

**VARIACIÓN GENÉTICA DENTRO DE LAS REGIONES ITS-1 E ITS-2 EN EL  
GUSANO ELOTERO (*Helicoverpa zea* Boddie) DE VERACRUZ Y TAMAULIPAS,  
MÉXICO.**

**AUSENCIO AZUARA DOMÍNGUEZ**

**TESIS**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL**

**PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA.**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA**

**ANTONIO NARRO**

**PROGRAMA DE GRADUADOS**

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Diciembre de 2008.

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
DIRECCIÓN DE POSTGRADO**

**VARIACIÓN GENÉTICA DENTRO DE LAS REGIONES ITS-1 E ITS-2 EN EL  
GUSANO ELOTERO (*Helicoverpa zea* Boddie) DE VERACRUZ Y TAMAULIPAS,  
MÉXICO.**

**TESIS**

**POR**

**AUSENCIO AZUARA DOMÍNGUEZ**

Elaborada bajo la supervisión del comité particular de asesoría y aprobada como  
requisito parcial para optar al grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS  
EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA**

**COMITÉ PARTICULAR**

**Asesor principal:** \_\_\_\_\_

**Dr. Sergio R. Sánchez Peña.**

**Asesor:** \_\_\_\_\_

**Dr. Jerónimo Landeros Flores**

**Asesor:** \_\_\_\_\_

**Dr. Alberto Flores Olivas.**

\_\_\_\_\_  
**Dr. Jerónimo Landeros Flores  
Director de Postgrado**

Buenavista, Saltillo, Coahuila, Diciembre de 2008.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**) por brindarme el apoyo económico durante la realización de uno de mis grandes esfuerzos para la preparación profesional. Así como también por el apoyo económico brindado para realizar la estancia en el USDA, Mississippi, USA.

Con cariño a la **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**, por haberme abierto sus puertas y envolverme en su seno, además de darme los más sabios conocimientos para terminar mis estudios profesionales y ser siempre un hombre de bien ante todas las adversidades que hay en la vida.

Al **Departamento de Parasitología** y a todas aquellas personas que ahí trabajan por su gran atención brindada.

El autor expresa su humilde y profundo agradecimiento al Director de Postgrado, el **Dr. Jerónimo Landeros Flores**, por la oportunidad brindada para realizar esta investigación, invaluable asesoría para la culminación de este trabajo, así como mis más sinceras gracias por su amistad

Al **Dr. Alberto Flores Olivas**, por su disposición y apoyo incondicional para la realización de esta investigación.

Al **Departamento de Agricultura de los Estado Unidos de América (USDA)**, Unidad localizada en el estado de Mississippi, USA, en especial al **Dr. Carlos A. Blanco Montero**, por su valiosa cooperación y asesoría en el proyecto.

Así como también al **Dr. Omaththage P. Perera**, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio de Biología Molecular y por transmitirme sus conocimientos en Genética Poblacional de Insectos. Mil gracias!

A todos mis **Maestros**, por transmitirme parte de sus conocimientos durante mis estudios de Maestría.

En especial a las Secretarías del Departamento: Yolanda, Juanita y Lupita. Por su grata y oportuna atención.

## **DEDICATORIA**

A Dios y la Virgen de Guadalupe, quienes me han guiado por el mejor camino e iluminado en aquellos momentos tan difíciles que hay en la vida y por ser siempre mi mayor aliento durante mis estudios hasta lograr mis objetivos.

### **A MIS PADRES, HERMANOS Y DE MAS FAMILARES.**

Les brindo este trabajo en premio a su gran amor, cariño y por su incondicional apoyo moral y económico. Todo lo que he conseguido se los debo a ustedes, gracias.

### **A MI QUERIDA ESPOSA:**

**Lidia Rivera Hernández**, por estar siempre conmigo.

### **A MIS AMIGOS:**

Por su gran apoyo moral, con quienes he convivido y disfrutado grandes momentos de mi vida; a ustedes les deseo el mejor de los éxitos donde quieran que se encuentren.

## COMPENDIO

### VARIACIÓN GENÉTICA DENTRO DE LAS REGIONES ITS-1 E ITS-2 EN EL GUSANO ELOTERO (*Helicoverpa zea* Boddie) DE VERACRUZ Y TAMAULIPAS, MÉXICO.

POR

**AUSENCIO AZUARA DOMÍNGUEZ**

MAESTRÍA EN CIENCIAS

PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA. DICIEMBRE 2008.

Dr. Sergio R. Sánchez Peña -Asesor-

**Palabras claves:** Diversidad genética de insectos, ITS-1 e ITS-2.

La relación genéticas entre *Helicoverpa zea* (Boddie) presente en diferentes plantas hospederas (maíz, sorgo y soya) al norte de Veracruz y sur de Tamaulipas México (Tantoyuca, Tampico Alto, etc.), fue estudiada usando las regiones ITS-1 e ITS-2 del ADN ribosomal. El Análisis de secuencias mediante el método de máxima parsimonia, produjo dendrogramas con grupos

genéticamente diferentes para cada región ITS. La divergencia evolucionaria fue muy alta en el análisis de ambas regiones ITS; la mínima divergencia genética fue 0.193 para ITS-1 y 0.002 para ITS-2 in individuos colectados en maíz de Tantoyuca Veracruz. Los niveles similares de divergencia dentro y entre grupos en las regiones ITS fueron evidentes en individuos de maíz, sorgo y soya de Tampico Alto, Veracruz y Estación Cuauhtémoc, Tamaulipas. La divergencia global fue menor que 1, lo cual indica que la mayoría de la variabilidad genética está dentro de los grupos formados para cada región ITS. Los niveles similares de divergencia entre grupos y el nivel mínimo de diversidad evolutiva intra-poblacional indicaron que no había diferenciación genética significativa entre las poblaciones, así como el coeficiente de diferenciación evolutiva puede indicar que los individuos que se colectaron del sorgo, soya y maíz son derivados de un mismo ancestro.

A demás, comparando la relación entre la distancia genética y los niveles evolutivos de *H. zea*, los arboles filogenéticos construidos con el método de máxima parsimonia, usando los juegos de datos de las regiones ITS, mostraron que los individuos de la misma población geográfica natural no se agruparon. Estos resultados sugieren que hay un nivel bajo estructuración genética y aislamiento geográfico en las diferentes regiones. Las tres poblaciones geográficas muestreadas parecen ser una parte de una sola 'megapoblación' de *H. zea*.

**ABSTRACT**

**GENETIC VARIATION WITHIN ITS-1 AND ITS-2 REGIONS IN CORN  
EARWORM (*Helicoverpa zea* Boddie) FROM VERACRUZ AND  
TAMAULIPAS, MEXICO.**

BY

**AUSENCIO AZUARA DOMINGUEZ**

**MASTER IN SCIENCES**

**AGRICULTURAL PARASITHOLOGY**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

**BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA. DECEMBER 2008.**

Dr. Sergio R. Sánchez Peña -Advisor-

Keywords: Insect diversity, ITS-1 and ITS-2.

The genetic relatedness among *Helicoverpa zea* (Boddie) occurring on different host plants (corn, sorghum and soybean) prevailing in northern Veracruz and southern Tamaulipas Mexico (Tantoyuca, Tampico Alto Veracruz and Estación Cuauhtémoc Tamaulipas), was studied using the sequences of the ITS regions of the ribosomal DNA. After sequence analysis using MP and bootstrap



analysis, we obtained dendrograms splitting the samples in three groups, for each ITS region. Evolutionary divergence was found to be very high within and between the groups in both ITS regions; the minimum genetic divergence was 0.193 for ITS-1 and 0.002 for ITS-2 in individuals collected in corn from all four localities. The overall divergence was far below 1, indicated that the majority of genetic viability is within a given group. Similar levels of divergence between groups, minimum level of the mean evolutionary Interpopulational diversity, which indicated that there was no significant genetic differentiation between populations, as well as the coefficient of evolutionary differentiation may indicate that the individuals collected from sorghum, soybeans and corn, were derived from a same ancestor. Furthermore, comparing the relationship between genetic distances and evolutionary levels of *H. zea*, Phylogenetic trees constructed with MP method using ITS regions data sets showed that individuals from the same natural geographical populations (Tantoyuca, Tampico Alto Veracruz and Estación Cuauhtémoc Tamaulipas) did not cluster together. These results suggest that there is little genetic structuring and geographical isolation in different regions. Instead, the three geographical populations sampled seemed to be a part of a single large megapopulation of *H. zea*.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS-----	xii
ÍNDICE DE CUADROS-----	xiii
1.- INTRODUCCIÓN-----	1
Objetivo-----	4
2.- REVISION DE LITERATURA-----	5
Género <i>Helicoverpa</i> , Hardwick 1965-----	5
<i>Helicoverpa zea</i> (Boddie). (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)-----	5
Distribución geográfica de <i>H. zea</i> -----	5
Hospederos de importancia económica-----	6
Daños-----	7
Cultivo de maíz-----	7
Cultivo de tomate-----	9
Cultivo de algodón-----	10
Hospedero silvestres-----	11
Biología de <i>Helicoverpa zea</i> -----	12
Huevo-----	13
Larva-----	16
Pupa-----	18
Adulto-----	19
Ecología y dinámica poblacional de <i>Helicoverpa zea</i> -----	21
Perspectivas del control químico y uso de cultivos Bt, para él control de <i>H. zea</i> -----	24
Retos del uso de cultivos transgénicos en el control de plagas----	26
Estrategias para el monitoreo de resistencia a cultivos Bt-----	27

Líneas de investigación enfocados sobre el estudio de la estructura genética en poblaciones de insectos-----	28
<i>Helicoverpa zea</i> (Lepidoptera: Noctuidae)-----	28
<i>Helicoverpa armigera</i> (Lepidoptera: Noctuidae)-----	29
<i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)-----	31
<b>3.- MATERIALES Y MÉTODOS</b> -----	<b>35</b>
<b>4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> -----	<b>40</b>
<b>5.- DISCUSIÓN</b> -----	<b>40</b>
<b>6.- CONCLUSIONES GENERALES</b> -----	<b>53</b>
<b>7.- LITERATURA CITADA</b> -----	<b>55</b>
<b>ANEXO</b> -----	<b>70</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Filamentos de la mazorca de maíz con huevecillos de <i>H. zea</i> .....	8
Figura 2. Larvas de <i>Helicoverpa zea</i> alimentándose en la mazorca de maíz..	9
Figura 3. Daño en el cultivo de tomate ocasionado por <i>H. zea</i> .....	10
Figura 4. Larva de <i>H. zea</i> alimentándose en la bellota (fruto) del algodón....	11
Figura 5. Anillo en huevos de <i>H. zea</i> .....	15
Figura 6. Huevo de <i>H. zea</i> en la vena principal de una hoja de tomate.....	15
Figura 7. Huevos de <i>H. zea</i> sobre la base del pedúnculo floral en tomate.....	16
Figura 8. Mandíbula sin retináculo y pináculo setífero sin microespinas (ps), en larva <i>H.zea</i> .....	17
Figura 9. Mandíbula con retináculo (re) y pináculosetífero con microespinas (me), larva de <i>H. virescens</i> .....	17
Figura 10. Mancha oscura (mo) ( <i>H. zea</i> ) y franjas diagonales oscuras en las alas anteriores ( <i>H. virescens</i> ).....	18
Figura 11. Pupas de <i>Helicoverpa zea</i> .....	19

## ÍNDICE DE CUADROS.

Cuadro 1. Número de generaciones anuales de <i>H. zea</i> en América del Norte.....	13
---	----

## INTRODUCCIÓN

El gusano elotero *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera:Noctuidae) es una especie polífaga (Metcalf *et al.* 1962, Mitter C. *et al.* 1993 ), que infesta al menos 30 especies de cultivos en Norte América entre los que destacan, el maíz y algodón (Payne *et al.* 1974; Martin *et al.* 1976; Young *et al.* 1977; López *et al.* 1984; Rummel *et al.* 1986; Slosser *et al.* 1987; Kogan *et al.* 1989); así como también ha sido observado alimentándose en al menos 76 especies de plantas no cultivables (Blanco *et al.* 2007). *H. zea* posee la habilidad de desarrollar altos niveles de resistencia a ciertos insecticidas sintéticos (Terán-Vargas *et al.* 2005) y es parcialmente controlado por variedades comerciales de algodón transgénico Bt (Kranthi *et al.* 2002, Wolfenbarger *et al.* 1981). En relación a las características mencionadas, hay un gran interés por un mejor entendimiento de la estructura genética poblacional de este insecto, preferencia de hospederos y la cantidad de flujo genético. Esta información es indispensable para la comunicación, organización y fortalecimiento de programas de manejo integrado de *H. zea* y el desarrollo de estrategias para el manejo de su resistencia a insecticidas sintéticos o cultivos transgénicos.

El análisis de la genética poblacional proporciona un mejor entendimiento de la dispersión, ayuda al monitoreo de la resistencia de insecticidas y puede

ser de gran utilidad para designar hospederos refugios con el objetivo de manejo de resistencia en cultivos genéticamente modificados.

En investigaciones recientes se han utilizado diferentes sistemas de marcadores genéticos moleculares. Tan *et al.* (2001); Ji *et al.* (2003); Scott *et al.* (2004), desarrollaron marcadores (microsatélites) del material genómico de *H. armigera*, dichos marcadores fueron utilizados para el análisis genético de poblaciones de *H. zea* criadas en condiciones de laboratorio, dichos marcadores mostraron resultados no consistentes debido al requerimiento de diferentes temperaturas de anillamiento para cada par de primers (Gresala *et al.* 2005). En estudios genéticos en *H. zea*, Perera *et al.* (2007) localizaron y caracterizaron 13 sitios polimórficos (microsatélites) viables para el estudio poblacional de *H. zea*.

Behere *et al.* (2007), analizaron la región Citocromo Oxidasa Sub-Unidad I (COI) en poblaciones de *H. armigera* y *H. zea*, con el objetivo de estudiar la estructura genética poblacional de las dos plagas de insectos. Concluyeron que entre *H. armigera* y *H. zea*, hay un nivel bajo de diferencia genética y que las poblaciones de *H. zea*, colectados en maíz, algodón y a través de trampas con feromona, al Norte (Carolina del Norte y New York) y Sur de América (Brasil) conforman una sola especie a consecuencia de un entrecruzamiento sexual y a una gran cantidad de flujo genético. Así mismo

Qifa *et al.* (2002), estudiaron la frecuencia temporal de alelos en la estructura poblacional por generación (*H. zea*) en áreas locales y regionales. En sus estudios encontraron escasa diferenciación genética poblacional en las áreas de estudio; la frecuencia de alelos, heterocigotidad y la cantidad de números por locus fue estable por generación, sugiriendo que hay una gran cantidad de flujo genético dentro de la escala espacial de investigación.

En el presente estudio, se investigó la variabilidad genética intraespecífica sobre las secuencias en el primer y segundo espaciador transcrito internamente (*Internal Transcribed Spacers*, ITS) en el ADN ribosomal (ADNr), utilizando larvas de *H. zea* colectadas en diferentes hospederos cultivados en los estados de Veracruz y Tamaulipas. Esto con el fin de relacionar la estructura genética poblacional (secuencias de ITS1 e ITS2) de esta especie de insecto con la preferencia por un hospedero (s) y/o con regiones geográficas.



### **Objetivo específico:**

Evaluar la variabilidad molecular en poblaciones de *H. zea*, para investigar la similitud genética y estructura poblacional entre individuos colectados en sorgo (*Sorghum bicolor* L.), soya (*Glycine max* L.) y maíz (*Zea mays* L.). Analizando las secuencias de los espaciadores transcritos internos (ITS-1 e ITS-2) del ADN ribosomal (ADNAr).

## REVISION DE LITERATURA.

**Género *Helicoverpa***, Hardwick 1965.

Es un grupo de 18 especies (Mitter *et al.* 1993), *Helicoverpa zea* y *Helicoverpa armigera* son algunas de las especies plaga más devastadoras en la agricultura pertenecientes a este género (Gajanan *et al.* 2007).

*H. zea* y *H. virescens* son similares en su biología, distribución geográfica y apariencia física, específicamente en huevecillos y estado larval (Kogan *et al.* 1978; Neunzing, 1969). Larvas de las dos especies se encuentran comúnmente alimentándose sobre la misma planta de algodón, haciendo más difícil el manejo para su control. Debido a esto, al conjunto de plagas se le denomina “**Complejo Heliothis**” (Hardwick, 1965; King 1994; Leonard *et al.* 1999).

***Helicoverpa zea*** (Boddie). (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE).

**Distribución geográfica de *H. zea*.**

*Helicoverpa* (= *Heliothis*) *zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae) es nativa de América del Norte, aunque su origen es incierto (Capinera, 2001). Hill (1983) reportó que *H. zea* tiene hábitos migratorios y se encuentra distribuida en América del Norte, Central, y del Sur, el Caribe y Hawaii entre los 40° de latitud norte y 40° de latitud Sur. En los Estados Unidos puede encontrarse hasta los estados de Kansas, Ohio, Virginia y el sur de Nueva Jersey (Blanchard, 1942; citado por Capinera 2001), aunque puede desplazarse hasta Canadá dependiendo de la severidad del invierno (Hardwick, 1965; Fitt, 1989; Kogan *et al.* 1978; Neunzing, 1969). En México los mayores daños se registran en: Guerrero, Morelos, Michoacán, Oaxaca, Quintana Roo, Chihuahua, Veracruz y Yucatán.

### **Hospederos de importancia económica.**

En maíz se le conoce como gusano elotero, en leguminosas gusano de la vaina, en jitomate y cucurbitáceas gusano de la cápsula o del fruto y en algodón, gusano bellotero (Medina- Gaud *et al.* 2003). Otros nombres de uso común para identificar a *H. zea* son: tomato fruitworm, corn earworm, cotton bollworm y gusano cogollero del tabaco (tobacco budworm), aunque este último nombre se aplica especialmente a *H. virescens*.

Según King y Coleman (1989), los principales hospederos de la especie son el maíz, el algodón y el tabaco, mientras que puede convertirse en plaga

secundaria de los cultivos de sorgo, repollo, leguminosas, cucurbitáceas, fresas, girasol, pimiento, alfalfa, lechuga, soya, y se le ha observado alimentándose de al menos 76 plantas no cultivadas (Blanco *et al.* 2007). De acuerdo a Fitt (1989), la predilección de *H. zea* por las plantas en floración es el patrón más consistente en la selección de sus hospederos. Las larvas de *H. zea* prefieren alimentarse de estructuras vegetales con alto contenido de nitrógeno, como las flores, los frutos y los puntos de crecimiento.

## **Daños.**

### **Cultivo de maíz.**

El gusano elotero, es una de las plagas principales del maíz. Por ejemplo, en los Estados Unidos en el cultivo de maíz se han cuantificado de 40,000 a 50,000 adultos de *H. zea* por hectárea (Stinner *et al.* 1977, citado por Fitt, 1989). En estudios separados Figueroa-Silvestri (1983) y Fuentes- López (1994), determinaron que el ciclo de vida de esta especie está relacionado con la floración del maíz, en donde el estadio larvario puede atacar hasta el 60% de las plantas florecidas en variedades para la producción de grano. En el cultivo de maíz los adultos de *H. zea* ovipositan en los filamentos (estigmas) de la mazorca (Figura 2), donde las larvas del primer instar comienzan a consumirlos hasta llegar a los granos de la mazorca. Las pérdidas económicas en el maíz causadas por *H. zea* ocurren debido a que durante su estadio larval se alimenta

de los granos superiores de la mazorca, donde permanecen alimentándose hasta el momento de pupar (figura 3). Además del daño directo, las larvas abren paso a la entrada de microorganismos causantes de enfermedades tales como la pudrición de la mazorca como *Fusarium* spp, y a los que son productores de aflatoxinas como *Aspergillus* spp. (Storer *et al.* 2001).



Figura 1. Filamentos de la mazorca de maíz con huevecillos de *H. zea*.



Figura 2. Larvas de *H. zea* alimentándose en la mazorca de maíz.

### **Cultivo de tomate.**

El estadio larval causa daño directo en el fruto y lo contamina. De acuerdo a Martin *et al.* (1976a), las hembras de *H. zea* prefieren al cultivo de tomate para efectuar su oviposición cuando los filamentos de la mazorca de maíz en campos adyacentes se secan. En el cultivo de tomate, las hembras adultas depositan sus huevos durante las horas de la noche en las hojas cercanas a las frutas verdes que se encuentran en el borde exterior de la planta. Las hojas bajo los racimos florales son el lugar preferido de oviposición de *H. zea* en este cultivo (Zalom *et al.* 1983).

Al eclosionar, los primeros instares larvales perforan la base de las frutas. Generalmente el gusano sólo hace un orificio en la fruta, por donde comienza a alimentarse (Figura 4) y luego al completar una especie de túnel se mueve a otra fruta. Su alimentación resulta en una fruta con una cavidad interna acuosa llena de mudas de exoesqueleto, heces fecales y áreas necróticas. La fruta dañada, madura prematuramente. Más adelante en el ciclo de vida del cultivo las larvas también entrarán a las frutas de tomate maduras (Zalom *et al.* 2000).

### **Cultivo de algodón.**

El algodón el estado larval destruye las chapas o cuadros (botones florales) y los frutos verdes (bellotas) (King *et al.* 1984) (figura 5).



Figura 3. Daño en el cultivo de tomate ocasionado por *H. zea*.



Figura 4. Larva de *H. zea* alimentándose en la bellota (fruto) del algodón.

### **Hospederos silvestres**

Las poblaciones de adultos de *H. zea* pueden estar presentes antes de que estén disponibles sus hospederos cultivados, no cultivables debido a que el insecto puede alimentarse de una gran variedad de hospederos silvestres (Raulston *et al.* 1998); Blanco *et al.* (2007), reportaron que a *H. zea* se le ha observado alimentándose de al menos 76 especies de plantas no cultivadas. Martin *et al.* (1976a) reportaron que varios árboles y arbustos son frecuentados por los adultos de *H. zea*, entre ellos miembros de las familias Rosaceae y Asteraceae. Neunzig (1963), concluyó que la densidad de larvas por planta en el cultivo de maíz y en la maleza *Linaria canadensis* (L.) es equivalente. Varios autores mencionan entre los yerbajos o malezas que sirven de hospederos para



las larvas de *H. zea* a: *Coronilla varia* L., *Panicum dichotomiflorum* Michx., *Cannabis sativa* L., *Solanum spp.*, *Sida spinosa* L., *Portulaca oleracea* L., *Ambrosia artemisiifolia* L., *Bidens bipinnata* L., *Helianthus spp.*, *Abutilon theophrasti* Medik. (Ditman y Cory, 1931; Roach, 1975; Sudbrink y Grant, 1995; citados por Capinera, 2001) y *Gaura drummondii* (Spach) Torr. & Gray (Raulston *et al.* 1998).

Los hospederos silvestres le sirven al insecto no sólo como fuente de alimento para sus etapas inmaduras sino como fuente de alimento y lugar de oviposición para los adultos. La influencia que puedan ejercer los hospederos silvestres sobre el desarrollo y la capacidad de sobrevivir de las poblaciones del insecto no están claras debido a la gran biomasa asociada a los hospederos cultivados. De acuerdo a Graham *et al.* (1972), la preferencia de alimentación de *H. zea* es dictada por la disponibilidad de la fuente de hospederos.

### **Biología de *Helicoverpa zea***

El manejo de las plagas requiere la identificación correcta de la plaga y el conocimiento de las interacciones con las condiciones y hospederos presentes durante su ciclo de vida. El ciclo de vida de *H. zea* consiste de cuatro etapas: huevo, larva, pupa y adulto. La duración del ciclo varía con la temperatura, la humedad y el fotoperiodo, y la secuencia y disponibilidad de

hospederos podría influenciar el número de generaciones por año (Fitt, 1989). Varios autores citados por Capinera (2001) han evaluado el número de generaciones de *H. zea* en América del Norte conforme al Cuadro 1. Se estima que el gusano del fruto puede completar de una a cuatro generaciones por año en zonas templadas y hasta 11 en climas cálidos donde puede permanecer activo todo el año (Fitt, 1989; Stehr, 1987).

Cuadro 1. Número de generaciones anuales de *H. zea* en América del Norte

<b>Autores</b>	<b>Número de generaciones</b>	<b>Area</b>
Knutson, 1944; Beirne, 1971; Chapman y Lienk, 1981	1	Canadá, Minnesota y el Oeste de Nueva York
Prostak, 1995	2	Norte de los Estados Unidos de América
Ditman y Cory, 1931	2- 3	Maryland
Okumura, 1962	3	Norte de California
Oliver y Chapin, 1981	4- 5	Louisiana
Okumura, 1962	4- 5	Sur de California
Capinera, 2001	7	Sur de Florida y Texas

## Huevo

Los huevos de *H. zea* son depositados individualmente. Estos huevos tienen forma de esfera ligeramente achatada y poseen doce o más crestas que radian desde su parte superior, de 57 mm en diámetro (King, 1994; Neunzig, 1969). Luego de su postura, el color de los huevos de *H. zea* es blanco-cremoso pero al cumplirse 24 horas desarrollan un anillo café-rojizo (Figura 5). En el maíz, las hembras prefieren ovipositar sobre los filamentos frescos

(estigmas) de la mazorca (Hardwick, 1965). Sin embargo, en el tomate los huevos son depositados en las vellosidades de las venas principales del follaje cercano a las flores y frutos (Alvarado- Rodríguez *et al.* 1982) (Figura 6) o en las vellosidades sobre la base del pedúnculo floral (Figura 7). Zalom *et al.* (1983) reportan que el lugar de oviposición preferido por *H. zea* en tomate son las hojas bajo los pedúnculos florales, en algodón la hembra elige chapas o cuadros y bellotas (Lingren *et al.* 1986; Neunzig 1969). El estadio de huevo puede completarse en un promedio de 3 a 4 días (Capinera, 2001), así como también va a depender de la temperatura, no de la humedad. Los huevecillos de *H. zea* requieren 5.3 días a 21.1° C y solo 3.9 días a 26.7° C (Ellington *et al.* 1986).



Figura 5. Anillo en huevos de *H. zea*.



Figura 6. Huevo de *H. zea* en la vena principal de una hoja de tomate.



Figura 7. Huevos de *H. zea* sobre la base del pedúnculo floral en tomate.

### **Larvas**

Pasa por seis estadios, el color puede ser rosado, café claro o verde, con rayas amarillas o rojas longitudinales y puntos negros, con pelos. El tamaño larval es 2 mm en el primer estadio y 40 mm en el último, el tiempo de desarrollo larval está en función de la temperatura, humedad, viento, calidad de la comida y al tipo de especie de planta hospedera (Fey *et al.* 1972; Gross *et al.* 1977; Harrell *et al.* 1979; Hogg *et al.* 1981). En el estadio larval existe cierto grado de confusión al clasificar larvas de *H. zea* y *H. virescens*, debido a que en este estadio, así como también en huevecillos las dos especies son muy parecidas morfológicamente. A continuación se presentan algunas de las

características distintivas en el estadio larval y adultos entre las dos especies de insectos.



Figura 8. Mandíbula sin retináculo y pináculo setífero sin microespinas (ps), en larva de *H. zea*.

Figura9. Mandíbula con retináculo (re) y pináculo setífero con microespinas (me), larva de *H. virescens*

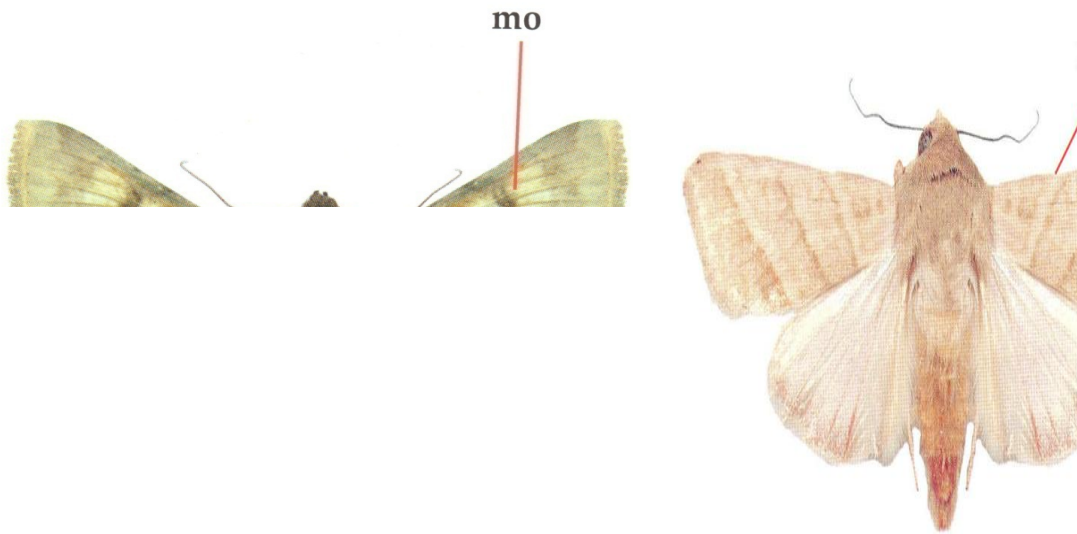


Figura 10. Mancha oscura (mo) (*H. zea*) y franjas diagonales oscuras en las alas anteriores (*H. virescens*).

### **Pupa**

De 14-22 mm de largo por 6 mm de ancho, color castaño caoba brillante, forma cilíndrica, redonda en la cabeza, estrecha a puntiaguda en el abdomen (Neunzig, 1969). La pupa de las hembras es de mayor peso y tamaño que la de los machos. Sin embargo hay una considerable variación en tamaño y peso a consecuencia de la calidad de la comida consumida en el estado larval (King, 1994). Las pupas se encuentran en el suelo a una profundidad de 3 a 20 cm (Neunzig, 1969; Quaintance *et al.* 1905) (figura 11). Según Harrell *et al.* (1979)

la humedad relativa ejerce una mayor influencia sobre el desarrollo de la pupa que la temperatura y la velocidad del aire, sin embargo las temperaturas altas acortan la duración del estadio pupal. La pupa de *H. zea* puede entrar en diapausa si las condiciones ambientales no son adecuadas para continuar su desarrollo. Se han identificado dos tipos de diapausa para este insecto, una en relación al frío y otra en relación a condiciones áridas (Fitt, 1989).



Figura 11. Pupas de *H. zea*.

### **Adulto**

Poseen comportamientos y adaptaciones físicas que hace su estilo de vida nocturna de gran importancia (Lingren *et al.* 1982; Matthews *et al.* 1978; Rabb *et al.* 1979). La actividad de los adultos comienza a la anochecer y continua hasta media noche, presentando un pico máximo de emergencia de 9 a 12 pm (Callahan, 1958; Lingre *et al.* 1986; Lingree *et al.* 1982), el cual es



afectado por el cultivo, calidad nutricional de la planta hospedera y las condiciones climáticas (Hayes, 1988; López *et al.* 1984).

El apareo de los adultos comienza después de finalizar su alimentación, aproximadamente a las 11 pm, y continúa por 4 horas (Lingren *et al.* 1977; Ramaswamy, 1990). Durante su tiempo de vida, las hembras pueden depositar de 200 a 2,000 huevecillos (Fye *et al.* 1972; Proshold *et al.* 1982; Quaintance *et al.* 1905), la frecuencia de fecundidad varía en relación a la humedad y temperatura. En condiciones de laboratorio a 60 % de humedad, la fertilidad de las hembras fue 850, 1231, y 355 huevecillos, a 21.1, 26.7, y 32.2° C, respectivamente (Ellington *et al.* 1986).

Los adultos de *H. zea* tienen hábitos migratorios y se desplazan con facilidad de una región a otra. Estas palomillas se alimentan principalmente de néctar durante las noches y a menudo se encuentran en comunidades de plantas diferentes a las que utilizan para ovipositar (Rabb, 1979; citado por Raulston *et al.* 1998). La alta movilidad es una de las características de esta especie que contribuye a facilitar su establecimiento en los agroecosistemas. Esta capacidad de desplazarse a sitios atractivos y concentrarse en ellos ofrece una oportunidad para medidas de control. Sin embargo, luego de considerar la alta movilidad, la naturaleza polífaga, y la alta razón intrínseca de aumento de la

especie, es poco probable que la reducción de las poblaciones de *H. zea* por la manipulación de los adultos pueda resultar en la eliminación de su reproducción (Raulston *et al.* 1998).

### **Ecología y dinámica poblacional de *H. zea*.**

El movimiento espacial y redistribución de los adultos de los Heliothinos es un proceso dinámico. Como en muchos insectos herbívoros, el periodo de mayor o menor movimiento va a depender del ambiente y planta hospedera de alimento, reproducción y dispersión (Fitt, 1989; Gatehouse, 1997; Johnson, 1995; Raulston *et al.* 1996). Las causas específicas del movimiento de los Heliothinos son, los mecanismos genéticos o fisiológicos o causas ambientales que van a controlar la migración de adultos (Fitt, 1989). Hay tres tipos generales de movimientos que han sido definidos para los Heliothinos (Raulston *et al.* 1996): (1) movimientos cortos, ocurren dentro, o justo sobre la planta, distancia de 91 a 914 metros, estos son a favor o en contra del viento e involucra en comportamiento tales como, alimentación, fecundación de huevecillos en la planta, apareamiento, y reguarde de los adultos; (2) movimientos largos, son menos frecuentes que los movimientos cortos, ocurre por en cima de la planta arriba de 30 pies, son más o menos suaves de 1 a 16 kilómetros, los

movimientos involucrados son: entre plantas hospederas, sitios de fecundación de huevecillos y sitios de emergencia a áreas de alimentación. (3) movimientos migratorios verdaderos de grandes distancias, ocurren bajo grandes velocidades del viento, de 914 metros a más de 1.5 kilómetros sobre la planta hospedera, el adulto puede viajar una distancia de 16 a 480 kilómetros en una noche.

Los eventos antes mencionados se pueden presentar a causa de: deterioro de hábitat, incremento de la densidad poblacional provocando pocos recursos alimenticios para el soporte de la población y por último los efectos adversos del ambiente sobre el hospedero o la habilidad para reproducirse y sobrevivir dentro del hábitat (Beerwinkle *et al.* 1995; Forrow *et al.* 1987; Raulston *et al.* 1982, 1986).

El gusano del fruto es una de las principales plagas agrícolas y posee características que le permiten explotar los agroecosistemas eficientemente. Sus hábitos polípagos hacen que se pueda desarrollar continuamente en varios hospederos, lo que le permite permanecer en un lugar aún cuando las fuentes de alimento sean mínimas. De acuerdo a Fitt (1989), los adultos de *H. zea* tienen una amplia capacidad de movimiento a diferentes escalas, lo que les permite lidiar con el cambio espacial y temporal de sus hospederos. Otras

características que contribuyen al éxito de ésta plaga son: su alta fecundidad y su corto período generacional.

Al presente se han identificado y sintetizado feromonas sexuales para la mayoría de las especies de los géneros *Heliiothis* y *Helicoverpa*. Varios autores señalan la importancia de utilizar trampas con feromonas específicas para atraer el macho de la especie en estudios de dinámica poblacional. Por ejemplo, Witz *et al.* (1985) encontraron que las capturas tempranas los individuos en la estación están correlacionados con la dinámica poblacional que se desarrollará más adelante en la temporada. Igualmente, Parajulee *et al.* (1998) reportaron una correlación positiva entre los adultos capturados en las trampas de feromonas y la temperatura.

Existe poca información sobre las preferencias de los adultos de *H. zea* por las kairomonas de sus hospederos. Algunos estudios indican que de los 100 compuestos identificados como kairomonas o atrayentes de insectos, solo el fenilacetaldehído es atractivo a los adultos de *H. zea* (Hedin *et al.* 1974; Metcalf, 1987; citados por Raulston *et al.* 1998).

Raulston *et al.* (1998), estudiaron los hospederos silvestres de adultos de *H. zea* en el estado de Texas, entre ellos a *Gaura drummondii* (Spach) Torr. &

Gray (Onagraceae). Estos investigadores encontraron que durante el período de alimentación las palomillas dejan el campo de maíz para alimentarse en las flores de *Gaura* y luego reintroducirse al maíz para ovipositar. La atracción de los adultos de *H. zea* hacia *G. drummondii* sugiere que esta planta contiene sustancias volátiles que pueden ser utilizadas en el desarrollo de kairomonas para atraer a la especie. Según los autores, la aplicación de insecticidas a las flores de *G. drummondii* ofrece una oportunidad para suprimir las poblaciones de adultos de *H. zea* antes de que se dispersen a colonizar nuevos hábitats. Sobre este particular, Lingren *et al.* (1998), demostraron que el 78% de los adultos de *H. zea* murieron al ser expuestos a flores de *G. drummondii* tratadas con insecticida, aún así, aunque estas aplicaciones pueden ser utilizadas en control de esta plaga, pueden tener un impacto sobre las poblaciones de enemigos naturales. De acuerdo a Raulston *et al.* (1998), es necesario conocer a plenitud la ecología, la dinámica poblacional y el comportamiento nocturno de la especie para minimizar la competencia de atracción entre los atrayentes tratados con kairomonas e insecticidas y las fuentes naturales de alimentación de los adultos del insecto.

**Perspectivas del control químico y el uso de cultivos Bt, para el control de *H. zea*.**

El control de plagas sustentado en el uso de insecticidas ha ocasionado severos problemas de contaminación ambiental, efectos negativos en la salud humana (Bottrell y Adkisson, 1977) y abandono de cultivos importantes (Georghiou y Taylor, 1977), tal como ocurrió con el algodnero en el sur de Tamaulipas en la época de los 70 (Adkisson, 1972). Afortunadamente, este tipo de escenarios no se ha repetido en los últimos años.

El uso irracional de insecticidas ha propiciado el desarrollo de resistencia de los insectos (Bujanos-Muñiz, 1983[6]; Martínez-Carrillo *et al.* 1991), por ejemplo, en México el control de plagas en algodón a base de insecticidas sintéticos ha ocasionado este tipo de problemas (Terán-Vargas *et al.* 2005).

Como alternativa para reducir el uso de insecticidas y manejar con eficacia las principales plagas del algodnero, en 1996 se empezó a utilizar a nivel mundial (Layton *et al.* 1997) y en México (Martínez-Carrillo y Díaz-López, 2005) el algodnero transgénico Bollgard<sup>®</sup> que expresa la  $\delta$ -endotoxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Bt). Esta toxina es efectiva para controlar larvas de *H. virescens* y *Pectinophora gossypiella* (Lepidoptera: Pyralidae) (Saunders) (Koziel *et al.* 1993; Perlak *et al.* 2001). Sin embargo es menos efectiva para controlar plagas importantes como *H. zea* (MacIntosh *et al.* 1990).

A de más de contar con Bollgard<sup>®</sup>, a partir del 2002 la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América aprobó el uso comercial del cultivar Bollgard II<sup>®</sup> (EPA, 2006) para los agricultores de dicho país (Akin y Layton, 2004).

Estos cultivares son de utilidad en las áreas donde *H. zea* es una plaga importante, tal es el caso de La Comarca Lagunera y Chihuahua (Martínez-Carrillo y Díaz-López, 2005). Debido a que expresan la  $\delta$ -endotoxina Cry1Ac y la  $\delta$ -endotoxina Cry2Ab, esta última es muy efectiva para el control de *H. zea* (Sivasupramanian *et al.* 2005).

### **Retos del uso de cultivos transgénicos en el control de plagas.**

El reto principal consiste en retrasar el desarrollo de resistencia en las plagas objeto de control (Sims y Stone, 1991; Gould *et al.* 1992; Moar *et al.* 1995; De Maagd *et al.* 1999; Tabashnik *et al.* 2003; Luo *et al.* 2007). Para mitigar el desarrollo de resistencia, se considera necesario que los agricultores siembren con algodón convencional áreas de refugio adyacentes al algodón transgénico (Gould y Tabashnik, 1998; Díaz *et al.* 2005). Las zonas de refugio tienen como función permitir el desarrollo de individuos susceptibles, mismos que al llegar al estado adulto se espera copulen con aquellos que

emerjan del algodón Bollgard® y se reduzca el riesgo de resistencia. Las proporciones de las áreas a sembrar de Bollgard®: algodón convencional (refugio) que se han utilizado en México son 80:20 y 96:4. A la fecha, las poblaciones plaga objeto de control por parte del algodón Bollgard® mantienen su susceptibilidad a la  $\delta$ -endotoxina Cry1Ac, indicando la efectividad del programa de manejo de la resistencia implementado (Rodríguez *et al.* 2005). Es probable que esta estrategia también se utilice en algodón Bollgard II®.

### **Estrategias para el monitoreo de resistencia a cultivos Bt.**

El conocimiento de la respuesta inicial de las poblaciones de insectos plaga a las  $\delta$ -endotoxinas Cry1Ac y la  $\delta$ -endotoxina Cry2Ab es un requisito indispensable para conocer la evolución de la resistencia (Luttrell *et al.* 1999; Ali y Luttrell, 2007). Los valores de respuesta que en el futuro se obtengan, se comparan con los valores de respuesta inicial para conocer la proporción de cambio a través del tiempo (Zhao *et al.* 2001). Idealmente dichos valores deberían determinarse para todos los insecticidas. Desafortunadamente, en muchos casos, como en insecticidas sintéticos, se desconocen y por tanto se dificulta conocer la magnitud del cambio a través del tiempo. Así mismo el conocimiento de la estructura genética de la población plaga objeto de control.



A través de la estructura genética se tiene un mejor entendimiento de los mecanismos de comportamiento y de genético, flujo genético, hospederos preferentes por posibles razas o líneas de insectos. La información en estos puntos es indispensable tanto para los programas de manejo integrado de plagas como para el desarrollo de estrategias de manejo de resistencia a insecticidas sintéticos o cultivos transgénicos.

### **Líneas de investigación enfocadas sobre el estudio de la estructura genética en poblaciones de insectos.**

La estructura poblacional de diferentes especies de insectos tanto vectores de importantes enfermedades dañinas para el hombre, como de plagas de carácter económico de gran importancia, han sido estudiadas desde el punto de vista molecular, usando diferentes sistemas de marcadores.

Dentro de las principales plagas estudiadas en este sentido se encuentran:

***H. zea*** (Lepidoptera: Noctuidae).

Qifa *et al.* (2002), estudiaron la frecuencia de alelos por generación en poblaciones de *H. zea* dentro de áreas regionales, encontrando una

estabilidad en la frecuencia de alelos y heterocigosidad por generación, concluyendo que hay una gran cantidad de flujo genético y un bajo nivel de diferenciación genética dentro de la escala espacial de investigación.

Gresala *et al.* (2005), analizaron la estructura genética poblacional de *H. zea* con el uso de marcadores Microsatélites de secuencia sencilla repetida (SSR), El resultado no fue contundente debido a que cada marcador genético necesitaba temperaturas de anillamiento independiente. Así mismo Perera *et al.* (2007), ubicaron y caracterizaron 13 sitios polimórficos en una población (n=96) de *H. zea*, colectados en maíz, útiles para el estudio de genética poblacional en *H. zea*.

***H. armigera*** (Lepidoptera: Noctuidae).

*H. armigera* y *H. zea*, son especies plaga, polífagas de gran importancia en el Viejo y Nuevo mundo. Para la identificación y separación entre las dos especies se recurre a diferencias morfológicas en sus genitales, causando controversia en repetidas ocasiones. Algunos autores las consideran como una misma especie.

Gajanan *et al.* (2007), estudiaron la estructura genética de *H. armigera* y su relación evolutiva con *H. zea*. Utilizando para el estudio las secuencias de la región mitocondrial, citocromo c oxidasa subunidad I (COI). Ellos obtuvieron secuencias de 511 pares de bases de longitud de individuos de *H. armigera* colectados en diferentes hospederos cultivados en Australia, Burkina Faso, Uganda, China, India y Pakistán. Un solo nucleótido polimórfico (SNPs) presente en COI, distinguió a las poblaciones de *H. armigera* en 33 haplotipos. La distribución de haplotipos entre continentes, los valores bajos de la prueba estadística de Fisher ( $F_{ST}$ ) en relación a los haplotipos y la baja diversidad de nucleótidos entre continentes (0.0017 – 0.0038) sugieren que *H. armigera* es una sola especie distribuida en África, Asia y Australia, capaz de viajar grandes distancias. En relación al estudio evolutivo, la baja diversidad genética en entre especies y en los análisis de datos de las secuencias en *H. zea*, colectadas de el Norte y Sur América, concluyen que *H. zea* es una sola especie. Así como también los resultados demostraron una distancia genética corta (alto porcentaje de semejanza) entre *H. armigera* y *H. zea*; dichos resultados hacen suponer que *H. zea* proviene de *H. armigera*, en un evento ocurrido hace 1.5 millones de años.

***Spodoptera frugiperda*** (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae).

Es una especie plaga de importancia económica en diferentes cultivos en el continente americano (Méndez *et al.* 2002, Yu *et al.* 2003). Este insecto tiene un comportamiento altamente polífago, en el cual incluye diferentes cultivos hospederos, tales como maíz, *Zea mays* L.; algodón, *Gossypium hirsutum* L., y arroz, *Oryza sativa* L.

En los Estados Unidos de América como en Brasil, con el empleo de técnicas moleculares se han diferenciado dos “razas” o estirpes de *S. frugiperda*, una asociada fuertemente al cultivo de maíz (Busato *et al.* 2002, 2004) y la otra al cultivo de arroz (Pashley *et al.* 1985, 1992; Pashley 1986). Con la necesidad de un mayor entendimiento de la similitud genética entre las dos razas (*S. frugiperda*) se han empleado diferentes técnicas moleculares (Samuel *et al.* 2006; Jennifer *et al.* 2006; Clark *et al.* 2007).

Jennifer *et al.* (2006), se enfocaron a investigar la estructura genética de *S. frugiperda* (J.E. Smith) y la distribución de las dos razas (maíz y arroz) en una parte de su rango de distribución en los Estados Unidos de América. Utilizando el gen COI y II como región de análisis, obteniendo como resultado fragmentos de 608 pares de bases para los dos regiones (COI y II), que

diferenciaron a tres haplotipos de la raza de maíz y cuatro haplotipos de la raza de arroz las cuales presentaban una divergencia genética de 0.66 a 0.99%.

Martinelli *et al.* (2006), estudiaron la variabilidad genética en poblaciones de *S. frugiperda* asociadas al cultivo de maíz y algodón en Brasil. Los resultados sugieren la presencia de un alto flujo genético considerable entre las poblaciones de *S. frugiperda* presentes en el cultivo de maíz y algodón localizados en la misma región de Brasil. Así mismo Clark *et al.* (2007), estudiaron la variación genética poblacional del gusano cogollero en el hemisferio occidental. Incluyeron para el análisis a 23 poblaciones colectadas en México, Estados Unidos de América, Puerto Rico, Brasil y Argentina, con objetivo de evaluar si la mayor variabilidad genética se encuentra dentro o entre poblaciones de *S. frugiperda*. Los resultados de AFLP muestran que la mayoría de la variabilidad genética está presente dentro de la población y no entre poblaciones, indicando un escaso flujo genético.

Machado *et al.* (2008) analizaron las poblaciones de *S. frugiperda* en áreas del Sur de Brasil para investigar la presencia de las dos razas previamente caracterizadas y si las mismas mostraban infestaciones semejantes sobre las plantas hospederas (maíz, arroz), así como también determinar si la secuencia de la raza de arroz previamente identificada se encontraba presente con mismo patrón de desplazamiento en la misma

distribución asimétrica en las dos líneas de hospedero. Los resultados indicaron que los haplotipos mitocondriales típicos de la raza de arroz fueron encontrados 100% en larvas colectadas de maíz, mientras el 83% de los haplotipos típicos de la raza de maíz fueron encontrados en larvas colectadas de cultivo de maíz. Indicando que las poblaciones de *S. frugiperda* en Brasil y Norte América son virtualmente indistinguibles con los marcadores ya conocidos para la raza de maíz y arroz, debido a la existencia de una posible hibridación entre las dos razas.

Como hemos observado, para el estudio de la estructura genética poblacional se emplean diferentes técnicas moleculares.

Al respecto en años recientes se ha utilizado al ADN ribosomal como una herramienta en estudios filogenéticos y poblacionales en diferentes especies de insectos.

El ADN ribosomal se encuentra constituido por unidades repetidas consecutivamente, en el cual cada unidad esta conformadas por tres regiones que codifican el RNA ribosomal, los genes 18S, 5.8S y el gen 28S, separados por regiones o espaciadores transcritos internos (ITS) no codificantes. Los genes 5.8S y 18S de RNA ribosomal son separados por el primer espaciador ITS-1 y los genes 18S y 28S están separados por el segundo espaciador ITS-2.

Las secuencias de nucleótidos de los genes 18S, 5.8S y 28S demuestran altos niveles de conservación. En contraste, las regiones espaciadoras (ITS) son menos conservadas y han sido fuertemente usadas en estudios taxonómicos y filogenéticos, para diferenciar poblaciones que recientemente han divergido en numerosos insectos de importancia económica (Hillis *et al.* 1986; Collis *et al.* 1996; Miller *et al.* 1996; Baffi *et al.* 2002)

## MATERIALES Y MÉTODOS.

### **Genetic Variation within ITS1 and ITS2 regions in corn earworm (*Helicoverpa zea* Boddie) from Veracruz and Tamaulipas, Mexico.**

Ausencio A. Dominguez<sup>1, a</sup>, Omaththage P. Perera<sup>2</sup>, Carlos A. Blanco<sup>2</sup>, Jorge San Juna Lara<sup>\*2</sup>  
and Sergio R. Sánchez-Peña<sup>\*2</sup>

<sup>1-2</sup> UAAAN Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista, Saltillo  
Coahuila, México. C.P. 25315

<sup>2</sup> USDA Agricultural Research Service, Southern Insect Management Research  
Unit, Stoneville, Mississippi 38776

Keywords: Insect diversity, ITS-1 and ITS-2, bollworm.

<sup>a</sup> Corresponding author: azuarad@gmail.com



## **Abstract.**

The genetic relatedness among *Helicoverpa zea* (Boddie) occurring on different host plants (corn, sorghum and soybean) prevailing in northern Veracruz and southern Tamaulipas Mexico, was studied using ITS regions. The evolutionary divergence was found very high within the groups in both ITS regions analysis; the minimum genetic divergence was 0.193 for ITS-1 and 0.002 for ITS-2 in individuals collected in corn from Tantoyuca Veracruz, similar levels of divergence within and between groups in of ITS regions was evident in individuals of corn, sorghum and soybeans from Tampico Alto Veracruz and Estación Cuauhtémoc Tamaulipas. The divergence overall was far below 1, indicated that the majority of genetic viability is within a give group. Similar levels of divergence between groups, minimum level of the mean evolutionary diversity Interpopulational, which indicated that there was no significant genetic differentiation between populations, as well as the coefficient of evolutionary differentiation may indicate that the individuals collected from sorghum, soybeans and corn, ware derived from a same ancestor. Furthermore, comparing the relationship between genetic distances and evolutionary levels of the *H. zea*; Phylogenetic trees constructed with MP method using ITS regions data sets shoved that individuals from the same natural geographical populations did not cluster together. These results suggest that there is litter genetic structuring and geographical isolation in different regions. Instead, the three geographical populations sampled seemed to be a part of a single large 'megapopulation'.

## Introduction

The bollworm or corn earworm, *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae) is highly polyphagous, causing considerable economic losses in at least 30 important crops in various countries from South to North America (Metcalf *et al.* 1962, Mitter *et al.* 1993), especially of upland cotton *Gossypium hirsutum* L. (Luttrell, 1994), it also feeds on a diversity of non-cultivated plants (>76) (Blanco *et al.* 2007); Bollworm has developed resistance to certain classes of insecticides (Terán-Vargas *et al.* 2005), and is perceived as a migratory species. Due to these characteristics is considered a ‘megapopulation’, infesting the entire American continent.

The population genetic analysis on *H. zea* in North America may provide a better understanding of its dispersal; it can aid in monitoring the spread of insecticide resistance, and can be useful for the implementation of area-wide control programs. Little is known about the bollworm population structure within and among crops and regions.

The objective of this study was to evaluate the molecular variability in *H. zea* populations to investigate the genetic relatedness among *H. zea* individuals collected from sorghum (*Sorghum bicolor* L.), soybeans (*Glycine max* L.) and corn (*Zea mays* L.) fields at different sites in tropical area of eastern Mexico,

using as genetic markers the internal transcribed spacers (ITS-1 and ITS-2) of ribosomal DNA (rDNA).

## **Materials and methods**

### **Field collections**

Bollworm (*Helicoverpa zea*) larvae were collected from sorghum, soybeans and corn (Table 1), placed in containers with 100% ethanol and stored at -20°C until they were processed. Collections from corn were obtained in the municipalities of Tantoyuca and Tampico Alto, Veracruz; larvae from sorghum and soybeans were obtained in the municipality of Estación Cuauhtémoc in the state of Tamaulipas. All localities are within a radius of < 45 km.

### **Molecular Analysis**

Total DNA was extracted from the thorax of individual larvae using the Master Pure™ reagent system (Epicentre Technologies) following manufacturer's instructions, followed by a phenol/chloroform clean-up. The purified DNA was quantified by spectrometry and stored at -20° C.

After DNA extraction, two separate ITS regions were amplified using polymerase chain reaction (PCR): The oligonucleotide primer pairs used for amplification ITS regions are listed in Table 2, they were constructed with previously published sequences, submitted to GenBank. Amplifications were

performed 25  $\mu$ l reactions by using 50 ng of template DNA, 10X PCR buffer, 10 mM dNTPs, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 10  $\mu$ M of each primer, and 1 U of platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen). The amplification was performed in a PTC-200 Thermal Cycler (MJ Research) using the following parameters: an initial cycle at 95 °C (4 min), 35 cycles at 95 °C (90 s), 50 °C (30 s), 72 °C (120 s), followed by a final extension at 72 °C (4 min). The length of PCR products was estimated by electrophoresis on 1.5% agarose gels, stained with ethidium bromide using a molecular weight marker of 1 kb DNA ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and visualized under low-intensity UV illumination using UVP's (Upland, California) Doc-It LS Analysis Software.

### **Cloning and DNA Sequencing of PCR Fragments**

After determining the approximate size of fragments, these were excised from gels and purified using the Wizard<sup>®</sup> PCR Preps DNA Purification System kit (Promega, Madison, WI). Purified DNA fragments were ligated with PCR 2.1 TOPO<sup>®</sup> Plasmid vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and three recombinant clones from each sample were sequenced at the USDA-ARS Mid-South Area Genomics Laboratory using an ABI 370xl instruments and BigDye version 3.1 (Applied Biosystems).

## **Data Analysis**

DNA sequences were assembled and aligned using Vector NTI Advance™ 10 software, followed by manual editing. Phylogenetic trees were constructed using Parsimony method in MEGA program ver. 4.0 (Tamura *et al.* 2007), Statistical support for each MP tree was assessed with the bootstrap resampling technique (Felsenstein, 1985) over 1000 replicates. Evolutionary distances and Diversity Population were computed using the Tamura-Nei method (Tamura and Nei, 1993) in MEGA4 program.

## **Results.**

DNA amplification of all samples showed the presence of a unique PCR fragment, with molecular lengths of 595 bp for consensus sequences of ITS-1 and 954 bp for ITS-2 region. Composition of the ITS-1 region was clearly of 332 parsimony- informative sites from 494 variables sites, and had a 48.8% G + C content, for ITS-2 region was of 665 parsimony-informative sites from 751 variables sites, and had 54.8 % G + C content.

The genetic divergence value the 0.193 (ITS-1) and 0.002 (ITS-2), was found within the conforming group of individuals collected in corn from Tantoyuca Veracruz; this low level supports the possibility of low gene flow across this portion of the *H. zea* range. Values high of divergence within groups (Grp-2, 3 and 4) and similar values between them in both ITS regions (Table 3-4), suggest

that events, such as migration, provide opportunity for interbreeding and gene flow in the three geographic regions.

Overall gene divergence averaged 0.576 (ITS-1) and 0.318 (ITS-2) found across all groups (Table 3-4). The coefficient of evolutionary differentiation value among all sampled populations was low in both ITS regions (Table 5), indicating a high degree of within population variation and low variation among populations, as well as the coefficient may indicate that the individuals collected from sorghum, soybeans and corn, they were derived from a same ancestor.

Parsimony analysis, of the ITS regions data sets, three distinct strains were obtained on ITS-2 region and two different strains in ITS-1 region, respectively, with a similarity coefficient above 80% within them (fig. 1-2).

Phylogenetic trees constructed showed that individuals from the same natural geographical populations did not cluster together (fig. 1-2). For example, individuals sampled in Tantoyuca Veracruz clustered with those from Tampico Alto Veracruz and Estación Cuauhtémoc Tamaulipas. Results indicated no evidence of correlation between genetic distance and geographical, suggest that there is little genetic structuring and geographical isolation in different regions the tree geographical populations sampled, seemed to be a part of a single large 'megapopulation'. This is consistent with the known long-distance migratory behavior of this insect. Results observed through allozyme by Lopez *et al.*

(1984) and Qifa *et al.* (2002) suggested that genetic structure not vary over generations in *H. zea* populations current in local and regional scales, indicating stability in allele frequencies, heterozygosity and an extensive gene flow occurring at both scales.

It is reasoned that the high genetic differentiation among individuals and low differentiation among *H. zea* geographical populations may result from at last two factors. First, when there is close relationship between the population genetic diversity and the potential adaptability to environments. Increased genetic diversity has been associated with higher fitness (Wright, 1997). Migratory insects usually have higher adaptability to different environments conditions and may encounter environments drastically different from the habitats before migrate. Second, migration enhances gene flow, which can be a powerful force maintaining genetic differentiation in the face of selection (Bossart and Scriber 1995), or which can constrain differentiation and local adaptation of subpopulation. Thus, migration may contribute to the maintenance of genetic polymorphism in this highly migratory insect.

The results of the ITS analysis do not support Pashley (1986) suggestion that divergence and genetic variation among populations collected from different host plants might be due to host characteristics and adaptation.

Furthermore, the Clades obtained with a similarity coefficient above 80% within them, showed that individuals from different natural geographical populations did not cluster together to each other (Fig 1-2), This suggests that of difference genetic within *H. zea* populations may be in function of strains partially incompatibles to cause maybe the mates differential attraction signal of *H. zea* females (Groot *et al.* 2007) and not to reproductive isolation among *H. zea* population (Pashley *et al.* 1992).

In the current study, Bollworm Populations derived from different hosts in the same area and populations collected from the same host but from different areas were analyzed. This study represents the first comprehensive study of Bollworm Populations from Mexico that aimed at detecting the presence maybe of different strains either generated in sympatric, by host preferences, or in allopatry, by the presence of geographic barriers. The Bollworm populations collected from different host plants in Tantoyuca, Tampico Alto (Veracruz) and Estación Cuauhtémoc (Tamaulipas).



**Table 3.** Estimates of Evolutionary Divergence of *Helicoverpa zea* occurring on different host plants (ITS-1).

	N	within Groups	Between Groups.			Overall
			Grp-1 corn-T	Grp-2 corn-TA	Grp-3 sorghum-E	
<b>Grp-1 corn-T</b>	16	0.193				0.576
<b>Grp-2 corn-TA</b>	18	0.593	0.427			
<b>Grp-3 sorghum-E</b>	16	0.686	0.463	0.612		
<b>Grp-4 soybeans-E</b>	18	0.722	0.580	0.644	0.704	

All results are based on the pairwise analysis of 68 sequences. Analyses were conducted using the Tamura-Nei method in MEGA4. There were a total of 436 positions in the final dataset.  
T= Tantoyuca Veracruz. TA= Tampico Alto Veracruz. E= Estación Cuauhtémoc Tamaulipas. N = Sample size.

**Table 4.** Estimates of Evolutionary Divergence of *Helicoverpa zea* occurring on different host plants (ITS-2).

	N	within Groups	Between Groups.			Overall
			Grp-1 corn-T	Grp-2 corn-TA	Grp-3 sorghum-E	
<b>Grp-1 corn-T</b>	16	0.002				0.318
<b>Grp-2 corn-TA</b>	16	0.480	0.263			
<b>Grp-3 sorghum-E</b>	13	0.448	0.171	0.390		
<b>Grp-4 soybeans-E</b>	19	0.333	0.253	0.430	0.361	

All results are based on the pairwise analysis of 64 sequences. Analyses were conducted using the Tamura-Nei method in MEGA4. There were a total of 436 positions in the final dataset.  
T= Tantoyuca Veracruz. TA= Tampico Alto Veracruz. E= Estación Cuauhtémoc Tamaulipas. N = Sample size.

**Table 5.** Estimates of the Mean Evolutionary Diversity Population of *H. zea* occurring on different host from Veracruz and Tamaulipas, Mexico.

	ITS-1	ITS-2
<b>Within Subpopulations</b>	0.548	0.316
<b>Entire Population</b>	0.576	0.318
<b>Interpopulational</b>	0.028	0.002
<b>Coefficient of Evolutionary Differentiation</b>	0.049	0.007

All results are based on the analysis of 68 sequences, using the Tamura-Nei method in MEGA4.

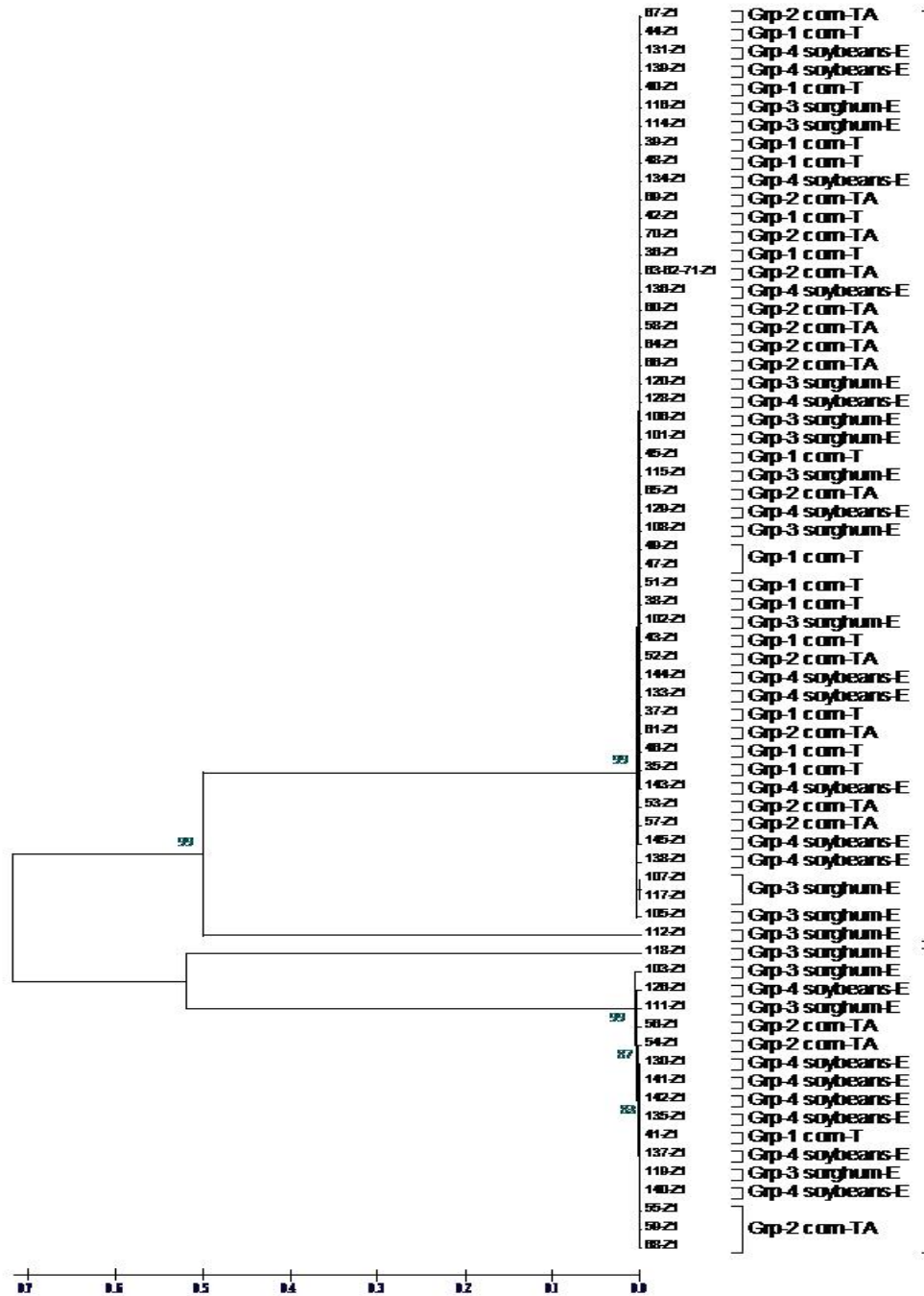


Fig. 1. Phylogenetic analysis of ITS-1 sequence of *H. zea*. Consensus tree were inferred by the maximum parsimony and Bootstrap values were based on 1000 replicates and expressed as percentages.

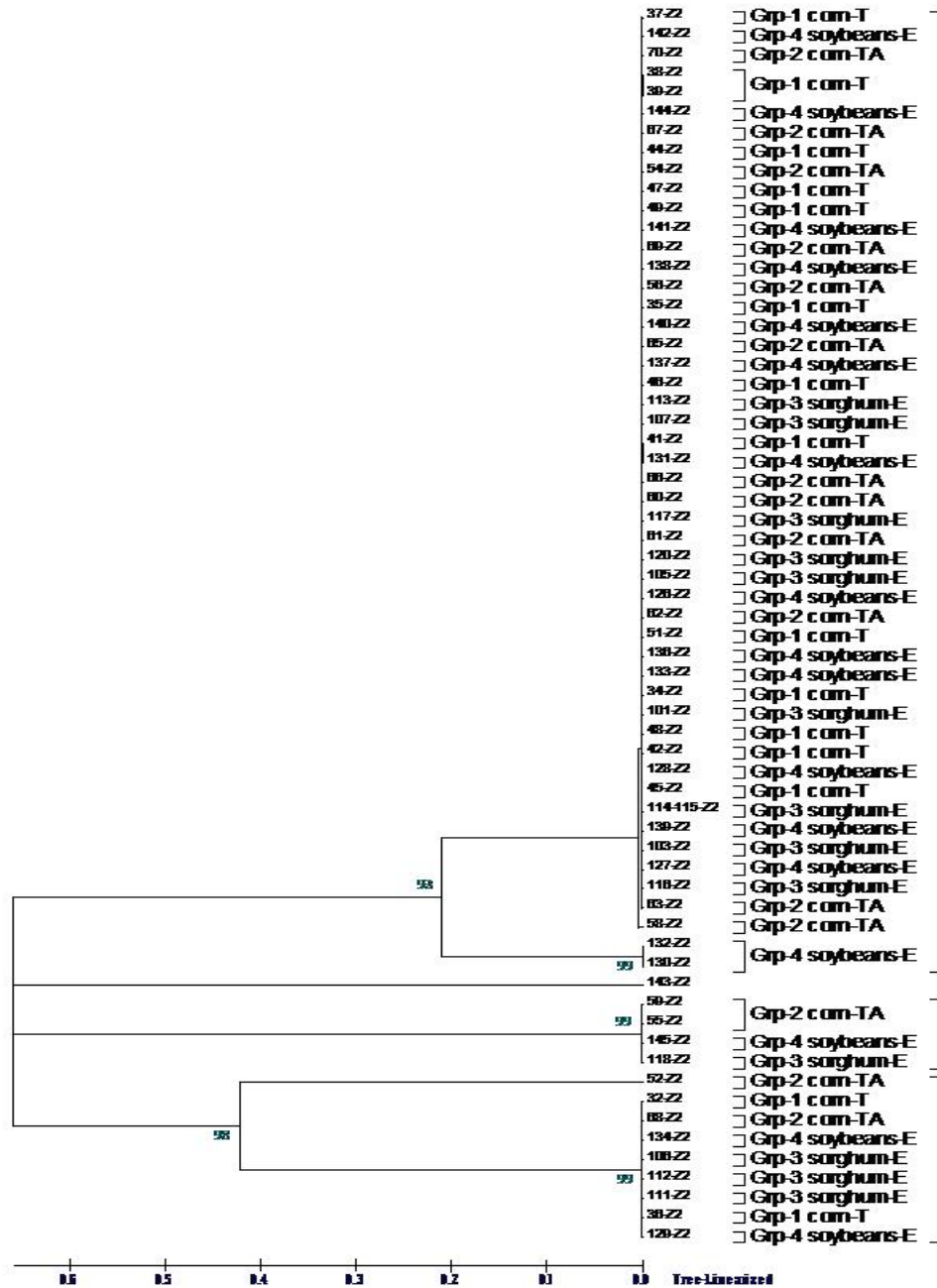


Fig. 2. Phylogenetic analysis of ITS-2 sequence of *H. zea*. Consensus tree were inferred by the maximum parsimony and Bootstrap values were based on 1000 replicates and expressed as percentages.

**Table 1. Samples collected from corn, sorghum and soybean, used in the present study.**

Locality	Host	Coordinates		Collection dates
		(N ) Latitude	(W ) Longitude	
Tantoyuca Ver.	corn	21° 22' 10.95"	98° 04' 49.79"	13/10/2007
Tampico Alto Ver.	corn	22° 4' 7.05"	97° 47' 7.40"	14/10/2007
Est. Cuauhtémoc Tam.	sorghum	22° 33' 10.97"	98° 05' 55.21"	15/10/2007
Est. Cuauhtémoc Tam.	soybean	22° 37' 09.06"	98° 09' 55.74"	15/10/2007

**Table 2. Sequences used in developing oligos specific for ITS regions.**

Primer	Oligo Sequence	No. Accession GenBank	Insect	References
ITS-1 311-5.8S-rDNA	(5'-GCAGGACACATTTGAACATCGACAYTTC-3') <i>Forward</i>	AF463459	<i>Attacus ricini</i> .	Dou <i>et al</i> , 1987.
		DQ164784	<i>Samia ricini</i> .	Mahendran <i>et al</i> , 2006.
		DQ164787	<i>Hyalophora cecropia</i> .	Mahendran <i>et al</i> , 2006.
		DQ164788	<i>Bombyx mori</i> .	Mahendran <i>et al</i> , 2006.
		DQ164786	<i>Gonometa postica</i>	Mahendran <i>et al</i> , 2006.
		DQ179248	<i>Lymantria xyliina</i> .	Wang <i>et al</i> , 2005.
387-28S-rDNA	(5'-ATTCTTCCTGTTTCGCTCGCCGCTACT-3') <i>Reverse</i>	AF463459	<i>Attacus ricini</i> .	Dou <i>et al</i> , 1987.
		AF423922	<i>Hemileuca sp.</i>	Michael F. Whiting 2002.
		AF423921	<i>Galleria mellonella</i> .	Michael F. Whiting 2002.
ITS-2 310-18S-rDNA	(5'- ATCATTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGT-3') <i>Forward</i>	AF463459	<i>Attacus ricini</i> .	Dou <i>et al</i> , 1987.
		DQ164784	<i>Samia ricini</i> .	Mahendran <i>et al</i> , 2006.
		DQ164787	<i>Hyalophora cecropia</i> .	Mahendran <i>et al</i> , 2006.
		DQ164788	<i>Bombyx mori</i> .	Mahendran <i>et al</i> , 2006.
		DQ164786	<i>Gonometa postica</i>	Mahendran <i>et al</i> , 2006.
		DQ179248	<i>Lymantria xyliina</i> .	Wang <i>et al</i> , 2005.
		AF077013	<i>Ostrinia nubilalis</i>	Marcon <i>et al</i> , 1999.
		AY371192	<i>Plutella xylostella</i>	MA J. <i>et al</i> , 2005.
		EU057177	<i>Helicoverpa assulta</i>	Li <i>et al</i> , 2007.
		EU204143	<i>Helicoverpa armigera</i>	Kuracha <i>et al</i> , 2007.
		AF395878	<i>Bombyx mandarina</i>	Nho <i>et al</i> , 2001.
		EU215423	<i>Anthonomus grandis</i>	Roehrdanz <i>et al</i> , 2007.
312-5.8S-rDNA	(5'-GAARTGTCGATGTTCAAATGTGCCTGC-3') <i>Reverse</i>			

**Note: 312-5.8S-rDNA = Reverse complement of 311-5.8S-rDNA.**

## References Cited

1. Blanco, C. A., A. P. Terán-Vargas, J. D. López, J. V. Kauffman, and X. Wei. 2007. Densities of *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in Three Plant Hosts. Fla. Entomol. 90: 742–750.
2. Bossart, J. L., and M. Scriber. 1995. Maintenance of ecologically significant variation in the tiger swallowtail butterfly through differential selection and gene flow. Evolution. 19: 1163-1171.
3. Dou, S., Z. Zheng, and T. Li. 1987. The DNA Sequence and Structural Characteristic of the 5.8S Ribosomal RNA Gene of Silkworm *Attacus ricini*. Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao. 19:373-381.
4. Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution. 39:783-791.
5. Gajanan, T. B., T. T. Wee, A. R Derek, G. H David, R. A Belinda, R. K Keshav, and B. Philip. 2007. Mitochondrial DNA analysis of field populations of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and of its relationship to *H. zea*. BMC Evolution. Biol: 7- 117 doi: 10.1186/1471-2148-7-117.
6. Groot, A. T., and R. C. Santangelo, E. Ricci, F. Gould, C. Brownie, and C. Shal. 2007. Differential attraction of *Heliothis subflexa* Males to Synthetic Pheromone Lures in Eastern US and Western México. J. Chem. Ecol. 33:353-368.
7. Kuracha. 2007. The internal transcribed spacer region (ITS-1 and ITS-2) of the nuclear ribosomal genes as a tool for Phylogenetic analysis of insect orders. Zoology, Osmania University, Koti, Hyderabad, A.P. 500007, India.
8. Li, H. C., Q. Qiao, and G. H. Yuan. 2007. Cloning and Phylogenetic analysis of the 18S ribosomal RNA gene of *Heliothis assulta*. College of

Plant Protection, Henan Agricultural University, Wenhua Road, 95, Zhengzhou, Henan 450002, P.R. China.

9. Lopez, J. D., A. W. Haststack, and R. Beach. 1984. Comparative pattern of emergence of *Heliothis zea* and *H. virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) from overwintering pupae. *J. Econ. Entomol.* 77: 1421-1426.
10. Luttrell, R. G. 1994. Cotton Pest Management: Part 2. A US perspective. *Annu. Rev. Entomol.* 39:527-542.
11. Ma, J., D. Li, M. Keller, O. Schmidt, and X. Feng. 2005. A DNA marker to identify predation of *Plutella xylostella* (Lep., Plutellidae) by *Nabis kinbergii* (Hem., Nabidae) and *Lycosa* sp. (Aranea, Lycosidae). *J. Appl. Entomol.* 129:330-335.
12. Mahendran, B., S. K. Ghosh, and S. C. Kundu. 2006. Molecular Phylogeny of Silk Producing Insects Based on Internal Transcribed Spacer DNA1. *J. Biochem. Mol. Biol.* 39:522-529.
13. Marcon, P. C., D. B. Taylor, C. E. Mason, R. L. Hellmich, and B. D. Siegfried. 1999. Genetic similarity among pheromone and voltinism races of *Ostrinia nubilalis* (Hubner) (Lepidoptera: Crambidae) *Insect. Mol. Biol.* 8:213-221.
14. Metcalf, C. L., W. P. Flint, and R. L. Metcalf. 1962. *Destructive and Useful Insects*. McGraw-Hill, New York.
15. Michael, F. W. 2002. Mecoptera is paraphyletic: multiple genes and phylogeny of Mecoptera and Siphonaptera. *Zoologica Scripta.* 01: 93-104.
16. Mitter, C., R. W. Poole, and M. Matthews. 1993. Biosystematics of the *Heliothinae* (Lepidoptera: Noctuidae). *Ann. Rev. Entomol.* 38:207-225.
17. Nho, S., K. Kim, and J. Lee. 2001. Phylogenetic relationships of the wild silkworm, *Bombyx mandarina*, inferred from the ITS-1 region sequences.

Kyungpook National University, 1370Sankyuk-dong Puk-Gu, Taegu (Korea): 702-701.

18. Pashley, D. P. 1986. Host-associated genetic differentiation in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). A sibling species complex? *Ann. Entomol. Soc. Am.* 79: 898-904.
19. Pashley, D. P., A. M. Hammond, and T. N. Hardy. 1992. Reproductive isolating mechanisms in fall armyworm host strains (Lepidoptera: Noctuidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 85: 400-405.
20. Qifa, H., and M. A. Caprio. 2002. Temporal and Spatial Patterns of Allelic Frequencies in Cotton Bollworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Enviro. Entomol.* 31:462-468.
21. Roehrdanz, R. L., L. Heilmann, and P. Senechal. 2007. Alternating tandem array of histone and ribosomal RNA gene blocks in the boll weevil. Biosciences Research Laboratory, USDA, Agricultural Research Service, Red River Valley Agricultural Research Center, 1605 Albrecht Blvd., Fargo, ND 58105, USA.
22. Tamura, K., and M. Nei. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10:512-526.
23. Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24:1596-1599.
24. Terán-Vargas, A. P., J. C. Rodríguez, C. A. Blanco, J. L. Martínez Carrillo, J. Cibrian Tovar, H. Sanchez Arroyo, L. A. Rodríguez del Bosque, and D. Stanley. 2005. Bollgard cotton and resistance of the tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) to conventional insecticides in Southern Tamaulipas, Mexico. *J. Econ. Entomol.* 98: 2203-2209.



25. Wang, C.H. and H. F. Lin. 2005. Partial sequence of *Lymantria xyli* rRNA unit, including 18S and 5.8S rRNA. Entomology, National Taiwan University, Sec. 4, Roosevelt Rd., Taipei 106, Taiwan.
26. Wright, S. 1977. Evolution and the genetics of populations. vol. 3. Experimental results and evolutionary deductions. University of Chicago Press, Chicago, IL.

## **CONCLUSIONES GENERALES**

De acuerdo a los objetivos planteados y resultados obtenidos en este trabajo, se llegó a las siguientes conclusiones:

Las regiones ITS son útiles para el análisis de la estructura genética poblacional de *H. zea*. La estructura genética generada de las dos regiones ITS, no mostró una asociación entre grupos formados y localidad de origen de los individuos, tampoco hubo una asociación positiva entre grupos y plantas hospederas específicas. Esto indica un nivel bajo de estructura genética y aislamiento geográfico de los grupos formados, posiblemente a consecuencia de un cruzamiento no selectivo entre los individuos y al comportamiento migratorio de los adultos.

Con este tipo de investigación se contribuye con información relevante sobre la genética poblacional de *H. zea* y su dispersión entre cultivos, lo que fortalece al diseño e implementación de estrategias de manejo sustentable de plagas y el manejo de resistencia a insecticidas o cultivos transgénicos.

Por ejemplo, las plantas refugio en manejo de plantas transgénicas no necesariamente deben ser de la misma especie que el cultivo. Esto puede ser relevante si las plantas refugios alternantes son agronómicamente más sencillas o su cultivo es menos costoso.

**LITERAURA CITA**

1. Adkisson P.L. 1972. The integrated control of insect pest of cotton. Proc. Tall Timbers Conf. Ecol. Anim. Contr. Habitat Manag. 4: 175-188
2. Ali M.I. and Luttrell R.G. 2007. Susceptibility of bollworm and tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) to Cry2Ab2 insecticidal protein. J. Econ. Entomol. 100: 921-931.
3. Alvarado-Rodríguez B., Leigh T.F. and Lange W.H. 1982. Oviposition site preference by the tomato fruitworm (Lepidoptera: Noctuidae) on tomato, with notes on plant phenology. J. Econ. Entomol. 75: 895-898.
4. Beerwinkle K.R., Lopez Jr. J.D. Shleider P.G. and Lingreen P.D. 1995. Annual patterns of aerial insect densities at altitudes from 500 to 2400 meters in East-Central Texas indicated by continuously-operating vertically-oriented radar. South. Entomol. 18: 63-79.
5. Biosciences Research Laboratory, USDA, Agricultural Research Service, Red River Valley Agricultural Research Center, 1605 Albrecht Blvd., Fargo, ND 58105. USA.
6. Blanchard, R. A. 1942. Hibernation of the corn earworm in the central and northeastern parts of the United States. US Dep. Agric. Tech. Bull. 838.
7. Blanco CA, Terán-Vargas AP, López JD, Kauffman JV and Wei X. 2007. Densities of *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in Three Plant Hosts. Florida Entomologist. 90 (4): 742-750.
8. Bottrell, D. G., and P. L. Adkisson. 1977. Cotton insect pest management. Annu. Rev. Entomol. 22: 451-481.
9. Brockhouse, C. L., C. G. Vajime, R. Marin, and R. M. Tanguay. 1993. Molecular identifications of *Onchocerciasis* vector sibling species in black flies (Diptera: Simuliidae). Biochem. Biophys. Res. Commun. 44: 223-243.
10. Busato, G. R., A. D. Grutzmacher, M. S. Garcia, F. P and A. F. Martin. 2002. Consumo e utilização de alimento para *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae): originária de diferentes regiones de Rio Grande do Sul, nas culturas do milho e arroz irrigado. Neotrop. Entomol. 31: 525-529.
11. Busato, G. R., A. D. Grutzmacher, A. C. Oliveria, E. A. Vieira, P. D. Zimmer, M. M. Kopp, J. M. Bandeira, and T. R. Magalhaes. 2004. Análise da

- estrutura e diversidade molecular de populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) associadas as culturas do milho e arroz no Rio Grande do Sul. Neotrop. Entomol. 33: 709-716.
12. Callahan, P. S. 1958. Behavior of the imago of the corn earworm, *Heliothis zea* (Boddie), with special reference to emergence and reproduction. Ann. Entomol. Soc. Am. 51: 271-283.
  13. Capinera, J. L. 2001. Handbook of Vegetable Pests. Academic Press, San Diego. 729 pp.
  14. Clark PL, Molina-Ochoa J, Martinelli S, Skoda SR, Isenhour DJ, Lee DJ, Krumm JT, and Foster JE. 2007. Population variation of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, in the Hemisphere. J. Insect of Science 7.05: 10. available online: [insectscience.org/7.05](http://insectscience.org/7.05)
  15. De Maagd, R. A., D. Bosch, and W. Stiekkema. 1999. *Bacillus thuringiensis* toxins-mediated insect resistance in plants. Trends Plant Sci. 4: 9-13.
  16. Díaz, N., J. E. Pérez, y J. M. De la Fuente. 2005. Algodón Bollgard. In: Valdivia E., F. J. Trujillo, y J. Sánchez (eds), Bioseguridad y protección fitosanitaria en la globalización comercial. Universidad Autónoma Chapingo-Colegio de Postgraduados. México. pp: 174-180.
  17. Ditman, L. P., and E. N. Cory. 1931. The corn earworm biology and control. Maryland Agricultural Experiment Station Bulletin 328. 482 pp.
  18. Dou, S., Zheng, Z. and Li, T. 1987. The DNA Sequence and Structural Characteristic of the 5.8S Ribosomal RNA Gene of Silkworm *Attacus ricini*. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao* 19 (5), 373-381.
  19. Eck RV and Dayhoff MO. 1966. Atlas of Protein Sequence and Structure. National Biomedical Research Foundation, Silver Springs, Maryland.
  20. Ellington, J. J. and A. El-Sokkari. 1986. A measure of the fecundity, ovipositional behavior, and mortality of the bollworm, *Heliothis zea* (Boddie), in the laboratory. South. Entomol. 11: 177-193.
  21. EPA (U.S. Environmental protection Agency). 2006. Biopesticides registration action document-*Bacillus thuringiensis* plantain incorporated protestants([protocol://www.epa.gov/pesticides/bipesticides/pips/pip\\_list.htm](http://www.epa.gov/pesticides/bipesticides/pips/pip_list.htm)).

22. Farrar, R. R., and J. R. Brandley. Jr. 1985a. Within-plant distributions of *Heliothis* spp. (Lepidoptera: Noctuidae) eggs and leaves on cotton in North Carolina. *Environ. Entomol.* 14: 205-209.
23. Farrow, R. A. and J. C. Daly. 1987. Long-range movements as an adaptive strategy in the genus *Heliothis* (Lepidoptera: Noctuidae): A review of its occurrence and detection in four pest species. *Aust. J. Zool.* 35: 1-24.
24. Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution.* 39:783-791.
25. Fengyou Jia, Elizabeth Maghirang, Floyd Dowell, Craig Abel, and Sonny Ramaswamy. 2007. Differentiating Tobacco Budworm and Corn Earworm Using Near-Infrared Spectroscopy .*J. Econ. Entomol.* 100 (3): 759-764.
26. Fey, R. E. 1975. Plant host sequence of major cotton insects in Southern Arizona. U.S. Dep. Agric., ARS W-24.8 pp.
27. Fey, R. E. and W. C. McAda. 1972. Laboratory studies of the development, longevity, and fecundity of six Lepidopteros pests of cotton in Arizona. USDA Tech. Bull. 1454.
28. Figueroa-Silvestri, E. 1983. Ciclo de vida y enemigos naturales de *Heliothis zea* (Lepidoptera: Noctuidae) en Puerto Rico. Tesis M.S. Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, P. R. 110 pp.
29. Fitt, G. P. 1989. The ecology of *Heliothis* species in relation to agroecosystems. *Ann. Rev. Entomol.* 34: 17-52.
30. Fuentes-López, M. R. 1994. Progreso en selección recurrente recíproca en cuatro poblaciones de maíz y su comportamiento agronómico en relación al gusano de la mazorca y el cogollero (Lepidoptera: Noctuidae). Tesis M.S. Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, P. R. 85 pp.
31. Gajanan T Behere, Wee Tek Tay, Derek A Russell<sup>1</sup>, David G Heckel, Belinda R Appleton, Keshav R Kranthi and Philip Batterham. 2007. Mitochondrial DNA analysis of field populations of *H. armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and of its relationship to *H. zea*. *BMC Evolutionary Biology*: 7-117. doi: 10.1186/1471-2148-7-117.

32. Gatehouse, A. G. 1997. Behavior and ecological genetics of wind-borne migration by insects. *Annu. Rev. Entomol.* 42: 475-502.
33. Georghiou, G. P., and C. E. Taylor. 1977. Genetic and biological influences in the evolution of insecticide resistance. *J. Econ. Entomol.* 70: 319-323.
34. Gould, F., A. Martínez-Ramírez, A. Anderson, J. Ferre, F. J. Silva, and W. J. Moar. 1992. Broad-spectrum resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 701-726. James, C. 2006. Global status of commercialized biotech/GM crops.
35. Gould, F., and B. E. Tabashnik. 1998. Bt-cotton resistance management. *In*: M. Mellon and J. Rissler (eds.), now or never: serious new plans to save a natural pest control. Cambridge, MA: Union of Concerned Scientist. pp. 67-105.
36. Graham, H. M., N. S. Hernandez, Jr. and J. R. Llanes. 1972. The role of host plants in the dynamics of populations of *Heliothis* spp. *Environ. Entomol.* 1: 424-431.
37. Grasela JJ, McIntosh AH. 2005. Cross-species investigation of *Helicoverpa armigera* microsatellites as potential marker for other related species in the *Helicoverpa-Heliothis* complex. *J. Insect of Science.* 5(47): 13.
38. Gross. H. R., Jr., and J. R. Young. 1977. Comparative development and fecundity of corn earworm reared on selected wild and cultivated early-season hosts common to the southwestern U. S. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 70: 63-65.
39. Hardwick, D. F. 1965. The corn earworm complex. *Mem. Entomol. Soc. Canada.* 40: 1- 247.
40. Harrell, E. A., W. D. Perkins, and B. G. Mullinix. 1979. Effects of temperature, relative humidity, and air velocities on development of *Heliothis zea*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 72: 222-223.
41. Hayes, J. L. 1988. A comparative study of adult emergence phonologies of *Heliothis virescens* (F.) and *H. zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae) on various hosts in field cages. *Environ. Entomol.* 17: 344-349.

42. Hedin, P. A., F. G. Maxwell, and J. N. Jenkins. 1974. Insect plant attractants, feeding stimulants, repellents, deterrents, and other related factors affecting insect behavior, pp. 494-527. En F. G. Maxwell y F. A. Harris [eds.], Proc., Summer Institute on Biological Control of Plant Insects and Diseases. University Press of Mississippi. Jackson, MS. 647 pp.
43. Hill, D. 1983. Agricultural insects' pest of the tropics and their natural control. Cambridge University Press, London, England. 746 pp.
44. Hillis, D. M., and S. K. Davis. 1986. Evolution of ribosomal DNA: fifty million years of recorded history in the frog genus *Rana*. *Evolution* 40:1275-1 288.
45. Hogg, D. B., and M. Calderon C. 1981. Developmental times of *Heliothis zea* and *H. virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae and pupae in cotton. *Environ. Entomol.* 10: 177-179.
46. Jennifer A. L, Allen L. Z, Rodny N. N, Robert L. M, Carrie B. O, and Rondall G.L. 2006. Genetic Variation with and between Strains of the Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Florida entomologist* 89 (1). 63-68.
47. Ji Y-J, Zhang D-X, Hewitt GM, Kang L, and Li D-M. 2003. Polymorphic microsatellites loci for the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and some remarks on their isolation). *Molecular Ecology Notes.* 3: 102-104.
48. Johnson, S. J. 1995. Insect migration in Norte America: synoptic-scale transport in a highly seasonal environment, pp. 31-66. In V. A. Drake and A. G. Gatehouse (eds.) *Insect Migration: Tracking Resource through Time and Space*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
49. Kadwell, K. Launis, K. Lewis, D. Addox, K. Mcpherson, M. R. Mefhji, E. Merlin, R. Rhodes, G. W. Warren, M. Wright, and S. Evola. 1993. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology* 11: 194-200.
50. King, A. B. S. 1994. *Heliothis/Helicoverpa* (Lepidoptera: Noctuidae), pp. 39-106. In G. A. Matthews, and J. P. Tunstall (eds.) *Insect Pests of Cotton*. CAB Intl., Oxon, UK.



51. King, A.B.S. and J.L. Saunders. 1984. Las plagas Invertebradas de cultivos anuales alimenticios en America central. London: Overseas Development Administration (ODA). 182 p.
52. King, E. G. and R. J. Coleman. 1989. Potential for the biological control of *Heliothis* species. Ann. Rev. Entomol. 34: 53-75.
53. Kogan M., C. G. Helm, J. Kogan, and E. Brewer. 1989. Distribution and economic importance of *Heliothis virescens* and *Heliothis zea* in North, Central, and South America and of their natural enemies and host plants. pp. 241-297 In E. G. King and R. D. Jackson [eds.], Proceedings of the Workshop on Biological Control of *Heliothis*: Increasing Effectiveness of Natural Enemies, New Delhi, India. Far Eastern Regional Research Office, USDA.
54. Kogan, J., D. K. Sell, R. E. Stinner, J. R. Bradley, Jr., and M. Kogan. 1987. The literature of arthropods associated with soybean: v a bibliography of *Heliothis zea* (Boddie) and *H. virescens* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae). INTSOY Series 17. International Agricultural Publications, Urbana-Champaign, IL, US.
55. Koziel, M. G., G. L. Beland, C. Bowman, N. B. Carozzi, R. Crenshaw, L. Crossland, J. Dawson, N. Desai, M. Hill, S. Kadwell, K. Launis, K. Lewis, D. Maddox, K. McPherson, M. R. Meghji, E. Merlin, R. Rhodes, G. W. Warren, M. Wright, and S. V. Evola. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. Bio/Technology 194–200.11.1993.
56. Kranthi KR, Jadhav DR, Kranthi S, Wanjari RR, Ali S, Russell D: Insecticide resistance in five major insects pests of cotton in India. Crop Prot 2002, 21:449-460.
57. Kuracha, 2007. The internal transcribed spacer region (ITS-1 and ITS-2) of the nuclear ribosomal genes as a tool for Phylogenetic analysis of insect orders. Zoology, Osmania University, Koti, Hyderabad, A.P. 500007, India.
58. Layton, M. B., M. R. Williams, and S. Stewart. 1997. Bt-cotton in Mississippi: the first year. Proceedings of the Beltwide Cotton Conference, 6-10 January 1997. New Orleans, Louisiana. National Cotton Council of America, New Orleans LA. pp: 861-863.

59. Leonard, B.R., J. B. Graves, and P. C. Ellsworth. 1999. Insect and mite pest of cotton, pp. 489-551. In W.C. Smith (ed.) Cotton: Origin, History, Technology, and Production. John Wiley and Sons, New York.
60. Li, H.C., Qiao, Q. and Yuan, G.H. 2007. Cloning and Phylogenetic analysis of the 18S ribosomal RNA gene of *Heliothis assulta*. College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Wenhua Road, 95, Zhengzhou, Henan 450002, P.R. China.
61. Lingren, P. D., and W. W. Wolf. 1982. Nocturnal activity of the tobacco budworm and other insects, pp. 211-228. In J. L. Hatfield, and I.J. Thomason (ed.) Biometeorology in Integrated Pest Management. Academic Press, New York.
62. Lingren, P. D., G. L. Greene, D. R. Davis, A. H. Baumhover, and T. J. Henneberry. 1977. Nocturnal behavior of four Lepidoptera pests that attack tobacco and other crops. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 70: 161-167.
63. Lingren, P. D., J. R. Raulston, T. J. Henneberry, and A. N. Sparks. 1986. Night-vision equipment, reproductive biology, and nocturnal behavior: Importance to studies of insect flight, dispersal, and migration, pp. 253-264. In W. Danthanarayana (ed.) *Insect Flight*. Springer-Verlag, New York.
64. Lopez, J. D., A. W. Haststack, Jr. and R. Beach. 1984. Comparative pattern of emergence of *Heliothis zea* and *H. virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) from overwintering pupae. *J. Econ. Entomol.* 77: 1421-1426.
65. Luo, S., K. Wu, Y. Tian, G. Liang, X. Feng, J. Zhang, and Y. Guo. 2007. Cross-resistance studies of Cry1Ac-resistant strains of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to Cry2Ab. *J. Econ. Entomol.* 100: 909-915.
66. Luttrell R. G. 1994. Cotton Pest Management: Part 2. A US perspective. *Annu. Rev. Entomol.* 39:527-542.
67. Luttrell, R. G., L. Wan, and K. Knighten. 1999. Variation in susceptibility of noctuid (Lepidoptera) larvae attacking cotton and soybean to purified endotoxin proteins and commercial formulations of *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* 92: 21-32.

68. Ma, J., Li, D., Keller, M., Schmidt, O. and Feng, X. 2005. A DNA marker to identify predation of *Plutella xylostella* (Lep., Plutellidae) by *Nabis kinbergii* (Hem., Nabidae) and *Lycosa* sp. (Aranea, Lycosidae). *J. Appl. Entomol.* 129 (6): 330-335.
69. MacIntosh, S. C., T. B. Stone, R. S. Sims, P. L. Hunts, J. T. Greenplate, P. G. Marrone, J. F. Perlak, D. A. Fischhoff, and R. L. Fuchs. 1990. Specificity and efficacy of purified *Bacillus thuringiensis* against agronomically important insects. *J. Environ. Entomol.* 56: 258-266.
70. Mahendran, B., Ghosh, S.K. and Kundu, S.C. 2006. Molecular Phylogeny of Silk Producing Insects Based on Internal Transcribed Spacer DNA1. *J. Biochem. Mol. Biol.* 39 (5), 522-529.
71. Marcon, P.C., Taylor, D.B., Mason, C.E., Hellmich, R.L. and Siegfried, B.D. 1999. Genetic similarity among pheromone and voltinism races of *Ostrinia nubilalis* (Hubner) (Lepidoptera: Crambidae) *Insect Mol. Biol.* 8 (2): 213-221.
72. Martin, Lingren and Greene GL. 1976. Relative Abundance and host preferences of cabbage looper, soybean looper, tobacco budworm, and corn earworm on crops grown in Northern Florida. *Environ. Entomol.* 5:878-882.
73. Martin, P. B., P. D. Lingren and G. L. Greene. 1976a. Relative abundance and host preferences of cabbage looper, soybean looper, tobacco budworm, and corn earworm on crops grown in northern Florida. *Environ. Entomol.* 5: 878-882.
74. Martínez-Carrillo, J. L., and N. Díaz-López. 2005. Nine years of transgenic cotton in México, adoption and resistance management results. *In: Proceedings of the Beltwide Cotton Conference, 4-7 January 2005, New Orleans, Louisiana. National Cotton Council of America, Memphis TN. pp: 1368-1372.*
75. Martínez-Carrillo, J. L., J. J. Pacheco, y A. Hernández. 2002. Manejo integrado de plagas del algodón en el sur de Sonora. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Centro de Investigación Regional del Noroeste, Campo Experimental Valle del Yaqui. Folleto Técnico No. 46. 68 p.

76. Martínez-Carrillo, J. L., L. P. Schouest, Jr., and T. A. Millar. 1991. Responses of populations of the tobacco budworm (Lepidoptera:Noctuidae) from Northwest Mexico to pyrethroids. *J. Econ. Entomol.* 84: 363-366.
77. Matthews, R. W., and J. R. Matthews. 1978. *Insect Behavior*. John Wiley, New York.
78. Medina-Gaud, S., L. F. Martorell y J. Maldonado-Capriles. 2003. Catálogo de los nombres comunes de insectos y acarinos de importancia económica en Puerto Rico. Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez. Estación Experimental Agrícola Río Piedras, Puerto Rico. 149 pp.
79. Méndez, W. A., V. Javier, J. E. Ibarra, J. Cisneros, D. L. Penagos, and T. Williams. 2002. Spinosad and nucleopolyhedrovirus mixtures for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in corn. *Biol. Control* 25: 195-206.
80. Metcalf C. L., W. P. Flint, and R. L. Metcalf. 1962. *Destructive and Useful Insects*. McGraw-Hill, New York.
81. Metcalf, R. L. 1987. Plant volatiles as insect attractants. *CRC Critical reviews in Plant Science* 5: 251-301.
82. Michael F. Whiting. 2002. *Mecoptera* is paraphyletic: multiple genes and phylogeny of *Mecoptera* and *Siphonaptera*. *Zoologica Scripta*. 01: 93-104.
83. Mindell, D. P., and R. L. Honeycut. 1990. Ribosomal RNA in vertebrates: evolution and Phylogenetic applications. *Ann Rev. Ecol. Syst.* 21:541-566.
84. Mitter C, Poole RW and Matthews M .1993. Biosystematics of the *Heliothinae* (Lepidoptera: Noctuidae). *Ann Rev Entomol.* 38: 207-225.
85. Moar, W. J., M. Pustai-Carey, H. van Faasen, D. Bosch, R. Frutos, C. Rang, K. Luo, and M. J. adang. 1995. Development of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac resistance by *Spodoptera exigua* (Lepidoptera. Noctuidae). *Applied. Environ. Microbiol.* 61: 2086-2092.
86. Nei, M. and Kumar S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetic*. Oxford University Press, New York.

87. Neunzig, H. H. 1963. Wild host plants of the corn earworm and the tobacco budworm in eastern North Carolina. *J. Econ. Entomol.* 56: 135-139.
88. Neunzig, H. H. 1969. The biology of the tobacco budworm and the corn earworm in North Carolina: with particular reference to tobacco as a host. *North Carolina Agric. Exp. Stn. Tech. Bulletin* 196.
89. Nho, S., Kim, K. and Lee, J. 2001. Phylogenetic relationships of the wild silkworm, *Bombyx mandarina*, inferred from the ITS-1 region sequences. Kyungpook National University, 1370Sankyuk-dong Puk-Gu, Taegu 702-701, Korea.
90. Omaththage P. Perera, Carlos A. Blanco, Brian E. Scheffler, Craig A. Abel. 2007. Characteristics of 13 polymorphic microsatellite markers in the corn earworm, *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). *Molecular Ecology Notes.* 7 (6): 1132-1134.
91. Parajulee, M. N., J. E. Slosser and E. P. Boring III. 1998. Seasonal activity of *Helicoverpa zea* and *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) detected by pheromone traps in the rolling plains of Texas. *Environ. Entomol.* 27 (5): 1203-1219.
92. Pashley, D. P. 1986. Host associated genetic differentiation in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae): a sibling species complex? *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 79: 898-904.
93. Pashley, D. P., Hammound, A. M., and Hardy, T. N. 1992. Reproductive isolating mechanisms in fall armyworm host strains. *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 85: 400-405.
94. Pashley, D. P., S. J. Johnson, and A. N. Sparks. 1985. Genetic population structure of migratory moths: the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 78: 756-762.
95. Payne J. A. and S. G. Polles. 1974. Pecan: a new host for tobacco budworms and corn earworms. *J. Econ. Entomol.* 67: 295-296.
96. Perlak, J. F., M. Oppenhuizen, K. Gustafson, R. Voth, S. Sivasupramaniam, D. Heering, B. Carey, R. A. Ibrigg, and J. K. Roberts. 2001. Development and commercial use of Bollgard cotton in the USA—early promises versus today's reality. *The Plant J.* 27: 489-501.

97. Qifa H, and Caprio M. A. 2002. Temporal and Spatial Patterns of Allelic Frequencies in Cotton Bollworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Environ. Entomol.* 31 (3): 462-468
98. Quaintance, A. L., and C. T. Brues. 1905. The cotton bollworm. U.S. Dep. Agric. Bureau of Entomol. Bulletin. 50. 155 pp.
99. Rabb, R. L. 1979. Regional research on insect movement: Initial considerations, pp. 2-12. En Rabb R. L. y G. G. Kennedy [eds.], Movement of highly mobile insects: Concepts and methodology in research. University Graphics. North Carolina State University, Raleigh, NC. 465 pp.
100. Rabb, R. L., and G. G. Kennedy. 1979. Movement of Highly Mobile Insects and Methodology in Research. University Graphics, North Carolina State University, Raleigh, NC.
101. Ramaswamy, S. B. 1990. Periodicity of oviposition, feeding, and calling by mated female *Heliothis virescens* in a field cage. *J. Insect Bahav.* 3: 417-442.
102. Raulston, J. R., S. D. Pair, P. D. Lingren, W. H. Hendrix III and T. N. Shaver. 1998. The role of population dynamics in the development of control strategies for adult *Helicoverpa zea* and other Noctuidae. *South. Entomol.* 21: 25-35.
103. Raulston, J. R., S. D. Pair, P. D. Lingren, W. H. Hendrix III and T. N. Shaver. 1998. The role of population dynamics in the development of control strategies for adult *Helicoverpa zea* and other Noctuidae. *South. Entomol.* 21: 25-35.
104. Raulston, J. R., T. J. Henneberry, J. E. Lenggett, D. N. Byrne, E. Grafton-Cardwell, and T. F. Leigh. 1996. Short-and long- range movement of insects and mites, pp. 143-162. In E. G. King, J. R. Phillips. And R. J. Coleman (ed.) Cotton Insects and Mites: Characterization and Management. The Cotton Foundation. Memphis. TN.
105. Raulston, J. R., W. W. Wolf, P. D. Lingreen, and A. N. Sparks. 1982. Migration as a factor in *Heliothis* Management, pp. 61-73. In Proceedings of the International Workshop on *Heliothis* Management, 15-20 November

- 1981, Patancheru, A. P., India. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics.
106. Roach, S. H. 1975. *Heliothis* spp.: larvae and associated parasites and diseases on wild host plants in the Pee Dee area of South Carolina. *Environ. Entomol.* 4: 725-728.
107. Rodríguez, J. C., J. L. Martínez, U. Nava, M. Berdegue, R. Haces, J. M. De la Fuente, N. Díaz, y J. E. Pérez. 2005. *In*: Valdivia E., F. J. Trujillo, y J. Sánchez (eds), Bioseguridad y protección fitosanitaria en la globalización comercial. Universidad Autónoma Chapingo–Colegio de Postgraduados. México. pp: 181-184.
108. Roehrdanz, R.L., Heilmann, L. and Senechal, P. 2007. Alternating tandem array of histone and ribosomal RNA gene blocks in the boll weevil. Biosciences Research Laboratory, USDA, Agricultural Research Service, Red River Valley Agricultural Research Center, 1605 Albrecht Blvd., Fargo, ND 58105, USA.
109. Rummel D. R., J. F. Leser, J. E. Slosser, G. J. Puterka, C. W. Neeb, J. K. Walker, J. H. Benedict, M. D. Heilman, L. N. Namken, J. W. Norman, and J. H. Young. 1986. Cultural control of *Heliothis* spp. in southwestern U.S. Cropping systems. pp. 38-53 *In* S. J. Johnson, E. G. King, and J. R. Bradley, Jr. [eds.], Theory and Tactics of *Heliothis* Population Management. Southern Cooperative Series Bulletin 316.
110. Saitou N. and Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing Phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution.* 4: 406-425.
111. Samuel M, R. M. Barata, M. I. Zucchi, M, DC. Silva-Filho and C. Omoto. 2006. Molecular Variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Populations Associated to corn and cotton Crops in Brazil. *J. Econ. Entomol.* 99 (2): 519-526.
112. Schlotterer, C., M.-T. Hauser, A. V. Haeseler, and T. Tautz. 1994. Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in *Drosophila*. *Molecular Biology and Evolution.* 11: 513-522.

113. Scott K. D., Lange C. L., Scott L. J., and Graham G. C. 2004. Isolation and characterization of microsatellites loci from *Helicoverpa zea* Hubern (Lepidoptera: Noctuidae). *Molecular Ecology Notes*. 1: 243-244.
114. Sims, S. B., and T. B. Stone. 1991. Genetic basis of tobacco budworm resistance to an engineered *Pseudomonas fluorescens* expressing the delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* kurstaki. *J. Invertebr. Pathol.* 57: 206-210.
115. Sivasupramanian, S., L. G. Ruschke, J. A. Osborn, M. E. Oppenhuizen, J. T. Greenplate, and W. J. Mullins. 2005. Bollgard II: improvement in efficacy and spectrum against Lepidoptera pests of cotton. *In: Proceedings of the Beltwide Cotton Conference, 4-7 January 2005, New Orleans, Louisiana. National Cotton Council of America, Memphis TN.* 1302 p.
116. Slosser J. E., J. A. Witz, G. J. Puterka, J. R. Price, and A. W. Hartstack. 1987. Seasonal changes in bollworm (Lepidoptera: Noctuidae) moth catches in pheromone traps in a large area. *Environ. Entomol.* 16: 1296-1301.
117. Stehr, W. F. 1987. *Immature Insects*. Kendall Hunt Publishing Company. Iowa USA. 754 pp.
118. Stinner, R. E., R. L. Rabb and J. R. Bradley. 1977. Natural factors operating in the population dynamics of *Heliothis zea* in North Carolina. *Proc. 15<sup>th</sup> Int. Congr. Entomol.*, Washington, DC, pp. 622-642.
119. Storer, N. P., J. W. Van Duyn and G. G. Kennedy. 2001. Life history traits of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) on non- Bt and Bt transgenic corn hybrids in eastern North Carolina. *J. Econ. Entomol.* 94: 1268-1279.
120. Sudbrink, D. L. Jr. and J. F. Grant. 1995. Wild host plants of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in eastern Tennessee. *Environ. Entomol.* 24: 1080-1085.
121. Tabashnik, B., Y Carrière, T. J. Dennehy, S. Morin, M. S. Sisterson, R. T. Roush, A. M. Shelton, and J. Z. Zhao. 2003. Insect resistance to transgenic Bt crops: lessons from the laboratory and field. *J. Econ. Entomol.* 96: 1031-1038.



122. Takezaki N, Rzhetsky A and Nei M. 2004. Phylogenetic test of the molecular clock and linearized trees. *Molecular Biology and Evolution* 12: 823-833.
123. Tamura K, Dudley J, Nei M and Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
124. Tamura K, Nei M and Kumar S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 101: 11030-11035.
125. Tan S, Chen X, Zhang A, and Li D. 2001. Isolation and characterization of DNA microsatellites from cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*, Hubner). *Molecular Ecology Notes*. 4: 204-2005.
126. Tang. J., Toe, L., Back, C., and Unnasck, T.R., 1996. Intra-specific heterogeneity of the rDNA internal transcribed spacer in the *Simulium damnosum* (Diptera: Simuliidae) complex. *Molecular Biology and Evolution* 13: 244-252.
127. Teran Vargas A. P., J. C. Rodríguez, C. A. Blanco, J. L. Martínez Carrillo, J. Cibrian Tovar, H. Sanchez Arroyo, L. A. Rodríguez del Bosque, and D. Stanley. 2005. Bollgard cotton and resistance of the tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) to conventional insecticides in Southern Tamaulipas, Mexico. *J. Econ. Entomol.* 98: 2203-2209.
128. Vilmar M., Milena W., Vanessad D. B., Jaime V. O., Lidia M. F., and Rodney N. 2008. Molecular Characterization of Host Strains of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Southern Brazil. *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 101(3): 619-626.
129. Vogler, A. P., and R. Desalle. 1994. Evolution and Phylogenetic information content of the ITS-I region in the tiger beetle *Cincindeladorsalis*. *Molecular Biology and Evolution*. 11: 393-405.
130. Wesson, D. M., C. H. Porter, and E H. Collins. 1993. Sequence and secondary structure comparisons of ITS rDNA in mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Molecular Phylogenetic and Evolution*. 1: 253-269.

131. Witz, J. A., A. W. Hartstack, E. G. King, W. A. Dickerson and J. R. Phillips. 1985. Monitoring and prediction of *Heliothis* spp. South. Entomol. 8: 56-70.
132. Wolfenbarger DA, Bodegas VPR and Flores GR. 1981: Development of resistance in *Heliothis* spp. in the Americas, Australia, Africa and Asia. Bull Entomol. Soc. Am. 27: 181-185.
133. Young J. H and R. G. Price. 1977. Overwintering of *Heliothis zea* in southwestern Oklahoma. Environ. Entomol. 6: 627-628.
134. Yu, S. J., S. N. Nguyen, and C. E. Albo-Elghar. 2003. Biochemical characteristics of insecticide resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). Pestic Biochem. Physiol. 77: 1-11.
135. Zalom, F. G., J. T. Trumble, C. G. Summers and N. C. Toscano. 2000. UC IPM Pest Management Guidelines: Tomato. UC ANR Publication 3470.
136. Zalom, F. G., L. T. Wilson and R. Smith. 1983. Oviposition patterns by several Lepidopteros pests on processing tomatoes in California. Environ. Entomol. 12: 1133-1137.
137. Zhao, J. Z., Y. X. Li., H. L. Collins, J. Cao, E. D. Earle, and A. M. Shelton. 2001. Different cross-resistance patterns in the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac. J. Econ. Entomol. 94: 1547-1552.

