReB y ReB inv. Campañas agrícolas 2015/16 y 2016/17.....	41
Tabla 2.11: Cociente de chances (CC) de supervivencia de larvas de <i>S. frugiperda</i> en microparcels no <i>Bt</i> respecto a microparcels <i>Bt</i> , ReB y ReB inv, a los 12 días de su liberación. Campañas agrícolas 1: 2015/16, 2: 2016/17	42
Tabla 2.12: Cociente de chances (CC) de supervivencia de larvas de <i>S. frugiperda</i> en microparcels no <i>Bt</i> respecto a microparcels <i>Bt</i> , ReB y ReB inv, al estado de pupa. Campañas agrícolas 1: 2015/16, 2: 2016/17	43
Tabla 2.13: Criterios de bondad de ajuste de los modelos lineales mixtos estimados para el análisis del índice de dispersión	43
Tabla 2.14: Análisis de la varianza, pruebas de hipótesis marginales del modelo lineal mixto para medidas repetidas en el tiempo del índice de dispersión de larvas de <i>S. frugiperda</i> en tratamiento ReB en función del estado fenológico y la densidad de siembra. Campañas agrícolas 2015/16 y 2016/17	44
Tabla 3.1: Criterios de bondad de ajuste de los Modelos lineales mixtos evaluados para el análisis de eficacia de Abbott a los 7 días.....	57
Tabla 3.2: Análisis de la varianza, prueba de hipótesis marginales del modelo lineal mixto del índice de Abbott de eficacia de control de larvas de <i>S. frugiperda</i> de distintos estadios alimentadas con maíz <i>Bt</i>	58
Tabla 3.3: Análisis de la varianza, pruebas de hipótesis marginales (Wald) del modelo lineal generalizado de la supervivencia de larvas de <i>S. frugiperda</i> alimentadas con hojas de maíz <i>Bt</i> a los siete días de la exposición	59

Tabla 3.4: Análisis de la varianza, pruebas de hipótesis marginales (Wald) del modelo lineal generalizado de la supervivencia de larvas de <i>S. frugiperda</i> alimentadas con hojas de maíz <i>Bt</i> determinada al estado de pupa	59
Tabla 3.5: Análisis de la varianza, pruebas de hipótesis marginales (Wald) del modelo lineal generalizado la supervivencia de larvas de <i>S. frugiperda</i> alimentadas con hojas de maíz <i>Bt</i> y no <i>Bt</i> a los siete días de la exposición.....	60
Tabla 3.6: Cociente de chances (CC) de supervivencia de larvas de <i>S. frugiperda</i> de distintos estadios alimentadas con maíz <i>Bt</i> y no <i>Bt</i> a los 7 días de exposición.....	61
Tabla 3.7: Criterios de bondad de ajuste de los Modelos lineales mixtos explorados para el análisis del peso de pupas.....	61
Tabla 3.8: Análisis de la varianza, pruebas de hipótesis marginales del modelo lineal mixto del peso de pupas provenientes de larvas de <i>S. frugiperda</i> de distintos estadios alimentadas con maíz <i>Bt</i> y no <i>Bt</i>	62
Tabla 4.1: Parámetros utilizados para el cálculo de probabilidades de supervivencia de larvas de <i>S. frugiperda</i>	71
Tabla 4.2: Variación de la ventaja de fitness de larvas heterocigotas respecto a homocigotas susceptibles en tres escenarios de evolución de resistencia.....	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Esquema de asignación de puntajes a las diferentes ubicaciones de las larvas de <i>S. frugiperda</i> , respecto a la planta en la que se realizó la liberación inicial. Los puntajes se asignaron de acuerdo al número de perímetros concéntricos que avanzó cada larva.	30
Figura 2.2: Índice de movimiento (medias \pm error estándar) de larvas de <i>S. frugiperda</i> en plantas con tecnología <i>Bt</i> y no <i>Bt</i> .	35
Figura 2.3: Índice de movimiento (medias \pm error estándar) de larvas de <i>S. frugiperda</i> en plantas con tecnología <i>Bt</i> y no <i>Bt</i> en 2 campañas de evaluación (campaña 1: 2015/16; campaña 2: 2016/17).	35
Figura 2.4: Índice de movimiento (medias \pm error estándar) de larvas de <i>S. frugiperda</i> a lo largo del tiempo evaluado en horas desde la liberación.	36
Figura 2.5: Reencuentro de larvas de <i>S. frugiperda</i> (media \pm error estándar) a lo largo del tiempo expresado como horas desde la liberación en la planta central de la unidad experimental.	37
Figura 2.6: Valores predichos del Índice de dispersión (ID) de larvas de <i>S. frugiperda</i> en función al tiempo en días desde su liberación en la planta central de la unidad experimental. Se representan los modelos ajustados para los tratamientos <i>Bt</i> , no <i>Bt</i> , ReB y ReB inv.	40
Figura 2.7: Distribución y número de larvas de <i>S. frugiperda</i> en clases de dispersión (0, 1, 2, 3 y 4) en función del tiempo en días desde la liberación para los diferentes tratamientos A: <i>Bt</i> , B: no <i>Bt</i> , C: ReB y D: ReB inv.	41
Figura 2.8: Porcentaje de supervivencia de larvas de <i>S. frugiperda</i> en función del tiempo en días desde su liberación en las unidades experimentales de los tratamientos <i>Bt</i> , no <i>Bt</i> , ReB y ReB inv.	42
Figura 2.9: Índice de dispersión (medias \pm error estándar) de larvas de <i>S. frugiperda</i> desde el punto de su liberación, según estado fenológico, V2 y V8 (Ritchie & Hanway 1982), de las plantas de la parcela experimental.	44

Figura 2.10: Índice de dispersión (medias \pm error estándar) de larvas de <i>S. frugiperda</i> desde el punto de su liberación, en dos campañas agrícolas (campaña 1: 2015/16; campaña 2: 2016/17).	45
Figura 2.11: Índice de dispersión (medias \pm error estándar) de larvas de <i>S. frugiperda</i> desde el punto de su liberación, a lo largo del tiempo evaluado en días desde la infestación inducida.	45
Figura 3.1: Índice de Abbott de eficacia de control de larvas de <i>S. frugiperda</i> de distintos estadios, alimentadas con maíz <i>Bt</i> . Se representa la media \pm error estándar.	58
Figura 3.2: Porcentaje de supervivencia (media \pm error estándar) de larvas de <i>S. frugiperda</i> alimentadas con Maíz <i>Bt</i> según del estadio larval.	60
Figura 3.3: Peso de pupas en gramos (media \pm error estándar) provenientes de larvas de <i>S. frugiperda</i> alimentadas con maíz <i>Bt</i> y no <i>Bt</i> en tres estadios larvales (L1, L3, L5).	62
Figura 4.1: Ventaja de fitness de individuos heterocigotas respecto de homocigotas susceptibles en un refugio integrado con 5 y 10% de plantas no <i>Bt</i> , en función de la supervivencia de los heterocigotas (baja: 0,01, media: 0,5 alta: 1).	74

ABREVIATURAS

AD/R: Alta dosis/Refugio
AIC: Criterio de información de Akaike
A.M.: Antes del mediodía
Bt. Bacillus thuringiensis
BIC: Criterio de información Bayesiano
CC: Cociente de chances
cm: Centímetro
Cry: Cristal proteico (Crystal protein)
CL50: Concentración letal media
°C: Grado centígrado
d: Días
DBCA: Diseño en bloques completos al azar
EC: Concentrado emulsionable
EEA: Estación Experimental Agrícola
fig.: Figura
g: Gramo
h: Hora
ha: Hectárea
ID: Índice de dispersión
IM: Índice de movimiento
INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
inv.: Invertido
kg: Kilogramo
km: Kilometro
l: Litro
LSD: Diferencia mínima significativa
ml: Mililitro
mm: Milímetro
MRI: Manejo de la Resistencia de Insectos
m.s.n.m: Metros sobre el nivel del mar
Nº: Número
pdts: Tasa de supervivencia debido a la prueba pre-dispersión
PET: Tereftalato de polietileno
pl.: Planta
ReB: Refugio en Bolsa
rs: Heterocigota
S: Sur
ss: Homocigota susceptible
V: Vegetativo
Vip: Proteína insecticida vegetativa (Vegetative insecticidal protein)
W: Oeste

Resumen

Spodoptera frugiperda es plaga clave del maíz en todo el continente americano. Actualmente la principal estrategia de control consiste en la utilización de cultivares de maíz genéticamente modificados *Bt*. La evolución de resistencia es la principal amenaza para esta tecnología. La estrategia de refugio -que consiste en la siembra de una porción de lote con una variedad no *Bt*- fue el principal enfoque adoptado para retrasar la evolución de la resistencia. Los refugios integrados o refugios en bolsa (ReB), pueden acelerar la resistencia de plagas blanco por efecto del movimiento y dispersión de larvas entre plantas *Bt* y no *Bt* comparado con refugios estructurados. Los objetivos fueron: 1) comparar el movimiento intra-planta y la dispersión inter-plantas en distintas configuraciones de refugio, 2) estudiar el efecto de la densidad y el estado fenológico en la dispersión y 3) evaluar la susceptibilidad de distintos estadios larvales de *S. frugiperda* a las toxinas *Bt*. Los ensayos fueron realizados durante las campañas 2015/16 y 2016/17 en INTA Reconquista, Santa Fe. Se utilizaron los híbridos KWS3720 VT TriplePro (*Bt*) y KWS3800 (no *Bt*). Los tratamientos fueron: *Bt*, ReB (1 no *Bt* rodeada de 44 plantas *Bt*), no *Bt* y ReB inv (1 *Bt* rodeada de 44 plantas no *Bt*) en DBCA con cinco repeticiones. En V6 se liberaron larvas neonatas de *S. frugiperda* en la planta central. Se elaboraron 2 índices: a) movimiento (larvas vivas en diferentes hojas) en la misma planta cada 2 h, las primeras 8 h desde la liberación, b) dispersión (larvas vivas en diferentes plantas) en la parcela cada 2 días durante 12 días. Para el objetivo 2) se realizó otro ensayo en el que se empleó una configuración ReB en DCA con cuatro repeticiones y combinación factorial de estado fenológico (V2 y V8) y densidad (40.000 pl. ha⁻¹, 55.000 pl. ha⁻¹ y 70.000 pl. ha⁻¹). Objetivo 3) se evaluó la susceptibilidad de larvas L1, L3 y L5 en hojas de maíz *Bt*. El movimiento intra-planta fue mayor en maíz *Bt* comparado a no *Bt* y aumentó con el tiempo. La dispersión inter-plantas y su variación en el tiempo fueron significativamente diferentes entre tratamientos. En *Bt* y ReB inv se dispersaron más rápidamente que en no *Bt* y ReB. La dispersión inter-plantas fue mayor en V8, en cambio la densidad no tuvo efectos. Larvas L1 fueron 7,5 y 16,5 veces más susceptibles que larvas L3 y L5, respectivamente. La alimentación inicial sobre plantas *Bt* genera rechazo y consecuentemente mayor movimiento y dispersión de larvas. La dispersión y susceptibilidad diferencial de larvas favorece condiciones de exposición a dosis subletales en un refugio integrado. Esta situación podría acelerar la evolución de resistencia en un refugio integrado comparado al refugio estructurado.

Abstract

Spodoptera frugiperda is a key pest of corn in all the American continent. Currently, genetically modified *Bt* corn became the main control strategy. Resistance evolution is the mayor threat to the success of this technology. The refuge strategy -which involves a portion of the field sowed with a non *Bt* variety- has been the prime approach adopted to delay the evolution of insect resistance. Integrated refuges, also refuge in the bag (RIB), might accelerate resistance in target pests due to the movement and dispersal of larvae between *Bt* and non *Bt* plants compared to structured refuges. The objectives were: 1) to compare the intraplant movement and interplant dispersion in different refuge configurations, 2) to study the effect of plant density and growth stage in dispersion and 3) to evaluate the susceptibility of different larval instars of *S. frugiperda* to *Bt* toxins in corn. Experiments were carried out at INTA Reconquista, Santa Fe during two seasons, 2015/16 and 2016/17. The corn hybrids KWS 3720 VT Triple Pro (*Bt*) and KWS 3800 (non *Bt*) were used and the treatments were: *Bt*, ReB (1 non *Bt* surrounded by 44 *Bt* plants), non *Bt* and ReB inv (1 *Bt* surrounded by 44 non *Bt* plants) in RCB design with five replications. At V6, *S. frugiperda* neonates were released in the central plant. Two indices were elaborated: a) movement (live larvae in different leaves) in the same central plant every 2 hours for the first 8 hours, b) dispersion (live larvae in different plants) in the plot every 2 days for 12 days. For objective 2) a ReB configuration was used in another experiment in CR design with four replications and a factorial combination of phenological stages (V2 and V8) and density (40.000 pl. ha⁻¹, 55.000 pl. ha⁻¹ y 70.000 pl. ha⁻¹). Objective 3) Susceptibility of L1, L3 and L5 larvae in *Bt* corn leaves was evaluated. Intraplant movement was higher in *Bt* corn compared to non *Bt* and increased over time. The interplant dispersion and its variation over time were significantly different among treatments. In *Bt* and ReB inv larvae dispersed faster than in non *Bt* and ReB. The interplant dispersion was greater in V8, however plant density had no effect. L1 Larvae were 7.5 and 16.5 times more susceptible than L3 and L5 larvae, respectively. Initial feeding on *Bt* plants generate aversion and consequently greater movement and dispersion of larvae. The dispersal and differential susceptibility of larvae favors exposure to sublethal doses in an integrated refuge. This situation could accelerate resistance evolution in integrated refuge compared to structured refuge.

Capítulo 1 Introducción general y antecedentes

1.1) El cultivo de Maíz

El maíz, *Zea mays* Linnaeus (Poaceae), es uno de los granos alimenticios más antiguos que se conocen. Deriva del teosinte y fue domesticado en un período comprendido entre 7.000 y 10.000 años atrás, en el Sur de México (Beadle, 1980). Su cultivo se expandió por América con anterioridad a la colonización europea. A partir de ésta, el maíz fue introducido en el viejo mundo, donde rápidamente se convirtió en un factor clave de la alimentación humana y animal (Andrade *et al.*, 1996).

Actualmente el maíz es el segundo cultivo del mundo por superficie de producción (187,95 millones de hectáreas) después del trigo, mientras que el arroz ocupa el tercer lugar. Es el primer cereal en rendimiento de grano por hectárea y el primero en producción total con 1.060,107 millones de toneladas en 2016 (FAOSTAT, 2018). El maíz es de gran importancia económica a nivel mundial: como alimento humano, como alimento para el ganado o como fuente de un gran número de productos industriales. La diversidad de ambientes bajo los cuales se cultiva es mucho mayor que la de cualquier otro cultivo. Habiéndose originado y evolucionado en la zona tropical como una planta de excelentes rendimientos, en el presente se cultiva hasta los 58° de latitud norte en Canadá y Rusia, y hasta los 40° de latitud sur en Argentina y Chile (Paliwal, 2001). Actualmente el principal país productor de maíz es Estados Unidos, seguido por China, Brasil, México y en quinto lugar Argentina (FAOSTAT, 2018), con una producción de 49,47 millones de toneladas (Ministerio de Agroindustria, 2018).

La producción de maíz en Argentina se extiende desde la provincia de Jujuy hasta el Sur de la Provincia de Buenos Aires. Las principales provincias productoras son Córdoba, Buenos Aires, Santa Fe, Santiago del Estero y La Pampa, con una producción conjunta de 82,2% del total nacional. La superficie implantada durante las campañas 2015/16 y 2016/17 osciló entre 6,9 y 8,4 millones de hectáreas (Ministerio de Agroindustria, 2018).

En la Provincia de Santa Fe, en la campaña 2016/17 el cultivo de maíz ocupó 890.800 hectáreas. En los departamentos del norte en particular, durante la misma campaña la superficie destinada al cultivo de maíz fue de 135.500 ha, alrededor del 15% de la superficie provincial (Ministerio de Agroindustria, 2018). En esta región la mayor

parte de la superficie de maíz se siembra en fechas tardías como medida para evitar la coincidencia de la floración del cultivo con períodos de estrés hídrico en los meses de verano (Brach & Gallard, 2014). Sin embargo, los cultivos de maíz sembrados en fechas tardías tienden a ser más afectados por factores de estrés biótico (Szwarc *et al.*, 2015a; Almada *et al.*, 2015). En el norte santafesino las pérdidas de maíz en siembra directa por efecto de plagas oscilan entre 19 y 21% y a medida que se retrasa la época de siembra, se incrementa el impacto negativo (Sosa, 2002).

1.2) Principales plagas del maíz

El cultivo de maíz es atacado por varios artrópodos. El grupo más numeroso que daña la parte aérea de las plantas está comprendido por lepidópteros, mientras que la parte subterránea es dañada en mayor medida por coleópteros (Chiang, 1978). Las plagas más importantes dentro del primer grupo son el barrenador de la caña de azúcar, *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Crambidae), la isoca de la espiga, *Helicoverpa zea* Boddie (Lepidoptera: Noctuidae), y el gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae) (Sparks, 1979; Castro *et al.*, 2004; Buntin, 2008; Siebert *et al.*, 2012). Esta última especie es una de las principales plagas del cultivo de maíz en la Argentina (Willink *et al.*, 1990).

1.3) Aspectos biológicos de *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith y daños causados a la planta

Spodoptera frugiperda, conocida comúnmente como "cogollero del maíz" u "oruga militar tardía", es una plaga migratoria (Luginbill, 1928; Johnson, 1987). A pesar de ser un insecto subtropical (Mitchell *et al.*, 1991) con poblaciones permanentes restringidas a áreas con inviernos suaves del hemisferio occidental (Nagoshi *et al.*, 2012), es una especie ampliamente distribuida en el continente Americano, desde Canadá (al Norte) hasta Argentina (al Sur) y en todo el Caribe (Pogue, 2002; Clark *et al.*, 2007; Vilarinho *et al.*, 2011). Se la ha detectado también en más de 30 países del Oeste y Centro del continente Africano y recientemente en la India (Goergen *et al.*, 2016; Prasanna *et al.*, 2018; Sisodiya *et al.*, 2018; Sharanabasappa *et al.*, 2018).

Las larvas son muy polífagas y se alimentan de más de 80 especies de plantas hospederas. Se ha citado a *S. frugiperda* como plaga en numerosos cultivos: maíz, arroz, avena, caña de azúcar, trigo, sorgo, algodón, maní, soja, garbanzo, girasol, hortalizas, frutales y ornamentales, y además en numerosas malezas y plantas voluntarias (Luginbill,

1928; Sparks, 1979; Buntin, 1986; Pastrana, 2004; Casmuz *et al.*, 2010; Capinera, 2014). En Argentina es una de las plagas más importante del cultivo de maíz (Iannone & Leiva, 2012; Ayala *et al.*, 2013) y es la plaga más importante del Noroeste (Willink *et al.*, 1990) y del Noreste del País (Sosa, 2002a, b). Asimismo, el Noroeste argentino puede ser considerado como el límite sur del área de distribución permanente de esta especie (Juárez *et al.*, 2012). En este sentido, Murúa & Virla, (2004b) determinaron la presencia de individuos durante los meses de invierno, sugiriendo que las poblaciones permanentes podrían alcanzar la provincia de Tucumán, entre 26° y 28° de latitud Sur. Si bien no se encuentran registros bibliográficos equivalentes para el Nordeste Argentino, si se toman los registros de temperaturas mínimas históricas del INTA correspondientes de esta región, cabe asumir que el límite en esta región podría establecerse entre latitudes de 29° y 30° (norte de Santa Fe y sur de Corrientes). Por otro lado la incidencia de esta plaga es menor a partir de latitudes de 31° a 32°, desde Córdoba hacia el sur del país (Virla *et al.*, 1999). Debido a la importancia en Argentina, esta especie es objeto de muchas contribuciones científicas referidas a diversos aspectos como ciclo biológico (Valverde *et al.*, 1995); evaluación de dietas para cría (Murúa *et al.*, 2003); parámetros poblacionales sobre distintas fuentes de alimento (Murúa y Virla, 2004a); caracterización genética de diferentes cepas (Nagoshi *et al.*, 2012), revisión de hospederos (Casmuz *et al.*, 2010); protocolos de monitoreo (Serra & Trumper, 2006); efectos histológicos de parasitoides (Michel *et al.*, 2013); niveles de daño ocasionados al cultivo de maíz (Willink *et al.*, 1991; 1993; Sosa, 2002a; 2002b; Ayala *et al.*, 2013); estudios sobre enemigos naturales (Virla *et al.*, 1999; Sosa y Vitti, 2005; Murúa *et al.*, 2006; Murúa *et al.*, 2009; Yasem de Romero & Romero, 2013); interacción con cultivos *Bt* (Giaveno *et al.*, 2010; Murúa *et al.*, 2013; Ayala *et al.*, 2013; Massoni *et al.*, 2014; Almada *et al.*, 2015; Szwarc *et al.*, 2015; Sassano *et al.*, 2016); manejo de la resistencia (Trumper, 2014; Chandrasena *et al.*, 2018).

Los adultos poseen una elevada capacidad de dispersión (Nagoshi *et al.*, 2012, 2017). Existen evidencias de capturas en trampas de luz de plataformas petrolíferas localizadas a 160 km de la costa del golfo de Méjico (Sparks *et al.*, 1986). Las mariposas poseen hábitos nocturnos, movilizándose entre las plantas hospederas para su alimentación, apareamiento y oviposición (Sparks, 1979; Vilarinho *et al.*, 2011). Las posturas son colocadas en masas de 100 a 300 huevos, cubiertos por escamas del cuerpo de la hembra totalizando de 500 a 2.000 huevos/hembra (Luginbill, 1928; Capinera, 2014). Las hembras adultas de *S. frugiperda* tienen preferencia por oviponer en las hojas

de maíz con menor daño ocasionado por larvas de su misma especie (Télliez-Rodríguez *et al.*, 2014). Las larvas poseen hábitos gregarios en los estadios iniciales y luego se dispersan (Farias *et al.*, 2008). Se alimentan de las hojas en las cuales roen la epidermis al inicio y luego las perforan o destruyen desde sus bordes. También pueden actuar como cortadoras, defoliadoras y cogolleras, según el momento de su desarrollo, y producen daños directos cuando se alimentan de los granos de la espiga (Cruz & Turpin, 1983; Willink *et al.*, 1993; Urretabizkaya *et al.*, 2010; Vilarinho *et al.*, 2011; Pannuti *et al.*, 2016). El mayor consumo, 80% de la ingesta, lo realizan en los dos últimos estadios (Capinera, 2014) dentro del cogollo, donde encuentran protección (Burtet *et al.*, 2017). Por otra parte, *S. frugiperda* tiene hábitos caníbales, razón por la cual suele encontrarse sólo una larva grande por cogollo (Chapman *et al.*, 1994; 2000; Capinera, 2014). Este comportamiento es denso-dependiente y dinámico, es decir, depende de la densidad inicial de larvas pero decrece a medida que la densidad disminuye por causa de la mortalidad, debido a que la tasa de encuentro entre larvas es menor a medida que la densidad decae (Andow *et al.*, 2015). La duración del ciclo de vida de *S. frugiperda* está estrictamente relacionada a la temperatura (Luginbill, 1928). En condiciones de laboratorio (14:10 h de luz: oscuridad de fotoperíodo artificial y alimentación basada en dieta artificial), la duración del período de huevo a adulto osciló entre 66,6 y 18,4 días a temperaturas de 15,6° C y 35°C respectivamente (Barfield *et al.*, 1978). La tasa de desarrollo de las larvas se incrementa de manera lineal entre 21°C y 33°C, luego de la cual decrece (Ali *et al.*, 1990). Además de la temperatura, otro factor importante que influye en la duración del período larval es la dieta, en este sentido Murúa *et al.* (2003) determinaron en condiciones de laboratorio (25 ± 2°C, 14:10 h luz: oscuridad de fotoperíodo artificial y 70-75% HR) que las larvas poseen de 6 a 8 estadios y la duración del estado larval completo varía entre 25 y 57 días de acuerdo a la dieta suministrada.

Según Willink *et al.* (1991) y Ayala *et al.* (2013) en el noroeste y noreste Argentino, respectivamente, los maíces de siembra tardía son los más afectados. En el norte santafesino se presenta una situación similar, acentuándose el daño a medida que se atrasa la siembra (Sosa, 2002a; Szwarc *et al.*, 2015; Almada *et al.*, 2015). En los cultivos sembrados en diciembre y enero se observa mayor presión de la plaga, lo cual se relaciona con la mayor abundancia relativa de adultos, estimada a través de las capturas en trampas de luz en la EEA INTA Reconquista, Santa Fe (Sosa, 2002b y c).

Las recomendaciones de umbral económico para *S. frugiperda* en el maíz varían del 11% (Evans & Stansly, 1990) al 40% de las plantas infestadas (Hruska & Gladstone, 1988), con la mayoría de las recomendaciones en el rango del 20-30% (Van Huis, 1981). Cuando afecta plantas jóvenes de maíz, los daños pueden ser totales; en cambio, si afecta plantas en estados fenológicos avanzados, éstas pueden reponerse de la defoliación llegando a una producción normal. Durante los primeros días de desarrollo (hasta la cuarta hoja), las larvas pueden defoliar parcial o totalmente la planta o cortarla por arriba de la corona del tallo (Strnad & Bergman, 1987). Si se ve afectado el meristema apical la planta incluso puede morir (Willink *et al.*, 1993). Luego de la aparición de la sexta hoja el daño generalmente se circunscribe al cogollo (Sosa, 2002b). En sus últimos estadios, las larvas se alimentan de las hojas enrolladas del cogollo, donde producen perforaciones transversales que debilitan y posteriormente quiebran las hojas, lo que provoca una disminución de la capacidad fotosintética de la planta (Sosa, 2002a). En etapas finales del cultivo, las larvas pueden causar daños a la panoja que se desarrolla dentro de la hoja bandera, pero su importancia es relativa ya que generalmente no se pierde toda la panoja, y el polen puede ser producido igualmente por la misma (Sosa, 2002). Una vez emergida la panoja, las larvas prefieren las espigas en desarrollo, donde el daño realizado en los estigmas reduce la polinización y produce una disminución de granos por espiga (Pannuti *et al.*, 2015).

1.4) Manejo de *Spodoptera frugiperda* en maíz

Históricamente el control de *S. frugiperda* en el cultivo de maíz se llevó a cabo mediante la utilización de insecticidas sintéticos (Burtet *et al.*, 2017). Sin embargo, la eficacia de esta táctica está condicionada por el comportamiento larval de la especie, ya que las larvas se encuentran protegidas dentro del cogollo del maíz, y de este modo se dificulta el control con aplicaciones de insecticidas (Carvalho *et al.*, 2013; Burtet *et al.*, 2017). Sumado a lo anterior, la planta de maíz es capaz de emitir nuevas hojas cada tres o cuatro días, lo que obliga a repetir aplicaciones con frecuencia para mantener protegidas a las plantas (Vitti, 2018. Comunicación personal). Además, factores como extensas áreas de cultivo de maíz, elevada tasa de infestación de *S. frugiperda* y las pérdidas económicas que ocasiona han llevado al uso generalizado y a veces indiscriminado de insecticidas químicos para su control (Carvalho *et al.*, 2013). Esta práctica, además de implicar en sí misma severos daños al ambiente y a la salud humana, ha contribuido al desarrollo de poblaciones resistentes a diferentes clases de insecticidas, incluidos organofosforados,

carbamatos, piretroides y benzoilureas (Yu, 1991; Diez-Rodriguez & Omoto, 2001; Yu *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2013; Burtet *et al.*, 2017).

A partir de 1996, la aprobación comercial de maíces genéticamente modificados que sintetizan toxinas insecticidas derivadas de la bacteria *Bacillus thuringiensis* Berliner, denominados maíces *Bt*, ha proporcionado una nueva táctica para el manejo de *S. frugiperda* (Tabashnik *et al.*, 2003; Burtet *et al.*, 2017; Wan *et al.*, 2017). Estas plantas resistentes a insectos se obtienen a partir de modificaciones genéticas consistentes en la introducción de un gen que codifica la síntesis de toxinas proteicas pertenecientes a distintas cepas de *B. thuringiensis* (Siebert *et al.*, 2008; Tabashnik *et al.*, 2009; Casmuz *et al.*, 2010; James, 2012). Las propiedades insecticidas de *B. thuringiensis* son atribuidas principalmente a la síntesis de cristales proteicos insecticidas (toxinas *Cry*) y a proteínas insecticidas vegetativas (toxinas *Vip*), las cuales son producidas por la bacteria durante la fase de esporulación o crecimiento vegetativo, respectivamente (Pigott *et al.*, 2008; Palma *et al.*, 2012; Sauka & Benintende, 2017). El ciclo de vida de *B. thuringiensis* se divide en cuatro fases. Durante la primera, llamada fase vegetativa, ocurre crecimiento y división. La fase II es de transición a la esporulación; la fase III es de esporulación propiamente dicha y la fase IV implica la maduración de las esporas y la lisis celular (George & Crickmore, 2012). Cuando los nutrientes y las condiciones ambientales son apropiados para el crecimiento, la espora germina produciendo una célula vegetativa que crece y se reproduce por fisión binaria. Este crecimiento continuará hasta que uno o más nutrientes, como azúcares, aminoácidos u oxígeno sean insuficientes. Bajo estas condiciones *B. thuringiensis* inicia la fase de esporulación, originando una espora y un cuerpo parasporal, compuesto principalmente por una o más proteínas insecticidas en forma de inclusiones cristalinas (Sansinenea, 2012). Durante la fase vegetativa, *B. thuringiensis* produce y secreta las toxinas *Vip*, que expresan actividad insecticida contra lepidópteros y coleópteros entre otros insectos (Palma *et al.*, 2012).

La primera generación de cultivos de maíz *Bt* con incorporación de una sola toxina, comenzó a sembrarse comercialmente en 1996 en EE.UU. (Bourguet *et al.*, 2005) y en 1998 en Argentina (Trumper, 2014) (Tabla 1.1). En el caso del cultivo de maíz, los primeros híbridos con inserción simultánea de dos genes para la misma plaga blanco (híbridos pirámide o híbridos piramidados), recibieron aprobación completa en EE.UU. al igual que en Argentina en 2010 (Ghimire *et al.*, 2011; Trumper, 2014) (Tabla 1.1).

Desde la perspectiva del manejo de la resistencia de insectos a cultivos *Bt*, se apunta a introducir en estas nuevas variedades al menos dos toxinas *Bt*, cada una de las cuales debe cumplir con el requisito de ser de alta dosis (Ives *et al.*, 2011; Trumper, 2014). El supuesto subyacente de esta táctica es que los diferentes modos de acción implican receptores diferentes en la membrana celular del epitelio intestinal de las larvas (Ferré *et al.*, 2008), y que los genes de resistencia segregan independientemente (Trumper, 2014). En consecuencia, la probabilidad de que un insecto de la población blanco sea portador de un genotipo resistente a las dos toxinas *Bt* incorporadas en una misma planta será extremadamente baja (Tabashnik *et al.*, 2013).

Tabla 1.1: Eventos *Bt* de maíz comercialmente disponibles en Argentina, características, toxinas expresadas, nombre comercial y empresas, año de aprobación y plaga blanco (Adaptado de Argenbio, 2018)

<i>Evento/s</i>	<i>Característica/s (RL¹, TH², RC³)</i>	<i>Toxina/s Bt</i>	<i>Nombre Comercial y empresa/s</i>	<i>Año de aprobación</i>	<i>Plaga Blanco* (D. s⁴, S. f⁵, D. v⁶, H. z⁷)</i>
<i>MON810/Bt11</i>	RL	Cry1Ab	MaizGard MG Monsanto/ TD Max Syngenta	1998/2001	<i>D. s</i>
<i>TC1507</i>	RL + TH	Cry1Fa	Herculex HX Pioneer + Dow	2005	<i>D. s, S. f</i>
<i>MON88017</i>	TH+ RC	Cry3Bb1	Monsanto	2010	<i>D. v</i>
<i>MON89034 x MON88017 x NK603</i>	TH + RL + RC	Cry1A.105 + Cry2Ab2 + Cry3Bb1	VT Triple Pro Monsanto	2010	<i>D. s, S. f, D. v, H. z</i>
<i>MIR162</i>	RL	Vip3Aa20	Viptera Syngenta	2011	<i>D. s, S. f, H. z</i>
<i>Bt11xMIR162</i>	RL	Cry1Ab + Vip3Aa20	Viptera 3 Syngenta	2011	<i>D. s, S. f, H. z</i>
<i>MON89034 x TC1507 x NK603</i>	RL + TH	Cry1A.105 + Cry2Ab2 + Cry1Fa	Powercore PW Dow	2012	<i>D. s, S. f</i>
<i>Bt11 x MIR162 x TC1507 x GA21</i>	RL + TH	Cry1Ab + Vip3Aa20 + Cry1Fa	Leptra Pioneer	2014	<i>D. s, S. f, H. z</i>
<i>TC1507 x MIR162 x MON89034 x MON603</i>	RL + TH	Cry1Fa + Cry1A.105 + Cry2Ab2 + Vip3Aa20	Powercore Ultra PWU Dow	2016	<i>D. s, S. f, H. z</i>

*Fuente: <https://www.programamri.com.ar>, 2018. Referencias: ¹Resistencia a insectos lepidópteros, ²Tolerancia a herbicidas, ³Resistencia a insectos coleópteros, ⁴*Diatraea saccharalis* F., ⁵*Spodoptera frugiperda* S., ⁶*Diabrotica virgifera virgifera* L., ⁷*Helicoverpa zea* B.

Desde el año 1996 la adopción de cultivos genéticamente modificados alrededor del mundo se ha ido incrementando sostenidamente. En 20 años (1996-2016) se han cultivado 2.149,7 millones de hectáreas de cultivos genéticamente modificados. En 2016 se ha registrado un total de 185,1 millones de hectáreas en 26 países, un 5,4% mayor que en el año 2015. Actualmente, soja, algodón y maíz corresponden al 99% de todos los cultivos transgénicos del mundo (James, 2016). La Argentina es uno de los países en los que la siembra de cultivos genéticamente modificados ha experimentado mayor crecimiento. El proceso de adopción de las mismas se inició en el año 1996 con la introducción de soja RR tolerante al herbicida glifosato, luego en 1998 se aprobó la comercialización de maíz y algodón *Bt*, y ha continuado ininterrumpidamente. En la actualidad este tipo de tecnologías se utilizan en prácticamente la totalidad del cultivo de soja, en el 97% del área de maíz, y el 95% de la superficie de algodón (James, 2016).

Se ha argumentado que los maíces *Bt* pueden proporcionar muchos beneficios, incluyendo disminución de la dependencia de insecticidas químicos, baja o nula exposición por parte de los trabajadores a tales insecticidas, conservación de los enemigos naturales, supresión de plagas a nivel regional e incremento o estabilidad de los rendimientos (Andow, 2008; National Research Council, 2010; Bilal *et al.*, 2012; Ibrahim & Shaver, 2014). Dentro de las desventajas se puede mencionar que las semillas de maíz *Bt* son más costosas que las de maíz no *Bt* (Marvier, 2008). El mayor precio que se paga por la semilla *Bt* sólo tiene retorno económico ante escenarios de alta intensidad de ataque de la plaga. Además el flujo génico hacia poblaciones silvestres puede ocasionar disminución en la diversidad de especies nativas (Andow & Zwahlen, 2006). Otra arista negativa es la presión de selección continua durante todo el ciclo del cultivo aún con bajos niveles poblacionales de plaga(s) objetivo(s) o incluso en ausencia de la misma, en cuyo caso, la ventaja del maíz *Bt* frente al no *Bt* es nula (Bessin, 2015). La evolución de la resistencia de las plagas es la principal amenaza para el éxito de los cultivos *Bt* (Tabashnik *et al.*, 2013; Carrière *et al.*, 2016; Van Den Berg, 2016). El uso intensivo de cultivos *Bt* ejerce una alta presión de selección en las poblaciones de plagas objetivo, lo que conduce a una rápida evolución de la resistencia (Gould, 1998; Glaser & Matten, 2003; Storer *et al.*, 2010; Gassmann *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2011; Tabashnik *et al.*, 2013). Un escenario de rápida adaptación de las plagas a los cultivos *Bt* amenaza la continuidad de los beneficios. La eficacia sostenida de los cultivos que expresan toxinas *Bt* depende de

la implementación de estrategias de manejo de resistencia de insectos (MRI) (Head *et al.*, 2014; Faretto *et al.*, 2017).

1.5) Resistencia de insectos a cultivos *Bt*

La resistencia es el carácter heredable consistente en la menor susceptibilidad (fenotipo) de un insecto (individuo) a la toxina *Bt* en relación a individuos de la misma población (Trumper, 2014). La *resistencia desarrollada en campo* a un plaguicida o toxina *Bt* se da cuando ocurre una disminución de la susceptibilidad de una población de insectos como consecuencia de la exposición al plaguicida o toxina *Bt* en el campo (Tabashnik *et al.*, 2009; 2014; Trumper, 2014). Por su parte, la *resistencia práctica* se define como la resistencia desarrollada en el campo que reduce la eficacia de una toxina y tiene consecuencias prácticas para el control de la plaga objetivo. El criterio utilizado para definirla es que más del 50% de individuos de una población son resistentes y la eficacia del cultivo *Bt* en campo se ve reducida (Tabashnik *et al.*, 2014). El número de casos de *resistencia práctica* en todo el mundo se ha incrementado de tres en 2005 a 17 en 2016 (Tabashnik & Carrière, 2017; Chandrasena *et al.*, 2018), y corresponden a poblaciones de cinco especies con *resistencia práctica* a maíz *Bt* (*Busseola fusca* Fuller (Lepidoptera: Noctuidae), *D. saccharalis*, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae), *S. frugiperda* y *Striacosta albicosta* Smith (Lepidoptera: Noctuidae)); una especie a algodón *Bt* (*Pectinophora gossypiella* Saunders) y una especie con *resistencia práctica* a los dos, maíz y algodón *Bt* (*H. zea*).

1.6) Manejo de la resistencia de insectos a cultivos *Bt*

Desde los inicios de los cultivos *Bt* ha habido preocupación en cuanto a la evolución de resistencia de las plagas objetivo (Tabashnik, 1994). Para ello, en 1988 se esbozaron cuatro estrategias básicas que podrían utilizarse para retrasar la adaptación de insectos: a) mezcla de cultivares tóxicos y no tóxicos (enfoque de refugio); b) apilamiento de dos o más toxinas en cada planta tóxica dentro de una mezcla; c) bajas dosis de toxinas que actúan en conjunto con enemigos naturales para disminuir la población de plagas objetivo; y, por último, d) expresión de toxinas dependiente del tejido, tiempo o señales (Gould, 1998). No se incluyó en esta lista al enfoque de “alta dosis”, el cual no había sido considerado hasta 1991, cuando científicos de la compañía Monsanto demostraron que podían producir plantas con concentraciones de toxinas mucho mayores a las necesarias para provocar la muerte del 100% de los individuos susceptibles de plagas objetivo

(Perlak *et al.*, 1991; Gould, 1998). La estrategia de refugio ha sido el principal enfoque utilizado en todo el mundo para retrasar la aparición de resistencia a los cultivos *Bt* (Tabashnik, 2008). Esta estrategia se apoya en los principios de reducción de la dominancia y heredabilidad de la resistencia (Tabashnik *et al.*, 2004; Trumper, 2014) a través de la premisa de que los raros individuos resistentes que sobreviven en cultivos *Bt* se aparearán con los abundantes individuos susceptibles de refugios cercanos o plantas sin toxinas *Bt* (Gould, 1998; Tabashnik *et al.*, 2004). Si la herencia de la resistencia es recesiva, la progenie híbrida de dicho cruzamiento será controlada por el cultivo *Bt*, retrasando considerablemente la evolución de la resistencia. Esta estrategia es también denominada Alta dosis/Refugio (AD/R) porque funciona mejor si la dosis de toxina ingerida por los insectos en las plantas *Bt* es lo suficientemente alta como para matar a la totalidad o casi toda la progenie híbrida antes mencionada (Gould, 1998; Tabashnik *et al.*, 2004; Matten *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2014).

Se ha establecido por convención que una alta dosis representa la expresión de la toxina insecticida en una concentración 25 veces superior a la necesaria para eliminar el 99% de los individuos homocigotas susceptibles de la población (Gould, 2000). Andow (2008) define a la alta dosis como “la concentración de toxina a la cual la resistencia se hereda como un alelo recesivo o casi recesivo, de tal modo que los individuos heterocigotas serán casi tan susceptibles como los individuos homocigotas susceptibles. y la resistencia se mantiene funcionalmente recesiva” (Andow, 2008; Bernardi *et al.*, 2012; Campagne *et al.*, 2013; Trumper, 2014). En una definición operativa, se considera que el evento *Bt* es de alta dosis cuando el cultivo expresa una concentración de toxina *Bt* que elimina 99,99% de la fracción homocigota de la(s) plaga(s) blanco respecto al carácter de susceptibilidad a la toxina, y a la vez provoca la mortalidad de un muy elevado porcentaje ($\geq 95\%$ según Huang *et al.*, 2011) de la fracción heterocigota para el mismo carácter (Trumper, 2014). Por su parte el refugio comprende el área donde la plaga no está expuesta a presión de selección por la toxina insecticida presente en el cultivo *Bt* (Van Den Berg, 2016). Además, el refugio debe asegurar la provisión de suficiente cantidad de adultos susceptibles, de tal forma que disminuya significativamente la probabilidad de apareamiento entre adultos portadores del alelo de resistencia. En ese caso, la descendencia será mayoritariamente heterocigota y eliminada por la toxina *Bt* (Andow, 2008). Este supuesto es conocido como efecto dilución (Bates *et al.*, 2005).

Desde los inicios, se concibió el refugio como un sector claramente definido implementado frecuentemente como franjas, bloques o fajas perimetrales en los mismos campos donde se siembra la variedad *Bt*. Este tipo de refugio, conocido como estructurado, fue la configuración típicamente adoptada (Head & Greenplate, 2012; Head *et al.*, 2014). En Estados Unidos los tamaños mínimos aceptables de refugio son específicos de cada híbrido y varían del 5% al 20% del área de maíz *Bt* (Onstad, 2014). En la Argentina, la Asociación de Semilleros Argentinos (ASA), con el acuerdo de la Comisión Nacional de Biotecnología para la Agricultura (CONABIA) y la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos, recomienda un área refugio de 10% de la superficie del lote con maíz no *Bt* y que sea de ciclo similar para mantener su eficiencia y facilitar su manejo (Aragón, 2004). Sin embargo, la implementación del refugio puede ser compleja y requiere decisiones adicionales sobre la elección de variedad o híbrido no *Bt* a utilizar (Carroll *et al.*, 2013). Sumado a esto último, en muchos casos, las compañías disponen de un limitado número de híbridos no *Bt* y los productores se ven obligados a sembrar materiales no apropiados (Bourguet *et al.*, 2005). Otra limitante que encuentran los productores es la de sembrar separadamente el refugio del resto del lote *Bt*, lo que implica demoras y una necesidad de adaptar la configuración de siembra y el manejo posterior diferenciado (Kruger *et al.*, 2012). El riesgo de daño económico al refugio puede ser la razón de la falta de cumplimiento entre los agricultores que cultivan maíz *Bt* (Bates *et al.*, 2005). En un estudio realizado por Bourguet *et al.* (2005) se observó que el incumplimiento de refugio se debe a una posible renuencia de los agricultores que consideran que las poblaciones de plagas susceptibles son una propiedad común compartida por los productores de maíz *Bt*. Sin embargo, sembrando cultivos *Bt* sin refugio, cada productor aumenta los beneficios personales a corto plazo, pero favorece la selección de plagas resistentes, lo que puede afectar negativamente los beneficios a largo plazo de los agricultores vecinos (Vacher *et al.*, 2006). Como consecuencia, asegurar la adopción de refugio puede ser un problema (Carroll *et al.*, 2013). De hecho, el bajo compromiso de cumplimiento de refugio ha sido considerado como uno de los factores que contribuyeron a generar resistencia en la mayoría de los casos reportados (van Rensburg, 2007; Dhurua & Gujar, 2011; Gassmann *et al.*, 2011; Storer *et al.*, 2012; Monnerat *et al.*, 2015; Miraldo *et al.*, 2016; Chandrasena *et al.*, 2018). En nuestro país, desde los primeros años el nivel de adopción de áreas refugios por parte de los productores que utilizan maíz *Bt* no estuvo en los niveles esperados (Aragón, 2004). De acuerdo a la Bolsa de Cereales de Buenos Aires, en la campaña 2016/17, los porcentajes de adopción

de refugio variaron entre 20 y 24%. Los motivos argüidos por quienes no cumplen con este aspecto del manejo abarcan desde la falta de disponibilidad de semilla de maíz convencional, hasta el rechazo a las complicaciones operativas y percepción de pérdida de rendimiento.

1.7) El refugio integrado como táctica alternativa en la estrategia AD/R

A partir de la aprobación del maíz *Bt* piramidado con al menos dos toxinas en alta dosis, algunos aspectos cuantitativos de la estrategia AD/R pudieron ser flexibilizados (Huang *et al.*, 2011). Uno de ellos es la reducción del porcentaje de los lotes destinado a la siembra de refugios (20% a 5%) debido a que la probabilidad de resistencia a las dos toxinas es extremadamente baja (Storer *et al.*, 2012; Tabashnik *et al.*, 2013; Trumper, 2014). En este sentido, modelos probabilísticos determinaron que eventos *Bt* piramidados con dos toxinas en alta dosis son al menos 25 veces más eficaces en retrasar la resistencia que eventos *Bt* simples, incluso con refugios de un cuarto de la superficie recomendada para eventos simples (Roush, 1998; Storer *et al.*, 2012). La configuración espacial más efectiva de refugio para retrasar la resistencia sigue siendo controvertida. Los refugios estructurados, se han utilizado ampliamente desde 1996 (Yang *et al.*, 2014; Carrière *et al.*, 2016). Desde 2010 un enfoque de refugio integrado (RI), (también conocido como mezcla de semillas, refugio en bolsa o ReB) de 5: 95% (proporción de semillas no *Bt*: *Bt*) ha sido aprobado y adoptado en Estados Unidos y Canadá para el cultivo de maíz *Bt* (Onstad *et al.*, 2011; Matten *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2014). De igual modo, en el año 2014 se aprobó en la Argentina la comercialización de mezclas de 2 híbridos de maíz en semilla de clase fiscalizada en proporción 5: 95% (no *Bt*: *Bt*) para eventos piramidados y 10: 90% para eventos simples (INASE, 2014; Trumper, 2014). Con esta estrategia, con anterioridad al embolsado para la venta, las compañías semilleras mezclan semillas no *Bt* con semillas *Bt* en la proporción oficialmente autorizada. El argumento es que de esta manera los productores solamente compran las semillas premezcladas y las siembran en sus campos, por lo tanto el cumplimiento por parte de ellos ya no sería un problema (Matten *et al.*, 2012; Wangila *et al.*, 2013).

En el caso de refugios estructurados, el movimiento de los adultos es esencial para el diseño y aplicación de las estrategias de manejo de la resistencia de insectos (Gould, 1994; Ostlie *et al.*, 1997). Para que esta estrategia funcione, es esencial que los individuos adultos producidos en el refugio sean capaces de dispersarse hasta el cultivo *Bt* para

aparearse con los individuos resistentes que lograron sobrevivir en él (Qureshi *et al.*, 2006). La capacidad de dispersión de los adultos, sobre todo la capacidad de dispersión pre copulación son parámetros fundamentales para establecer el sitio y las distancias mínimas entre cultivo *Bt* y refugio (Gould, 1994; Ostlie *et al.*, 1997; Shelton *et al.*, 2000; Qureshi *et al.*, 2006; Vilarinho *et al.*, 2011). Para el caso del refugio integrado, es el comportamiento de la larva lo que más interesa (Wangila *et al.*, 2013), debido a su potencial efecto en la tasa de evolución de resistencia. Específicamente, el movimiento de las larvas entre plantas *Bt* y no *Bt* puede crear condiciones favorables para el desarrollo de la resistencia de las plagas objetivo (Goldstein *et al.*, 2010; Paula-Moraes *et al.*, 2012; Wangila *et al.*, 2013). A su vez, la movilidad de las larvas en diferentes estadios impacta en la exposición de las mismas a concentraciones letales y subletales de toxinas *Bt* (Reay-Jones *et al.*, 2016).

La búsqueda de alimento es necesaria para la adquisición de recursos, para ubicar una planta huésped, el insecto debe establecer contacto o al menos acercarse para examinar sus características (Schoonhoven *et al.*, 2005). La dispersión, el movimiento de individuos fuera de su origen, es un comportamiento adaptativo que minimiza el riesgo de que la población entera sea destruida por perturbación o agotamiento de recursos, maximiza la probabilidad de que algunos individuos encuentren y exploten nuevos recursos (Schowalter, 2011). Sin embargo, la dispersión conlleva un riesgo considerable y requiere un gasto energético significativo. Varios factores afectan la probabilidad de una dispersión exitosa, es decir, la llegada al alimento o hábitats adecuados, incluido el grado de adaptación a los disturbios, el hacinamiento, el estado nutricional, el hábitat y las condiciones del recurso, y el mecanismo de dispersión (Schowalter, 2011). La ubicación de un sitio de alimentación adecuado es crítica en la vida de las larvas. En este sentido, son muchos los factores que influyen en el movimiento larval. Se pueden clasificar en externos a la planta (ambientales), internos a la planta (nutricionales, factores anti alimentarios, compuestos de defensa) y propios de los insectos (fase de movimiento prealimentaria, densidad de la población, competencia, canibalismo) (Berger, 1992; Zalucki *et al.*, 2002; Schowalter, 2011; Andow *et al.*, 2015). Por otra parte, el movimiento y dispersión de larvas de una misma especie dependerá del cultivo y del tamaño y densidad de las plantas (Onstad *et al.*, 2018).

En un análisis inicial, Mallet & Porter (1992) utilizaron modelos matemáticos para identificar los aspectos técnicos preocupantes sobre el manejo de la resistencia relacionados al movimiento de larvas en refugios integrados. Primero, el movimiento de un insecto desde una planta *Bt* a una no *Bt* luego de una exposición subletal, o desde una planta no *Bt* a una *Bt* luego de adquirir mayor tamaño y con ello mayor tolerancia a las toxinas, puede conducir a un mayor *fitness* relativo de los individuos heterocigotas, acelerando la evolución de la resistencia (Mallet & Porter, 1992; Brévault *et al.*, 2015; Carrière *et al.*, 2016; Miraldo *et al.*, 2016). Este riesgo es mayor para plantas *Bt* con una sola toxina debido a que la dispersión entre plantas *Bt* y no *Bt* reduce la cantidad de toxina recibida por el insecto en movimiento (Onstad & Gould, 1998; Davis & Onstad, 2000). Segundo, el movimiento de insectos susceptibles desde una planta no *Bt* a una *Bt* puede provocar la muerte de éstos y por consiguiente una disminución en la producción de insectos adultos susceptibles en las plantas no *Bt* de un refugio integrado, lo que finalmente provoca una reducción en el tamaño efectivo del refugio (Davis & Onstad, 2000; Shelton *et al.*, 2000; Wangila *et al.*, 2013). Ambas consecuencias se exacerban en el caso de plagas clave con gran capacidad de movimiento larval como muchos lepidópteros (Halcomb *et al.*, 1996; Davis & Onstad, 2000; Carroll *et al.*, 2012). Por lo tanto, la susceptibilidad diferencial entre estadios larvales y el movimiento de larvas entre plantas *Bt* y no *Bt* puede crear condiciones de exposición a dosis subletales y así promover el desarrollo de resistencia en las poblaciones de plaga objetivo (Huang *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2006; Wangila *et al.*, 2013).

Davis & Onstad (2000) demostraron que el movimiento de larvas de *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae) puede ser lo suficientemente elevado como para comprometer el desempeño de los refugios integrados frente al refugio estructurado en el caso de maíz *Bt* con toxina Cry1Ab. Se ha demostrado que el movimiento de larvas de *H. zea* y *Heliothis virescens* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae) pone en desventaja a los refugios integrados en algodón *Bt* frente al refugio estructurado (Halcomb *et al.*, 1996; Agi *et al.*, 2001; Brévault *et al.*, 2015).

La implementación y adopción del enfoque de refugio integrado como táctica para el manejo de la resistencia demanda más información relacionada al comportamiento de las plagas (Shelton *et al.*, 2002; Murphy *et al.*, 2010). Uno de los aspectos menos entendidos del comportamiento de los insectos está relacionado a la capacidad de

dispersión de las larvas, aspecto que cobra mayor importancia en el caso de cultivos *Bt* (Goldstein *et al.*, 2010; Head & Greenplate, 2012). Diseñar estudios que representen situaciones de mezclas de semillas no es sencillo. Se han desarrollado modelos probabilísticos con el fin de simular estos escenarios (Onstad & Gould, 1998; Davis & Onstad, 2000; Ives *et al.*, 2011; Carroll *et al.*, 2012; Garcia *et al.*, 2016). Sin embargo, el conocimiento de muchos aspectos de la biología de los insectos necesarios para una mayor precisión de estos modelos, aún no están claros y dependen de supuestos, como el movimiento intra e inter-planta (Onstad, 2006). Por lo tanto, es fundamental construir conocimiento sobre el comportamiento larval de plagas importantes del maíz para mejorar las estrategias para su manejo, así como proporcionar datos confiables para parametrizar modelos de simulación con mayor precisión (Pannuti *et al.*, 2016). Este movimiento larval se relaciona con el mecanismo de adaptación por el cual los insectos buscan recursos, incluidos los alimentos. De este modo, ubicar un sitio de alimentación adecuado es esencial para el desarrollo, crecimiento y mantenimiento del insecto (Bell, 1990). En el caso de los lepidópteros, son los estadios larvales tempranos los que determinan en gran medida dónde se establecen los sitios de alimentación, por lo que merecen gran atención para su manejo (Zalucki *et al.*, 2002; Perkins *et al.*, 2008). Describir estos movimientos puede contribuir a aplicar estas estrategias eficientemente, ya que durante su dispersión exploratoria, las larvas son vulnerables a los depredadores, parasitoides, patógenos y otras estrategias de control de plagas (Zalucki *et al.*, 2002).

Existen pocos antecedentes de estudio de la dispersión de larvas de lepidópteros plagas en maíz transgénico (Onstad & Gould, 1998). La gran mayoría se realizaron con *D. saccharalis* (Wangila *et al.*, 2013) y otros barrenadores como *O. nubilalis* (Davis & Onstad, 2000; Goldstein *et al.*, 2010) y *S. albicosta* (Paula-Moraes *et al.*, 2012; Pannuti *et al.*, 2015; 2016). En relación al movimiento y dispersión de larvas de *S. frugiperda*, se han realizado estudios en plantas de maíz convencional en estados fenológicos avanzados (Pannuti *et al.*, 2015; 2016). Por otro lado, no existen evaluaciones realizadas en la Argentina sobre movimiento y dispersión de larvas de lepidópteros en cultivos *Bt*. La gran mayoría se condujeron en Estados Unidos (Davis & Onstad, 2000; Cabrera, 2001; Goldstein *et al.*, 2010; Paula-Moraes, *et al.*, 2012; Wangila *et al.*, 2013), Brasil (Pannuti *et al.*, 2015; 2016; Malaquias *et al.*, 2017) y Sudáfrica (Erasmus *et al.*, 2016).

Estudios sobre dispersión de larvas de *O. nubilalis* revelan que aproximadamente un 50% de las larvas son recuperadas de plantas de maíz vecinas de aquella en la que ocurrió la oviposición (Ross & Ostlie, 1990). Un patrón similar fue reportado para *S. frugiperda* en algodón, donde las larvas se encontraron predominantemente a distancias promedio de 1 a 2,4 plantas de la que fue sustrato de oviposición, y nunca a distancias mayores a 5 plantas del sitio de desove (Ali *et al.*, 1990). Del mismo modo Pannuti *et al.*, (2016) observaron que el 50% de las larvas de *S. frugiperda* liberadas en el cultivo de maíz en floración se encontraron en el mismo surco de la infestación y el 91,4% fueron recuperadas en un radio de 1,1 m. Por otro lado, Razze & Mason (2012) encontraron que la dispersión de larvas de *O. nubilalis* es significativamente mayor en maíz *Bt* comparado a maíz no *Bt*. Larvas neonatas de *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) y *Alabama argillacea* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) en presencia de toxinas *Bt* expresadas en algodón, incrementan su dispersión desde plantas *Bt* hacia no *Bt* respecto a aquellas que fueron liberadas en plantas no *Bt* (Zhang *et al.*, 2004; Ramalho *et al.*, 2014). En este sentido Malaquias *et al.* (2017) encontraron que larvas de *S. frugiperda* se dispersaron a una distancia mayor en algodón *Bt* comparado a algodón no *Bt*.

Davis & Coleman (1997) encontraron que las larvas neonatas de *O. nubilalis* pueden recuperarse de cortos períodos de exposición a la toxina Cry1Ab, aunque su supervivencia a largo plazo es reducida. Li *et al.* (2006) hallaron que larvas de *Trichoplusia ni* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) son capaces de detectar y evitar toxinas *Bt* en hojas de algodón. De igual modo, Binning *et al.* (2014) demostraron que la respuesta inicial de larvas de tercer estadio de *S. frugiperda* a la toxina Cry1F expresada en hojas de maíz es la aversión, y además, que sobrevivieron a periodos de exposición breves. Estas características podrían fomentar el desarrollo de resistencia en un refugio integrado al incrementar la supervivencia de los individuos heterocigotas que se alimentan inicialmente de una planta *Bt* y luego se trasladan a una no *Bt* donde puedan completar su desarrollo (Davis & Coleman, 1997; Huang *et al.*, 2006; Goldstein *et al.*, 2010; Paula-Moraes *et al.*, 2012; Wangila *et al.*, 2013).

Estudios previos demostraron que existen diferencias en la susceptibilidad a toxinas entre estadios larvales de varias plagas (Huang *et al.*, 1999; Walker *et al.*, 2000; Ashfaq *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2006; Armstrong *et al.*, 2011). De este modo, Hornby & Gardner (1987) demostraron que la susceptibilidad de *S. frugiperda* a la β -exotoxina de

B. thuringiensis está inversamente relacionada al estadio larval. Estos autores encontraron que la concentración letal media (CL50) para el cuarto estadio es 309 y 17 veces superior a las del primer y tercer estadio, respectivamente.

El enfoque de refugio integrado como táctica para el manejo de la resistencia de los insectos, demanda información acerca del comportamiento de los estadios larvales de las principales plagas objetivo. Los antecedentes se han enfocado principalmente en el estudio de estas características en otras plagas de maíz y/o cultivos. Por otro lado, no existen estudios que contemplen el movimiento y dispersión de larvas de *S. frugiperda* en distintas configuraciones de refugio de maíz *Bt* y no *Bt*. Por lo tanto, en esta tesis se propone estudiar el efecto de las toxinas expresadas en el maíz *Bt* sobre el comportamiento de larvas de *S. frugiperda* y la susceptibilidad de los distintos estadios larvales para dimensionar hasta qué punto un refugio integrado puede aportar al manejo de la resistencia de esta plaga en el cultivo de maíz.

1.8) Hipótesis y predicciones

Hipótesis 1: Varios mecanismos se emplean para evitar o eludir los compuestos de defensa de una planta, algunos herbívoros evitan la exposición moviéndose a nuevos recursos (Schowalter, 2011). Se ha demostrado que las larvas de *S. frugiperda* poseen la capacidad de detectar la presencia de toxinas *Bt* Cry1F en el alimento antes de que la cantidad consumida cause efectos letales, y esto causa como primer estímulo el rechazo hacia la fuente de alimento (Binning *et al.*, 2014). Se postula que este comportamiento provoca que las larvas incrementen su movilidad.

Predicción: El movimiento intra-planta y la dispersión de larvas de *S. frugiperda* en busca de otra fuente de alimento será mayor en plantas de maíz *Bt* que en las plantas de maíz no *Bt*.

Hipótesis 2: El término dispersión se emplea generalmente para significar la separación de los individuos en distintas direcciones, y puede implicar movimientos activos o pasivos (Begon *et al.*, 1995). En el contexto de esta tesis, una dispersión exitosa significa que la larva se separa de la planta de maíz original y alcanza a otra. Se plantea como hipótesis, que el éxito en la dispersión de las larvas de *S. frugiperda* está directamente relacionado con la tasa de encuentro entre éstas y las plantas receptoras.

Predicción: Considerando que la tasa de encuentro entre larvas en dispersión y las plantas receptoras guarda una estrecha relación directa con la densidad de plantas y con el incremento de tamaño de las plantas, entonces a mayores densidades de siembra y en estados fenológicos más avanzados el éxito en la dispersión de larvas será mayor.

Hipótesis 3: La toxicidad de una sustancia se mide en términos de miligramos por unidad de peso de un organismo. Esto sugiere que existe una relación inversa entre la capacidad de la toxina para generar un efecto adverso, y el peso del organismo receptor (Yu, 1983; You *et al.*, 2013). Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* actúan adhiriéndose a receptores ubicados en las membranas celulares del intestino y paralizando el tracto digestivo (Aranda *et al.*, 1996), efecto que guarda estrecha relación con la concentración de la toxina. Por carácter transitivo y en virtud de lo expresado anteriormente, el efecto tóxico guarda una relación inversa con el peso de las larvas.

Predicción: Se espera que las larvas jóvenes de *S. frugiperda* sean más susceptibles a las toxinas expresadas en las hojas de maíz *Bt* que aquellas en estadios más avanzados de desarrollo.

1.9) Objetivos

1.9.1) Objetivo general

Estudiar los aspectos biológicos y agronómicos involucrados en el diseño del refugio integrado en el marco de la estrategia de manejo de la resistencia de *Spodoptera frugiperda* en maíz *Bt*.

1.9.2) Objetivos específicos

1. Comparar la movilidad intra-planta y la dispersión inter-plantas de las larvas de *Spodoptera frugiperda* entre maíz *Bt* y maíz no *Bt* (Capítulo 2).
2. Evaluar la influencia del estado fenológico y densidad de las plantas de maíz en la dispersión efectiva de las larvas (Capítulo 2).
3. Comparar la potencialidad de los patrones de refugio estructurado y refugio integrado, para proveer individuos susceptibles, en función de la supervivencia en plantas no *Bt* (Capítulo 2).
4. Determinar la susceptibilidad relativa de los distintos estadios larvales de *Spodoptera frugiperda* a las toxinas expresadas en hojas de maíz *Bt* (Capítulo 3).

1.10) Organización de la tesis

Para abordar estos objetivos, la tesis fue organizada en capítulos: En el capítulo 1 (Introducción general y antecedentes) se desarrollaron los antecedentes sobre el tema, los cuales dan sustento a la formulación de hipótesis y objetivos. En el capítulo 2 (Movimiento, dispersión y supervivencia de *S. frugiperda* en diferentes configuraciones de siembra de maíz *Bt* y no *Bt*) se abordarán los objetivos 1 a 3. El objetivo 4 se tratará en el capítulo 3 (Evaluación de susceptibilidad de diferentes estadios de *S. frugiperda* a las toxinas Cry1A.105 y Cry2Ab2 expresadas en hojas de maíz *Bt*). La tesis desemboca en un capítulo 4 final en el que se articula la información generada en este trabajo con el conocimiento previo disponible, para generar estimaciones del impacto relativo del refugio integrado en la evolución de resistencia de *S. frugiperda* en maíz *Bt*, se discuten los resultados y se presentan las conclusiones generales.

Capítulo 2 Movimiento, dispersión y supervivencia de *S. frugiperda* en diferentes configuraciones de siembra de maíz *Bt* y no *Bt*

2.1) Introducción

A partir de 1996, la adopción de maíces genéticamente modificados, maíces *Bt*, se incrementó año tras año (James, 2016). Esta tecnología se constituyó como una nueva táctica para el manejo de *S. frugiperda* (Burtet *et al.*, 2017). Sin embargo, el uso extensivo de cultivos *Bt* podría acelerar la adaptación de las plagas a las toxinas *Bt* y amenazar el uso sostenible de la tecnología (Tabashnik *et al.*, 2013; Carrière *et al.*, 2016; Van Den Berg, 2016). La continuidad de la eficacia de los cultivos que expresan toxinas insecticidas depende de la implementación de estrategias de manejo de la resistencia de insectos (MRI) (Head *et al.*, 2014; Faretto *et al.*, 2017).

Tal como se expuso en el capítulo 1, por muchos años la estrategia de manejo de la resistencia “Alta dosis/Refugio” (AD/R) ha sido aceptada y ampliamente adoptada (Tabashnik, 2008). Esta estrategia se apoya en los principios de reducción de la dominancia y heredabilidad de la resistencia (Tabashnik *et al.*, 2004; Trumper, 2014). La dominancia de la resistencia no es una propiedad constante y depende de características ambientales y de la concentración de toxina (Roush & Daly, 1990; Bourguet *et al.*, 2000). En efecto, la relación entre la dominancia de la resistencia y la dosis de toxina responde a una función negativa, es decir, la dominancia disminuye a medida que se incrementa la concentración de toxina (Mallet & Porter, 1992; Tabashnik *et al.*, 2004). Si la herencia de la resistencia es recesiva, la progenie híbrida de dicho cruzamiento será controlada por el cultivo *Bt*, retrasando considerablemente la evolución de la resistencia. El refugio estructurado fue la configuración típicamente adoptada, es decir, un bloque o franjas de cultivo no *Bt* (Head & Greenplate, 2012; Head *et al.*, 2014). Sin embargo el cumplimiento de los requerimientos de refugio ha sido siempre un inconveniente (Wangila *et al.*, 2013).

Numerosos estudios han demostrado que la estrategia AD/R es altamente eficaz para retrasar el desarrollo de resistencia de insectos y preservar la sustentabilidad de la tecnología de cultivo *Bt* (Huang *et al.*, 2011; 2014; Tabashnik *et al.*, 2013; Carrière *et al.*, 2015). Para complementar la estrategia AD/R y a partir de la aprobación de los eventos *Bt* piramidados (Roush, 1998; Carrière *et al.*, 2015; 2016), se aprobó un enfoque de refugio integrado en proporción 5: 95% (no *Bt*: *Bt*) para eventos piramidados de maíz

(Onstad *et al.*, 2011; Matten *et al.*, 2012; Trumper, 2014; Yang *et al.*, 2014). Sin embargo la información científica acerca del resultado de esta estrategia es todavía escasa (Yang *et al.*, 2017). El movimiento de las larvas entre plantas *Bt* y no *Bt* es una de las mayores preocupaciones ya que se pueden crear condiciones favorables para el desarrollo de la resistencia de las plagas objetivo (Goldstein *et al.*, 2010; Paula-Moraes *et al.*, 2012; Wangila *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2017).

En este contexto, el conocimiento del comportamiento asociado al movimiento y dispersión de larvas es crítico para aplicar efectivamente las estrategias de manejo de la resistencia de insectos (Ross & Ostlie, 1990; Paula-Moraes *et al.*, 2012). El movimiento de los primeros estadios larvales de lepidópteros en las plantas hospedadoras determina en gran medida dónde se establecen los sitios de alimentación (Zalucki *et al.*, 2002; Perkins *et al.*, 2008). A su vez, la movilidad de las larvas en diferentes estadios impacta en la exposición de las mismas a concentraciones letales y sub-letales de toxinas *Bt* (Paula-Moraes *et al.*, 2012).

El movimiento de insectos desde una planta no *Bt* a una *Bt* puede conducir a una disminución en la producción de insectos susceptibles de las plantas refugio en una mezcla de semillas (Davis & Onstad, 2000; Shelton *et al.*, 2000; Wangila *et al.*, 2013; Brévault *et al.*, 2015). Por otro lado, el movimiento de un insecto desde una planta *Bt* a una no *Bt* luego de una exposición subletal, o desde una planta no *Bt* a una *Bt* luego de desarrollar algún nivel de tolerancia debido al mayor tamaño de la larva, puede conducir a un mayor *fitness* relativo de los individuos resistentes heterocigotas (Mallet & Porter, 1992; Brévault *et al.*, 2015; Carrière *et al.*, 2016; Faretto *et al.*, 2017). El riesgo es mayor en aquellas plagas clave con gran capacidad de movimiento larval como muchos lepidópteros (Halcomb *et al.*, 1996; Davis & Onstad, 2000; Carroll *et al.*, 2012). De esta forma, la utilización de refugio integrado o en mezcla de semillas *Bt* y no *Bt* para reducir la presión de selección, podría paradójicamente, incrementar la tasa de evolución de resistencia de la plaga comparada con un cultivo puro *Bt* (Mallet & Porter, 1992). Se espera que un refugio integrado reduzca la presión de selección, sin embargo, el movimiento de larvas entre plantas *Bt* y no *Bt* puede incrementar la dominancia de la resistencia al ingerir dosis subletales de la toxina (Mallet & Porter, 1992). La dominancia afecta en gran medida la evolución de la resistencia al incrementar la supervivencia de los individuos heterocigotas, entonces la disminución de la presión de selección causada

por el refugio integrado podría ser superada potencialmente por un aumento pronunciado de la dominancia (Mallet & Porter, 1992). El movimiento y dispersión de larvas entre plantas dependerá del tamaño y densidad de plantas, por un lado se espera que en plantas pequeñas la densidad de larvas sea mayor y esto promueva la dispersión para evitar el hacinamiento, pero por otro, plantas más grandes pueden superponerse y de esta forma facilitar el movimiento de las larvas entre las plantas (Onstad *et al.*, 2018). Por lo tanto, la susceptibilidad diferencial entre estadios larvales y el movimiento de larvas entre plantas *Bt* y no *Bt* puede crear condiciones de exposición a dosis subletales y así promover el desarrollo de resistencia en las poblaciones de plaga objetivo (Huang *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2006; Wangila *et al.*, 2013).

Estudios previos señalan que la dispersión de larvas de algunas especies puede ser lo suficientemente elevada como para comprometer el desempeño de refugios integrados en cultivos de maíz (Onstad & Gould, 1998; Onstad, 2006; Onstad *et al.*, 2011) y de algodón (Halcomb *et al.*, 1996; Agi *et al.*, 2001; Brévault *et al.*, 2015). Sin embargo, Son escasos los antecedentes acerca de la capacidad de dispersión de *S. frugiperda*, sobre todo en maíz *Bt*. En este sentido, Pannuti *et al.* (2016) estudiaron la dispersión de esta especie en maíz convencional no *Bt* en estados reproductivos. Por su parte Ali *et al.* (1990) y Malaquias *et al.* (2017) estudiaron la dispersión de *S. frugiperda* en algodón convencional no *Bt* y *Bt* respectivamente. El movimiento de la misma especie será diferente en diferentes especies de plantas, en diferentes etapas de crecimiento y en plantas de diferentes tamaños y densidades (Onstad *et al.*, 2018). Por lo tanto, el estudio del movimiento y dispersión de *S. frugiperda* en distintas configuraciones de refugio de maíz *Bt* y no *Bt* puede brindar información valiosa para determinar la configuración de refugio más apropiada para el manejo de la resistencia de esta plaga.

En este capítulo se plantea poner a prueba las siguientes hipótesis:

Hipótesis 1: Varios mecanismos se emplean para evitar o eludir los compuestos de defensa de una planta, algunos herbívoros evitan la exposición moviéndose a nuevos recursos (Schowalter, 2011). Se ha demostrado que las larvas de *S. frugiperda* poseen la capacidad de detectar la presencia de toxinas *Bt* Cry1F en el alimento antes de que la cantidad consumida cause efectos letales, y esto causa como primer estímulo el rechazo hacia la fuente de alimento (Binning *et al.*, 2014). Se postula que este comportamiento provoca que las larvas incrementen su movilidad.

Predicción: El movimiento intra-planta y la dispersión de larvas de *S. frugiperda* en busca de otra fuente de alimento será mayor en plantas de maíz *Bt* que en las plantas de maíz no *Bt*.

Hipótesis 2: El término dispersión se emplea generalmente para significar la separación de los individuos en distintas direcciones, y puede implicar movimientos activos o pasivos (Begon *et al.*, 1995). En el contexto de esta tesis, una dispersión exitosa significa que la larva se separa de la planta de maíz original y alcanza a otra. Se plantea como hipótesis, que el éxito en la dispersión de las larvas de *S. frugiperda* está directamente relacionado con la tasa de encuentro entre éstas y las plantas receptoras.

Predicción: Considerando que la tasa de encuentro entre larvas en dispersión y las plantas receptoras guarda una estrecha relación directa con la densidad de plantas y con el incremento de tamaño de las plantas, entonces a mayores densidades de siembra y en estados fenológicos más avanzados la dispersión de larvas será mayor.

2.1.1) Objetivos específicos

1. Comparar la movilidad intra-planta y la dispersión inter-plantas de las larvas de *Spodoptera frugiperda* entre maíz *Bt* y maíz no *Bt*
2. Evaluar la influencia del estado fenológico y densidad de las plantas de maíz en la dispersión efectiva de las larvas
3. Comparar la potencialidad de los patrones de refugio estructurado y refugio integrado, para proveer individuos susceptibles, en función de la supervivencia en plantas no *Bt*

2.2) Materiales y métodos

2.2.1) Sitio experimental

Se llevaron a cabo dos ensayos durante las campañas agrícolas 2015/16 y 2016/17 en la Estación Experimental Agropecuaria de INTA Reconquista (29°15' S 59°44' W; 51 m.s.n.m). Provincia de Santa Fe, Argentina. Esta área presenta relieve plano y el suelo pertenece a la unidad cartográfica RTA 4, donde el subgrupo dominante es Argiudol Acuértico (Giorgi *et al.*, 2009). El clima es de transición, subtropical subhúmedo-

subhúmedo seco, con una distribución de las precipitaciones que concentra el 70% desde octubre a marzo (Zuil, 2011; Zuil e Izquierdo, 2012).

2.2.2) Población de *Spodoptera frugiperda*

Se estableció una colonia en laboratorio a través de la captura de adultos mediante trampa de luz y recolección de larvas en un lote de maíz no *Bt* de la variedad Leales 25 Plus (único material no *Bt* sembrado en INTA EEA Reconquista en el momento de iniciar la colonia). Los adultos se mantuvieron en jaulas cilíndricas de plástico (Tereftalato de polietileno, PET) (Barrionuevo *et al.*, 2012), de 12 cm de diámetro y 25 cm de alto cubiertas en la parte superior con una tela de voile para asegurar la ventilación y en su interior con papel tissue como sustrato de oviposición. Los adultos fueron alimentados con una solución acuosa de miel al 10% provista mediante un algodón saturado (Russo *et al.*, 2012; Barrionuevo *et al.*, 2012; Omoto *et al.*, 2016). Los huevos se recolectaron diariamente, el papel tissue que contenía masas de huevos fue recortado (2 cm x 2 cm) y acondicionado en recipientes plásticos con papel de filtro humedecido con agua destilada y colocados en cámara de cría a temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$; $60 \pm 10\%$ de humedad relativa y fotoperiodo de 14:10 h de luz: oscuridad. Una fracción de las masas de huevos fue utilizada para la realización de ensayos a campo y bioensayos, los restantes se destinaron al establecimiento y mantenimiento de la colonia. Las larvas obtenidas fueron colocadas individualmente en cajas de Petri plásticas con papel de filtro humedecido y alimentadas con dieta artificial (Greene *et al.*, 1976). La dieta fue reemplazada cada 2 días (Barrionuevo *et al.*, 2012) hasta que las larvas alcanzaron el estado de pupa. Las pupas fueron acondicionadas en las jaulas anteriormente mencionadas hasta la emergencia de los adultos que permitieron el reinicio del ciclo. Las larvas utilizadas en los bioensayos fueron alimentadas con hojas de maíz convencional (no *Bt*) hasta alcanzar el estadio correspondiente de ensayo, para reducir los posibles efectos que pueden tener la dieta o el agua en el comportamiento de las larvas (Binning *et al.*, 2014; Glendinning & Slansky, 1995). Una vez establecida la colonia, se depositaron especímenes de referencia en la colección entomológica del laboratorio de entomología “María Ana Sosa” de la Estación Experimental Agropecuaria de INTA Reconquista. Además, se conservaron larvas en recipientes adecuados con etanol (100%) a -20°C para su posterior caracterización molecular (Machado *et al.*, 2008; Juárez *et al.*, 2012).

2.2.3) Material vegetal

Para los ensayos se utilizaron dos híbridos comerciales de maíz recomendados para la región por su comportamiento agronómico, uno *Bt* (KWS® 3720 Genuity® VT Triple Pro®) y otro híbrido no *Bt* genéticamente cercano (KWS® 3800 Agrisure® TGPlus®). Se seleccionó este híbrido debido a que el mismo híbrido en versión no *Bt* (iso-híbrido) no se encontraba comercialmente disponible al momento de los ensayos. Esta es una situación muy frecuente, y de hecho, además de haber sido la elección en investigaciones precedentes, tales como Buntin *et al.* (2000); Wangila *et al.* (2012), (2013); Campagne *et al.* (2013); Niu *et al.* (2013); Huang *et al.* (2014); Yang *et al.* (2013, 2014, 2015), es un criterio aceptado por la comunidad científica (Huang, 2018. Comunicación personal). El híbrido Genuity® VT Triple Pro® contiene tres genes *Bt*, de los cuales Cry1A.105 y Cry2Ab tienen acción insecticida sobre lepidópteros y Cry3Bb1 acción insecticida sobre insectos coleópteros (Wangila *et al.*, 2012; Niu *et al.*, 2013); además posee un evento que le confiere tolerancia al herbicida glifosato (Wan, 2015). El híbrido no *Bt* posee únicamente tolerancia al herbicida glifosato. En este trabajo experimental se optó trabajar con el evento VT Triple Pro® debido a que al momento de los ensayos comprendía la táctica de control más empleada para el control de *S. frugiperda* en maíz en el Norte de Santa Fe (Gallard, 2016. Comunicación personal).

2.2.4) Prácticas culturales

Los ensayos fueron realizados bajo un sistema de manejo en siembra directa, sembrados manualmente en parcelas de cinco surcos previamente marcados con sembradora a 0.52 m. Al momento de siembra, las parcelas fueron fertilizadas con 80 kg. ha⁻¹ de fosfato diamónico (18-46-0). Luego de la siembra (preemergencia) se aplicaron herbicidas residuales (Atrazina 90% 2 kg. ha⁻¹ + Acetoclor 90% 1 l. ha⁻¹), y luego de la emergencia del cultivo (V2) (Ritchie & Hanway, 1982) se aplicó Glifosato (62% 2,5 l. ha⁻¹). Para evitar infestaciones naturales durante los ensayos se tomaron medidas de seguridad que consistieron en la utilización de jaulas y aplicaciones del insecticida no persistente Cipermetrina 25 EC (100 ml. ha⁻¹) (Pannuti *et al.*, 2015) cada 5 días hasta la colocación de las jaulas. Las medidas de las mismas fueron de 3 m de ancho por 4 m de largo por 1.2 m de alto, la estructura fue realizada con hierro nervado de 10 mm de diámetro y fue íntegramente cubierta con tela de tul 16 x 22 mesh (Walker *et al.*, 2000; Macrae *et al.*, 2005). Antes del inicio de los ensayos se inspeccionaron todas las plantas para constatar la ausencia de infestaciones naturales.

2.2.5) Ensayo 1

2.2.5.1) Diseño experimental y tratamientos

Para responder a los objetivos 1 y 3 se realizó un ensayo a campo en la campaña 2015/16 que se repitió completamente en la campaña 2016/17. Las unidades experimentales fueron parcelas de 45 plantas en cinco surcos distanciados a 0,52 m. La distancia entre plantas en el surco fue de 0,33 m lo que representa una densidad aproximada de 55.000 pl. ha⁻¹. El diseño del experimento fue completamente aleatorizado con cinco repeticiones. Los tratamientos fueron:

T1: Cultivo puro *Bt*. (*Bt*)

T2: 1 planta no *Bt* (refugio) en el centro de la parcela rodeada de plantas *Bt*. (ReB)

T3: cultivo puro no *Bt*. (no *Bt*)

T4: 1 planta *Bt* en el centro de la parcela rodeada de plantas no *Bt*. (ReB inv)

Los tratamientos T1 y T3 representan las dos posibilidades en un refugio estructurado (fracciones *Bt* y no *Bt* del lote respectivamente), el tratamiento T2 fue diseñado para simular un refugio integrado o mezcla de semillas (una planta *Bt* rodeada de 44 plantas no *Bt*, es una de las posibles configuraciones de una mezcla 95:5). El tratamiento T4 es el escenario menos probable en un refugio integrado.

2.2.5.2) Infestación inducida de larvas

Cuando las plantas de maíz alcanzaron el estado fenológico V6 según escala de Ritchie & Hanway (1982), se procedió con la infestación de larvas neonatas (< 12 h) de la colonia establecida en el laboratorio de Entomología de INTA EEA Reconquista. Las masas de huevos obtenidas se colocaron individualmente en recipientes de plástico. Posteriormente se contó el número de huevos de cada masa mediante un microscopio estereoscópico (Nikon SMZ 645). El primer año de ensayo se utilizaron desoves de 123 ± 22,7 huevos para infestar cada planta central. El segundo año se utilizaron desoves más grandes (196 ± 39,4 huevos), debido a que las precipitaciones durante el ensayo pueden afectar la supervivencia y el recuento de larvas en los sucesivos muestreos (Pannuti *et al.*, 2015). Se contabilizaron y acondicionaron una gran cantidad de masas de huevos (100 ± 20) en cada año. Luego, al momento de la infestación las masas de huevos se seleccionaron por uniformidad en tamaño y edad; el ensayo se llevó a cabo con aquellas que se encontraban eclosionadas pero las larvas seguían sobre el papel tissue que sirvió de sustrato de oviposición. Se colocó una masa de huevos eclosionada en la cara superior

de la cuarta hoja totalmente expandida de la planta central de cada parcela. Se consideró como hoja totalmente desarrollada a aquella con el collar completamente visible (Andrade *et al.*, 1996). Esta hoja fue marcada con un rótulo a los efectos de facilitar la categorización de los movimientos. Las infestaciones artificiales se realizaron en el rango horario 6:00-7:00 AM.

2.2.5.3) Mediciones y variables analizadas

Índice de movimiento

Se generó un índice de movimiento estimado a partir de la movilidad de las larvas en la planta sobre la cual fueron liberadas (bajo jaula en campo). El movimiento fue registrado mediante observaciones a intervalos regulares de 2 horas durante las primeras 8 horas de la inoculación. En cada uno de los momentos de observación, se registró el número de larvas presentes en cada hoja de la planta donde se realizó la liberación. Se implementó un sistema de puntuación de las posiciones en que se encontraron las larvas de tal forma de ponderar el desplazamiento desde la hoja en la que se realizó la liberación. Si la larva se encontraba en la hoja en la cual fue efectuada la liberación se usó el puntaje 0. El puntaje 1 se asignó a larvas que se encontraron en la hoja inmediatamente superior o inferior a la de la liberación. Los puntajes 2 y 3, para las larvas en la segunda y tercera hoja, respectivamente, y puntaje 4 si la larva llegó al cogollo. Usando estos puntajes se elaboró un índice de movimiento en cada planta, según la siguiente fórmula:

$$IM = \frac{\sum_{i=0}^4 L_i \times S_i}{\sum L \times 4}$$

Dónde: L_i : N° larvas en puntaje i

S_i : Puntaje i (rango de 0 a 4)

Para la modelación del IM, se ajustaron modelos lineales mixtos para medidas repetidas en el tiempo, ya que las observaciones se realizaron repetidamente sobre la misma planta (Moser & Macchiavelli, 2002; Gueorguieva & Krystal, 2011; Chaplin-Kramer & Kremen, 2012; Lopez Bautista *et al.*, 2014). La modelación estadística se realizó con el total de los datos, incorporando efecto campaña y efecto de interacciones de los demás factores con campaña.

El modelo base fue:

$$IM = \mu + \alpha T + \beta t + \delta Txt + \gamma C + \text{repetición}(C) + \varepsilon$$

Donde μ es la media general, T es la tecnología (*Bt*; no *Bt*), t representa el tiempo en horas, C es la campaña agrícola y ε es el error experimental.

Reencuentro de larvas

Se evaluó a partir del número de larvas reencontradas en los distintos tipos de maíces (*Bt* y no *Bt*) en cada momento de evaluación (durante las primeras 8 h de la liberación). El número de larvas encontradas fue expresado respecto del número inicial de larvas liberadas.

El modelo base utilizado para indagar la dinámica del reencuentro de larvas fue el mismo de la ecuación anterior.

$$\text{Reencuentro} (\%) = \mu + \alpha T + \beta t + \delta Txt + \gamma C + \text{repetición}(C) + \varepsilon$$

Donde μ es la media general, T es la tecnología (*Bt*; no *Bt*), t representa el tiempo en horas, C es la campaña agrícola y ε es el error experimental.

Índice de dispersión

Se generó un índice para estimar la dispersión de las larvas en los distintos tratamientos *Bt*, no *Bt*, ReB (1 planta no *Bt* rodeada de 44 *Bt*) y ReB inv (1 planta *Bt* rodeada de 44 no *Bt*). Éste índice fue elaborado en base a las larvas halladas en observaciones regulares a intervalos de 2 días durante 12 días desde la liberación. En cada uno de los momentos de observación se registró el número de larvas presentes en cada planta de cada parcela. Los datos se organizaron en clases de dispersión según la Figura 2.1. A partir de los datos se elaboró un índice de dispersión, según la fórmula:

$$I. D. = \frac{\sum_{i=0}^4 L_i \times S_i}{\sum L \times 4}$$

Donde L_i : N° larvas en puntaje i

S_i : Puntaje i (N° de clase) rango 0-4

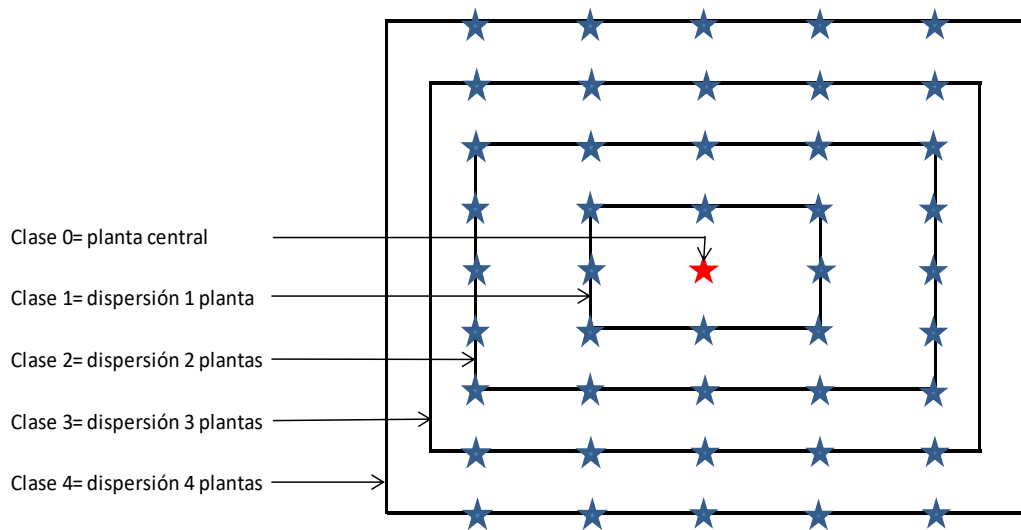


Figura 2.1: Esquema de asignación de puntajes a las diferentes ubicaciones de las larvas de *S. frugiperda*, respecto a la planta en la que se realizó la liberación inicial. Los puntajes se asignaron de acuerdo al número de perímetros concéntricos que avanzó cada larva.

De igual modo que para la variable índice de movimiento, se exploraron distintos modelos para incluir simultáneamente las observaciones de índice de dispersión de ambas campañas. Para modelar la dinámica de la dispersión se usó un polinomio de segundo orden.

El modelo base fue:

$$ID = \mu + \alpha T + \beta t + \delta t^2 + \sigma T \alpha t + \rho T \alpha t^2 + \gamma C + \text{repetición}(C) + \varepsilon$$

Donde μ es la media general, T es el tratamiento (*Bt*; ReB; no *Bt*; ReB inv), t representa el tiempo en horas, C es la campaña agrícola y ε es el error experimental.

Se ajustó el modelo explorando las distintas posibilidades de modelar la auto correlación temporal en los errores y la heterocedasticidad.

Supervivencia

Se estimó a partir del número de larvas encontradas en los distintos tratamientos (*Bt*, no *Bt*, ReB y ReB inv) en cada momento de muestreo. La supervivencia fue expresada en función del número inicial de larvas liberadas. Se ajustó un modelo lineal generalizado, de familia binomial con función de enlace Logit.

El modelo utilizado fue:

$$\text{Ln} \left(\frac{p_i}{(1 - p_i)} \right) = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_5 X_5 + \varepsilon$$

Donde, X_1 corresponde a tratamiento, X_2 es el tiempo en días, X_3 la interacción tratamiento x tiempo, X_4 es la campaña y X_5 representa la repetición (efecto anidado a campaña) y ε es el error experimental.

Se calcularon los cocientes de chance (CC) de supervivencia del tratamiento no Bt respecto de los tratamientos Bt , ReB y ReB inv para cada campaña. Tomando como ejemplo el contraste de los tratamientos no Bt versus Bt , se aplicó la siguiente ecuación (Scheiner & Gurevitch, 2001):

$$CC_{(no\ Bt;Bt)} = \frac{\frac{p_{no\ Bt}}{(1 - p_{no\ Bt})}}{\frac{p_{Bt}}{(1 - p_{Bt})}}$$

Donde $p_{no\ Bt}$ y p_{Bt} representan la proporción de larvas sobrevivientes en los tratamientos no Bt y Bt , respectivamente, mientras que $1-p_{no\ Bt}$ y $1-p_{Bt}$ son sus respectivos complementos. El mismo procedimiento se aplicó para contrastar el tratamiento no Bt con ReB y ReB inv. Los cocientes de chance se estimaron para dos momentos, el primero de los cuales fue con los datos de supervivencia (a campo) a los 12 días de la liberación de las larvas. El segundo momento fue la supervivencia hasta el estado de pupa. con el dato final de supervivencia “hasta alcanzar el estado de pupa”, para lo cual al finalizar el monitoreo (12 días desde la infestación inducida) se recolectaron todas las larvas de las parcelas y se las llevó a laboratorio, donde se las alimentó con hojas de las plantas de las cuales fueron recolectadas, y se registró el número de larvas que alcanzaron el estado de pupa (Brévault *et al.*, 2015). Los cocientes de chances se analizaron mediante test Chi² de Pearson (Agresti, 2002).

2.2.6) Ensayo 2

2.2.6.1) Diseño experimental y tratamientos

Para cumplir el objetivo 2 se realizó un ensayo a campo en la campaña 2015/16 que se repitió completamente en la campaña 2016/17. Se utilizó un patrón de siembra diseñado para simular una situación de refugio integrado o mezcla de semillas (1 planta no Bt rodeada de 44 plantas Bt). El diseño del experimento fue completamente

aleatorizado con cuatro repeticiones y combinación factorial de 2 factores, estado fenológico (2 niveles: V2 y V8) (Ritchie & Hanway 1982), y densidad (3 niveles: 40.000 pl. ha⁻¹, 55.000 pl. ha⁻¹ y 70.000 pl. ha⁻¹). Los tres niveles de densidad se lograron al modificar la distancia entre plantas en el surco (45 cm, 35 cm y 27 cm) respectivamente. Las parcelas fueron de 45 plantas distribuidas en 5 surcos distanciados a 0,52 m.

2.2.6.2) Infestación inducida de larvas

Cuando las plantas de maíz alcanzaron el estado fenológico V2 y V8 según escala de Ritchie & Hanway (1982), se procedió con la infestación de larvas neonatas (< 12 h) del mismo modo que en el ensayo 1. Para este experimento el primer año se utilizaron desoves de 155 ± 31,9 huevos y el segundo año desoves de 182 ± 21,5 huevos, por el mismo motivo explicado con anterioridad. Para la infestación se colocó una masa de huevos eclosionada en la cara superior de la última hoja totalmente desarrollada de la planta central. Se consideró como hoja totalmente desarrollada a aquella con el collar completamente visible (Andrade *et al.*, 1996). Esta hoja fue marcada con un rótulo a los efectos de facilitar la categorización de los movimientos. Las infestaciones artificiales se realizaron en el rango horario 6:00-7:00 AM.

2.2.6.3) Mediciones y variables analizadas

Índice de dispersión

El índice de dispersión se estimó de la misma manera que en el ensayo 1. La dispersión fue registrada en observaciones regulares a intervalos de 2 días durante 12 días de la liberación. En cada uno de los momentos de observación se registró el número de larvas presentes en cada planta de la parcela. Los datos se organizaron en clases y se elaboró un índice de dispersión según la fórmula mencionada en 2.2.5.3.

El modelo base utilizado fue:

$$ID = \mu + \alpha E + \beta D + \gamma t + \delta Ext + \rho Dxt + \sigma ExD + \varphi ExDxt + \omega C + \text{repetición}(C) + \varepsilon$$

Donde μ es la media general, E representa el estado fenológico, D a la densidad, t al tiempo en días, C a la campaña agrícola y ε es el error experimental.

Del mismo modo que para las variables anteriores se corrió el modelo propuesto, explorando las distintas posibilidades de modelar la covarianza mediante auto correlación

temporal en los errores y la heterocedasticidad residual. Se utilizaron los criterios de verosimilitud penalizada (AIC y BIC) para elegir el modelo que mejor describió los datos.

Todos los análisis estadísticos fueron llevados a cabo con el software Infostat versión 2017 (Di Rienzo *et al.*, 2017). Las comparaciones de medias fueron mediante test LSD de Fisher con nivel de significancia de 5%. Como estrategia general para el análisis de los datos primero se ajustaron modelos con distintas estructuras de covarianza, combinando apropiadamente estructuras de correlación residual, heteroscedasticidad residual y efectos aleatorios. Mediante criterios de verosimilitud penalizada (AIC y BIC) se eligió el modelo que mejor describió los datos y se utilizó ese modelo para realizar inferencias acerca de las medias. Para la elección del mejor modelo se comenzó desde el modelo más simple y parsimonioso (datos independientes y varianzas homogéneas) y se fueron agregando parámetros de correlación residual (correlación constante o auto regresivo de orden 1) y heteroscedasticidad (varianza residual diferente según tiempo o tratamientos) hasta encontrar el que mejor se ajustó a los datos.

2.3) Resultados

2.3.1) Ensayo 1

2.3.1.1) Índice de movimiento

De acuerdo a los criterios de AIC y BIC el modelo que mejor ajustó a los datos fue el que contempla la auto correlación temporal mediante una función auto regresiva heterocedástica (modelo N° 4) de la Tabla 2.1 que muestra los criterios de evaluación de bondad de ajuste de los modelos estadísticos evaluados.

Tabla 2.1: Criterios de bondad de ajuste de los modelos lineales mixtos estimados para el análisis del índice de movimiento

<i>N°</i>	<i>Modelo</i>	<i>AIC</i>	<i>BIC</i>
1	Datos independientes y varianzas homogéneas	-152.19	-71.26
2	Datos correlacionados (simetría compuesta) y varianzas homogéneas	-162.69	-78.87
3	Datos correlacionados (Auto regresivo) y varianzas homogéneas	-150.19	-66.37
4	Datos correlacionados (Auto regresivo) y varianzas heterogéneas (VarIdent(Tiempo))	-178.08	-85.59
5	Datos correlacionados (simetría compuesta) y varianzas heterogéneas (VarPower(Fitted))	-168.06	-75.57

Menor valor de AIC y de BIC implica mejor ajuste

Se encontraron efectos estadísticamente significativos de los factores Tecnología, tiempo y campaña (Tabla 2.2). La interacción Tecnología x tiempo fue no significativa, sugiriendo que las diferencias entre las tecnologías existen independientemente del momento de observación.

Tabla 2.2: Análisis de la varianza, pruebas de hipótesis marginales del modelo lineal mixto para medidas repetidas en el tiempo del índice de movimiento de larvas de *S. frugiperda* en plantas de maíz *Bt* y no *Bt*. Campañas agrícolas 2015/16 y 2016/17

<i>Fuente de variación</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>F</i>	<i>P-valor</i>
<i>Intercepto</i>	1	909,749	<0,0001
<i>Tecnología</i>	1	12,261	0,0006
<i>Tiempo</i>	3	45,821	<0,0001
<i>Campaña</i>	1	31,638	<0,0001
<i>Tecnología x tiempo</i>	3	1,635	0,1844

La comparación de medias del índice de movimiento en maíces *Bt* y no *Bt* mostró que el movimiento de larvas fue 25% mayor en tecnología *Bt* (Fig. 2.2). Por otro lado, si bien en la campaña 2 (Fig. 2.3) el movimiento fue mayor que en la campaña 1, las diferencias entre tratamientos se mantuvieron. En cada campaña, el movimiento fue incrementándose a medida que transcurrían las horas desde la liberación (fig. 2.4).

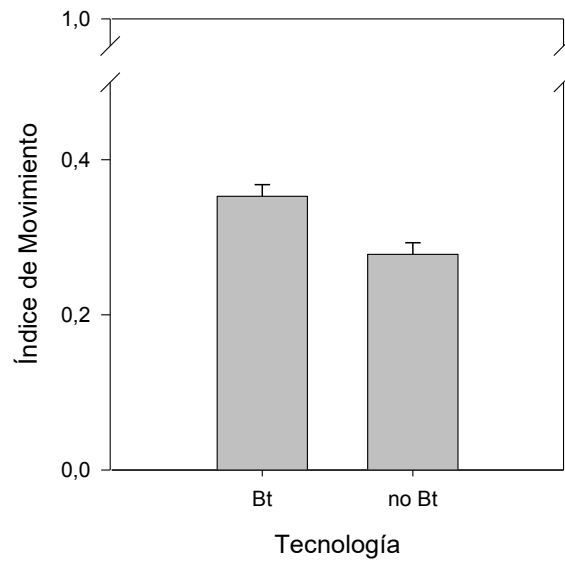


Figura 2.2: Índice de movimiento (medias \pm error estándar) de larvas de *S. frugiperda* en plantas con tecnología *Bt* y no *Bt*.

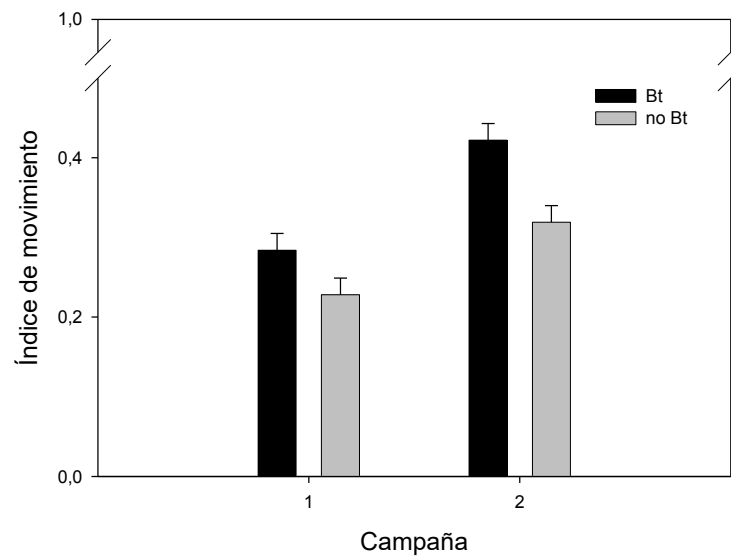


Figura 2.3: Índice de movimiento (medias \pm error estándar) de larvas de *S. frugiperda* en plantas con tecnología *Bt* y no *Bt* en 2 campañas de evaluación (campaña 1: 2015/16; campaña 2: 2016/17).

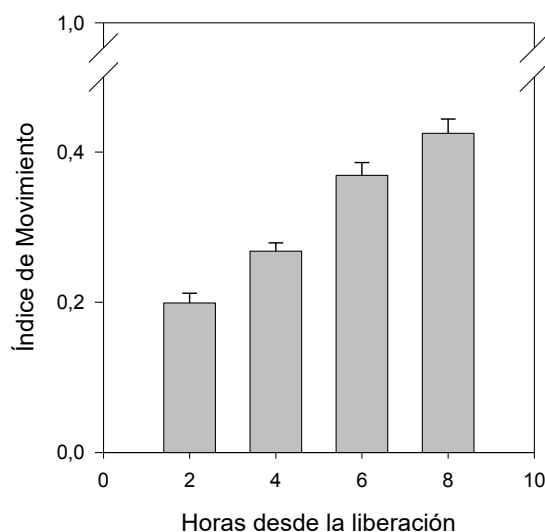


Figura 2.4: Índice de movimiento (medias \pm error estándar) de larvas de *S. frugiperda* a lo largo del tiempo evaluado en horas desde la liberación.

2.3.1.2) Reencuentro de larvas

El modelo de mejor ajuste fue el N° 6 (Tabla 2.3), que contempló la auto correlación temporal mediante una función auto regresiva heteroscedástica.

Tabla 2.3: Criterios de bondad de ajuste de los modelos lineales mixtos explorados para el análisis del reencuentro de larvas

N°	Modelo	AIC	BIC
1	Datos independientes y varianzas homogéneas	-32.63	48.30
2	Datos correlacionados (simetría compuesta) y varianzas homogéneas	-141.00	-57.18
3	Datos correlacionados (Auto regresivo) y varianzas homogéneas	-158.14	-74.32
4	Datos correlacionados (simetría compuesta) y varianzas heterogéneas (VarIdent(Tiempo))	-154.58	-62.09
5	Datos correlacionados (Auto regresivo) y varianzas heterogéneas (VarIdent(Tiempo))	-160.69	-68.20
6	Datos correlacionados (Auto regresivo) y varianzas heterogéneas (VarPower(Fitted))	-198.77	-112.06

Menor valor de AIC y de BIC implica mejor ajuste

El reencuentro de larvas fue bajo si se toma como referencia el número de larvas liberadas durante la infestación inducida. No se encontraron efectos significativos del factor Tecnología ni del factor campaña (Tabla 2.4). Sin embargo, el reencuentro

disminuyó con el paso del tiempo. La interacción Tecnología x tiempo de observación no fue significativa (Tabla 2.4).

Tabla 2.4: Análisis de la varianza, pruebas de hipótesis marginales del modelo lineal mixto para medidas repetidas en el tiempo del reencuentro de larvas de *S. frugiperda* en plantas de maíz *Bt* y no *Bt*. Campañas agrícolas 2015/16 y 2016/17

<i>Fuente de variación</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>F</i>	<i>P-valor</i>
<i>Intercepto</i>	1	177,400	<0,0001
<i>Tecnología</i>	1	1,420	0,2355
<i>Tiempo</i>	3	26,701	<0,0001
<i>Campaña</i>	1	3,149	0,0782
<i>Tecnología x tiempo</i>	3	0,521	0,6684

El reencuentro de larvas disminuyó significativamente en el transcurso del tiempo en horas desde la liberación (fig. 2.5).

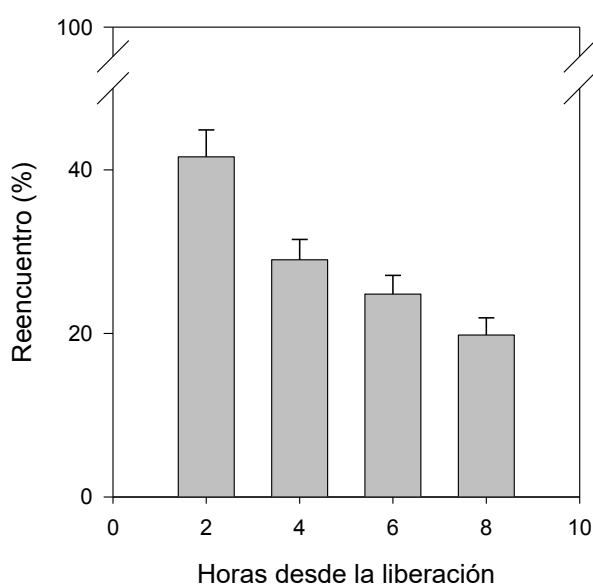


Figura 2.5: Reencuentro de larvas de *S. frugiperda* (media \pm error estándar) a lo largo del tiempo expresado como horas desde la liberación en la planta central de la unidad experimental.

2.3.1.3) Índice de dispersión

De acuerdo a los criterios de AIC y BIC el modelo explorado que mejor se ajustó a los datos fue el N° 4 (Tabla 2.5), que contempla auto correlación temporal auto regresiva de orden 1 y heterogeneidad de varianzas residual entre los tratamientos.

Tabla 2.5: Criterios de bondad de ajuste de los modelos lineales mixtos ensayados para el análisis del índice de dispersión

<i>N°</i>	<i>Modelo</i>	<i>AIC</i>	<i>BIC</i>
1	Datos independientes y varianzas homogéneas	-11.85	62.44
2	Datos independientes y varianzas heterogéneas entre tratamientos	-142.39	-58.00
3	Datos correlacionados (Simetría Compuesta) y varianzas heterogéneas entre tratamientos	-184.89	-97.13
4	Datos correlacionados (Auto regresivo) y varianzas heterogéneas entre tratamientos	-197.29	-109.53

Menor valor de AIC y de BIC implica mejor ajuste

Se encontraron efectos significativos de los factores Tratamiento, tiempo, tiempo² y fueron significativos los efectos de las interacciones Tratamiento x tiempo y Tratamiento x tiempo². No fue significativo el efecto del factor campaña (Tabla 2.6).

Tabla 2.6: Análisis de la varianza, pruebas de hipótesis marginales del modelo lineal mixto para medidas repetidas en el tiempo del índice de dispersión de larvas de *S. frugiperda* en los tratamientos *Bt*, no *Bt*, ReB y ReB inv. Campañas agrícolas 2015/16 y 2016/17

<i>Fuente de variación</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>F</i>	<i>P-valor</i>
<i>Intercepto</i>	1	53,628	<0,0001
<i>Tratamiento</i>	3	7,097	<0,0001
<i>tiempo</i>	5	15,442	<0,0001
<i>Tiempo²</i>	5	14,373	<0,0001
<i>Campaña</i>	1	0,0004	0,9847
<i>Tratamiento x tiempo</i>	15	3,578	0,0147
<i>Tratamiento x tiempo²</i>	15	3,054	0,0294

El índice de dispersión fue diferente entre tratamientos y mostró una variación diferencial en el tiempo para cada uno de ellos, razón por la cual se determinaron los coeficientes de regresión para cada tratamiento. En las Tablas 2.7 y 2.8 se detalla la prueba de hipótesis secuencial de los modelos ajustados para cada tratamiento y se prueba la significancia de las variables predictoras de cada modelo, según valores de p y los coeficientes de cada modelo final respectivamente. Los modelos ajustados que representan la variación del índice de dispersión en función del tiempo para cada tratamiento se detallan en la Tabla 2.9.

Tabla 2.7: Pruebas de hipótesis secuenciales de los modelos ajustados para el índice de dispersión de larvas de *S. frugiperda* en los tratamientos *Bt*, *no Bt*, *ReB* y *ReB inv.* Campañas agrícolas 2015/16 y 2016/17

<i>Tratamiento</i>	<i>Efectos fijos</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>F</i>	<i>P-valor</i>
<i>Bt</i>	Intercepto	1	470,838	<0,0001
	Tiempo	1	7,022	0,0104
	Tiempo ²	1	7,139	0,0098
<i>no Bt</i>	Intercepto	1	1253,735	<0,0001
	Tiempo	1	18,291	0,0001
	Tiempo ²	1	4,414	0,0401
<i>ReB</i>	Intercepto	1	128,7	<0,0001
	Tiempo	1	0,108	0,7438
	Tiempo ²	1	0,969	0,3292
<i>ReB inv</i>	Intercepto	1	3911,812	<0,0001
	Tiempo	1	9,679	0,0029
	Tiempo ²	1	2,1	0,1528

Tabla 2.8: Efectos fijos y coeficientes de los modelos ajustados para el índice de dispersión de larvas de *S. frugiperda* en los tratamientos *Bt*, *no Bt*, *ReB* y *ReB inv.* Campañas agrícolas 2015/16 y 2016/17

<i>Tratamiento</i>	<i>Efecto fijo</i>	<i>Estimador</i>	<i>Error exp.</i>	<i>T</i>	<i>P-valor</i>
<i>Bt</i>	Intercepto	0,28	0,109	2,592	0,0121
	Tiempo	0,09	0,036	2,65	0,0104
	Tiempo ²	-0,01	0,002	-2,672	0,0098
<i>no Bt</i>	Intercepto	0,29	0,067	4,286	0,0001
	Tiempo	0,06	0,022	2,93	0,0049
	Tiempo ²	-0,003	0,002	-2,101	0,0401
<i>ReB</i>	Intercepto	0,281	0,148	1,902	0,0482
	Tiempo	0,043	0,048	0,896	0,3739
	Tiempo ²	-0,003	0,003	-0,984	0,3292
<i>ReB inv</i>	Intercepto	0,493	0,043	11,581	<0,0001
	Tiempo	0,029	0,014	2,054	0,0446
	Tiempo ²	-0,001	0,001	-1,449	0,1528

Tabla 2.9: Modelos de Índice de Dispersión de larvas de *S. frugiperda* en función del tiempo en días desde su liberación en la planta central de la unidad experimental, para los tratamientos *Bt*, *no Bt*, *ReB* y *ReB inv.*

<i>Tratamiento</i>	<i>Ecuación</i>
<i>Bt</i>	ID= 0,28 + 0,09t - 0,01t ²
<i>no Bt</i>	ID= 0,29 + 0,06t - 0,003t ²
<i>ReB</i>	ID= 0,28
<i>ReB inv</i>	ID= 0,49 + 0,03t

En los tratamientos ReB inv y *Bt* las larvas se dispersaron inicialmente más rápido que en los demás tratamientos (Fig. 2.6), luego en ReB inv la dispersión se incrementó con el tiempo, y finalmente, después del día 10 casi la totalidad de las larvas habían abandonado la planta donde habían sido liberadas (Fig. 2.7D). En cambio, en el tratamiento *Bt* la dispersión alcanzó su valor máximo a los 8 días (Fig. 2.6) y luego disminuyó debido a la disminución en el número de larvas registradas en las clases superiores de dispersión (Fig. 2.7A). En los tratamientos no *Bt* y ReB la dispersión inicial resultó más lenta que en los anteriores, en no *Bt* aumentó con el tiempo hasta alcanzar un máximo el día 10 y finalmente disminuyó. En el tratamiento ReB el índice de dispersión fue constante durante el intervalo de tiempo analizado (Fig. 2.6).

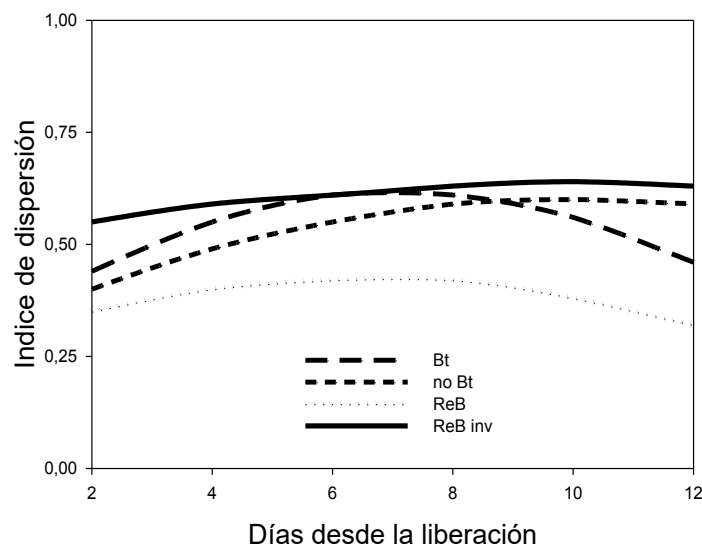


Figura 2.6: Valores predichos del Índice de dispersión (ID) de larvas de *S. frugiperda* en función al tiempo en días desde su liberación en la planta central de la unidad experimental. Se representan los modelos ajustados para los tratamientos *Bt*, no *Bt*, ReB y ReB inv.

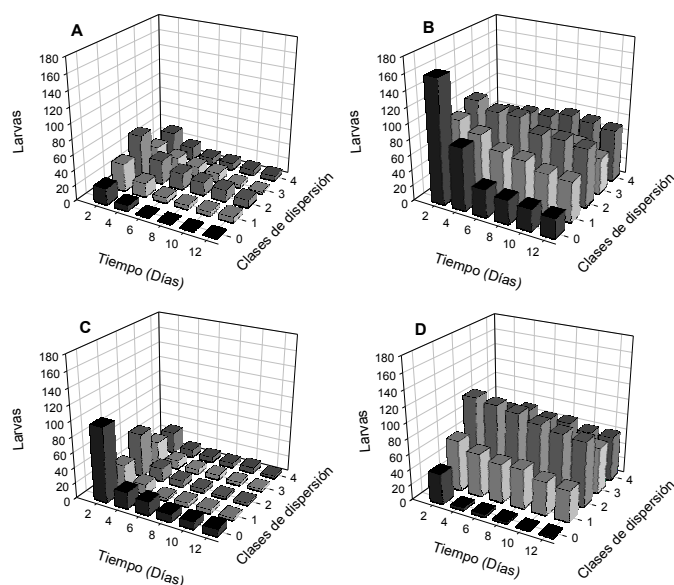


Figura 2.7: Distribución y número de larvas de *S. frugiperda* en clases de dispersión (0, 1, 2, 3 y 4) en función del tiempo en días desde la liberación para los diferentes tratamientos A: *Bt*, B: no *Bt*, C: ReB y D: ReB inv.

2.3.1.4) Supervivencia

Se encontraron efectos significativos de los factores Tratamiento y tiempo en días desde la liberación inducida, y fueron significativos los efectos de la interacción Tratamiento x tiempo (Tabla 2.10).

Tabla 2.10: Análisis de la varianza, pruebas de hipótesis marginales (Wald) del modelo lineal generalizado para medidas repetidas en el tiempo de la supervivencia de larvas de *S. frugiperda* en los tratamientos *Bt*, no *Bt*, ReB y ReB inv. Campañas agrícolas 2015/16 y 2016/17

Fuente de variación	Grados de libertad	F	P-valor
Tratamiento	3	32,950	<0,0001
Tiempo	5	135,114	<0,0001
Campaña	1	2,575	0,1100
Tratamiento x tiempo	15	16,342	<0,0001

La comparación de medias mostró diferencias significativas entre las diferentes configuraciones del refugio. Los tratamientos no *Bt* y ReB inv presentaron los mayores valores de supervivencia y no se diferenciaron entre sí, pero sí lo hicieron de los tratamientos ReB y *Bt*, los que se diferenciaron entre sí únicamente a los 2 días desde la liberación (fig. 2.8). Los resultados de los análisis de cocientes de chances de supervivencia a los 12 días de la liberación de larvas indicaron diferencias significativas en las comparaciones entre *Bt* y no *Bt* y entre ReB y no *Bt*, en cambio, entre ReB inv y

no *Bt* las diferencias no fueron significativas. En efecto, como lo ilustra la Tabla 2.11, el CC entre no *Bt* y *Bt* en la campaña 1 fue de 61,77 ($p < 0,0001$) esto significa que en el tratamiento no *Bt* sobreviven más de 61 larvas por cada una que sobrevive en el tratamiento *Bt*. Los mismos análisis realizados con los datos de supervivencia hasta alcanzar el estado de pupa arrojaron resultados similares, las chances de supervivencia fueron significativamente mayores en no *Bt* respecto a *Bt* y ReB en las dos campañas. La comparación entre no *Bt* y ReB inv no arrojó diferencia significativa en la campaña 1, pero en la campaña 2 la chance de supervivencia en ReB inv fue significativamente mayor que en no *Bt* (Tabla 2.12).

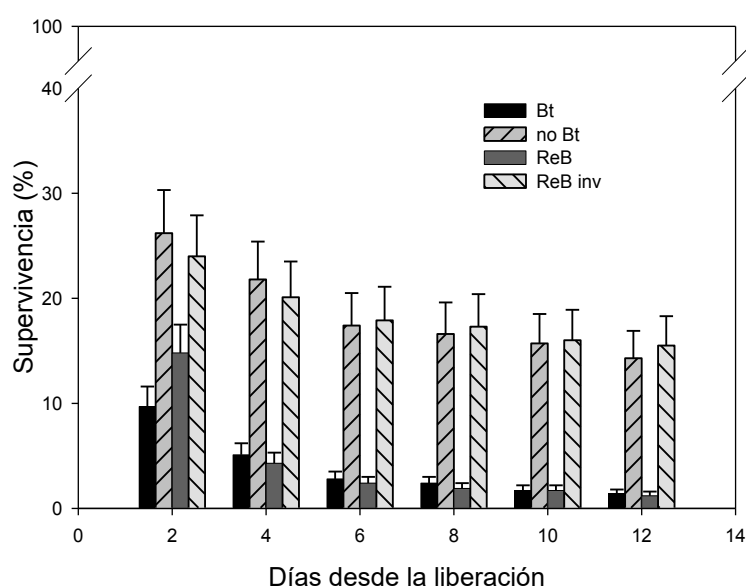


Figura 2.8: Porcentaje de supervivencia de larvas de *S. frugiperda* en función del tiempo en días desde su liberación en las unidades experimentales de los tratamientos *Bt*, no *Bt*, ReB y ReB inv.

Tabla 2.11: Cociente de chances (CC) de supervivencia de larvas de *S. frugiperda* en microparcels no *Bt* respecto a microparcels *Bt*, ReB y ReB inv, a los 12 días de su liberación. Campañas agrícolas 1: 2015/16, 2: 2016/17

Campaña	no <i>Bt</i> vs <i>Bt</i>			no <i>Bt</i> vs ReB			no <i>Bt</i> vs ReB inv		
	CC	I.C. 95%	P-valor	CC	I.C. 95%	P-valor	CC	I.C. 95%	P-valor
1	61,77	21,2-179,4	<0,0001	16,99	8,9-32,1	<0,0001	1,01	0,7-1,3	0,9146
2	5,22	3,3-8,2	<0,0001	11,21	6,1-20,6	<0,0001	0,82	0,6-1,1	0,1554

Tabla 2.12: Cociente de chances (CC) de supervivencia de larvas de *S. frugiperda* en microparcelas no *Bt* respecto a microparcelas *Bt*, ReB y ReB inv, al estado de pupa. Campañas agrícolas 1: 2015/16, 2: 2016/17

Campaña	<i>no Bt vs Bt</i>			<i>no Bt vs ReB</i>			<i>no Bt vs ReB inv</i>		
	CC	I.C. 95%	P-valor	CC	I.C. 95%	P-valor	CC	I.C. 95%	P-valor
1	sd	sd	<0,0001	15,38	6,8-34,4	<0,0001	1,28	0,9-1,8	0,1439
2	18,35	3,5-96,2	<0,0001	9,73	2,6-36,1	<0,0001	0,35	0,2-0,5	<0,0001

2.3.2) Ensayo 2

2.3.2.1) Índice de dispersión

De acuerdo a los criterios de AIC y BIC el modelo de mejor ajuste fue el N° 5 (Tabla 2.13), que contempla la auto correlación temporal de tipo auto regresiva de orden 1 y heteroscedástica.

Tabla 2.13: Criterios de bondad de ajuste de los modelos lineales mixtos estimados para el análisis del índice de dispersión

N°	Modelo	AIC	BIC
1	Datos independientes y varianzas homogéneas	58.57	197.56
2	Datos correlacionados y varianzas homogéneas	51.99	194.14
3	Datos correlacionados (Simetría Compuesta) y varianzas heterogéneas (VarIdent(tiempo))	22.45	180.40
4	Datos correlacionados (Auto regresivo) y varianzas homogéneas	60.57	202.72
5	Datos correlacionados (Auto regresivo) y varianzas heterogéneas (VarIdent(tiempo))	20.88	178.83

Menor valor de AIC y de BIC implica mejor ajuste

Se encontraron efectos significativos de los factores estado fenológico, tiempo y campaña. No fueron significativos los efectos de densidad y las interacciones estado fenológico x tiempo, estado fenológico x densidad, densidad x tiempo y estado fenológico x densidad x tiempo (Tabla 2.14).

Tabla 2.14: Análisis de la varianza, pruebas de hipótesis marginales del modelo lineal mixto para medidas repetidas en el tiempo del índice de dispersión de larvas de *S. frugiperda* en tratamiento ReB en función del estado fenológico y la densidad de siembra. Campañas agrícolas 2015/16 y 2016/17

<i>Fuente de variación</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>F</i>	<i>P-valor</i>
<i>Intercepto</i>	1	1271,294	<0,0001
<i>Estado fenológico</i>	1	32,930	<0,0001
<i>Densidad</i>	2	0,432	0,6498
<i>Tiempo</i>	5	9,382	<0,0001
<i>Campaña</i>	1	28,617	<0,0001
<i>Estado fenológico x tiempo</i>	5	0,477	0,7928
<i>Estado fenológico x densidad</i>	2	0,101	0,9042
<i>Densidad x tiempo</i>	10	1,322	0,2221
<i>Estado fenológico x densidad x tiempo</i>	10	0,898	0,5362

La comparación de medias del índice de dispersión mostró que la dispersión de larvas fue mayor en estado fenológico V8 (fig. 2.9). En la campaña 2 (fig. 2.10), la dispersión fue mayor que en la campaña 1. No obstante, las diferencias entre estados fenológicos se mantuvieron dentro de cada campaña. En cada campaña, la dispersión fue incrementándose hasta el día 6 desde la liberación, a partir del cual las diferencias no fueron significativas (fig. 2.11).

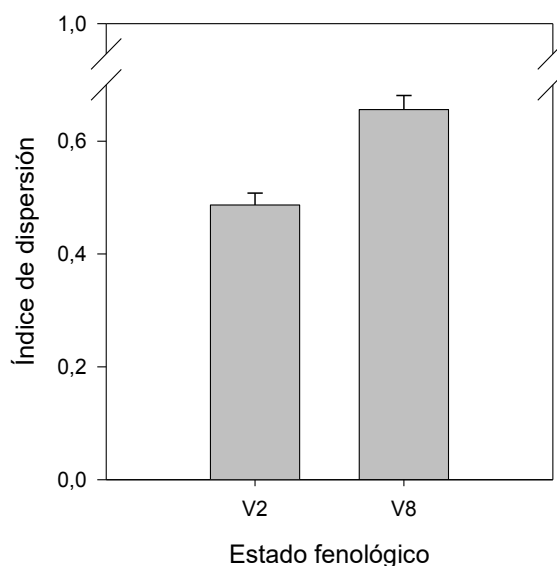


Figura 2.9: Índice de dispersión (medias \pm error estándar) de larvas de *S. frugiperda* desde el punto de su liberación, según estado fenológico, V2 y V8 (Ritchie & Hanway 1982), de las plantas de la parcela experimental.

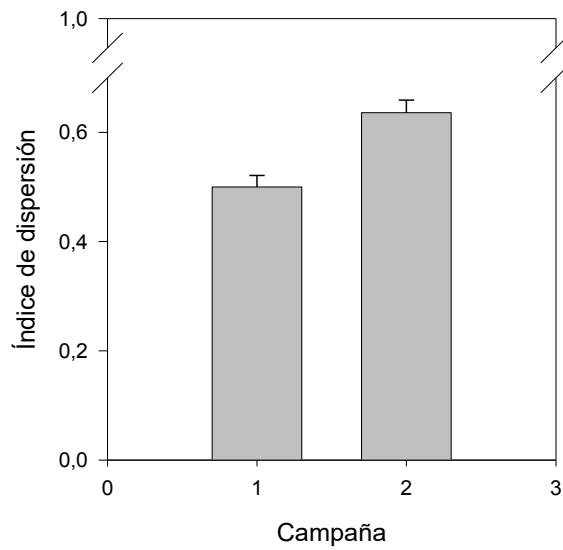


Figura 2.10: Índice de dispersión (medias \pm error estándar) de larvas de *S. frugiperda* desde el punto de su liberación, en dos campañas agrícolas (campaña 1: 2015/16; campaña 2: 2016/17).

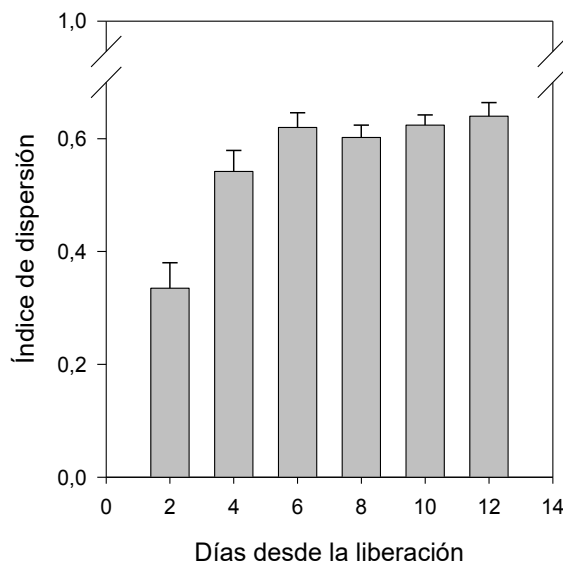


Figura 2.11: Índice de dispersión (medias \pm error estándar) de larvas de *S. frugiperda* desde el punto de su liberación, a lo largo del tiempo evaluado en días desde la infestación inducida.

2.4) Discusión

Los resultados obtenidos en cuanto a índice de movimiento intra-planta y reencuentro de larvas a partir de los experimentos realizados demuestran que la alimentación inicial de las larvas tiene influencia en su comportamiento. En efecto, el índice de movimiento fue mayor para aquellas larvas que fueron liberadas en plantas *Bt*.

Estudios previos mencionan que la presencia de algunas sustancias en el interior de las células vegetales (Rhoades, 1985; Zalucki *et al.*, 2002) como aleloquímicos y compuestos secundarios de defensa, como también algunos lípidos presentes en la cutícula de la hoja (Eigenbrode & Espelie, 1995) pueden ocasionar el rechazo por parte del insecto. En respuesta a ello se puede producir el abandono del órgano vegetal o incluso de la planta en busca de otro sitio de alimentación. En este sentido, Cohen *et al.* (1987) y Schiff *et al.* (1989) sugirieron que los insectos pueden obtener una respuesta fisiológica de una fuente de alimento tóxica o nutricionalmente inadecuada, lo que causa un incremento en el movimiento en busca de una fuente de alimento apropiada.

Generalmente una vez que una larva neonata encuentra una planta hospedera adecuada, se emplaza y establece su sitio de alimentación. En cambio, si la hospedera o parte de ella no es adecuada, es probable que continúe la exploración en busca de un sitio propicio dentro y entre las plantas (Zalucki *et al.*, 2002). Las larvas neonatas también permanecen moviéndose si la planta hospedera contiene toxinas, como las derivadas de *Bacillus thuringiensis* (Davis & Onstad, 2000; Goldstein *et al.*, 2010 Razzi *et al.*, 2011). Por su parte Binning *et al.* (2014), encontraron que la primera respuesta de larvas de *S. frugiperda* a la presencia de toxinas Cry1F en maíz fue el rechazo. Li *et al.* (2006) mencionaron que *T. ni* en estado larval es capaz de detectar y evitar toxinas *Bt* en hojas de algodón. Davis & Coleman (1997) encontraron que larvas de *O. nubilalis* que fueron expuestas a la toxina Cry1Ab tuvieron un comportamiento errante. Del mismo modo Goldstein *et al.* (2010) descubrieron que larvas neonatas de *O. nubilalis* fueron capaces de detectar toxinas Cry1Ab luego de estar expuestas por 24 h a plantas de maíz *Bt* y desencadenaron conductas que condujeron al abandono de la planta.

Durante la campaña agrícola 2016/17 se estimó un mayor índice de movimiento, lo que podría deberse a la utilización de desoves con mayor número de huevos, y en consecuencia mayor cantidad de larvas neonatas. Específicamente, la diferencia de tamaño de desoves fue de 56,1%. Esto indicaría una conducta de dispersión densodependiente en las larvas neonatas de *S. frugiperda*, aunque se necesitaría un experimento de diseño específico para confirmarlo. Un comportamiento similar fue encontrado en larvas de *Chilo partellus* Swinhoe (Lepidoptera: Pyralidae) en las que una mayor tasa de encuentro entre larvas pequeñas debido a una elevada densidad induce a las mismas a suspenderse por medio de hebras de seda y dispersarse arrastradas por el viento (Berger, 1992). Otros autores encontraron una relación lineal positiva entre la densidad de huevos en desoves de *O. nubilalis* y la distancia máxima de dispersión (Ross & Ostlie, 1990).

La progresiva disminución del reencuentro de larvas en la planta donde se realizó la liberación, puede estar influenciada por el movimiento y dispersión en busca de otras plantas y también por la mortalidad de las larvas. Pannuti *et al.* (2015) encontraron resultados similares al estudiar el movimiento de larvas de *S. frugiperda* en plantas de maíz no *Bt* en estado reproductivo. La mortalidad de los primeros estadios larvales en lepidópteros es comúnmente alta y puede alcanzar valores de hasta 95% para *S. frugiperda* (Varella *et al.*, 2015). Estos autores atribuyen, entre otros factores, al efecto de lluvias (por desalojo y ahogo), depredadores y dispersión. Otro factor que pudo influir en menor medida en la disminución del reencuentro es el canibalismo, en este sentido Andow *et al.* (2015) encontraron que el canibalismo está fuertemente ligado a la densidad ya que a mayor densidad incrementa la probabilidad de encuentro entre larvas. Sin embargo, este comportamiento es poco frecuente en los primeros estadios larvales, en relación a esto, Chapman *et al.*, (1999) encontraron que durante las primeras 48 h de vida el canibalismo alcanza sólo 6%.

En este estudio la dispersión fue diferente según los tratamientos evaluados. Inicialmente, se dispersaron más rápidamente en parcelas puras *Bt* y ReB inv respecto a parcelas puras no *Bt* y ReB. En *Bt* las larvas alcanzaron una dispersión máxima a los ocho días y luego la dispersión decreció por causa de la mortalidad. En ReB inv y no *Bt* el progreso de la dispersión se incrementó de forma lineal, sin embargo, en este último la dispersión fue menor comparada a ReB inv. En ReB, la dispersión fue menor y constante durante estos experimentos. La dispersión de larvas de lepidópteros puede ser resultado de la programación genética para reducir la competencia por los recursos y garantizar la supervivencia (Goldstein *et al.*, 2010; Razzi & Mason, 2012; Ramalho *et al.*, 2014). También puede ser un comportamiento adaptativo por el cual incrementa la probabilidad de supervivencia de larvas en condiciones limitantes de recursos (Eizaguirre *et al.*, 2004). Este comportamiento es relevante en especies de insectos que se originan a partir de masas de huevos de más individuos que los que la planta puede soportar (Berger, 1992).

Los resultados encontrados en cuanto al índice de dispersión revelan una elevada capacidad de dispersión de larvas de *S. frugiperda*. En efecto, en todos los tratamientos las larvas alcanzaron las clases máximas de dispersión. Este comportamiento podría otorgar una ventaja genética a los individuos que se dispersan frente a los que no lo hacen debido a que escapan a los factores de mortalidad denso-dependientes como el canibalismo (Davis & Onstad, 2000; Faretto *et al.*, 2017; Andow *et al.*, 2015). Por otro

lado, aquellas larvas que se dispersan están más expuestas al ataque de depredadores (Weisser, 2001). Resultados similares a los de esta tesis fueron hallados en estudios con maíz no *Bt* en estado reproductivo (Pannuti *et al.*, 2016). La dispersión inicial (2 días desde la liberación) fue mayor en los tratamientos *Bt* y ReB inv en los cuales las larvas fueron liberadas en plantas *Bt*. Esto confirma lo mencionado por Davis & Onstad (2000), Goldstein *et al.* (2010), Razze *et al.* (2011), Eizaguirre *et al.* (2004), y Zalucki *et al.* (2002) sobre el efecto de las toxinas *Bt* en el comportamiento de las larvas. Las larvas de *S. frugiperda* son más propensas a abandonar más rápidamente las plantas *Bt*, lo que sugiere que la dispersión inicial de larvas de *S. frugiperda* en plantas de maíz *Bt* y no *Bt* podría estar relacionada con la aceptación de la planta hospedadora. En este sentido Razze & Mason, (2012) y Davis & Onstad, (2000) encontraron que larvas neonatas de *O. nubilalis* se dispersaron más rápidamente en plantas *Bt* que en no *Bt*. Otros antecedentes sostienen que las larvas neonatas de *O. nubilalis* aceptan plantas de maíz no *Bt* y continúan alimentándose, causando un daño significativo en las hojas; mientras que las larvas que emergen en una planta *Bt* detectan la toxina a través de mordiscos de prueba, dejan de alimentarse y se dispersan para tratar de encontrar una hospedadora adecuada (Razze *et al.*, 2011).

En el tratamiento *Bt* el índice de dispersión de las larvas aumentó con el transcurso del tiempo hasta el día 8 posterior a la liberación, luego del mismo mostró una tendencia decreciente, posiblemente debido a una mayor mortalidad de las larvas que se dispersaron hacia las clases de dispersión superiores, ya que el índice de dispersión asigna valores según la posición de larvas reencontradas en la parcela. La dispersión *per se* contribuye al incremento de la mortalidad como resultado de una mayor exposición de las larvas a factores de mortalidad natural (Weisser, 2001), desecación (Onstad *et al.*, 2018) o imposibilidad de encontrar una fuente de alimento adecuada (Terry *et al.*, 1989). Por otro lado las probabilidades de muerte se incrementan en aquellas larvas que abandonan una planta *Bt* en busca de otra fuente de alimento y se encuentran con otra planta de iguales características (Davis & Onstad, 2000).

Los resultados obtenidos revelaron un índice de dispersión más bajo en el tratamiento ReB y constante durante el intervalo de tiempo estudiado. Esto podría indicar un incremento en la tolerancia de las larvas más grandes a las toxinas *Bt* presentes en las plantas de maíz *Bt*. Resultados similares se encontraron cuando se expuso al coleóptero *D. virgifera virgifera* a una mezcla de semillas de maíz *Bt* y no *Bt* (Head *et al.*, 2014).

Este comportamiento pone en desventaja al ReB frente al refugio estructurado ya que incrementa la probabilidad de supervivencia de los individuos heterocigotas, lo que se ve agravado si la dominancia de la resistencia es cercana pero no igual a cero (Mallet & Porter, 1992).

La supervivencia de las larvas, tanto a los 12 días desde la liberación como hasta alcanzar el estado de pupa, se vio fuertemente influenciada por los tratamientos. La supervivencia fue considerablemente mayor en los tratamientos no *Bt* y ReB inv respecto a *Bt* y ReB. Wangila *et al.* (2013) encontraron resultados similares a los 21 días de la liberación de larvas de *Diatraea saccharalis* Sin embargo, estos autores encontraron que la supervivencia en aquellas plantas no *Bt* del tratamiento ReB no difirió de la supervivencia en el tratamiento no *Bt*. En cambio, Head *et al.* (2014) encontraron que la producción de adultos susceptibles de *D. virgifera virgifera* fue menor en mezclas de semillas de maíz *Bt* y no *Bt* comparado a bloques puros de plantas no *Bt* en 6 de 10 experimentos realizados. Estas diferencias pueden deberse a características biológicas de las plagas. Por un lado, a partir del tercer estadio larval *D. saccharalis* establece su sitio de alimentación dentro del tallo de las plantas de maíz (Rodríguez del Bosque *et al.*, 1990). Mientras que *D. virgifera virgifera* lo hace en las raíces y puede dispersarse en estadios avanzados hacia plantas *Bt* vecinas, disminuyendo de esta manera la proporción de adultos susceptibles en una mezcla de semillas (Murphy *et al.*, 2010). Los resultados de los cocientes de chances de supervivencia del tratamiento no *Bt* respecto a ReB fueron menores que no *Bt* respecto al tratamiento *Bt*. Esto sugiere que la mezcla de semillas convencionales y *Bt* permitiría mayor supervivencia de larvas en aquellas plantas *Bt* de la mezcla, situación que podría acelerar la evolución de la resistencia de *S. frugiperda* (Malaquias *et al.*, 2017; Miraldo *et al.*, 2016; Ramalho *et al.*, 2014).

De esta forma el movimiento y dispersión de larvas en un refugio integrado tiene dos efectos. Primero, si las larvas susceptibles se dispersan de una planta no *Bt* tienen mayor probabilidad de morir por la toxina *Bt*, esto es debido a que la probabilidad de encontrar una planta *Bt* se incrementa con la probabilidad de dispersión. Un incremento en la probabilidad de dispersión aumenta la probabilidad de muerte a causa de la toxina *Bt* y por lo tanto incrementará la selección de resistencia; que por sí misma disminuirá la durabilidad de la toxina *Bt*. Segundo, la dispersión de larvas incrementa la dominancia de la resistencia al someter a las larvas a dosis subletales lo que también disminuye el tiempo hasta la falla de la toxina *Bt*. Estos dos efectos se combinan y aceleran la tasa de evolución

de resistencia debido al movimiento y dispersión de larvas en mezclas de semillas (Ives *et al.*, 2011).

Los resultados indicaron una mayor dispersión en plantas de maíz de estadios fenológicos más avanzados. También se encontró que la dispersión aumentó con el tiempo. La dispersión en larvas puede ocurrir de manera pasiva o activa. La primera es por efecto del viento, facilitado por un mecanismo de suspensión aérea por formación de hebras de seda (“ballooning”), por el cual las larvas se suspenden de las plantas gracias a hilos de seda que ellas mismas producen y son arrastradas por el viento (Goldstein *et al.*, 2010). Esto es común en los primeros estadios de *S. frugiperda*, luego a medida que la larva crece el peso de la misma imposibilita este tipo de dispersión y la misma se torna activa, con la cual la larva se dispersa caminando (Zalucki *et al.*, 2002). Recientemente Onstad *et al.* (2018) encontraron que la dispersión activa es mayor en aquellas condiciones en las que las plantas están más próximas entre sí como en estados fenológicos más avanzados donde la canopia de las plantas se superponen.

En este capítulo se ha investigado el empleo del refugio integrado en el manejo de la resistencia de *S. frugiperda* a toxinas *Bt* presentes en maíz *Bt*. En un escenario en el cual no exista movimiento y dispersión de larvas el refugio en mezcla de semillas *Bt* y no *Bt* puede ser utilizado como estrategia de manejo de la resistencia a cultivos *Bt* (Mallet & Porter, 1992). Los resultados hallados en el presente estudio, junto con otros antecedentes, Binning *et al.* (2014); Malaquias *et al.* (2017), indican que larvas de *S. frugiperda* son capaces de detectar las toxinas *Bt* presentes en el maíz *Bt* y alterar su comportamiento en cuanto a movimiento y dispersión dependiendo de la configuración de siembra. Esto tiene consecuencias para la evolución de resistencia, ya que, en primer lugar, la dispersión provoca mayor mortalidad de las larvas homocigotas susceptibles que alcanzan una planta *Bt*, incrementando la selección de resistencia. En segundo lugar, la dispersión aumenta la dominancia de la resistencia al incrementar la supervivencia de los individuos heterocigotas respecto a los homocigotas (Onstad *et al.*, 2018).

Capítulo 3 Evaluación de susceptibilidad de diferentes estadios de *S. frugiperda* a las toxinas Cry1A.105 y Cry2Ab2 expresadas en hojas de maíz *Bt*

3.1) Introducción

El movimiento de un insecto desde una planta *Bt* a una no *Bt* luego de una exposición subletal, o desde una planta no *Bt* a una *Bt* luego de desarrollar algún nivel de tolerancia debido al mayor tamaño de la larva, puede conducir a un mayor *fitness* relativo de los individuos resistentes heterocigotas (Mallet & Porter, 1992; Brévault *et al.*, 2015; Carrière *et al.*, 2016; Fatoretto *et al.*, 2017). Otro aspecto que cobra importancia con un enfoque de refugio integrado, además del movimiento y dispersión de las larvas, es la susceptibilidad diferencial de los distintos estadios larvales (Onstad *et al.*, 2018). El grado en que los insectos pueden metabolizar y degradar sustancias tóxicas o perjudiciales como insecticidas o toxinas *Bt* es de considerable importancia para su supervivencia. Esta capacidad difiere entre especies, con la etapa de desarrollo y con la naturaleza del ambiente. La variación en esta actividad es responsable, al menos en parte, de la toxicidad selectiva de los insecticidas y toxinas *Bt*, el desarrollo de resistencia y la selección de plantas hospederas (Terriere, 1984).

Los mecanismos de defensa de los insectos generalmente implican una mayor degradación metabólica o la modificación de los sitios de acción. Factores como la reducción de la penetración de las toxinas y las modificaciones del comportamiento complementan los efectos de estos mecanismos (Bouvier *et al.*, 2002). Una menor susceptibilidad de las larvas de estadios avanzados, ocasiona que aquellas larvas grandes que emigran de una planta no *Bt* a una *Bt* sean sometidas a dosis subletales, situación que aumenta el riesgo potencial de desarrollo de resistencia (Eizaguirre *et al.*, 2004; Erasmus *et al.*, 2016). Estudios previos han demostrado diferencias en la susceptibilidad entre estadios larvales de varias plagas a insecticidas (Yu, 1983; Hardke *et al.*, 2011) y a toxinas *Bt*. En este sentido, Li *et al.* (2007) encontraron que larvas de *T. ni* de primer y tercer estadio no lograron sobrevivir luego de la exposición a algodón *Bt*, en cambio, el 23,3% de larvas de quinto estadio lograron sobrevivir hasta el estado de pupa. Armstrong *et al.* (2011) descubrieron diferencias en la susceptibilidad de larvas de *S. frugiperda* de primer y tercer estadio a algodón *Bt* en estudios llevados a cabo en laboratorio con hojas de algodón *Bt* y dieta artificial con incorporación de hojas de algodón *Bt* liofilizadas. Por su

parte Ashfaq *et al.* (2001) hallaron una respuesta lineal positiva entre el porcentaje de mortalidad y el tiempo de exposición a hojas de algodón *Bt* de larvas de *Chrysodeixis includens* Walker (Lepidoptera: Noctuidae) de primer y tercer estadio, en cambio no encontraron diferencias en la mortalidad de larvas de quinto estadio alimentadas con algodón *Bt* y no *Bt*. En evaluaciones realizadas con plantas de maíz *Bt*, larvas de *O. nubilalis* de tercer estadio fueron más susceptibles que larvas de cuarto estadio (Walker *et al.*, 2000). De igual manera, Huang *et al.* (1999) encontraron una disminución de la mortalidad en estadios larvales más avanzados en evaluaciones de susceptibilidad de larvas de distintos estadios de *O. nubilalis* a diferentes dosis de una formulación comercial de *B. thuringiensis* incorporada a dieta artificial. Hornby & Gardner (1987) demostraron que la susceptibilidad de *H. zea*, *S. frugiperda* y *T. ni* a la β -exotoxina de *B. thuringiensis* está inversamente relacionada al estadio larval y es diferente entre especies. Estos autores encontraron que la concentración letal media (CL50) para el cuarto estadio de *S. frugiperda* es 17 y 309 veces superior a las del tercer y primer estadio, respectivamente. En evaluaciones llevadas a cabo con *S. frugiperda* se encontró que larvas heterocigotas de estadios avanzados fueron capaces de sobrevivir en maíz *Bt* (Miraldo *et al.*, 2016) y en algodón *Bt* (Horikoshi *et al.*, 2016) favoreciendo la evolución de resistencia.

La susceptibilidad de los diferentes estadios puede manifestarse no solo en cuanto a la mortalidad, sino también en otros aspectos como reducción de la tasa de crecimiento o tamaño (Trumper, 2014). Sorgatto *et al.* (2015) encontraron una disminución en el peso de pupas de *S. frugiperda* alimentadas con hojas de algodón *Bt* en comparación con aquellas que fueron alimentadas con algodón no *Bt*. Estos autores, también mencionaron efectos subletales, ya que detectaron mayor impacto en el peso de las pupas en aquellas larvas que se alimentaron todo el ciclo con algodón *Bt* respecto de aquellas que se alimentaron primero en algodón no *Bt* y luego de unos días fueron alimentadas con algodón *Bt* (Sorgatto *et al.*, 2015). En el mismo sentido, Bernardi *et al.* (2014) encontraron menor biomasa de larvas, mayor duración de la fase larval y ciclo de vida más largo en *S. frugiperda* expuesta a soja *Bt*. Resultados similares fueron observados por de Sousa Ramalho *et al.* (2011), en los cuales larvas de *S. frugiperda* alimentadas con algodón *Bt* presentaron menor biomasa que aquellas alimentadas con algodón no *Bt*.

En la evaluación de diferentes estrategias de manejo de la resistencia, se le ha dado escasa atención a la selección que se produce en diferentes etapas de la vida o a efectos del tamaño de los insectos en la magnitud de la selección. En general los estudios de susceptibilidad ignoran la importancia de la etapa del ciclo de vida o del tamaño de la plaga, ambos aspectos son importantes en el caso de lepidópteros (Daly *et al.*, 1988). Consecuentemente estudiar la influencia del estadio larval en la susceptibilidad a toxinas *Bt* como respuesta a la selección es fundamental para la implementación de estrategias de manejo de la resistencia (Bouvier *et al.*, 2002).

Por lo expuesto anteriormente, en este capítulo se plantea la siguiente hipótesis:

Hipótesis 3: La toxicidad de una sustancia se mide en términos de miligramos por unidad de peso de un organismo. Esto sugiere que existe una relación inversa entre la capacidad de la toxina para generar un efecto adverso, y el peso del organismo receptor (Yu, 1983; You *et al.*, 2013). Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* actúan adhiriéndose a receptores ubicados en las membranas celulares del intestino y paralizando el tracto digestivo (Aranda *et al.*, 1996), efecto que guarda estrecha relación con la concentración de la toxina. Por carácter transitivo y en virtud de lo expresado anteriormente, el efecto tóxico guarda una relación inversa con el peso de las larvas.

Predicción: Se espera que las larvas jóvenes de *S. frugiperda* sean más susceptibles a las toxinas expresadas en las hojas de maíz *Bt* que aquellas en estadios más avanzados de desarrollo.

3.1.1) Objetivo específico

Determinar la susceptibilidad relativa de los distintos estadios larvales de *S. frugiperda* a las toxinas expresadas en hojas de maíz *Bt*.

3.2) Materiales y métodos

3.2.1) Sitio experimental

Dos ensayos se llevaron a cabo, al igual que en los experimentos del capítulo anterior durante las campañas agrícolas 2015/16 y 2016/17 en la Estación Experimental Agropecuaria de INTA Reconquista (29°15' S; 59°44' W; 51 m.s.n.m.), Provincia de Santa Fe, Argentina.

3.2.2) Material vegetal

Se utilizaron dos híbridos comerciales de maíz recomendados para la región por su comportamiento agronómico, uno *Bt* (KWS® 3720 Genuity® VT Triple Pro®) y otro híbrido no *Bt* genéticamente cercano (KWS® 3800 Agrisure® TGPlus®). El híbrido Genuity® VT Triple Pro® contiene tres genes *Bt*, de los cuales Cry1A.105 y Cry2Ab2 tienen acción insecticida sobre lepidópteros y Cry3Bb1 acción insecticida sobre insectos coleópteros; además posee un evento que le confiere tolerancia al herbicida glifosato. El híbrido no *Bt* posee únicamente tolerancia al herbicida glifosato (cabe aclarar que al momento de la realización de los ensayos no se encontraba en el mercado la opción sin tolerancia al herbicida mencionado).

3.2.3) Población de *Spodoptera frugiperda*

Para la realización de los ensayos se utilizaron larvas provenientes de la colonia establecida en el laboratorio de Entomología de INTA EEA Reconquista (Ver capítulo 2 sección 2.2.2 Población de *S. frugiperda*). La susceptibilidad a las toxinas expresadas en hojas de maíz *Bt* fue evaluada en tres estadios larvales, para lo cual se emplearon larvas de primer, tercer y quinto estadio (con menos de 24 h en el estadio en cuestión) respectivamente (Ashfaq *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2007). Las larvas de tercer y quinto estadio utilizadas fueron alimentadas con hojas de maíz convencional hasta alcanzar el estadio correspondiente de ensayo, para reducir los posibles efectos que pueden tener la dieta o el agua en el comportamiento de las larvas (Binning *et al.*, 2014; Glendinning & Slansky, 1995).

3.2.4) Procedimiento

Las plantas de maíz *Bt* y no *Bt* fueron cultivadas en invernáculo, la siembra fue realizada en macetas de 10 litros (cuatro plantas por maceta), con tierra y sustrato vegetal en proporción 2:1 (Sorgatto *et al.*, 2015). Los bioensayos fueron iniciados con plantas en estado fenológico V4. Se extrajeron hojas totalmente desarrolladas y se lavaron con agua corriente para eliminar restos de suciedad de su superficie (Binning *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2006). Posteriormente se cortaron pequeños discos de aproximadamente 6 cm². Los discos de hoja de maíz *Bt* y no *Bt* se acondicionaron individualmente sobre papel de filtro en recipientes de plástico de 50 ml y se reemplazaron diariamente hasta que las larvas alcanzaron el estado de pupa. En cada recipiente se inoculó una larva del estado en estudio con ayuda de un pincel fino y suave. Finalmente, las larvas se acondicionaron en cámara

de cría (temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$, humedad relativa $60 \pm 10\%$ y fotofase de 14 h) (Barrionuevo *et al.*, 2012; Murúa *et al.*, 2003) hasta alcanzar el estado adulto. Se empleó un diseño experimental completamente aleatorizado con 10 repeticiones, cada repetición constó de 12 larvas.

3.2.5) Variables analizadas

El desarrollo de las larvas alimentadas con hojas de maíz *Bt* y no *Bt* fue examinado cada 24 h, se registró el tiempo entre estadios hasta alcanzar el estado de pupa. Las larvas fueron consideradas muertas si no respondieron cuando se las tocó con un pincel. Las pupas se colocaron y acondicionaron individualmente en cajas de Petri y fueron pesadas luego de 48 h con balanza de precisión (Ohaus Adventurer). A continuación, se describen las variables registradas y los análisis estadísticos correspondientes.

3.2.5.1) Eficacia de control de los distintos estadios larvales a los siete días

La mortalidad registrada a los siete días de los distintos estadios larvales estudiados fue corregida a partir del control (maíz no *Bt*) según Abbott (1925) a fin de asegurar que los valores de mortalidad obtenidos se deban exclusivamente al efecto letal las toxinas *Bt*, según la fórmula:

$$Eficacia (\%) = \left(1 - \frac{nT}{nC}\right) \times 100$$

Donde nT es el número de larvas vivas del estadio correspondiente en maíz *Bt* y nC es el número de larvas vivas del mismo estadio en el control (maíz no *Bt*).

De esta manera se obtuvo la eficacia de control de larvas de primer, tercer y quinto estadio luego de siete días de alimentación con hojas de maíz *Bt*. Esta variable se analizó mediante Modelos lineales mixtos para poder contemplar la heterogeneidad de varianzas (Pinheiro & Bates, 2000). El modelo evaluado para la eficacia ajustada según las observaciones realizadas en el maíz no *Bt*, fue el siguiente:

$$Eficacia (\%) = \mu + \alpha E + \beta e + \gamma Exe + \varepsilon$$

Donde μ es la media general, E representa al estadio evaluado (L1; L3; L5), e es el ensayo (1; 2) y ε es el error experimental.

3.2.5.2) Supervivencia de larvas de los distintos estadios alimentadas con hojas de maíz *Bt*

Se calculó en dos momentos, el primero a partir del número de individuos vivos a los siete días de la alimentación con hojas de maíz *Bt* y el segundo, a partir del número de larvas que alcanzaron el estado de pupa en cada uno de los estadios larvales evaluados. Esta variable se analizó con modelos lineales generalizados para datos binarios (larva viva/muerta) y función de enlace logit, bajo el siguiente modelo:

$$\text{Ln}\left(\frac{p_i}{(1-p_i)}\right) = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \varepsilon$$

Donde, X_1 corresponde al estadio evaluado (L1; L3; L5), X_2 es el ensayo (1; 2), X_3 la interacción estadio x ensayo y ε es el error experimental.

3.2.5.3) Cocientes de chances de supervivencia *Bt* – no *Bt* según estadios larvales

A partir del número de individuos vivos de cada uno de los estadios larvales luego de siete días de alimentación con hojas de maíz *Bt* y no *Bt*, se calcularon los cocientes de chances de supervivencia a los siete días de la exposición de distintos estadios larvales alimentados con maíz *Bt* y no *Bt*. La chance se define como el cociente entre la supervivencia y la mortalidad en un determinado escenario o bajo un tratamiento dado. El cociente de chance representa cuántas veces más probable es la supervivencia en un escenario o tratamiento respecto a otro (Agresti, 2002). Los cocientes de chance fueron estimados a partir del siguiente modelo lineal generalizado para datos binarios y función de enlace logit (Scheiner & Gurevitch, 2001):

$$CC_{(no\ Bt;Bt)} = \frac{\frac{p_{no\ Bt}}{(1-p_{no\ Bt})}}{\frac{p_{Bt}}{(1-p_{Bt})}}$$

Donde $p_{no\ Bt}$ y p_{Bt} representan la proporción de larvas sobrevivientes en los tratamientos no *Bt* y *Bt*, respectivamente para el estadio L1, mientras que $1-p_{no\ Bt}$ y $1-p_{Bt}$ son sus respectivos complementos. El mismo procedimiento se aplicó para contrastar los tratamientos no *Bt* con *Bt* en los estadios L3 y L5.

3.2.5.4) Peso de pupas a las 48 h

El peso de las pupas después de transcurridas 48 h desde su formación, se analizó mediante Modelos lineales mixtos para contemplar la heterogeneidad de varianzas (Pinheiro & Bates, 2000). El modelo ajustado fue:

$$Peso\ pupas_{(g)} = \mu + \alpha E + \beta T + \gamma ExT + \delta e + \varepsilon$$

Donde μ es la media general, E representa al estadio (L1; L3; L5), T corresponde al tratamiento (*Bt*; no *Bt*) y e corresponde al ensayo (1; 2) y ε es el error experimental.

Todos los análisis estadísticos fueron llevados a cabo con el software Infostat versión 2017 (Di Rienzo *et al.*, 2017). Las comparaciones de medias fueron mediante test LSD de Fisher con nivel de significancia de 5%. Como estrategia general para el análisis de los datos primero se ajustaron modelos con distintas estructuras de heteroscedasticidad. Mediante criterios de verosimilitud penalizada (AIC y BIC) se eligió el modelo que mejor describió los datos y se utilizó ese modelo para realizar inferencias acerca de las medias.

3.3) Resultados

3.3.1) Eficacia de control de los distintos estadios larvales a los 7 días

De acuerdo a los criterios de AIC y BIC el modelo que mejor se ajustó a los datos fue el que contempla heterogeneidad de varianzas, expresada como una función exponencial de los valores predichos. Los criterios de evaluación de bondad de ajuste de los modelos estadísticos evaluados se presentan en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1: Criterios de bondad de ajuste de los Modelos lineales mixtos evaluados para el análisis de eficacia de Abbott a los 7 días

<i>N</i> ^o	<i>Modelo</i>	<i>AIC</i>	<i>BIC</i>
1	Datos independientes y varianzas homogéneas	456,60	470,40
2	Datos independientes y varianzas heterogéneas (VarIdent(Estadio))	449,12	466,85
3	Datos independientes y varianzas heterogéneas (VarPower(Fitted))	449,06	464,83
4	Datos independientes y varianzas heterogéneas (VarExp(Fitted))	447,60	463,36

Menor valor de AIC y de BIC implica mejor ajuste

Las toxinas Cry1A.105 y Cry2Ab2 expresadas simultáneamente en las hojas de maíz *Bt* híbrido KWS® 3720 Genuity® VT Triple Pro®, ocasionaron diferentes niveles de mortalidad entre estadios larvales. Se encontraron efectos significativos de los factores

estadio larval y ensayo, en cambio no fue significativo el efecto de la interacción entre los efectos de estadio y de ensayo (Tabla 3.2).

Tabla 3.2: Análisis de la varianza, prueba de hipótesis marginales del modelo lineal mixto del índice de Abbott de eficacia de control de larvas de *S. frugiperda* de distintos estadios alimentadas con maíz *Bt*

<i>Fuente de variación</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>F</i>	<i>P-valor</i>
<i>Intercepto</i>	1	1220,778	<0,0001
<i>Estadio</i>	1	7,700	0,0076
<i>Ensayo</i>	2	94,338	<0,0001
<i>Estadio x ensayo</i>	2	0,022	0,9779

Luego, aun con diferencias significativas entre ensayos, las diferencias en eficacia de control a los 7 días, entre los estadios larvales L1, L3 y L5, se mantuvieron de un ensayo a otro. La eficacia del maíz *Bt* fue significativamente superior en larvas de estadio L1, seguida de L3 y menor en L5 (Fig. 3.1). Por otra parte, la eficacia general del maíz *Bt* fue significativamente mayor en el ensayo 1.

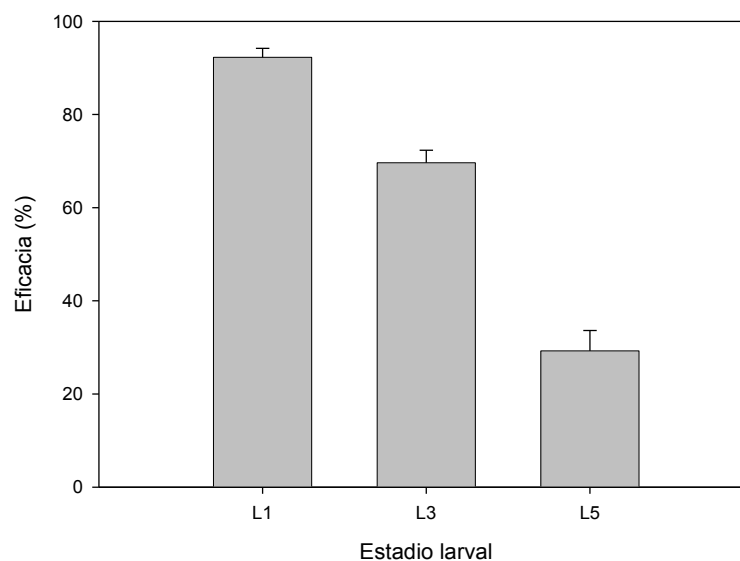


Figura 3.1: Índice de Abbott de eficacia de control de larvas de *S. frugiperda* de distintos estadios, alimentadas con maíz *Bt*. Se representa la media \pm error estándar.

3.3.2) Supervivencia de larvas de los distintos estadios alimentadas con hojas de maíz *Bt*

La supervivencia de larvas de *S. frugiperda* alimentadas con maíz *Bt* estuvo relacionada al tamaño de las mismas. Para los dos momentos de estimación (7 días desde

la exposición y al estado de pupa), se hallaron efectos estadísticamente significativos del estadio y diferencia en supervivencia entre ensayos. La interacción entre factores no fue significativa, es decir la diferencia en supervivencia de los distintos estadios larvales se repitió entre ensayos (Tablas 3.3 y 3.4).

Tabla 3.3: Análisis de la varianza, pruebas de hipótesis marginales (Wald) del modelo lineal generalizado de la supervivencia de larvas de *S. frugiperda* alimentadas con hojas de maíz *Bt* a los siete días de la exposición

<i>Fuente de variación</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>F</i>	<i>P-valor</i>
<i>Estadio</i>	2	55,188	0,0013
<i>Ensayo</i>	1	10,392	<0,0001
<i>Estadio x ensayo</i>	2	1,993	0,1371

Tabla 3.4: Análisis de la varianza, pruebas de hipótesis marginales (Wald) del modelo lineal generalizado de la supervivencia de larvas de *S. frugiperda* alimentadas con hojas de maíz *Bt* determinada al estado de pupa

<i>Fuente de variación</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>F</i>	<i>P-valor</i>
<i>Estadio</i>	2	58,342	<0,0001
<i>Ensayo</i>	1	6,497	0,0110
<i>Estadio x ensayo</i>	2	1,040	0,3541

Las larvas L5 presentaron mayor supervivencia, seguidas de larvas L3 y finalmente larvas L1 (Fig. 3.2). No se detectaron diferencias entre los dos momentos de estimación ($p > 0,05$). Sólo 3,4% de larvas de estadio L1 alimentadas durante todo el período larval con hojas de maíz *Bt* alcanzaron el estado de pupa, mientras que este valor asciende a 29,1% en el caso de larvas L3 y a 66,1% para aquellas larvas de estadio L5 (Fig. 3.2).

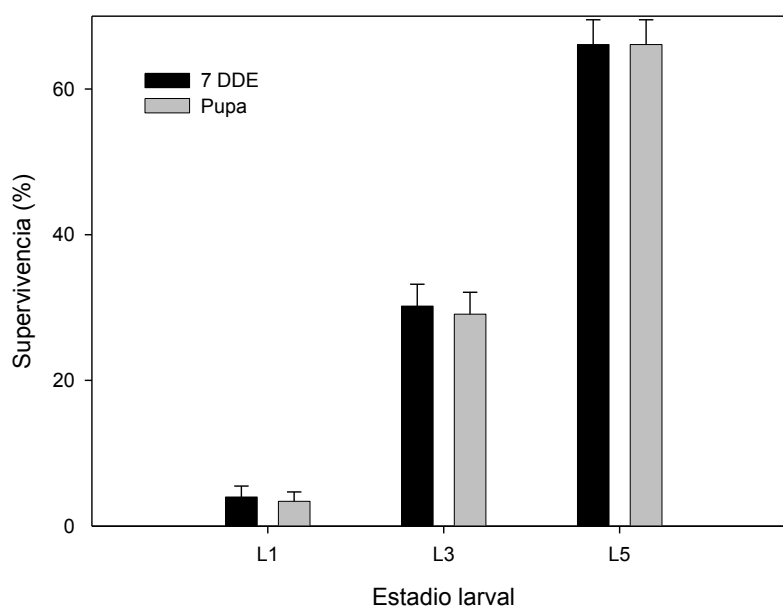


Figura 3.2: Porcentaje de supervivencia (media \pm error estándar) de larvas de *S. frugiperda* alimentadas con Maíz *Bt* según del estadio larval.

3.3.3) Cocientes de chances de supervivencia *Bt* – no *Bt* según estadios larvales

Las chances de supervivencia de larvas de *S. frugiperda* alimentadas con maíz *Bt* y no *Bt* difieren entre estadios. Se encontraron efectos estadísticamente significativos de tecnología y estadio. A su vez la interacción entre factores fue significativa (Tabla 3.5).

Tabla 3.5: Análisis de la varianza, pruebas de hipótesis marginales (Wald) del modelo lineal generalizado la supervivencia de larvas de *S. frugiperda* alimentadas con hojas de maíz *Bt* y no *Bt* a los siete días de la exposición

Fuente de variación	Grados de libertad	F	P-valor
Estadio	2	83,732	<0,0001
Tratamiento	1	277,202	<0,0001
Estadio x tratamiento	2	6,388	0,0017

En general, las chances de supervivencia de larvas alimentadas con hojas de maíz no *Bt* son 35,8 veces mayores que aquellas que se alimentaron con hojas de maíz *Bt*. La relación entre los cocientes de chance no *Bt* – *Bt* se mantiene entre los estadios L3 y L1 ($p=0,91$) (ver Tabla 3.6), en cambio difiere entre L5 y L1 ($p=0,0017$), lo que significa que la relación entre las chances de supervivencia de larvas alimentadas con hojas de maíz no *Bt* vs las alimentadas con maíz *Bt* se reducen significativamente en larvas de estadio L5 respecto a L1. En otras palabras, las larvas de *S. frugiperda* de cualquier estadio que se alimentan en hojas de maíz no *Bt* tienen más chances de sobrevivir que aquellas que se

alimentan en hojas de maíz *Bt*, pero esta ventaja se reduce significativamente para larvas de estadio L5 comparadas a larvas L1. (Tabla 3.6).

Tabla 3.6: Cociente de chances (CC) de supervivencia de larvas de *S. frugiperda* de distintos estadios alimentadas con maíz *Bt* y no *Bt* a los 7 días de exposición

<i>Estadio</i>	<i>CC no Bt vs. Bt</i>	<i>P-valor (CC no Bt vs. Bt)</i>	<i>P-valor (Variación del CC no Bt – Bt de L3 vs. L1 y L5 vs. L1)</i>
<i>L1</i>	42,09	<0,0001	—
<i>L3</i>	34,46	<0,0001	0,9135
<i>L5</i>	8,08	<0,0001	0,0017

3.3.4) Peso de pupas a las 48 h

De acuerdo a los criterios de AIC y BIC el modelo explorado que mejor se ajustó a los datos fue el que contempla heterogeneidad de varianza diferencial para cada estadio larval. Los criterios de bondad de ajuste de los modelos estadísticos ensayados se presentan en la Tabla 3.7.

Tabla 3.7: Criterios de bondad de ajuste de los Modelos lineales mixtos explorados para el análisis del peso de pupas

<i>Nº</i>	<i>Modelo</i>	<i>AIC</i>	<i>BIC</i>
1	Datos independientes y varianzas homogéneas	-3096,39	-3059,67
2	Datos independientes y varianzas heterogéneas (VarIdent(Estadio))	-3165,47	-3119,57
3	Datos independientes y varianzas heterogéneas (VarPower(Fitted))	-3116,71	-3075,39
4	Datos independientes y varianzas heterogéneas (VarExp(Fitted))	-3115,65	-3074,34

Menor valor de AIC y de BIC implica mejor ajuste

Se encontraron efectos significativos para los factores Estadio, tratamiento y ensayo. No fue significativa la interacción Estadio x tratamiento (Tabla 3.8).

Tabla 3.8: Análisis de la varianza, pruebas de hipótesis marginales del modelo lineal mixto del peso de pupas provenientes de larvas de *S. frugiperda* de distintos estadios alimentadas con maíz *Bt* y no *Bt*

Fuente de variación	Grados de libertad	F	P-valor
Intercepto	1	11071,052	<0,0001
Estadio	2	15,347	<0,0001
Tratamiento	1	138,293	<0,0001
Ensayo	1	10,807	0,0011
Tratamiento x estadio	2	0,849	0,4284

El peso de pupas fue mayor en larvas alimentadas con maíz no *Bt*. Por otro lado, larvas alimentadas con hojas de maíz *Bt* a partir de estadio L3 presentaron mayor peso de pupas que aquellas que fueron alimentadas con maíz *Bt* a partir de estadio L1 y L5, éstas últimas no se diferenciaron entre sí. (Fig. 3.3). El peso de pupas fue mayor en el ensayo 1.

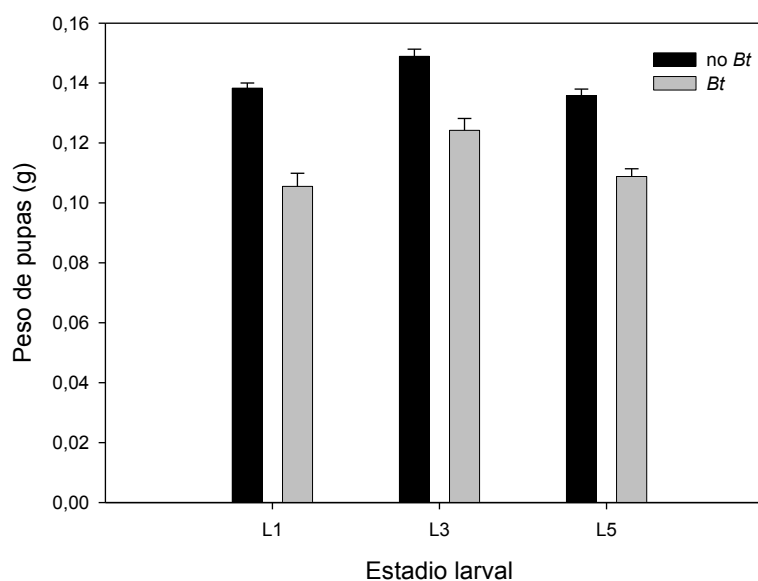


Figura 3.3: Peso de pupas en gramos (media \pm error estándar) provenientes de larvas de *S. frugiperda* alimentadas con maíz *Bt* y no *Bt* en tres estadios larvales (L1, L3, L5).

3.4) Discusión

Los resultados obtenidos demuestran que las toxinas Cry1A.105 y Cry2Ab2 expresadas en hojas de maíz *Bt* VT Triple Pro® son altamente efectivas para el control de larvas neonatas de *S. frugiperda*. La chance de supervivencia de larvas de distintos estadios de *S. frugiperda* es 36 veces mayor cuando son alimentadas con hojas de maíz no *Bt* comparada con la chance de supervivencia cuando son alimentadas con hojas de

maíz *Bt*. Los valores de eficacia de control de *S. frugiperda* estimados a partir este estudio son similares a los publicados para las mismas toxinas de maíz *Bt* en evaluaciones a campo realizadas en Estados Unidos (Siebert *et al.*, 2012; Rule *et al.*, 2014). Del mismo modo, en Brasil, Sorgatto *et al.* (2015) encontraron valores similares de eficacia de las toxinas Cry1Ac y Cry2Ab2 expresadas en hojas de Algodón *Bt* Bollgard II® para el control de *S. frugiperda*. Aunque las similitudes en eficacia deben ser interpretadas con precaución porque una misma toxina se expresa con diferente concentración en distintos cultivos, y además para distintas toxinas, la susceptibilidad inherente de la plaga blanco difiere. Por otro lado, el momento en que se evalúa la eficacia en relación al nivel de evolución de resistencia, puede ser diferente. Asimismo, diferentes poblaciones de *S. frugiperda* muestran variaciones en cuanto a la susceptibilidad a distintas cepas de *B. thuringiensis* y también a las preparaciones puras de diversas toxinas Cry (Monnerat *et al.*, 2006).

Por otra parte, los resultados alcanzados muestran diferencias en cuanto a la susceptibilidad relativa de los distintos estadios larvales de *S. frugiperda* a las toxinas Cry1A.105 y Cry2Ab2 expresadas en hojas de maíz *Bt*. La susceptibilidad de larvas de estadio L1 es mayor y disminuye a medida que la larva se desarrolla, crece y adquiere mayor tamaño. Este fenómeno podría estar relacionado con el tamaño de las larvas, ya que los estadios más avanzados tienen mayor volumen y pueden tolerar físicamente más toxinas (Huang *et al.*, 1999). Los resultados coinciden con lo hallado para *T. ni* en algodón *Bt* por Li *et al.* (2007). Sin embargo, estos autores reportan una mayor eficacia en el control de los distintos estadios larvales de *T. ni* que los obtenidos en el presente estudio. En este sentido Armstrong *et al.* (2011), en estudios realizados con *S. frugiperda* reportaron mayor mortalidad de larvas L1 comparadas con L3 en evaluaciones llevadas a cabo en laboratorio con hojas de algodón *Bt* Bollgard II® y Widestrike®, con valores absolutos de mortalidad para cada estadio similares a los obtenidos en esta tesis.

La chance de supervivencia de larvas alimentadas con maíz no *Bt* fue mayor en relación a las alimentadas con maíz *Bt*, aunque esta ventaja se redujo hacia estadios larvales avanzados. Larvas de quinto estadio tienen poco tiempo para alimentarse antes de alcanzar el estado de pupa y pueden incluso disminuir la ingesta, de esta manera no alcanzan a ingerir una dosis letal, por lo tanto la mortalidad de estos estadios avanzados se reduce (Sorgatto *et al.*, 2015). En este sentido, Ashfaq *et al.* (2001) encontraron una

mayor mortalidad en los primeros estadios larvales de *C. includens* expuestas a hojas de algodón *Bt*. Larvas de primer y tercer estadio tuvieron mayor mortalidad que larvas de estadio L5. Estos autores también encontraron una baja tasa de mortalidad en larvas de *C. includens* de quinto estadio expuestas a hojas de algodón *Bt*. De manera similar Walker *et al.*, (2000) en investigaciones con *O. nubilalis* demostraron que larvas de estadio L4 mostraron significativamente mayor supervivencia que larvas L3 en distintos maíces *Bt* que expresan la toxina Cry1Ab. En relación a la misma plaga Huang *et al.* (1999) demostraron que larvas de *O. nubilalis* de estadio L1 fueron mucho más sensibles que larvas de estadios más avanzados a un formulado comercial de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* incorporado a la dieta artificial. A dosis bajas de este formulado, los autores no encontraron diferencias en la mortalidad de estadios L3, L4 y L5, en cambio, a dosis altas la mortalidad de larvas L3 y L4 fue mucho mayor comparada con larvas L5. Hornby & Gardner (1987), en estudios realizados en laboratorio con β -exotoxina de *B. thuringiensis* incorporada a dieta artificial, determinaron a través de curvas dosis-respuesta que se necesita una dosis 309 y 17 veces mayor para provocar la muerte del 50% de los individuos de cuarto estadio que la dosis que se requiere para matar las larvas de primer y tercer estadio, respectivamente. A su vez estos autores encontraron diferencias de susceptibilidad entre especies, siendo *T. ni* > *S. frugiperda* > *H. zea*.

Probablemente la disminución de la susceptibilidad a las toxinas en los estadios larvales más avanzados se debe a una mayor capacidad de metabolizar estas toxinas en los insectos. En este sentido, Yu (1983) mencionó la importancia de enzimas oxidasas, transferasas y esterases en el metabolismo de los insecticidas en insectos. De igual manera You *et al.* (2013) mencionaron que, a nivel metabólico, la tolerancia a insecticidas y xenobióticos involucra la detoxificación por acción de enzimas así como la reducción de la sensibilidad del sitio de acción.

En el presente trabajo no se han encontrado diferencias entre la supervivencia de los distintos estadios registrada a los 7 días y la supervivencia registrada al alcanzar el estado de pupa. Binning *et al.* (2014) reportaron que el porcentaje de larvas de *S. frugiperda* que sobrevivió pudo sobreponerse a la exposición a toxinas Cry1F en maíz y completar el ciclo. Entre las causas de esto, mencionaron la posible capacidad de detoxificación de las larvas de *S. frugiperda*, una respuesta genética heterogénea y variaciones naturales en la población.

El peso de las pupas de *S. frugiperda* fue afectado negativamente por las toxinas Cry1A.105 y Cry2Ab2 expresadas en las hojas de maíz *Bt*. Resultados similares fueron publicados por de Sousa Ramalho *et al.* (2011) y Sorgatto *et al.* (2015), quienes encontraron menor peso de pupas cuyas larvas fueron alimentadas con hojas de algodón *Bt* Bollgard® y Bollgard II®, respectivamente. Del mismo modo Bernardi *et al.* (2014) registraron menor peso de pupas de *S. frugiperda* cuando las larvas fueron alimentadas con hojas de soja *Bt* Intacta®. La detoxificación de las toxinas *Bt* incrementa la tasa metabólica del insecto y esto puede determinar un menor crecimiento debido a que se destina una mayor proporción de energía para detoxificación o reemplazo de células del intestino (Dingha *et al.*, 2004).

En este trabajo, además se han encontrado diferencias en el peso de pupas entre larvas de distintos estadios alimentadas con maíz *Bt*. En este sentido, larvas de estadio L3 que alcanzaron el estado de pupa registraron mayor peso de las mismas, seguidas de larvas de estadio L1 y L5. Este fenómeno puede estar asociado a los resultados obtenidos en el capítulo 2 y a otros antecedentes (Binning *et al.*, 2014), en relación a la capacidad de *S. frugiperda* de detectar y rechazar toxinas *Bt*, sumado a que larvas de estadio L5 tiene poco tiempo para alimentarse e ingerir una dosis letal de toxina *Bt*, incluso pueden disminuir la alimentación y acelerar su desarrollo hasta pupar (Sorgatto *et al.*, 2015). Por otro lado, aquellas pocas larvas L1 que sobrevivieron se vieron más afectadas que larvas L3. De igual forma Ashfaq *et al.* (2001) reportaron diferencias en el peso de pupas de larvas de distintos estadios alimentadas con algodón *Bt* Bollgard®. Estos autores, al igual que en este trabajo, reportaron mayor peso de pupas generadas a partir de larvas de tercer estadio alimentadas con algodón *Bt*, seguido de larvas L5 y finalmente las larvas de primer estadio que sobrevivieron fueron las más afectadas.

En este capítulo se ha estudiado la susceptibilidad diferencial de los distintos estadios larvales de *S. frugiperda* a las toxinas Cry1A.105 y Cry2Ab2 expresadas por el maíz *Bt* VT Triple Pro®. Este aspecto cobra importancia en el manejo de la resistencia en un contexto de refugio integrado, escenario en el que el movimiento y dispersión de las larvas entre plantas *Bt* y no *Bt* puede generar condiciones de exposición diferencial a las toxinas *Bt*. En un enfoque de refugio integrado, el movimiento y dispersión de larvas desde una planta no *Bt* a una *Bt*, sumado a la disminución de la susceptibilidad de estadios

larvales avanzados registrada en el presente capítulo permitiría la supervivencia de larvas favoreciendo así la evolución de la resistencia.

Capítulo 4 Discusión y Conclusiones generales

4.1) Discusión general

En esta tesis se estudiaron los aspectos del comportamiento de larvas de *S. frugiperda* relacionados al movimiento intra-planta y dispersión inter-planta en distintos tratamientos, donde *Bt* y no *Bt* representaron las dos situaciones en un lote de maíz *Bt* con refugio estructurado, el tratamiento ReB fue diseñado para simular un refugio integrado o mezcla de semillas (una planta *Bt* rodeada de 44 plantas no *Bt*, es una de las posibles configuraciones de una mezcla 95:5). El tratamiento ReB inv es el escenario menos probable en un refugio integrado. Se demostró que esta especie tiene capacidad para detectar las toxinas *Bt* antes de que la cantidad ingerida cause efectos letales y esto provocó un mayor estímulo de movimiento en busca de un sitio de alimentación apropiado. Aquellas larvas que fueron liberadas en plantas de maíz *Bt* exhibieron un índice de movimiento intra-planta significativamente mayor que aquellas liberadas en plantas no *Bt*. En ambos casos el movimiento aumentó a lo largo del intervalo de tiempo evaluado. Del mismo modo, se comprobó que la dispersión es un comportamiento propio y natural de la especie, ya que en todos los tratamientos las larvas fueron capaces de alcanzar las máximas categorías de dispersión evaluadas (hasta 4 plantas y 2 hileras desde el punto de liberación). Evaluaciones previas realizadas en maíz por Pannuti *et al.* (2016) en estado reproductivo indican que las larvas de *S. frugiperda* tienen la capacidad de dispersarse tanto hacia plantas vecinas en el mismo surco como también entre surcos de siembra. En el mismo estudio hallaron el 91,4% de las larvas en un radio de 1,1 m desde el punto de liberación con una distancia máxima alcanzada de 1,4 m (Pannuti *et al.*, 2016). Un patrón similar se encontró para *S. frugiperda* en algodón, donde las larvas se dispersaron en promedio de 1,6 a 2,4 plantas desde el sitio de liberación y ninguna larva se dispersó más de 5 plantas (Ali *et al.*, 1990). Sin embargo, en la presente tesis este comportamiento se vio exacerbado cuando las larvas fueron expuestas originalmente en plantas *Bt*. La dispersión inter-planta de larvas de *S. frugiperda* fue significativamente más rápida en los tratamientos *Bt* y ReB inv que en no *Bt* y ReB. Luego, el progreso de la misma fue diferente en cada tratamiento. Los resultados encontrados son consistentes con la hipótesis propuesta de que “las larvas de *S. frugiperda* poseen la capacidad de detectar la presencia de toxinas *Bt* en el alimento antes de que la cantidad consumida cause efectos letales, y esto causa como primer estímulo el rechazo de la fuente de

alimento. Este comportamiento provoca que las larvas incrementen su movilidad”, ya que se verificó la predicción “el movimiento intra-planta y la dispersión de larvas de *S. frugiperda* en busca de otra fuente de alimento será mayor en plantas de maíz *Bt* que en las plantas de maíz no *Bt*”.

La dispersión inter-planta de larvas de *S. frugiperda* fue mayor en plantas de maíz de estados fenológicos más avanzados independientemente de la densidad de siembra. En este sentido se encontró que la dispersión fue significativamente mayor en estado fenológico V8 comparado con V2 (Ritchie & Hanway, 1982), y la misma se incrementó en el tiempo hasta el sexto día desde la liberación, a partir del cual fue constante. La dispersión efectiva fue facilitada por el mayor contacto y superposición entre hojas de las plantas de mayor tamaño, verificando una de las predicciones de la hipótesis planteada. Sin embargo, el aumento de la densidad de siembra no tuvo efecto en la dispersión. Así, la hipótesis que postula que el éxito en la dispersión de las larvas de *S. frugiperda* está directamente relacionado con la tasa de encuentro entre éstas y las plantas receptoras, encuentra en esta tesis un respaldo parcial.

Otro aspecto de la biología de larvas de *S. frugiperda* que se estudió fue la susceptibilidad de distintos estadios larvales (L1, L3 y L5) a las toxinas Cry1A.105 y Cry2Ab2 expresadas en las hojas de maíz *Bt*. Se comprobó que estas toxinas son efectivas para el control de larvas neonatas de *S. frugiperda*, resultados similares fueron encontrados por Storer *et al.* (2012) y Reay-Jones *et al.* (2016). El índice de Abbott de eficacia de control fue de 93% para larvas neonatas. De igual manera se comprobó que la susceptibilidad disminuyó hacia estadios larvales más avanzados. Las larvas de estadio L5 fueron menos susceptibles, seguidas de larvas de estadio L3 y finalmente larvas L1 fueron significativamente más sensibles. Los resultados mencionados respaldan la hipótesis 3: “el efecto tóxico guarda una relación inversa con el peso de las larvas” ya que su predicción se cumplió: “las larvas jóvenes de *S. frugiperda* fueron más susceptibles a las toxinas expresadas en las hojas de maíz *Bt* que aquellas en estadios más avanzados de desarrollo”.

En cuanto a la potencialidad de los patrones de refugio estructurado y refugio integrado para proveer individuos susceptibles, si el problema se enfoca únicamente en términos de individuos adultos generados por planta no *Bt*, ambos patrones son compatibles entre sí, ya que se registró supervivencia de larvas hasta el estado de pupa en

ambas configuraciones. Esto significa que, a igual proporción de plantas no *Bt*, y en un contexto de ausencia de movimiento y dispersión entre plantas, el refugio en mezcla de semillas podría considerarse como opción frente al refugio estructurado, debido a que ambas configuraciones reducen la presión de selección sin alterar la dominancia de la resistencia (Mallet & Porter, 1992). Sin embargo, el potencial de movimiento y dispersión de las larvas de *S. frugiperda* sumado al incremento de estos comportamientos registrados en plantas *Bt*, podrían exponer a las larvas a condiciones subletales. Estas afirmaciones, en conjunto con la diferente susceptibilidad de los distintos estadios larvales que se demostraron en esta tesis, sugieren que el refugio integrado no sería la configuración más adecuada para el manejo de la resistencia de *S. frugiperda* en maíz *Bt*, en concordancia con Malaquias *et al.* (2017) y Yang *et al.* (2017).

Sobre la base del modelo desarrollado por Onstad & Gould (1998) y validado por Davis & Onstad (2000), Onstad (2006), Onstad *et al.* (2011) y Kang *et al.* (2012), y adaptándolo a las características de dispersión en distintas configuraciones de refugio y supervivencia de larvas de *S. frugiperda* alimentadas con hojas de maíz *Bt* (Cry1A.105 + Cry2Ab2), datos generados en esta tesis, la probabilidad de supervivencia de cada genotipo ss (homocigota susceptible) y rs (heterocigota) en un refugio integrado se estimó mediante las siguientes ecuaciones (Onstad *et al.*, 2011):

$$P_{(g,no\ Bt)} = (1 - T) \times (1 - Z) \times S_{no\ Bt} + (1 - T) \times Z \times (1 - T) \times S_{no\ Bt} + T \times V \times (1 - T) \times pdts \times S_{no\ Bt} \quad (1)$$

Donde T representa la proporción de plantas *Bt* de la mezcla; Z es la probabilidad de una larva de dispersarse de una planta no *Bt*; $S_{no\ Bt}$ representa la supervivencia en plantas no *Bt*; V es probabilidad de una larva de dispersarse de una planta *Bt* de la mezcla y *pdts* es la tasa de supervivencia de las larvas que prueban el tejido *Bt* y luego se dispersan (Kang *et al.*, 2012). Este término se propuso para tratar situaciones en las que las larvas neonatas se dispersan luego de probar el tejido *Bt* sin alimentarse completamente (Onstad & Gould, 1998). En otras palabras, algunas larvas pueden probar el tejido de la planta antes de dispersarse, la tasa de supervivencia debida a esta prueba depende del genotipo y la expresión de los alelos (Onstad, 2006). Por lo tanto, difiere entre homocigotas y heterocigotas (Onstad *et al.*, 2018). No se encontraron valores de este parámetro para *S. frugiperda* en la bibliografía. Para *O. nubilalis*, por ejemplo, Onstad & Gould (1998), Onstad (2006) y Onstad *et al.* (2011) ante el desconocimiento

de este parámetro, propusieron valores arbitrarios de *p_{dts}* de 0,5 para homocigotas susceptibles y de 1 para homocigotas resistentes. Para el caso de heterocigotas, Onstad (2006) evaluó la sensibilidad del modelo con un rango de valores de 0,5 a 1 y no encontró diferencias significativas. Por ello en los modelos subsiguientes adoptó el valor de 1. A los efectos de evaluar el comportamiento del modelo ante los parámetros conocidos a través de esta tesis y no realizar especulaciones sobre parámetros desconocidos, se utilizarán valores de *p_{dts}* de 0,5 para homocigotas susceptibles y de 1 para heterocigotas adoptando las conclusiones de los expertos arriba citados.

$$P_{(g,Bt)} = T \times (1 - V) \times S_{Bt} + T \times V \times T \times S_{Bt} + (1 - T) \times Z \times T \times S_{Bt} \quad (2)$$

Donde T representa la proporción de plantas *Bt* de la mezcla; V es probabilidad de una larva de dispersarse de una planta *Bt*; *S_{Bt}* representa la supervivencia en plantas *Bt* y Z es la probabilidad de una larva de dispersarse de una planta no *Bt* de la mezcla.

La Ecuación 1 representa la probabilidad de supervivencia de una larva de genotipo g (ss, rs) en plantas no *Bt* de un refugio integrado. Por su parte la Ecuación 2 representa la probabilidad de supervivencia de larvas de genotipo g, en plantas *Bt*. En ambas ecuaciones, el primer término representa la probabilidad de que las larvas permanezcan en la planta que nacen, el segundo término representa la probabilidad de que larvas se dispersen y encuentren otra planta del mismo tipo y el tercer término indica la probabilidad de que las larvas se dispersen y cambien el tipo de planta. Para la simplificación de los cálculos de probabilidades se asumió que la oviposición es aleatoria (Mallet & Porter, 1992), supuesto que se toma por defecto en la gran mayoría de los modelos que se han propuesto para analizar los procesos de evolución de resistencia a cultivos *Bt* (Onstad, 2014). Los valores asignados a los demás parámetros se detallan en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1: Parámetros utilizados para el cálculo de probabilidades de supervivencia de larvas de *S. frugiperda*.

Valores	Descripción de los parámetros
0,95	T: Proporción de semillas <i>Bt</i> en la mezcla.
0,621	Z: Probabilidad de una larva de dispersarse de una planta no <i>Bt</i> de la mezcla ^a .
0,971	V: Probabilidad de una larva de dispersarse de una planta <i>Bt</i> de la mezcla ^a .
0,51	S _{no <i>Bt</i>} : Supervivencia en plantas no <i>Bt</i> ^b .
0,001	S _{ss <i>Bt</i>} : Supervivencia de larvas homocigotas susceptibles en planta <i>Bt</i> ^{c,e}
0,01	S _{rs <i>Bt</i>} : Supervivencia de larvas heterocigotas en planta <i>Bt</i> , resistencia recesiva ^d
0,5	S _{rs <i>Bt</i>} : Supervivencia de larvas heterocigotas en planta <i>Bt</i> , resistencia incompletamente dominante ^d
1	S _{rs <i>Bt</i>} : Supervivencia de larvas heterocigotas en planta <i>Bt</i> , Resistencia dominante ^d
0,5	<i>p</i> _{ds} : Tasa de supervivencia debido a la prueba pre-dispersión de larvas homocigotas susceptibles ^{c,d,e}
1	<i>p</i> _{ds} : Tasa de supervivencia debido a la prueba pre-dispersión de larvas heterocigotas ^{c,d,e}

^a Determinado sobre la base de los datos obtenidos en el capítulo 2; ^b Determinado sobre la base de los datos obtenidos en el capítulo 3; ^c (Onstad & Gould, 1998); ^d (Onstad, 2006); ^e (Onstad *et al.*, 2011)

De acuerdo a las ecuaciones anteriores y los parámetros detallados en la Tabla 4.1, la probabilidad estimada de supervivencia de larvas homocigotas susceptibles en un refugio integrado es de 0,0231, mientras que la probabilidad de supervivencia de individuos heterocigotas es de 0,0432. De este modo, en un refugio integrado la ventaja de *fitness* de larvas heterocigotas frente a las homocigotas susceptibles, dado por el cociente de chances de supervivencia entre larvas rs y ss es de: 0,0432/0,0231= 1,87. En otras palabras, es casi dos veces más probable la supervivencia de larvas heterocigotas respecto de las homocigotas susceptibles. En un refugio estructurado, en cambio, la probabilidad de supervivencia es la misma para ambos genotipos ya que en un refugio estructurado no existen fuerzas de selección (Mallet & Porter, 1992; Brévault *et al.*, 2015) y no se han encontrado costos metabólicos asociados a la resistencia (Acharya *et al.*, 2017; Jakka *et al.*, 2014; Niu *et al.*, 2018; Vélez *et al.*, 2014).

Los resultados obtenidos demuestran que la táctica de refugio integrado puede acelerar la evolución de resistencia comparado a un refugio estructurado al incrementar la dominancia de la resistencia por dos razones. La primera es la reducción de la

supervivencia de los individuos susceptibles y, por lo tanto, la reducción en el tamaño efectivo del refugio (Brévault *et al.*, 2015). La segunda razón es el incremento de la dominancia de la resistencia al incrementar la supervivencia de las larvas heterocigotas en relación a las larvas homocigotas susceptibles (Mallet & Porter, 1992). Mientras en un refugio estructurado la supervivencia no difiere entre genotipos (Acharya *et al.*, 2017; Vélez *et al.*, 2014), los resultados de esta tesis sugieren que en un refugio integrado la chance de supervivencia de larvas heterocigotas es aproximadamente dos veces mayor que la chance de larvas homocigotas susceptibles, mientras que en un refugio estructurado no existen diferencias en supervivencia. Yang *et al.* (2017) encontraron resultados similares en cuanto a la supervivencia de *S. frugiperda* en espigas de maíz en refugio integrado comparado a refugio estructurado, aproximadamente tres veces más probable la supervivencia de heterocigotas respecto a los homocigotas susceptibles, concluyendo en ese caso, que la evolución de la resistencia en un refugio integrado, debido a la exposición de las larvas a dosis subletales es de 2,25 y 3,6 veces mayor que en un refugio estructurado para proporciones de refugio de 5:95% y 20:80%, respectivamente comparada con un refugio estructurado.

La dominancia de la resistencia a insecticidas o toxinas *Bt* puede ser definida como una medida del *fitness* del fenotipo heterocigota respecto al de los fenotipos homocigotas resistente y susceptible. En otras palabras representa la ventaja conferida por el alelo de resistencia (Bourguet *et al.*, 2000). Su rango varía de cero a uno, en el primer caso, la resistencia es completamente recesiva y en el segundo completamente dominante (Bourguet *et al.*, 2000; Tabashnik *et al.*, 2004; Trumper, 2014). La dominancia afecta fuertemente la evolución de la resistencia. En efecto, si la frecuencia de un alelo de resistencia es muy baja, su genotipo homocigota resistente será muy raro, entonces en las primeras etapas de la evolución de la resistencia cualquier incremento de la supervivencia de los individuos heterocigotas la acelerará (Mallet & Porter, 1992). La dominancia de la resistencia a insecticidas y toxinas *Bt* no es una propiedad genética constante, depende de la concentración de la toxina (Trumper, 2014) y del tiempo de exposición a la misma (Mallet & Porter, 1992). Además, la selección de resistencia a insecticidas o toxinas *Bt* generalmente es acompañada por un incremento en los niveles de dominancia (Bourguet *et al.*, 2000). Por esta razón se espera que en un escenario en el cual la evolución de la resistencia sea mayor debido, por ejemplo, a la baja implementación de refugios estructurados, la dominancia también lo sea. Esto significa que los individuos

heterocigotas se asemejarán en su fenotipo a los homocigotas resistentes (Trumper, 2014).

En este sentido, a modo de exploración de las implicancias de los resultados obtenidos en esta tesis, se analizó la variación de la ventaja de *fitness* de larvas heterocigotas frente a las homocigotas susceptibles en dos escenarios de evolución de resistencia, uno intermedio donde la supervivencia de los individuos heterocigotas en maíz *Bt* es intermedia ($S_{rs\ Bt}=0,5$) y otro avanzado ($S_{rs\ Bt}=1$). Asimismo, se consideraron dos proporciones de refugio 5% y 10% (Tabla 4.1), ya que son las dos opciones que se han aprobado hasta el presente en la Argentina. Se calcularon los cocientes de chances de supervivencia y los resultados se muestran en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2: Variación de la ventaja de *fitness* de larvas heterocigotas respecto a homocigotas susceptibles en tres escenarios de evolución de resistencia

<i>Proporción de plantas Bt:no Bt</i>	<i>Escenario (evolución de resistencia)</i>	<i>Ventaja de fitness rs/ss</i>
95:5	Inicial ($S_{rs\ Bt}=0,01$)	1,87
	Intermedio ($S_{rs\ Bt}=0,5$)	21,62
	avanzado ($S_{rs\ Bt}=1$)	41,78
90:10	Inicial ($S_{rs\ Bt}=0,01$)	1,65
	Intermedio ($S_{rs\ Bt}=0,5$)	10,98
	avanzado ($S_{rs\ Bt}=1$)	20,49

En la Tabla 4.2 y en la Figura 4.1 puede observarse la sensibilidad de la ventaja de *fitness* de los individuos heterocigotas respecto de los homocigotas susceptibles en función del nivel de dominancia de la resistencia expresado como supervivencia en plantas *Bt* en un escenario de refugio integrado con 5% y 20% de refugio. Para el caso de refugio estructurado no existen diferencias significativas en la supervivencia de ambos genotipos (Brévault *et al.*, 2015), asumido en base a antecedentes que indican que la resistencia de *S. frugiperda* no involucra reducción de *fitness* (Acharya *et al.*, 2017; Vélez *et al.*, 2014; Jakka *et al.*, 2014; Niu *et al.*, 2018). Los resultados de las simulaciones realizadas demuestran una ventaja de *fitness* menor de los individuos heterocigotas en el caso de refugio integrado de 10% de plantas no *Bt* respecto a 5%. Esto sugiere que el incremento de la proporción de refugio permite la supervivencia de un mayor número de individuos homocigotas susceptibles y de esta forma la evolución de la resistencia sería menor respecto a un refugio de 5%. Resultados similares fueron encontrados por (Onstad *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2017).

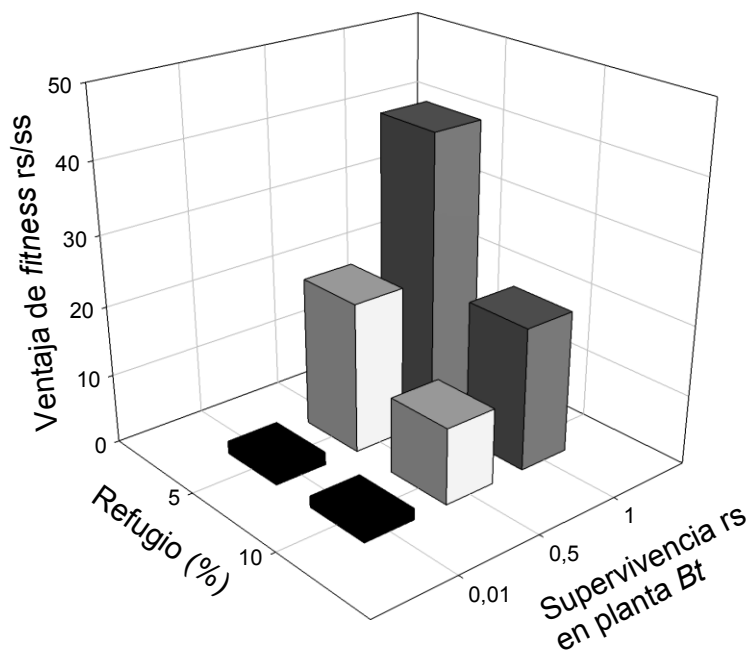


Figura 4.1: Ventaja de *fitness* de individuos heterocigotas respecto de homocigotas susceptibles en un refugio integrado con 5 y 10% de plantas no *Bt*, en función de la supervivencia de los heterocigotas (baja: 0,01, media: 0,5 alta: 1).

Como se mencionó en el capítulo 1, y en concordancia con otros autores (Bourguet *et al.*, 2000; Tabashnik *et al.*, 2004; Trumper, 2014), la premisa del manejo de la resistencia de insectos basada en la estrategia “Alta dosis/Refugio” se apoya en los principios de reducción de la dominancia y heredabilidad. Los resultados obtenidos en esta tesis confirman que la dispersión de larvas en un refugio integrado expone a los insectos a condiciones de dosis subletales de toxina. En esta situación los individuos heterocigotas tienen una ventaja de *fitness* respecto de los homocigotas (Bourguet *et al.*, 2000; Brévault *et al.*, 2015; Mallet & Porter, 1992). En especies de plagas blanco donde las larvas tienen gran capacidad de dispersión, como *S. frugiperda*, y los insectos pasan sólo una parte de su ciclo en plantas *Bt*, se incrementa la dominancia de la resistencia y esto tiene efectos muy negativos en la evolución de resistencia. De esta forma, la utilización de refugio integrado para reducir la presión de selección podría, paradójicamente, incrementar la tasa de evolución de resistencia de la plaga. (Mallet & Porter, 1992).

4.2) Significancia de esta investigación

La importancia de esta tesis radica en que reúne información acerca de varios aspectos que no habían sido abordados en conjunto. En general los antecedentes acerca de la potencialidad de los refugios integrados indican que se lo ha estudiado a partir de modelos matemáticos o con información perteneciente a otras plagas clave de maíz. Este trabajo es la primera contribución al estudio del movimiento y dispersión de larvas de *S. frugiperda* a campo para evaluar la potencialidad del refugio integrado en el manejo de la resistencia de esta plaga en maíz *Bt*. Si bien la sola confirmación de este comportamiento de movilidad en las larvas de *S. frugiperda* permite señalar la validez de la proposición de que en este caso la táctica de refugio integrado contribuiría a demorar la evolución de resistencia en menor medida que el refugio estructurado, las estimaciones realizadas posteriormente acerca de la ventaja de *fitness* de individuos heterocigotas en estas condiciones lo confirman. Esta tesis aporta información que permite estimar el impacto del refugio integrado en la ventaja de *fitness* de los individuos heterocigotas.

4.3) Nuevos interrogantes

Uno de los interrogantes que surgen a partir de los resultados obtenidos en esta tesis es el nivel de susceptibilidad de distintas poblaciones de *S. frugiperda* a las toxinas Cry1A.105 y Cry1Ab2 expresadas en maíz *Bt*. Los niveles de supervivencia de larvas alimentadas con maíz *Bt* que se obtuvieron en este trabajo son mayores a los esperados. Diversos autores señalan la existencia de resistencia cruzada entre toxinas Cry (Carrière *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2014, 2016; Santos-Amaya *et al.*, 2015). En Argentina se ha detectado resistencia de *S. frugiperda* a la toxina Cry1F (Chandrasena *et al.*, 2018). Las toxinas Cry1F y Cry1A.105 son similares en su estructura genética (Niu *et al.*, 2013). La resistencia cruzada a Cry1A.105 causada por la resistencia a Cry1F probablemente acelere la evolución de la resistencia a la pirámide Cry1A.105 + Cry2Ab2 (Carrière *et al.*, 2016; Santos-Amaya *et al.*, 2015). Por lo tanto, una línea de investigación plausible para complementar este estudio sería la caracterización de los niveles de resistencia de distintas poblaciones y/o biotipos de *S. frugiperda* a las toxinas Cry1A.105 y Cry2Ab2.

Las investigaciones realizadas en esta tesis se llevaron adelante con un evento de maíz piramidado con expresión simultánea de las toxinas *Bt* Cry1A.105 y Cry2Ab2. Actualmente en el mercado existen eventos piramidados con expresión simultánea de toxinas Cry1Ab, Cry1F, Cry1A.105, Cry2Ab2 y Vip3Aa20. Diversos autores señalan la

importancia de considerar las estrategias de manejo de la resistencia y específicamente la configuración de refugio caso por caso (Carrière *et al.*, 2016; Onstad *et al.*, 2011, 2018). En este sentido, sería de interés estudiar en estos eventos los aspectos del comportamiento de *S. frugiperda* relacionados con el movimiento y dispersión para determinar si los mismos están relacionados o son independientes de las toxinas *Bt* expresadas por las hojas de maíz.

Bibliografía

- Abbott, W.S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, v.18, n.1, p.265-267.
- Acharya, B., Head, G. P., Price, P. A., & Huang, F. (2017). Fitness costs and inheritance of Cry2Ab2 resistance in *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). *Journal of Invertebrate Pathology*, 149, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.06.014>.
- Agi, A. L., Mahaffey, J. S., Bradley Jr., J. R., & Van Duyn, J. W. (2001). Efficacy of seed mixes of transgenic *Bt* and nontransgenic cotton against bollworm, *Helicoverpa zea* Boddie. *The Journal of Cotton Science*, 5, 74–80.
- Agresti, A. (2002). *Categorical data analysis*. New Jersey: John Wiley & sons, inc.
- Ali, A., Luttrell, R. G., & Pitre, H. N. (1990). Feeding Sites and Distribution of Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) Larvae on Cotton. *Environmental Entomology*, 19(4), 1060–1067.
- Ali, A., Luttrell, R. G., & Schneider, J. C. (1990). Effects of Temperature and Larval Diet on Development of the Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 83(4), 725–733.
- Almada, M. S., Szwarc, D. S., & Vitti, D. E. (2015). Daño de *Spodoptera frugiperda* S. y *Helicoverpa zea* B. en distintos eventos de maíz transgénico (Bt) en el Norte de Santa Fe. In XV Jornadas Fitosanitarias Argentinas.
- Andow, B. D. A. (2008). The Risk of Resistance Evolution in Insects to Transgenic Insecticidal Crops. *ICGEB Collection of Biosafety Reviews*, 4, 142–199.
- Andow, D. A., Farias, J. R., Horikoshi, R. J., Bernardi, D., Nascimento, A. R. B., & Omoto, C. (2015). Dynamics of cannibalism in equal-aged cohorts of *Spodoptera frugiperda*. *Ecological Entomology*, 40(3), 229–236. <https://doi.org/10.1111/een.12178>.
- Andow, D. A., & Zwahlen, C. (2006). Assessing environmental risks of transgenic plants. *Ecology Letters*, 9(2), 196–214. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2005.00846.x>.

Andrade, F. H., Cirilo, A. G., Uhart, S. A. & Otegui, M. E. 1996. Ecofisiología del cultivo de maíz. La Barrosa Ed. Dekalb Press. CERBAS. FCA-UNMP. Buenos Aires, Argentina. 292 p.

Aragón, J. R. (2004). Maíz *Bt* resistente al barrenador del tallo Adopción de Área de Refugio. IDIA XXI, 6, 166–171.

Aranda, E., Sanchez, J., Peferoen, M., Güereca, L., & Bravo, A. (1996). Interactions of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with the midgut epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Journal of Invertebrate Pathology, 68(3), 203–212. <https://doi.org/10.1006/jipa.1996.0087>.

Argenbio. Consejo Argentino para la Información y el desarrollo de la Biotecnología. <http://www.argenbio.org/> Fecha de acceso 28/08/2018.

Armstrong, J. S., Adamczyk, J. J., & Greenberg, S. M. (2011). Efficacy of single and dual gene cotton *Gossypium hirsutum* events on neonate and third instar Fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* development based on tissue and meridic diet assays. Florida Entomologist, 94(2), 262–271. <https://doi.org/10.1653/024.094.0220>.

Ashfaq, M., Young, S. Y., & Mcnew, R. W. (2001). Larval Mortality and Development of *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) Reared on a Transgenic *Bacillus thuringiensis*-Cotton Cultivar Expressing CryIAc Insecticidal Protein. Journal of Economic Entomology, 94(5), 1053–1058.

Ayala, O. R., Navarro, F., & Virla, E. (2013). Evaluation of the attack rates and level of damages by the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), affecting corn-crops in the northeast of Argentina. Rev. FCA UNCUYO, 45(2), 1–12.

Barfield, C. S., Mitchell, E. R., & Poe, S. L. B. (1978). A Temperature-Dependent Model for Fall Armyworm Development. Annals of the Entomological Society of America, 72, 70–74.

Barrionuevo, M. J., Murúa, M. G., Goane, L., Meagher, R. L., & Navarro, F. (2012). Life Table Studies of *Rachiplusia nu* (Guenée) and *Chrysodeixis* (= *Pseudoplusia*) *includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) on Artificial Diet. Florida Entomologist, 95(4), 944–951.

- Bates, S. L., Zhao, J.-Z., Roush, R. T., & Shelton, A. M. (2005). Insect resistance management in GM crops: past, present and future. *Nature Biotechnology*, 23(1), 57–62. <https://doi.org/10.1038/nbt1056>.
- Beadle, G. W. (1980). The Ancestry of Corn. *Scientific American*, 242(1), 112–119.
- Begon, M., C. R Townsend. M. Costa and J. L. Harper. (1995). *Ecología: Individuos, poblaciones y comunidades*. Ed. Omega. Barcelona. 886p.
- Bell, W. (1990). Searching Behavior Patterns in insects. *Annual Review of Entomology*, 35, 447–467. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.35.010190.002311>.
- Berger, A. (1992). Larval movements of *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae) within and between plants: Timing, density responses and survival. *Bulletin of Entomological Research*, 82(4), 441–448. <https://doi.org/10.1017/S0007485300042498>.
- Bernardi, O., Malvestiti, G. S., Dourado, P. M., Oliveira, W. S., Martinelli, S., Berger, G. U., Head, G., & Omoto, C. (2012). Assessment of the high-dose concept and level of control provided by MON 87701 × MON 89788 soybean against *Anticarsia gemmatalis* and *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Pest Management Science*, 68(7), 1083–91. <https://doi.org/10.1002/ps.3271>.
- Bernardi, O., Sorgatto, R. J., Barbosa, A. D., Domingues, F. a., Dourado, P. M., Carvalho, R. a., Martinelli, S., Head, G., & Omoto, C. (2014). Low susceptibility of *Spodoptera cosmioides*, *Spodoptera eridania* and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to genetically-modified soybean expressing Cry1Ac protein. *Crop Protection*, 58, 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.01.001>.
- Bessin, R. (2015). *Bt-Corn for corn borer control*. Cooperative Extension Service University of Kentucky College of Agriculture, Lexington, KY.
- Bilal, M. F., Saleem, M. F., Wahid, M. A., Shakeel, A., & Maqbool, M. (2012). Adoption of *Bt* cotton: threats and challenges. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 72(3), 419–428.
- Binning, R. R., Coats, J., Kong, X., & Hellmich, R. L. (2014). Susceptibility and Aversion of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to Cry1F *Bt* Maize and

Considerations for Insect Resistance Management. *Journal of Economic Entomology*, 107(1), 368–374. <https://doi.org/10.1603/EC13352>.

Bolsa de Cereales de Buenos Aires. <http://www.bolsadecereales.com/> Fecha de acceso 09/08/2018.

Bourguet, D., Genissel, A., & Raymond, M. (2000). Insecticide Resistance and Dominance Levels. *Journal of Economic Entomology*, 93(6), 1588–1595. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-93.6.1588>.

Bourguet, D., Desquilbet, M., & Lemarié, S. (2005). Regulating insect resistance management: the case of non- *Bt* corn refuges in the US. *Journal of Environmental Management*, 76, 210–220. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2005.01.019>.

Bouvier, J. C., Boivin, T., Beslay, D., & Sauphanor, B. (2002). Age-dependent response to insecticides and enzymatic variation in susceptible and resistant codling moth larvae. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 51, 55–66. <https://doi.org/10.1002/arch.10052>.

Brach, A. M., & Gallard, A. E. (2014). Efecto de la densidad de siembra en el rendimiento de maíz bajo riego. *Voces y Ecos INTA Reconquista*, 32, 16–18.

Brévault, T., Tabashnik, B. E., & Carrière, Y. (2015). A seed mixture increases dominance of resistance to *Bt* cotton in *Helicoverpa zea*. *Nature Scientific Reports*, 5, 9807. <https://doi.org/10.1038/srep09807>.

Buntin, G. D. (1986). A Review of Plant Response to Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), Injury in Selected Field and Forage Crops. *The Florida Entomologist*, 69(3), 549–559.

Buntin, G. D. (2008). Corn Expressing Cry1Ab or Cry1F Endotoxin for Fall Armyworm and Corn Earworm (*Lepidoptera*: Noctuidae) Management in Field Corn for Grain Production. *The Florida Entomologist*, 91(4), 523–530.

Buntin, G. D., Dewey Lee, R., Wilson, D., & McPherson, R. (2000). Evaluation of Yieldgard Transgenic Resistance for control of Fall Armyworm and Corn Earworm (*Lepidoptera*: Noctuidae) on Corn. *Florida Entomologist*, 84(1), 37–42.

- Burtet, L., Bernardi, O., Melo, A., Pes, M., Strahl, T., & Guedes, J. (2017). Managing fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), with *Bt* maize and insecticides in south Brazil. *Pest Management Science*, 73(12), 2569–2577.
- Cabrera, J. C. (2001). Interactions between *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Bt*- transgenic sweet corn. North Carolina University.
- Campagne, P., Kruger, M., Pasquet, R., Le Ru, B., & Van den Berg, J. (2013). Dominant inheritance of field-evolved resistance to *Bt* corn in *Busseola fusca*. *PLoS ONE*, 8(7), e69675. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069675>.
- Capinera, J. L. (2014). Fall Armyworm , *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). Publication EENY098 University of Florida. Institute of Food and Agricultural Sciences, 1–6.
- Carrière, Y., Crickmore, N., & Tabashnik, B. E. (2015). Optimizing pyramided transgenic *Bt* crops for sustainable pest management. *Nature Biotechnology*, 33(2), 161–168. <https://doi.org/10.1038/nbt.3099>.
- Carrière, Y., Fabrick, J. A., & Tabashnik, B. E. (2016). Can Pyramids and Seed Mixtures Delay Resistance to *Bt* Crops? *Trends in Biotechnology*, 34(4), 291–302. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.12.011>.
- Carroll, M. W., Head, G., & Caprio, M. (2012). When and where a seed mix refuge makes sense for managing insect resistance to *Bt* plants. *Crop Protection*, 38, 74–79. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.02.015>.
- Carroll, M. W., Head, G., Caprio, M., & Stork, L. (2013). Theoretical and empirical assessment of a seed mix refuge in corn for southwestern corn borer. *Crop Protection*, 49, 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.02.003>.
- Carvalho, R., Omoto, C., Field, L., Williamson, M., & Bass, C. (2013). Investigating the Molecular Mechanisms of Organophosphate and Pyrethroid Resistance in the Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda*. *PLoS ONE*, 8(4), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062268>.
- Casmuz, A., Juárez, M., Socías, M., Murúa, M., Prieto, S., Medina, S., ... Gastaminza, G. (2010). Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera*

frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae). Revista de La Sociedad Entomológica Argentina, 69(3–4), 209–231.

Castro, B. A., Leonard, B. R., & Riley, T. J. (2004). Management of feeding damage and survival of southwestern corn borer and sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae) with *Bacillus thuringiensis* transgenic field corn. Journal of Economic Entomology, 97(6), 2106–2116. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-97.6.2106>.

Chandrasena, D. I., Signorini, A. M., Abratti, G., Storer, N. P., Olaciregui, M. L., Alves, A. P., & Pilcher, C. D. (2018). Characterization of field-evolved resistance to *Bacillus thuringiensis*-derived Cry1F δ -endotoxin in *Spodoptera frugiperda* populations from Argentina. Pest Management Science, 74(3), 746–754. <https://doi.org/10.1002/ps.4776>.

Chaplin-Kramer, R., & Kremen, C. (2012). Pest control experiments show benefits of complexity at landscape and local scales. Ecological Applications, 22(7), 1936–1948. <https://doi.org/10.1890/11-1844.1>.

Chapman, J. W., Williams, T., Caballero, P., Cave, R. D., & Goulson, D. (1994). Fitness consequences of cannibalism in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. Behavioral Ecology, 10(3), 298–303.

Chapman, J., Williams, T., Escribano, A., Caballero, P., Cave, R., & Goulson, D. (1999). Age-related cannibalism and horizontal transmission of a nuclear polyhedrosis virus in larval *Spodoptera frugiperda*. Ecological Entomology, 24(3), 268–275.

Chapman, J. W., Williams, T., Martínez, A. M., Cisneros, J., Caballero, P., Cave, R. D., & Goulson, D. (2000). Does cannibalism in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) reduce the risk of predation? Behavioral Ecology and Sociobiology, 48(4), 321–327. <https://doi.org/10.1007/s002650000237>.

Chiang, H. C. (1978). Pest management in corn. Annual Review of Entomology, 23(9841), 101–123. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.23.010178.000533>.

Clark, P. L., Molina-Ochoa, J., Martinelli, S., Skoda, S. R., Isenhour, D. J., Lee, D. J., ... Foster, J. E. (2007). Population variation of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, in the Western Hemisphere. Journal of Insect Science, 7(5), 1–10. <https://doi.org/10.1673/031.007.0501>.

- Cohen, R. W., Waldbauer, G. P., Friedman, S., & Schiff, N. M. (1987). Nutrient self-selection by *Heliothis zea* larvae : A time-lapse film study. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 44, 65–73.
- Cruz, I., & Turpin, F. T. (1983). Yield impact of larval infestations of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) to Midwhorl growth stage of corn. *Journal of Economic Entomology*, 76(5), 1052–1054. <https://doi.org/10.1093/jee/76.5.1052>.
- Daly, J. C., Fisk, J. H., & Forrester, N. W. (1988). Selective Mortality in Field Trials Between Strains of *Heliothis armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) Resistant and Susceptible to Pyrethroids: Functional Dominance of Resistance and Age Class. *Journal of Economic Entomology*, 81(4), 1000–1007. <https://doi.org/10.1093/jee/81.4.1000>.
- Davis, P. M., & Coleman, S. B. (1997). European Corn Borer (Lepidoptera: Pyralidae) Feeding Behavior and Survival on Transgenic Corn Containing CryIA(b) Protein from *Bacillus thuringiensis*. *Journal of the Kansas Entomological Society*, 70(1), 31–38.
- Davis, P. M., & Onstad, D. W. (2000). Seed Mixtures as a Resistance Management Strategy for European Corn Borers (Lepidoptera: Crambidae) Infesting Transgenic Corn Expressing Cry1Ab Protein. *Journal of Economic Entomology*, 93(3), 937–948.
- de Sousa Ramalho, F., Azeredo, T. L., de Nascimento, A. R. B., Fernandes, F. S., Nascimento Júnior, J. L., Malaquias, J. B., Domingues da Silva, C. A., & Zanuncio, J. C. (2011). Feeding of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, on *Bt* transgenic cotton and its isoline. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 139(3), 207–214. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2011.01121.x>.
- Dhurua, S., & Gujar, G. T. (2011). Field-evolved resistance to Bt toxin Cry1Ac in the pink bollworm, *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera: Gelechiidae), from India. *Pest Management Science*, 67(8), 898–903. <https://doi.org/10.1002/ps.2127>.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat (2017). Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar> .
- Diez-Rodriguez, G., & Omoto, C. (2001). Herança da Resistência de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) a Lambda-Cialotrina. *Neotropical Entomology*, 30(2), 311–316.

Dingha, B. N., Moar, W. J., & Appel, A. G. (2004). Effects of *Bacillus thuringiensis* Cry1C toxin on the metabolic rate of Cry1C resistant and susceptible *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Physiological Entomology*, 29(5), 409–418. <https://doi.org/10.1111/j.0307-6962.2004.00409.x>.

Eigenbrode, S. D., & Espelie, K. E. (1995). Effects of Plant Epicuticular Lipids on Insect Herbivores. *Annual Review of Entomology*, 40(1), 171–194. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.40.010195.001131>.

Eizaguirre, M., López, C., & Albajes, R. (2004). Dispersal capacity in the Mediterranean corn borer, *Sesamia nonagrioides*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 113(1), 25–34. <https://doi.org/10.1111/j.0013-8703.2004.00201.x>.

Erasmus, A., Marais, J., & Van den Berg, J. (2016). Movement and survival of *Busseola fusca* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae within maize plantings with different ratios of non-*Bt* and *Bt* seed. *Pest Management Science*, 72(12), 2287–2294. <https://doi.org/10.1002/ps.4273>.

Evans, D. C., & Stansly, P. A. (1990). Weekly Economic Injury Levels for Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) Infestation of Corn in Lowland Ecuador. *Journal of Economic Entomology*, 83(6), 2452–2454.

FAOSTAT. Production. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Fecha de acceso 02/07/2018.

Farias, P. R. S., Barbosa, J. C., Busoli, A. C., Overall, W. L., Miranda, V. S., & Ribeiro, S. M. (2008). Spatial analysis of the distribution of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) and losses in maize crop productivity using geostatistics. *Neotropical Entomology*, 37(3), 321–327. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2008000300012>.

Faretto, J. C., Michel, A. P., Silva Filho, M. C., & Silva, N. (2017). Adaptive Potential of Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) Limits *Bt* Trait Durability in Brazil. *Journal of Integrated Pest Management*, 8(1), 7281–7291. <https://doi.org/10.1093/jipm/pmx011>.

Ferré, J., Van Rie, J., & MacIntosh, S. (2008). Insecticidal Genetically Modified Crops and Insect Resistance Management (IRM). In J. Romeis, A. Shelton, & G. Kennedy

(Eds.), Integration of insect-resistant genetically modified crops within IPM Programs. (pp. 41–85). Springer.

Garcia, A. G., Ferreira, C. P., Cônsoli, F. L., & Godoy, W. A. C. (2016). Predicting evolution of insect resistance to transgenic crops in within-field refuge configurations, based on larval movement. *Ecological Complexity*, 28, 94–103. <https://doi.org/10.1016/j.ecocom.2016.07.006>.

Gassmann, A. J., Petzold-Maxwell, J. L., Keweshan, R. S., & Dunbar, M. W. (2011). Field-evolved resistance to *Bt* maize by Western corn rootworm. *PLoS ONE*, 6(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022629>.

George, Z., & Crickmore, N. (2012). *Bacillus thuringiensis* Applications in Agriculture. In E. Sansinenea (Ed.), *Bacillus thuringiensis* Biotechnology (pp. 19–40). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-3021-2>.

Ghimire, M. N., Huang, F., Leonard, R., Head, G. P., & Yang, Y. (2011). Susceptibility of Cry1Ab-susceptible and -resistant sugarcane borer to transgenic corn plants containing single or pyramided *Bacillus thuringiensis* genes. *Crop Protection*, 30(1), 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.09.008>.

Giaveno, C. D., Paravano, A. S., Cella, M., & Curis, M. C. (2010). Efecto de diferentes maíces *Bt* en la biología de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista FAVE Ciencias Agrarias*, 9(1–2), 45–54.

Giorgi, R., Tosolini, R., Sapino, V., Leon, C. y Chiavassa, A. (2009). Capacidad productiva de los suelos de la provincia de Santa Fe. INTA - CR Santa fe, EEA Rafaela.

Glaser, J. A., & Matten, S. R. (2003). Sustainability of insect resistance management strategies for transgenic *Bt* corn. *Biotechnology Advances*, 22(1–2), 45–69. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2003.08.016>.

Glendinning, J. I., & Slansky, F. (1995). Consumption of a toxic food by caterpillars increases with dietary exposure: support for a role of induced detoxification enzymes. *Journal of Comparative Physiology A*, 176(3), 337–345. <https://doi.org/10.1007/BF00219059>.

Goergen, G., Kumar, P. L., Sankung, S. B., Togola, A., & Tamò, M. (2016). First report of outbreaks of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) (Lepidoptera, Noctuidae), a new alien invasive pest in West and Central Africa. PLoS ONE, 11(10), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165632>.

Goldstein, J. A., Mason, C. E., & Pesek, J. (2010). Dispersal and Movement Behavior of Neonate European Corn Borer (Lepidoptera: Crambidae) on Non-*Bt* and Transgenic *Bt* Corn. Journal of Economic Entomology, 103(2), 331–339. <https://doi.org/10.1603/EC09304>.

Gould, F. (1994). Potential and Problems with High-dose Strategies for Pesticidal Engineered Crops. Biocontrol Science and Technology, 4(4), 451–461. <https://doi.org/10.1080/09583159409355357>.

Gould, F. (1998). Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. Annual Review of Entomology, 43, 701–726. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.43.1.701>.

Gould, F. (2000). Testing *Bt* refuge strategies in the field. Nature Biotechnology, 18(March), 266–267.

Greene, G. L., Leppla, N. C., & Dickerson, W. A. (1976). Velvetbean Caterpillar: A Rearing Procedure and Artificial Medium. Journal of Economic Entomology, 69(4), 487–488. <https://doi.org/10.1093/jee/69.4.487>.

Gueorguieva, R., & Krystal, J. H. (2011). Move over ANOVA. Arch Gen Psychiatry, 61(3), 310–317. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.61.3.310>.

Halcomb, J. L., Benedict, J. H., Cook, B., & Ring, D. R. (1996). Survival and growth of bollworm and tobacco budworm on nontransgenic and transgenic cotton expressing a CryIA insecticidal protein (Lepidoptera: Noctuidae). Environmental Entomology, 25(2), 250–255.

Hardke, J. T., Temple, J. H., Leonard, B. R., & Jackson, R. E. (2011). Laboratory Toxicity and Field Efficacy of Selected Insecticides Against Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) 1. Florida Entomologist, 94(2), 272–278. <https://doi.org/10.1653/024.094.0221>.

Head, G. P., & Greenplate, J. (2012). The design and implementation of insect resistance management programs for *Bt* crops. *GM Crops & Food: Biotechnology in Agriculture and the Food Chain*, 3(3), 144–153. <https://doi.org/10.4161/gmcr.20743>.

Head, G., Campbell, L. a., Carroll, M., Clark, T., Galvan, T., Hendrix, W. M., ... Stork, L. (2014). Movement and survival of corn rootworm in seed mixtures of SmartStax insect-protected corn. *Crop Protection*, 58, 14–24. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.12.023>.

Horikoshi, R. J., Bernardi, D., Bernardi, O., Malaquias, J. B., Okuma, D. M., Miraldo, L. L., de Amaral, F. S., & Omoto, C. (2016). Effective dominance of resistance of *Spodoptera frugiperda* to *Bt* maize and cotton varieties: implications for resistance management. *Scientific Reports*, 6(1), 34864. <https://doi.org/10.1038/srep34864>.

Hornby, J. A., & Gardner, W. A. (1987). Dosage/Mortality Response of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and Other Noctuid Larvae to Beta-exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Economic Entomology*, 80(4), 925–929.

Hruska, A. J., & Gladstone, S. M. (1988). Effect of Period and Level of Infestation of the Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda*, on Irrigated Maize Yield. *The Florida Entomologist*, 71(3), 249–254.

Huang, F., Buschman, L. L., & Higgins, R. A. (1999). Susceptibility of Different Instars of European Corn Borer (Lepidoptera: Crambidae) to Diet Containing *Bacillus thuringiensis*. *Biological and Microbial Control*, 92(3), 547–550.

Huang, F., Leonard, B. R., & Gable, R. H. (2006). Comparative Susceptibility of European Corn Borer, Southwestern Corn Borer, and Sugarcane Borer (Lepidoptera: Crambidae) to Cry1Ab Protein in a Commercial *Bacillus thuringiensis* Corn Hybrid. *Journal of Economic Entomology*, 99(1), 194–202.

Huang, F., Andow, D. a., & Buschman, L. L. (2011). Success of the high-dose/refuge resistance management strategy after 15 years of *Bt* crop use in North America. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 140(1), 1–16. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2011.01138.x>.

Huang, F., Qureshi, J. A., Meagher, R. L., Reisig, D. D., Head, G. P., Andow, D. A., Ni,

X., Kerns, D., Buntin, G., Niu, Y., Yang, F., & Dungal, V. (2014). Cry1F resistance in fall armyworm *Spodoptera frugiperda*: Single gene versus pyramided *Bt* maize. PLoS ONE, 9(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112958>.

Huang, F., Qureshi, J. A., Head, G. P., Price, P. A., Levy, R., Yang, F., & Niu, Y. (2016). Frequency of *Bacillus thuringiensis* Cry1A.105 resistance alleles in field populations of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, in Louisiana and Florida. Crop Protection, 83, 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.01.019>.

Iannone, N., & Leiva, P. (2012). Bioecología y control de plagas en el cultivo de maíz. In G. H. Eyherávide (Ed.), Bases para el manejo del cultivo de maíz (p. 297). Pergamino: INTA.

Ibrahim, R. a, & Shower, D. M. (2014). Transgenic *Bt*-Plants and the Future of Crop Protection (An Overview). International Journal of Agricultural and Food Research, 3(1), 14–40.

INASE (Instituto Nacional de Semillas). (2014). Resolución N° 112/14.

Ives, A. R., Glaum, P. R., Ziebarth, N. L., & Andow, D. A. (2011). The evolution of resistance to two-toxin pyramid transgenic crops. Ecological Applications, 21(2), 503–515. <https://doi.org/10.1890/09-1869.1>.

Jakka, S. R. K., Knight, V. R., & Jurat-Fuentes, J. L. (2014). Fitness Costs Associated with Field-Evolved Resistance to *Bt* Maize in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Journal of Economic Entomology, 107(1), 342–351.

James, C. (2012). ISAAA Briefs Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2012.

James, C. (2016). ISAAA Briefs Global Status of Commercialized Biotech / GM Crops : 2016.

Johnson, S. J. (1987). Migration and the life history strategy of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* in the Western Hemisphere. Insect Science and It's Applications, 8(4/5/6), 543–549. <https://doi.org/10.1017/S1742758400022591>.

Juárez, M. L., Murúa, M. G., García, M. G., Ontivero, M., Teresa Vera, M., Vilardi, J.

C., Groot, A. T., Castagnaro, A. P., Gastaminza, G., & Willink, E. (2012). Host Association of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Corn and Rice Strains in Argentina, Brazil, and Paraguay. *Journal of Economic Entomology*, 105(2), 573–582. <https://doi.org/10.1603/EC11184>.

Kang, J., Onstad, D. W., Hellmich, R. L., Moser, S. E., Hutchison, W. D., & Prasifka, J. R. (2012). Modeling the Impact of Cross-Pollination and Low Toxin Expression in Corn Kernels on Adaptation of European Corn Borer (Lepidoptera: Crambidae) to Transgenic Insecticidal Corn. *Environmental Entomology*, 41(1), 200–211. <https://doi.org/10.1603/EN11133>.

Kruger, M., Van Rensburg, J. B. J., & Van den Berg, J. (2012). Transgenic *Bt* maize : farmers' perceptions, refuge compliance and reports of stem borer resistance in South Africa. *Journal of Applied Entomology*, 136, 38–50. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2011.01616.x>.

Li, Y.-X., Greenberg, S. M., & Liu, T.-X. (2006). Effects of *Bt* cotton expressing Cry1Ac and Cry2Ab and non-*Bt* cotton on behavior, survival and development of *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). *Crop Protection*, 25(9), 940–948. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2005.12.007>.

Li, Y., Greenberg, S., & Liu, T. (2007). Orientation Behavior, Development and Survival of *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) Larvae on Cotton Expressing Cry1Ac and Cry2Ab and Conventional Cotton. *Journal of Insect Behavior*, 20, 473–488. <https://doi.org/10.1007/s10905-007-9093-0>.

Li, Y., Greenberg, S. M., & Liu, T. (2007a). Effect of *Bt* cotton expressing Cry1Ac and Cry2Ab , non-*Bt* cotton and starvation on survival and development of *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Management Science*, 63, 476–482. <https://doi.org/10.1002/ps>.

Lopez Bautista, E. A., San'tana Quaresma, E., & Santana, M. L. (2014). Modelos lineares mistos para análise de dados longitudinais provenientes de ensaios agronomicos. *Revista Da Estatística Universidade Federal de Ouro Preto*, 3(3), 649–653.

Luginbill, P. (1928). The Fall Armyworm. *USDA Technical Bulletin* (Vol. 34). [https://doi.org/10.1016/0003-6870\(73\)90259-7](https://doi.org/10.1016/0003-6870(73)90259-7).

- Machado, V., Wunder, M., Baldissera, V., Oliveira, J., Fiúza, L., & Nagoshi, R. (2008). Molecular Characterization of Host Strains of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Southern Brazil. *Annals of the Entomological Society of America*, 101(3) 619-626.
- Macrae, T. C., Baur, M. E., Boethel, D. J., Bentley, J., Gao, A., Gamundi, J. C., Harrison, L. A., Kabuye, V. T., McPherson, R. M., Miklos, J. A., Paradise, M. S., Toedebush, A. S., & Viegas, A. (2005). Laboratory and Field Evaluations of Transgenic Soybean Exhibiting High-Dose Expression of a Synthetic *Bacillus thuringiensis* cry1A Gene for Control of Lepidoptera. *Journal of Economic Entomology*, 98(2), 577–587.
- Malaquias, J. B., Godoy, W. A. C., Garcia, A. G., Ramalho, F. D. S., & Omoto, C. (2017). Larval Dispersal of *Spodoptera frugiperda* Strains on *Bt* Cotton: A Model for Understanding Resistance Evolution and Consequences for its Management. *Scientific Reports*, 7(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16094-x>.
- Mallet, J., & Porter, P. (1992). Preventing insect adaptation to insect-resistant crops: are seed mixtures or refugia the best strategy? *Proc. R. Soc. London B.*, 250, 165–169.
- Marvier, M. (2008). Pharmaceutical crops in California, benefits and risks . A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 28, 1–9.
- Massoni, F. A., Schlie, G., & Frana, J. E. (2014). Evaluación del daño causado por lepidópteros en híbridos de maíz *Bt* (VT Triple PRO y MG) y convencional y determinacion del impacto sobre el rendimiento. In X Congreso Nacional de Maíz. Área Protección Vegetal. (pp. 1–4).
- Matten, S. R., Frederick, R. J., & H., R. A. (2012). United States Environmental Protection Agency Insect Resistance Management Programs for Plant-Incorporated Protectants and Use of Simulation Modeling. In C. A. Wozniak & A. McHughen (Eds.), *Regulation of Agricultural Biotechnology: The United States and Canada* (pp. 175–268). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-2156-2>.
- Michel, A. A., Valverde, L., Berta, C., & Vaca, G. V. (2013). Análisis histológico sobre los efectos producidos por el parasitoidismo de *Campoletis grioti* (Hymenoptera: Ichneumonidae) en larvas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera : Noctuidae). *Acta Zoológica Lilloana*, 57, 94–98.

Ministerio de Agroindustria de la Nación. Estimaciones Agrícolas. <http://www.datosestimaciones.magyp.gob.ar/reportes.php?reporte=Estimaciones>. Fecha de acceso 02/07/2018.

Miraldo, L. L., Bernardi, O., Horikoshi, R. J., Amaral, F. S. A., Bernardi, D., & Omoto, C. (2016). Functional dominance of different aged larvae of *Bt*-resistant *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) on transgenic maize expressing Vip3Aa20 protein. *Crop Protection*, 88, 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.06.004>.

Mitchell, E. R., McNeil, J. N., Westbrook, J. K., Silvain, J. F., Lalane-Cassou, B., Chalfant, R. B., Pair, S. D., Wadhill, V. H., Sotomayor-Rios, A., & Proshold, F. I. (1991). Seasonal periodicity of fall armyworm, (Lepidoptera: Noctuidae) in the Caribbean Basin and Northward to Canada. *Journal of Entomological Sciences*, 26(1), 39–50.

Monnerat, R., Martins, E., Queiroz, P., Ordúz, S., Jaramillo, G., Benintende, G., Cozzi, J., Real, M. D., Martinez-Ramirez, A., Rausell, C., Cerón, J., Ibarra, J., Del Rincon-Castro, C., Espinoza, A., Meza-Basso, L., Cabrera, L., Sánchez, J., Soberon, M., & Bravo, A. (2006). Genetic variability of *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Latin America is associated with variations in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* cry toxins. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(11), 7029–35. <https://doi.org/10.1128/AEM.01454-06>.

Monnerat, R., Martins, E., Macedo, C., Queiroz, P., Praça, L., Soares, C. M., Moreira, H., Grisi, I., Silva, J., Soberon, M., & Bravo, A. (2015). Evidence of field-evolved resistance of *Spodoptera frugiperda* to *Bt* corn expressing Cry1F in Brazil that is still sensitive to modified *Bt* toxins. *PLoS ONE*, 10(4), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119544>.

Moser, E. B., & Macchiavelli, R. E. (2002). Model Selection Techniques for Repeated Measures Covariance Structures. *Applied Statistics in Agriculture*, 14, 17–31.

Murphy, A. F., Ginzal, M. D., & Krupke, C. H. (2010). Evaluating Western Corn Rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) Emergence and Root Damage in a Seed Mix Refuge. *Journal of Economic Entomology*, 103(1), 147–157. <https://doi.org/10.1603/EC09156>.

Murúa, M. G., Virla, E. G., & Defagó, V. (2003). Evaluación de cuatro dietas artificiales

para la cría de *Spodoptera frugiperda* (Lep.: Noctuidae) destinada a mantener poblaciones experimentales de himenópteros parasitoides. Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas, 29(1), 43–51.

Murúa, M. G., & Virla, E. (2004a). Population parameters of *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lep.: Noctuidae) fed on corn and two predominant grasses in Tucumán (Argentina). Acta Zoológica Mexicana, 20(1), 199–210.

Murúa, M. G., & Virla, E. (2004b). Presencia Invernal de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) en el Área Maicera de la Provincia de Tucumán , Argentina, 105(2), 46–52.

Murúa, G., Molina-Ochoa, J., & Coviella, C. (2006). Population Dynamics of the Fall Armyworm, *Spodoptera Frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and Its Parasitoids in Northwestern Argentina. Florida Entomologist, 89(2), 175–182. [https://doi.org/10.1653/0015-4040\(2006\)89\[175:PDOTFA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1653/0015-4040(2006)89[175:PDOTFA]2.0.CO;2).

Murúa, G. M., Molina-Ochoa, J., & Fidalgo, P. (2009). Natural distribution of parasitoids of larvae of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, in Argentina. Journal of Insect Science, 9(20), 1–17. <https://doi.org/10.1673/031.009.2001>.

Murúa, M. G., Degano García, M. F., Pereira, M., Pero, E., & Willink, E. (2013). Eficacia en campo del maíz Herculex ® I para el control de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) en el Noroeste Argentino. Revista Industrial y Agrícola de Tucumán, 90(1), 37–43.

Nagoshi, R. N., Meagher, R. L., & Hay-Roe, M. (2012). Inferring the annual migration patterns of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) in the United States from mitochondrial haplotypes. Ecology and Evolution, 2(7), 1458–1467. <https://doi.org/10.1002/ece3.268>.

Nagoshi, R. N., Murúa, G. M., Hay-Roe, M., Juárez, M. L., Willink, E., & Meagher, R. L. (2012). Genetic Characterization of Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) Host Strains in Argentina. Journal of Economic Entomology, 105(2), 418–428. <https://doi.org/10.1603/EC11332>.

Nagoshi, R. N., Fleischer, S., Meagher, R. L., Hay-Roe, M., Khan, A., Murúa, M. G.,

Silvie, P., Vergara, C., & Westbrook, J. (2017). Fall armyworm migration across the lesser antilles and the potential for genetic exchanges between north and south American populations. *PLoS ONE*, 12(2), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171743>.

National Research Council. (2010). *The Impact of Genetically Engineered Crops on Farm Sustainability in the United States*. National Academies Press. Washington DC. <https://doi.org/10.17226/12804>.

Niu, Y., Head, G. P., Price, P. A., & Huang, F. (2018). Inheritance and fitness costs of Cry1A.105 resistance in two strains of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). *Crop Protection*, 110, 229–235. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.06.022>.

Niu, Y., Meagher, R. L., Yang, F., & Huang, F. (2013). Susceptibility of field populations of the Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) from Florida and Puerto Rico to purified Cry1F protein and corn leaf tissue containing single and pyramided *Bt* genes. *Florida Entomologist*, 96(3), 701–713.

Omoto, C., Bernardi, O., Salmeron, E., Sorgatto, R. J., Dourado, P. M., Crivellari, A., Carvalho, R. A., Willse, A., Martinelli, S., & Head, G. P. (2016). Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. *Pest Management Science*, 72(9), 1727–1736. <https://doi.org/10.1002/ps.4201>.

Onstad, D. W., & Gould, F. (1998). Modeling the dynamics of adaptation to transgenic maize by European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Economic Entomology*, 91(3), 585–593.

Onstad, D. W. (2006). Modeling Larval Survival and Movement to Evaluate Seed Mixtures of Transgenic Corn for Control of Western Corn Rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Economic Entomology*, 99(4), 1407–1414.

Onstad, D. W., Mitchell, P. D., Hurley, T. M., Lundgren, J. G., Porter, R. P., Krupke, C. H., Spencer, J. L., Difonzo, C. D., Baute, T. S., Hellmich, R. L., Buschman, L. L., Hutchison, W. D., & Tooker, J. F. (2011). Seeds of Change: Corn Seed Mixtures for Resistance Management and Integrated Pest Management. *Journal of Economic Entomology*, 104(2), 343–352. <https://doi.org/10.1603/EC10388>.

Onstad, D. W. (2014). *Insect Resistance Management*. (D. W. Onstad, Ed.) (Second).

Academic Press Elsevier B.V.

Onstad, D. W., Crespo, A. L. B., Pan, Z., Crain, P. R., Thompson, S. D., Pilcher, C. D., & Sethi, A. (2018). Blended Refuge and Insect Resistance Management for Insecticidal Corn. *Environmental Entomology*, 47(1), 210–219. <https://doi.org/10.1093/ee/nvx172>.

Ostlie, K. R., Hutchison, W. D., & Hellmich, R. L. (1997). *Bt* corn and European corn borer. University of Nebraska Faculty Publications. Lincoln..

Paliwal, R. L., G. Granados, H. R. Lafitte, A. D. Violic, J. P. Marathée. (2001). El Maíz en los trópicos: mejoramiento y producción. FAO of the United Nations. http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/DOCREP/003/X7650S/x7650s15.htm. Fecha de acceso 1/4/2014.

Palma, L., Hernandez-Rodriguez, C., Maeztu, M., Hernandez-Martinez, P., Iñigo Ruiz de Escudero, B., Muñoz, D., Van Rie, J., Ferré, J., & Caballero, P. (2012). Vip3C, a novel class of vegetative insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(19), 7163–7165. <https://doi.org/10.1128/AEM.01360-12>.

Pannuti, L. E. R., Baldin, E. L. L., Hunt, T. E., & Paula-Moraes, S. V. (2015). On-Plant Larval Movement and Feeding Behavior of Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) on Reproductive Corn Stages. *Environmental Entomology*, (45), 192–200. <https://doi.org/10.1093/ee/nvv159>.

Pannuti, L. E. R., Paula Moraes, S. V, Hunt, T. E., Baldin, E. L. L., Dana, L., & Malaquias, J. V. (2016). Plant to Plant Movement of *Striacosta albicosta* (Lepidoptera : Noctuidae) and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera : Noctuidae) in Maize (*Zea mays*). *Journal of Economic Entomology*, 109(3), 1125–1131. <https://doi.org/10.1093/jee/tow042>.

Pastrana, J. (2004). Los lepidópteros argentinos. Sus plantas hospedadoras y otros sustratos alimenticios. 1° ed. Buenos Aires: Sociedad Entomológica Argentina. 350pp.

Paula-Moraes, S. V., Hunt, T. E., Wright, R. J., Hein, G. L., & Blankenship, E. E. (2012). On-Plant Movement and Feeding of Western Bean Cutworm (Lepidoptera: Noctuidae) Early Instars on Corn. *Environmental Entomology*, 41(6), 1494–1500.

- Perkins, L. E., Cribb, B. W., Hanan, J., Glaze, E., Beveridge, C., & Zalucki, M. P. (2008). Where to from here? The mechanisms enabling the movement of first instar caterpillars on whole plants using *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Arthropod-Plant Interactions*, 2(4), 197–207. <https://doi.org/10.1007/s11829-008-9047-2>.
- Perlak, F. J., Fuchs, R. L., Dean, D. A., McPherson, S. L., & Fischhoff, D. A. (1991). Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(8), 3324–3328. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.8.3324>.
- Pigott, C. R., King, M. S., & Ellar, D. J. (2008). Investigating the properties of *Bacillus thuringiensis* cry proteins with novel loop replacements created using combinatorial molecular biology. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(11), 3497–3511. <https://doi.org/10.1128/AEM.02844-07>.
- Pinheiro, J., & Bates, D. (2000). Fitting Linear Mixed-Effects Models Models. In *Mixed-Effects Models in S and S-PLUS*. Statistics and Computing. New York: Springer.
- Pogue, M. G. (2002). A world revision of the genus *Spodoptera* guenée (Lepidoptera: Noctuidae). *Memoirs of the American Entomological Society*, 43, 1–202.
- Prasanna, B. M., Huesing, J. E., Eddy, R., & Peshke, V. M. (2018). Fall Armyworm in Africa: A guide for integrated pest management. I Edición. CYMMIT. USAID México 109p.
- Programa Manejo de la resistencia de Insectos. <http://www.programamri.com.ar/> Fecha de acceso 28/08/2018.
- Qureshi, J. a., Buschman, L. L., Throne, J. E., & Ramaswamy, S. B. (2006). Dispersal of Adult *Diatraea grandiosella* (Lepidoptera: Crambidae) and Its Implications for Corn Borer Resistance Management in *Bacillus thuringiensis* Maize. *Annals of the Entomological Society of America*, 99(2), 279–291. [https://doi.org/10.1603/0013-8746\(2006\)099\[0279:DOADGL\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2006)099[0279:DOADGL]2.0.CO;2).
- Ramalho, F. S., Pachú, J. K., Lira, A. C. S., Malaquias, J. B., Zanuncio, J. C., & Fernandes, F. S. (2014). Feeding and Dispersal Behavior of the Cotton Leafworm , *Alabama argillacea* (Hübner) (Lepidoptera:Noctuidae), on *Bt* and Non-*Bt* Cotton:

Implications for Evolution and Resistance Management. PLoS ONE, 9(11), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111588>.

Razze, J. M., Mason, C. E., & Pizzolato, T. D. (2011). Feeding Behavior of Neonate *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) on Cry1Ab *Bt* Corn: Implications for Resistance Management. *Journal of Economic Entomology*, 104(3), 806–813. <https://doi.org/10.1603/EC10287>.

Razze, J. M., & Mason, C. E. (2012). Dispersal Behavior of Neonate European Corn Borer (Lepidoptera: Crambidae) on *Bt* Corn. *Ecology and Behavior*, 105(4), 1214–1223.

Reay-Jones, F. P. F., Bessin, R. T., Brewer, M. J., Buntin, D. G., Catchot, A. L., Cook, D. R., Flanders, K. L., Kerns, D. L., Porter, R. P., Reising, D. D., Stewart, S. D., & Rice, M. E. (2016). Impact of Lepidoptera (Crambidae, Noctuidae, and Pyralidae) Pests on Corn Containing Pyramided *Bt* Traits and a Blended Refuge in the Southern United States. *Journal of Economic Entomology*, 109(4), 1–13. <https://doi.org/10.1093/jee/tow109>.

Rhoades, D. F. (1985). Offensive-Defensive Interactions between Herbivores and Plants: Their Relevance in Herbivore Population Dynamics and Ecological Theory. *The American Naturalist*, 125(2), 205–238. <https://doi.org/10.1086/284338>.

Ritchie, S.W., & Hanway, J.J., (1982). How a corn plant develops. Spec. Rep. 48. Rev. Iowa State University, Coop. Ext. Serv., Ames, IA.

Rodriguez del Bosque, L., Smith, J., & Browning, H. (1990). Feeding and Pupation Sites of *Diatraea lineolata*, *D. saccharalis*, and *Eoreuma loftini* (Lepidoptera: Pyralidae) in Relation to Corn Phenology. *Journal of Economic Entomology*, 83(3), 850–855.

Ross, S. E., & Ostlie, K. R. (1990). Dispersal and survival of early instars of European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) in field corn. *Journal of Economic Entomology*, 83, 831–836.

Roush, R. T., & Daly, J. C. (1990). The Role of Population Genetics in Resistance Research and Management. In R. Roush & B. Tabashnik (Eds.), *Pesticide Resistance in Arthropods* (pp. 97–152). Boston MA: Springer.

Roush, R. T. (1998). Two-toxin strategies for management of insecticidal transgenic crops: can pyramiding succeed where pesticide mixtures have not? *Philosophical Transactions of the Royal Society Biological Sciences*, 353(1376), 1777–1786. <https://doi.org/10.1098/rstb.1998.0330>.

Rule, D. M., Nolting, S. P., Prasifka, P. L., Storer, N. P., Hopkins, B. W., Scherder, E. F., Siebert, M. W., & Hendrix, W. H. (2014). Efficacy of Pyramided *Bt* Proteins Cry1F, Cry1A.105, and Cry2Ab2 Expressed in SmartStax Corn Hybrids Against Lepidopteran Insect Pests in the Northern United States. *Journal of Economic Entomology*, 107(1), 403–409. <https://doi.org/10.1603/EC12448>.

Russo, R., Gamundi, J. C., & Alzogaray, R. A. (2012). Evaluation of pyrethroids toxicity in a laboratory strain and a field population of *Rachiplusia nu* (Lepidoptera: Noctuidae) using two bioassay techniques. *Revista de La Sociedad Entomológica Argentina*, 71(1–2), 115–123.

Sansinenea, E. (2012). *Bacillus thuringiensis* Biotechnology. (E. Saisinenea, Ed.), *Bacillus thuringiensis* Biotechnology. Springer. https://doi.org/10.1007/978-94-007-3021-2_2.

Santos-Amaya, O. F., Rodrigues, J. V. C., Souza, T. C., Tavares, C. S., Campos, S. O., Guedes, R. N. C., & Pereira, E. J. G. (2015). Resistance to dual-gene *Bt* maize in *Spodoptera frugiperda*: selection, inheritance, and cross-resistance to other transgenic events. *Scientific Reports*, 5(November), 18243. <https://doi.org/10.1038/srep18243>.

Sassano, F., Urretabizkaya, N., & Alvarez, J. (2016). Respuesta de maíces *Bt* y no *Bt* ante la presencia de *Spodoptera frugiperda* (Smith) y evaluación del momento óptimo de control Sassano. *Revista de Divulgación Técnica Agropecuaria, Agroindustrial y Ambiental Facultad de Ciencias Agrarias. UNLZ.*, 3(2), 18–29.

Sauka, D. H., & Benintende, G. B. (2017). Diversity and distribution of lepidopteran-specific toxin genes in *Bacillus thuringiensis* strains from Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(3), 273–281. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.02.003>.

Scheiner, S., & Gurevitch, J. (2001). *Design and Analysis of Ecological Experiments*. (S. Scheiner & J. Gurevitch, Eds.) (Second). Oxford University Press.

Schiff, N. M., Waldbauer, G. P., & Friedman, S. (1989). Dietary self-selection by *Heliothis zea* larvae: roles of metabolic feedback and chemosensory stimuli. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 52, 261–270.

Schoonhoven, L. M., van Loon, J. J., & Dicke, M. (2005). *Insect-Plant Biology*. (L. M. Schoonhoven, J. J. a van Loon, & M. Dicke, Eds.) (Second). Oxford, New york: Oxford University Press. <https://doi.org/10.1079/9781845939564.0363>.

Schowalter, T. D. (2011). *Insect Ecology an Ecosystem Approach*. *Insect Ecology: An Evolutionary Approach* (third). Academic Press Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381351-0/00006-8>.

Serra, G. V., & Trumper, E. V. (2006). Sequential sampling protocols for *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), on *Zea mays* fields: influence of sampling unit size. *Bulletin of Entomological Research*, 96, 471–477. <https://doi.org/10.1079/BER2006447>.

Sharanabasappa, D., Kalleshwaraswamy, C. M., Asokan, R., Mahadewa Swamy, H. M., Maruthi, M. S., Pavithra, H. B., Hegde, K., Shivaray, N., Prabhu, S. T., Goergen, G. (2018). First report of the Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), an alien invasive pest on maize in India. *Pest Management in Horticultural Ecosystems*, 24(1), 23-29.

Shelton, A. M., Tang, J. D., Roush, R. T., Metz, T. D., & Earle, E. D. (2000). Field tests on managing resistance to *Bt*-engineered plants. *Nature Biotechnology*, 18(3), 339–342. <https://doi.org/10.1038/73804>.

Shelton A. M.; Zhao, J.Z.; Roush, R. T. (2002). Economic, Ecological, Food Safety, and Social Consequences of the Deployment of *Bt* transgenic Plants. *Annual Review of Entomology*, 47, 845–881.

Siebert, M. W., Babock, J. M., Nolting, S., Santos, A. C., Adamczyk, J. J., Neese, P. A., King, J. E., Jenkins, J. N., McCarty, J., Lorenz, G. M., Fromme, D. D., & Lassiter, R. B. (2008). Efficacy of Cry1F Insecticidal Protein in Maize and Cotton for Control of Fall Armyworm (Lepidoptera : Noctuidae). *Florida Entomologist*, 91(4), 555–565.

Siebert, M. W., Nolting, S. P., Hendrix, W., Dhavala, S., Craig, C., Leonard, B. R., Stewart, S. D., Musser, F. R., Buntin, G. D., & Samuel, L. (2012). Evaluation of Corn

Hybrids Expressing Cry1F, Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry34Ab1/Cry35Ab1, and Cry3Bb1 Against Southern United States Insect Pests. *Journal of Economic Entomology*, 105(5), 1825–1834.

Sisodiya, D. B., Raghunandan, B. L., Bhatt, N. A., Verma, H. S., Shewale, C. P. Timbadiya, B. G., & Borad, P. K. (2018). The fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae); first report of new invasive pest in maize fields of Gujarat, India. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6(5), 2089-2091.

Sorgatto, R. J., Bernardi, O., & Omoto, C. (2015). Survival and development of *Spodoptera frugiperda* and *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) on *Bt* cotton and implications for resistance management strategies in Brazil. *Environmental Entomology*, 44(1), 186–192. <https://doi.org/10.1093/ee/nvu018>.

Sosa, M. A. (2002). Daño por *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera : Noctuidae) en maíz bajo siembra directa en diferentes épocas en el noreste santafesino. In IX Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Corrientes.

Sosa, M. A. (2002a). Daño producido por *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) sobre el rendimiento del cultivo de maíz en siembra directa, según tiempos de exposición a la plaga. *Información Para Extensión INTA Centro Regional Santa Fe*, (70), 46–52.

Sosa, M. A. (2002b). Estimación de daño de *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) en maíz con infestación natural en tres fechas de siembra en el norte santafesino. *Información Para Extensión INTA Centro Regional Santa Fe*, (70), 39–45.

Sosa, M. A. (2002c). Fluctuación de la población de *Spodoptera frugiperda* Smith en el norte santafesino según capturas en trampas de luz. *Información Para Extensión INTA Centro Regional Santa Fe*, (70), 35–38.

Sosa, M. A., & Vitti, D. E. (2005). Factores de mortalidad natural de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), en el Norte Santafesino. In XI Reunión de Comunicaciones Científicas, Técnicas y de Extensión. Corrientes.

Sparks, A. N. (1979). A Review of the Biology of the Fall Armyworm. *The Florida Entomologist*, 62(2), 82–87.

- Sparks, A. N., Jackson, R. D., Carpenter, J. E., & Muller, R. A. (1986). Insects Captured in Light Traps in the Gulf of Mexico. *Annals of the Entomological Society of America*, 79(1), 132–139.
- Storer, N. P., Babcock, J. M., Schlenz, M., Meade, T., Thompson, G. D., Bing, J. W., & Huckaba, R. M. (2010). Discovery and Characterization of Field Resistance to *Bt* Maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. *Journal of Economic Entomology*, 103(4), 1031–1038. <https://doi.org/10.1603/EC10040>.
- Storer, N. P., Kubiszak, M. E., Ed King, J., Thompson, G. D., & Santos, A. C. (2012). Status of resistance to *Bt* maize in *Spodoptera frugiperda*: lessons from Puerto Rico. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110(3), 294–300. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.04.007>.
- Storer, N. P., Thompson, G. D., & Head, G. P. (2012a). Application of pyramided traits against Lepidoptera in insect resistance management for *Bt* crops. *GM Crops & Food: Biotechnology in Agriculture and the Food Chain*, 3(3), 154–162.
- Strnad, S. P., & Bergman, M. K. (1987). Distribution and Orientation of Western Corn Rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) Larvae in Corn Roots. *Environmental Entomology*, 16(5), 1193–1198.
- Szwarc, D. E., Vitti Scarel, D. E., & Almada, M. S. (2015). Daño de gusanos “cogollero” y “de la espiga” en maíces *Bt*, en dos fechas de siembra. *Voces y Ecos INTA Reconquista*, 42–44.
- Szwarc, D. S., Vitti, D. E., & Almada, M. S. (2015a). Evaluación de daño de *Spodoptera frugiperda* Smith y *Helicoverpa zea* Boddie en diferentes híbridos de maíz (*Zea mays* Linneo) en el Norte de Santa Fe. In IX Congreso Argentino de Entomología. (p. ISSN: 1666-45-23).
- Tabashnik, B. (1994). Evolution of Resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology*, 39(1), 47–79. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.39.1.47>.
- Tabashnik, B. E., Carrière, Y., Dennehy, T. J., Morin, S., Sisterson, M. S., Roush, R. T., Shelton, A. M., & Zhou-Zhao, J. (2003). Insect Resistance to Transgenic *Bt* Crops: Lessons from the Laboratory and Field, 96(4), 1031–1038.

Tabashnik, B. E., Gould, F., & Carrière, Y. (2004). Delaying evolution of insect resistance to transgenic crops by decreasing dominance and heritability. *Journal of Evolutionary Biology*, 17, 904–912. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2004.00695.x>.

Tabashnik, B. E. (2008). Delaying insect resistance to transgenic crops. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(49), 19029–19030.

Tabashnik, B. E., Rensburg, J. B. J. Van, & Carrière, Y. (2009). Field-Evolved Insect Resistance to *Bt* Crops : Definition , Theory , and Data. *Journal of Economic Entomology*, 102(6), 2011–2025.

Tabashnik, B. E., Brévault, T., & Carrière, Y. (2013). Insect resistance to *Bt* crops: lessons from the first billion acres. *Nature Biotechnology*, 31(6), 510–521. <https://doi.org/10.1038/nbt.2597>.

Tabashnik, B. E., Mota-sanchez, D., Whalon, M. E., Hollingworth, R., & Carrière, Y. (2014). Defining Terms for Proactive Management of Resistance to *Bt* Crops and Pesticides. *Journal of Economic Entomology*, 107(2), 496–507.

Tabashnik, B., & Carrière, Y. (2017). Surge in insect resistance to transgenic crops and prospects for sustainability. *Nature Biotechnology*, 35(10), 926–935. <https://doi.org/10.1038/nbt.3974>.

Téllez-Rodríguez, P., Raymond, B., Morán-Bertot, I., Rodríguez-Cabrera, L., Wright, D. J., Borroto, C. G., & Ayra-Pardo, C. (2014). Strong oviposition preference for *Bt* over non-*Bt* maize in *Spodoptera frugiperda* and its implications for the evolution of resistance. *BMC Biology*, 12, 48. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-12-48>.

Terriere, L. C. (1984). Induction of detoxification enzymes in insects. *Ann. Rev. Entomol*, 29, 71–88.

Terry, I., Bradley, J. R., & Duyn, J. W. (1989). Establishment of early instar *Heliothis zea* on soybeans. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 51(3), 233–240. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1989.tb01234.x>.

Trumper, E. V. (2014). Resistencia de insectos a cultivos transgénicos con propiedades insecticidas. Teoría, estado del arte y desafíos para la República Argentina. *Agriscientia*,

31(2), 109–126.

Urretabizkaya, N., Vasicek, A., & Saini, E. (2010). Insectos perjudiciales de importancia gronómica. I. Lepidópteros. (INTA, Ed.), INTA (Vol. 1).

Vacher, C., Bourguet, D., Desquilbet, M., Lemarié, S., Ambec, S., & Hochberg, M. E. (2006). Fees or refuges: which is better for the sustainable management of insect resistance to transgenic *Bt* corn? *Biology Letters*, 2(2), 198–202. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2005.0418>.

Valverde, L., Z. A. de Toledo y S. Popich. (1995). Ciclo biológico de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lep. Noctuidae). *Acta Zoológica Lilloana* 43: 131-143.

Van Den Berg, J. (2016). Insect Resistance Management in *Bt* Maize: Wild Host Plants of Stem Borers Do Not Serve as Refuges in Africa. *Journal of Economic Entomology*, 1–9. <https://doi.org/10.1093/jee/tow276>.

Van Huis, A. (1981). Integrated pest management in the small farmer's maize crop in Nicaragua. *Meded Landbou* (Vol. 81). Wageningen.

van Rensburg, J. B. J. (2007). First report of field resistance by the stem borer, *Busseola fusca* (fuller) to bt-transgenic maize. *South African Journal of Plant and Soil*, 24(3), 147–151. <https://doi.org/10.1080/02571862.2007.10634798>.

Varella, A. C., Menezes-Netto, A. C., Alonso, J. D. D. S., Caixeta, D. F., Peterson, R. K. D., & Fernandes, O. A. (2015). Mortality Dynamics of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Immatures in Maize. *Plos One*, 10(6), e0130437. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130437>.

Vélez, A., Spencer, T., Alves, A., Crespo, A., & Siegfried, B. (2014). Fitness costs of Cry1F resistance in fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Applied Entomology*, 138, 315–325. <https://doi.org/10.1111/jen.12092>.

Vilarinho, E. C., Fernandes, O. A., Hunt, T. E., & Caixeta, D. F. (2011). Movement of *Spodoptera Frugiperda* Adults (Lepidoptera: Noctuidae) in Maize in Brazil. *Florida Entomologist*, 94(3), 480–488. <https://doi.org/10.1653/024.094.0312>.

Virla, E. G., Colomo, M. V, Berta, D. C., & Valverde, L. (1999). El complejo de

parasitoides del “gusano cogollero” del maíz, *Spodoptera frugiperda*, en la República Argentina (Insecta, Lepidoptera). *Neotrópica*, 45(113–114), 3–12.

Walker, D. R., All, J. N., Mcpherson, R. M., Boerma, H. R., & Parrott, W. A. (2000). Field Evaluation of Soybean Engineered with a Synthetic cry1Ac Transgene for Resistance to Corn Earworm , Soybean Looper , Velvetbean Caterpillar (Lepidoptera : Noctuidae), and Lesser Cornstalk Borer (Lepidoptera : Pyralidae). *Journal of Economic Entomology*, 93(3), 613–622.

Walker, K. A., Hellmich, R. L., & Lewis, L. C. (2000a). Late-instar European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) tunneling and survival in transgenic corn hybrids. *Journal of Economic Entomology*, 93(4), 1276–1285.

Wan, B. (2015). Advances in Plant Breeding Strategies: Breeding, Biotechnology and Molecular Tools. In *Advances in plant breeding strategies. Breeding Biotechnology and Molecular Tools* (pp. 369–396). Chicago: Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-22521-0>.

Wan, P., Xu, D., Cong, S., Jiang, Y., Huang, Y., Wang, J., Wu, H., Wang, L., Wu, K., Carrière, Y., Mathias, A., Li, X., & Tabashnik, B. E. (2017). Hybridizing transgenic *Bt* cotton with non-*Bt* cotton counters resistance in pink bollworm. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(21), 5413–5418. <https://doi.org/10.1073/pnas.1700396114>.

Wangila, D. S., Leonard, B. R., Bai, Y., Head, G. P., & Huang, F. (2012). Larval survival and plant injury of Cry1Ab-susceptible, -resistant, and -heterozygous genotypes of the sugarcane borer on transgenic corn containing single or pyramided *Bt* genes. *Crop Protection*, 42, 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.06.005>.

Wangila, D. S., Leonard, B. R., Ghimire, M. N., Bai, Y., Zhang, L., Yang, Y., Emfinger, K., Head, G., Yang, F., Niu, Y., & Huang, F. (2013). Occurrence and larval movement of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) in seed mixes of non-*Bt* and *Bt* pyramid corn. *Pest Management Science*, 69(10), 1163–72. <https://doi.org/10.1002/ps.3484>.

Weisser, W. (2001). Predation and the evolution of dispersal. In C. D. T. Ian Woiwood, D. R. Reynolds (Ed.), *Insect movement: mechanisms and consequences: Proceedings of the Royal Entomological Society’s 20th Symposium* (CABI, p. 458).

- Willink, E., Costilla, M. A., & Osoreo, V. M. (1990). Principales plagas del maíz: Daños, pérdidas y recomendaciones para la siembra. *Avance Agroindustrial*, 11(42), 17–19.
- Willink, E., Osoreo, V. M., & Costilla, M. A. (1991). El gusano “cogollero”. Nivel de Daño Económico. *Avance Agroindustrial*, 12(46), 25–26.
- Willink, E., M. Costilla y V. Osoreo. (1993). Daños, pérdidas y nivel de daño económico de *Spodoptera frugiperda* (Lep., Noctuidae) en maíz. *Revista Industrial Agrícola, Estación Experimental Agroindustrial, Obispo Colombes, Tucumán* 70: 49-52.
- Yang, F., Huang, F., Qureshi, J. a., Leonard, B. R., Niu, Y., Zhang, L., & Wangila, D. S. (2013). Susceptibility of Louisiana and Florida populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to transgenic Agrisure®Viptera™ 3111 corn. *Crop Protection*, 50, 37–39. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.04.002>.
- Yang, F., Kerns, D. L., Head, G. P., Leonard, B. R., Levy, R., Niu, Y., & Huang, F. (2014). A Challenge for the Seed Mixture Refuge Strategy in *Bt* Maize: Impact of Cross-Pollination on an Ear-Feeding Pest, Corn Earworm. *PLoS ONE*, 9(11), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112962>.
- Yang, F., Kerns, D. L., Head, G. P., Leonard, B. R., Niu, Y., & Huang, F. (2014a). Occurrence, distribution, and ear damage of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in mixed plantings of non-*Bt* and *Bt* corn containing Genuity® SmartStax™ traits. *Crop Protection*, 55, 127–132. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.10.012>.
- Yang, F., Kerns, D. L., Leonard, B. R., Oyediran, I., Burd, T., Niu, Y., & Huang, F. (2015). Performance of Agrisure®Viptera™ 3111 corn against *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in seed mixed plantings. *Crop Protection*, 69, 77–82. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.12.002>.
- Yang, F., Kerns, D., Brown, S., Head, G., & Huang, F. (2017). Pollen contamination in seed mixture increases the dominance of resistance to *Bt* maize in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Management Science*, 73, 2379–2385. <https://doi.org/10.1002/ps.4631>.
- Yasem de Romero, M. G., & Romero, E. R. (2013). Reducción del consumo foliar de orugas de *Spodoptera frugiperda* (Lep.: Noctuidae) infectadas con Nucleopolyhedrovirus

aislamiento Leales (Tucumán, R. Argentina). *Revista Industrial y Agrícola de Tucumán*, 90(2), 29–38.

You, M., Yue, Z., He, W., Yang, X., Yang, G., Xie, M., Zhan, D., Baxter, S., Vasseur, L., Gurr, G., Douglas, C., Bai, J., Wang, P., Cui, K., Huang, S., Li, X., Zhou, Q., Wu, Z., Chen, Q., Liu, C., Wang, B., Li, X., Xu, X., Lu, C., Hu, M., Davey, J., Smith, S., Chen, M., Xia, X., Tang, W., Ke, F., Zheng, D., Hu, Y., Song, F., You, Y., Ma, X., Peng, L., Zheng, Y., Liang, Y., Chen, Y., Yu, L., Zhang, Y., Liu, Y., Li, G., Fang, L., Li, J., Zhou, X., Luo, Y., Gou, C., Wang, J., Wang, J., Yang, H., & Wang, J. (2013). A heterozygous moth genome provides insights into herbivory and detoxification. *Nature Genetics*, 45(2), 220–225. <https://doi.org/10.1038/ng.2524>.

Yu, S. J. (1983). Age Variation in Insecticide Susceptibility and Detoxification Capacity of Fall Armyworm (*Lepidoptera* : *Noctuidae*) Larvae. *Journal of Economic Entomology*, 76(219–222).

Yu, S. J. (1991). Insecticide Resistance in the Fall Armyworm , *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 39, 84–91.

Yu, S. J., Nguyen, S. N., & Abo-Elghar, G. E. (2003). Biochemical characteristics of insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 77, 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0048-3575\(03\)00079-8](https://doi.org/10.1016/S0048-3575(03)00079-8).

Zalucki, M. P., Clarke, A. R., & Malcolm, S. B. (2002). Ecology and behavior of first instar larval lepidoptera. *Annu. Rev. Entomol*, 47, 361–393.

Zhang, J., Wang, C., Qin, J., & Guo, S. (2004). Feeding behaviour of *Helicoverpa armigera* larvae on insect-resistant transgenic cotton and non-transgenic cotton. *Journal of Applied Entomology*, 128, 218–225.

Zuil, S. (2011). Comportamiento de soja en tres campañas contrastantes en el norte de Santa Fe. V Congreso de Soja del Mercosur / I Foro de la Soja ASIA – Mercosur. E6.

Zuil, S. y N. Izquierdo. (2012). Efecto de incrementos térmicos sobre el rendimiento de soja durante el llenado de granos. VI Congreso Brasileiro de Soja. 121: 79.