

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE BIOTIPOS DE *Spodoptera frugiperda* Smith, (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) UTILIZANDO DIFERENTES METODOLOGÍAS DE EXTRACCIÓN DE DNA

Jesús Alicia Chávez-Medina¹✉, José Cuauhtémoc Ibarra Gámez⁴, Gabriela Lizbeth Flores Zamora¹, Píndaro Álvarez Ruiz¹, Cristino Baruch García-Negroe^{2,3}, Cipriano García Gutiérrez¹, Luciano Castro Espinoza⁴, Marco Antonio Gutiérrez Coronado⁴ y José Luis Martínez-Carrillo⁴.

¹CIIDIR-IPN, Unidad Sinaloa, Juan de Dios Bátiz Paredes No. 250, Guasave, Sinaloa, México. C. P. 81101.

²COBAES, Plantel 13 Lic. Eustaquio Buelna Pérez, El Tajito S/N, Guasave.

³ITSL, carretera Sinaloa de Leyva, Sinaloa, México.

⁴ITSON, 5 de Febrero No. 818 Sur, Centro, Ciudad Obregón, Sonora, México. C. P. 85000.

✉ Autor de correspondencia: jlamarca@gmail.com

RESUMEN. La extracción de ADN ha sido un factor limitante en estudios genéticos que se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y en digestiones del ADN, por lo que es importante utilizar protocolos que permitan obtener cantidades suficientes de ADN con una pureza elevada. En el presente trabajo se evaluaron cinco métodos de extracción de ADN (CTAB, Hidrocloruro de Guanidina, STE, Buffer de lisis y kit Qiagen) a partir del insecto plaga *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), con el objetivo Identificar molecularmente los biotipos de *S. frugiperda* mediante diferentes metodologías de extracción de DNA. Los resultados mostraron que con el método del kit de Qiagen, CTAB y Buffer de lisis, se obtuvo una mejor calidad amplificable del fragmento de 569pb del gen COI del insecto, en comparación con los otros dos métodos evaluados. No se observaron diferencias en los métodos de extracción al momento de realizar la identificación de biotipos mediante el análisis de RFLP-PCR en las muestras digeridas. Mediante este estudio se logró identificar el biotipo de maíz en *S. frugiperda* colectados en campos de maíz en Sinaloa.

Palabras clave: *Spodoptera frugiperda*, RFLP-PCR, Biotipos.

Molecular identification of *Spodoptera frugiperda* Smith, (Lepidoptera: Noctuidae) using different DNA extraction methods

ABSTRACT. DNA extraction has been a limiting factor in genetic studies that rely on polymerase chain reaction (PCR) and DNA digestions, so it is important to use protocols to obtain sufficient amounts of DNA with high purity. In the present work, five methods of DNA extraction (CTAB, H. Guanidine, STE, lysis Buffer and Qiagen kit) were evaluated from the insect pest *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), with the objective of quickly selecting and amplifying DNA fragments by PCR and the identification of biotypes by RFLP-PCR. The results showed that the method of the Qiagen CTAB kit and lysis Buffer obtained a better amplify quality of the 569bp fragment of the COI gene of the insect compared to the other two methods evaluated. No differences were observed in the extraction methods at the time of the identification of biotypes by the analysis of RFLP-PCR in the digested samples. This study identified the biotype of maize in the *S. frugiperda* collected from cornfields in Sinaloa.

Key words: *Spodoptera frugiperda*, RFLP-PCR, Biotyps.

INTRODUCCIÓN

Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) es una de las principales plagas agrícolas en gran parte del hemisferio occidental (López-Edwards *et al.*, 1999). En Brasil, Estados Unidos y México, genera un aumento en los costos de producción especialmente en los cultivos de maíz, arroz y algodón (Nagoshi *et al.*, 2006, 2007, López-Edwards *et al.*, 1999, Busato *et al.*, 2004). Siendo una de las principales plagas del maíz y secundaria en sorgo, algodón, pastos (García *et al.*, 2002) y diversas hortalizas (Andrews, 1980, Busato *et al.*, 2004, Martinelli *et al.*, 2007).

Se han identificado dos biotipos de este insecto plaga que son indistinguibles morfológicamente, pero son reconocidos como posibles nuevas especies (Dres y Mallet, 2002) o razas, de plantas hospederas de maíz y arroz (Pashley, 1998), puesto que se encuentran con mayor frecuencia en ellos. Sin embargo, el biotipo de maíz, también se ha encontrado asociado a cultivos de sorgo y algodón, mientras que el biotipo de arroz a cultivos de arroz y pastizales (Pashley, 1998; Nagoshi y Meagher, 2003a 2004; Pashley *et al.*, 2004). Aun cuando se puedan encontrar diferencias a nivel fisiológico o reproductivo entre los biotipos de *S. frugiperda*, las similitudes morfológicas hacen imposible su identificación (Nagoshi y Meagher, 2003a, b). Sin embargo, se puede realizar utilizando herramientas moleculares como aloenzimas electroforéticas, las esterases (Pashley, 1986), polimorfismos de ADN mitocondrial (Lu y Adang, 1996, Levy *et al.*, 2002, Meagher y Gallo-Meagher 2003, Nagoshi y Meagher 2004, Meagher y Nagoshi 2004, Nagoshi *et al.*, 2006, 2007), RFLP's del gen COI (Lu *et al.*, 1992), AFLP's (Pashley *et al.*, 2004; Clark *et al.*, 2007; Martinelli *et al.*, 2007) y con una región en tandem del ADN nuclear denominada FR (for rice) que produce amplificaciones de alto peso molecular (mayores a 500 pb) en el biotipo de arroz (Lu *et al.*, 1994; Nagoshi y Meagher 2003a, 2004). El uso de los marcadores COI y FR han sido de suma importancia en *S. frugiperda*, ya que no solamente han permitido identificar los biotipos de esta especie, sino que también han servido para el reconocimiento de híbridos entre éstos. Lo cual demuestra, la relevancia que tienen las herramientas moleculares no solo en la identificación de biotipos, si no se pueden encontrar híbridos, con ello se pueden generar diferentes estrategias para mejorar el manejo de este insecto (Nagoshi *et al.*, 2007a).

Una gran cantidad de herramientas moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), han tomado gran importancia en investigaciones con insectos, siendo la extracción de ADN un paso vital e incluso limitante en algunos casos para estudios taxonómicos, genética poblacional y evolutivos (Lagisz *et al.*, 2010). Por estas razones el presente trabajo tiene como objetivo identificar molecularmente biotipos de *S. frugiperda* utilizando diferentes metodologías de extracción de ADN.

MATERIALES Y MÉTODO

Durante el ciclo agrícola 2015-2016, se colectaron larvas del tercer al quinto instar de *S. frugiperda* en los principales campos de maíz de Guasave, Sinaloa. Los insectos preservaron en alcohol al 70 % con el etiquetado correspondiente y almacenados a -20 °C. De la parte posterior de las larvas se realizó la extracción de ADN, utilizando los métodos siguientes: Buffer CTAB, H. Guanidina, STE, Buffer de lysis y kit (Qiagen Inc. Valencia CA). Treinta insectos se utilizaron para cada metodología (Para evaluar la integridad del ADN se realizó una electroforesis horizontal utilizando geles de agarosa al 1 % teñidos con bromuro de etidio. La calidad y concentración de las muestras se verificó mediante un Nanodrop 2000c (Thermoscientific®). Para examinar los datos se utilizó la prueba de Tukey ($P < 0.05$). Con el ADN obtenido, se realizó un PCR convencional para amplificar los genes citocromo oxidasa I – COI con los primers JM76F/COI1483R.

a) Amplificación del gen mitocondrial citocromo oxidasa I – COI. La amplificación por PCR del gen COI se realizó en una mezcla de reacción de 25 µl que contiene: 2.5 µl de buffer de PCR (10X), 1.5 µl de MgCl₂ (50 nM), 0.5 µl de dNTPs, (10 mM) 1µl del primer forward (10 mM), 1µl del primer reverso (10 mM) y 0.5 µl de Taq polimerasa (5u/µl Invitrogen), 17 µl de agua ultrapura (Invitrogen) y 1.0 µl de DNA (50 ng). El programa de amplificación en el termociclador fueron las siguientes: 94 °C (3 min), seguido de 30 ciclos de 94 °C (1 min) 59 °C (1 min), 72 °C (1 min), y un segmento final de extensión de 72 °C por 10 min (My Cyler Termal Cyler, Biorad). La

amplificación del COI se llevó a cabo con el par de cebadores JM76 F (5'GAGCTGAATTAGG (G/A) ACTCCAGG 3') y JM77R (5'ATCACCTCC(A/T) CCTGCAGGATC3') (Sigma Aldrich). Todas las muestras fueron visualizadas en un gel de agarosa al 1 % con 2.0 µl de bromuro de etidio mediante un transiluminador (Chemidoc, Biorad, USA). Para evaluar la calidad de los productos de los diferentes métodos de extracción, los mismos fueron analizados por RFLP-PCR de los genes COI mitocondrial y FR Nuclear de *Spodoptera frugiperda*.

b) RFLP – PCR del gen mitocondrial COI. La identificación de los Biotipos (B. maíz - B. arroz), se realizó mediante la técnica de digestión enzimática de los productos de PCR (RFLP-PCR), la cual permite obtener dos patrones de bandeo, diferenciando así los biotipos de *S. frugiperda*. Para el análisis de restricción de los fragmentos del gen mitocondria COI amplificados por PCR con los oligos universales JM76 F/ JM77 R (569 pb), se utilizó la enzima de restricción Msp I (New England Biolabs, Beverly, MA), para lo cual se usaron las siguientes condiciones, se tomaron 2.0 µL de buffer (10X), 0.5 µL de la enzima Msp I, 3µL del producto de la PCR, se completó con 9.5 µL de agua y se incubó por dos horas. Los fragmentos producto de la restricción fueron separados en geles de agarosa al 2 % por electroforesis a un voltaje de 60 V durante aproximadamente 1:30 h y posteriormente a 80 V hasta completar la separación de los fragmentos. El gel de agarosa fue teñido con una solución de bromuro de etidio, los fragmentos de DNA se visualizaron con luz UV en un transiluminador de imágenes (Chemidoc, Biorad, USA). El perfil electroforético se comparó con los patrones ya existentes en la literatura (Vélez-Arango *et al.*, 2008), como base para la identificación de los biotipos de *S. frugiperda*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En total se analizaron 150 individuos de *S. frugiperda* de los cuales el 100 % de las muestras se logró extraer el DNA de los insectos con los cinco métodos. El tiempo promedio de extracción para el protocolo CTAB fue alrededor de dos horas, una hora para los métodos de kit Qiagen e Hidrocloruro de Guanidina, para el método STE 35 y 20 minutos para buffer de lysis, mientras que el método que se obtuvo mayor concentración de ADN fue el CTAB y con el kit de Qiagen el de menor concentración; cabe señalar que este mismo es el método con mayor costo para la extracción, mientras que el CTAB con el menor costo (Cuadro 1).

Cuadro 1. Comparación de las diferentes metodologías en tiempo de procesamiento, concentración, pureza y costo requerido para la extracción de ADN de *S. frugiperda*.

Método de extracción	Tiempo (hras)	Concentración ng/µL	Pureza 260/280	Costos Pesos
CTAB	2:00	1158.4	1.85	20
Kit Qiagen	1:10	9.25	1.89	105
H. Guanidina	1:05	404	2.13	40
STE	0:35	610	1.37	19
B. lysis	0:20	188.7	1.737	56

Existen diferentes reportes que indican que la metodología del CTAB es de las más eficientes para el aislamiento de ADN en tejido vegetal (Lefort y Doyglas, 1999, González *et al.*, 2004). Sin embargo, para el caso de insectos existen modificaciones en el método debido a la estructura de cada especie, donde los resultados de este trabajo indican que con la metodología del CTAB se

obtuvo una concentración de ADN y pureza de *S. frugiperda* elevada con respecto a extracciones de ADN de chapulines (*Boopeton nubilum*) donde obtuvieron concentraciones de 286 ng/μL y una pureza baja de 1.46 en su relación A_{260}/A_{280} (Torres *et al.*, 2013). Sin embargo, los valores obtenidos en este estudio sobresalen con los reportados por Barragan-Valencia *et al.* (2009), analizaron diferentes especies del genero *Diabrotica* spp. obteniendo cantidades de 827 y 926 ng/μL de ADN, y pureza similar a nuestro estudio de 1.9 A_{260}/A_{280} . Los resultados obtenidos con el buffer STE demuestran gran cantidad de ADN, sin embargo, la pureza de las muestras es más baja. Para el caso del resto de las metodologías en cuanto concentración y pureza resultaron ser menos competitivos confirmando lo reportado por (Acevedo *et al.*, 2007).

En tres de las diferentes metodologías de extracción de ADN (kit de Qiagen, CTAB y Buffer de lysis) se logró amplificar el fragmento de 569 pb del gen mitocondrial COI de *Spodoptera frugiperda* en 100 % de las muestras. No obstante, la mejor calidad del amplificado se observó en las muestras extraídas con el kit comercial aun cuando no se obtuvieron los ADN de mayor concentración, pero sí de muy buena calidad. En los métodos de extracción H. Guanidina y buffer STE, se logró amplificar el 84 y 81 % respectivamente (Fig. 1), aun cuando la metodología de extracción resultó eficiente, con buena concentración y pureza (Cuadro 1), lo anterior nos puede indicar la presencia de impurezas y/o inhibidores en la reacción de PCR, caso que difiere con lo reportado Acevedo *et al.* (2007).

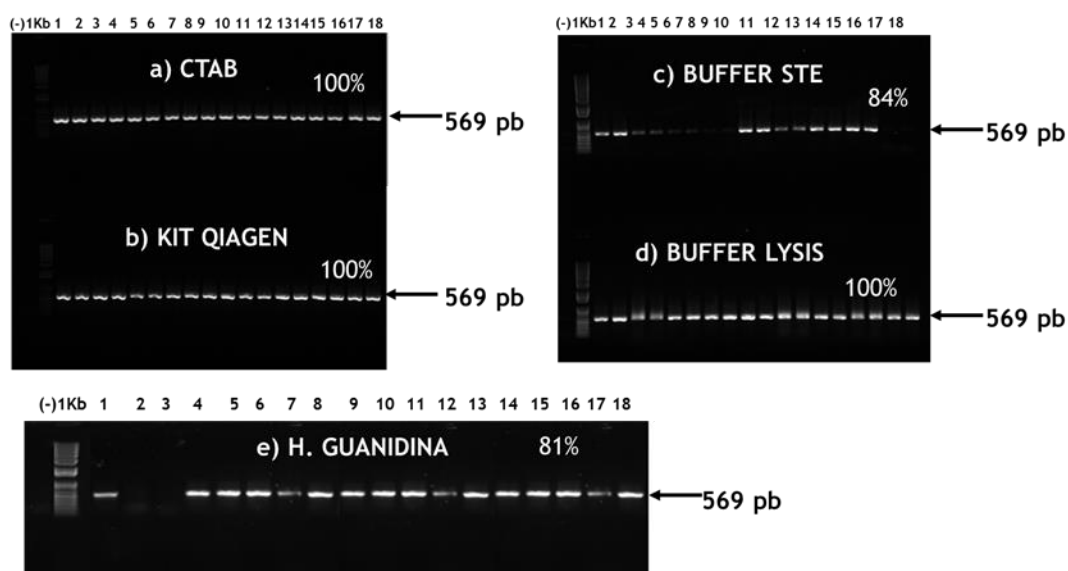


Figura 1. PCR del gen mitocondrial COI de *Spodoptera frugiperda* con los primers JM76-JM77. a) CTAB; b) Qiagen destilada; c) Buffer STE; d) Buffer de lysis; e) Buffer de H. Guanidina.

Para la identificación de biotipos *S. frugiperda*, se obtuvieron resultados positivos con respecto a la digestión en todos los casos, siendo el mismo patrón característico del biotipo maíz para todas las muestras, al observar los fragmentos correspondientes de 497 y 72 pb, este último fragmento de ADN a pesar de ser difícil de detectarlo por ser tan pequeño (Velez-Arango *et al.*, 2008), se logró observar en todas las muestras. No se encontró la presencia del biotipo arroz, por lo tanto, se puede confirmar la presencia del biotipo Maíz en Sinaloa en cultivos de maíz. Estos resultados sobre *S. frugiperda* biotipo Maíz indicaron que son consistentes en su preferencia por la planta hospedera de maíz (Murua *et al.*, 2015); sin embargo, también se ha encontrado este biotipo en cultivos de sorgo y algodón (Nagoshi *et al.*, 2007, Vélez-Arango *et al.*, 2008), para el caso del

biotipo Arroz, se ha reportado preferentemente en cultivos de arroz y en el pasto Bermuda (Pashley, 1986). Cabe mencionar que para este proceso se utilizaron productos amplificados en el PCR y se seleccionan de ser posible las muestras definidas y de concentración más alta, para verificar si existía alguna diferencia en las metodologías de extracción en dichas restricciones de los PCRs, donde no se encontró ninguna diferencia en los resultados obtenidos para ninguna metodología, por lo que se puede asegurar que en todas las muestras en las 5 metodologías distintas se obtuvo el biotipo maíz de *S. frugiperda* (Fig. 2).

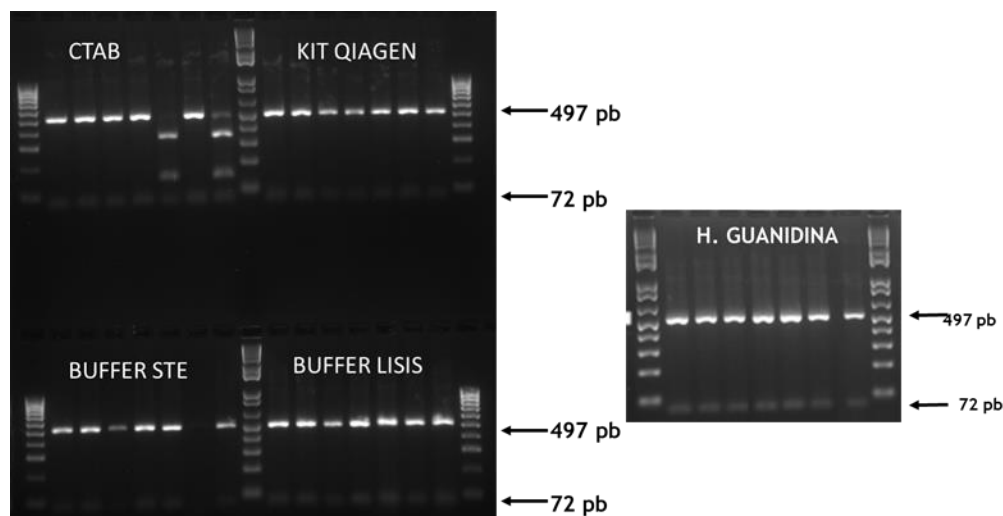


Figura 2. RFLP-PCR del gen mitocondrial COI con la enzima Msp I, utilizando ADNs obtenidos con las diferentes metodologías de extracción de *S. frugiperda*.

CONCLUSIÓN

Los métodos de extracción evaluados permiten obtener cantidades suficientes de ADN para estudios posteriores, debido a que el 100 % de las muestras reflejó presencia del ácido nucleico.

Los resultados mostraron que el método del kit de Qiagen y CTAB y Buffer de lisis, se obtuvieron mejor calidad y cantidad de muestras amplificadas de ADN (100 %), en comparación con los métodos de H. guanidina donde se obtuvo el 81 y 84 % de amplificación.

No se observaron diferencias en las metodologías de extracción al momento de realizar la identificación de biotipos mediante RFLP-PCR en las muestras digeridas.

Se logró identificar el biotipo de Maíz en los insectos colectados en campos de maíz en Sinaloa.

Agradecimientos

Al instituto Politécnico Nacional por su apoyo del proyecto (IPN-Unidad Sinaloa) y al Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON-Obregón Sonora).

Literatura Citada

- Acevedo, B. F. E., Navarro, E., Constantino, C. L. M., Gil, P. Z. y M. P. Benavides. 2007. Método rápido y económico para la extracción de ADN genómico en la broca de café y su uso en PCR. *Cenicafé*, 58(2): 134–141.
- Andrews, K. L. 1980. The whorlworm, *Spodoptera frugiperda*, in Central America and neighboring areas. *Florida Entomologist*, 63: 456–467.
- Barragán-Valencia, G., Almaraz-Abarca, N., Álvarez-Zagoya, R., Delgado-Alvarado, E. A. and J. F. Pérez-Domínguez. 2009. DNA Isolation from *Diabrotica virgifera zea* Krysan and Smith and *Diabrotica*

- virgifera virgifera* LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae) by a CTAB simplified procedure. *Southwestern Entomologist*, 34: 289–294.
- Busato, G. R., Grützmacher, A. D., De Oliveira, A. C., Vieira, E. A., Zimmer, P. D., Kopp, M. M., Bandeira, J. D. M. e M. T. R. 2004. Análise da estrutura e diversidade molecular de populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) associadas às culturas de milho e arroz no Rio Grande do Sul. *Neotropical Entomology*, 33: 709–716.
- Clark, P. L., Molina-Ochoa, J., Martinelli, S., Skoda, S. R., Isenhour, D. J., Lee, D. J., Krumm, J. T. and J. E. Foster. 2007. Population variation of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, in the western hemisphere. *Journal of Insect Science*, 7: 1–10.
- Drés, M. and J. Mallet. 2002. Host races in plant-feeding insects and their importance sympatric speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of Science*, 3 57: 471–492.
- García, F., Mosquera, M., Vargas, C. y L. Rojas. 2002. Control biológico, microbiológico y físico de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) plaga del maíz y otros cultivos en Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*, 28: 53–60.
- González, R. A., Arias, M. D., Valencia, S. and K. Oyama. 2004. Morphological and RAPD análisis of hybridization between *Quercus affinis* and *Q. laurina* (Fagaceae), two mexican red oaks. *American Journal of Botany*, 91 (3): 401–409.
- Lagisz, M., Port, G. and K. Wolff. 2010. A cost-effective, simple and high-throughput method for DNA extraction from insects. *Insect Science*, 17: 465–470.
- Lefort, F. and G. C. Douglas. 1999. An efficient micro-method of DNA isolation from leaves of four hardwood tree species *Acer*, *Fraxinus*, *Prunus* and *Quercus*. *Annals of Forest Science*, 56(3): 549–263.
- López, E. M., Hernández-Mendoza, J., Pescador-Rubio, A., Molina-Ochoa, A., Lezama-Gutierrez, J. R., Hamm, J. J and B. R. Wiseman. 1999. Biological differences between five populations of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) collected from corn in Mexico. *Florida Entomologist*, 82: 254–262.
- Levy, H. C., Garcia-Muruniak, A. and J. E. Muruniak. 2002. Strain identification of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) insects and cell line: PCR-RFLP of cytochrome oxidase C subunit I gene. *Florida Entomologist*, 85: 186–190.
- Lu, Y. J., Kochert, G. D., Isenhour, D. J. and M. J. Adang. 1994. Molecular characterization of a strain-specific repeated DNA sequence in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Insect Molecular Biology*, 3: 123–130.
- Lu Y. J., Adang, M. J., Isenhour, D. J. and G. D. Kochert. 1992. RFLP analysis of genetic variation in North American population of the fall armyworm moth *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Molecular Ecology*, 1: 199–208.
- Lu, Y. and M. J. Adang. 1996. Distinguishing fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) strains using a diagnostic mitochondrial DNA marker. *Florida Entomologist*, 79: 48–55.
- Martinelli, S., Clark, P. L., Zucchi, M. I., Silva-Filho, M. C., Foster, E. J. and C. Omoto. 2007. Genetic structure and molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) collected in maize and cotton fields in Brazil. *Bulletin of Entomological Research*, 93: 225–231.
- Meagher, R. L. and M. Gallo-Meagher. 2003. Identifying host strains of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) in Florida using mitochondrial markers. *Florida Entomologist*, 86: 450–455.
- Meagher, R. L. and R. N. Nagoshi. 2004. Population dynamics and occurrence of *Spodoptera frugiperda* host strains in Southern Florida. *Ecological Entomology*, 29: 614–620.
- Murúa, M. G., Nagoshi, R. N., Dos Santos, D. A., Hay-Roe, M. M., Meagher, R. L. and J. C. Vilardi. 2015. Demonstration using field collections that Argentina fall armyworm population exhibit strain-specific host plant preferences. *Journal of Economical Entomology*, 108: 2305–2315.
- Nagoshi, R. N. and R. Meagher. 2003a. Fall armyworm FR sequences map to sex chromosomes and their distribution in the wild indicate limitations in interstrain mating. *Insect Molecular Biology*, 12: 453–458.

- Nagoshi, R. N. and R. Meagher. 2003b. RF tandem-repeat sequence in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) host strains. *Annals of the Entomological Society of America*, 96: 329–335.
- Nagoshi, R. N. and R. L. Meagher. 2004. Behavior and distribution of the two fall armyworm host strains in Florida. *Florida Entomologist*, 87: 440–449.
- Nagoshi, R. N., Meagher, R. L., Adamczyk, J. J. Jr., Braman, S. K., Brandenburg, R. L. and G. Nuessly. 2006. New restriction fragment length polymorphisms in the cytochrome oxidase i gene facilitate host strain identification of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) populations in the southeastern United States. *Journal of Economic Entomologist*, 99: 671–677.
- Nagoshi, R. N., Silvie, P., Meagher, R. L. Jr., Lopez, J. and V. Machado. 2007. Identification and comparison of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) host strains in Brazil, Texas, and Florida. *Annals of the Entomological Society of America*, 100: 394–402.
- Pashley, D. P. 1986. Host-associated genetic differentiation in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae): a sibling species complex?. *Annals of the Entomological Society of America*, 79: 898–904.
- Pashley, D. P. 1988. The status of fall armyworm host strains. *Florida Entomologist*, 71: 227–234.
- Pashley, D. P., McMichael, M. and J. F. Silvain. 2004. Multilocus genetic analysis of host use, introgression and speciation in host strains of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Annals of Entomological Society of America*, 97(5): 1034–1044.
- Sparks, A. N. 1986. Fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) potential for area-wide management. *Florida Entomologist*, 69: 603–614.
- Vélez-Arango, A. M., Arango, I. R. E., Villanueva, D. M., Aguilera, E. G. and C. I. B. Saldamando. 2008. Identificación de biotipos de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) mediante marcadores mitocondriales y nucleares. *Revista Colombiana de Entomología*, 34: 145–150.