



**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO**

**EVALUACIÓN DE LÍNEAS TRANSGÉNICAS DE SOJA [*Glycine max* (L.) MERRILL]  
RESISTENTES A LEPIDÓPTEROS EN LA REGIÓN PAMPEANA**

**Ing. Agr. LUCAS PEDRO HAXHI**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE  
MAGISTER EN GENÉTICA VEGETAL**

**DIRECTOR: Ing. Agr. (MSc) MARCELO ERNESTO SERRE**

**ASESORES: Lic. (MSc, Dr.) CELINA BELTRÁN**

**Ing. Agr. (MSc, Dr.) ENRIQUE DOMINGO KREFF**

**Ph.D. MATTHEW ENRICO BAUR**

**2013**

# **EVALUACIÓN DE LÍNEAS TRANSGÉNICAS DE SOJA [*Glycine max* (L.) MERRILL] RESISTENTES A LEPIDÓPTEROS EN LA REGIÓN PAMPEANA**

Lucas Pedro Haxhi

Ingeniero Agrónomo – Universidad Nacional de Lomas de Zamora

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Magister en Genética Vegetal, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido previamente presentada para la obtención de otro título en ésta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en Dupont Pioneer, durante el período comprendido entre Mayo de 2010 y Mayo de 2012, bajo la dirección de Marcelo Ernesto Serre.

Lucas Pedro Haxhi

Marcelo Ernesto Serre

Celina Beltrán

Enrique Domingo Kreff

Matthew Enrico Baur

Defendida: 7 de Abril de 2014

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia, y especialmente a Raquel por su ayuda y apoyo incondicional.

A Dupont Pioneer por darme la oportunidad y los recursos para llevar a cabo este proyecto, y en especial a la gestión de Teresita Martin.

A mis asesores por guiarme, enseñarme y motivarme durante el desarrollo de la Tesis.

A los grupos de Investigación de Pergamino y de Johnston de Dupont Pioneer por la colaboración en la obtención de los datos.

A Juan Carlos Gamundi, Daniel Igarzabal, Ignacio Colonna, Jeffrey Hegstad y Martín Lábaque por compartir sus experiencias y conocimientos.

*A Raquel y Tomás*

*A mis viejos, Norma y Miguel*

# ÍNDICE

RESUMEN .....	V
ABSTRACT .....	VI
1. INTRODUCCIÓN.....	1
HIPÓTESIS .....	8
OBJETIVOS .....	9
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
2.1. Material genético .....	10
2.2. Ensayos con control de lepidópteros .....	12
2.3. Ensayos sin control de lepidópteros .....	15
2.3.1. Ciclo agrícola 2010/11 .....	15
2.3.2. Ciclo agrícola 2011/12 .....	18
3. RESULTADOS .....	20
3.1. Ensayos con control de lepidópteros .....	20
3.1.1. Localidades de Argentina, 2010/11 .....	20
3.1.2. Localidades de Estados Unidos, 2010 .....	23
3.2. Ensayos sin control de lepidópteros .....	25
3.2.1. Ciclo agrícola 2010/11 .....	25
3.2.2. Ciclo agrícola 2011/12 .....	32
4. DISCUSIÓN.....	45
4.1. Ensayos con control de lepidópteros .....	45
4.2. Ensayos sin control de lepidópteros .....	47
5. CONCLUSIONES.....	54
6. BIBLIOGRAFÍA .....	55
ANEXO I.....	63
ANEXO II .....	66

## RESUMEN

La soja [*Glycine max* (L.) Merrill] es el principal cultivo en Argentina. Entre los factores limitantes del cultivo, los lepidópteros pueden causar pérdidas significativas de rendimiento. Los agroquímicos son comúnmente utilizados para controlar estos insectos, a pesar de los perjuicios que ocasionan a la salud humana y al ambiente. Otra alternativa de control sería el uso de variedades resistentes a estos insectos. El objetivo de este trabajo fue evaluar la eficacia en el control de lepidópteros en la región Pampeana y el comportamiento agronómico de líneas transgénicas de soja portadoras de genes de *Bacillus thuringiensis*. Se evaluaron 20 líneas transgénicas portadoras de las construcciones PHP1, PHP2 ó PHP3 y sus isolíneas negativas, en ensayos con y sin control de lepidópteros. Las especies predominantes fueron *Rachiplusia nu* (Guenée), *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) y *Helicoverpa gelotopoeon* (Dyar). Las líneas portadoras de PHP1 y las de PHP3 no mostraron alteraciones en el comportamiento agronómico respecto a sus isolíneas negativas. En estas líneas la defoliación, el número de larvas por metro y el daño de brotes y vainas fue menor que en las isolíneas negativas, y tuvieron un mayor rendimiento que estas en los ambientes con mayores densidades poblacionales. Las líneas portadoras de PHP2 tuvieron diferencias en altura de planta en el estadio R2, en días de siembra a madurez y en rendimiento, respecto de sus isolíneas negativas. Si bien estas líneas mostraron un control similar de *Rachiplusia nu* y *Anticarsia gemmatalis*, ejercieron un control parcial de *Helicoverpa gelotopoeon*. Las líneas portadoras de PHP1 y las de PHP3 serían las más promisorias para ser avanzadas en un programa de mejoramiento genético.

## ABSTRACT

### **Evaluation of Transgenic Soybean Lines Resistant to Lepidopteran Pests in the Pampas Region**

Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] is the main crop in Argentina. Chemical control is commonly used to reduce yield losses caused by lepidopteran pests to this crop. Insect resistant varieties could be an alternative to chemical control. The objective of this study was to evaluate the efficacy against lepidopteran pests and the agronomic performance of transgenic lines carrying genes from *Bacillus thuringiensis* in the Pampas region. Twenty lines carrying PHP1, PHP2 or PHP3 constructs and their negative isolines were evaluated. Predominant species were *Rachiplusia nu*, *Anticarsia gemmatalis* and *Helicoverpa gelotopoeon*. Agronomic performance of lines carrying PHP1 or PHP3 was similar to negative isolines. Defoliation, amount of larvae per meter and shoot and pod damage were lower in positive than in negative isolines, and the positives showed higher yield in environments with higher lepidopteran densities. Lines containing PHP2 showed differences in plant height at R2, maturity and yield compared with negative isolines. Lines carrying this construct showed high efficacy against *Rachiplusia nu* and *Anticarsia gemmatalis*, but presented partial control of *Helicoverpa gelotopoeon*. Lines containing constructs PHP1 or PHP3 are the most promising to be advanced for further breeding.

# 1. INTRODUCCIÓN

La soja [*Glycine max* (L.) Merrill] pertenece a la familia Fabaceae (USDA, 2013) y es originaria de China. Fue por primera vez sembrada en Argentina en el año 1862, aunque no tuvo mayor difusión hasta la década de 1960, siendo en 1962 la primera exportación de grano (Giorda, 1997). Actualmente es el principal cultivo agrícola en el país. Durante el ciclo Agrícola 2011/12 se sembraron 18,7 millones de hectáreas y se produjeron 40,1 millones de toneladas, siendo la Argentina el tercer productor mundial de grano y el principal exportador de aceite y de harina de soja. La provincia de Buenos Aires produce cerca del 40 % del total de grano de este cultivo, siguiendo en importancia Córdoba, Santa Fé y Entre Ríos, sumando entre estas cuatro provincias el 91 % del total de producción del país (MinAgri, 2012a).

Las plagas constituyen un factor limitante para el desarrollo del cultivo de la soja, dado que pueden producir significativas pérdidas de rendimiento. Entre las principales plagas que afectan a este cultivo encontramos diferentes especies de lepidópteros (Aragón *et al.*, 1997). Las orugas defoliadoras más importantes en la mayor parte del área de cultivo de soja de Argentina son la Oruga de las Leguminosas (*Anticarsia gemmatalis* Hübner) y la Oruga Medidora (*Rachiplusia nu* Guenée) (Perotti y Gamundi, 2007). Otras especies que pueden causar defoliaciones importantes al cultivo son: *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), *Dichroplus sp.*, *Megascelis sp.*, *Achyra sp.* (antiguamente denominada *Loxostge sp.*), *Spilosoma virginica* (Fabricius), *Spodoptera cosmioides* (Walker), *Helicoverpa gelotopoeon* (Dyar) y *Pseudoplusia includens* (Walker) (Perotti y Gamundi, 2009). Algunos de estos insectos pueden causar otros daños al cultivo, tal como lo hace la Oruga Bolillera (*Helicoverpa gelotopoeon*), la cual causa daño en brotes y tallos tiernos cuando las plantas son pequeñas, y en estadíos reproductivos avanzados puede producir daño a las vainas o bien al grano en formación (Aragón, 2002).

Entre las Orugas Medidoras encontramos dos especies que pueden dañar el cultivo de soja, *Rachiplusia nu* y *Pseudoplusia includens*. Comúnmente resulta dificultosa su identificación a campo a pesar de que ambas especies son completamente diferenciables en los estados preimaginales (huevo, estadíos larvales y pupa). Durante los estadíos larvales estas se diferencian en la disposición de setas, morfología de la mandíbula, presencia o ausencia de microespinas, tamaño de los pináculos y presencia o ausencia de espuripedios vestigiales, entre otros caracteres (Barrionuevo, 2011).

La defoliación afecta al cultivo produciéndole una disminución en el área foliar. Esta pérdida de área foliar puede provocar disminuciones de rendimiento por una menor intercepción de luz, que a su vez provoca una reducción de la fotosíntesis por parte de la canopia, pérdida de material transportable acumulado en hojas y acortamiento del período efectivo de llenado de granos (Board *et al.*, 1994).

El cultivo de soja responde a la defoliación de acuerdo a la duración e intensidad de la misma, el estado de desarrollo del cultivo, características de las plantas tales como estructura del canopeo, hábito de crecimiento y senescencia demorada, y a factores ambientales y de manejo (Perotti y Gamundi, 2009). Durante los estadios vegetativos un determinado nivel de defoliación tiene un menor efecto en el rendimiento que aquellos que ocurren después de la floración, durante la formación de vainas y el llenado de granos (Fehr *et al.*, 1981). Cuando este tipo de daño sucede durante los estadios R5-R5.5 se producen las mayores disminuciones de rendimiento, siendo entonces estos estadios los más críticos para la defoliación en el cultivo de soja (Board *et al.*, 1994; Board *et al.*, 2010; Fehr *et al.*, 1981; Goli y Weaver, 1986). Fehr *et al.* (1981) determinaron mermas de rendimiento del 80 % en el estadio R5.5 con defoliaciones del 100 %. Board *et al.*, (2010) encontraron resultados similares evaluando las mermas de rendimiento durante el período de llenado de granos, determinando reducciones de hasta el 78% con defoliaciones totales a comienzos de este período, entre R5 y R5.6, las cuales disminuyeron progresivamente hacia fines del llenado de granos donde estas fueron de un 14 %. Estos autores hallaron mermas de rendimiento significativas con defoliaciones de 33 % durante el comienzo de llenado de granos, mientras que Perotti y Gamundi (2009) encontraron mermas significativas de rendimiento con defoliaciones a partir de 15 % en soja de primera época de siembra.

Diversos insecticidas son comúnmente aplicados para el control de insectos, pero estos no siempre son efectivos (Aragón *et al.*, 1997) y algunas especies se han vuelto resistentes a los mismos (Thomas y Boethel, 1994). El control químico, además de poseer un alto costo económico, tiene efectos perjudiciales sobre la entomofauna benéfica (Massaro *et al.*, 2005), el medioambiente y la salud humana (Bravo *et al.*, 2011). Esto ha conducido al intento de disminuir la cantidad de aplicaciones mediante el uso de tácticas que tienen en cuenta el ambiente y la dinámica de las plagas, conocidas como Manejo Integrado de Plagas, el cual como una de sus herramientas propone la utilización de variedades resistentes a insectos. La susceptibilidad de los lepidópteros a los insecticidas difiere de acuerdo a cada especie.

*Rachiplusia nu* es una especie muy sensible por lo que requiere bajas dosis para su control, mientras que *Helicoverpa gelotopoeon* necesita en muchos casos dosis mayores que esta y que otras especies tales como *Anticarsia gemmatalis*, *Achyra bifidalis* (Guenée) y *Spodoptera frugiperda*. Además, si bien el control de *Helicoverpa gelotopoeon* no reviste complicaciones en estadios tempranos de desarrollo del cultivo, durante las etapas reproductivas la protección proporcionada a las larvas por el sistema foliar y las vainas lo vuelven más dificultoso (Aragón *et al.*, 1997).

Además de insecticidas de origen químico se utiliza como biopesticida la bacteria *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) para el control de larvas de insectos de diferentes órdenes, tales como lepidópteros, coleópteros y dípteros. Durante la esporulación esta bacteria produce proteínas de inclusión en forma de cristales, llamadas toxinas Cry o Cyt (Bravo *et al.*, 2011). Al ingerir los cristales, los mismos se solubilizan por la alcalinidad existente en el intestino medio de la larva liberando las toxinas activas. Estas se unen a receptores específicos en las microvellocidades de las células intestinales, lo cual conduce a la formación de poros que producen la disrupción de la regulación osmótica de las células del epitelio intestinal del insecto. Las células pierden su función produciéndose entonces la lisis celular y consecuentemente la muerte de la larva (Gill, 1995).

Las toxinas Cry se clasifican en 72 tipos diferentes (Cry1–Cry72), en base a la secuencia del aminoácido primario (Crickmore *et al.*, 2012). A pesar de la gran cantidad de toxinas Cry, sólo unas pocas se utilizan comercialmente (Bravo y Sobero, 2008). Esto es debido a que no todas resultan tóxicas cuando son probadas en bioensayos con insectos, y sólo unas pocas son tóxicas contra plagas importantes (Peferoen, 1997).

A través del mejoramiento genético tradicional ha sido dificultosa la obtención de variedades de soja resistentes a insectos de buen comportamiento agronómico y de alto potencial de rendimiento (All *et al.*, 1989). Se han identificado fuentes de resistencia a la defoliación por insectos de tipo cuantitativa (Sisson *et al.*, 1976; Rufener *et al.*, 1989), lo cual hace dificultosa la introducción en el material elite de los programas de mejoramiento. Además, las introducciones utilizadas como fuentes de resistencia tienen poca aptitud agronómica, lo que incrementa los problemas de arrastre de genes desfavorables por ligamiento (Kilen y Lambert, 1986; Zhu *et al.*, 2006). Debido a la limitada disponibilidad de cultivares elite resistentes, la incorporación de genes de otras especies mediante ingeniería

genética resultaría una alternativa para la obtención de variedades transgénicas resistentes a insectos de alto potencial de rendimiento (Walker *et al.*, 2000).

La transformación genética ha permitido al mejoramiento vegetal superar barreras naturales tales como la incompatibilidad en el cruzamiento entre especies, permitiendo así la incorporación de genes de plantas muy alejadas desde el punto de vista evolutivo así como también de hongos, virus, bacterias y animales. Los métodos utilizados para la incorporación de transgenes, que permiten superar el obstáculo que constituye la pared celular al ingreso del ADN, se dividen en indirectos y directos. Dentro de los primeros se encuentra la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, y entre los segundos encontramos las técnicas de transformación de protoplastos y el bombardeo de microproyectiles (Díaz *et al.*, 2010).

La técnica de bombardeo con microproyectiles utiliza partículas de oro y tungsteno cubiertas con ADN que son aceleradas con gas comprimido para introducir las en las células sin matarlas, después de atravesar las paredes y membranas celulares. Luego de transferido el transgen al interior de la célula, se debe lograr la integración del mismo al ADN celular. Posteriormente se regenera una planta completa a partir de la célula portadora del ADN modificado utilizando la técnica de cultivo de tejidos *in vitro* (Díaz *et al.*, 2010). Klein *et al.*, (1987) fueron los primeros en obtener materiales transgénicos utilizando esta técnica, la cual les permitió introducir fragmentos de ácidos nucleicos en tejido epidérmico de cebolla (*Allium cepa* Linnaeus) que luego fueron expresados.

El transgen consta de una secuencia codificante, ubicada entre los codones de iniciación y terminación, y secuencias regulatorias que determinan el momento y nivel de expresión en la planta. Dentro de estas últimas el promotor constituye la secuencia más importante en la construcción del transgen, el cual sirve como sitio de unión de la ARN-polimerasa para comenzar el proceso de transcripción. Los promotores pueden ser modificados con el fin de aumentar el nivel de expresión del transgen. La posición del gen introducido dentro del genoma puede afectar el nivel y el patrón de expresión, lo cual se conoce como efecto de posición (Díaz *et al.*, 2010). El nivel y estabilidad de expresión del transgen pueden también ser fuertemente afectados por la estructura del *locus* del transgen, la cual puede variar considerablemente entre transformaciones independientes (Kohli *et al.*, 2003).

Los caracteres agronómicos de las plantas transgénicas pueden ser alterados respecto a los de las plantas no transformadas. Homrich *et al.*, (2008b), comparando el cultivar IAS5 de soja

con sus progenies transgénicas, encontraron diferencias en desarrollo inicial, fecha de floración, altura de planta, número de nudos, número semillas, peso de semillas y peso total de granos; pero no en fecha de emergencia, color de hipocótilo, de flor, de pubescencia, de hilo y del tegumento de la semilla, ni en hábito de crecimiento y madurez. Elmore *et al.* (2001) también determinaron diferencias de rendimiento entre líneas transgénicas de soja resistentes a glifosato y sus líneas hermanas no resistentes. Por el contrario, Maqbool y Christou (1999) no encontraron cambios en el fenotipo de plantas transgénicas de arroz al expresar genes extraños al cultivo, excepto cuando los niveles de expresión eran muy elevados. Filipecki y Malepszy (2006) atribuyen las diferencias en el comportamiento agronómico a posibles efectos pleiotrópicos del ADN introgresado, la influencia del sitio de integración y la arquitectura del transgen sobre el nivel de expresión y la estabilidad del transgen, y por último al estrés ocasionado por el manejo de tejido, la regeneración y la propagación clonal.

El cultivo transgénico de soja ha tenido una gran difusión desde su ingreso en la Argentina. La superficie sembrada con variedades de soja transgénica fue del 0,15 % durante el ciclo agrícola 1996/97, alcanzando el 98 % en el 2004/05 (SAGPyA, 2009). Actualmente la totalidad de la soja cultivada en la Argentina es transgénica (American Soybean Association, 2012).

El desarrollo de líneas de soja que posean genes que expresan delta-endotoxinas (proteínas Cry) provenientes de *Bacillus thuringiensis* parecería promisorio para el control de insectos (Homrich *et al.*, 2008b). Esta tecnología ha sido utilizada en híbridos de maíz y variedades de algodón para el control de diferentes especies de lepidópteros, estando disponibles para los productores en Argentina desde 1998 para ambos cultivos (SAGPyA, 2009). Parrott *et al.* (1994) fueron los primeros en informar de la obtención de líneas experimentales de soja transgénica portadoras de un gen Bt. Las plantas evaluadas en ese estudio, que expresan el gen *cryIAb*, fueron transformadas mediante bombardeo de microproyectiles. Posteriormente se desarrollaron líneas que expresan el gen sintético *cryIAc* (Stewart *et al.*, 1996; Homrich *et al.*, 2008a) y otras que expresan el gen sintético *tic107* el cual codifica para una proteína similar a CryIAc (MacRae *et al.*, 2005; McPherson y MacRae, 2009b), siendo en el primer caso obtenidas mediante bombardeo con microproyectiles y en el segundo por transformación mediada por *Agrobacterium*. En el año 2012, la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca autorizó en Argentina la producción y comercialización de

soja portadora de los eventos biotecnológicos MON87701 y MON89788 que confieren protección contra ciertos insectos lepidópteros y tolerancia al herbicida glifosato, respectivamente (MinAgri, 2012b). En Brasil estos eventos apilados en el cultivo de soja fueron autorizados previamente, en el año 2010 (CTNBio, 2010). El evento MON87701 expresa la proteína insecticida sintética similar a Cry1Ac (Bernardi *et al.*, 2012).

Diversos autores (MacRae *et al.*, 2005; Miklos *et al.*, 2007; Homrich *et al.*, 2008b; McPherson y MacRae, 2009a; b; Bernardi *et al.*, 2012) informaron que diferentes líneas Bt de soja tuvieron un control eficaz de especies de lepidópteros tales como *Anticarsia gemmatalis*, *Pseudoplusia includens*, *Epinotia aporema* (Walsingham), *Spilosoma virginica*, *Helicoverpa zea* (Boddie), *Rachiplusia nu*, etc. Walker *et al.* (2000) evaluaron la línea 7b transgénica Bt del cultivar Jack y encontraron adecuados niveles de resistencia a las especies *Helicoverpa zea*, *Anticarsia gemmatalis*, *Pseudoplusia includens* y *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller), sin embargo obtuvieron un menor control de *Helicoverpa zea* que de *Anticarsia gemmatalis*. Luttrell *et al.* (1999) también hallaron una menor susceptibilidad de *Helicoverpa zea* respecto de *Heliothis virescens* cuando expusieron a un amplio rango de colonias de estas especies a diferentes endotoxinas y formulaciones comerciales Bt.

La susceptibilidad de los insectos a las toxinas Bt varía entre las diferentes poblaciones, dependiendo de cada especie (Luttrell *et al.*, 1999). Los insectos se pueden volver resistentes a las toxinas Cry, siendo la resistencia controlada genéticamente y basada en la disminución de la susceptibilidad de una población a una determinada toxina (Bravo y Sobero, 2008). Tabashnik *et al.* (2008) monitorearon globalmente seis especies de lepidópteros durante una década y encontraron que algunas poblaciones de *Helicoverpa zea* aumentaron la resistencia a toxinas Cry1Ac. El apilamiento de genes Bt que expresen toxinas con diferentes sitios de unión, sería una herramienta útil para retrasar el desarrollo de la resistencia (Walker *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2011). Esta estrategia permitiría contar con un más amplio espectro de control de insectos (Chitkowski *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2011) y una mayor durabilidad de la resistencia (Zhao *et al.*, 2003).

Dada la importancia del cultivo de soja, las pérdidas de rendimiento normalmente ocasionadas por diferentes especies de lepidópteros y los perjuicios que ocasiona el control químico, surge la necesidad de obtener variedades resistentes a estos insectos. La complejidad para su obtención mediante mejoramiento convencional y los avances de la biotecnología, resaltan la importancia de evaluar la efectividad de la transgénesis para incorporar genes en

variedades elite de soja que permitan el control de lepidópteros y no modifiquen su comportamiento agronómico.

## **HIPÓTESIS**

Las líneas transgénicas de soja portadoras de las construcciones PHP1, PHP2 ó PHP3, que expresan proteínas Bt, son resistentes a las especies de lepidópteros que se presentan naturalmente en ambientes de la región Pampeana y su comportamiento agronómico no difiere del de las isolíneas que no las portan.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general:**

Evaluar la eficacia en el control de poblaciones de lepidópteros en ambientes de la región Pampeana y el comportamiento agronómico de líneas transgénicas de soja portadoras de las construcciones PHP1, PHP2 o PHP3 que codifican para la síntesis de proteínas Bt.

### **Objetivos específicos:**

- Caracterizar las poblaciones de lepidópteros presentes durante el ciclo del cultivo, identificando las especies que componen la población y el número de individuos de cada especie.
- Comparar el comportamiento agronómico de las líneas transgénicas de soja que expresan proteínas Bt con el de las isólinas que no las expresan.
- Determinar la eficacia de las líneas transgénicas de soja que expresan proteínas Bt ante infestaciones naturales de lepidópteros.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Material genético

Se evaluaron 20 líneas transgénicas de soja que expresan proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis*. Estas líneas fueron obtenidas a través de la transformación genética de una variedad elite de Dupont Pioneer, nombrada de ahora en más como PHI38. Esta variedad se transformó con tres construcciones diferentes, que para este trabajo se las denomina PHP1, PHP2 y PHP3.

Las construcciones contienen diferentes genes, desarrollados por Dupont Pioneer, que codifican para la síntesis de proteínas Cry. Para los fines de este trabajo las proteínas se denominan como PrA y PrB. PHP2 contiene el gen que codifica para PrA, mientras que PHP1 y PHP3 contienen el gen que codifica para PrB. Estas últimas construcciones difieren en la secuencia del promotor que dirige la expresión de la proteína Cry. Para PHP1 y PHP2 se utilizó la misma secuencia del promotor, mientras que en PHP3 se utilizó una diferente. Todas las construcciones contienen además el gen marcador GM-HRA que confiere tolerancia a herbicidas que pertenecen a la clase de los inhibidores de la enzima acetolactato sintasa (Bedbrook *et al.*, 1995).

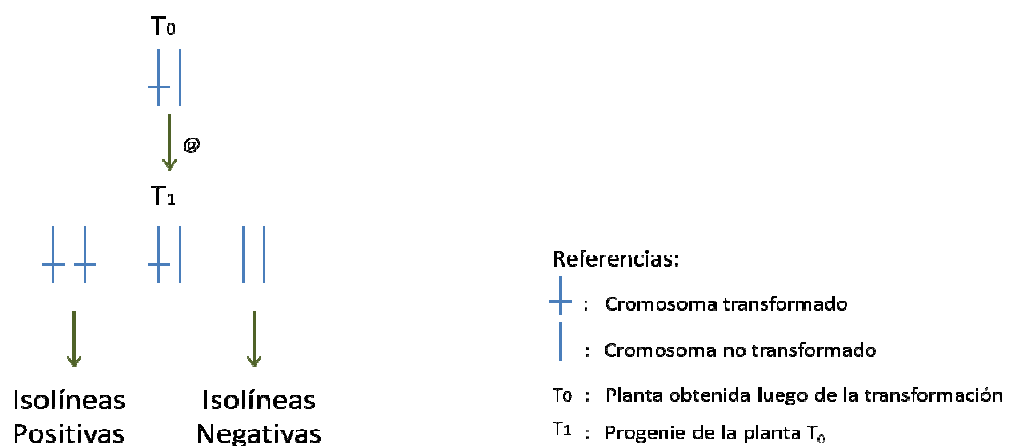
La variedad PHI38 fue transformada mediante bombardeo con microproyectiles (Klein *et al.*, 1987) con cada una de las construcciones, a partir de las cuales se originaron los eventos de transformación listados en la tabla 1. Las líneas portadoras de estos eventos corresponden a una generación T5, son homocigotas para el gen Bt introgresado y contienen una sola copia de este, lo cual fue corroborado mediante la técnica de Southern Blot (Southern, 1975).

**Tabla 1.** Líneas Bt de acuerdo a la proteína que expresan, construcción utilizada para la transformación genética y evento de transformación.

Proteína	Construcción	Evento	Línea
PrB	PHP1	EN01	1
		EN02	2
		EN03	3
		EN04	4
		EN05	5
		EN06	6
		EN07	7
PrA	PHP2	EN08	8
		EN09	9
		EN10	10
		EN11	11
		EN12	12
		EN13	13
PrB	PHP3	EN14	14
		EN15	15
		EN16	16
		EN17	17
		EN18	18
		EN19	19
		EN20	20

Se incluyeron además de las líneas Bt mencionadas anteriormente (isolíneas positivas), las isolíneas negativas de cada una de estas líneas. Las isolíneas negativas son aquellas que no portan el transgen y se derivaron de la progenie de una planta que resultó positiva luego del proceso de transformación (figura 1).

**Figura 1:** Esquema de la obtención de isolíneas positivas y negativas luego del proceso de transformación genética.



La variedad PHI38 es clasificada como grupo de madurez 3,8 y se encuentra bien adaptada a las localidades en las que se realizaron los ensayos.

Se realizaron dos tipos de experimentos, uno con el objetivo de evaluar el comportamiento agronómico de las líneas Bt en ensayos sin presencia de lepidópteros (“ensayos con control de lepidópteros”). El otro se realizó para evaluar la eficacia de las líneas Bt ante infestaciones naturales de lepidópteros presentes en las localidades de estudio (“ensayos sin control de lepidópteros”). Ambos tipos de ensayos se detallan a continuación.

## 2.2. Ensayos con control de lepidópteros

Se condujeron ensayos en dos localidades de la provincia de Buenos Aires (Manuel Ocampo y Arrecifes) durante el ciclo agrícola 2010/11.

La unidad experimental consistió en parcelas de dos surcos de cuatro metros de longitud, separados a 0,7 m entre surcos. La densidad de siembra fue de 27,5 semillas por metro. La siembra se realizó con una sembradora experimental de cuatro surcos en las fechas que se muestran en la Tabla 2 para las diferentes localidades.

**Tabla 2.** Fechas de siembra de los ensayos con control de lepidópteros en cada una de las localidades de Argentina.

Localidad	Fecha
Manuel Ocampo	05/12/2010
Arrecifes	14/12/2010

El diseño experimental que se utilizó para este ensayo fue un diseño factorial en parcelas divididas con factores cruzados y anidados, con cuatro repeticiones.

En cuanto al manejo agronómico se trató la semilla con fungicida y se realizó la inoculación con *Bradirizobium japonicum* y aplicación de insecticida sobre el surco de siembra. Se aplicaron herbicidas pre y post emergentes y se realizó desmalezado manual en los casos en que fue necesario. Se realizaron controles con insecticidas y fungicidas de modo de evitar cualquier tipo de daño al cultivo.

Las variables evaluadas fueron: altura de planta, días desde siembra a madurez y rendimiento.

La altura de planta, expresada en centímetros, se midió desde el suelo hasta el nudo superior de una planta representativa de la parcela en los estadíos V3, R2 y R8. Para la determinación de los estadíos fenológicos del cultivo se utilizó la escala propuesta por Fehr *et al.* (1971).

La variable días desde siembra a madurez se midió como la cantidad de días transcurridos desde la siembra hasta que el 95 % de las vainas de la parcela alcanzaron el color de madurez.

El rendimiento se evaluó cosechando la totalidad de la parcela con una cosechadora experimental de dos surcos y se expresó en kilogramos por hectárea (Kg/ha), corregido al 13 % de humedad.

Con los datos obtenidos se realizó el Análisis de Varianza (ANVA) para cada una de las variables antes mencionadas con el programa estadístico SAS (SAS Institute, 2008). Se utilizó el modelo que se detalla a continuación:

$$Y_{ijklm} = \mu + \theta_i + \zeta_j + \delta_{k(j)} + \alpha_l + \beta_{m(i)} + \gamma_{mj} + (\theta\zeta)_{ij} + (\theta\delta)_{ik(j)} + (\theta\alpha)_{li} + (\zeta\alpha)_{jl} + (\alpha\delta)_{lk(j)} + (\theta\alpha\zeta)_{ijl} + (\theta\alpha\delta)_{ilk(j)} + \epsilon_{ijklm}$$

$Y_{ijklm}$ : variable respuesta

$\mu$ : media general

$\theta_i$ : efecto de la i-ésima localidad

$\zeta_j$ : efecto de la j-ésima construcción

$\delta_{k(j)}$ : efecto del k-ésimo evento anidado dentro de la j-ésima construcción

$\alpha_l$ : efecto de la l-ésima isolínea (este efecto se considera como la presencia o ausencia del transgen)

$\beta_{m(i)}$ : efecto del m-ésimo bloque anidado dentro de la i-ésima localidad

$\gamma_{mj}$ : error aleatorio correspondiente al bloque m-ésimo y a la j-ésima construcción (error de la parcela principal)

$(\theta\zeta)_{ij}$ : efecto de la interacción entre la i-ésima localidad y la j-ésima construcción

$(\theta\delta)_{ik(j)}$ : efecto de la interacción entre la i-ésima localidad y el k-ésimo evento anidado dentro de la j-ésima construcción

$(\theta\alpha)_{li}$ : efecto de la interacción entre la i-ésima localidad y la l-ésima isolínea

$(\zeta\alpha)_{jl}$ : efecto de la interacción entre la j-ésima construcción y a la l-ésima isolínea

$(\alpha\delta)_{lk(j)}$ : efecto de la interacción entre la l-ésima isolínea y del k-ésimo evento anidado dentro de la j-ésima construcción

$(\theta\alpha\zeta)_{ijl}$ : efecto de la interacción entre la i-ésima localidad, la l-ésima isolínea y la j-ésima construcción

$(\theta\alpha\delta)_{ijk(j)}$ : efecto de la interacción entre la i-ésima localidad, la l-ésima isolínea y el k-ésimo evento anidado dentro de la j-ésima construcción

$\epsilon_{ijklm}$ : error aleatorio

Al momento de realizar el ANVA acorde al modelo estadístico antes mencionado, y en caso de que las interacciones triples no fueran significativas ( $p \geq 0,05$ ), se eliminaron estas del modelo y se realizó nuevamente el ANVA. Lo mismo se realizó con las interacciones dobles en caso que estas no estuvieran involucradas en alguna de mayor orden que haya resultado significativa ( $p < 0,05$ ).

Se comprobó la normalidad y homogeneidad de varianzas para cada una de las variables, a través del análisis de los residuales y predichos resultantes del modelo estadístico utilizado. Para la evaluación de la normalidad se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnov y el gráfico con la distribución de frecuencias de los residuales comparada con las de una distribución normal teórica. El supuesto de homogeneidad de varianzas se analizó a través del gráfico de residuales versus predichos.

Se realizaron pruebas de comparaciones múltiples con el procedimiento LSMeans de SAS (SAS Institute, 2008) en los casos en que se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en los ANVA. En estas pruebas también se utilizó como límite para la significancia en las comparaciones, el 5 % de probabilidad.

Cuando la interacción entre los efectos Construcción, Isolínea y Localidad resultaron significativos ( $p < 0,05$ ), se procedió a la descripción de los resultados de la variable para cada localidad. De lo contrario se describieron a través de todas las localidades en conjunto.

Con el fin de validar los datos de rendimiento obtenidos en las localidades de Argentina, se condujeron ensayos en cinco localidades de Estados Unidos (Bevington, IA; Griswold, IA; Johnston, IA; Montezuma, IA; Mansfield, IL) durante el año 2010. La unidad y el diseño experimental, el manejo agronómico y el procedimiento estadístico, fueron los mismos a los utilizados en las localidades de Argentina pero difirieron en que se realizaron tres repeticiones por localidad, no contaron con inoculación con *Bradirizobium japonicum* ni aplicación de insecticida sobre el surco de siembra y solo se evaluó la variable rendimiento.

Las fechas de siembra de las localidades de Estados Unidos se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Fechas de siembra de los ensayos con control de lepidópteros en cada una de las localidades de Estados Unidos.

Localidad	Fecha
Bevington, IA	24/05/2010
Griswold, IA	23/05/2010
Johnston, IA	01/05/2010
Montezuma, IA	27/05/2010
Mansfield, IL	05/05/2010

### 2.3. Ensayos sin control de lepidópteros

Con el fin de evaluar la eficacia de las líneas Bt ante infestaciones naturales de lepidópteros se condujeron ensayos durante los ciclos agrícolas 2010/11 y 2011/12, los cuales se describen a continuación:

#### 2.3.1. Ciclo agrícola 2010/11

En cuanto al material genético, además de las isolíneas positivas y negativas antes mencionadas, se incluyó la variedad PHI38 sin transformar.

Los ensayos se realizaron en dos localidades, Pergamino (Buenos Aires) y General Paz (Córdoba).

La unidad experimental consistió en parcelas de cuatro surcos de cuatro metros de longitud, separados a 0,7 m entre surcos. La densidad, el método de siembra y el diseño experimental fueron los mismos que los utilizados en los ensayos con control de lepidópteros, con la diferencia de que en este caso se utilizaron 3 repeticiones. Se realizaron dos fechas de siembra en cada localidad para aumentar las probabilidades de lograr infestaciones naturales de lepidópteros durante el ciclo del cultivo (Tabla 4).

**Tabla 4.** Fechas de siembra de los ensayos sin control de lepidópteros durante el ciclo agrícola 2010/11.

Localidad	Fecha de siembra	Fecha
Pergamino	1 <sup>ra</sup>	08/12/2010
	2 <sup>da</sup>	28/12/2010
General Paz	1 <sup>ra</sup>	21/12/2010
	2 <sup>da</sup>	04/01/2011

En cuanto al manejo agronómico, se realizó de manera similar a los ensayos anteriormente mencionados a excepción del uso de insecticidas. Se realizó una aplicación de insecticida de corta residualidad en el estadio V4, con el objetivo de disminuir la población de artrópodos predadores de los lepidópteros (Chitkowski *et al.*, 2003; Massaro *et al.*, 2005). Luego de esta aplicación, en los casos en que otras especies plaga del cultivo diferentes de los lepidópteros superasen el umbral de daño económico, se procedió al control de las mismas mediante el uso de insecticidas específicos.

Los ensayos realizados en Pergamino contaron con riego complementario en los momentos en que las precipitaciones no fueron suficientes para cubrir la demanda del cultivo.

Las variables evaluadas fueron: defoliación, larvas de lepidópteros por metro y rendimiento.

La defoliación se midió a través de la estimación visual del área defoliada y se expresó como porcentaje. Para ello se tomaron al azar diez folíolos del estrato superior y diez del estrato inferior de las plantas y se determinó el área defoliada de cada uno. Estos valores fueron promediados para obtener el porcentaje de defoliación de cada parcela (Antonelli y Prieto, 2007; Perotti y Gamundi, 2007).

La población de lepidópteros se determinó en cada parcela mediante el uso de un paño vertical de un metro de ancho (Gamundi, 1995). El paño se colocó al costado del surco a evaluar y se golpearon las plantas para que caigan los insectos, inmediatamente se identificaron y registraron la cantidad de larvas de lepidópteros correspondiente a cada especie. Se tomaron dos muestras en los dos surcos centrales de cada parcela (McPherson y MacRae, 2009b). Esta variable se expresó como total de larvas por metro de surco. Para identificar la especie de las isocas medidoras, al momento del muestreo se colectaron 100 larvas de estas al azar a través de todo el ensayo para luego ser llevadas al laboratorio para su identificación a nivel de especie mediante el uso de una lupa. De esta manera se determinó la cantidad de individuos de cada especie y los resultados se expresaron como porcentaje del total de isocas medidoras.

Para determinar el momento oportuno en que se medirían las variables anteriormente descritas se registró la evolución de la población de lepidópteros y la defoliación a través del desarrollo del cultivo. Estas determinaciones se realizaron mediante muestreos semanales desde fines de la etapa vegetativa hasta fines de la etapa reproductiva, aproximadamente entre los estadios V5 y R7. Estas determinaciones se realizaron en parcelas distribuidas

homogéneamente dentro del ensayo, sembradas con la variedad PHI38 u otra de un grupo de madurez y arquitectura de planta similar. La cantidad de larvas de lepidópteros se obtuvo mediante un muestreo con paño vertical de un metro sobre diez de estas parcelas tomadas al azar. Se registró y expresó el número de larvas de lepidópteros del mismo modo al anteriormente mencionado. El porcentaje de defoliación se determinó visualmente en las mismas diez parcelas (Walker *et al.*, 2000).

El muestreo para la determinación del total de larvas de lepidópteros por metro se realizó cercano al máximo número de larvas por metro durante el ciclo del cultivo. De manera similar, la determinación de la defoliación se realizó cercana al máximo valor de defoliación durante el ciclo del cultivo.

El rendimiento se determinó cosechando los dos surcos centrales de la parcela con una cosechadora experimental de dos surcos. La expresión de esta variable y su corrección se hizo de igual manera que para los ensayos con control de lepidópteros.

Con los datos obtenidos se realizó el ANVA para cada una de las variables antes mencionadas, con el programa estadístico SAS (SAS Institute, 2008). Se aplicó el mismo modelo que el utilizado en los ensayos con control de lepidópteros para la comparación de las isolíneas positivas y negativas, así como para la comparación de las isolíneas positivas entre sí.

Para la comparación de las isolíneas positivas con la variedad PHI38 se utilizó el modelo que se describe a continuación:

$$Y_{ijkm} = \mu + \theta_i + \zeta_j + \delta_{k(j)} + \beta_{m(i)} + \gamma_{mj} + (\theta\zeta)_{ij} + (\theta\delta)_{ik(j)} + \varepsilon_{ijkm}$$

$Y_{ijkm}$ : variable respuesta

$\mu$ : media general

$\theta_i$ : efecto de la  $i$ -ésima localidad

$\zeta_j$ : efecto de la  $j$ -ésima construcción

$\delta_{k(j)}$ : efecto del  $k$ -ésimo evento anidado dentro de la  $j$ -ésima construcción

$\beta_{m(i)}$ : efecto del  $m$ -ésimo bloque anidado dentro de la  $i$ -ésima localidad

$\gamma_{mj}$ : error aleatorio correspondiente al bloque  $m$ -ésimo y a la  $j$ -ésima construcción (error de la parcela principal)

$(\theta\zeta)_{ij}$ : efecto de la interacción entre la  $i$ -ésima localidad y la  $j$ -ésima construcción

$(\theta\delta)_{ik(j)}$ : efecto de la interacción entre la i-ésima localidad y el k-ésimo evento anidado dentro de la j-ésima construcción

$\epsilon_{ijkm}$ : error aleatorio

Con ambos modelos se procedió de igual manera que en los ensayos con control de lepidópteros para el tratamiento de las interacciones, para la comprobación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas y para las pruebas de comparaciones múltiples.

En caso que los datos no se ajustaron a una distribución normal, se procedió a la transformación de los mismos de la manera más adecuada para cada caso.

### 2.3.2. Ciclo agrícola 2011/12

De las 20 líneas incluidas inicialmente en este trabajo, durante el segundo año de ensayos se continuaron evaluando las 12 líneas que avanzaron dentro del programa de mejoramiento de Dupont Pioneer (Tabla 5). En este caso las líneas correspondieron a una generación T6.

**Tabla 5.** Líneas Bt de acuerdo a la proteína que expresan, construcción utilizada para la transformación genética y evento de transformación, evaluadas en los ensayos sin control de lepidópteros durante el ciclo agrícola 2011/12.

Proteína	Construcción	Evento	Línea
PrB	PHP1	EN02	2
		EN04	4
		EN05	5
		EN06	6
		EN07	7
PrA	PHP2	EN08	8
		EN13	13
PrB	PHP3	EN14	14
		EN16	16
		EN17	17
		EN18	18
		EN20	20

Los ensayos se sembraron en Pergamino (Buenos Aires), General Paz (Córdoba) y Tinoco (Córdoba). Se realizó una fecha de siembra en cada una de las localidades de la Provincia de Córdoba y dos en Pergamino. En la tabla 6 se muestran las fechas de siembra para cada una de las localidades.

**Tabla 6.** Fechas de siembra de los ensayos sin control de lepidópteros durante el ciclo agrícola 2011/12.

Localidad	Fecha de siembra	Fecha
Pergamino	1 <sup>ra</sup>	05/01/2012
	2 <sup>da</sup>	16/01/2012
General Paz	Única	14/12/2011
Tinoco	Única	13/01/2012

La unidad y el diseño experimental, el manejo agronómico y el procedimiento estadístico, fueron los mismos a los utilizados durante el ciclo agrícola 2010/11 en los ensayos sin control de lepidópteros.

Las variables y la determinación de su medición también fueron las mismas que las descritas en el ciclo agrícola anterior. Además, en los ambientes en donde *Helicoverpa gelotopoeon* estuvo entre las especies predominantes, se evaluaron daños de brotes y vainas causados por esta especie y se realizó el análisis discriminando a esta dentro de la población de lepidópteros. En este último caso se procedió a segregar del total de larvas, la cantidad de larvas de *Helicoverpa gelotopoeon* por metro de surco y el total de larvas correspondientes a otras especies, expresado como total de larvas por metro excluyendo *Helicoverpa gelotopoeon*.

El daño de brotes se midió contando la cantidad de plantas con brotes dañados por *Helicoverpa gelotopoeon* del total de plantas en un metro de surco, tomando dos de estas muestras al azar por parcela en los dos surcos centrales. Los resultados se expresaron como porcentaje de brotes dañados. Esta evaluación se realizó en el estadio fenológico R1.

El daño de vainas se determinó mediante el conteo de las vainas dañadas por *Helicoverpa gelotopoeon* en todas las plantas de un metro de surco escogido al azar de los dos surcos centrales de cada parcela. Los resultados se expresaron como porcentaje de vainas afectadas sobre el total de vainas de las plantas consideradas. Esta medición se realizó a fines del período de llenado de granos, entre los estadios fenológicos R5.5 y R6.

### 3. RESULTADOS

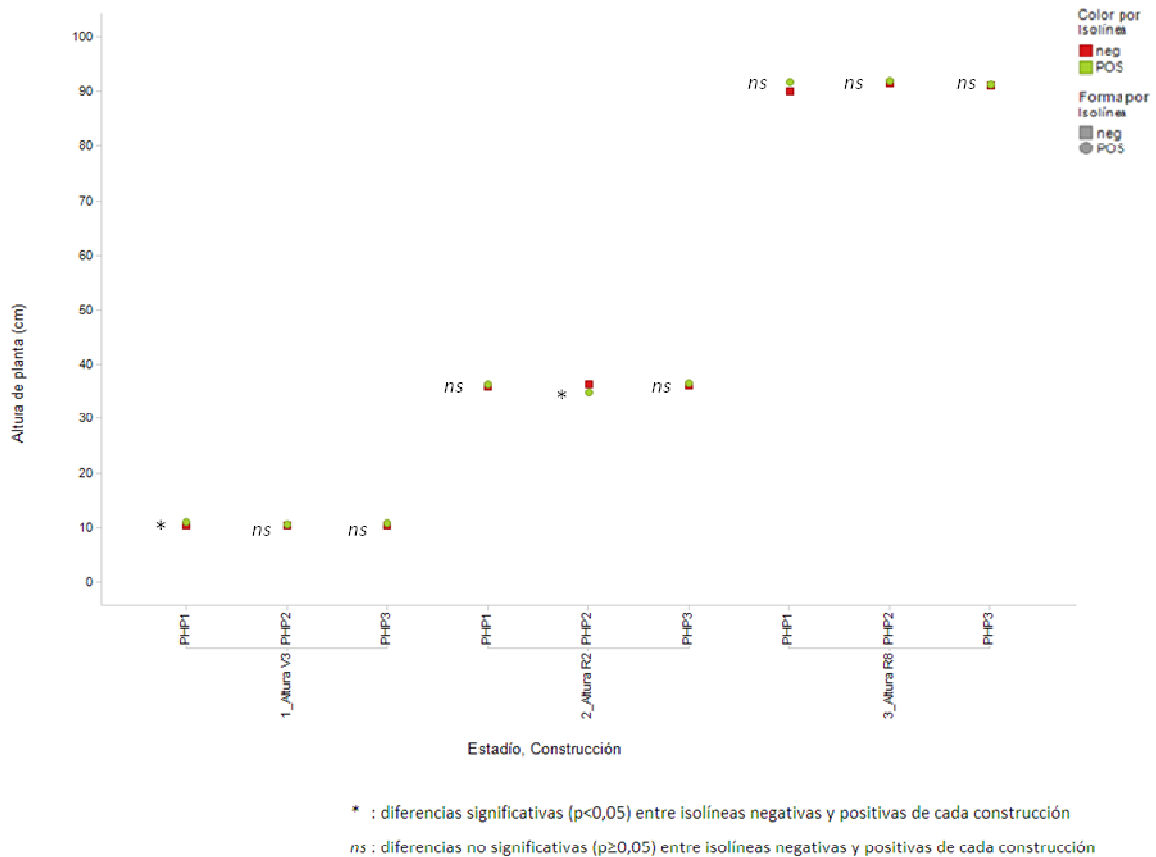
#### 3.1. Ensayos con control de lepidópteros

##### 3.1.1. Localidades de Argentina, 2010/11

###### Altura de planta:

Los valores promedio de altura de planta en los estadios fenológicos V3, R2 y R8 de las isólinas negativas y positivas de cada una de las construcciones se muestran en el Gráfico 1.

**Gráfico 1:** Altura de planta (cm) en los estadios fenológicos V3, R2 y R8 de las isólinas positivas y negativas de las construcciones PHP1, PHP2 y PHP3 en los ensayos con control de lepidópteros. Resultados promedio para las localidades de Argentina durante el ciclo agrícola 2010/11.



En el estadio V3 la altura de planta promedio de las isólinas negativas fue de 10,4 cm para PHP1 y de 10,5 cm para PHP2 y PHP3. En las isólinas positivas resultó de 10,9 cm para PHP1, de 10,7 cm para PHP2 y de 10,8 cm para PHP3. Las diferencias en altura de planta

entre las isolíneas negativas y positivas fueron significativas solo para PHP1. Cuando se compararon las isolíneas positivas de las tres construcciones, estas no difirieron significativamente entre sí.

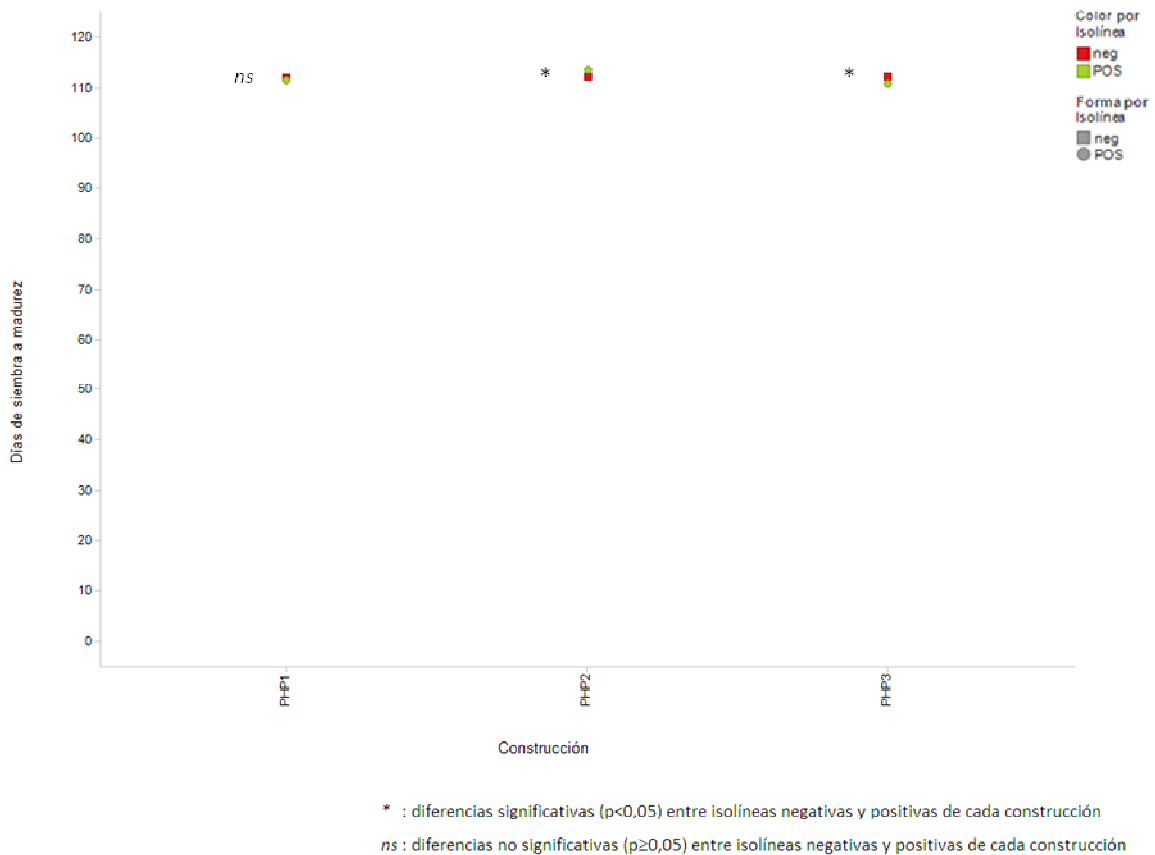
En el estadio R2 la altura de planta promedio resultó en las isolíneas negativas 36,1 cm para PHP1, 36,5 cm para PHP2 y 36,2 cm para PHP3; mientras que en las isolíneas positivas fue de 36,5 cm para PHP1, de 35,1 cm para PHP2 y de 36,7 cm para PHP3. Las diferencias de altura de planta entre las isolíneas negativas y positivas sólo resultaron significativas para PHP2. Cuando se compararon las isolíneas positivas entre construcciones, las de PHP2 difirieron significativamente de las de PHP1 y PHP3, mientras que las de estas últimas no presentaron diferencias significativas entre sí.

En el estadio R8 la altura de planta promedio de las isolíneas negativas fue de 90,1 cm para PHP1, de 91,6 cm para PHP2 y de 91,1 cm para PHP3. En las isolíneas positivas fue de 91,7 cm para PHP1, de 91,9 cm para PHP2 y de 91,2 cm para PHP3. Las isolíneas negativas no difirieron significativamente de las positivas para las tres construcciones. Cuando se compararon las isolíneas positivas entre construcciones, estas tampoco difirieron entre sí.

#### *Días desde siembra a madurez:*

La cantidad promedio de días desde siembra a madurez de las isolíneas negativas y positivas de las tres construcciones se muestra en el Gráfico 2.

**Gráfico 2:** Días de siembra a madurez de las isólineas positivas y negativas de las construcciones PHP1, PHP2 y PHP3 en los ensayos con control de lepidópteros. Resultados promedio para las localidades de Argentina durante el ciclo agrícola 2010/11.

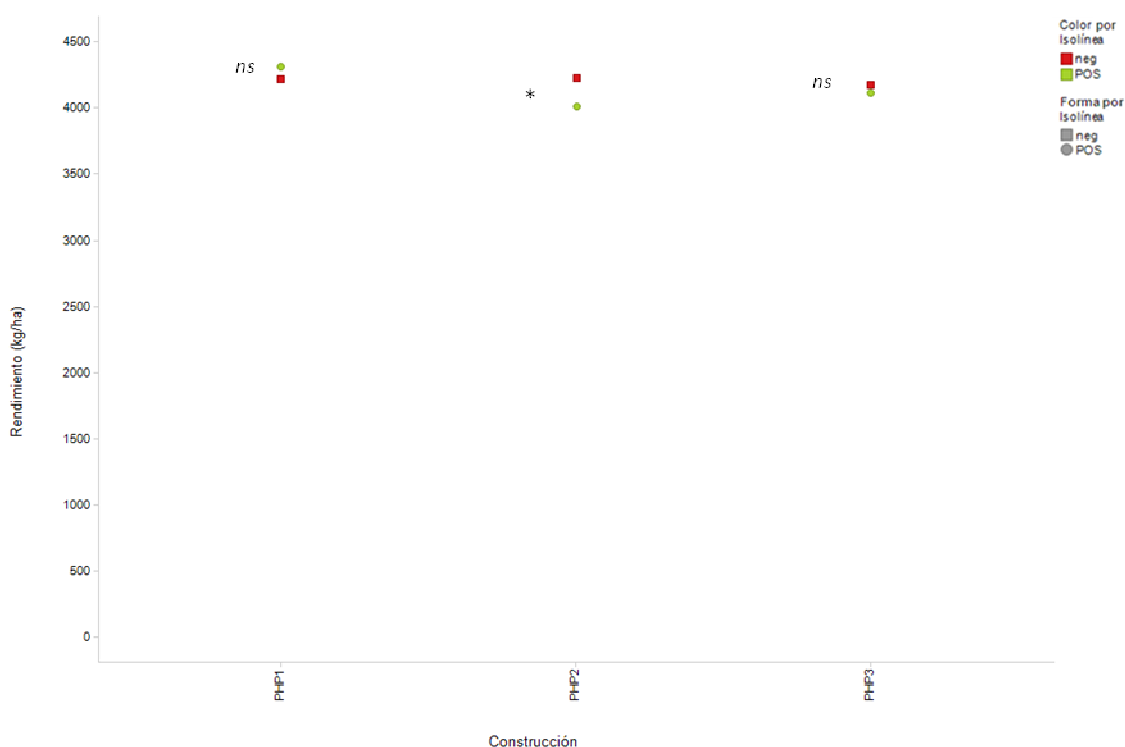


En las isólineas negativas la cantidad promedio de días desde siembra a madurez fue de 112 días para las tres construcciones, mientras que para las positivas fue de 112 días para PHP1, de 114 días para PHP2 y de 111 días para PHP3. Las isólineas negativas difirieron significativamente de las positivas para PHP2 y PHP3. Cuando se compararon las isólineas positivas entre construcciones, las de PHP1 y PHP3 no difirieron significativamente entre sí, pero sí lo hicieron las de PHP2 de las de PHP1 y PHP3.

### *Rendimiento:*

El rendimiento promedio de las isólineas negativas y positivas de cada una de las construcciones se presenta en el Gráfico 3.

**Gráfico 3:** Rendimiento (kg/ha) de las isólineas positivas y negativas de las construcciones PHP1, PHP2 y PHP3 en los ensayos con control de lepidópteros. Resultados promedio para las localidades de Argentina durante el ciclo agrícola 2010/11.



\* : diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre isólineas negativas y positivas de cada construcción  
 ns : diferencias no significativas ( $p \geq 0,05$ ) entre isólineas negativas y positivas de cada construcción

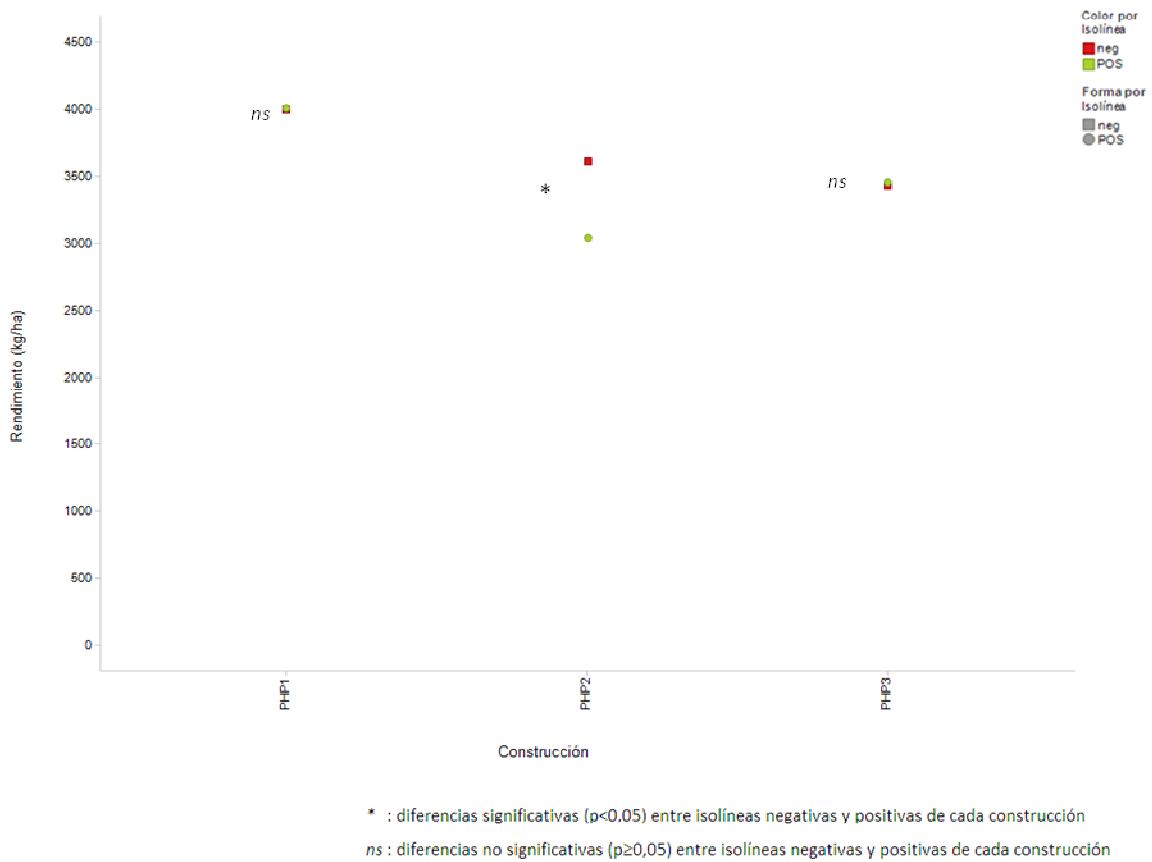
El rendimiento promedio de las isólineas negativas fue 4.217 kg/ha para PHP1, 4.226 kg/ha para PHP2 y 4.173 kg/ha para PHP3. En las isólineas positivas fue 4.306 kg/ha para PHP1, 4.011 kg/ha para PHP2 y 4.111 kg/ha para PHP3. Las isólineas negativas difirieron significativamente de las positivas solo para PHP2. Cuando se compararon las isólineas positivas entre construcciones, las de PHP1 tuvieron un rendimiento significativamente mayor al de las de PHP2 y PHP3, en tanto que las de estas últimas no difirieron entre sí.

### 3.1.2. Localidades de Estados Unidos, 2010

#### Rendimiento:

El rendimiento promedio de las isólineas negativas y positivas para cada una de las construcciones se muestra en el Gráfico 4.

**Gráfico 4:** Rendimiento (kg/ha) de las isólineas positivas y negativas de las construcciones PHP1, PHP2 y PHP3 en los ensayos con control de lepidópteros. Resultados promedio para las localidades de Estados Unidos durante el año 2010.



En las isólineas negativas el rendimiento promedio fue 3.997 kg/ha para PHP1, 3.613 kg/ha para PHP2 y 3.434 kg/ha para PHP3. Las isólineas positivas tuvieron un rendimiento promedio de 4.010 kg/ha para PHP1, 3.045 kg/ha para PHP2 y 3.455 kg/ha para PHP3. Al igual que en las localidades de Argentina, las isólineas negativas difirieron significativamente de las isólineas positivas solo para PHP2. Cuando se compararon las isólineas positivas de las tres construcciones, todas difirieron significativamente entre sí.

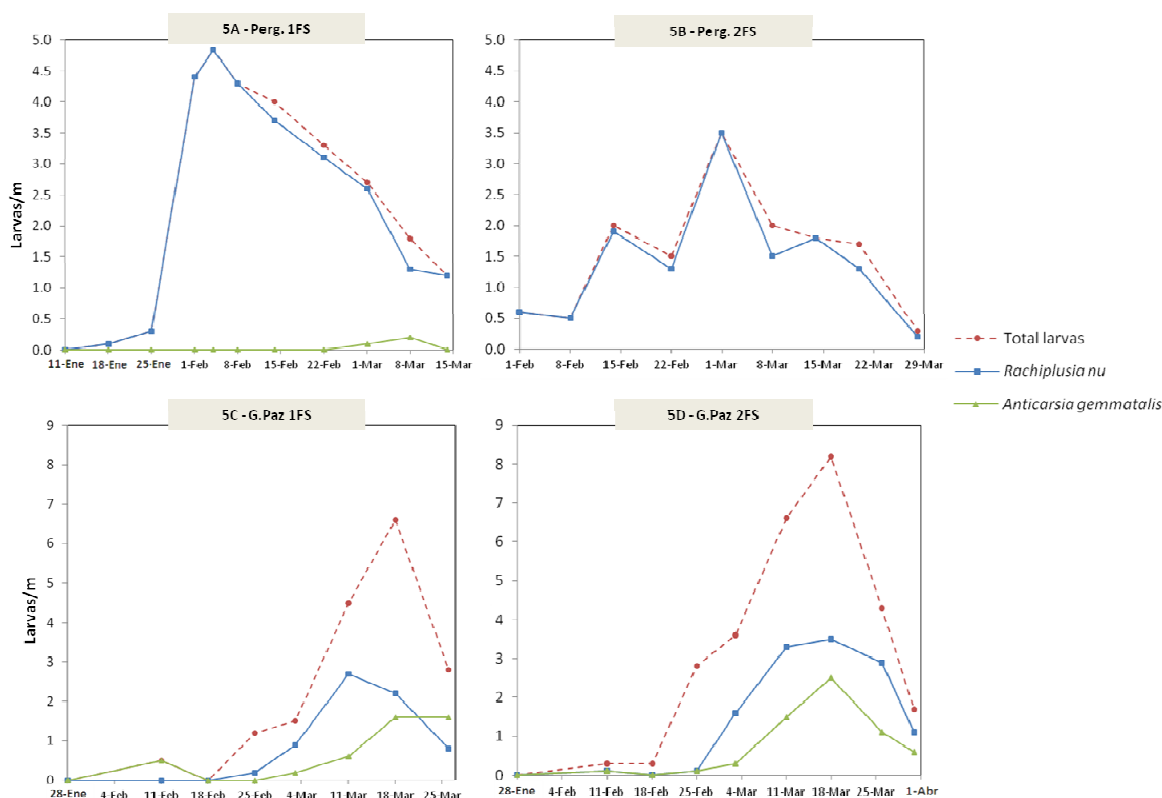
## 3.2. Ensayos sin control de lepidópteros

### 3.2.1. Ciclo agrícola 2010/11

#### *Poblaciones de lepidópteros:*

La evolución de la población de lepidópteros a través del desarrollo del cultivo en las localidades de Pergamino y General Paz, se muestra en el Gráfico 5.

**Gráfico 5:** Cantidad de larvas por metro obtenidas en los ensayos sin control de lepidópteros durante los muestreos semanales, en las dos fechas de siembra de Pergamino (5A primera fecha de siembra y 5B segunda fecha de siembra) y General Paz (5C primera fecha de siembra y 5D segunda fecha de siembra) durante el ciclo agrícola 2010/11.



En la primera fecha de siembra de Pergamino (Gráfico 5A), la máxima cantidad de larvas se registró a principios de febrero, alcanzando en promedio 4,8 larvas por metro (larvas/m). En la segunda fecha de siembra de la misma localidad, la máxima cantidad se presentó a principios de marzo, observándose 3,5 larvas/m.

En ambas fechas de siembra de Pergamino más del 90 % de las larvas identificadas pertenecieron a isocas medidoras de la especie *Rachiplusia nu*. Las otras especies presentes

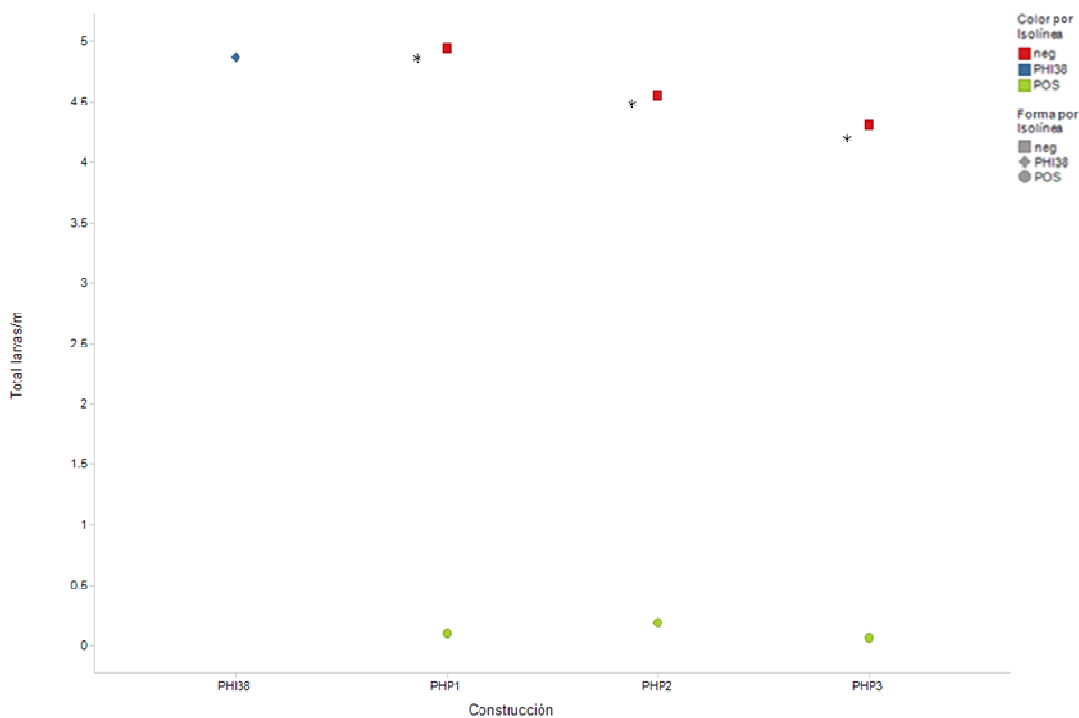
fueron *Helicoverpa gelotopoeon*, *Anticarsia gemmatalis*, *Spodoptera frugiperda*, *Achyra bifidalis* y *Colias lesbia* (Fabricius).

En los ensayos de General Paz el máximo número de larvas por metro se alcanzó a mediados de marzo, siendo 6,6 y 8,2 larvas/m para la primera y segunda fecha de siembra respectivamente (Gráficos 5C y 5D).

En ambas fechas de siembra de General Paz aproximadamente el 70 % de las larvas identificadas correspondió a isocas medidoras. Dentro de estas, *Rachiplusia nu* fue la especie de mayor importancia. *Pseudoplusia includens* se presentó en bajo número hacia fines del ciclo del cultivo. Un 25 % correspondió a *Anticarsia gemmatalis* y el 5 % restante a otras especies entre las que se identificaron *Helicoverpa gelotopoeon*, *Spodoptera cosmioides* y *Spodoptera frugiperda*.

El promedio a través de los cuatro ambientes del total de larvas por metro de las isolíneas negativas y positivas de las tres construcciones y de la variedad PHI38, se presenta en el Gráfico 6.

**Gráfico 6:** Total de larvas por metro de las isolíneas positivas y negativas de las construcciones PHP1, PHP2 y PHP3 y de la variedad PHI38 en los ensayos sin control de lepidópteros. Resultados promedio para las dos fechas de siembra de Pergamino y General Paz, durante el ciclo agrícola 2010/11.



\* : diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre isolíneas negativas y positivas de cada construcción  
 ns : diferencias no significativas ( $p \geq 0,05$ ) entre isolíneas negativas y positivas de cada construcción

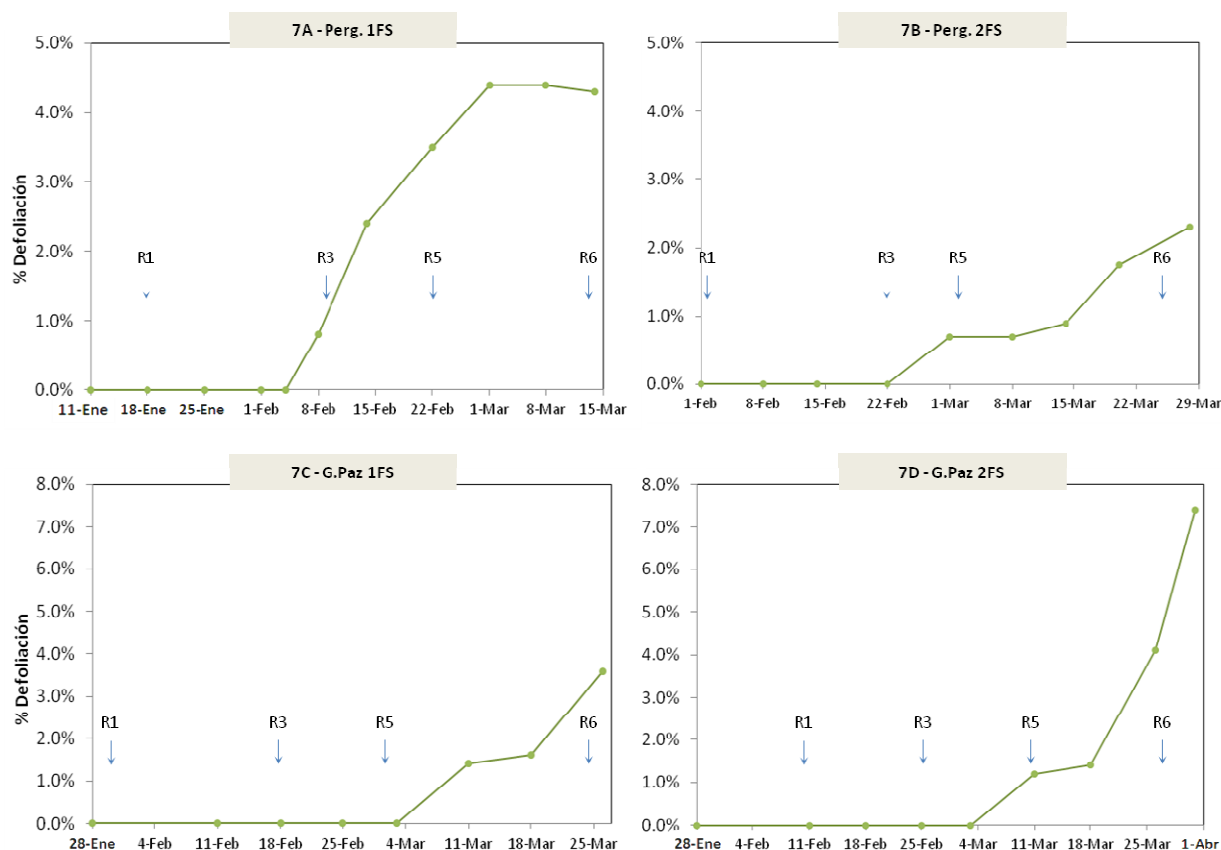
En las isolíneas negativas el total de larvas por metro promedio fue de 5 larvas/m para la construcción PHP1, de 4,6 larvas/m para PHP2 y de 4,3 larvas/m para PHP3. Mientras que el observado en las isolíneas positivas fue de 0,1 larvas/m para PHP1 y PHP3, y de 0,2 larvas/m para PHP2. Las diferencias en la cantidad de larvas entre las isolíneas negativas y positivas fueron significativas para todas las construcciones. Cuando se compararon entre sí las isolíneas positivas de las tres construcciones, estas no presentaron diferencias significativas en la cantidad promedio de larvas/m.

La variedad PHI38 tuvo una cantidad significativamente mayor de larvas/m que las isolíneas positivas de cada una de las construcciones.

### *Defoliación:*

La evolución de la defoliación a través del desarrollo del cultivo, se muestra en el Gráfico 7.

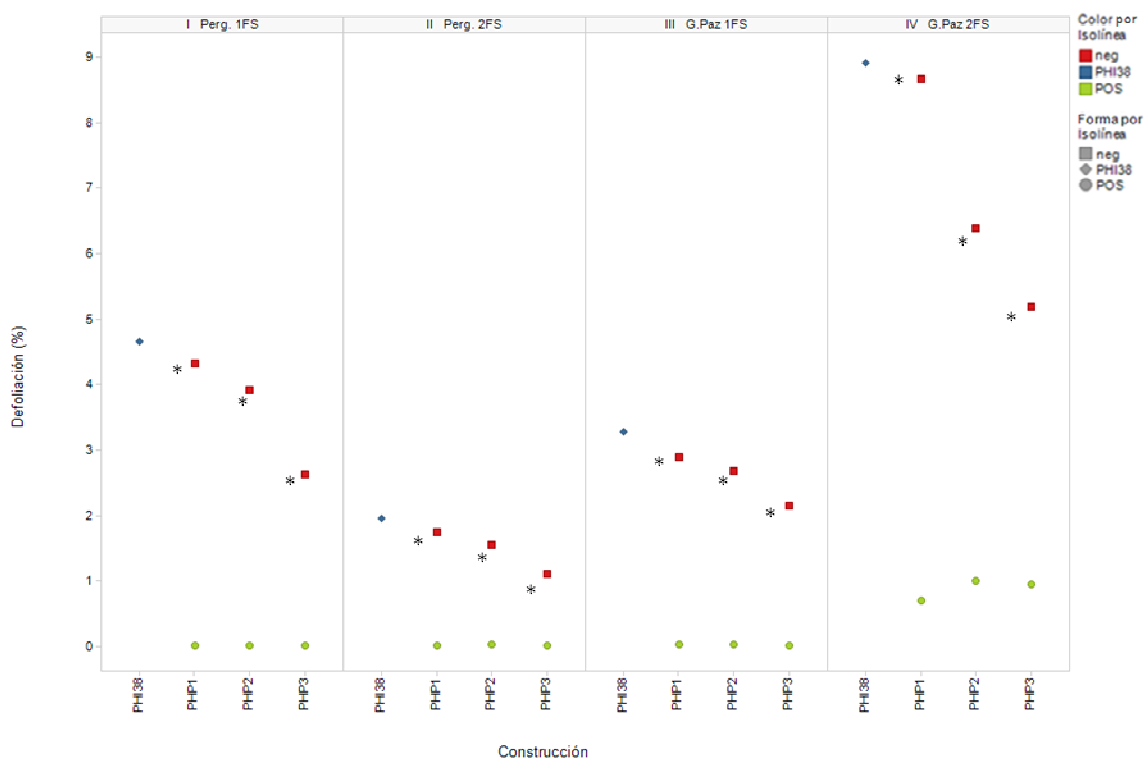
**Gráfico 7:** Porcentaje de defoliación obtenido en los ensayos sin control de lepidópteros durante los muestreos semanales, en las dos fechas de siembra de Pergamino (7A primera fecha de siembra y 7B segunda fecha de siembra) y General Paz (7C primera fecha de siembra y 7D segunda fecha de siembra) durante el ciclo agrícola 2010/11. Se indica con flechas azules sobre el gráfico el momento de ocurrencia de los estadios fenológicos (R1, R3, R5 y R6).



En la primera fecha de siembra de Pergamino la defoliación comenzó a principios de febrero y alcanzó el máximo de 4,4 % a principios de marzo (Gráfico 7A). En la segunda fecha de siembra la máxima defoliación alcanzada fue de 2,3 % a fines de marzo (Gráfico 7B). En los ensayos de General Paz la máxima defoliación se registró a fines de marzo, la cual fue de 3,6 % para la primera fecha de siembra y de 7,4 % para la segunda (Gráficos 7C y 7D).

La defoliación promedio de las isolíneas negativas y positivas de las tres construcciones y de la variedad PHI38 en cada uno de los ambientes, se presenta en el Gráfico 8.

**Gráfico 8:** Porcentaje de defoliación de las isólineas positivas y negativas de las construcciones PHP1, PHP2 y PHP3 y de la variedad PHI38 en los ensayos sin control de lepidópteros. Resultados para las dos fechas de siembra de Pergamino y General Paz, durante el ciclo agrícola 2010/11.



\* : diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre isólineas negativas y positivas de cada construcción  
 ns : diferencias no significativas ( $p \geq 0,05$ ) entre isólineas negativas y positivas de cada construcción

En la primera fecha de siembra de Pergamino la defoliación de las isólineas negativas fue de 4,3 % para PHP1, de 3,9 % para PHP2 y de 2,6 % para PHP3. En las isólineas positivas fue cercana a cero para las tres construcciones. La defoliación en la variedad PHI38 fue de 4,7 %.

En la segunda fecha de siembra de Pergamino la defoliación de las isólineas negativas fue de 1,8 % para PHP1, de 1,6 % para PHP2 y de 1,1 % para PHP3. En las isólineas positivas fue de 0,03 % para las tres construcciones. La defoliación en la variedad PHI38 fue de 2 %.

En la primera fecha de siembra de General Paz la defoliación de las isólineas negativas fue de 2,9 % para la construcción PHP1, de 2,7 % para PHP2 y de 2,2 % para PHP3, mientras que para las isólineas positivas fue de 0,03 % para las tres construcciones. La defoliación en la variedad PHI38 fue de 3,3 %.

En la segunda fecha de siembra de General Paz la defoliación de las isólineas negativas fue de 8,7 % para PHP1, de 6,4 % para PHP2 y de 5,2 % para PHP3. La defoliación en las

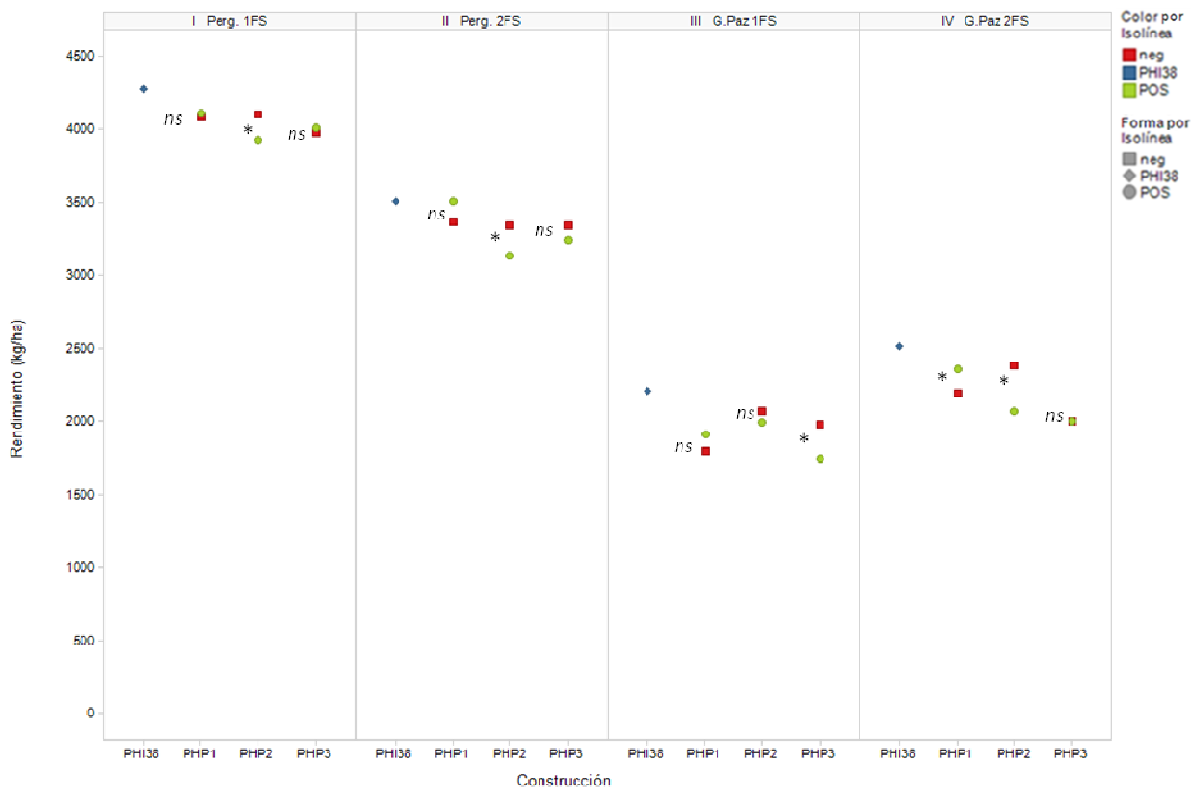
isolíneas positivas fue de 0,7 % para PHP1, de 1 % para PHP2 y PHP3. La defoliación en la variedad PHI38 fue de 8,9 %.

En todos los ambientes la defoliación de las isolíneas positivas fue significativamente menor a la de las isolíneas negativas y a la de la variedad PHI38. Cuando se compararon las isolíneas positivas de las tres construcciones, no hubo diferencias significativas entre estas en los ensayos de Pergamino y en la primera fecha de siembra de General Paz. En la segunda fecha de siembra de General Paz la defoliación de las isolíneas positivas de la construcción PHP1 fue significativamente menor a la de las de PHP2 y PHP3, mientras que en estas últimas las diferencias no resultaron significativas cuando se compararon entre sí.

**Rendimiento:**

El rendimiento promedio de las isolíneas negativas y positivas de las tres construcciones y de la variedad PHI38, se muestra en el Gráfico 9 para cada uno de los ambientes.

**Gráfico 9:** Rendimiento (kg/ha) de las isolíneas positivas y negativas de las construcciones PHP1, PHP2 y PHP3 y de la variedad PHI38 en los ensayos sin control de lepidópteros. Resultados para las dos fechas de siembra de Pergamino y General Paz, durante el ciclo agrícola 2010/11.



\* : diferencias significativas (p<0,05) entre isolíneas negativas y positivas de cada construcción  
 ns : diferencias no significativas (p≥0,05) entre isolíneas negativas y positivas de cada construcción

En la primera fecha de siembra de Pergamino el rendimiento promedio de las isolíneas negativas fue 4.087 kg/ha para PHP1, 4.102 kg/ha para PHP2 y 3.979 kg/ha para PHP3. En las isolíneas positivas fue 4.113 kg/ha para PHP1, 3.928 kg/ha para PHP2 y 4.013 kg/ha para PHP3. La variedad PHI38 rindió en promedio 4.275 kg/ha. Las diferencias de rendimiento entre las isolíneas positivas y negativas fueron significativas solo para PHP2. Cuando se compararon las isolíneas positivas de las tres construcciones, estas no mostraron diferencias significativas entre sí.

En la segunda fecha de siembra de Pergamino el rendimiento de las isolíneas negativas fue 3.367 kg/ha para PHP1 y 3.343 kg/ha para PHP2 y PHP3. En las isolíneas positivas fue 3.504 kg/ha para PHP1, 3.138 kg/ha para PHP2 y 3.244 kg/ha para PHP3. La variedad PHI38 rindió en promedio 3.510 kg/ha. Las isolíneas negativas difirieron significativamente de las positivas solo para PHP2. Cuando se compararon las isolíneas positivas entre construcciones, las de PHP1 difirieron significativamente de las de PHP2 y PHP3. Las diferencias entre las isolíneas positivas de estas últimas dos construcciones no fueron significativas.

En la primera fecha de siembra de General Paz el rendimiento promedio de las isolíneas negativas fue 1.792 kg/ha para PHP1, 2.067 kg/ha para PHP2 y 1.973 kg/ha para PHP3. En las isolíneas positivas fue 1.913 kg/ha para PHP1, 1.992 kg/ha para PHP2 y 1.746 kg/ha para PHP3. La variedad PHI38 rindió en promedio 2.212 kg/ha. Las isolíneas negativas difirieron significativamente de las positivas solo para PHP3. Cuando se compararon las isolíneas positivas entre construcciones, las de PHP2 y PHP3 mostraron diferencias significativas entre sí, mientras que las de PHP1 no difirieron de las de PHP2 ni de las de PHP3.

En la segunda fecha de siembra de General Paz el rendimiento promedio de las isolíneas negativas fue 2.194 kg/ha para PHP1, 2.379 kg/ha para PHP2 y 2.000 kg/ha para PHP3. En las isolíneas positivas fue 2.357 kg/ha para PHP1, 2.067 kg/ha para PHP2 y 2.001 kg/ha para PHP3. La variedad PHI38 rindió en promedio 2.511 kg/ha. Las isolíneas positivas difirieron significativamente de las negativas para las construcciones PHP1 y PHP2. Cuando se compararon las isolíneas positivas entre construcciones, las de PHP1 difirieron significativamente de las de PHP2 y PHP3, mientras que las de estas últimas no mostraron diferencias significativas.

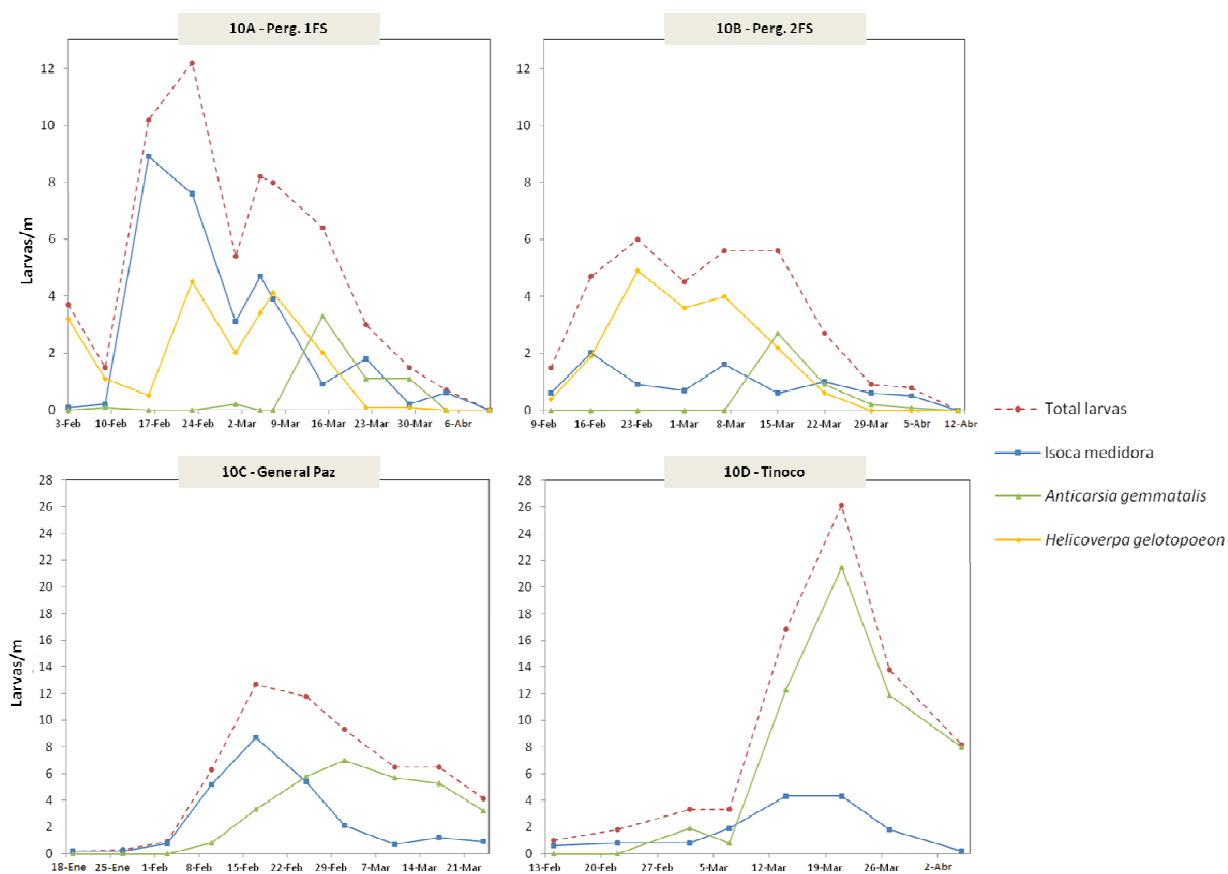
En el análisis a través de todas las localidades, el rendimiento de la variedad PHI38 resultó significativamente mayor al de las isolíneas positivas de las tres construcciones.

### 3.2.2. Ciclo agrícola 2011/12

#### Poblaciones de lepidópteros:

La evolución de la población de lepidópteros a través del desarrollo del cultivo, se muestra en el Gráfico 10.

**Gráfico 10:** Cantidad de larvas por metro obtenidas en los ensayos sin control de lepidópteros durante los muestreos semanales. Resultados de las dos fechas de siembra de Pergamino (10A primera fecha de siembra y 10B segunda fecha de siembra), de General Paz (10C) y de Tinoco (10D), durante el ciclo agrícola 2011/12.



En los ensayos de Pergamino (Gráficos 10A y 10B), el mayor número de larvas se observó desde mediados de febrero hasta mediados de marzo, con un promedio máximo de 12,2 y 6 larvas/m en la primera y segunda fecha de siembra, respectivamente.

En ambas fechas de siembra la especie encontrada en mayor proporción fue *Helicoverpa gelotopoeon*. Esta representó un 55 % y un 42 % del total de larvas diferenciadas en la primera y segunda fecha de siembra, respectivamente. En segundo lugar, las isocas medidoras de la especie *Rachiplusia nu* representaron un 44 % en la primera fecha de siembra y un 20 %

en la segunda. *Anticarsia gemmatalis* representó el 35 % de la población de lepidópteros en la segunda fecha de siembra. Otras especies presentes fueron *Spodoptera frugiperda* y *Colias lesbia*.

En General Paz (Gráfico 10C) el máximo número de larvas fue 12,7 larvas/m, el cual se presentó a mediados de febrero.

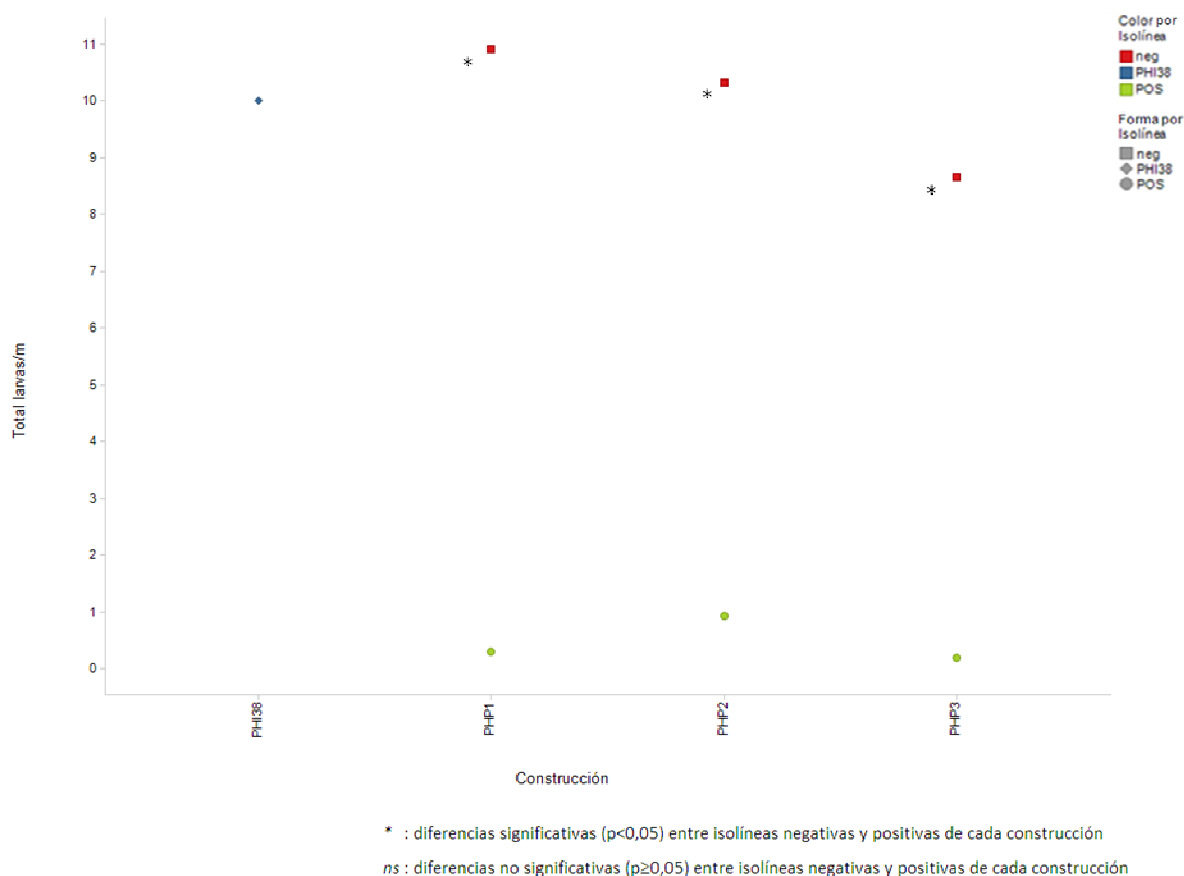
En esta localidad la especie predominante fue *Anticarsia gemmatalis*. Esta última representó un 55 % del total de larvas diferenciadas, siguiéndole en importancia las isocas midadoras de la especie *Rachiplusia nu* con un 42 %. Otras especies presentes fueron *Helicoverpa gelotopoeon*, *Spodoptera frugiperda* y *Spodoptera cosmioides*.

En Tinoco (Gráfico 10D) el mayor número de larvas se registró a fines de marzo con un máximo de 26,1 larvas/m.

La especie predominante en esta localidad fue *Anticarsia gemmatalis* que representó el 82 % de las larvas diferenciadas, mientras que en segundo lugar *Rachiplusia nu* representó un 15 %. Además de esta última, a fines del ciclo del cultivo también se hicieron presentes en bajo número isocas midadoras pertenecientes a la especie *Pseudoplusia includens*. *Helicoverpa gelotopoeon*, *Spodoptera frugiperda* y *Spodoptera cosmioides* fueron otras especies encontradas en baja frecuencia en esta localidad.

El promedio a través de los cuatro ambientes del total de larvas por metro observado en las isolíneas negativas y positivas de las tres construcciones y en la variedad PHI38, se presenta en el Gráfico 11.

**Gráfico 11:** Total de larvas por metro de las isólineas positivas y negativas de las construcciones PHP1, PHP2 y PHP3 y de la variedad PHI38 en los ensayos sin control de lepidópteros. Resultados promedio de las dos fechas de siembra de Pergamino, de General Paz y de Tinoco, durante el ciclo agrícola 2011/12.

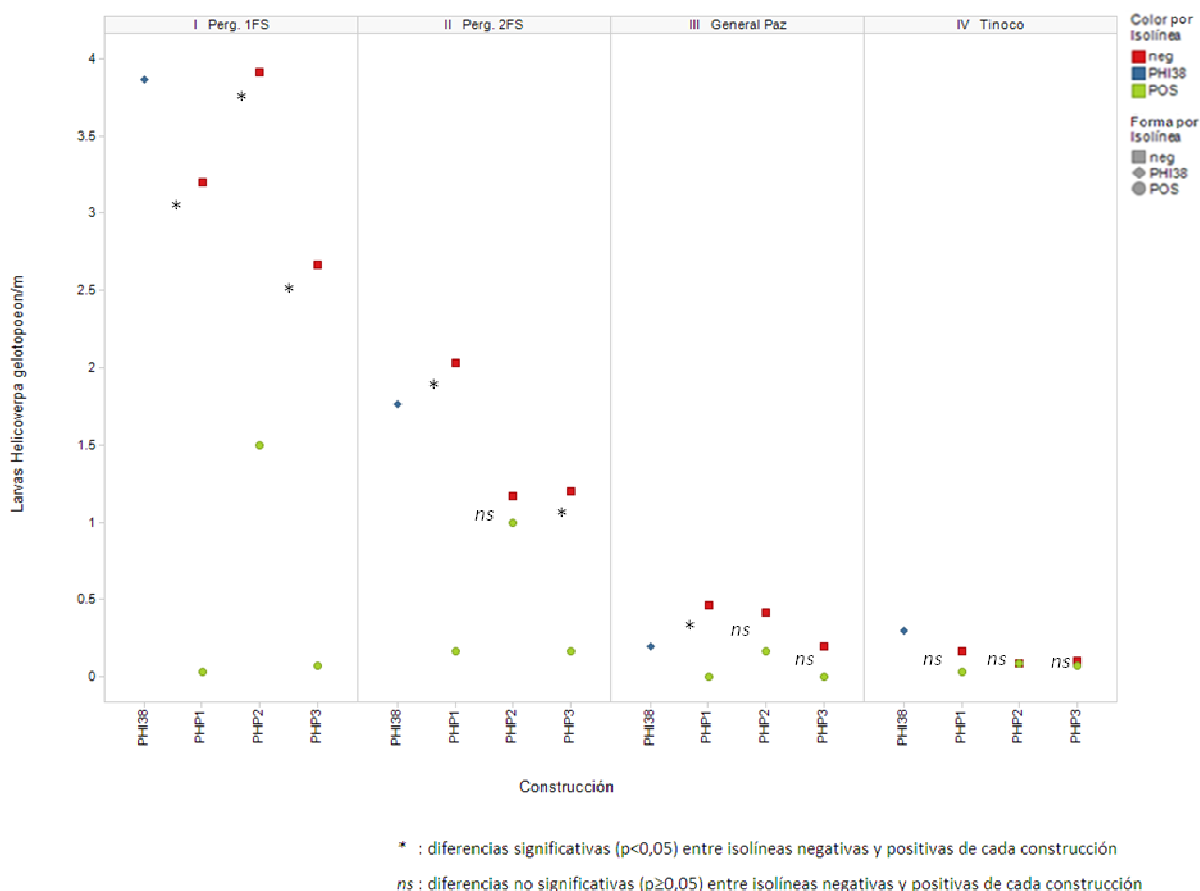


El promedio del total de larvas por metro en las isólineas negativas fue 10,9 larvas/m para la construcción PHP1, 10,3 larvas/m para PHP2 y 8,7 larvas/m para PHP3. En las isólineas positivas fue 0,3 larvas/m para la construcción PHP1, 0,9 larvas/m para PHP2 y 0,2 larvas/m para PHP3. Las isólineas positivas de las tres construcciones tuvieron una cantidad significativamente menor de larvas que sus isólineas negativas y que la variedad PHI38. En cuanto a la comparación de las isólineas positivas entre construcciones, las de PHP2 difirieron significativamente de las de PHP1 y de las de PHP3, mientras que las de estas últimas no difirieron entre sí.

Al realizar el muestreo de insectos se observó que algunas isólineas positivas se comportaban de manera diferente ante *Helicoverpa gelotopoeon*, por lo que se procedió a realizar el análisis discriminando a esta especie del resto de los lepidópteros.

La cantidad promedio de larvas de *Helicoverpa gelotopoeon* por metro de las isolíneas negativas y positivas de las tres construcciones y de la variedad PHI38, se muestra en el Gráfico 12 para cada uno de los ambientes.

**Gráfico 12:** Cantidad de larvas de *Helicoverpa gelotopoeon* por metro de las isolíneas positivas y negativas de las construcciones PHP1, PHP2 y PHP3 y de la variedad PHI38 en los ensayos sin control de lepidópteros. Resultados de las dos fechas de siembra de Pergamino, de General Paz y de Tinoco, durante el ciclo agrícola 2011/12.



En la primera fecha de siembra de Pergamino la cantidad promedio de larvas de *Helicoverpa gelotopoeon* por metro en las isolíneas negativas fue de 3,2 larvas/m para PHP1, de 3,9 larvas/m para PHP2 y de 2,7 larvas/m para PHP3. En las isolíneas positivas la cantidad promedio de larvas de esta especie fue 0,03 larvas/m para PHP1, 1,5 larvas/m para PHP2 y 0,1 larvas/m para PHP3. Las isolíneas negativas tuvieron una cantidad significativamente mayor de larvas de *Helicoverpa gelotopoeon* que las isolíneas positivas para las tres construcciones. Cuando se compararon las isolíneas positivas entre

construcciones, las de PHP1 y PHP3 no difirieron entre sí, en tanto que las de PHP2 difirieron significativamente de las de PHP1 y de las de PHP3.

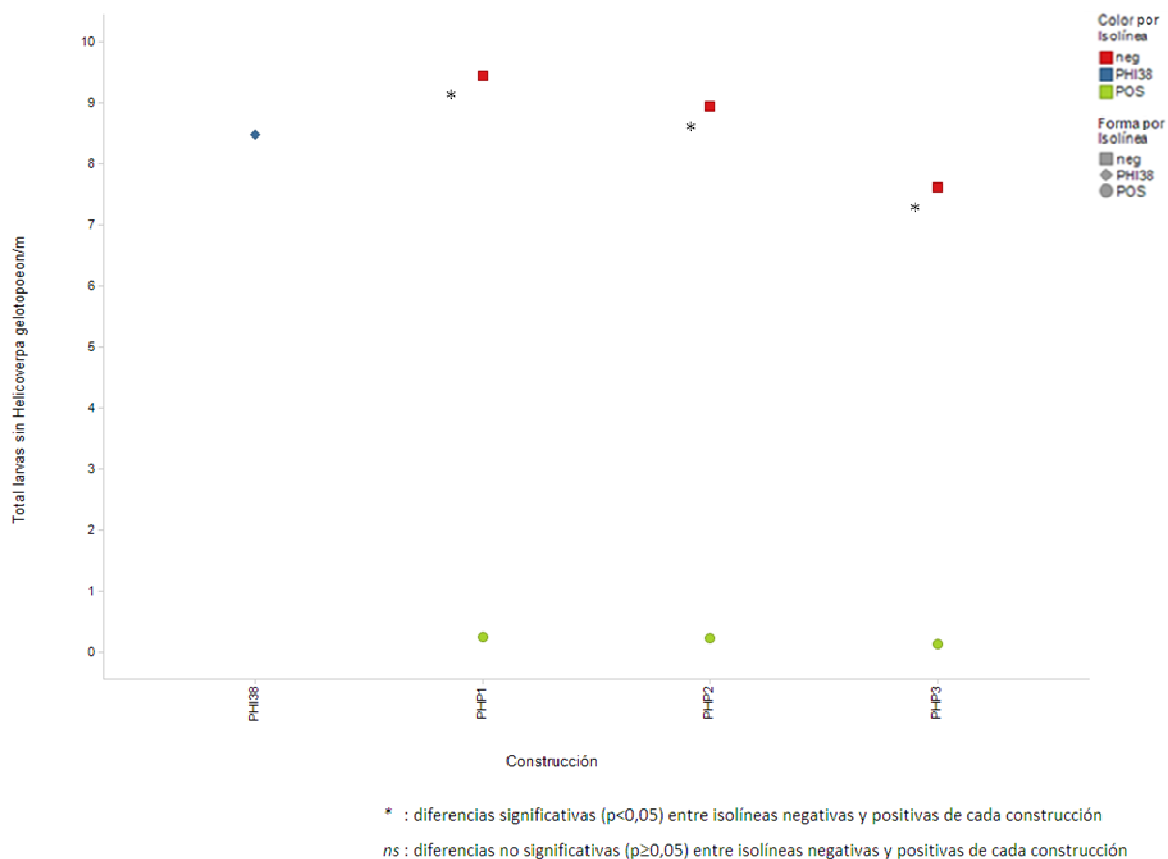
En la segunda fecha de siembra de Pergamino la cantidad promedio de larvas de *Helicoverpa gelotopoeon* por metro en las isolíneas negativas fue de 2 larvas/m para PHP1 y de 1,2 larvas/m para PHP2 y PHP3. Mientras que en las isolíneas positivas fue 0,2 larvas/m para PHP1 y PHP3, y 1 larva/m para PHP2. Las isolíneas negativas tuvieron una cantidad significativamente mayor de larvas de *Helicoverpa gelotopoeon* que sus isolíneas positivas para las construcciones PHP1 y PHP3, mientras que para PHP2 no hubo diferencias significativas. Cuando se compararon las isolíneas positivas de las tres construcciones, las de PHP2 difirieron significativamente de las de PHP1 y de las de PHP3, en tanto que las de estas últimas no difirieron entre sí.

En General Paz la cantidad promedio de larvas de *Helicoverpa gelotopoeon* por metro en las isolíneas negativas fue de 0,5 larvas/m para PHP1, de 0,4 larvas/m para PHP2 y de 0,2 larvas/m para PHP3. En las isolíneas positivas fue de 0 larvas/m para PHP1 y PHP3 y de 0,2 larvas/m para PHP2. La cantidad promedio de larvas de esta especie en las isolíneas negativas difirió de la cantidad en las isolíneas positivas, solo para PHP1. Cuando se compararon las isolíneas positivas de las tres construcciones, no hubo diferencias significativas en la cantidad de larvas de esta especie.

En Tinoco la cantidad promedio de larvas de *Helicoverpa gelotopoeon* por metro en las isolíneas negativas fue de 0,2 para PHP1 y de 0,1 para PHP2 y PHP3. Para las isolíneas positivas fue de 0,03 larvas/m para PHP1 y 0,1 larvas/m para PHP2 y PHP3 respectivamente. Las isolíneas negativas no difirieron de sus isolíneas positivas en las tres construcciones. Cuando se compararon las isolíneas positivas entre construcciones, estas tampoco difirieron entre sí.

El promedio a través de los cuatro ambientes del total de larvas por metro excluyendo *Helicoverpa gelotopoeon* observado en las isolíneas negativas y positivas de las tres construcciones y en la variedad PHI38, se presenta en el Gráfico 13.

**Gráfico 13:** Total de larvas por metro excluyendo *Helicoverpa gelotopoeon* de las isólineas positivas y negativas de las construcciones PHP1, PHP2 y PHP3 y de la variedad PHI38 en los ensayos sin control de lepidópteros. Resultados promedio de las dos fechas de siembra de Pergamino, de General Paz y de Tinoco, durante el ciclo agrícola 2011/12.

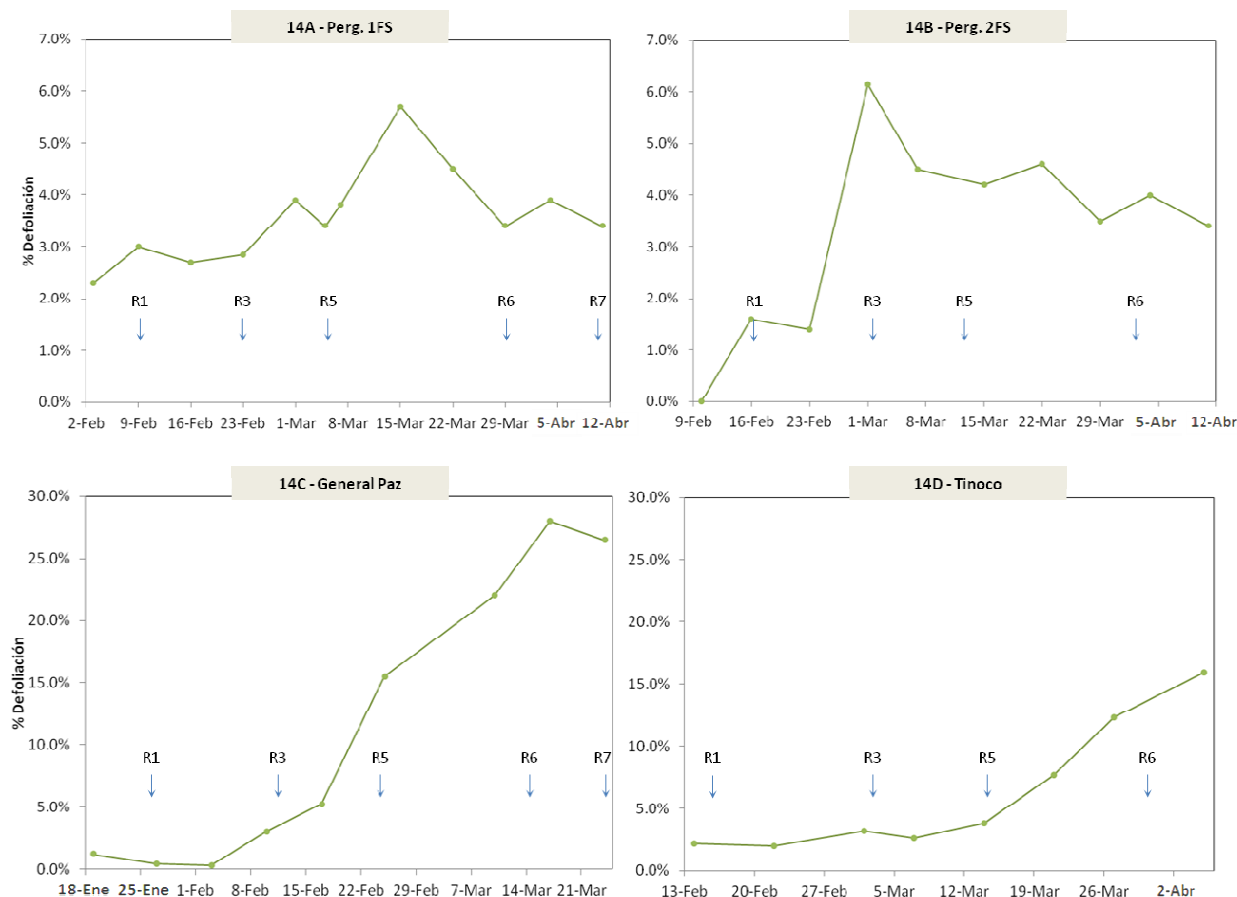


En las isólineas negativas el promedio del total de larvas/m excluyendo *Helicoverpa gelotopoeon* fue de 9,5 larvas/m para PHP1, de 8,9 larvas/m para PHP2 y de 7,6 larvas/m para PHP3. En las isólineas positivas fue de 0,2 larvas/m para PHP1 y PHP2, y 0,1 larvas/m para PHP3. Las isólineas negativas de las tres construcciones tuvieron número significativamente mayor de larvas que sus isólineas positivas. Cuando se compararon las isólineas positivas de las tres construcciones, estas no mostraron diferencias significativas.

#### Defoliación:

La evolución del porcentaje de defoliación a través del desarrollo del cultivo, se muestra en el Gráfico 14.

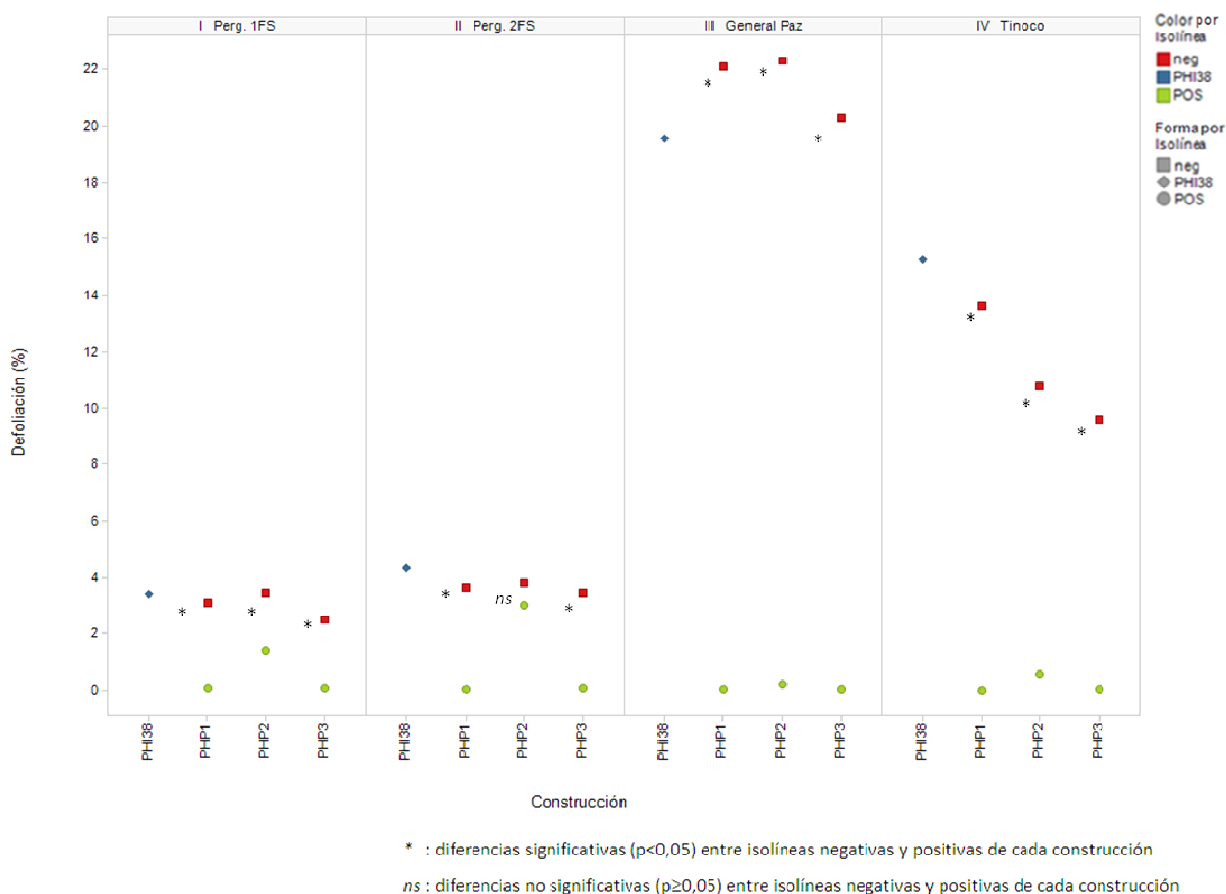
**Gráfico 14:** Porcentaje de defoliación obtenido en los ensayos sin control de lepidópteros durante los muestreos semanales. Resultados de las dos fechas de siembra de Pergamino (14A y 14B), de General Paz (14C) y de Tinoco (14D), durante el ciclo agrícola 2011/12. Se indica con flechas azules sobre el gráfico el momento de ocurrencia de los estadios fenológicos (R1, R3, R5, R6 y R7).



En la primera fecha de siembra de Pergamino la máxima defoliación se produjo a mediados de marzo, alcanzando un 5,7 % (Gráfico 14A). En la segunda fecha de siembra de esta localidad el máximo de 6,2 % se alcanzó a principios de marzo (Gráfico 14B). En General Paz la máxima defoliación se produjo a mediados de marzo, la cual fue de 28 % (Gráfico 14C); mientras que en Tinoco la defoliación resultó máxima a principios de abril, alcanzando un 15,9 % (Gráfico 14D).

Los valores de defoliación observados en cada uno de los ambientes en las isolíneas positivas y negativas de las tres construcciones y en la variedad PHI38, se muestran en el Gráfico 15.

**Gráfico 15:** Porcentaje de defoliación de las isólineas positivas y negativas de las construcciones PHP1, PHP2 y PHP3 y de la variedad PHI38 en los ensayos sin control de lepidópteros. Resultados de las dos fechas de siembra de Pergamino, de General Paz y de Tinoco, durante el ciclo agrícola 2011/12.



En la primera fecha de siembra de Pergamino el promedio de defoliación observado en las isólineas negativas fue de 3,1 % para la construcción PHP1, de 3,4 % para PHP2 y de 2,5 % para PHP3. Mientras que en las isólineas positivas fue de 0,1 % para PHP1 y PHP3, y 1,4 % para PHP2. Las isólineas negativas difirieron significativamente de sus isólineas positivas en las tres construcciones. Al comparar las isólineas positivas entre construcciones, PHP1 y PHP3 no mostraron diferencias significativas, mientras que si difirieron las de PHP2 de las de PHP1 y PHP3.

En la segunda fecha de siembra de Pergamino el promedio de defoliación observado en las isólineas negativas fue de 3,6 % para PHP1, de 3,8 % para PHP2 y de 3,5 % para PHP3. En las isólineas positivas fue de 0,1 % para PHP1 y PHP3, y de 3 % para PHP2. Las isólineas negativas de PHP1 y PHP3 difirieron de manera significativa de sus isólineas positivas, en tanto que en PHP2 las diferencias no resultaron significativas. Cuando se compararon las

isolíneas positivas entre construcciones, las de PHP2 difirieron significativamente de las de PHP1 y PHP3, mientras que estas últimas no difirieron entre sí.

En General Paz la defoliación de las isolíneas negativas fue de 22,1 % para PHP1, de 22,3 % para PHP2 y de 20,3 % para PHP3. En las isolíneas positivas fue de 0,04 % para PHP1, de 0,2 % para PHP2 y de 0,1 % para PHP3. Las isolíneas negativas de las tres construcciones tuvieron una defoliación significativamente mayor que sus isolíneas positivas. Cuando se compararon las isolíneas positivas de las tres construcciones, las de PHP1 y PHP2 difirieron significativamente entre sí, en tanto que las de PHP3 no difirieron de las de PHP1 y PHP2.

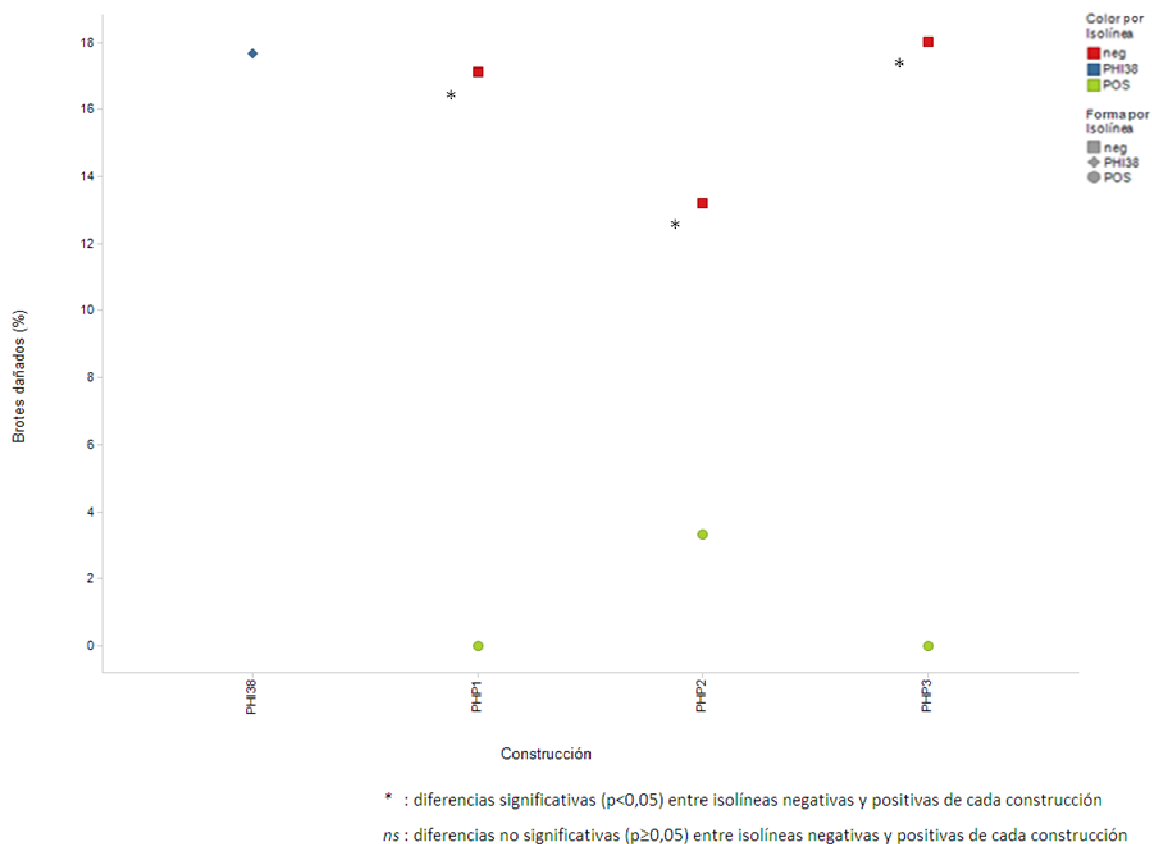
En Tinoco la defoliación de las isolíneas negativas fue 13,6 % para PHP1, 10,8 % para PHP2 y 9,6 % para PHP3. En las isolíneas positivas fue de 0,02 % para PHP1, de 0,6 % para PHP2 y de 0,1 % para PHP3. Las isolíneas negativas de las tres construcciones tuvieron una defoliación significativamente mayor que las isolíneas positivas. Cuando se compararon las isolíneas positivas entre construcciones, las de PHP2 difirieron de manera significativa de las de PHP1 y PHP3, mientras que estas últimas no difirieron entre sí.

En cuanto a la variedad PHI38, el promedio de defoliación en cada una de las localidades resultó: 3,4 % y 4,3 % en la primera y segunda fecha de siembra de Pergamino, 19,6 % en General Paz y 15,3 % en Tinoco. En todos los ambientes la defoliación fue significativamente mayor a la de las isolíneas positivas de las tres construcciones.

#### *Daño de Brotes:*

Se observó daño de brotes producido por *Helicoverpa gelotopoeon* solamente en la primera fecha de siembra de Pergamino (Gráfico 16).

**Gráfico 16:** Porcentaje de brotes dañados por *Helicoverpa gelotopoeon* de las isolíneas positivas y negativas de las construcciones PHP1, PHP2 y PHP3 y de la variedad PHI38 en los ensayos sin control de lepidópteros. Resultados de la primera fecha de siembra de Pergamino, durante el ciclo agrícola 2011/12.



El promedio del porcentaje de brotes dañados en las isolíneas negativas fue de 17,1 % para PHP1, de 13,2 % para PHP2 y de 18,2 % para PHP3. En las isolíneas positivas resultó 0 % para PHP1 y PHP3, y de 3,3 % para PHP2. Las diferencias en el daño de brotes entre las isolíneas negativas y positivas fueron significativas para todas las construcciones. Al comparar las isolíneas positivas entre construcciones, el daño de brotes no difirió entre PHP1 y PHP3; mientras que PHP2 difirió de estas dos.

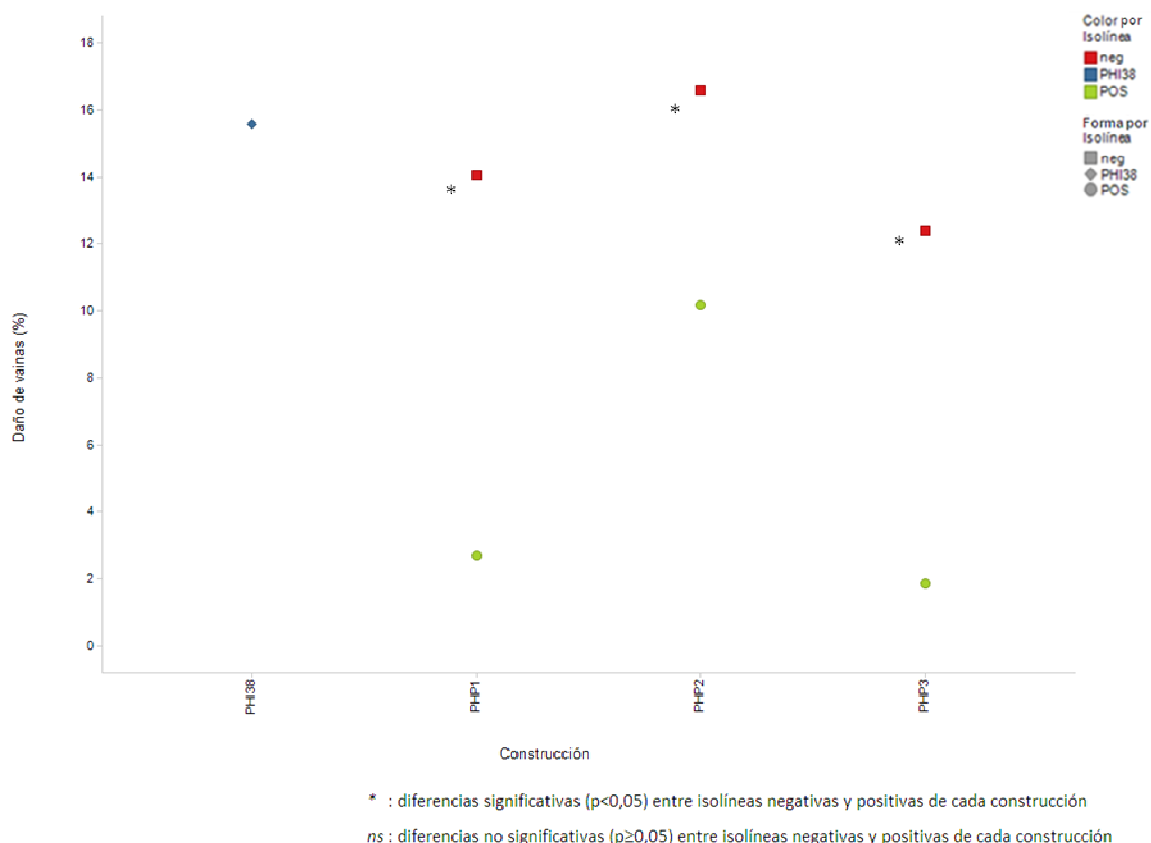
El promedio del porcentaje de brotes dañados en la variedad PHI38 fue de 17,7 %, el cual fue significativamente mayor al observado en las isolíneas positivas de las tres construcciones.

#### Daño de vainas:

En las dos fechas de siembra de Pergamino se registró daño en las vainas, producido por *Helicoverpa gelotopoeon*. El promedio del porcentaje de vainas dañadas en las isolíneas

positivas y negativas de las tres construcciones y en la variedad PHI38 para las dos fechas de siembra, se muestra en el Gráfico 17.

**Gráfico 17:** Porcentaje de vainas dañadas por *Helicoverpa gelotopoeon* de las isolíneas positivas y negativas de las construcciones PHP1, PHP2 y PHP3 y de la variedad PHI38 en los ensayos sin control de lepidópteros. Resultados promedio de las dos fechas de siembra de Pergamino, durante el ciclo agrícola 2011/12.



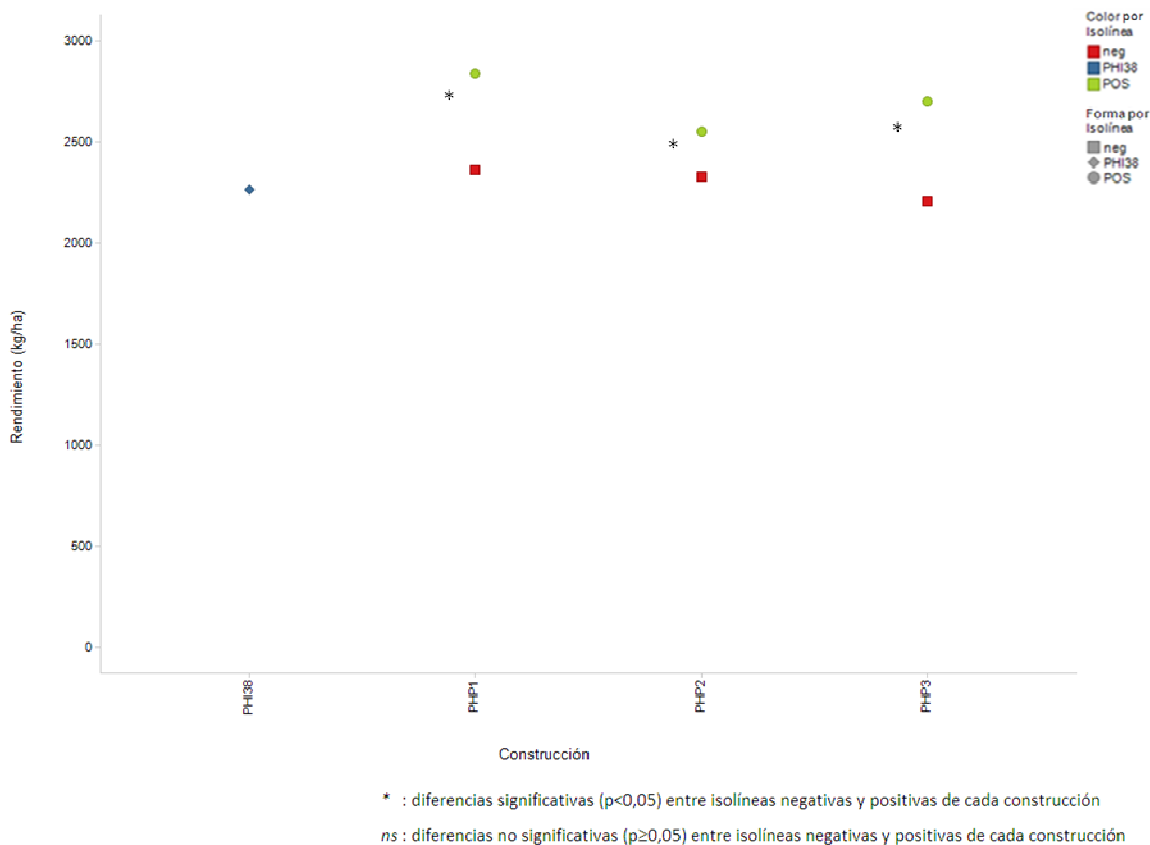
El promedio del porcentaje de vainas dañadas fue en las isolíneas negativas de 14 % para PHP1, de 16,6 % para PHP2 y de 12,4 % para PHP3. En las isolíneas positivas resultó 2,7 % para PHP1, 10,2 % para PHP2 y 1,9 % para PHP3. Las diferencias en el daño de vainas observado entre las isolíneas negativas y positivas fueron significativas para las tres construcciones. Cuando se compararon las isolíneas positivas entre construcciones, todas difirieron significativamente entre sí.

El promedio del porcentaje de vainas dañadas en la variedad PHI38 fue de 15,6 %, el cual difirió significativamente del observado en las isolíneas positivas de las tres construcciones.

### Rendimiento:

El rendimiento promedio de las isolíneas negativas y positivas de las tres construcciones y de la variedad PHI38, se presenta en el Gráfico 18.

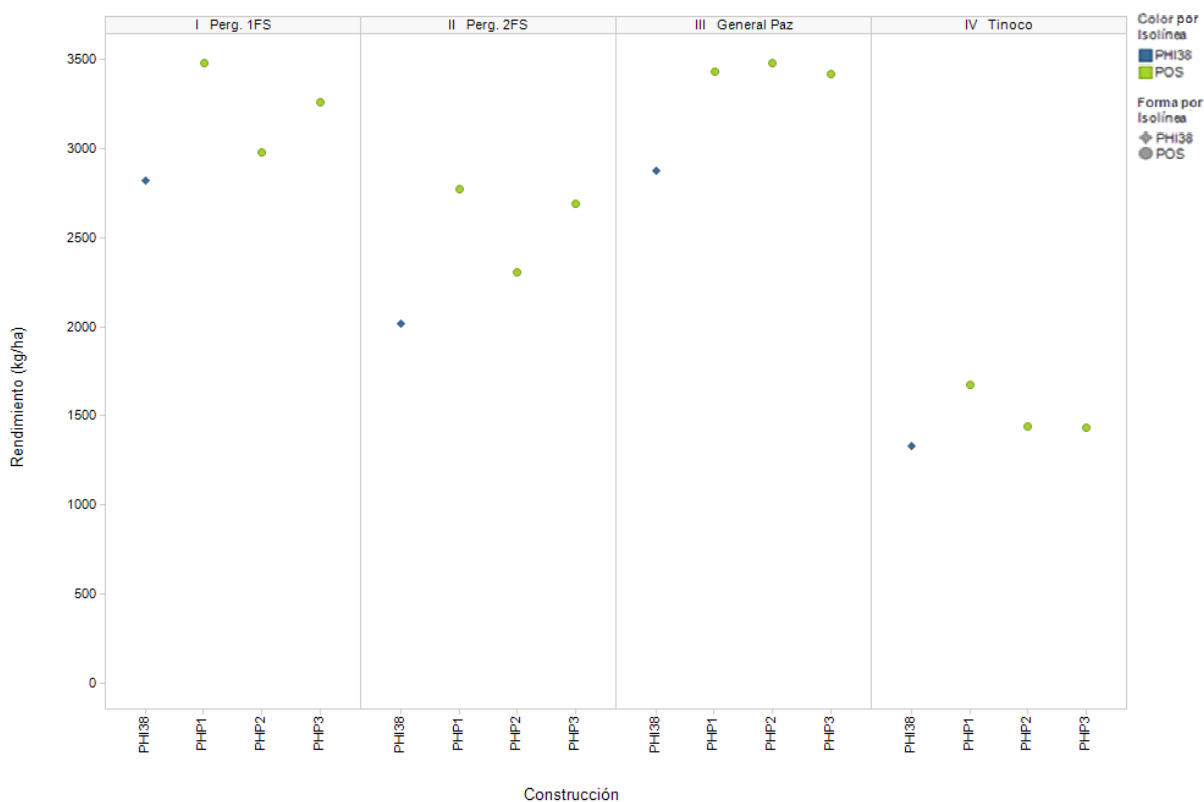
**Gráfico 18:** Rendimiento (kg/ha) de las isolíneas positivas y negativas de las construcciones PHP1, PHP2 y PHP3 y de la variedad PHI38 en los ensayos sin control de lepidópteros. Resultados promedio de las dos fechas de siembra de Pergamino, de General Paz y de Tinoco, durante el ciclo agrícola 2011/12.



El rendimiento promedio de las isolíneas negativas fue de 2.361 kg/ha para PHP1, de 2.329 kg/ha para PHP2 y de 2.206 kg/ha para PHP3. En las isolíneas positivas fue 2.840 kg/ha para PHP1, 2.549 kg/ha para PHP2 y 2.700 kg/ha para PHP3. Las isolíneas positivas tuvieron un rendimiento significativamente mayor al de sus isolíneas negativas para cada una de las tres construcciones. Cuando se compararon las isolíneas positivas entre construcciones, todas mostraron diferencias significativas entre sí.

El rendimiento promedio de las isolíneas positivas y de la variedad PHI38 para cada uno de los ambientes, se muestra en el Gráfico 19.

**Gráfico 19:** Rendimiento (kg/ha) de las isolíneas positivas de las construcciones PHP1, PHP2 y PHP3 y de la variedad PHI38 en los ensayos sin control de lepidópteros. Resultados de las dos fechas de siembra de Pergamino, de General Paz y de Tinoco, durante el ciclo agrícola 2011/12.



El rendimiento promedio de la variedad PHI38 fue de 2.817 kg/ha para la primera fecha de siembra de Pergamino. Este resultó significativamente menor al de las isolíneas positivas de PHP1 y PHP3, y no difirió del de las de PHP2. En la segunda fecha de siembra de Pergamino la variedad PHI38 rindió 2.020 kg/ha y fue significativamente menor al de las isolíneas positivas de las tres construcciones. El rendimiento de la variedad PHI38 en General Paz fue de 2.877 kg/ha, siendo significativamente menor al de las isolíneas positivas de las tres construcciones. Por último, en Tinoco la variedad PHI38 rindió 1.334 kg/ha resultando significativamente menor al rendimiento de las isolíneas positivas de PHP1. La variedad PHI38 no mostró diferencias significativas con las isolíneas positivas de PHP2 y PHP3 en esta última localidad.

## 4. DISCUSIÓN

### 4.1. Ensayos con control de lepidópteros

Los caracteres agronómicos de las líneas portadoras de las construcciones PHP1, PHP2 y PHP3 tuvieron un comportamiento estable ante las diversas condiciones ambientales en las que fueron realizados los ensayos. Esto se evidencia observando la interacción entre isolíneas, localidades y construcciones para cada una de las variables, la cual no resultó significativa. La diversidad de los ambientes se manifestó a través de los diferentes niveles de productividad alcanzados en cada uno de estos, como se muestra en los gráficos del Anexo II.

Para el caso particular del rendimiento, este comportamiento estable también se observa al contrastar los datos de Argentina con los de Estados Unidos. En ambos países se obtuvieron similares resultados al comparar el rendimiento de las isolíneas positivas y negativas de cada una de las construcciones. Las isolíneas positivas no difirieron de las negativas para PHP1 y PHP3, en tanto que las isolíneas positivas de PHP2 tuvieron un rendimiento significativamente menor al de sus isolíneas negativas. En las localidades de Argentina esta diferencia fue de un 5 %, mientras que en las de Estados Unidos la merma de rendimiento ascendió al 15 %. Similares disminuciones de rendimiento fueron encontradas por Elmore *et al.* (2001), quienes compararon líneas transgénicas de soja resistentes a glifosato, las cuales rindieron un 5 % menos que sus líneas hermanas no resistentes a este herbicida. De acuerdo a los autores, esta disminución del rendimiento se debería tanto al gen que confiere la resistencia como al proceso de su inserción.

En cuanto a la comparación de las isolíneas positivas entre sí, las de PHP1 tuvieron un rendimiento mayor al de las de PHP2 y PHP3 tanto en las localidades de Argentina como en las de Estados Unidos. El rendimiento de las isolíneas positivas de PHP3 fue superior al de PHP2 en ambos países aunque en las localidades de Argentina estas diferencias no resultaron significativas. Por el contrario, en las localidades de Estados Unidos las isolíneas positivas de PHP2 y PHP3 difirieron significativamente. Esto puede deberse a la mayor cantidad de ambientes evaluados en este último país, lo cual aumenta la potencia para detectar diferencias estadísticas (Kuehl, 2001).

Las líneas portadoras de PHP1 y las de PHP3 no mostraron diferencias respecto a sus isolíneas negativas para la mayoría de las variables evaluadas. Por lo tanto, la introgresión de

estas dos construcciones en la variedad PHI38 no produjo alteraciones en el comportamiento agronómico. Similares resultados fueron reportados en soja por otros investigadores (MacRae *et al.*, 2005; Miklos *et al.*, 2007; McPherson y MacRae, 2009a). Miklos *et al.* (2007), compararon isolíneas negativas y positivas de soja portadoras del gen *cryIA* proveniente de *Bacillus thuringiensis* y no encontraron diferencias en altura de planta, madurez y rendimiento, entre otros caracteres agronómicos. MacRae *et al.* (2005), así como McPherson y MacRae (2009a), evaluaron el rendimiento de líneas transgénicas de soja portadoras del gen *cryIA* y el de sus isolíneas negativas o de líneas genotípicamente similares. Cuando compararon estos materiales entre sí, en ensayos con aplicaciones de insecticidas para el control de poblaciones de lepidópteros, no encontraron diferencias significativas en rendimiento.

Contrariamente, las líneas portadoras de la construcción PHP2 tuvieron diferencias con sus isolíneas negativas en altura de planta en el estadio R2, en días de siembra a madurez y en rendimiento. Homrich *et al.* (2008b) compararon el cultivar de soja IAS5 con sus progenies transgénicas portadoras del gen *cryIAc* y también encontraron diferencias significativas en altura de planta y rendimiento. Estos autores mencionan que las variaciones en los caracteres agronómicos pueden darse como consecuencia de la transformación con genes extraños al cultivo. Filipecki y Malepszy (2006) mencionan que estas diferencias pueden deberse a: 1) efectos pleiotrópicos del ADN introgresado; 2) la influencia del sitio de integración y la arquitectura del transgen sobre el nivel de expresión y la estabilidad del transgen; y 3) al estrés ocasionado por el manejo de tejido, la regeneración y la propagación clonal.

El gen que codifica para la síntesis de proteínas Cry en PHP2 difiere del incluido en las otras dos construcciones. Por lo tanto, las diferencias en el comportamiento agronómico de las líneas que portan esta construcción podrían deberse a efectos pleiotrópicos de dicho gen. Para corroborar esta hipótesis deberían evaluarse diferentes construcciones que contengan el gen que codifica para la proteína PrA.

La influencia del sitio de integración, que involucra efectos de posición y de inserción (Filipecki y Malepszy, 2006), se atenuaría en el análisis a nivel de construcción dado que en este estudio se evaluaron varios eventos de transformación en cada construcción.

Del mismo modo, los cambios debidos al estrés ocasionado por las técnicas de regeneración *in vitro* no se deberían tener en cuenta por estar utilizando para la comparación de las isolíneas positivas sus isolíneas negativas. Ambas fueron derivadas de la misma planta

obtenida luego del proceso de transformación, por lo que la comparación entre estas anula el efecto del estrés antes mencionado.

En cuanto a la arquitectura del transgen, en las construcciones PHP1 y PHP2 el promotor utilizado es el mismo, mientras que en PHP3 este es diferente. Dado que tanto PHP1 como PHP3 no produjeron alteraciones considerables en el comportamiento agronómico, podríamos inferir que el promotor no estaría provocando estos tipos de cambios observados en las líneas conteniendo PHP2.

Por último, podríamos relacionar estos cambios con el nivel de expresión del gen introgresado. Maqbool y Christou (1999), evaluando plantas transgénicas de arroz (*Oryza sativa* L.) transformadas con diferentes plásmidos conteniendo los genes *cry1Ac* y *cry2A*, encontraron defectos en el desarrollo en condiciones de muy altos niveles de expresión de genes extraños al cultivo. En estudios futuros podría determinarse el nivel de expresión de los eventos incluidos en este trabajo para así relacionar este con su comportamiento agronómico.

Dado que las líneas portadoras de PHP1 y las de PHP3 no tuvieron diferencias con sus isolíneas negativas en la mayoría de los caracteres agronómicos evaluados, estas construcciones serían las más promisorias para ser avanzadas en un programa de mejoramiento. En una etapa siguiente de evaluación, las mismas deberían introgresarse dentro de un mayor grupo de variedades para validar estos resultados.

## **4.2. Ensayos sin control de lepidópteros**

Las poblaciones de lepidópteros en los distintos ambientes presentaron como especies predominantes a *Rachiplusia nu*, *Anticarsia gemmatalis* y/o *Helicoverpa gelotopoeon*. Tanto *Rachiplusia nu* como *Anticarsia gemmatalis* se encontraron entre las especies con mayor proporción en los ciclos agrícolas 2010/11 y 2011/12, mientras que *Helicoverpa gelotopoeon* tuvo densidades poblacionales considerables solo en los ensayos de Pergamino durante el ciclo agrícola 2011/12. Otras especies presentes fueron *Pseudoplusia includens*, *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera cosmioides*, *Achyra bifidalis* y *Colias lesbia*, las cuales presentaron densidades poblacionales demasiado bajas para poder determinar la eficacia de las construcciones Bt ante estas.

El control de lepidópteros fue eficaz por parte de las líneas portadoras de PHP1, PHP2 ó PHP3 en todos los ambientes de evaluación. Esto se evidenció a través del total de larvas de lepidópteros, el cual fue en la variedad PHI38 y en las isolíneas negativas mayor que en las

isolíneas positivas para cada una de las construcciones. Estos resultados se observaron tanto ante bajas densidades poblacionales de lepidópteros como ocurrió durante 2010/11, así como ante densidades poblacionales más altas como las que se presentaron durante 2011/12. Otros autores (Walker *et al.*, 2000; MacRae *et al.*, 2005; Miklos *et al.*, 2007; Homrich *et al.*, 2008b; McPherson y MacRae, 2009a; b; Bernardi *et al.*, 2012) también encontraron un control eficaz frente a diferentes especies de lepidópteros, tales como *Anticarsia gemmatalis*, *Pseudoplusia includens*, *Helicoverpa zea*, *Rachiplusia nu*, etc., por parte de líneas transgénicas de soja que expresan proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis*.

Se observó que algunas isolíneas positivas se comportaban de manera diferente ante la presencia de *Helicoverpa gelotopoeon* durante el ciclo agrícola 2011/12, por lo cual se procedió a realizar el análisis discriminando a esta especie del resto de los lepidópteros. Cuando se excluyó a esta del análisis, la cantidad promedio de larvas de lepidópteros por metro en las isolíneas positivas de las tres construcciones no difirió y fue cercana a cero para todos los ambientes, durante los dos ciclos agrícolas de evaluación. Por otro lado, *Helicoverpa gelotopoeon* fue controlada con una alta eficacia por PHP1 y PHP3, siendo en las isolíneas positivas de estas dos construcciones el número de larvas por metro de esta especie cercano a cero y significativamente menor al de las isolíneas negativas. Sin embargo, en los ambientes que presentaron las poblaciones más altas de *Helicoverpa gelotopoeon*, la cantidad de larvas de esta especie en las isolíneas positivas de PHP2 fue significativamente mayor al de las isolíneas positivas de PHP1 y PHP3. Asimismo, en estos ambientes la cantidad de larvas de *Helicoverpa gelotopoeon* en las isolíneas positivas de PHP2 no siempre fue significativamente menor al de las isolíneas negativas. Esto explica la mayor cantidad de larvas totales presentes en las isolíneas positivas de PHP2 respecto a las presentes en las isolíneas positivas de las otras dos construcciones durante el ciclo agrícola 2011/12, en el análisis a través de todos los ambientes.

La defoliación en todos los ambientes resultó mayor en la variedad PHI38 y en las isolíneas negativas que en las isolíneas positivas de las tres construcciones, a excepción de la segunda fecha de siembra de Pergamino en 2011/12. En esta última las isolíneas positivas y negativas de PHP2 no difirieron entre sí. Esto se debería a que en ese ambiente la cantidad de larvas de *Helicoverpa gelotopoeon*, la cual habría causado esta defoliación, no mostró diferencias significativas entre las isolíneas positivas y negativas de esta construcción.

La defoliación de las isolíneas positivas en los ambientes en que solo *Rachiplusia nu* y/o *Anticarsia gemmatalis* fueron las especies predominantes, no difirió entre las tres construcciones para la mayoría de los ambientes. En los casos en que hubo diferencias significativas, las magnitudes de las mismas fueron muy bajas por lo que difícilmente puedan percibirse a campo y no se espera que tengan incidencia en el rendimiento. En los ambientes en que *Helicoverpa gelotopoeon* estuvo entre las especies predominantes, las isolíneas positivas de PHP2 resultaron significativamente más defoliadas que las de PHP1 y PHP3. Esto concuerda con la mayor cantidad de larvas de esta especie en las isolíneas positivas de PHP2 con respecto a las de PHP1 y PHP3 en esos ambientes. Las isolíneas positivas de PHP1 y PHP3 no difirieron entre sí para la mayoría de los ambientes, independientemente de la especie de lepidóptero considerada.

En los ambientes en que *Helicoverpa gelotopoeon* estuvo entre las especies predominantes también se observó daño de vainas y brotes. Ambos tipos de daños fueron causados por esta especie. El comportamiento de las isolíneas positivas respecto de las isolíneas negativas y la variedad PHI38 resultó similar al observado a través de los niveles de población de lepidópteros y de la defoliación. Las isolíneas positivas tuvieron un daño de vainas y de brotes significativamente menor que las isolíneas negativas y que la variedad PHI38 en las tres construcciones. Las isolíneas positivas de PHP2 tuvieron un daño de vainas y brotes significativamente mayor al de las de PHP1 y PHP3. Estas últimas no difirieron entre sí en cuanto a daño de brotes. A pesar de que las isolíneas positivas de PHP1 y PHP3 difirieron en el daño de vainas, la diferencia fue en promedio menor al 1 % de vainas dañadas lo cual difícilmente pueda percibirse a campo y no se espera que tenga incidencia significativa en el rendimiento. El control de lepidópteros por parte de las líneas portadoras de estas construcciones a nivel de vainas y brotes, indica que las proteínas PrA y PrB se expresarían también en estos órganos.

Lo anteriormente expuesto indica que las líneas de los eventos EN08 y EN13 de la construcción PHP2, tuvieron un control parcial de *Helicoverpa gelotopoeon*. Dado que estos son solo dos de los seis eventos de PHP2 incluidos en este trabajo, no se pudo determinar si el comportamiento observado de debió a un efecto de esos eventos en particular o es un comportamiento general de la construcción. Para determinar esto se deberían evaluar todos los eventos de PHP2 ante poblaciones de esta especie.

El control parcial de las líneas portadoras de PHP2 ante *Helicoverpa gelotopoeon*, se podría explicar por el gen que codifica la proteína PrA en esta construcción, la cual es diferente a la proteína PrB codificada por el gen incluido en PHP1 y PHP3. Por lo tanto, PrA podría no resultar altamente eficaz para el control de poblaciones de *Helicoverpa gelotopoeon*. Esto podría ser determinado en futuros estudios incluyendo todos los eventos de esta construcción en ensayos con infestaciones a campo, o bien en laboratorio. Walker *et al.*, (2000), evaluando una línea transgénica de soja del cultivar Jack que expresa la proteína Bt Cry1Ac, encontraron que esta línea comparada con el cultivar Jack sin transformar tuvo un menor control de *Helicoverpa zea* que de *Anticarsia gemmatalis*. Esto podría asemejarse al menor control producido por PHP2 ante una especie del mismo género (*Helicoverpa gelotopoeon*) respecto del observado ante *Anticarsia gemmatalis* y *Rachiplusia nu* en el presente estudio. En algunas zonas de Estados Unidos se han informado casos de incremento de la resistencia de *Helicoverpa zea* a toxinas Bt Cry1Ac que se expresan en el cultivo transgénico de algodón (Tabashnik *et al.*, 2008). Para revertir esto se desarrollaron materiales que incluyen un segundo gen que codifica para la proteína Cry2Ab. De esta manera, las plantas que expresan Cry1Ac y Cry2Ab tuvieron un mejor control que aquellas que expresan únicamente la proteína Cry1Ac (Chitkowski *et al.*, 2003). Cry2Ab sería la proteína que contribuye en mayor medida a la toxicidad ante *Helicoverpa zea* en las plantas que expresan ambas proteínas (Greenplate *et al.*, 2003). De acuerdo a lo mencionado anteriormente, podría utilizarse una estrategia que permita el apilamiento de los genes considerados en este trabajo, de manera de que las líneas transgénicas produzcan ambas proteínas Cry, PrA y PrB. Así se esperaría contar con un más amplio espectro de control de insectos (Chitkowski *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2011) y una mayor durabilidad de la resistencia (Walker *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2003).

Por otro lado, si bien la diferencia de control puede relacionarse a la susceptibilidad ante toxinas Bt de cada especie, también existen variaciones en la susceptibilidad entre poblaciones de la misma especie (Luttrell *et al.*, 1999). Ali y Luttrell (2004) reportaron que la variabilidad en la susceptibilidad a Cry1Ac por parte de diferentes poblaciones de *Heliothis virescens* y *Helicoverpa zea* varió alrededor de 10 veces.

Podríamos también relacionar las diferencias en eficacia con los niveles de expresión de la proteína PrA en EN08 y EN13, que serían suficientes para el control de especies como *Anticarsia gemmatalis* y *Rachiplusia nu*, pero no para controlar adecuadamente *Helicoverpa*

*gelotopoeon*. El nivel de expresión está determinado por diferentes factores entre los que encontramos aquellos inherentes a la construcción tales como las secuencias regulatorias; y otros que resultan de la incorporación del transgen en el genoma vegetal. Entre estos últimos podemos mencionar efectos de posición y cambios genéticos y epigenéticos.

Dentro de las secuencias regulatorias del transgen, el promotor es la más importante en la determinación del nivel de expresión (Díaz *et al.*, 2010). PHP1 y PHP2 poseen la misma secuencia que dirige la expresión de la proteína Bt, y dado que el control de PHP1 fue altamente eficaz para todas las especies presentes en los ambientes de estudio, el promotor no sería el causante de las diferencias en eficacia observadas entre estas construcciones.

El material genético transferido mediante bombardeo con microproyectiles se integra al azar en el ADN cromosómico de la planta. La posición del genoma donde se insertó el transgen puede afectar el nivel de expresión, lo cual se conoce como “efecto de posición” (Díaz *et al.*, 2010).

El cultivo de tejidos origina cambios en las plantas regeneradas los cuales pueden ser genéticos o epigenéticos (Jain, 2001). Estos últimos se refieren a cambios que si bien son heredables en el fenotipo, no se deben a alteraciones en la secuencia del ADN. Uno de estos mecanismos epigenéticos es la metilación del ADN, la cual está asociada a cambios en la expresión génica (Díaz *et al.*, 2010).

Otros cambios genéticos a nivel de la secuencia del ADN podrían ser originados a partir del bombardeo con microproyectiles, los cuales también pueden modificar la expresión del transgen. Durante este proceso se pueden producir copias simples intactas del transgen como también configuraciones más complejas compuestas por copias intactas, repeticiones invertidas o en tándem, copias múltiples de una misma secuencia de nucleótidos, secuencias truncadas y re-arregladas y ADN genómico intercalado (Kohli *et al.*, 2003).

Durante 2010/11 las densidades poblacionales de las especies de lepidópteros fueron bajas. Estas poblaciones en la mayoría de los casos produjeron la máxima defoliación en estadíos reproductivos avanzados tales como el comienzo de llenado de granos (R5, R5.5), el cual es el más susceptible a la disminución de rendimiento debido a este tipo de daño (Board *et al.*, 1994; Board *et al.*, 2010; Fehr *et al.*, 1981; Goli y Weaver, 1986). A pesar de esto, dado que en todos los ambientes se produjeron niveles de defoliación menores al 10 % en parcelas que no correspondían a líneas Bt, en la mayoría de los casos no se tradujeron en diferencias significativas de rendimiento. Esto coincide con lo reportado por Perotti y Gamundi (2009),

quienes evaluaron defoliaciones naturales provocadas por larvas de *Rachiplusia nu* y *Anticarsia gemmatalis*. En sojas de primera fecha de siembra encontraron disminuciones significativas de rendimiento a partir de 15 % de defoliación, mientras que en sojas de segunda época de siembra a partir de 14 % hallaron mermas que justificaron la aplicación de una medida de control. Dado que la defoliación producida no fue suficiente para traducirse en mermas significativas de rendimiento, el comportamiento del rendimiento de las isolíneas positivas respecto de las negativas así como el de las positivas entre sí, muestra una tendencia similar al encontrado en los ensayos con control de lepidópteros. En la primera fecha de siembra de General Paz se observa un comportamiento algo diferente el cual podría deberse a las condiciones ambientales al momento de la madurez, que produjeron dehiscencia natural de vainas. Esto, sumado a un retraso en la cosecha, podría haber generado diferencias de rendimiento que no pueden atribuirse al efecto *per se* de las construcciones, sino más bien a un efecto ambiental que contribuyó al error experimental.

El mayor rendimiento de la variedad PHI38, respecto al de las isolíneas positivas de las tres construcciones durante 2010/11, podría deberse a efectos no deseados en las plantas transgénicas (Filipecki y Malepszy, 2006), tal como los discutidos anteriormente para los ensayos con control de lepidópteros. Podría además, en parte deberse a variaciones genéticas existentes entre las isolíneas sometidas al proceso de transformación y la variedad sin transformar, que exceden al transgen introgresado. Las variedades poseen una pequeña fracción de variabilidad genética proveniente del cruzamiento original del cual fue derivada (Sebastian *et al.*, 2010). Si bien las isolíneas positivas y negativas fueron obtenidas a partir de tejido proveniente de la variedad PHI38, cada una de estas isolíneas no representan la variabilidad genética existente dentro de la variedad no transformada dado que provienen de un único individuo de esta.

En los ensayos del ciclo agrícola 2011/12 donde la incidencia de lepidópteros fue mayor, el rendimiento de las isolíneas positivas fue superior al de sus isolíneas negativas para cada una de las construcciones a través de todos los ambientes. También fue mayor que el de la variedad PHI38 en la mayoría de los casos. En promedio a través de los cuatro ambientes, las isolíneas positivas de PHP1 rindieron un 20% más que sus isolíneas negativas, las de PHP2 un 10 % más, y las de PHP3 un 22 % más. Esto se debió al control efectivo por parte de las tres construcciones ante las poblaciones de lepidópteros presentes en cada uno los ambientes.

En las localidades de Córdoba se observaron los mayores niveles de defoliación. La misma alcanzó el 15 % en Tinoco hacia fines del período de llenado de granos y en General Paz fue superior al 20 % desde principios de llenado de grano hasta madurez fisiológica, alcanzando como máximo cerca del 30 % de defoliación. En ambos casos el nivel de defoliación fue superior al umbral del 14 % expresado por Perotti y Gamundi (2009) como necesario para causar mermas de rendimiento en el cultivo de soja en segunda época de siembra. Board *et al.* (2010) encontraron que con un 33 % de defoliación durante el período de llenado de granos, el rendimiento se redujo de 6 a 23 %, siendo en algunos casos estas diferencias significativas al 5 % de probabilidad. Timsina *et al.* (2007) produciendo defoliaciones de un 30 % en el estadio R5, encontraron reducciones de rendimiento de un 4,2 % en fechas de siembras tempranas y de hasta un 11,3 % en fechas de siembra de principios de enero. La defoliación en Tinoco habría tenido un mayor efecto en la disminución del rendimiento ya que el cultivo alcanzó poco desarrollo. Esto fue consecuencia de la fecha de siembra tardía y al espaciamiento utilizado en este trabajo. En épocas tardías de siembra el cultivo acelera su desarrollo por lo que produce plantas de tamaño reducido y poco ramificadas. Debido a esto y a la utilización de un espaciamiento de 70 cm, el cultivo no pudo alcanzar la cobertura necesaria que permita interceptar el 95 % de la radiación antes del desarrollo de vainas (R4) por lo que la plasticidad del cultivo se vio afectada (Vega y Andrade, 2002).

En el caso de los ambientes de Pergamino, durante el ciclo agrícola 2011/12, la defoliación estuvo por debajo del 7 % en parcelas que no correspondían a líneas Bt durante todo el ciclo del cultivo. Si bien la defoliación fue baja como para producir mermas significativas en el rendimiento según lo reportado por Perotti y Gamundi (2009), hubo daño en brotes y vainas por parte de *Helicoverpa gelotopoeon* que habrían provocado una merma de rendimiento en las isolíneas negativas y en la variedad PHI38.

Si bien el control de *Helicoverpa gelotopoeon* por parte de las líneas portadoras de PHP2 no fue tan eficaz como el de las de PHP1 y PHP3, el control efectivo del resto de especies de lepidópteros presentes sumado al control parcial de esta especie, fue suficiente para poner en ventaja en rendimiento a las isolíneas positivas respecto de las negativas. En cuanto a la comparación de las isolíneas positivas entre sí, estas mostraron un comportamiento similar al de los ensayos con control de lepidópteros.

## 5. CONCLUSIONES

- Las poblaciones de lepidópteros que se presentaron tuvieron como especies predominantes a *Rachiplusia nu* y *Anticarsia gemmatalis*. *Helicoverpa gelotopoeon* estuvo entre las predominantes en Pergamino durante el segundo año de evaluación.
- La transformación de la variedad PHI38 con las construcciones PHP1 y PHP3 no produjo alteraciones en el comportamiento agronómico.
- La transformación de la variedad PHI38 con la construcción PHP2 causó alteraciones en la altura de planta en el estadio R2, los días transcurridos desde siembra hasta madurez y el rendimiento.
- Las líneas Bt portadoras de las construcciones PHP1 y las de PHP3 resultaron eficaces controlando *Rachiplusia nu*, *Anticarsia gemmatalis* y *Helicoverpa gelotopoeon*.
- Las líneas Bt portadoras de la construcción PHP2 fueron eficaces controlando *Rachiplusia nu* y *Anticarsia gemmatalis*.
- Las líneas Bt conteniendo los eventos EN08 y EN13 de la construcción PHP2 mostraron un control parcial de *Helicoverpa gelotopoeon*.
- Las líneas Bt que contienen las construcciones PHP1, PHP2 ó PHP3 mostraron control de *Helicoverpa gelotopoeon* en hojas, brotes y vainas.
- Las líneas Bt portadoras de las construcciones PHP1 y las de PHP3 serían las más promisorias para ser avanzadas en un programa de mejoramiento genético.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Ali, M.I., y R.G. Luttrell. 2004. Measuring Baseline Susceptibility of Heliothine Populations for Bt Resistance Monitoring. Summaries of Arkansas Cotton Research 2004. AAES Research Series 533: 195–199.
- All, J.N., H.R. Boerma, y J.W. Todd. 1989. Screening Soybean Genotypes in the Greenhouse for Resistance to Insects. *Crop Science* 29: 1156–1159.
- American Soybean Association. 2012. Soy Stats Online Guide. [www.SoyStats.com](http://www.SoyStats.com). American Soybean Association, St. Louis, MO.
- Antonelli, M., y G. Prieto. 2007. Monitoreo de insectos plaga en soja. Campaña 2006/2007. Para Mejorar la Producción 36 - INTA EEA Oliveros: 104–108.
- Aragón, J.R. 2002. Insectos Perjudiciales de la Soja. INTA Marcos Juarez. IDIA XXI 3: 75–82.
- Aragón, J.R., A. Molinari, y S. Lorenzatti. 1997. Manejo Integrado de Plagas. p. 248–288. *En* Giorda, L.M., Baigorri, H.E.J. (eds.), El cultivo de la soja en Argentina. INTA C.R. Córdoba.
- Barrionuevo, M.J. 2011. Redescrición de los estados preimaginales de *Rachiplusia nu* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*: 70 (3–4): 169–184.
- Bedbrook, J.R., R.S. Chaleff, S.C. Falco, B.J. Mazur, C.R. Somerville, y N.S. Yadav. 1995. Nucleic acid fragment encoding herbicide resistant plant acetolactate synthase. U. S. Patent 5,378,824.
- Bernardi, O., G.S. Malvestiti, P.M. Dourado, W.S. Olivera, S. Martinelli, G.U. Berger, G.P. Head, y C. Omoto. 2012. Assessment of the high-dose concept and level of control provided by MON 87701 × MON 89788 soybean against *Anticarsia gemmatilis* and *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Pest Management Science* 68: 1083–1091.

- Board, J.E., A.T. Wier, y D.J. Boethel. 1994. Soybean Yield Reductions Caused by Defoliation during Mid to Late Seed Filling. *Agronomy Journal* 86: 1074–1079.
- Board, J.E., S. Kumudini, J. Omielan, E. Prior, y C.S. Kahlon. 2010. Yield Response of Soybean to Partial and Total Defoliation during the Seed-Filling Period. *Crop Science* 50: 703–712.
- Bravo, A., S. Likitvivatanavong, S.S. Gill, y M. Soberón. 2011. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect biochemistry and molecular biology* 41(7): 423–431.
- Bravo, A., y M. Sobero. 2008. How to cope with insect resistance to Bt toxins? *Trends in Biotechnology* 26(10): 573–579.
- Chitkowski, R.L., S.G. Turnipseed, M.J. Sullivan, y W.C. Bridges Jr. 2003. Field and laboratory evaluations of transgenic cottons expressing one or two *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* Berliner proteins for management of noctuid (Lepidoptera) pests. *Journal of Economic Entomology* 96(3): 755–62.
- Crickmore, N., D.R. Zeigler, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, A. Bravo, y D.H. Dean. 2012. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature.  
[http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/).
- CTNBio. 2010. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. Technical Opinion no. 2542/2010 - Commercial release of genetically modified insect-resistant and herbicide-tolerant soy containing genetically modified events MON 87701 and MON 89788.  
<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/15558.html>.
- Díaz, M.L., D.C. Zappacosta, P.M. Franzone, y R.D. Ríos. 2010. Aplicación de la transformación genética al mejoramiento vegetal. p. 243–258. *En* Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., Mroginski, L. (eds.), *Biología y Mejoramiento Vegetal II*. Ediciones INTA y Argenbio.

- Elmore, R.W., F.W. Roeth, L.A. Nelson, C.A. Shapiro, R.N. Klein, S.Z. Knezevic, y A. Martin. 2001. Glyphosate-Resistant Soybean Cultivar Yields Compared with Sister Lines. *Agronomy Journal* 93: 408–412.
- Fehr, W.R., C.E. Caviness, D.T. Burmood, y J.S. Pennington. 1971. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. *Crop Science* 11: 929–931.
- Fehr, W.R., B.K. Lawrence, y T.A. Thompson. 1981. Critical Stages of Development for Defoliation of Soybean. *Crop Science* 21: 259–262.
- Filipecki, M., y S. Malepszy. 2006. Unintended consequences of plant transformation: a molecular insight. *Journal of Applied Genetics* 47(4): 277–286.
- Gamundi, J.C. 1995. Evaluación de técnicas de muestreo de insectos plaga y depredadores en cultivos de soja con diferentes sistemas de siembra y labranza. Primer Congreso Nacional de Soja, Segunda Reunión Nacional de Oleaginosos. AIANBA, Pergamino (Bs. As.). Tomo 11: IV:43-5.
- Gill, S.S. 1995. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* toxins. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 90(1): 69–74.
- Giorda, L.M. 1997. La soja en la Argentina. p. 12–26. *En* Giorda, L.M., Baigorri, H.E.J. (eds.), *El cultivo de la soja en Argentina*. INTA C.R. Córdoba.
- Goli, A., y D.B. Weaver. 1986. Defoliation Responses of Determinate and Indeterminate Late-Planted Soybeans. *Crop Science* 26: 156–159.
- Greenplate, J.T., J.W. Mullins, S.R. Penn, A. Dahm, B.J. Reich, J.A. Osborn, P.R. Rahn, L. Ruschke, y Z.W. Shappley. 2003. Partial characterization of cotton plants expressing two toxin proteins from *Bacillus thuringiensis*: relative toxin contribution, toxin interaction, and resistance management. *Journal of Applied Entomology* 127: 340–347.
- Homrich, M.S., L.M.P. Passaglia, J.F. Pereira, P.F. Bertagnolli, G. Pasquali, M.A. Zaidi, I. Altosaar, y M.H. Bodanese-Zanettini. 2008a. Resistance to *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera, Noctuidae) in transgenic soybean (*Glycine max* (L.) Merrill

- Fabales, Fabaceae) cultivar IAS5 expressing a modified Cry1Ac endotoxin. *Genetics and Molecular Biology* 31(2): 522–531.
- Homrich, M.S., L.M.P. Passaglia, J.F. Pereira, P.F. Bertagnolli, J.R. Salvadori, M. Nicolau, E. Kaltchuk-Santos, L.B. Alves, y M.H. Bodanese-Zanettini. 2008b. Agronomic performance, chromosomal stability and resistance to velvetbean caterpillar of transgenic soybean expressing *cryIAc* gene. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 43(7): 801–807.
- Jain, S.M. 2001. Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica* 118: 153–166.
- Kilen, T.C., y L. Lambert. 1986. Evidence for Different Genes Controlling Insect Resistance in Three Soybean Genotypes. *Crop Science* 26: 869–871.
- Klein, T.M., E.D. Wolf, R. Wu, y J.C. Sanford. 1987. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* 327: 70–73.
- Kohli, A., R.M. Twyman, R. Abranches, E. Wegel, E. Stoger, y P. Christou. 2003. Transgene integration, organization and interaction in plants. *Plant Molecular Biology* 52: 247–258.
- Kuehl, R.O. 2001. *Diseño de Experimentos. Principios estadísticos para el diseño y análisis de investigaciones*. 2a. Ed. Editorial Thomson.
- Luttrell, R.G., L. Wan, y K. Knighten. 1999. Variation in Susceptibility of Noctuid (Lepidoptera) Larvae Attacking Cotton and Soybean to Purified Endotoxin Proteins and Commercial Formulations of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Economic Entomology* 92(1): 21–32.
- MacRae, T.C., M.E. Baur, D.J. Boethel, B.J. Fitzpatrick, A.-G. Gao, J.C. Gamundi, L.A. Harrison, V.T. Kabuye, R.M. McPherson, J.A. Miklos, M.S. Paradise, A.S. Toedebusch, y A. Viegas. 2005. Laboratory and field evaluations of transgenic soybean exhibiting high-dose expression of a synthetic *Bacillus thuringiensis cryIA* gene for control of Lepidoptera. *Journal of Economic Entomology* 98(2): 577–587.

- Maqbool, S.B., y P. Christou. 1999. Multiple traits of agronomic importance in transgenic indica rice plants: analysis of transgene integration patterns, expression levels and stability. *Molecular Breeding* 5: 471–480.
- Massaro, R.A., G. Gonsebatt, M.V. De Altube, D. Vicente, y P. Remorini. 2005. Efecto de la aplicación temprana del insecticida cipermetrina en el cultivo de soja, sobre la entomofauna fitófaga y benéfica. *Ciclo* 2004/05. Para Mejorar la Producción 30 - INTA EEA Oliveros: 77–80.
- McPherson, R.M., y T.C. MacRae. 2009a. Assessing lepidopteran abundance and crop injury in soybean lines exhibiting a synthetic *Bacillus thuringiensis cryIA* gene. *Journal of Entomological Science* 44(2): 120–131.
- McPherson, R.M., y T.C. MacRae. 2009b. Evaluation of transgenic soybean exhibiting high expression of a synthetic *Bacillus thuringiensis cryIA* transgene for suppressing lepidopteran population densities and crop injury. *Journal of Economic Entomology* 102(4): 1640–1648.
- Miklos, J.A., M.F. Alibhai, S.A. Bledig, D.C. Connor-Ward, A.G. Gao, B.A. Holmes, K.H. Kolacz, V.T. Kabuye, T.C. MacRae, M.S. Paradise, A.S. Toedebusch, y L.A. Harrison. 2007. Characterization of Soybean Exhibiting High Expression of a Synthetic *Bacillus thuringiensis cryIA* Transgene That Confers a High Degree of Resistance to Lepidopteran Pests. *Crop Science* 47: 148–157.
- MinAgri. 2012a. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, Argentina. Sistema Integrado de Información Agropecuaria. [http:// www.siiia.gov.ar/index.php/series-por-tema/agricultura](http://www.siiia.gov.ar/index.php/series-por-tema/agricultura).
- MinAgri. 2012b. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, Argentina. Resolución SAGyP N° 446. [http://64.76.123.202/site/agregado\\_de\\_valor/biotecnologia/55-OGM\\_COMERCIALES/index.php](http://64.76.123.202/site/agregado_de_valor/biotecnologia/55-OGM_COMERCIALES/index.php).
- Parrott, A., J.N. All, M.J. Adang, M.A. Bailey, H.R. Boerma, y C.N. Stewart Jr. 1994. Recovery and Evaluation of Soybean Plants Transgenic for a *Bacillus thuringiensis* Var. *kurstaki* Insecticidal Gene. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 30P: 144–149.

- Peferoen, M. 1997. Progress and prospects for field use of Bt genes in crops. Trends in Biotechnology 15: 173–177.
- Perotti, E., y J.C. Gamundi. 2007. Evaluación del daño provocado por lepidópteros defoliadores en cultivares de soja determinados e indeterminados (GM III , IV , V) con diferentes espaciamientos entre líneas de siembra. Para Mejorar la Producción 36 - INTA EEA Oliveros: 119–125.
- Perotti, E., y J.C. Gamundi. 2009. La importancia de saber proteger oportunamente las hojas del cultivo de soja. Para Mejorar la Producción 42 - INTA EEA Oliveros: 113–117.
- Rufener II, G.K., S.K. St. Martin, R.L. Cooper, y R.B. Hammond. 1989. Genetics of Antibiosis Resistance to Mexican Bean Beetle in Soybean. Crop Science 29: 618–622.
- SAGPyA. 2009. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. <http://www.minagri.gob.ar/SAGPyA/>.
- SAS Institute. 2008. SAS Enterprise Guide, versión 4.2, (4.2.0.9016). SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Sebastian, S.A., L.G. Streit, P.A. Stephens, J.A. Thompson, B.R. Hedges, M.A. Fabrizius, J.F. Soper, D.H. Schmidt, R.L. Kallem, M.A. Hinds, L. Feng, y J.A. Hoeck. 2010. Context-Specific Marker-Assisted Selection for Improved Grain Yield in Elite Soybean Populations. Crop Science 50: 1196–1206.
- Sisson, V.A., P.A. Miller, W. V. Campbell, y J.W. Van Duyn. 1976. Evidence of Inheritance of Resistance to the Mexican Bean Beetle in Soybeans. Crop Science 16: 835–837.
- Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. Journal of Molecular Biology 98: 503–517.
- Stewart, C.N., M.J. Adang, J.N. All, H.R. Boerma, G. Cardineau, D. Tucker, y W.A. Parrott. 1996. Genetic transformation, recovery, and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis cryIAc* gene. Plant physiology 112: 121–129.

- Tabashnik, B.E., A.J. Gassmann, D.W. Crowder, y Y. Carrière. 2008. Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory. *Nature Biotechnology* 26(2): 199–202.
- Thomas, J.D., y D.J. Boethel. 1994. Synergism of Insecticides in Tests with Resistant Soybean Looper Larvae (Lepidoptera: Noctuidae) in the Laboratory and Field. *Journal of Economic Entomology* 87(6): 1416–1422.
- Timsina, J., K.J. Boote, y S. Duffield. 2007. Evaluating the CROPGRO Soybean Model for Predicting Impacts of Insect Defoliation and Depodding. *Agronomy Journal* 99: 148–157.
- USDA. 2013. United States Department of Agriculture. Natural Resources Conservation Service.  
<http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=GLMA4>.
- Vega, C.R.C., y F.H. Andrade. 2002. Densidad de plantas y espaciamento entre hileras. p. 97–135. *En* Andrade, F.H., Sadras, V.O. (eds.), Bases para el manejo del maíz, el girasol y la soja. Segunda ed. E.E.A. INTA Balcarce - F.C.A. U.N.M.P.
- Walker, D.R., J.N. All, R.M. McPherson, H.R. Boerma, y W.A. Parrott. 2000. Field Evaluation of Soybean Engineered with a Synthetic *cryIAc* 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.
- Yang, Z., H. Chen, W. Tang, H. Hua, y Y. Lin. 2011. Development and characterisation of transgenic rice expressing two *Bacillus thuringiensis* genes. *Pest Management Science* 67: 414–422.
- Zhao, J.-Z., J. Cao, Y. Li, H.L. Collins, R.T. Roush, E.D. Earle, y A.M. Shelton. 2003. Transgenic plants expressing two *Bacillus thuringiensis* toxins delay insect resistance evolution. *Nature Biotechnology* 21(12): 1493–1497.

Zhu, S., D.R. Walker, H.R. Boerma, J.N. All, y W.A. Parrott. 2006. Fine Mapping of a Major Insect Resistance QTL in Soybean and its Interaction with Minor Resistance QTLs. *Crop Science* 46: 1094–1099.

## ANEXO I

**Tabla 7:** Significancia de los análisis de varianza para la comparación de las isolíneas positivas y negativas en los ensayos con control de lepidópteros. Análisis de las variables altura de planta en los estadios V3, R2 y R8, días a madurez y rendimiento para las localidades de Argentina durante el ciclo agrícola 2010/11; y de la variable rendimiento para las localidades de Estados Unidos durante 2010.

Fuente de variación	Variable					
	Altura de planta V3	Altura de planta R2	Altura de planta R8	Días a madurez	Rendimiento Argentina	Rendimiento Estados Unidos
Localidad	*	*	*	ns	*	*
Construcción	ns	ns	ns	*	*	*
Construcción*Localidad	ns	ns	ns	ns	*	*
Evento(Construcción)	*	*	*	*	*	*
Evento*Localidad(Construcción)	ns	ns	*	*	ns	*
Isolínea	*	ns	ns	ns	ns	*
Construcción*Isolínea	ns	*	ns	*	*	*
Isolínea*Localidad	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Construcción*Isolínea*Localidad	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Evento*Isolínea(Construcción)	ns	*	ns	*	*	*
Evento*Isolínea*Localidad(Construcción)	ns	ns	ns	ns	ns	ns

\* : diferencias significativas (p<0,05)

ns: diferencias no significativas (p≥0,05)

**Tabla 8:** Significancia de los análisis de varianza para la comparación de las isolíneas positivas y negativas en los ensayos sin control de lepidópteros. Análisis de las variables total de larvas/m, defoliación y rendimiento para las dos fechas de siembra de Pergamino y General Paz, durante el ciclo agrícola 2010/11.

Fuente de variación	Variable		
	Total larvas/m	Defoliación	Rendimiento
Localidad	*	*	*
Construcción	*	*	*
Construcción*Localidad	ns	ns	ns
Evento(Construcción)	ns	*	*
Evento*Localidad(Construcción)	ns	ns	*
Isolínea	*	*	*
Construcción*Isolínea	ns	*	*
Isolínea*Localidad	*	*	ns
Construcción*Isolínea*Localidad	ns	*	*
Evento*Isolínea(Construcción)	ns	*	*
Evento*Isolínea*Localidad(Construcción)	ns	*	ns

\* : diferencias significativas (p<0,05)

ns: diferencias no significativas (p≥0,05)

**Tabla 9:** Significancia de los análisis de varianza para la comparación de la variedad PHI38 y las isolíneas positivas en los ensayos sin control de lepidópteros. Análisis de las variables total de larvas/m, defoliación y rendimiento para las dos fechas de siembra de Pergamino y General Paz, durante el ciclo agrícola 2010/11.

Fuente de variación	Variable		
	Total larvas/m	Defoliación	Rendimiento
Localidad	*	*	*
Construcción	*	*	*
Construcción*Localidad	*	*	ns
Evento(Construcción)	ns	*	*
Evento*Localidad(Construcción)	ns	*	*

\* : diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

ns : diferencias no significativas ( $p \geq 0,05$ )

**Tabla 10:** Significancia de los análisis de varianza para la comparación de las isolíneas positivas y negativas en los ensayos sin control de lepidópteros. Análisis de las variables total de larvas/m, larvas de *Helicoverpa gelotopoeon*/m, total de larvas excluyendo *Helicoverpa gelotopoeon*, defoliación y rendimiento para Tinoco, General Paz y las dos fechas de siembra de Pergamino; daño de brotes para la primera fecha de siembra de Pergamino; y daño de vainas para las dos fechas de siembra de Pergamino. Resultados obtenidos durante el ciclo agrícola 2011/12.

Fuente de variación	Variable						
	Total larvas/m	Larvas		Defoliación	Daño de brotes	Daño de vainas	Rendimiento
		<i>H. gelotopoeon</i> /m	Total larvas excluy. <i>H. gelotopoeon</i> /m				
Localidad	*	*	*	*	n/a	ns	*
Construcción	*	*	*	*	ns	*	*
Construcción*Localidad	ns	*	ns	*	n/a	ns	ns
Evento(Construcción)	ns	ns	ns	*	ns	ns	*
Evento*Localidad(Construcción)	ns	ns	ns	ns	n/a	*	*
Isolínea	*	*	*	*	*	*	*
Construcción*Isolínea	*	*	ns	*	*	*	*
Isolínea*Localidad	*	*	*	*	n/a	ns	*
Construcción*Isolínea*Localidad	ns	*	ns	*	n/a	ns	ns
Evento*Isolínea(Construcción)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Evento*Isolínea*Localidad(Construcción)	ns	ns	ns	ns	n/a	ns	ns

\* : diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

ns : diferencias no significativas ( $p \geq 0,05$ )

n/a: No aplica para esa variable

**Tabla 11:** Significancia de los análisis de varianza para la comparación de la variedad PHI38 y las isolíneas positivas en los ensayos sin control de lepidópteros. Análisis de las variables total de larvas/m, defoliación y rendimiento para Tinoco, General Paz y las dos fechas de siembra de Pergamino; daño de brotes para la primera fecha de siembra de Pergamino; y daño de vainas para las dos fechas de siembra de Pergamino. Resultados obtenidos durante el ciclo agrícola 2011/12.

Fuente de variación	Variable				
	Total larvas/m	Defoliación	Daño de brotes	Daño de vainas	Rendimiento
Localidad	*	*	n/a	ns	*
Construcción	*	*	*	*	*
Construcción*Localidad	*	*	n/a	ns	*
Evento(Construcción)	*	ns	ns	ns	*
Evento*Localidad(Construcción)	ns	ns	n/a	ns	ns

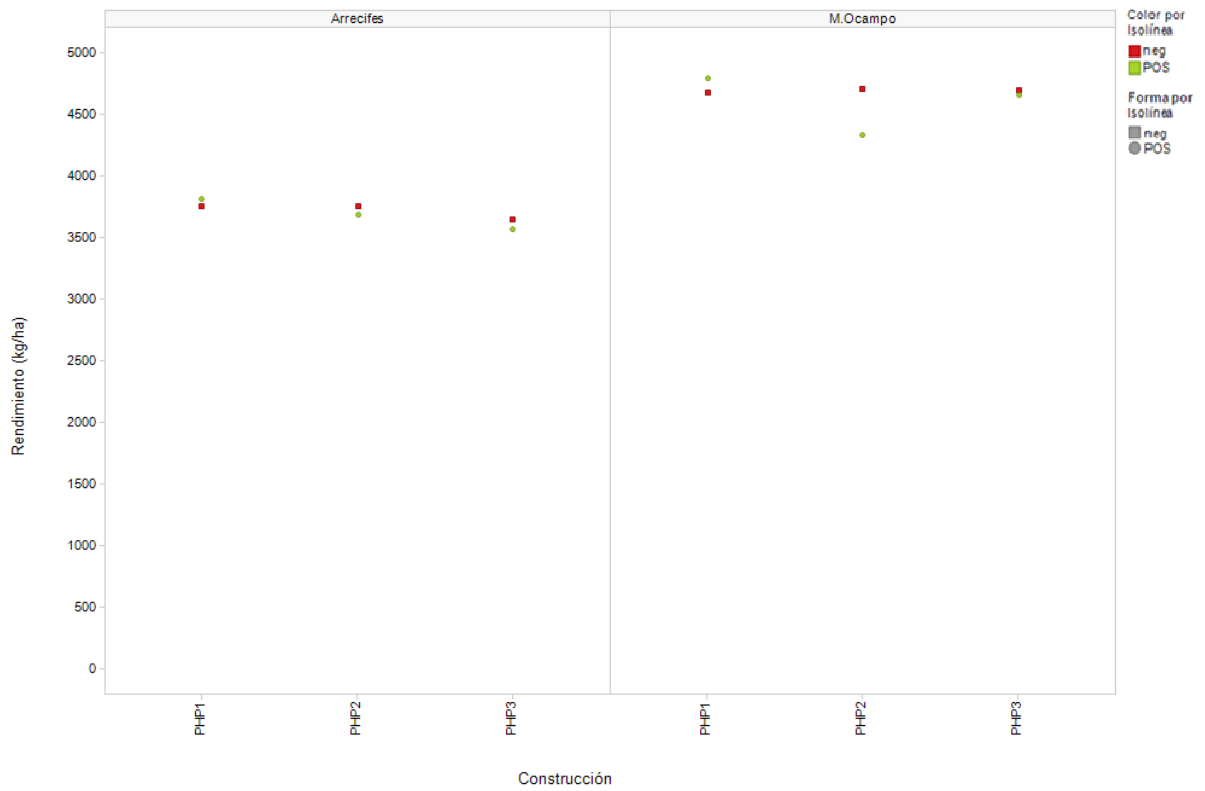
\* : diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

ns : diferencias no significativas ( $p \geq 0,05$ )

n/a: No aplica para esa variable

## ANEXO II

**Gráfico 20:** Rendimiento (kg/ha) de las isolíneas positivas y negativas de las construcciones PHP1, PHP2 y PHP3 en los ensayos con control de lepidópteros. Resultados de localidades de Argentina (Arrecifes y M. Ocampo) durante el ciclo agrícola 2010/11.



**Gráfico 21:** Rendimiento (kg/ha) de las isólineas positivas y negativas de las construcciones PHP1, PHP2 y PHP3 en los ensayos con control de lepidópteros. Resultados de las localidades de Estados Unidos (Bevington, Griswold, Johnston, Mansfield y Montezuma) durante el año 2010.

