

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



Variabilidad Genética de Poblaciones del Norte de México de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidóptera: Noctuidae) en Maíz

Por:

**MANUEL EDUARDO CHI CHUC**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO**

Saltillo, Coahuila, México

Mayo, 2015.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

Variabilidad Genética de Poblaciones del Norte de México de *Spodoptera frugiperda*  
(Smith) (Lepidóptera: Noctuidae) en Maíz

Por:

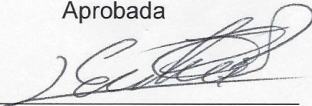
**MANUEL EDUARDO CHI CHUC**


TESIS

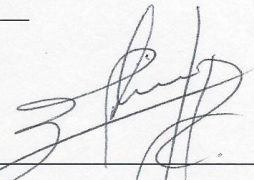
Presentada como requisito parcial para obtener el título de:


**INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO**

Aprobada

  
Dr. Ernesto Cerna Chávez  
Asesor Principal

  
Dr. Luis Alberto Aguirre Uribe  
Coasesor

  
M.C. José Ricardo Pérez Zubiri  
Coasesor

  
Dr. Leobardo Bañuelos Herrera  
Coordinador de la División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México

Mayo, 2015.

## *DEDICATORIAS*

### *A MIS PADRES:*

*MARTHA ELENA CHUC CANCHE Y EMILIO CHAN AKÉ*

*Con todo cariño, amor y respeto que se merecen, por apoyarme en mi formación en la vida así como los ánimos, consejos que me brindaron y por el esfuerzo, sacrificio que han hecho para poder graduarme como Ing. Agrónomo Parasitólogo. Gracias por depositar la confianza en mí.*

### *A MIS HERMANITOS:*

*ELBERTH ADALBERTO CHAN CHUC, ADRIANA MAGALY CHAN CHUC, EMILIO CHAN CHUC.*

*Con mucho cariño y amor para ustedes que a pesar de la distancia en que nos encontramos siempre me apoyaron y dieron ánimos a seguir adelante y la confianza que depositaron en mí.*

### *A MI ABUELA:*

*MARGARITA CHANCHE DZUL*

*A mi querida y amada abuelita por haber estado siempre en los momentos buenos y malos dándome sabios consejos así como haberme*

*enseñado a nunca rendirme y esforzarme a perseguir mis sueños.  
Gracias por haber confiado en mí.*

***A MI NOVIA:***

***MIRIAM VILLA HERNÁNDEZ***

*Por todo lo vivido, por los buenos y malos ratos que hemos compartido,  
por tus consejos los ánimos y sueños compartidos. Gracias por ser la  
novia más comprensiva y permitirme estar a tu lado.*

## *AGRADECIMIENTO*

### *A DIOS*

*Que siempre me ha dado la fuerza de crecer día a día, tanto en lo profesional como en lo personal y por ser la luz en mi camino, que siempre me impulsa a vencer todos los obstáculos y las adversidades que se me presentaron a lo largo del camino.*

### *A LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"*

*Por haberme permitido realizar uno de los sueños más importantes en mi vida. Gracias por formarme profesionalmente y por generar en mí nuevos conocimientos. Pondré en alto a mi Alma Terra Mater y sobre todo demostrar que los buitres sí valemos la pena, gracias a la Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro".*

### *A MIS ASESORES:*

*Al Dr. Ernesto Cerna Chávez por contribuir en el desarrollo de esta investigación de tesis.*

*Al Dr. Luis Alberto Aguirre Uribe, por sus buenos consejos y revisión de mi trabajo de tesis.*

*Al Mc. José Ricardo Pérez Zubiri por haberme apoyado en la elaboración de la tesis y por sus consejos muy sabios, por su dedicación al trabajo de investigación y apoyarme en momentos difíciles.*

### *A MIS AMIGOS:*

*Gracias a todos ustedes amigos que siempre estuvieron conmigo en cada uno de mis momentos difíciles y felices, siempre los recordare especialmente a ustedes mis queridos amigos: Ethel Beanney Reyes Gaytán, Gemanina López Pérez, Kennia Moreno, Emília Zunun Cifuentes, Cristina Trejo Ramos, Jessica Hernández Adame, Víctor Hugo Pérez Díaz, Gregorio Ramírez Ceh (Pollo).*

### *A LA FAMILIA REYES GAYTÁN*

*Por todos los momentos que pase con ellos por sus consejos y ser un apoyo en los momentos más difíciles*

# ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
<i>DEDICATORIAS</i> .....	<i>II</i>
<i>AGRADECIMIENTO</i> .....	<i>V</i>
<b>ÍNDICE DE CONTENIDO</b> .....	<b>VII</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b> .....	<b>IX</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>XI</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>XII</b>
<b>I.INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	<b>5</b>
<b>2.1 Descripción del maíz (<i>Zea mays</i> L.)</b> .....	<b>5</b>
2.1.1 Origen y distribución .....	5
2.1.2 Importancia del maíz .....	5
2.1.3 Taxonomía del maíz .....	6
2.1.4 Descripción botánica .....	7
2.1.5 Morfología del maíz .....	7
2.1.5.1 Sistema radical.....	8
2.1.5.2 Tallo.....	8
2.1.5.3 Hoja.....	8
2.1.5.4 Inflorescencia .....	9
2.1.5.5 Semillas.....	9
2.1.6 Plagas Importantes del Maíz .....	9
<b>2.2 Generalidades de <i>Spodoptera frugiperda</i></b> .....	<b>10</b>
2.2.1 Ubicación taxonómica.....	11
2.2.2 Origen y distribución .....	12
2.2.3 Importancia.....	12
2.2.4 Daños .....	13

<b>2.3 Marcadores Moleculares .....</b>	<b>13</b>
2.3.2 SSR (secuencias simples repetidas) .....	14
2.3.3 ISSRs (repeticiones entre secuencia simple) .....	14
<b>III. MATERIALES Y MÉTODO.....</b>	<b>16</b>
<b>3.1 Descripción del sitio .....</b>	<b>16</b>
<b>3.2 Procedimiento .....</b>	<b>16</b>
3.2.2 Preservación de muestras .....	17
3.2.3 Extracción de ADN. ....	18
3.2.4 Cuantificación de ADN.....	19
3.2.5 PCR (Reacción en cadena de polimerasa).....	20
3.2.6 Electroforesis .....	22
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>25</b>
<b>4.1 Análisis de la varianza molecular de las poblaciones de <i>S. frugiperda</i>.....</b>	<b>27</b>
<b>4.2 Variabilidad genética de las poblaciones de <i>S. frugiperda</i>.....</b>	<b>28</b>
<b>4.3 Distancia genética de las poblaciones de <i>S. frugiperda</i> colectadas en el norte de México.....</b>	<b>31</b>
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>34</b>
<b>VI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>41</b>
<b>VI .LITERATURA CITADA.....</b>	<b>42</b>



## ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1 Número de larvas colectadas de <i>Spodoptera frugiperda</i> en cada localidad. .....	17
Cuadro 2 Secuencia de marcadores moleculares tipo ISSR usados en el experimento. ....	21
Cuadro 3 Condiciones de amplificación de la PCR en <i>Spodoptera frugiperda</i> . ....	21
Cuadro 4 Descripción de los datos de marcadores moleculares .....	25
Cuadro 5 Bandas monomórficas.....	25
Cuadro 6 Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) de las poblaciones de <i>Spodoptera frugiperda</i> en el norte de México.....	28
Cuadro 7 Coeficiente de correlación. ....	28
Cuadro 8 Medidas de diversidad genética de poblaciones de <i>Spodoptera frugiperda</i> en el norte de México. ....	29
Cuadro 9 Medidas de diversidad genética de poblaciones de <i>Spodoptera frugiperda</i> en el norte de México obtenida por Bootstrap. ....	30
Cuadro 10 Medidas de diversidad genética de las poblaciones de <i>Spodoptera frugiperda</i> en el norte de México obteniendo errores estándar estimados por Bootstrap. ....	30
Cuadro 11 Distancia genética de las poblaciones de <i>Spodoptera frugiperda</i> obtenida utilizando el índice de Nei estándar.....	31
Cuadro 12 Distancia genética de las poblaciones de <i>Spodoptera frugiperda</i> obtenida utilizando el índice de Nei mínimo. ....	32
Cuadro 13 Distancia genética de las poblaciones de <i>Spodoptera frugiperda</i> obtenida utilizando el índice de Nei Insesgado. ....	32
Cuadro 14 Lista de algunos insecticidas químicos más usados para el control de plagas en el cultivo de maíz en el estado de Coahuila (INIFAP, 1995). ....	36

Cuadro 15 Lista de insecticidas químicos más usados para el control de plagas en el cultivo de maíz en el estado de Durango (INIFAP, 2005).....	37
Cuadro 16 Lista de insecticidas químicos más usados para el control de plagas en el cultivo de maíz en el estado de Sinaloa (INIFAP, 2010).....	38
Cuadro 17 Lista de insecticidas químicos más usados para el control de plagas en el cultivo de maíz en el estado de Jalisco (INIFAP, 2007).....	40

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1 Colecta de larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> en el cultivo del maíz. ....	17
Figura 2 Preservación de muestras de <i>Spodoptera frugiperda</i> en etanol al 70%. ....	18
Figura 3 Proceso de extracción de ADN de larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> A) Secado de larvas, B) Macerada de larvas, C) Centrifugado de larvas, D) ADN separación por fases, E) Segunda centrifugación, F) Tercera centrifugación, G) Secado de pastillas y H) Agitación para la incorporación de la pastilla.....	19
Figura 4 Cuantificación de ADN A) Epoch Microplate Spectrophotometer™ con la placa Take3™; B) Take3™ cargada con ADN. ....	20
Figura 5 A) Proceso de agregación de los contenidos, B) Thermo Axygen Maxygene. .....	22
Figura 6 Electroforesis A) peso de agarosa, B) microondas, C) azul de bromofenol, D) PCR de cada muestra, E) cargado de gel con PCR, F) colocación de molde con gel al electroforesis, G) electroforesis después de 1 hora 30 min., H) transiluminador .....	23
Figura 7 Fotografía tomada en el transiluminador de la población 9 con el marcador molecular tipo ISSR 1. ....	24
Figura 8 Dendrograma basada en la distancia genética de Mahalanobis de poblaciones de <i>Spodoptera frugiperda</i> derivado del análisis de marcadores ISSR. ....	33

## RESUMEN

*Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera: Noctuidae) J. E. Smith es un palomilla que está ocasionando grandes pérdidas en el cultivo de maíz. Debido a la escasa información sobre la variabilidad genética de esta especie, el objetivo de este estudio fue realizar una caracterización molecular, utilizando marcadores moleculares tipo ISSR (Repetición entre secuencias simples), a partir de larvas colectadas en diferentes estados de la República Mexicana: Sinaloa, Jalisco, Coahuila y Durango en cultivos de maíz. Los marcadores ISSR utilizados para este trabajo amplificaron un total de 27 loci, de los cuáles el 92.59% fueron polimórficos. Estos loci fueron identificados en geles de agarosa al 1% en un rango de 100 a 1300 pares de bases. Los ISSR fueron útiles para determinar que las poblaciones de *S. frugiperda* presentan una alta variabilidad genética, pero no permitieron discriminar los dos biotipos de este insecto como otros autores reportan, utilizando marcadores AFLP (Polimorfismo en la Longitud del Fragmento Amplificado). Un análisis de varianza molecular (AMOVA) realizado con los datos de las poblaciones; mostró que si existe diferenciación genética entre poblaciones (valor de  $p = 0.0175$ ), y dentro de estas ( $p = 0.0075$ ). La población más alejada en relación a las otras, fue la de Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco. La variabilidad genética obtenida podría ser por los diferentes grupos toxicológicos que se usan en el manejo de la plaga en Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco.

Palabras claves: *Spodoptera frugiperda*, Variabilidad genética, ISSR.

Correo Electronico; Manuel Eduardo Chi Chuc, [me\\_chichuc@yahoo.com.mx](mailto:me_chichuc@yahoo.com.mx)

## I.INTRODUCCIÓN

El rápido crecimiento poblacional de la humanidad ha acarreado la necesidad de la aparición de nuevas técnicas con el propósito de aumentar la producción de alimentos, así como también minimizar las pérdidas existentes, sin perjudicar la calidad de los mismos. En este sentido los cereales tienen gran relevancia, constituyéndose como una principal fuente de alimentos, y destacándose entre ellos el maíz *Zea mays* L. (Clavijo & Pérez 2000; Tavares 2002). El maíz es el cultivo agrícola más importante de México, desde el punto de vista alimentario, industrial, político y social. (Barkin, 2003).

El maíz es el principal cultivo en México, participa con el 18% del valor de producción del sector agrícola y concentra el 33% de la superficie sembrada en el territorio nacional (7.5 millones de hectáreas). El volumen de producción de maíz en 2012 alcanzó 22.1 millones de toneladas y se estima que para 2013 se alcanzaron 22.7 millones. Mientras que la superficie de temporal ocupa el 74% de la superficie, aporta únicamente el 40% del valor generado. Todas las entidades del país presentan algún nivel de producción de maíz, sin embargo, siete entidades concentran el 64.5% del volumen de producción nacional. Sinaloa es el principal productor al concentrar el 16.5% del total. Le siguen en importancia Jalisco, Michoacán, Estado de México, Chiapas, Guerrero y Veracruz. (FND, 2014).

Para la producción de maíz; el ataque por insectos representa uno de los aspectos más importantes de cuidar en su cultivo. Son numerosos los daños de todo tipo producidos por las fases larvarias o adultos de muchos insectos. Su interés es enorme desde el punto de vista económico, incluyendo no solo la pérdida de cosechas sino los gastos necesarios para su control y prevención, por lo general de tipo químico. No puede olvidarse tampoco, su repercusión social,

por la merma en el abastecimiento del alimento de primera necesidad (Rodríguez *et al.*, 2003)

El gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidóptera: Noctuidae), es un insecto tropical endémico del hemisferio occidental que se extiende desde Argentina hasta Norteamérica (López-Edwards *et al.* 1999; Pashley *et al.* 2004; Busato *et al.* 2004; Clark *et al.* 2007; Martinelli *et al.* 2007). Este insecto, es considerado como una de las plagas primarias de cultivos de maíz y secundaria en algodón, arroz y algunas hortalizas en Estados Unidos y Brasil (Pashley 1998; Busato *et al.* 2004)

El análisis de la estructura genética de la población, es decir, la distribución de la variación genética dentro y entre poblaciones, es un aspecto clave para entender la dinámica de poblaciones de insectos plaga en escenarios agrícolas y entender las estructuras de población proporciona la información más fundamental para la identificación fiable de las especies y el diseño de estrategias de gestión. Además, la comprensión de la genética de la invasión de plagas puede ayudar a identificar el origen, el número de introducciones y la propagación de la infestación de una plaga en un área (Kondidie, 2011).

Usando marcadores moleculares RAPD (Polimorfismos de ADN amplificados al azar), SSR (Secuencias Simples Repetidas), AFLP (Polimorfismos de la longitud del fragmento amplificado) o ISSR (repeticiones de secuencia simple interna o repeticiones de secuencia simple anclada), se pueden utilizar para distinguir diferencias genéticas entre individuos. Los marcadores ISSR son secuencias de microsatélites (SSR) utilizadas como primers, capaces de diferenciar rápidamente fragmentos de ADN genómico. Estos primers se componen de 15 a 20 nucleótidos con nucleótidos extras en los extremos 3' o 5' de la cadena de ADN que funcionan como anclas. Este tipo de marcador combina las ventajas de los SSRs y AFLPs aunado con la universalidad de los RAPD, ya que no se necesita conocer previamente la secuencia del genoma estudiado. Los ISSR son marcadores altamente polimórficos y han probado su utilidad en estudios de diversidad genética, filogenia, identificación de genes, mapeo genético y biología evolucionaria (Joint FAO/IAEA 2002; González y Aguirre 2007; Zietkiewicz *et al.*

1994; Reddy *et al.* 2002; Wolfe 2010; Pharmawati *et al.* 2004; Basha y Sujatha 2007; Ganesh *et al.* 2008; Cai *et al.* 2010).

Además, estos marcadores podrían ser usados para monitorear migración de poblaciones, en el desarrollo de agentes de control biológico, en programas de mejoramiento, y para prácticas de manejo en general (Arias *et al.*, 2011).

Una característica importante de los marcadores moleculares es que no son afectados por el ambiente, y por esto pueden ser utilizados en la descripción de parentales o en la identificación de variaciones genéticas entre individuos de una población, para constatar diferencias o similitudes entre los genotipos analizados (Reddy *et al.* 2002; Basha y Sujatha 2007; Guachambala y Rosas 2011; Subramanyam *et al.* 2009; Jubera *et al.* 2009).

## **OBJETIVO:**

Determinar mediante marcadores moleculares la variabilidad genética de poblaciones de *Spodoptera frugiperda*

## **JUSTIFICACION:**

Debido al creciente número de reportes relativos a los daños ocasionados al cultivo de maíz por *Spodoptera frugiperda*, esta investigación pretende generar información sobre la variabilidad genética en las poblaciones de dicha plaga, a fin de poder comprender el flujo genético y su comportamiento poblacional para poder estructurar estrategias efectivas de control integrado de la misma.

## **HIPOTESIS:**

Las poblaciones bajo estudio no serán significativamente variables genéticamente entre sí.



## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Descripción del maíz (*Zea mays* L.)

#### 2.1.1 Origen y distribución

Carlos Linneo lo descubrió y clasificó dentro del género *Zea* y la especie *mays*. Hasta el momento no se sabe con precisión la época y el lugar exacto de la aparición del maíz, por lo que históricamente se consideró que el maíz era nativo de Asia y/o de América, este el último el más aceptado, ya que existen suficientes testimonios que lo avalan (Reyes, 1990). Con la suficiente evidencia ha quedado establecido que México (Mesoamérica) fue el centro de origen primario, domesticación y de su diversificación en las más de 61 razas nativas reconocidas en nuestro territorio, esto hace más de 6 mil años y las migraciones humanas lo llevaron a Sudáfrica. (Reyes, 1990; CONABIO, 2006; Kato *et al.*, 2009; Benavidez *et al.*, 2010).

#### 2.1.2 Importancia del maíz

El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los cultivos más importantes del mundo. es la especie agrícola más diversa y buena parte del territorio mexicano forma parte de su centro de origen y es uno de sus centros actuales de diversidad (CONABIO, 2008), con una importancia desde el punto de vista alimenticio, industrial, político, cultural y social.

La producción de este grano está distribuida en todo el territorio nacional; sin embargo, en el ámbito estatal, cinco entidades de la República contribuyen con el 54% de la producción total (18.9 millones de ton), siendo los principales estados productores, en orden de importancia: Sinaloa, con 14.6 %; Jalisco con 13.9 %, Estado de México con el 10.2 %; Chiapas, 9 %, y Michoacán con el 6.6 %. La producción conjunta de estos estados es equivalente a 10,220 millones de ton (SIAP, 2009).

En México, el cultivo de maíz cobra gran importancia por ser fuente básica de la alimentación humana y animal, por la superficie cultivada y por la creciente demanda. Sin embargo estos cereales son invadidos por diversos organismos durante su desarrollo en el campo, su transporte y almacenaje, esto ocasiona indudablemente pérdidas económicas que fluctúan entre el 7 y el 10% de la cosecha total (FAO, 2006).

### 2.1.3 Taxonomía del maíz

Ubicación taxonómica del maíz de acuerdo USDA-NRCS (2009)

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

Súper división: Spermatophyta

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Cyperales

Familia: Poaceae

Género: *Zea*

Especie: *mays* L.

#### 2.1.4 Descripción botánica

El maíz es una planta de porte robusto y de hábito anual; de tallo simple, erecto, de elevada longitud alcanzando alturas de uno a cinco metros, con pocos macollos o ramificaciones, presentes nudos y entrenudos y una medula esponjosa. Las hojas nacen en los nudos de manera alterna a lo largo del tallo; se encuentran abrazadas al tallo mediante la vaina que envuelve el entrenudo y cubre la yema floral, de tamaño y ancho variable. Las raíces primarias son fibrosas presentando además raíces adventicias, que nacen en los nudos por encima de la superficie del suelo, ambas tienen la misión de mantener a la plantas erecta (Jugenheimer, 1988).

Es una planta monoica de flores unisexuales, que presenta flores masculinas y femeninas bien diferenciadas en la misma planta: la inflorescencia masculina es terminal, largamente pedunculada, conocida como panícula (o espiga) que consta de un eje central o raquis y ramas laterales; a lo largo del eje central se distribuyen los pares de espiguillas de forma polística y en las ramas con arreglo dístico y cada espiguilla está protegida por dos brácteas o glumas; que a su vez contienen en forma apareada las flores estaminadas; en cada florecilla componente de la panícula está en función de la tonalidad de las glumas y anteras, que pueden ser de coloración verde, amarilla, rojiza o morada ( Jugenheimer,1988;Reyes,1990; Benavidez *et al.*, 2010).

#### 2.1.5 Morfología del maíz

Las características morfológicas, los cambios estructurales y fisiológicos que acompañan el crecimiento y el desarrollo de la planta en los cereales son muy similares, con excepción del maíz, esta similitud se extiende a la formación de la espiga y la semilla (Díaz, 1954; Lesur, 2005).

#### 2.1.5.1 Sistema radical

Las raíces presentan un importante componente funcional y estructura de la planta de maíz (Cabrera, 2002); en la planta madura, las raíces pueden profundizar hasta 1.8 m y explorar una superficie de 2 m de diámetro (Salazar, 1990), el sistema radicular de la planta de maíz presenta varios tipos de raíz, como son; raíz seminal o principal, raíces adventicias, raíces sostén o soporte y raíces aéreas.

#### 2.1.5.2 Tallo

El tallo es simple, cilíndrico, erecto, de elevada longitud, sin ramificaciones, interiormente es carnoso, filamentososo y con alto contenido de agua (Salazar, 1990), formado por nudos y el número de estos nudos varían de 8 a 25 (Bejarano, 2000); puede desarrollarse hijos basales, los cuales cobran importancia en plantíos que resultan de baja densidad, puesto que ayudan a compensar el rendimiento; estos macollos también son de interés en la producción de híbridos. El tallo alcanza su máximo desarrollo cuando la panoja ha emergido completamente y se ha iniciado la producción del polen.

#### 2.1.5.3 Hoja

Las hojas son largas, anchas y planas, de gran tamaño, lanceolada, alternas, paralelinervias. Crecen en la parte superior de los nudos, abrazando al tallo mediante estructuras llamadas vainas. La cara superior de la hoja es pilosa, adaptada para la absorción de energía solar, mientras que la cara inferior, glabra, tiene numerosos estomas que permiten el proceso respiratorio. Las hojas son mantenidas en ángulos apropiadamente rectos con respecto al tallo mediante una fuerte nervadura central. En la superficie foliar de la hoja, en la unión del limbo con la vaina, existe una proyección delgada y semitransparente llamada lígula que

envuelve al tallo. La lígula restringe la entrada de agua y reduce las pérdidas por evaporación (Bejarano, 2000).

Su color usual es verde pero puede encontrarse hojas rayadas de blanco y verde o verde y púrpura. El número de hojas por planta varían entre 8 a 35, anónimo, 1988. La lámina de la hoja puede llegar a medir hasta 150 cm de largo (Salazar, 1990).

#### 2.1.5.4 Inflorescencia

La inflorescencia masculina (espiga) y femenina (mazorca) se encuentra en la misma planta, pero en sitios diferentes, por esto se dice que es una planta monoica (Salazar, 1990 citado por Moo; 2011).

#### 2.1.5.5 Semillas

La cubierta o capa de la semilla, se llama pericarpio, esta es dura, por debajo se encuentra la capa de aleurona, que le da el color al grano (blanco, amarillo o morado) el cual contiene proteínas, interiormente está el endospermo, con el 85 - 90 % del peso del grano. El embrión está formado por la radícula y la plúmula, ubicándose en el escutelo, localizado en la parte inferior del grano donde va adherido a la tusa o raquis (Salazar, 1990 citado por Moo; 2011).

#### 2.1.6 Plagas Importantes del Maíz

Uno de los factores más importantes que limitan la producción de maíz, son los insectos plaga y otros organismos afines a estos como los ácaros; capaces de infestar el maíz en cualquier etapa de su desarrollo o en el almacén y además pueden atacar cualquier parte de la planta, a menudo con graves consecuencias (Ortega, 1987).

Este cultivo tiene aproximadamente 75 plagas insectiles de la raíz, follaje y la mazorca o elote, de importancia económica en el agroecosistema maíz mexicano (Sifuentes, 1985; Ortega, 1987).

El grupo de las palomillas es el que más daño causa a nivel mundial, conformado de gusanos cortadores (*Agrotis ipsilon*, *Agrotis spp.*, *Peridroma saucia*, *Chorizagrotis auxiliaris*), ocasionan daño al tallo de la planta, cortadas a ras del suelo o ligeramente por debajo de la superficie, ocasiona agujeros en las hojas y márgenes de las hojas y cavidades en la base del tallo, lo que resulta en plantas que tienden a marchitarse y acamarse; gusanos soldados o cogolleros (*Spodoptera spp*; *S. frugiperda* y *Pseudaletia spp*) ocasionan daños a hojas enteras, mazorca y espigas, tallos cortados en la base; plantas jóvenes pueden ser consumidas durante infestaciones severas; gusano elotero *Helicoverpa zea* causa principalmente daños en la mazorca directo a los granos; (*Euxesta spp*), consumen y recortan el estigma dentro del canal del estigma, reduce la polinización, puntas de la mazorca blancas debido a la alimentación de las larvas, destrucción de los granos en desarrollo, aumento de la vulnerabilidad a la pudrición de mazorca, taladra el punto de crecimiento y provocan cogollo muerto (Ortega, 1987; CIMMYT, 2011).

## **2.2 Generalidades de *Spodoptera frugiperda***

El orden lepidóptera incluye palomillas que causan gran daño a varios cultivos a nivel mundial, siendo algunas de éstas las palomillas de los cereales, barrenadores, gusano elotero, gusano cortador, gusanos soldados y gusano cogollero. Este último es la plaga de mayor importancia económica en muchos cultivos de nuestro país, pero muestra mayor preferencia por el cultivo de maíz. El “gusano cogollero del maíz” o simplemente *S. frugiperda*, actúa como gusano tierrero, trozador o gusano soldado y como cogollero que es un hábito más característico en el maíz (Negrete, 2003).

Las palomillas, de color café grisáceo con dibujos más oscuros, ovipositan masas de huevecillos cubiertas por pelos en las hojas. De ahí nacen unas pequeñas larvas grises de cabeza negra que se alimentan en grupo de una hoja y, a medida

que crecen se devoran entre sí hasta que solo queda una, de color café claro con líneas longitudinales café oscuro o casi negro que, con el maíz ya más crecido, se refugia en el cogollo, en cuyo interior se alimenta haciendo grandes perjuicios, hasta que la planta alcanza un metro de altura, si bien en ocasiones ataca también las espigas y las partes tiernas del elote. Sin embargo, el daño más grave por esta plaga, lo resienten las plantas pequeñas que a veces son afectadas en su totalidad. Muchas de ellas mueren o retrasan su crecimiento. La producción de grano disminuye entre 10 y 100 %, ya que en ocasiones se pierde todo el cultivo cuando las plantitas mueren (BAYERCROPSCIENCE, 2010).

### 2.2.1 Ubicación taxonómica

De acuerdo a Triplehorn y Johnson (2005) se presenta la siguiente ubicación taxonómica para el gusano cogollero.

Reino: Animalia

Phylum: Artrópoda

Clase: Hexápoda

División: Pterigota

Orden: Lepidóptera

Suborden: Frenatae

Superfamilia: Noctuidea

Familia: Noctuidae

Subfamilia: Amphipyirinae

Tribu: Prodeniini

Género: *Spodoptera*

Especie: *frugiperda* (J.E.Smith).

### 2.2.2 Origen y distribución

El gusano cogollero es nativo de las regiones tropicales del hemisferio occidental de los Estados Unidos hasta Argentina. El gusano cogollero se dispersa a grandes distancias anualmente durante los meses de verano. Sin embargo, como regulares y graves plagas, se encuentra en todo los estados del sureste (Capinera, 2008).

En México, su distribución es muy amplia, estando presente en todas las zonas productoras de maíz. Su presencia y daños han sido consignadas en las siguientes entidades: Michoacán, Guerrero, Morelos, Veracruz, Oaxaca, Quintana Roo, Yucatán, Baja California Sur, Sonora, Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Chihuahua, Durango, San Luis Potosí, Guanajuato, Tamaulipas, Hidalgo, Puebla, México, Chiapas y Campeche (S.A.R.H., 1992).

### 2.2.3 Importancia

*S. frugiperda* presenta una metamorfosis completa (huevo, larva; pupa y adulto). Presentando masas de huevecillos muy amplificadas (Ortega, 1987). La fase inmadura (larva) es la que causa el mayor daño (Montes, *et al.*, 2001), que va desde el 13 % hasta el 60 %. Los daños más serios corresponden a zonas temporales de regiones tropicales y subtropicales (S.A.R.H., 1992). Además de que tiene una amplia cantidad de hospederos, destacándose principalmente el maíz (Angulo *et al.*, 2006).

El gusano cogollero es considerado como una de las plagas más importantes del maíz en las regiones tropicales y subtropicales de América. En diversas entidades del país se han registrado pérdidas causadas por este insecto que va desde 13 hasta 60 %. Los daños más serios corresponden a las zonas temporales de regiones tropicales y subtropicales. Además de maíz este insecto puede afectar otras gramíneas como sorgo, arroz, pastos, algunas leguminosas como frijol, soya



y cacahuete y cultivos hortícolas como papa, cebolla, pepino, col y camote (Notz, 1973; citado por Jiménez, 2011).

#### 2.2.4 Daños

*Spodoptera frugiperda*, es considerado la plaga más importante del maíz en muchas regiones de América (García *et al.*, 1999), Por su voracidad y daños ocasionados al cultivo. Los gusanos se localizan en el cogollo de las plantas, en donde se alimentan de las hojas en formación y las cuales al desarrollarse quedan perforadas y rasgadas; el ataque temprano causa la muerte de plántulas o el retraso en el desarrollo de la planta (Rodríguez y De León, 2008).

El gusano cogollero ataca alrededor de 60 especies de plantas (Andrews, 1988). En maíz este insecto es capaz de disminuir hasta el 90% de rendimiento, si no se controla oportunamente (Banda, 1981). En México, el maíz es la base de la alimentación y afecta económicamente más al rendimiento; si la planta es atacada cuando tiene entre 40 y 60 cm de altura y una edad menor a los 29 días (Banda *et al.*, 1981).

Los tres primeros instares requieren menos del 2% del follaje total consumido; sin embargo una larva puede llegar a consumir 140 cm<sup>2</sup> para completar su desarrollo (S.A.R.H., 1992)

### 2.3 Marcadores Moleculares

Los marcadores moleculares son una herramienta necesaria en muchos campos de la biología como evolución, ecología, bio-medicina, ciencias forenses y estudios de diversidad. Además se utilizan para localizar y aislar genes de interés. En la actualidad existen varias técnicas moleculares que nos permiten conocer cómo se encuentran las proporciones de genes en las poblaciones naturales de manera indirecta, como con los análisis de proteínas, o de manera directa con estudios de ADN. Los diferentes tipos de marcadores se distinguen por su

capacidad de detectar polimorfismo en loci únicos o múltiples y son de tipo dominante o codominante (Simpson, 1997).

### 2.3.2 SSR (secuencias simples repetidas)

En los genomas existe un ADN ubicuo y abundante denominado “microsatélite” que consiste en mono-1 di2 tri- y tetra nucleótidos repetidos en tándem. Este ADN, que es muy polimórfico, se ha utilizado como marcadores moleculares cuando la secuencia del motivo repetido se clona y secuencia para evaluarla en el análisis de poblaciones. Estos loci se encuentran en regiones codificantes y no codificantes del ADN y es probable que se formen por eventos de rompimiento que generan polimorfismo con valores superiores al 90% (Eguiarte *et al.* 2007., citado por López M. 2012)

Los marcadores SSR's son de naturaleza codominante y es posible detectar polimorfismo tanto en nADN como ADN de organelos. Sin embargo, la identificación inicial de SSR's es cara y requiere tanto de clonación como secuenciación, mientras que los pares de primers SSR tienden a ser específicos a nivel de especie (Lowe *et al.*, 2004., citado por López M. 2012)

### 2.3.3 ISSRs (repeticiones entre secuencia simple)

Los ISSRs son un tipo de marcador genético que nos permite obtener los niveles de variación en las regiones microsatélite que se encuentran dispersas en varios genomas, particularmente el nuclear. Estas regiones consisten en repeticiones en tándem de motivos simples como (CT) $n$  ó (CA) $n$ , ubicadas entre secuencias no repetitivas del genoma nuclear eucariote. Los motivos repetidos, llamados también SSRs (simple sequence repeats) pueden ser penta-, tetra-, tri- y di nucleótidos. La longitud de las secuencias de microsatélites tiende a ser altamente variable entre individuos debido a las altas tasas de mutación que experimentan, ya que cuando el DNA se replica durante la meiosis, la DNA

polimerasa puede “tartamudear” hacia adelante o hacia atrás en las unidades repetidas, eliminando o agregando unidades a la cadena. Las cadenas resultantes pueden entonces presentar menos o más unidades de repetición (o pares de bases) que las cadenas parentales (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Wolfe, 2000).

Los ISSRs son marcadores semiarbitrarios amplificados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de la presencia de un oligonucleótido o primer complementario a un microsatélite, diseñado para unirse a los motivos repetidos de di y tri-nucleótidos (evitando los mono-nucleótidos presentes en el cloroplasto). Los primers de ISSRs consisten en un motivo repetido de di- o tri-nucleótidos complementario a la secuencia del microsatélite. En ocasiones es posible agregar a esta secuencia un par de nucleótidos extras arbitrarios en el extremo 3' o en el 5', que jugarán el papel de “anclas” asegurando así que la amplificación inicie siempre en el extremo 5' o en el 3' del microsatélite, respectivamente (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Bornet y Branchard, 2001; Pradeep, 2002).

La molécula generada, con un tamaño particular (peso molecular), se considera un “locus”, que representa el segmento de ADN entre los microsatélites. Y se ha visto que los ISSRs frecuentemente amplifican de 25 a 50 bandas en una sola reacción. Este patrón característico de productos de PCR se considera la “huella digital genética” de cada uno de los individuos analizados. El polimorfismo entre individuos de la misma población puede detectarse, ya que el análisis es sensible a la presencia/ausencia del elemento genómico reconocido por el primer y a la longitud de la secuencia intermedia amplificada (Zietkiewicz *et al.*, 1994).

Las ventajas que ofrece esta técnica se centran principalmente en la alta variación que detecta, si como en su reproducibilidad debida principalmente a las altas temperaturas de alineación utilizadas en la PCR. Así mismo, no son necesarias altas concentraciones de ADN. Por otro lado no se requieren de un conocimiento previo de la secuencias del genoma del organismo en estudio para el diseño de primers. Finalmente, son sencillos de llevar a cabo, rápido, eficientes y poco costosos (Eguiarte *et al.* 2007., citado por López M.2012)

## **III.MATERIALES Y MÉTODO**

### **3.1 Descripción del sitio**

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Toxicología del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro” localizada en Buenavista, Saltillo; Coahuila, México y en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Alimentos, perteneciente a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila.

### **3.2 Procedimiento**

#### **3.2.1 Colecta de larvas**

Para el establecimiento del experimento se llevó a cabo una colecta de larvas de *S. frugiperda* en el cultivo de maíz, en los estados de Coahuila; Durango, Jalisco y Sinaloa (Cuadro 1). Las larvas colectadas de *S. frugiperda* (Figura 1), fueron colocadas en frascos con alcohol al 70%, para ser llevadas al Laboratorio de Toxicología de la UAAAN donde se determinara su taxonomía usando claves taxonómicas.

Cuadro 1 Número de larvas colectadas de *Spodoptera frugiperda* en cada localidad.

MUESTRA	ESPECIE	LOCALIDAD	TIPO DE MANEJO	POBL.	ISSR
1	<i>S. frugiperda</i>	Matamoros, Coahuila.	Maíz grano	100	1-2-8
2	<i>S. frugiperda</i>	Cd lerdo, Dgo.	Maíz forraje	31	1-2-8
3	<i>S. frugiperda</i>	Ejido 6 de enero, Dgo.	Maíz(subsistencia)	59	1-2-8
4	<i>S. frugiperda</i>	Rancho loma bonita, Coahuila.	Maíz grano (piret.)	52	1-2-8
5	<i>S. frugiperda</i>	Rancho los palmitos, Coahuila.	Maíz grano	30	1-2-8
6	<i>S. frugiperda</i>	Culiacán, sin.	Maíz grano	19	1-2-8
7		Tlajomulco, Jalisco	Maíz grano	25	1-2-8



Figura 1 Colecta de larvas de *Spodoptera frugiperda* en el cultivo del maíz.

### 3.2.2 Preservación de muestras

Para la conservación del material biológico se utilizaron frascos con etanol al 70% en donde se colocaron las larvas de *S. frugiperda* (Figura 2) recolectadas en campo, los cuales fueron rotulados con la información del sitio de colecta, la fecha y el nombre del hospedero.

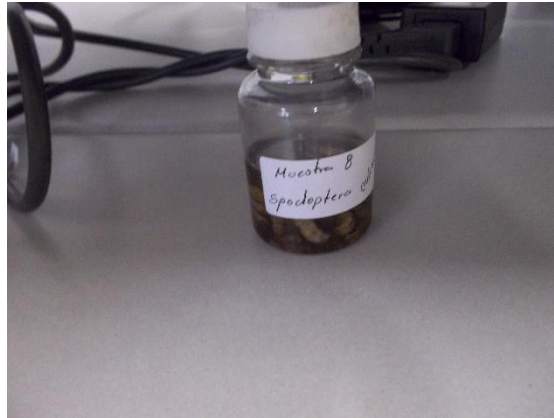


Figura 2 Preservación de muestras de *Spodoptera frugiperda* en etanol al 70%.

### 3.2.3 Extracción de ADN.

Se utilizó el método de extracción de ADN empleando por Doyle y Doyle (1987) modificado, individualmente para cada una de las 15 larvas por sitio de colecta de *S. frugiperda* preservados en etanol al 70%. Previo a la extracción de ADN, las larvas fueron puestos a secar en toallas de papel Sanita® (Figura 3A) y colocadas en una campana de extracción; una vez eliminado todo el etanol, se cortó la parte media del cuerpo de las larvas pesando aproximadamente 0.1 g; las larvas fueron maceradas en un tubo de 1.5 ml (Figura 3B) con 600  $\mu$ L de buffer de lisis (tris HCL pH 8 (100 mM), EDTA pH 8 (50 Mm), NaCl (50 mM), SDS 2 %). Se extrajo la totalidad de la mezcla con micro pipeta estéril a tubo Eppendorf de 1.5 ml y adicionar 500ul de solución (cloroformo (24 MI)+ Alcohol isoamilico (1 ml)=50 ml). Posteriormente se procedió a centrifugar a 12,000 rpm por 15 min (Figura 3C) en el cual se separan 3 fases (Figura 3D) de las cuales se recuperó la fase superior con cuidado para evitar tocar la fase intermedia, esta se colocó en un tubo Eppendorf limpio y previamente etiquetado, se tomó en cuenta la cantidad aproximada recuperada, para agregar la misma proporción de isopropanol (frio); se continuó a incubar durante 20 min en frio, pasado ese tiempo se procedió a centrifugar a 12,000 rpm durante 10 min + 5 min (Figura 3E), posteriormente se desechó la fase líquida con cuidado para no perder la pastilla se le adicionó 70  $\mu$ L de alcohol etílico al 70 % para lavar con cuidado la pastilla, se desechó el alcohol y se repite el paso para un segundo lavado, pero antes de desechar el alcohol de

este último, se centrifugo a 10,000 rpm por 5 min (Figura 3F), finalmente se abrió el tubo y se dejó en posición invertida sobre una hoja de papel secante (Figura 3G) durante aproximadamente de 10 a 15 min., hasta que el alcohol se evaporó completamente; se resuspendió la pastilla en 50  $\mu$ L de agua mili-Q (o buffer TE, opcional) y se agitó (Figura 3H) hasta que se disolvió completamente, terminada esta etapa de extracción de ADN se almacenó a -20 °C.

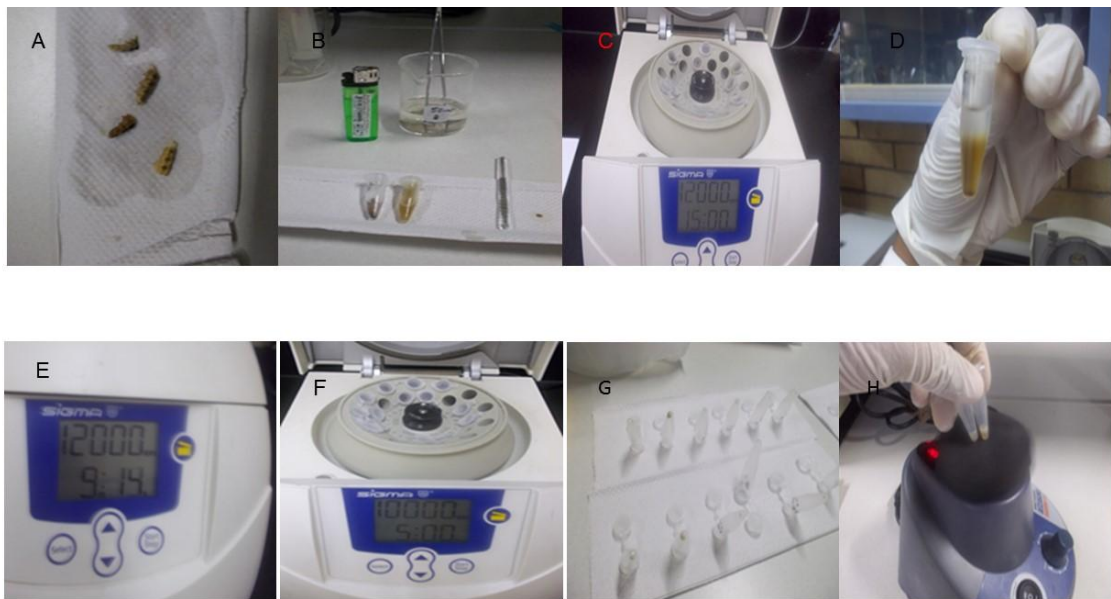


Figura 3 Proceso de extracción de ADN de larvas de *Spodoptera frugiperda* A) Secado de larvas, B) Macerada de larvas, C) Centrifugado de larvas, D) ADN separación por fases, E) Segunda centrifugación, F) Tercera centrifugación, G) Secado de pastillas y H) Agitación para la incorporación de la pastilla.

#### 3.2.4 Cuantificación de ADN

La cuantificación de ADN se realizó con el lector de placas Epoch Microplate Spectrophotometer™ con la placa Take3™ (Figura 4A) en el cual se colocó 14 muestras de ADN y 2 blancos de buffer TE (Figura 4B) el cual fue analizado con el software de cuantificación de ADN Gen5 1.11 donde se obtuvo calidad y concentración de ADN, se procedía a la limpieza del Take3™ con alcohol y algodón en donde se tuvo un cuidado exhaustivo para no rayarlo, se cargó la

placa con las muestras de ADN y los blancos con 2  $\mu$ L cada una, se procedió a la lectura y por último se limpió nuevamente la placa.



Figura 4 Cuantificación de ADN A) Epoch Microplate Spectrophotometer™ con la placa Take3™; B) Take3™ cargada con ADN.

### 3.2.5 PCR (Reacción en cadena de polimerasa)

Se utilizó el ADN extraído de los 15 individuos de cada población para realizar la PCR. Con la cual se amplificaron diversas bandas utilizando los 3 primers ISSR que se muestran en el Cuadro 2.

La reacción en cadena de polimerasa se realizó con un volumen de 25  $\mu$ L el cual contenía: 9  $\mu$ L Agua DDE, 5  $\mu$ L Taq & GO PCR MIX™ MP Biomedicals, 6  $\mu$ L ISSR, 3  $\mu$ L ADNc (80-100ng) (Figura 5A). En un tubo de Eppendorf se mezcló todos los componentes de PCR excepto el ADN se corrió con cada primer para descartar cualquier contaminación. La amplificación del ADN se llevó a cabo en el termociclador marca Thermo Axygen Maxygene (Figura 5B). Las condiciones de amplificación (Cuadro 3) utilizadas fue de un ciclo a 94°C (1 min) para la desnaturalización del ADN, seguido por 40 ciclos de 94°C (1 min) para la



desnaturalización, a temperatura variable (45 seg) para el alineamiento en relación al ISSR utilizado, a 72°C (2 min) para la elongación, seguido por un ciclo a 72°C (7min) para elongación final y posteriormente para conservación a 4°C para detener todas las reacciones.

Cuadro 2 Secuencia de marcadores moleculares tipo ISSR usados en el experimento.

Primers #	Secuencia (5' y 3')	Temperatura de alineamiento
1	GAGAGAGAGAGAGAGATC	43.4
2	AGAGAGAGAGAGAGAGTC	47
8	ACACACACACACACACA	51.5

Cuadro 3 Condiciones de amplificación de la PCR en *Spodoptera frugiperda*.

Etapa	Temperatura	Tiempo(min)
Primera	1. 94°C	1:00
Segunda (40Ciclos)	1.94°C	1:00
	2. ---*	0.45
	3.72°C	2:00
Tercera	1. 72°C	7:00
Final	1. 4°C	∞



Figura 5 A) Proceso de agregación de los contenidos, B) Thermo Axygen Maxygene.

### 3.2.6 Electroforesis

Para la electroforesis se preparó gel de agarosa utilizando para este: 0.5 gr de agarosa (Figura 6A), 50 ml de buffer SB 1X (5Mm) ,colocados en un vaso de precipitado, se colocó en el horno de microondas (Figura 6B) por 25 segundos, se retiró para agitarlo un poco y colocarlo nuevamente en el horno por 25 segundos más hasta ver que la agarosa se disolvió completamente, se esperó por un momento hasta que la solución estuviera a una temperatura tolerable para ser manejada y evitar riesgos de una quemadura, posteriormente se agregaron 2  $\mu$ L de bromuro de etidio y se disolvió completamente, el cual se vertió en un molde donde se colocó un peine para 16 orificios dejándolo solidificar por un tiempo aproximadamente de 20 min; se disolvieron 2  $\mu$ L de azul de bromofenol (Figura 6C) + 3  $\mu$ L de cada muestra de ADN (Figura 6D) el cual se depositó en cada POZO (Figura 6E), posteriormente se tomaron 5  $\mu$ L de marcador de peso molecular y se depositó en el primer pozo del gel de agarosa, se colocó el molde con el gel en el electroforesis (Figura 6F) por un tiempo de 1 hora 30 minutos a 65 volts(Figura 6G), una vez transcurrido este tiempo se tomó el molde junto con el

gel y se llevó a el SPECTROLINE® Ultraviolet Transilluminator (Figura 6H) en donde fue observado el gel con luz ultravioleta y tomado fotografías(Figura 7).

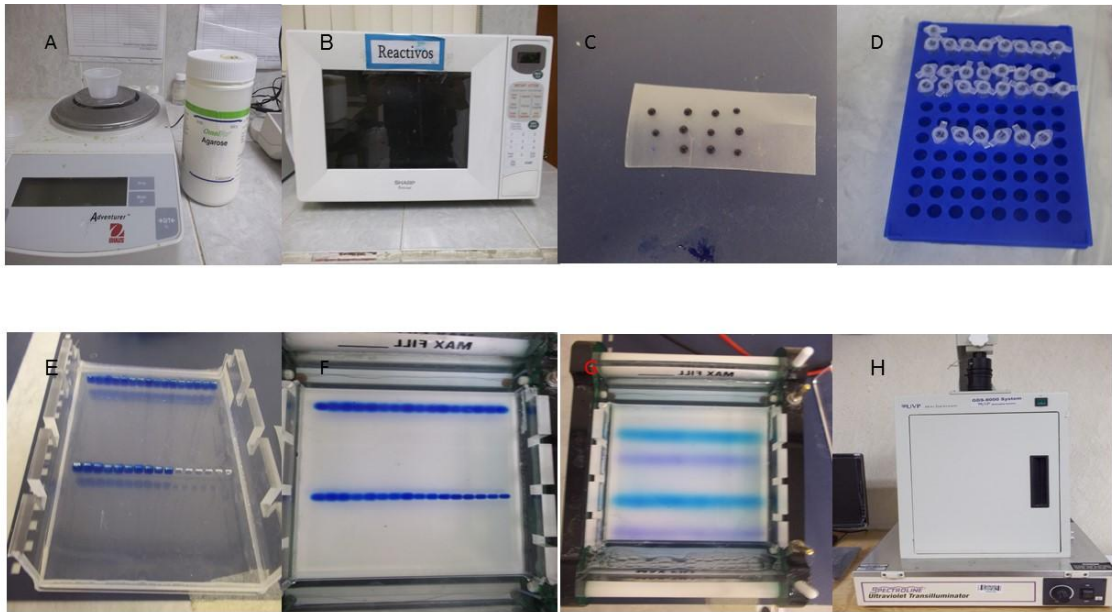
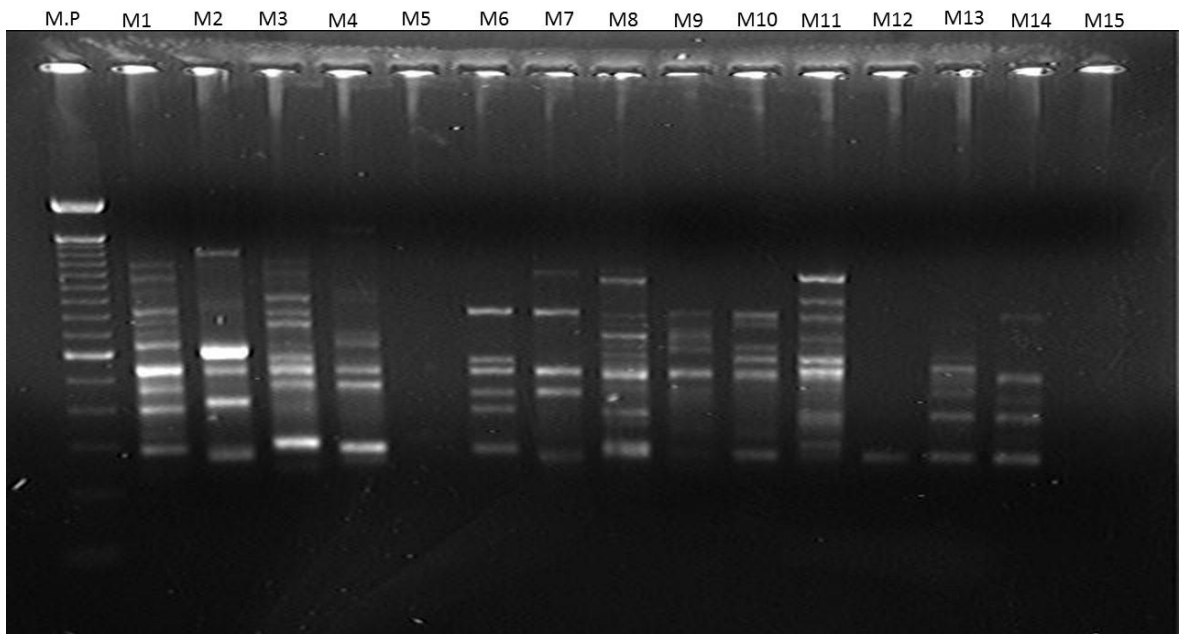


Figura 6 Electroforesis A) peso de agarosa, B) microondas, C) azul de bromofenol, D) PCR de cada muestra, E) cargado de gel con PCR, F) colocación de molde con gel al electroforesis, G) electroforesis después de 1 hora 30 min., H) transiluminador

Las fotografías tomadas se analizaron con un software estadístico InfoGen versión 2011 en el cual se obtuvieron los resultados de variabilidad genética.



M.P.=marcador de peso molecular.M1-15=muestras de ADN

Figura 7 Fotografía tomada en el transiluminador de la población 9 con el marcador molecular tipo ISSR 1.

## IV. RESULTADOS

De todas las bandas el 92.59 % son polimórficas (cuadro 4). En las cuales todas presentaban una menor o igual frecuencia de alelos.

Cuadro 4 Descripción de los datos de marcadores moleculares

Resumen	Cantidad de casos
Muestra	105
Muestras duplicadas	44
Bandas(numero)	27
Patrón bandas duplicadas	0
Bandas monomórficas	2
Bandas polimórficas (%)	92.59
Primers	3

Solo hay dos bandas monomórficas entre todas. Estos loci monomórficos fueron (Cuadro 5) únicamente a100 y a650 en las cuales se consideran monomórficas cuando están presentes de 95% a 99% en los individuos en una sola banda.

Cuadro 5 Bandas monomórficas

Primer	Banda	Patrón
Pa100	a100	00000...
Pa650	a650	00000...

Un gen se define como polimórfico si la frecuencia de uno de sus alelos es menor o igual a 0.95 (de Vicente & Fulton, 2004).

$$P_j = q \leq 0.95.$$

Donde:

$P_j$  = tasa de polimorfismo

$q$  = frecuencia alélica

Esta medida proporciona el criterio para determinar si un gen presenta variación. Su cálculo se hace por observación directa respecto a si se cumple la definición o no se cumple. La medida puede usarse con marcadores codominantes y, de manera muy restrictiva, con marcadores dominantes, debido a que la estimación basada en los marcadores dominantes presentaría una tendencia al sesgo inferior al número real (de Vicente & Fulton, 2004).

Existe además la variable que expresa la cantidad relativa de loci variables en una población. Para esto el cálculo se saca dividiendo el número de loci polimórficos entre el número de loci totales, y se expresa en por ciento. De igual manera, como en la variable anterior, puede usarse con marcadores codominantes y, de manera muy restrictiva, con marcadores dominantes (de Vicente & Fulton, 2004).

$$P = n_{pj} / n_{total}$$

Donde,

$P$  = la proporción de loci polimórficos

$n_{pj}$  = el número de loci polimórficos

$n_{total}$  = el número total de loci

#### 4.1 Análisis de la varianza molecular de las poblaciones de *S. frugiperda*.

Análisis de varianza: es una técnica que se usa para comprobar si existen diferencias significativas entre los promedios de los tratamientos.

Se utiliza cuando un investigador cuenta con los resultados de muestras aleatorias independientes, cada una de tamaño  $n$ , de diferentes poblaciones; y le interesa probar una hipótesis que las medias de esas poblaciones son estadísticamente iguales.

Cuando se analizaron todas las poblaciones de *S. frugiperda*, el análisis de la varianza molecular muestra que existe mayor variación genética entre poblaciones ( $CM=3.68$ ), que dentro de poblaciones ( $CM=2.32$ ). Se usaron 400 iteraciones (permutaciones) para el cálculo del valor de  $p$  asociado con cada término del modelo de AMOVA. Valor de  $P$  es altamente significativo ya que nos da un valor menor al 0.05 por tal motivo tenemos alta significancia para la variabilidad entre poblaciones y dentro de poblaciones (Cuadro 6). “El valor 0.04 del coeficiente  $\phi_{ST}$  es un cociente entre la correlación entre perfiles de una misma población respecto a la correlación entre cualquier par de individuos tomados al azar del conjunto total. El valor de 0.04 del coeficiente  $\phi_P$  es un cociente entre la correlación entre perfiles de dos poblaciones respecto a la correlación entre perfiles de dos poblaciones respecto a la correlación entre cualquier par de poblaciones tomadas al azar del conjunto total” (Cuadro 7). Como es estadísticamente significativo, sugiere que a pesar de la variabilidad observada dentro de poblaciones el factor población produce una estructura genética.

Cuadro 6 Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) de las poblaciones de *Spodoptera frugiperda* en el norte de México.

F.V	SC	GL	CM	p-valor	Iter. #	Comp. Var	Porcentaje
P	22.10	6	3.68	0.0175*	400	0.09	3.73
Dentro	227.47	98	2.32	0.0075*	400	2.32	96.27
Total	249.56	104	2.40			2.41	100.00

\*significante al 0.05%, F.V. =fuente de variación, SC= suma de cuadrados, GL=grados de libertad, CM= cuadrado medio, iter#= número de iteraciones.

Cuadro 7 Coeficiente de correlación.

Coeficiente	Estimación
Phi ST	0.04
Phi P	0.04

#### 4.2 Variabilidad genética de las poblaciones de *S. frugiperda*.

El porcentaje de loci polimórficos es alto (de 26 a 56%) al tomar como polimórficos los loci que presentan una variabilidad  $\geq 0.05$ . por otro lado, los valores para la diversidad genética obtenida muestra un valor total de 0.14. por lo tanto nos indica que la población 7 tiene el valor más alto entre todas las poblaciones por separado con 0.16. las poblaciones que mostraron una menor variabilidad son las 3 y la 4, con valores de 0.06 y 0.09, respectivamente.

La heterocigosis insesgada de Nei es un indicador que representa la probabilidad de que para un locus dado, un par de alelos tomados al azar, sean diferentes. Se puede interpretar también como la heterocigosidad esperada para un locus si el apareamiento fuese completamente al azar. Este indicador muestra de igual manera que la población 7 es la que tiene más probabilidades de presentar



heterocigosis (0.17) entre las poblaciones, mismo que el número promedio de alelos nos dice que tiene más probabilidades de presentar mayor número de alelos (1,56%), el número efectivo de alelos de igual forma nos confirma que dicha población presenta mayor número efectivo de alelos (1.26). La estimación de número de alelos por población presenta que la población 7 es la que presenta mayor cantidad de alelos (42.00) (Cuadro 8).

Cuadro 8 Medidas de diversidad genética de poblaciones de *Spodoptera frugiperda* en el norte de México.

Estadístico	Población							
	1	2	3	4	5	6	7	total
<b>Loci polimórfico (95%)</b>	0.33	0.37	0.26	0.37	0.44	0.48	0.56	0.59
<b>Diversidad genética</b>	0.10	0.11	0.06	0.09	0.11	0.14	0.16	0.14
<b>Heterocigosis promedio</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>Heter. insesgada de Nei</b>	0.11	0.11	0.06	0.09	0.11	0.15	0.17	0.14
<b>#promedio de alelos</b>	1.33	1.37	1.26	1.37	1.44	1.48	1.56	1.93
<b>#efectivo de alelos</b>	1.17	1.16	1.09	1.13	1.15	1.23	1.26	1.19
<b>Numero de alelos</b>	36.00	37.00	34.00	37.00	39.00	40.00	42.00	52.00

Para las medidas de diversidad genética se hizo una estimación a través de ciclos Bootstrap. El Bootstrap es un análisis de remuestreo que involucra sacar columnas de caracteres fuera de análisis, reconstruir el árbol, y probar si se recuperan los mismos nodos (uniones de las ramas; un nodo y las ramas que de él se derivan se conoce como un “clade” o “grupo monofilético”), y nos indica que tan confiable es el árbol que hemos construido. En este análisis se hicieron 250 iteraciones (valor de confianza 0.95), y los resultados que aquí se muestran indican un buen nivel de confiabilidad (Cuadro 9). Por lo tanto, de los valores

obtenidos podemos deducir que los nodos o clades obtenidos en el presente estudio están bien soportados.

Cuadro 9 Medidas de diversidad genética de poblaciones de *Spodoptera frugiperda* en el norte de México obtenida por Bootstrap.

Estadístico	Población							
	1	2	3	4	5	6	7	total
<b>Loci polimórficos (95%)</b>	0.33	0.38	0.26	0.37	0.44	0.49	0.55	0.93
<b>Diversidad genética</b>	0.17	0.19	0.13	0.18	0.22	0.24	0.28	0.46
<b>Heterocigosis promedio</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>Heter.insesgada de Nei</b>	0.22	0.25	0.17	0.25	0.30	0.32	0.37	0.62
<b>#promedio de alelos</b>	1.33	1.38	1.26	1.37	1.44	1.49	1.55	1.93
<b>#efectivo de alelos</b>	1.33	1.38	1.26	1.37	1.44	1.49	1.55	1.93
<b>Numero de alelos</b>	sd	sd	sd	Sd	sd	sd	sd	sd

En el siguiente Cuadro 10 se proporcionan los valores para el error estándar (E.E.) de la estimación promedio. Este valor es una medida de confiabilidad de la frecuencia media que se está reportando, y este es altamente influido por el número de individuos usados en la estimación. Si son pocos individuos, los valores del error estándar podrían dispararse y dar poco soporte a las conclusiones derivadas de los resultados.

Cuadro 10 Medidas de diversidad genética de las poblaciones de *Spodoptera frugiperda* en el norte de México obteniendo errores estándar estimados por Bootstrap.

Estadístico	población							
	1	2	3	4	5	6	7	total
<b>Loci polimórfico (95%)</b>	0.09	0.09	0.09	0.09	0.10	0.10	0.09	0.05
<b>Diversidad genética</b>	0.05	0.05	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.03
<b>Heterocigosis promedio</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>Heter.insesgada de Nei</b>	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.07	0.06	0.03
<b>#promedio de alelos</b>	0.09	0.09	0.09	0.09	0.10	0.10	0.09	0.05
<b>#efectivo de alelos</b>	0.09	0.09	0.09	0.09	0.10	0.10	0.09	0.05
<b>Número de alelos</b>	sd	Sd	sd	Sd	sd	sd	sd	sd

#### 4.3 Distancia genética de las poblaciones de *S. frugiperda* colectadas en el norte de México.

Utilizando el índice de Nei se ha calculado la distancia genética entre todas las poblaciones. En el Cuadro 11 se muestra la distancia Nei estándar presenta las poblaciones 1 -2, 1-3,2-3,2-4,3-4,3-5,4-5 se encuentran a una distancia de 0.01, siendo esta la menor distancia entre todos los pares de poblaciones, la población 1 y 7 se encuentra a una distancia de 0.14 siendo esta la mayor distancia entre todos los pares de poblaciones.

Cuadro 11 Distancia genética de las poblaciones de *Spodoptera frugiperda* obtenida utilizando el índice de Nei estándar.

Población	1	2	3	4	5	6	7
1	—	0.01	0.01	0.02	0.02	0.03	0.14
2	0.01	—	0.01	0.01	0.02	0.03	0.12
3	0.01	0.01	—	0.01	0.01	0.02	0.12
4	0.02	0.01	0.01	—	0.01	0.02	0.09
5	0.02	0.02	0.01	0.01	—	0.02	0.09
6	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	—	0.12
7	0.14	0.12	0.12	0.09	0.09	0.12	—

Para la medida de distancia Nei mínimo (Cuadro 12) presenta las poblaciones 3 y 4 como las que se encuentran a menor distancia (0.09) entre poblaciones de *S. frugiperda*. Las poblaciones 1 y 7 se encuentran a mayor distancia (1.50) entre poblaciones.

Cuadro 12 Distancia genética de las poblaciones de *Spodoptera frugiperda* obtenida utilizando el índice de Nei mínimo.

Población	1	2	3	4	5	6	7
1	—	0.10	0.17	0.22	0.29	0.31	1.50
2	0.10	—	0.12	0.12	0.20	0.30	1.28
3	0.17	0.12	—	0.09	0.14	0.24	1.35
4	0.22	0.12	0.09	—	0.12	0.20	0.97
5	0.29	0.20	0.14	0.12	—	0.21	1.04
6	0.31	0.30	0.24	0.20	0.21	—	1.31
7	1.50	1.28	1.35	0.97	1.04	1.31	—

La distancia Nei insesgado nos dice que las poblaciones (1-2,3-4) son las que presentan un menor número de locus heterocigotos ( $4.6e-03$ ) comparándolos entre si al igual que la población 1 y 7 son las que tienen mayor presencia de locus heterocigóticos (0.13) (Cuadro 13)

Cuadro 13 Distancia genética de las poblaciones de *Spodoptera frugiperda* obtenida utilizando el índice de Nei Insesgado.

Población	1	2	3	4	5	6	7
1	—	4.6E-03	0.01	0.01	0.02	0.02	0.13
2	4.6E-03*	—	0.01	0.01	0.01	0.02	0.11
3	0.01	0.01	—	4.6E-03	0.01	0.01	0.11
4	0.01	0.01	4.6E-03*	—	0.01	0.01	0.08
5	0.02	0.01	0.01	0.01	—	0.01	0.09
6	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	—	0.12
7	0.13	0.11	0.11	0.08	0.09	0.12	—

\*el valor de  $4.6e-03=0.0046 \times 10^{-3}$

En el dendrograma obtenido del algoritmo de Mahalanobis (Figura 8) en él se muestra 5 grupos principales de poblaciones, el grupo I incluye la población de matamoros; el grupo II está constituida por las poblaciones Cd. Lerdo y 6 de

enero; el grupo III se conforma por las poblaciones de loma bonita y Culiacán; el grupo IV la constituye la población de los palmitos; el grupo V es el más alejado de del resto el cual la conforma la población de Tlajomulco.

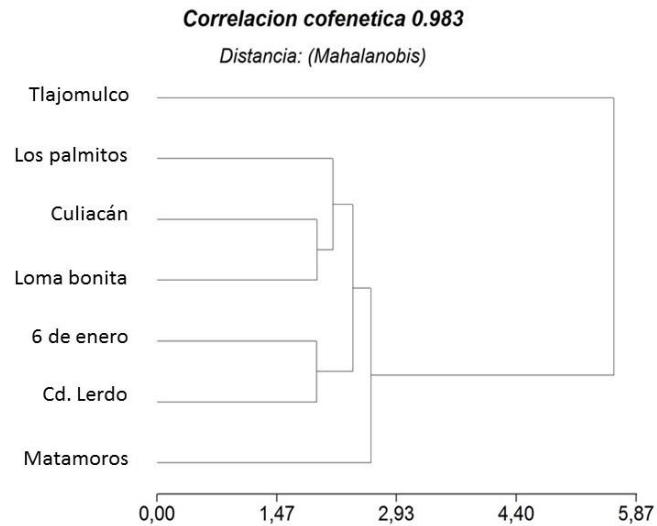


Figura 8 Dendrograma basada en la distancia genética de Mahalanobis de poblaciones de *Spodoptera frugiperda* derivado del análisis de marcadores ISSR.

## V. DISCUSIÓN

Los resultados más relevantes en este trabajo indican un alto nivel de polimorfismo con el uso de tres marcadores moleculares tipo ISSR, ya que se pudo obtener un total de 92.59% de loci polimórficos, lo cual permitió detectar suficiente variabilidad genética para establecer diferencias entre las poblaciones de *S. frugiperda*. Adicionalmente, la diversidad genotípica y la evaluación de la estructura genética de esta especie ha sido demostrada en diversos estudios con este insecto mediante los marcadores AFLP (Polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados) por autores como McMichael y Prowell (1999), Busato *et al.* (2004), Clark *et al.* (2007), y Martinelli *et al.* (2007), Lobo y Saldamando (2012), los cuales demuestran la validez y la vigencia de esta técnica molecular.

Existen relativamente pocos estudios sobre variabilidad genética molecular de *S. frugiperda* en México y claramente se ha comprobado que este tipo de marcadores moleculares proporcionan un buen poder discriminatorio para detectar diferencias genéticas entre y dentro de poblaciones de dicha especie. El número de muestras evaluadas en el estudio (105), se encontró una gran cantidad de loci polimórficos (92.59%).

Diferentes marcadores moleculares pueden ser utilizados para realizar estudios sobre la variabilidad genética de una población y estudios en genética de poblaciones, y en el caso de *S. frugiperda* marcadores como la PCR RFLP del gen de la citocromo oxidasa I (COI), al igual que la PCR del gen nuclear FR (For rice) utilizados por Nagoshi y Meagher (2004) en Estados Unidos y Vélez Arango *et al.* (2008) en Colombia, son ideales para la identificación de los biotipos de *S. frugiperda*. Pero en este caso se usó ISSR por tal motivo que es rápido de usar y a un bajo costo para el estudio de variabilidad genética de poblaciones de este lepidóptero.

Otro aspecto que debe tenerse en cuenta al realizar estudios de variabilidad genética de poblaciones, es el nivel de separación geográfica de las poblaciones

analizadas. Por ejemplo, los estudios realizados en *S. frugiperda* por Clark *et al.* (2007) en Estados Unidos, Argentina, y Brasil y por Busato *et al.* (2004) en Brasil con marcadores AFLP, mostraron que este insecto presenta una gran diferenciación genética entre sus poblaciones, por lo que representaron un buen ejemplo de aislamiento por distancia (Wright 1978), ya que en estos dos estudios se colectaron muestras de *S. frugiperda* separadas por un gran distanciamiento geográfico. Clark *et al.* (2007) genotipificaron muestras del insecto provenientes de cultivos de maíz, árbol de limón, árbol de princesa y pastos de bermuda mientras que Busato *et al.* (2004) analizaron muestras provenientes de cultivos de maíz y arroz.

El análisis de varianza molecular (AMOVA) confirmó que la variabilidad genética es altamente significativa entre las poblaciones y dentro de las poblaciones ya que valor de P mostro ser altamente significativo el cual dio un valor menor a 0.05. Muestra que existe mayor variación genética entre las poblaciones (CM = 3.68), que dentro poblaciones (CM = 2.32).

El dendrograma obtenido con la fórmula de Mahalanobis señala que las poblaciones son muy diferentes genéticamente, y esto podría ser por la presión de selección que se ejerce en una población al momento de aplicar químicos. La población más cercana genéticamente a todas las poblaciones a excepción de Tlajomulco es la del municipio de Matamoros, Coahuila esto se podría deber a la distancia geográfica que se encuentra entre ellas o de igual manera por la aplicación de muy pocos insecticidas (Cuadro 14).

## ESTADO DE COAHUILA

Cuadro 14 Lista de algunos insecticidas químicos más usados para el control de plagas en el cultivo de maíz en el estado de Coahuila (INIFAP, 1995).

Plaga	Insecticida	Dosis/Ha
Gusano cogollero ( <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith)) y barrenador ( <i>Diatrea grandiosella</i> Dyar)	Paration metílico	1 L
	Clorpirifos etil	1 L
	Carbaril PH	1 kg
	Carbaril polvo	10 kg
Araña roja <i>Tretanychus sp.</i>	Ometoato	0.5 L
	Dimetoato	1 L
Pulgón <i>Rhopalosiphum maidis</i> Fitch	Malation	1 L
	Ometoato	0.5 L
	Dimetoato	1 L
Diabrotica	Monocrotofos	0.75 L
	Diazinon	1 L
Pulga negra <i>Epitrix spp.</i>	Azinfos metílico	0.75 L
	Carbaril PH	2-3 kg
	Diazinon	0.5-6.5 L

Las poblaciones 6 de enero y Cd. Lerdo son casi similares genéticamente muy probablemente porque las poblaciones interactúan entre sí y existe mucho intercambio de genes entre ambas, pero no igual al mismo grado que la de Matamoros, posiblemente por el manejo que se le da y la aplicación de diferentes químicos en esa región de Durango (Cuadro15).



## ESTADO DE DURANGO

Cuadro 15 Lista de insecticidas químicos más usados para el control de plagas en el cultivo de maíz en el estado de Durango (INIFAP, 2005).

Plaga	Producto	Dosis/Ha
Gusano cogollero <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith)	Carbaril G	8-10 KG
	CYTROLANE	1.5 KG
	Triclorfon	10 KG
	Diazinon + Metoxicloro	8 KG
	Monocrotofos	10-15 KG
	Clorpirifos Etil	1.5 L
	Malathion	0.5 L
	Clorpirifos Etil	8-10 KG
	Carbofuran G	15-20 KG
Araña roja <i>Tretanychus sp.</i>	Ometoato	0.75 L
	Oxidemeton-Metil	0.5 L
	Dimetoato	1 L
Trips <i>Frankliniella sp.</i>	Malation	1 L
	Carbaril PH	1.5 KG
	Paration Metílico	1 L

Las poblaciones del Rancho Loma Bonita y Culiacán, son muy similares por lo cual comparamos los químicos que se aplican regularmente en cada una de las regiones pero son muy diferentes. Esto es, en el cual en el Rancho Loma Bonita se ejercía un control de plagas únicamente con piretroides según la encuesta que se realizó en el sitio, mientras que sobre la población de Culiacán se aplicaba un control con diferentes grupos químicos de plaguicidas (Cuadro16).

ESTADO DE SINALOA

Cuadro 16 Lista de insecticidas químicos más usados para el control de plagas en el cultivo de maíz en el estado de Sinaloa (INIFAP, 2010).

Plagas	Ingrediente Activo	Dosis/Ha
TRIPS	Ometoato	0.6 L
<i>Frankliniella sp.</i>	Dimetoato	1 L
Chapulín	Paration Metilico 3%	20 Kg
<i>Melanoplus sp.</i>	Carbaril	1.5 Kg
Pulga saltona		
<i>Epitrix spp.</i>		
Gusano cogollero	Bacillus Thuringiensis	3 L
<i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith)		1 L
Gusano elotero	Clorpirifos Etil.	0.75 L
<i>Heliothis spp.</i>	Clorpirifos +Permetrina.	2 L
	Permetrina	0.5 L
	Metomilo	1.5 L
	Lamda Cyalotrina	0.3 L
	Cyflutrin 37.5 %	0.75 L
	Permetrina 4%	10-12 Kg
	Cypermetrina	0.25 L
	Thiodicarb	1 L
Gusano barrenador	Permetrina 33.66%	0.5 L
<i>Diatrea grandiosella</i> Dyar	Permetrina 4% G	10-12 Kg
Pulgón	Pirimicarb	0.5 L
<i>Rhopalosiphum maidis</i> Fitch	Carborufan	2.5 L
Gusano trozador	Carborufan	2.5 L
(varios géneros)	Thiodicarb	3.5 L
Araña roja	Dimetoato	
<i>Tretanychus sp.</i>	Propargite	

La población del rancho los palmitos, está casi igual de distante que la población del Rancho Loma Bonita por tal motivo que son del mismo estado, pero si se encontraron variabilidad genética por el motivo de que en el Rancho los Palmitos no se aplicaban químicos según la encuesta que se realizó en el sitio mientras que en la población del Rancho Loma Bonita si se aplicaban químicos. La población de Tlajomulco, Jal., sea genéticamente más variable y diversa por la forma en que se ha estado aplicando químicos de diferentes grupos toxicológicos (Cuadro 17) esto viene causando que la población tenga un pool genético más diferente a las demás poblaciones.

Este estudio sugiere que la estrategia de control de plagas que tenga lugar en una región determinada influye de manera importante en la constitución genética de una población de insectos plaga. Por lo anterior, para la decisión del tipo de control que se vaya a aplicar en los cultivos se deben tomar en cuenta las condiciones del entorno agroecológico que se trate, pero también debe estar basada, en gran medida, en la información histórica de que se pueda disponer en un momento dado respecto al tipo de control que se ha venido ejerciendo en los ciclos de cultivo más recientes.

## ESTADO DE JALISCO

Cuadro 17 Lista de insecticidas químicos más usados para el control de plagas en el cultivo de maíz en el estado de Jalisco (INIFAP, 2007)

Plaga	Ingrediente Activo	Dosis/ Ha
Trips, ( <i>Frankliniella sp.</i> ) Gusano de alambre Grillo ( <i>Melanoplus sp.</i> )	Clothianidin	500 ml*
	Thiodicarb	2.0 L*
	Carbofurán	2.0 L*
	Carbosulfán	2.0 L*
	Imidacloprid	500 ml*
	Thiamethoxam	500 ml*
Gallina ciega, (phyllophaga) Diabrotica	Cadusafos	10 kg
	Fipronil	10 kg
	Fipronil	350 ml
	Tebupirimphos	12 kg
	Bifentrina	20 kg
	Chlorpyrifos	20 kg
	Teflutrina	20 kg
	Terbufos	20 kg
Gusano cogollero ( <i>Spodoptera frugiperda</i> )	Chlorpyrifos	10 kg
	Bifentrina	10 kg
	Chlorpyrifos	1.0 L
	Cipermetrina	250 ml
	Alfamectrina	100 ml
	Lamda-Cyhalothrina	250 ml
	Zeta-Cipermetrina	250 ml
	Permetrina	300 ml
	Benzoato de Emamectina	100 a 200 ml
Pulgón verde ( <i>Rhopalosiphum maidis</i> Fitch) Adultos de picudo**	Chlorpyrifos	750 ml
	Chlorpyrifos+Permetrina	750 ml
	Cipermetrina	250 ml
	Lamda-Cyhalothrina	250 ml
	Zeta-Cipermetrina	250 ml
	Alfa-Cipermetrina	250 ml
		250 ml
Gusano Soldado ( <i>Spodoptera exigua</i> )	Chlorpyrifos	750 ml
	Chlorpyrifos+P	750 ml
	Cipermetrina Lamda-Cyhalothrina	250 ml
	Zeta-Cipermetrina	250 ml
		250 ml

\* Cantidad de insecticida que debe utilizarse para tratar 25 kg de semilla \*\* Para el control de adultos de picudo se requiere de aplicaciones aéreas, porque las aplicaciones manuales implican serios riesgos para la salud de la persona que realiza la aplicación.

## VI. CONCLUSIONES

1.- El marcador molecular tipo ISSR en *S. frugiperda* mostro tener una alta variabilidad genética entre las poblaciones y dentro las poblaciones del norte de México.

2.- La población más alejada y, por tanto, más diferenciada de las demás fue la de Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco.

3.- La variabilidad genética obtenida podría ser por los diferentes grupos toxicológicos que se usan en el manejo de la plaga en Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco.

## VI .LITERATURA CITADA

- Andrews, K. L. 1988. Latin American research on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Florida entomologist. 71: 630: 653.
- Angulo, A.S., T.W. Olivares, Giselin.2006. Estados inmaduros de Lepidópteros Noctuidos de Importancia Económica.Agrícola y Forestal en Chile (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE). Universidad de Concepción, Gobierno de Chile.154 pág.
- Anónimo. 1988. Quality Protein Maize. National Academic Press. Washington, DC, USA.
- Arévalo-Niño, K., L. J. Galán-Wong y C. Solís-Rojas. 2007. Importancia de *Bacillus thuringiensis* (Bt) como Agente de Control Biológico de Plagas en una Agricultura Sustentable, pp. 223-231. En Lira-Saldívar, R.H. (Ed.) Bioplaguicidas y Control Biológico. Serna Editores. México. 231Pág.
- Arias, R. S.; Blanco, Carlos A.; Portilla, Maribel; Snodgrass, Gordon L.; and Scheffler, Brian E., "First Microsatellites From *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and Their Potential Use for Population Genetics" (2011).Publications from USDA-ARS / UNL Faculty.Paper 890.
- Balzarini M.G., Di Rienzo J.A. InfoGen versión 2011. FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL<http://www.info-gen.com.ar>
- Banda, T. J. F. 1981. Importancia económica de *Heliothis zea* (Boddie) y determinación del umbral económico, distribución matemática y muestreo de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) en maíz criollo. Tesis (Doctorado en Ciencias), ITESM. Div. Ciencias Agrop. Y Maritimas. Monterrey, México, p. 55-60.

- Banda, T. J. F.; Enkerlin, S. D.; De Alba, F. G. y Garza, B. L. E. 1981. Importancia económica de *Heliothis zea* (Boddie) y determinación del umbral económico, distribución matemática y muestreo secuencial de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) en maíz criollo. *Fitófilo*. 85: 101-118.
- Barkin D. R. 2003. El maíz: la persistencia de una cultura en México. *Cahiers des Ameriques Latines* N°40.
- Basha, S. D. y M. Sujatha. 2007. Inter and intra-population variability of *Jatropha curcas* (L.) characterized by RAPD and ISSR markers and development of population-specific SCAR markers. *Euphytica* 156:375-386.
- BAYERCROPSCIENCIE, 2010 [http://www.bayercropscience.com.mx/bayer/cropscience/csmexico.nsf/id/GcogolleroPests\\_BCS](http://www.bayercropscience.com.mx/bayer/cropscience/csmexico.nsf/id/GcogolleroPests_BCS)
- Bejarano, A. 2000. Características botánicas y fisiológicas de la planta: características botánicas del maíz. *El maíz en Venezuela*. Compilado por Fontana, H y González C. Fundación Polar Venezuela. Fundación para la Investigación Agrícola, Caracas (Venezuela). Caracas (Venezuela). 2000. p. 27-31. [http://scholar.google.com/scholar?hl=es&q=Bejarano++2000+caracteristicas+botanicas+del+maiz&lr=&as\\_ylo=&as\\_vis=0](http://scholar.google.com/scholar?hl=es&q=Bejarano++2000+caracteristicas+botanicas+del+maiz&lr=&as_ylo=&as_vis=0).
- Benavidez, M.A., R.E.M.Hernandez V., H.Ramírez R. Y A. Sandoval R. 2010. *Tratado De Botánica Económica Moderna*. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN). Saltillo, Coahuila; Mexico. 332 Pág.
- Bornet B. y Branchard M. 2001. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter* 19:209-215
- Busato, G. R.; Gruztmacher, A. D.; De Oliveira, A. C.; Vieira, E. A.; Zimmer, P. A.; Kopp, M. M.; De Bandeira, J.; Magalães, T. 2004. Análise da estrutura e diversidade molecular de poblaciones de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) asociadas as culturas de milho e arroz no Rio Grande do Sul. *Neotropical Entomology* 33: 709-716.

- Cabrera, S. 2002. El Desarrollo de la Planta del Maíz. Formación y Tipos de granos. Etapas de Crecimiento. En: IX Curso sobre producción del Maíz. ASOPORTUGUESA- INIA. Portuguesa. Venezuela.
- Cai, Y.; D. Sun; G. Wu y J. Peng. 2010. ISSR-based genetic diversity of *Jatropha* germplasm in China. *Biomass and Bioenergy* 34:1739-1750.
- Capinera, J. L. 2008. Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). EENY-098, University of Florida IFAS Extension, Pp. 6.
- Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) 2011. Lista de Plagas y enfermedades del maíz. En: <http://maizedoctor.cimmyt.org/es/plagas-y-enfermedades/lista>.
- Clark, P. L., Molina-Ochoa, J., Martinelli, S., Skoda, S. R., Isenhour, D. I., Lee, D. J., Krumm, J. T. Y J. E. Foster. 2007. Population variation of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, in western hemisphere. *Journal of Insect Science*. 7(5): 1536-2442.
- Clavijo, S. & G. Pérez. 2000. El Maíz en Venezuela. Protección y Sanidad Vegetal. Sec 2. Insectos Plagas del Maíz. Ed. Fundación Polar. pp. 345-361. Cap. 6. In.
- Comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad (CONABIO).2006."Elemento para la determinación de centros de origen y centros de diversidad en general y el caso específico de la liberación experimental de maíz transgénico al ambiente en México". Documento base preparado por la coordinación nacional de la CONABIO para la secretaria de medio ambiente y recursos naturales (SEMARNAT) y la secretaria de agricultura, ganadería, pesca y alimentación (SAGARPA).MEXICO, D.F. En: <[Http://www.biodiversidad.gob.mx/genes/pdf/Doc\\_CdeOCdeDG.pdf](http://www.biodiversidad.gob.mx/genes/pdf/Doc_CdeOCdeDG.pdf)>
- Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad (CONABIO). 2008. Proyecto FZ002 "Conocimiento de la diversidad y distribución actual del maíz nativo y sus parientes silvestres en México". México D.F. En:



[http://www.biodiversidad.gob.mx/genes/pdf/proyecto/Anexo8\\_ResultadosProyectos/FZ002/Informe%20final/Maiz/Sinaloa/Informe%20Final\\_Sinaloa\\_FZ002.pdf](http://www.biodiversidad.gob.mx/genes/pdf/proyecto/Anexo8_ResultadosProyectos/FZ002/Informe%20final/Maiz/Sinaloa/Informe%20Final_Sinaloa_FZ002.pdf)

- de Vicente, M.C. y T. Fulton (eds.). 2004. Tecnologías de Marcadores Moleculares para Estudios de Diversidad Genética de Plantas: Módulo de Aprendizaje. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI) Roma, Italia. URL: <http://www.bioversityinternational.org/e-library/publications/detail/modulos-de-aprendizaje-sobre-marcadores-moleculares-vol-1-y-2/>
- Díaz, P.A. 1954. El maíz cultivo-fertilización cosecha. 1 Ed. Editorial Bartolomé Trucco. México D.F. pag. 19-26.
- Doyle, J. J., and Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11-15.
- Eguiarte L, Souza V, y Aguirre X. 2007. Ecología Molecular. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. UNAM. México, pp. 594.
- FAO, 2006. Organización de las Naciones Unidas Para la Agricultura y la Alimentación Producción de granos. URL: <http://www.fao.org/DOCREP/003/X7650S/x7650s05.htm>
- FND, 2014. Financiera nacional de desarrollo agropecuario, rural forestal y pecuario. Panorama del maíz.
- Ganesh, S.; K. Parthiban; R. Senthil; V. Thiruvengadam y M. Paramathma. 2008. Genetic diversity among *Jatropha* species as revealed by RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 55:803-809.
- García, R. F. Mosquera, A. T., Vargas, S. C. A., Rojas, A. L. 1999. Manejo integrado del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). Boletín informativo Convenio Corpoica-PROMATTA. Palmira. 19 p.
- González A. y X. Aguirre. 2007. Capítulo 19: Inter Simple Sequence Repeats (ISSRs). In: SEMARNAT (Instituto Nacional de Ecología, México) y

- CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la biodiversidad, México). Ecología Molecular. Comps. L. E. Eguiarte; V. Souza y X. Aguirre. México D.F., México. IEPISA. p. 567-571.
- Guachambala, M. y J. C. Rosas. 2011. Módulo de Diagnóstico Molecular. Laboratorio de Biotecnología del PIF. Manual. Zamorano Academic Press. Zamorano, Honduras. 52 p.
- Hernández, A. 2012 Efectividad biológica del maíz genéticamente modificado para el control de Lepidópteros y su efecto sobre la diversidad de artrópodos no blanco. Tesis. depto. Parasitología UAAAN.
- INIFAP, 1995. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agrícolas y Pecuarias. El cultivo del maíz en la region lagunera. Torreon, Coahuila.
- INIFAP, 2005. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agrícolas y Pecuarias. El cultivo del maíz de temporal de Durango. Folleto para productores Num.20.pp14.
- INIFAP, 2007. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agrícolas y Pecuarias. Paquetes tecnologicos para maíz de temporal (ciclo Agrícola primavera-verano) para condiciones de alto, medio y bajo potencial productivo. México D.F.p14.
- INIFAP, 2010. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agrícolas y Pecuarias. Guia tecnica para el area de influencia del campo experimental valle de Culiacan. Culiacan, Sinaloa, Mexico.p41-47.
- Jimenez, L., J.D.2011. Efectividad biológica de extractos vegetales sobre larvas de *Spodoptera frugiperda*. Tesis. Depto. de parasitología. UAAAN.
- Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. 2002. Mutant Germplasm Characterization using Molecular Markers, A manual. IAEA. Vienna, Austria. 86 p.
- Jubera, M.; B. Janagoudar; D. Biradar; R. Ravikumar; R. Koti y S. Patil. 2009. Genetic diversity analysis of elite *Jatropha curcas* L. genotypes using

- randomly amplified polymorphic DNA markers. *Journal of Agricultural Science* 22(2):293-295.
- Jugenheimer, R.W. 1988. Maíz, variedades mejoradas, métodos del cultivo y producción de semillas. Ed. Limusa. Mexico D.F. 841 Pág.
- Kato, T.A., C. Mapes, L.M. Mera, J. A. Serratos Y R.A. Bye. 2009. Origen y diversificación del maíz: una revisión analítica. Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D.F. 116 Pág.
- Kondidie, D. B. 2011. Genetic Variability And Gene Flow Of The Fall Armyworm *Spodoptera Frugiperda* (J.E. Smith) In The Western Hemisphere And Susceptibility To Insecticides. University of Nebraska-Lincoln pp 20.
- Lesur, I. 2005. Manual del cultivo de maíz: una guía paso a paso. 1 Ed. Editorial Trillas. México D.F. Pp. 17-19
- Lobo Hernández, M.I., Saldamando Benjumea, C.I. 2012. Molecular Characterization and Genetic Differentiation of *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae) in Maize, Rice, and Cotton Fields of Colombia with AFLP. *Southwestern Entomologist*, 37(2):193-207
- Lopez Monroy Beatriz. 2012. Variación genética de *Bactericera cockerelli* (sulc) (Hemiptera: Triozidae) en las zonas paperas de México. pp 76.
- López-Edwards, M.; Hernández-Mendoza, J. L.; Pescador-Rubio, A.; Molina-Ochoa, J.; Lezmagutierrez, R.; Hamm, J. J.; Wiseman, B. R. 1999. Biological differences between five populations of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) collected from corn in Mexico. *Florida Entomologist* 82 (2): 254-262.
- Lowe A, Harris S, and Ashton P. 2004. *Ecological Genetics: Design, Analysis, and Applications*. Blackwell Science Ltd. EUA, pp. 326.
- Martinelli, S.; Clark, P. L.; Zucchi, M.I.; Silvafilho, M.C.; Foster, J. E. Omoto, C. 2007. Genetic structure and molecular variability of *Spodoptera frugiperda*

(Lepidoptera: Noctuidae) collected in maize and cotton field in Brazil. Bulletin of Entomological Research 97: 225-231.

- McMichael, M., and D. P. Prowell. 1999. Differences in amplified fragment-length polymorphism in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) host strains. Ann. Entomol. Soc. Am. 92: 175-181.
- Montes, M. J. A., P. N. Espinoza, R. E. Garrido Y M. F. A. Gutierrez. 2001. Reproduccion del Gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* L.) del Maíz (*Zea mays* L.) bajo condiciones de laboratorio. IX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. XIII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica. II Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica. Veracruz, México
- Moo, M., J. M. 2011. Evaluación de diferentes polvos vegetales para el control del gorgojo del maíz (*Sitophilus zeamais* Motschulsky). Tesis. depto. Parasitología UAAAN.
- Nagoshi, R. D., and R. L. Meagher. 2004. Behavior and distribution of the two fall armyworm host strains in Florida. Fla. Entomol. 87: 440-448.
- Negrete B.F. Y A.J. Morales. 2003 El gusano cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda* Smith). Corpoica. Colombia 26 pág.
- Notz, A. 1973. Estudio preliminar de *Spodoptera frugiperda* (Smith), (Lepidoptera: Noctuidae) en el estado Portuguesa, Venezuela. Trabajo de Ascenso a Asistente. Fac. Agronomía, Universidad Central de Venezuela, Maracay, Pp. 5-10.
- Ortega, A.C. 1987. Insectos nocivos del maíz: una guía para su identificación en el campo. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). D.F., Mexico. 106 Pág.
- Pashley, D. P. 1998. Sex linkage and speciation in Lepidoptera. pp. 309-319. In Howard, D.; Berlocher, S. (eds). Endless forms: species and speciation. Oxford. NY.

- Pashley, D. P.; McMichael M.; Silvain J. F. 2004. Multilocus genetic analysis of host use, introgression and speciation in host strains of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Annals of Entomological Society of America* 97 (5): 1034-1044.
- Pharmawati, M.; G. Yan e I. McFarlane. 2004. Application of RAPD and ISSR markers to analyse molecular relationships in *Grevillea* (Proteaceae). *Australian Systematic Botany* 17:49-61.
- Pradeep R., Sarla N. y Siddiq E.A., 2002. Inter simple sequence repeats (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128(1):9-17
- Reddy, M.; N. Sarla y E. Siddiq. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128:9-17.
- Reyes, C.P. 1990. El maíz y su cultivo. AGT-EDITOR S.A. Mexico, D.F. 280 Pág.
- Rodríguez, F. E., R. Zumalacàrregui, J. M., C. A. Otero, S. A. Calleja, C. F. de la Fuente C. 2003. Lo que vd. debe saber sobre los alimentos transgénicos (y organismos manipulados genéticamente) Cartilla de divulgación. Edición caja España. 69 Pág.
- Rodríguez, F.E., R. Zumalacàrregui, J.M., C.A. Otero, S.A. Calleja, C.F. De La Fuente C. 2003. Lo que vd. debe saber sobre los alimentos transgénicos (y organismos manipulados genéticamente) Cartilla de divulgación. Edición caja España. 69 Pág.
- Rodríguez, M., R. y C. De León. 2008. El cultivo del maíz. Temas selectos. 1ra ed. Editorial Colegio de Posgraduados, Mundi-Prensa México. Pp. 29-45.
- S.A.R.H. 1992. Guía fitosanitaria para el cultivo de maíz. Dirección de sanidad vegetal. Mexico. 87 pág.
- Salazar, P. 1990. El cultivo del maíz en el estado Trujillo, FONAIAP Divulga, N° 33. Enero. Venezuela. [http://bibagr.ucla.edu.ve/db/Bvetucla/edocs/tesis\\_pdf/adames\\_sabrina.pdf](http://bibagr.ucla.edu.ve/db/Bvetucla/edocs/tesis_pdf/adames_sabrina.pdf)
- SIAP. 2009. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera [www.Sianp.gob.mx/sisproIndModelos/SP\\_AG/Maiz/Descripción.pdf](http://www.Sianp.gob.mx/sisproIndModelos/SP_AG/Maiz/Descripción.pdf)

- Sifuentes, J. A. 1985. Plagas del maíz en México. INIFAP. Folleto técnico. Núm. 85. D. F., México. 49 Pág.
- Simpson J. 1997. Amplified fragment length polymorphisms. Bol. Soc. Bot. Méx. 60:73-76.
- Subramanyam, K.; D. Muralidhararao y D. Devanna. 2009. Genetic diversity assessment of wild and cultivated varieties of *Jatropha curcas* (L.) in India by RAPD analysis. African Journal of Biotechnology 8(9):1900-1910.
- Tavares, G. M. 2002. Bioatividade da erva de santa maría, *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae) em relação a *Sitophilus zeamais* Mots., 1855 (Coleoptera: Curculionidae). Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Paraçicaba, Sao Paulo, Brasil. 59 p.
- Triplehorn, C.A. And N.F.Johnson.2005.Borrr and DeLong's Introduction to the Study of Insects 7<sup>th</sup> edition. Thompson Brooks/Cole. USA pag 865.
- USDA-NRCS. 2009. Department of Agriculture. Natural Resources Conservation Service. Citado el 01-04-13. URL:<http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classified=ZEMA>
- Vélez-Arango, A. M., R. E. Arango, D. Villanueva, E. Aguilera, yC. I. Saldamando. 2008. Identificación de biotipos de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) mediante marcadores mitocondriales y nucleares. Rev. Colomb. Entomol. 34: 145-150
- Wolfe A., 2000. ISSR Resource Website. URL:<http://www.biosci.ohio-state.edu/~awolfe/ISSR/ISSR.html>
- Wright, S. 1978. Evolution and the Genetics of Populations, Vol. IV. Chicago University Press, Chicago, IL.
- Zietkiewicz, E.; A. Rafalski y D. Labuda. 1994. Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. Genomics 20:176-183.