

## CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BIOTIPOS DE *Spodoptera frugiperda* (SMITH, 1797), EN CULTIVOS DE IMPORTANCIA ECONÓMICA EN MÉXICO

Jesús Alicia Chávez-Medina<sup>1</sup>, José Cuauhtémoc Ibarra-Gómez<sup>2</sup>, Gabriela Lizbeth Flores-Zamora<sup>1</sup>, Sandra Pérez-Álvarez, Cipriano García-Gutiérrez, Píndaro Álvarez-Ruiz<sup>1</sup> y José Luis Martínez-Carrillo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>CIIDIR-IPN, Unidad Sinaloa, Juan de Dios Bátiz Paredes No. 250, Guasave, Sinaloa, México CP 81101.

<sup>2</sup>ITSON, 5 de Febrero No. 818 Sur, Centro, Ciudad Obregón, Sonora, México CP 85000.

✉ Autor de correspondencia: jlamarca@gmail.com

**RESUMEN.** *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith, es un insecto que se ha diferenciado genéticamente en dos biotipos denominados “maíz” y “arroz.” Dada la existencia de estos biotipos este estudio se enfocó en realizar una caracterización molecular de los biotipos de *S. frugiperda* presentes en los cultivos de maíz y sorgo en diferentes regiones de México. La identificación se realizó mediante RFLP-PCR y secuenciación del gen COI mitocondrial a partir de larvas colectadas en los estados de Sinaloa, Sonora, Chihuahua, Coahuila y Baja California. Los resultados mostraron que todos los insectos colectados y analizados mediante RFLP-PCR con la enzima *Msp I* y secuenciación, se encuentran dentro del biotipo maíz. Además, se observó que la presencia del biotipo maíz es consistente con la planta hospedera, pero dicha asociación no es absoluta. Se requieren más análisis para poder esclarecer la relación del biotipo con la planta hospedera.

**Palabras clave:** *Spodoptera frugiperda*, RFLP-PCR, Biotipos, *Msp I*

### Molecular characterization of *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) biotypes in crops of Mexico

**ABSTRACT.** *Spodoptera frugiperda* JE Smith, is an insect that has been genetically differentiated into two biotypes called "corn" and "rice." Given the existence of these biotypes, this study focused on carrying out a molecular characterization of the *S. frugiperda* biotypes present in corn and sorghum crops in different regions of Mexico. The identification was made by RFLP-PCR and sequencing of the mitochondrial COI gene from larvae collected in the states of Sinaloa, Sonora, Chihuahua, Coahuila and Baja California. The results showed that all insects collected and analyzed by RFLP-PCR with the *Msp I* enzyme and sequencing were within the maize biotype. Also was observed that the presence of the maize biotype is consistent with the host plant, but this association is not absolute. Further analysis is required to clarify the relationship between the biotype and the host plant.

**Key words:** *Spodoptera frugiperda*, RFLP-PCR, Biotypes, maize, *Msp I*

### INTRODUCCIÓN

*Spodoptera frugiperda* JE (Smith 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) es una de las principales plagas agrícolas en gran parte del hemisferio occidental (López-Edwards *et al.*, 1999). 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) 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).

La identificación de ambos biotipos empleando técnicas moleculares ha sido ampliamente utilizadas en diversos países del continente americano y es particularmente útil en el manejo

integrado de dicha plaga, ya que permite distinguir a las cepas aún después de un periodo de conservación y también permite determinar hábitos ecológicos de las poblaciones y sus mecanismos de aislamiento en diversos hábitats. Así mismo, la identificación de biotipos puede utilizarse como un método de protección de cultivos para el manejo de *S. frugiperda* porque permite definir técnicas de manejo para la resistencia (Meagher y Gallo-Meagher 2003, Prowell *et al.* 2004, Clark *et al.* 2007, Martinelli *et al.*, 2007). México ocupa un lugar preponderante en producción de maíz a nivel mundial., Dicho cultivo es atacado por diversas plagas, siendo *S. frugiperda* la principal y la que causa mayores daños (Blanco *et al.*, 2014). El objetivo de este estudio consistió en la caracterización molecular de biotipos de *S. frugiperda* en cultivos de importancia económica de México mediante RFLP-PCR y secuenciación.

## MATERIALES Y MÉTODO

**Recolección del insecto.** Durante el ciclo agrícola 2015-2017, se colectaron al azar larvas del tercer al quinto instar de *S. frugiperda* en los principales campos de maíz (*Zea mays* L.) y de sorgo (*Sorghum bicolor* L.) de los estados de Sinaloa, Sonora, Chihuahua, Coahuila y Baja California. Los insectos colectados se preservaron en alcohol al 70% con el etiquetado correspondiente y almacenados a -20°C.

**Extracción de ADN.** De la parte posterior y el primer segmento de las larvas se realizó la extracción de ADN, utilizando el método de Buffer CTAB, (Cano-Calle 2015). 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®).

**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 MgCl<sub>2</sub> (50nM), 0.5 µl de dNTPs, (10mM) 1µl del primer forward JM76F (10mM), 1µl del primer reverso JM77R (10mM) y 0.5 µl de *Taq* polimerasa (5u/ µl Invitrogen), 17µl de agua ultrapura (Invitrogen) y 1.0µl de DNA (~50ng). 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 Cycler Termal Cycler, 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 *S. frugiperda*.

**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 2 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 2 horas. Los fragmentos producto de la restricción fueron separados en geles de agarosa al 2% por electroforesis a un voltaje de 60V 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*.

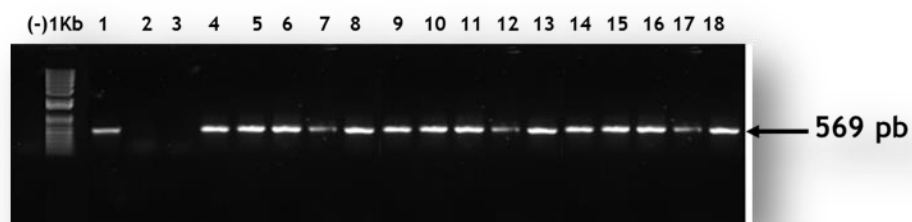
**Secuenciación de los genes amplificados citocromo oxidasa I – COI y la región FR de *S. frugiperda*.** Los productos amplificados fueron purificados mediante el protocolo del kit comercial Gen Clean Kit III (Gibco-BRL), los ADNS fueron enviados a secuenciar al laboratorio de Servicios Genómicos (LANGEBIO) del CINVESTAV-IPN Unidad Irapuato.

**Análisis de secuencias.** Para verificar y comparar genéticamente la identidad de las secuencias amplificadas se realizó un árbol de Neighbor – Joining, donde se observó que las secuencias de referencias del gen COI de *S. frugiperda* obtenidas del GenBank se unan a las secuencias amplificadas en este trabajo, confirmando así la identidad taxonómica del material biológico utilizado en esta investigación. Las secuencias obtenidas fueron editadas manualmente con Bioedit (Hall 1999) y alineadas con el algoritmo Clustal W (Larkin *et al.* 2007, Cheena *et al.* 2003) en el programa Mega 4.0 (Kumar *et al.* 2008). Los árboles de Neighbor - Joining se realizaron para visualizar y comparar la similitud genética entre los biotipos obtenidos y los reportados por otros autores.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En total se colectaron 850 individuos de *S. frugiperda* de campos de maíz y sorgo. 450 en maíz y 125 en sorgo en el estado de Sinaloa., 200 en maíz y 50 de sorgo en Sonora, 50 en maíz en Chihuahua, 30 insectos en Baja California y 20 insectos en Coahuila en maíz en el ciclo agrícola 2016-2017, de los cuales el 97% de las muestras se logró extraer el DNA de los insectos mediante el método de CTAB al 3% (datos no mostrados).

Se logró amplificar el fragmento de 569pb en todas las muestras analizadas del gen mitocondrial COI de *S. frugiperda* con los primers JM76 F/ JM77R en los insectos colectados de los cultivos de maíz y sorgo de los diferentes estados. 125 insectos colectados en maíz y 100 en el cultivo de sorgo en Sinaloa fueron analizadas, 80 muestras de insectos en maíz y 30 en sorgo de Sonora, 30 insectos de maíz de Chihuahua, 30 insectos en maíz de Baja California y 20 insectos en maíz de Coahuila. (Figura 1 y Cuadro 1).



**Figura 1.** Amplificación del gen mitocondrial COI de muestras larvales de *S. frugiperda* obtenidas con el método del de extracción CTAB 3%, mediante PCR con el par de primers JM76 F/ JM77R. Carriles 2-5, insectos colectados en cultivo de maíz de Sinaloa; carril 6-10, insectos colectados en cultivo de maíz de Sonora carriles 11-15 insectos colectados en maíz en Baja California; (-) control negativo (agua); (carril 1) control positivo; carril 1-kb plus, marcador molecular 1-kb plus, DNA ladder de Invitrogen. gel de agarosa al 2%.

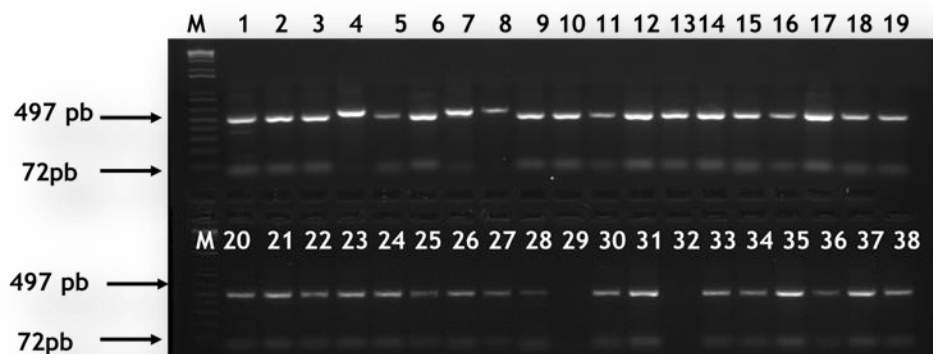
Se obtuvieron resultados positivos con respecto a la digestión en los cultivos de maíz y sorgo de los insectos colectados en los diferentes estados, siendo el mismo patrón característico del biotipo maíz para todas las muestras, al observar los fragmentos correspondientes de 497 y 72pb, este último fragmento de ADN a pesar de ser difícil de detectarlo por ser tan pequeño (Vélez-

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 cultivos de maíz y sorgo en los insectos colectados de los diferentes estados.

En general, los resultados de esta investigación coinciden con los obtenidos por Vélez-Arango *et al.* (2008) y Muria *et al.* (2015), donde ellos encuentran una asociación entre la planta y el hospedero, por lo que el biotipo maíz es principalmente encontrado en cultivo de maíz, seguido por sorgo; sin embargo, es importante tener en cuenta la asociación a la planta huésped en el biotipo de maíz y en el biotipo arroz no es exclusiva, debido a que el biotipo arroz también se puede encontrar en el cultivo de maíz, sorgo y pastos (Cañas-Hoyos *et al.*, 2014). Estos resultados indicaron que *S. frugiperda* biotipo maíz son consistentes en su preferencia por la planta hospedera de maíz (Murua 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) (Cuadro 1 y Figura 3)

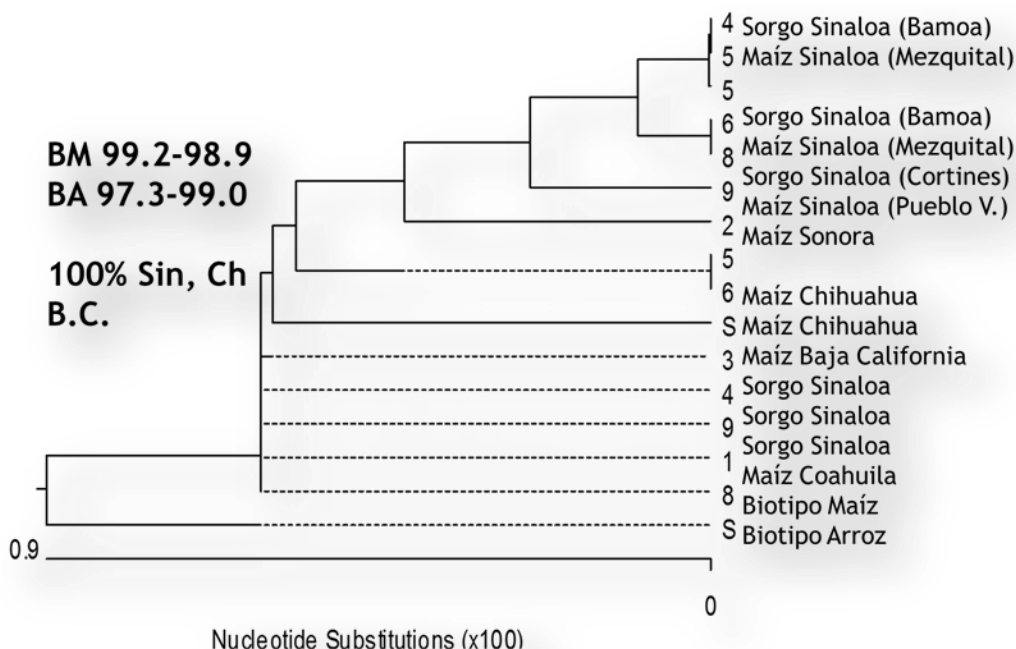
**Cuadro 1.** Biotipos de *S. frugiperda* en plantas de maíz y sorgo en diferentes estados de México

Estado	No. De individuos colectados/ ind. analizados	Cultivo	Identificación mediante restricción con <i>Msp I</i>	
			Biotopo maíz 997-72 (pb)	Biotopo arroz 569 (pb)
Sinaloa	450/125	maíz	122	
	100/30	sorgo	30	0
Sonora	200/80	maíz	80	0
		sorgo	30	0
Chihuahua	50/30	maíz	30	0
Baja california	30/30	maíz	30	0
Coahuila	20/20	maíz	20	0



**Figura 2.** PCR-RFLP del gen COI (569 pb) y sus respectivas digestiones con la enzima *Msp I* (497 pb y 72 pb). Carriles 1-6 insectos en maíz de Sinaloa, carriles 7-12 Muestras de maíz de Sonora; Carriles 13-17 insectos de Chihuahua; carriles 18-23 insectos de maíz en Coahuila, carriles 24-29 insectos de baja california; 30-38 insectos en sorgo de Sinaloa y Sonora., que presentan digestión (biotipo de maíz). M: Marcador de Peso Molecular de 1kb plus (Invitrogen).

Las secuencias obtenidas de 569 pb de los insectos de *S. frugiperda* colectados en los diferentes estados mostraron una similitud del 99.2 al 98.9% con el biotipo Maíz reportado en Estados Unidos y Canadá, y un 97.3 a un 99.0% con el biotipo arroz, observándose una similitud más alta al biotipo maíz en los insectos colectados en Sinaloa y Coahuila (Figura 3)



**Figura 3.** Árbol filogenético construido por el método de alineamiento de secuencias (CLUSTAL W) del gen COI mitocondrial de *S. frugiperda* obtenidos en este trabajo, y reportadas el GenBank por otros investigadores.

## CONCLUSIONES

Mediante RFLP-PCR del gen *COI* se identificó al biotipo maíz en *S. frugiperda* colectados en maíz y sorgo.

Se confirmó la presencia del biotipo maíz en *S. frugiperda* en cultivos de maíz y sorgo en Sinaloa, Sonora, Chihuahua y Baja California observándose una similitud entre 98 - 99.2 % con biotipo maíz comparados con Canadá y EU.

## AGRADECIMIENTOS

Al instituto Politécnico Nacional por su apoyo del proyecto (IPN-Unidad Sinaloa).  
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 Entomol.* 63: 456-467.
- Barragán-Valencia, G., N. Almaraz-Abarca, R. Álvarez-Zagoya, E. A. Delgado-Alvarado, y J. F. Pérez-Domínguez. (2009). DNA Isolation from *Diabrotica virgifera zea* Krysan and Smith y *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae) by a CTAB simplified procedure. *Southwestern Entomologist* 34: 289-294.
- Busato, G. R., A. D. Grützmacher, A. C. De Oliveira, E. A. Vieira, P. D. Zimmer, M. M. Kopp, J. D. M. Bandeira y 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. *Neotrop. Entomol.* 33: 709-716.



- Cañas-Hoyos N., Marquez E. J. y C. I. Saldamndo-Benjumea. 2014. Differentiation of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Corn and Rice Strains from Central Colombia: a Wing Morphometric Approach. *Annals of the Entomological Society of America* 107(3):575-581.
- Clark, P. L., J. Molina-Ochoa, S. Martinelli, S. R. Skoda, D. J. Isenhour, D. J. Lee, J. T. Krumm y 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. y J. Mallet. 2002. Host races in plant-feeding insects and their importance sympatric speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of Science*. 357: 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. *Rev. Colomb Entomol* 28: 53-60.
- González, R.A., M. D. Arias, S. Valencia, y 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.
- Hall. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT.
- Lagisz, M., G. Port y K. Wolff. 2010. A cost-effective, simple and high-throughput method for DNA extraction from insects. *Insect Science* 17: 465-470.
- Lefort, F. y 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; CAB Abstracts.
- López Edwards, M., J. Hernández Mendoza, L. Pescador Rubio, A. Molina Ochoa, J. R. Lezma Gutierrez, Hamm, J.J y 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., A. Garcia-Muruniak 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. *Fla. Entomol*. 85: 186-190.
- Lu, Y. J., G. D. Kochert, D. J. Isenhour y M. J. Adang. 1994. Molecular characterization of a strain-specific repeated DNA sequence in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Insect Mol. Biol.* 3: 123-130.
- Lu Y. J., M. J. Adang, D. J. Isenhour y 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., y M. J. Adang. 1996. Distinguishing fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) strains using a diagnostic mitochondrial DNA marker. *Fla. Entomol*. 79: 48-55.
- Martinelli, S., P. L. Clark, M. I. Zucchi, M. C. Silva-Filho, E. J. Foster, and C. Omoto (2007). Genetic structure and molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) collected in maize and cotton fields in Brazil. *Bull. Entomol. Res.* 93: 225-231.
- Meagher, R. L. y M. Gallo-Meagher. 2003. Identifying host strains of fall armyworm (Lepidoptera\Noctuidae) in Florida using mitochondrial markers. *Fla. Entomol*. 86: 450-455.
- Meagher, R. L. y R. N. Nagoshi. (2004). Population dynamics and occurrence of *Spodoptera frugiperda* host strains in Southern Florida. *Ecol. Entomol*. 29: 614-620.

- Murúa, M. G., R. N. Nagoshi, D. A. Dos Santos, M. M. Hay-Roe, R. L. Meagher y J. C. Vilardi. 2015. Demonstration using field collections that Argentina fall armyworm population exhibit strain-specific host plant preferences. *J. Econ. Entomol.* 108: 2305-2315.
- Nagoshi, R. N. y R. Meagher. 2003a. Fall armyworm FR sequences map to sex chromosomes and their distribution in the wild indicate limitations in inters train mating. *Insect Mol. Biol.* 12: 453-458.
- Nagoshi, R. N. y R. Meagher. 2003b. RF tandem-repeat sequence in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) host strains. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 96: 329-335.
- Nagoshi, R. N. y R. L. Meagher. 2004. Behavior and distribution of the two fall armyworm host strains in Florida. *Fla. Entomol.* 87: 440-449.
- Nagoshi, R. N., R. L. Meagher, J. J. Adamczyk, Jr., S. K. Braman, R. L. Brandenburg y 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. *J. Econ. Entomol.* 99: 671-677.
- Nagoshi, R. N., P. Silvie, R. L. Meagher Jr., J. Lopez y V. Machado. 2007. Identification and comparison of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) host strains in Brazil, Texas, and Florida. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 100: 394-402.
- Pashley, D. P. 1986. Host-associated genetic differentiation in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae): a sibling species complex *Ann. Entomol. Soc. Am.* 79: 898-904.
- Pashley, D. P. 1988. The status of fall armyworm host strains. *Fla Entomol* 71: 227-234.
- Pashley, D. P., McMichael M. y Silvain J. F. 2004. Multilocus genetic analysis of host use, introgression and speciation in host strains of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Annals of Entomological Society of America* 97 (5):34-1044.
- Sparks AN. 1986. Fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) potential for area-wide management. *Florida Entomologist* 69:603-614.
- Vélez-Arango, A. M., R. E. Arango I., D. Villanueva M., E. Aguilera G. y C. I. Saldamando B. 2008. Identificación de biotipos de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) mediante marcadores mitocondriales y nucleares. *Rev. Col. Entomol.* 34: 145-150.