

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



POPULATION VARIABILITY OF *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) IN
MAIZE (POALES: POACEAE) ASSOCIATED WITH THE USE OF CHEMICAL INSECTICIDES

Y

VARIABILIDAD GENÉTICA DE *Heliothis virescens* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) ASOCIADA
CON EL USO DE MAÍZ TRANSGÉNICO

Artículos

Que presenta JOSÉ RICARDO PÉREZ ZUBIRI

como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



POPULATION VARIABILITY OF *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA:
NOCTUIDAE) IN MAIZE (POALES: POACEAE) ASSOCIATED WITH THE USE OF
CHEMICAL INSECTICIDES

Y

VARIABILIDAD GENÉTICA DE *Heliothis virescens* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)
ASOCIADA CON EL USO DE MAÍZ TRANSGÉNICO

Artículos

Que presenta JOSÉ RICARDO PÉREZ ZUBIRI

como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

Una firma manuscrita en tinta negra sobre una línea horizontal.

Dr. Ernesto Cerna Chávez (UAAAN)

Una firma manuscrita en tinta negra sobre una línea horizontal.

Dr. Raúl Rodríguez Herrera (Externo)

Saltillo, Coahuila

Julio 2016

VARIABILIDAD GENÉTICA DE *Spodoptera frugiperda* Y *Heliiothis virescens* (LEPIDOPTERA:
NOCTUIDAE) ASOCIADA CON LA RESISTENCIA A INSECTICIDAS QUÍMICOS Y LA TOXINA
BT

Investigación

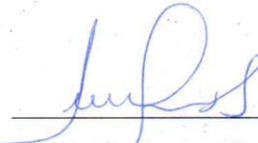
Elaborada por JOSÉ RICARDO PÉREZ ZUBIRI como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA con la supervisión y aprobación del
Comité de Asesoría



Dr. Ernesto Cerna Chávez
Asesor Principal



Dr. Luis Alberto Aguirre Uribe
Asesor



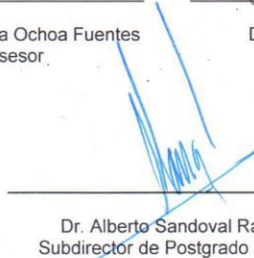
Dr. Jerónimo Landeros Flores
Asesor



Dra. Yisa María Ochoa Fuentes
Asesor



Dr. Raúl Rodríguez Herrera
Asesor



Dr. Alberto Sandoval Rangel
Subdirector de Postgrado UAAAN

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el otorgamiento del apoyo que me permitió realizar y culminar mis estudios de doctorado.

A mi Alma Terra Mater, mi bendita Universidad, a la que regresé al transcurrir de los años, una y otra vez, ansiando nuevos retos y mayores conocimientos. La que me reforzó el cariño por esta bella y noble carrera, y que me brindó siempre solaz, amores y amistades.

A todo el personal del Departamento de Parasitología, pero, muy en especial, a mis profesores, porque todos me han formado, al grado de aspirar a ser como ellos; y alguna vez, leí que el deseo de emular a las personas es el homenaje más sincero y el tributo más humilde, porque sólo se busca imitar a aquel a quien se admira.

Al **Dr. Ernesto Cerna Chávez**, por sus conocimientos, su amistad, su optimismo y su confianza en mí para poder realizar esta investigación. Además, yo le externo mi franco reconocimiento por la magistral dirección de este trabajo.

Al **Dr. Luis Alberto Aguirre Uribe**, como líder y como maestro, por compartir su invaluable experiencia, sus sabios consejos y su guía, y por la permanente confianza y apoyo para con un servidor.

Al **Dr. Jerónimo Landeros Flores**, por su aliento y decidido respaldo en la consecución de los objetivos de este trabajo; y por compartirme y transmitirme en diversos momentos, su gran cariño por esta especialidad y por esta benemérita Institución.

A la **Dra. Yisa María Ochoa Fuentes**, por su entusiasta apoyo para que esta investigación pudiera llegar a buen fin, y por su resuelta solidaridad en el apuntalamiento de la excelencia de este programa de postgrado.

Al **Dr. Raúl Rodríguez Herrera**, por transmitirme su experiencia, abrirme las puertas de su laboratorio y brindarme el apoyo de su equipo de trabajo, aún sin ser yo alumno de la UAdeC, poniendo como única condición que yo dedicara todo mi empeño.

A Isa, Carol, Marisol, Alondra, Aarón, Betty, Sandra, Mariela, y demás amigos y compañeros del lab de Biología Molecular de la UAdeC, por invertir algunas horas de su valioso tiempo para entrenar a este aprendiz.

A mis compañeros y amigos del postgrado en Parasitología Agrícola, que he decidido no nombrarlos uno por uno, pues temo cometer el pecado imperdonable de omitir a alguien. En verdad, los llevo en mi memoria y les estaré agradecido por siempre.

A mis hermanos integrantes y ex-integrantes de la Rondalla Universitaria de la UAAAN, por invitarme a compartir el escenario con ellos nuevamente después de todos estos años, y por seguir manteniendo vigente el espíritu de este que, más que un grupo cultural, es una gran familia.

DEDICATORIA

Con mucho amor...

A mi esposa, **Claudia**, por estar siempre cerca de mí para compartir mis momentos buenos y malos, por ser mi puntal y mi soporte cuando siento que me derrumbo, y por ser el testigo más fiel de mi existencia.

A mis hijos, **Claudia Mariana** y **Ricardo Alexis**, por haber llegado a mí y ser mi más grande testimonio de vida.

A mis padres, **Ana María** y **José Pascual**, por darme el ser y la esencia.

Con profundo cariño y gratitud...

A mi escuela, mi casa, mi segundo hogar... la Narro.

INTRODUCCIÓN

El maíz es el principal cultivo en México, participa con el 18% del valor de producción del sector agrícola y concentra el 33% de la superficie sembrada en el territorio nacional (7.5 millones de hectáreas). Su producción de 2014 en nuestro país fue de 23,273,256 toneladas, por encima de otros cereales como el trigo, sorgo, cebada y avena. Todas las entidades del país presentan algún nivel de producción de maíz, sin embargo, siete entidades concentran el 64.5% del volumen de producción nacional. Sinaloa es el principal productor al concentrar el 16.5% del total. Le siguen en importancia Jalisco, Michoacán, Estado de México, Chiapas, Guerrero y Veracruz. (FND, 2014).

Para la producción de maíz; el ataque por insectos representa uno de los aspectos más importantes de cuidar en su cultivo. Son numerosos los daños de todo tipo producidos por las fases larvarias o adultos de muchos insectos. Su interés es enorme desde el punto de vista económico, incluyendo no solo la pérdida de cosechas sino en los gastos necesarios para su control y prevención, por lo general de tipo químico. No puede olvidarse tampoco, su repercusión social, por la merma en el abastecimiento del alimento de primera necesidad (Rodríguez *et al.*, 2003).

Las aplicaciones de insecticidas convencionales para el control de esta plaga han resultado en el desarrollo de poblaciones altamente resistentes a dichos químicos en varias partes del mundo (Yu *et al.*, 2003, Ahmad and Arif, 2010); además de presentar efectos colaterales como impactos negativos sobre organismos de control biológico endémicos (Romeis *et al.*, 2006). Como alternativa, las plantas genéticamente modificadas (GM) también se consideran una tecnología útil que ha sido ampliamente adoptada desde hace algunos años en algunas regiones por su capacidad para reducir daños a las plantas causados por el ataque de insectos plaga, disminuir el uso de insecticidas (Shelton, 2012), y ser relativamente inocuos contra especies de insectos no blanco (Musser and Shelton, 2003).

En este sentido, los estudios sobre variabilidad genética, estructura poblacional y flujo de genes entre poblaciones de especies agrónomicamente importantes puede proveer información de base para establecer estrategias de MIP (Endersby *et al.*, 2006), y puede contribuir a. monitorear las fases tempranas de la evolución de la resistencia a Bt en el campo (Gahan *et al.*, 2001).

Al diseñar una estrategia exitosa MIP, se deben tomar en cuenta tres factores. Primero, se necesita caracterizar genéticamente la población de interés. Segundo, se deben realizar estudios para examinar los orígenes de posibles biotipos dentro de la población, asociados con diferentes condiciones ambientales. Y tercero, se debe examinar la dinámica de la variabilidad genética de una población a través de las generaciones. Sin embargo, algunos problemas con los métodos de estudio tradicionales es que no son capaces de representar de manera fidedigna el grado de evolución de la resistencia, los factores que influyen en su surgimiento o predecir en una forma apegada a la realidad el comportamiento de esta característica en una población natural de campo, aunque se lograban avances significativos. En este sentido, las pruebas moleculares son de gran utilidad, ya que pueden detectar diferencias genéticas entre individuos de manera directa más que basadas en diferencias fenotípicas observables (Huang, 2006).

Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue estudiar la variabilidad genética de las poblaciones de *S. frugiperda* y *H. virescens* recolectadas en cultivos de maíz bajo diferentes tipos de manejo (incluido maíz transgénico), utilizando marcadores moleculares tipo ISSR.

REFERENCIAS CITADAS

- Ahmad, M. and Arif M. I. 2010. Resistance of beet armyworm *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) to endosulfan, organophosphorus and pyrethroid insecticides in Pakistan. *Crop Protection*. 29: 1428 - 1433.
- Endersby N. M., S. W. McKechnie, P. M. Ridland, and A. R. Weeks. 2006. Microsatellites reveal a lack of structure in Australian populations of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *Molecular Ecology* 15(1):107-118.
- FND (Financiera Nacional de Desarrollo Agropecuario, Rural, Forestal y Pesquero). [http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Panoramas/Panorama%20Ma%C3%ADz%20\(may%202014\).pdf](http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Panoramas/Panorama%20Ma%C3%ADz%20(may%202014).pdf)
- Gahan L. J., F. Gould, and D. G. Heckel. 2001. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science* 293: 857-860.
- Huang F.. 2006. Detection and monitoring of insect resistance to transgenic Bt crops. *Insect Science* 13: 73-84.
- Musser, F. R., and A. M. Shelton. 2003. Bt sweet corn and selective insecticides: impacts on pests and predators. *J. Econ. Entomol.* 96: 71-80.
- Rodríguez F. E., R. Zumalacárregui, C. A. Otero, S. A. Calleja, C. F. De La Fuente. 2003. Lo que ud.debe saber sobre los alimentos transgénicos (y organismos manipulados genéticamente) Cartilla de divulgación. Edición Caja España. 69 Pág.
- Romeis, J., M. Meissle and F. Bigler. 2006. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. *Nature Biotechnology*. Vol. 24. pp. 63 - 71.

- Shelton A. M. 2012. Genetically engineered vegetables expressing proteins from *Bacillus thuringiensis* for insect resistance: Successes, disappointments, challenges and ways to move forward. *GM Crops and Food: Biotechnology in Agriculture and the Food Chain* 3: 175-183.

- Yu S. J., S. N. Nguyen, and G. E. Abo-Elghar. 2003. Biochemical characteristics of insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 77(1): 1 - 11.

ARTÍCULO

Population variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in maize
(Poales: Poaceae) associated with the use of chemical insecticides.

2016 — Florida Entomologist — Volume 99, No. 2

Florida Entomologist

[HOME](#) [ABOUT](#) [USER HOME](#) [SEARCH](#) [CURRENT](#) [ARCHIVES](#) [FLORIDA ONLINE JOURNALS HOME](#)

Home > User > Author > **Archive**

Archive

ACTIVE **ARCHIVE**

<u>ID</u>	<u>MM-DD SUBMIT</u>	<u>SEC</u>	<u>AUTHORS</u>	<u>TITLE</u>	<u>STATUS</u>
87230	11-17	ResPap	aguirre-uribe, Hernández-Juárez,...	EVALUATION OF FOLIAR DAMAGE BY SPODOPTERA FRUGIPERDA...	Vol. 99, No. 2 (June 2016)
84417	03-26	ResPap	Aguirre-Uribe, Hernandez, Flores,...	GENETICALLY MODIFIED MAIZE RESISTANT TO CORN EARWORM...	Vol. 98, No. 3 (September 2015)
84823	06-19	SciNote	perez-zubiri, cerna- chavez,...	POPULATION VARIABILITY OF SPODOPTERA FRUGIPERDA...	Archived
87142	10-16	SciNote	aguirre-uribe	POPULATION VARIABILITY OF SPODOPTERA FRUGIPERDA...	Vol. 99, No. 2 (June 2016)

1 - 4 of 4 Items

Start a New Submission

[CLICK HERE](#) to go to step one of the five-step submission process.

ISSN: 1938-5102

JOURNAL CONTENT

Search

All

Browse

- [By Issue](#)
- [By Author](#)
- [By Title](#)
- [Other Journals](#)

USER

You are logged in as...

luisaguirre

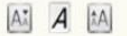
- [My Journals](#)
- [My Profile](#)
- [Log Out](#)

AUTHOR

Submissions

- [Active \(0\)](#)
- [Archive \(4\)](#)
- [New Submission](#)

FONT SIZE



[Journal Help](#)

Florida Entomologist



[HOME](#) [ABOUT](#) [USER HOME](#) [SEARCH](#) [CURRENT](#) [ARCHIVES](#) [FLORIDA ONLINE JOURNALS HOME](#)

[Home](#) > [User](#) > [Author](#) > [Submissions](#) > #87142 > **Summary**

#87142 Summary

[SUMMARY](#) [REVIEW](#) [EDITING](#)

Submission

Authors	luis alberto aguirre-uribe
Title	Population variability of <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lepidoptera: Noctuidae) in maize associated with the use of chemical insecticides
Original file	87142-109812-2-SM.DOCX 2015-10-16
Supp. files	None
Submitter	keco luis alberto aguirre-uribe 
Date submitted	October 16, 2015 - 02:17 PM
Section	Scientific Notes
Editor	John Capinera  Steven Valles 
Abstract Views	0

Status

Status	Published Vol. 99, No. 2 (June 2016)
Initiated	2016-03-29
Last modified	2016-03-29

JOURNAL CONTENT

Search

All

Browse

- [By Issue](#)
- [By Author](#)
- [By Title](#)
- [Other Journals](#)

USER

You are logged in as...

luisaguirre

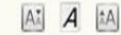
- [My Journals](#)
- [My Profile](#)
- [Log Out](#)

AUTHOR

Submissions

- [Active \(0\)](#)
- [Archive \(4\)](#)
- [New Submission](#)

FONT SIZE



[Journal Help](#)

Population variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in maize (Poales: Poaceae) associated with the use of chemical insecticides

Jose Ricardo Perez-Zubiri¹, Ernesto Cerna-Chavez¹, Luis Alberto Aguirre-Uribe^{1,*}, Jeronimo Landeros-Flores¹, Marvin K Harris², and Raul Rodriguez-Herrera³

The fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* Smith & Abbot (Lepidoptera: Noctuidae), is a major pest in the western hemisphere, capable of causing substantial damage to corn, sorghum, fodder, grass, rice, cotton, and peanut crops (Nagoshi & Meagher 2004). Approximately 3,000 tons of active ingredient per year are used to control this single pest (Blanco et al. 2014). In several regions of the world, insecticide overuse has resulted in the development of populations highly resistant to these chemicals (Yu et al. 2003; Ahmad & Arif 2010). Consequently, collateral effects such as negative impacts on biological control organisms also occur (Romeis et al. 2006).

Populations of the fall armyworm have been studied in various environments that show various factors can affect their level of resistance to insecticides. Population monitoring of the fall armyworm resistance status has shown that management strategies can minimize the environmental impact of insecticide use (Zenner de Polanía et al. 2007). Insects have demonstrated great genetic plasticity, with more than 500 species now resistant to one or more insecticides (McGaughey 1985; Ferré & Van Rie 2002). In designing resistance management strategies for *S. frugiperda*, we must take into account a few factors. First, we need to genetically characterize the population of interest. Second, studies should be conducted to examine the origins of possible biotypes within the population associated with certain environmental conditions. Third, we need to examine the dynamics of a population's genetic variability through generations.

Molecular markers have become a powerful tool to evaluate the degree of genetic variation in a given population with respect to a given factor over the years. Several types of relevant molecular markers have been identified in insect populations (Batley et al. 2004; Clark et al. 2007; Martinelli et al. 2007; Lindroth 2011), including the inter-simple sequence repeats (ISSR). The ISSR (Zietkiewicz et al. 1994) is a molecular marker that uses microsatellites as primers to amplify multiple loci, mainly repeated nucleotide sequences of several sizes. Some advantages of these types of molecular markers include high reproducibility, acceptable cost, no need for previous sequence information, and high polymorphism (Semagn et al. 2006). The objective of our research was to study the genetic variability of *S. frugiperda* in maize (Poales: Poaceae) from México under various crop management strategies using ISSR molecular markers.

Maize fields in localities of Coahuila, Durango, Jalisco, and Sinaloa states that differed in their pest management strategies

were selected, and the results of larval testing were used to compare and contrast the impact of management strategies on the genetic variability. The locations from where *S. frugiperda* populations were collected and the pest management tactics utilized are shown in Fig. 1. A modified protocol of Doyle & Doyle (1991) was used for DNA extraction from the cut mid-section of every selected larva. Polymerase chain reaction (PCR) analysis was performed using ISSR molecular markers. All PCR products were separated on 1% agarose gels for 1.3 h at 65 V. The gels were viewed and photographed under UV illumination and images digitalized in a UVP Mini Darkroom. Amplified bands from every individual were put in a single absence–presence matrix for data organization. Analysis of molecular variance (AMOVA) was carried out using the InfoGen version 2014 statistical software (Balzarini & Di Rienzo 2014). In addition to genetic diversity, Nei's unbiased heterozygosity, mean allele number, and the number of effective alleles were obtained. Data were analyzed to obtain frequency dendrograms.

The results of PCR analysis using ISSR molecular markers produced a total of 105 bands or loci, of which 92.59% were polymorphic and provided enough information to group populations into several nodes. Results from AMOVA (Table 1) show that *P*-values were small ($P = 0.0175$ and 0.0075) and genetic variability was greater within populations (96.27%) than among populations (3.73%). These data indicate that the collected populations were essentially panmictic, and there was little genetic differentiation among them, further suggesting that there was high gene flow among the populations. However, the ISSR molecular markers showed a great number of polymorphic loci, which supported placement of populations in separate groups. This genetic plasticity in *S. frugiperda* was noted in other studies using amplified fragment length polymorphism–type molecular markers for investigation of *S. frugiperda* population genetic structure (Martinelli et al. 2007; Lobo-Hernández & Saldamando-Benjumea 2012). Other workers on genetic variability in *S. frugiperda* and other widely distributed species reported that greater variability occurs within than between populations (Clark et al. 2007; Roux et al. 2007; Fuentes-Contreras et al. 2008), which agrees with results found in our research.

The dendrogram (Fig. 2) shows the formation of 4 groups, each containing between 1 and 3 populations (POP): group 1 (POP 1); group 2 (POP 2 and POP 3); group 3 (POP 4, POP 5, and POP 6), and

¹ Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Blvd. Antonio Narro s/n Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

² Texas A&M University, Department of Entomology, College Station, Texas, USA

³ Universidad Autónoma de Coahuila, Blvd. Venustiano Carranza s/n Col., República Oriente, Saltillo, Coahuila, México

*Corresponding author; E-mail: luisaguirreu@yahoo.com.mx

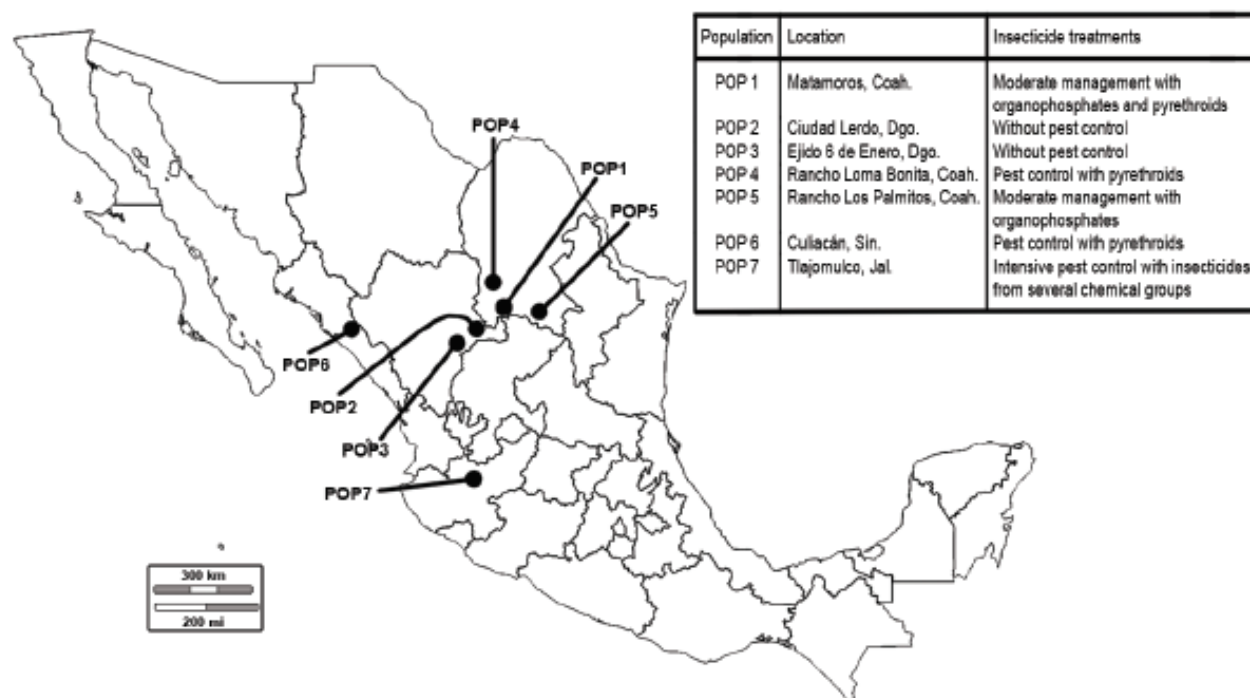


Fig. 1. *Spodoptera frugiperda* populations in cultivated maize in various parts of Mexico from which larvae were collected to study molecular genetic variation.

group 4 (POP 7). Population 7 had a genetic composition significantly different from other populations in this study. Population 3 was collected from a maize crop without insect control, whereas population 7 was collected from a corn crop where insecticides of various toxicological groups from organophosphates to some relatively new materials, such as neonicotinoids, had intensively been used for years (INIFAP 2007).

This insecticide use may not be completely responsible for all of the genetic differences observed in population 7, although reports on other Lepidoptera exposed to continuous insecticide exposures show similar genetic changes (Endersby et al. 2006; Franck et al. 2007). Population 4 (Rancho Loma Bonita, Coahuila) and population 6 (Culiacán, Sinaloa) were collected on crops with intensive use of pyrethroid insecticides for pest control, and both populations were sorted into the same group. These management differences suggest that populations intensively exposed to insecticides are more genetically diverse; such variability suggests that chemical treatment affects population allele diversity, which has also been shown previously (Franck et al. 2007). The herein used ISSR molecular markers provide new tools to investigate complex resistance problems under field conditions, and finer-grained interpretations of results using them are expected as larger databases become available.

Summary

The objective of this research was to determine the genetic variability of *Spodoptera frugiperda* Smith & Abbot (Lepidoptera: Noctuidae) larvae from populations collected on maize (Poales: Poaceae) crops from several locations (Sinaloa, Jalisco, Coahuila, and Durango) in Mexico grown under various types of pest management using inter-simple sequence repeats (ISSR) type molecular markers. These ISSR markers amplified 105 loci, with 92.59% being polymorphic, which genetically characterized these populations and related this variability with factors such as pest control management. The most divergent population was from Tlajomulco, Jalisco. This location had the most intense use of chemical insecticides with diverse modes of action, which may account for much of the difference in genetic variability observed among sites in this study.

Key Words: ISSR; genetic flow; insecticide

Sumario

El objetivo de esta investigación fue estudiar la variabilidad genética de gusano soldado *Spodoptera frugiperda* Smith & Abbot (Lepidoptera: Noctuidae) a partir de larvas de poblaciones recolectadas en

Table 1. Analysis of molecular variance (AMOVA) for genetic variability in *Spodoptera frugiperda* populations using 3 inter-simple sequence repeat (ISSR) molecular markers.

Variability source	Sum of squares	df	Mean square	P-value	No. of iterations	Variability composition	Variability (%)
Between	22.10	6	3.68	0.0175	400	0.09	3.73
Within	227.47	98	2.32	0.0075	400	2.32	96.27
Total	249.56	104	2.40	—	—	2.41	100.00

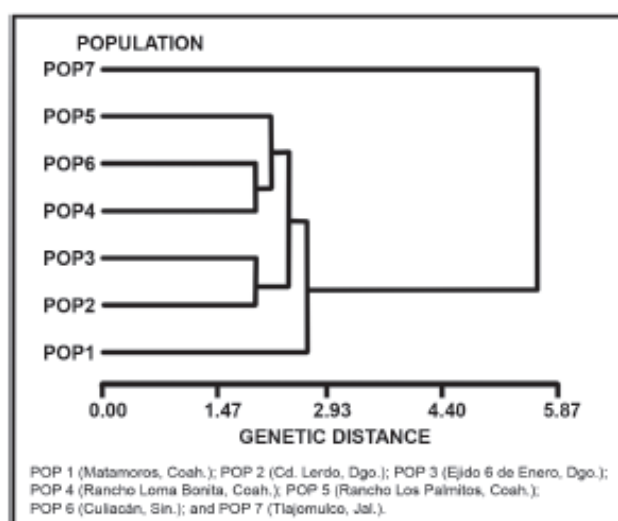


Fig. 2. Dendrogram of genetic distance among *Spodoptera frugiperda* populations analyzed using ISSR molecular markers.

cultivos de maíz (Poales: Poaceae) de distintas localidades (Sinaloa, Jalisco, Coahuila y Durango) de México bajo diferentes tipos de manejo del cultivo, utilizando marcadores moleculares tipo ISSR. Estos marcadores amplificaron un total de 105 loci, de los siendo el 92.59% polimórficos, lo cual permitió caracterizar las poblaciones genéticamente y relacionar esta variabilidad con factores como estrategias de control de la plaga. La población más diferenciada, población 7, fue la de Tlajomulco, Jalisco; la localidad con un uso más intensivo de insecticidas químicos con diversos modos de acción, lo que puede explicar gran parte de las diferencias de variabilidad genética observada entre sitios en este estudio.

Palabras Clave: ISSR; flujo genético; insecticidas

References Cited

- Ahmad M, Arif MI. 2010. Resistance of beet armyworm *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) to endosulfan, organophosphorus and pyrethroid insecticides in Pakistan. *Crop Protection* 29: 1428–1433.
- Balzarini MG, Di Rienzo JA. 2014. InfoGen versión 2014. FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.info-gen.com.ar> (last accessed 14 Mar 2016).
- Batley JK, Edwards J, Barker JHA, Dawson KJ, Wiltshire CW, Glen DM, Karp A. 2004. Population structure of the beetle pests *Phyllodecta vulgatissima* and *P. vitellinae* on UK willow plantations. *Insect Molecular Biology* 13: 413–421.
- Blanco CA, Pellegaud JG, Nava-Camberos U, Lugo-Barrera D, Vega-Aquino P, Coello J, Terán-Vargas AP, Vargas-Campis J. 2014. Maize pests in Mexico and challenges for the adoption of an integrated pest management program. *Journal of Integrated Pest Management* 5(4): 1–9.
- Clark PL, Molina-Ochoa J, Martinelli S, Skoda SR, Isehour DJ, Lee DJ, Krumm JT, Foster JE. 2007. Population variation of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, in the western hemisphere. *Journal of Insect Science* 7: article 5.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin* 19: 11–15.
- Endersby NM, McKechnie SW, Ridland PM, Weeks AR. 2006. Microsatellites reveal a lack of structure in Australian populations of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *Molecular Ecology* 15: 107–118.
- Ferré J, Van Rie J. 2002. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology* 47: 501–533.
- Franck P, Reyes M, Olivares J, Sauphanor B. 2007. Genetic architecture in codling moth populations: comparison between microsatellite and insecticide resistance markers. *Molecular Ecology* 16: 3554–3564.
- Fuentes-Contreras E, Espinoza JL, Lavandero B, Ramírez CC. 2008. Population genetic structure of codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) from apple orchards in Central Chile. *Journal of Economic Entomology* 101: 190–198.
- INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agrícolas y Pecuarias). 2007. Paquetes tecnológicos para maíz de temporal (ciclo Agrícola primavera-verano) para condiciones de alto, medio y bajo potencial productivo. INIFAP, México D.F.
- Lindroth EJ. 2011. Population genetics of the western bean cutworm (*Striacosta albicosta* Smith) across the United States. Ph.D. thesis. University of Nebraska, Lincoln, Nebraska.
- Lobo-Hernández MI, Saldamando-Benjumea CI. 2012. Molecular characterization and genetic differentiation of *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae) in maize, rice, and cotton fields of Colombia with AFLP. *Southwestern Entomologist* 37: 193–207.
- Martinelli S, Clark PL, Zucchi MI, Silva-Filho MC, Foster JE, Omoto C. 2007. Genetic structure and molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) collected in maize and cotton fields in Brazil. *Bulletin of Entomological Research* 97: 225–231.
- McGaughey WH. 1985. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science* 229: 193–195.
- Nagoshi RN, Meagher RL. 2004. Behavior and distribution of the two fall armyworm host strains in Florida. *Florida Entomologist* 87: 440–448.
- Romeis J, Meissle M, Bigler F. 2006. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. *Nature Biotechnology* 24: 63–71.
- Roux O, Gevrey L, Arvanitakis L, Gers C, Bordat D, Legal L. 2007. ISSR-PCR: tool for discrimination and genetic structure analysis of *Plutella xylostella* populations native to different geographical areas. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43: 240–250.
- Semagn K, Björnstad Å, Ndjioudjop MN. 2006. Review: an overview of molecular marker methods for plants. *African Journal of Biotechnology* 5: 2540–2568.
- Yu SJ, Nguyen SN, Abo-Elghar GE. 2003. Biochemical characteristics of insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 77: 1–11.
- Zenner de Polanía I, Arévalo HA, Mejía R. 2007. El gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) y algunas plantas transgénicas. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* 1: 103–113.
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (ssr)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176–183.

ARTÍCULO

Variabilidad genética de *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) asociada con el uso de maíz transgénico.

Enviado a la Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas (Febrero, 2016)

VARIABILIDAD GENÉTICA DE *Heliothis virescens* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

ASOCIADA CON EL USO DE MAÍZ TRANSGÉNICO

GENETIC VARIABILITY OF *Heliothis virescens* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

ASSOCIATED WITH THE USE OF TRANSGENIC CORN CROP

José Ricardo Pérez Zubiri¹, Ernesto Cerna Chávez², Luis Alberto Aguirre Uribe², Jerónimo Landeros Flores², Yisa María Ochoa Fuentes² y Raúl Rodríguez Herrera³

¹Estudiante de posgrado. Doctorado en Ciencias en Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila. C.P. 25315, Tel y Fax. 844 4110226. ²Departamento de Parasitología, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila. C.P. 25315, Tel y Fax. 844 4110226.* Autor para correspondencia: yisa8a@yahoo.com, ³Universidad Autónoma de Coahuila. Facultad de Ciencias Químicas. Blvd. Venustiano Carranza s/n Col. República Oriente. Saltillo, Coahuila. C.P. 25280. México.

RESUMEN

Los cultivos transgénicos capaces de expresar las proteínas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) están siendo usados ampliamente contra plagas de lepidópteros en el mundo. Varios estudios han demostrado la capacidad de las especies de insectos blanco para desarrollar resistencia a estas toxinas, lo cuál es una continua preocupación que amenazaría el uso a largo plazo de estos cultivos. Aunque se ha encontrado que la resistencia a la toxina Bt en los insectos tiene una base genética, pocos estudios se han hecho en el país acerca de la variabilidad genética de poblaciones expuestas a Bt. Por tanto, el objetivo de esta investigación fue estudiar la variabilidad genética de poblaciones *Heliothis virescens* en México a partir de larvas recolectadas en cultivos de maíz de distintas localidades (Sinaloa, Jalisco y Coahuila) y bajo diferentes tipos de manejo del cultivo, y compararlas con poblaciones recolectadas en huertos de maíz transgénico en Coahuila, utilizando marcadores moleculares tipo ISSR. Se observó que la

variación genética es mayor dentro de las poblaciones (95.24 %) que entre poblaciones (4.76 %), indicativo de una tasa elevada de intercambio genético entre ellas. Sin embargo, se pudo apreciar al construir el dendograma que la población expuesta a Bt se agrupó aparte de las demás. Esto puede deberse a la pérdida de alelos derivada de la constante presión de selección ocasionada por el uso del material transgénico. Esta información puede dar la pauta para establecer o modificar medidas para manejo de poblaciones resistentes.

PALABRAS CLAVE:

Heliothis virescens, ISSR, maíz, transgénico.

ABSTRACT:

Genetically modified (GM) crops able to express proteins from *Bacillus thuringiensis* (Bt) are being used widely against Lepidopteran pests around the world. Several studies have shown the ability of target insect species to develop resistance to these toxins, which is a continuous concern that would threaten the long-term use of these crops. Although it has been found that resistance to the Bt-toxin in insects has a genetic basis, few studies about the genetic variability of populations exposed to Bt have been made in Mexico. Therefore, the objective of this research was to assess the genetic variability of *Heliothis virescens* populations from larvae collected in corn crops from different locations (Sinaloa, Jalisco and Coahuila), under different types of crop management, and compare them with populations collected from transgenic corn crops in Coahuila, through the use of ISSR molecular markers. It was observed that genetic variation is greater within populations (95.24%) than among populations (4.76%), this is indicative of a high rate of genetic exchange. However, after constructing the dendrogram it was noted that the population exposed to Bt was grouped apart from the others. This may be due to the loss of alleles caused by the constant selection pressure by the use of the GM crop. This information may be useful to establish or modify management strategies to control resistant populations.

KEY WORDS:

Heliothis virescens, ISSR, maize, transgenic.

El gusano de la yema o cogollero del tabaco, *Heliothis virescens* (Fabricius) es una de las plagas más voraces y devastadoras en varios cultivos agrícolas en el hemisferio occidental (Molina-Ochoa *et al.*, 2010). Los insecticidas químicos han sido ampliamente utilizados para proteger a los cultivos de esta especie por más de 60 años, ocasionando que se haya asociado su uso con aspectos de resistencia y problemas de control en campo (Terán-Vargas *et al.*, 2005; Blanco *et al.*, 2009). Una alternativa para su control es el uso de plantas transgénicas. La mayoría de las plantas transgénicas Bt desarrolladas a la fecha producen toxinas Cry constitutivamente, confiriéndoles tolerancia al ataque de plagas de insectos sin afectar a insectos benéficos u otros vertebrados (Betz *et al.*, 2000). Una de las principales preocupaciones en relación al uso de estas plantas es el potencial de los insectos plaga para desarrollar resistencia debido a la intensa presión de selección (De Maagd *et al.*, 1999).

Aunque se ha comprobado en laboratorio que *H. virescens* tiene el potencial genético para desarrollar resistencia incluso cruzada a diferentes toxinas Cry (Gould *et al.*, 1995; Jurat-Fuentes *et al.*, 2003), actualmente la mayoría de las poblaciones de campo permanece susceptible (Blanco *et al.*, 2009; Tabashnik *et al.*, 2009). Por estudios recientes, se sabe que la resistencia a estas toxinas en algunas poblaciones involucra alteraciones y mutaciones en los genes encargados de codificar la formación de los receptores de la membrana del intestino medio (Gassmann *et al.*, 2009). Por esta razón, los estudios sobre variabilidad genética, estructura poblacional y flujo de genes entre poblaciones de especies agrónomicamente importantes puede proveer información de base para establecer estrategias de MIP (Endersby *et al.*, 2006), y puede contribuir a monitorear las fases tempranas de la evolución de la resistencia a Bt en el campo (Gahan *et al.*, 2001).

En este sentido, las pruebas moleculares son de gran utilidad, ya que pueden detectar diferencias genéticas entre individuos de manera directa más que basadas en diferencias fenotípicas observables (Huang, 2006). ISSR es una técnica basada en PCR en la cual secuencias de repeticiones simples son usadas como primers para amplificar las regiones entre estas secuencias (Zietkiewicz *et al.*, 1994), y es muy utilizada en áreas de estudio sobre diversidad genética y estudios de biología de la evolución en un amplio rango de especies (Agrawal & Shrivastava, 2014); algunas de sus ventajas son: alta reproducibilidad, costo aceptable, no se necesita información previa de la secuencia nucleotídica y alto polimorfismo (Semagn *et al.*, 2006). Por lo anterior, uno de los objetivos de esta investigación fue estudiar la variabilidad genética de las poblaciones de *H. virescens* a partir recolectadas en cultivos de maíz bajo diferentes tipos de manejo (incluido maíz transgénico), utilizando marcadores moleculares tipo ISSR.

A este efecto, se visitaron áreas de cultivo de maíz en diferentes puntos de los estados de Coahuila,

Jalisco y Sinaloa, donde se recolectaron larvas, que fueron colocadas en frascos con alcohol al 70% y debidamente rotulados, para ser llevadas al laboratorio donde fueron identificadas usando claves taxonómicas (Stehr, 2005). Los sitios de colecta fueron seleccionados en función a sus estrategias de manejo, y siempre y cuando fuera posible recolectar más de 15 individuos. Los datos de las poblaciones son los siguientes: 1 (Matamoros, Coahuila; maíz para forraje, sin manejo de plagas), 6 (Culiacán, Sinaloa; maíz para consumo humano, manejo intensivo con piretroides), y 7 (Tlajomulco, Jalisco; maíz para semilla para siembra, manejo intensivo con plaguicidas de grupos toxicológicos diversos), y una población expuesta a maíz transgénico de San Pedro, Coahuila, recolectada en 2011 (Trans).

Una vez obtenido el material biológico de las diferentes localidades, se procedió a la extracción de ADN usando un protocolo de Doyle & Doyle modificado (1987); para esto, se utilizó la sección media de cada larva recolectada (aprox. 0.1 g). Se utilizó, el ADN de individuos de los individuos de *H. virescens* de la población de maíz transgénico de Coahuila. Posteriormente, a

cada muestra se le realizó una prueba de PCR, para amplificar las regiones complementarias de ADN que se unen a los marcadores moleculares tipo ISSR. Los productos de PCR fueron cargados en geles de agarosa al 1 %. Después de 1 h 20 m en cámara de electroforesis a 65 V, se tomaron imágenes de los geles bajo iluminación UV, y estas imágenes fueron digitalizadas usando un UVP Mini Darkroom. Los datos de bandas amplificadas de cada individuo se organizaron en una matriz de presencia-ausencia, y se realizó un AMOVA usando el software estadístico InfoGen versión 2014 (Balzarini & Di Rienzo, 2014). Adicional a la diversidad genética, también se obtuvieron los parámetros, heterocigosidad insesgada de Nei, número promedio de alelos y número efectivo de alelos. Estos datos se sometieron a un análisis para obtener dendrogramas de frecuencias.

Con la ayuda de 3 primers, se obtuvieron un total de 29 bandas, de las cuáles el 100% fueron polimórficas, y proporcionaron información suficiente para agrupar las poblaciones. Los resultados del AMOVA se muestran en la Tabla 2. Los valores de p son muy bajos ($p = 0.0025$ y 0.0025), lo cuál indica que los resultados son estadísticamente significativos. Es posible apreciar también que la variación genética es mayor dentro de las poblaciones (95.24%) que entre las poblaciones (4.76%). Los resultados demuestran que las poblaciones recolectadas son panmícticas, y que las poblaciones carecen de estructura. Esto a su vez, sugiere que existe un elevado flujo de genes entre las poblaciones. Aún así, es importante remarcar que los marcadores moleculares ISSR permitieron obtener un número suficiente de loci polimórficos para separar a las poblaciones en grupos.

Tabla 2. Analisis Molecular de varianza (AMOVA) de poblaciones de *Heliothis virescens* usando marcadores moleculares ISSR.

Tabla 2. Cuadro de Análisis Molecular de Varianza

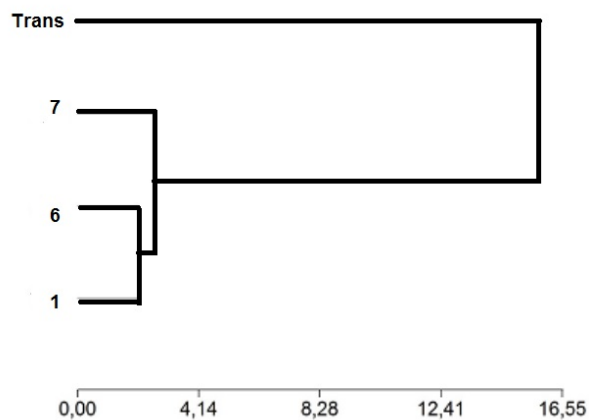
FV	SC	gl	CM	p-valor	Comp. Var.	Porcentaje
Población	14.87	3	4.96	0.0025	0.14	4.76
Dentro	154.93	56	2.77	0.0025	2.77	95.24
Total	169.8	59	2.88		2.91	100

FV = Fuente de variación; SC = Suma de cuadrados; gl = Grados de libertad; CM = Cuadrados medios.

Estos resultados concuerdan con lo reportado en otros estudios en *H. virescens* (Groot *et al.*, 2011) así como en otras especies de lepidopteros como *Cydia pomonella* (Fuentes-Contreras *et al.*, 2008) y *Plutella xylostella* (Endersby *et al.*, 2006), donde el mayor porcentaje de la variabilidad se presenta dentro de las poblaciones que entre poblaciones, lo cual sugiere que todos los individuos conforman una sólo población genéticamente homogénea. En el caso de *H. virescens*, en particular, dicha falta de estructura de las poblaciones posiblemente esté condicionada por la elevada movilidad de los individuos y los hábitos de alimentación generalistas de la plaga (Groot, *et al.*, 2011). Otro factor que puede influenciar la variabilidad de individuos dentro de las poblaciones es el aporte de las plantas hospederas silvestres alrededor de los cultivos como fuentes importantes de insectos para el crecimiento de las poblaciones iniciales al inicio del ciclo de cultivo (Blanco *et al.*, 2007).

Por otro lado, al construir el dendrograma con las poblaciones mediante el análisis de conglomerados, fue posible observar que existe una notoria separación genética entre la población recolectada del cultivo de maíz transgénico (Población T) con respecto a las demás, que formaron dos grupos aunque poco separados (Figura 1). Sin embargo, aún con esta distancia genética entre dicha población y las restantes, no existe evidencia que sugiera una estructura genética significativa en las poblaciones de esta especie. En estudios anteriores se ha establecido que las diferencias desde el punto de vista genético entre las poblaciones pueden ser debidas al tipo de manejo de las plagas (Franck *et al.*, 2007), además de que dichas tácticas de manejo pueden ocasionar pérdida de alelos y, por tanto, pérdida de variabilidad genética (Domingues *et al.*, 2012).

Figura 1. Dendrograma de distancias genéticas entre poblaciones de *Heliothis virescens* basado en un análisis de varianza molecular mediante marcadores moleculares ISSR de las siguientes poblaciones: 1 (Matamoros, Coahuila), 6 (Culiacán, Sinaloa), 7 (Tlajomulco, Jalisco), y su comparación con una población expuesta a maíz transgénico de San Pedro, Coahuila (Trans).



Se han estudiado diversos mecanismos de resistencia a la toxina Bt en *H. virescens*, desde bajos niveles de fosfatasa alcalina (Jurat-Fuentes & Adang, 2006), hasta alteraciones de los genes que codifica para las cadherinas (Gassmann *et al.*, 2009), pero en ambos casos involucran una mutación en el genoma de los individuos. Sin embargo, en los pocos casos de poblaciones de insectos resistentes a Bt (mayormente poblaciones de laboratorio) la base molecular y genética de su resistencia se ha mantenido confusa (Gahan *et al.*, 2001). Además, aunque existan individuos resistentes en las poblaciones, los genes que les confieren resistencia no pasan a las generaciones siguientes, ya que es frecuente que dichas poblaciones exhiban costos de adaptación y mueran prematuramente (Moar *et al.*, 2010).

Con el creciente uso de cultivos Bt, aspectos como el manejo de la resistencia a esta toxina se volverá más importante (Tabashnik *et al.*, 2009) y los estudios sobre métodos para detectar resistencia y conservar la susceptibilidad de las plagas se convertirá en un área de investigación con más auge en la agricultura (Huang, 2006). En este sentido, las pruebas moleculares que

permitan detectar alteraciones en los genes inductores de resistencia (Morin *et al.*, 2003; Jurat-Fuentes & Adang, 2006).

LITERATURA CITADA

- Agrawal PK and Shrivastava R. 2014. Chapter 3: Molecular markers. In: Advances in Biotechnology. Ravi I, Baunthiyal M, Saxena J (eds.). Springer, New Delhi, India. 260 pp
- Balzarini MG, Di Rienzo JA. 2014. InfoGen versión 2014. FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.info-gen.com.ar>.
- Betz FS, Hammond BG, Fuchs RL. 2000. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 32:156–173.
- Blanco CA, Terán-Vargas AP, Lopez Jr. JP, Kauffman JV, Wei. 2007. Densities of *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in three host plants. *Florida Entomologist* 90: 742-750.
- Blanco CA, Andow DA, Abel CA, Summerford DV, Hernández G, López Jr. JD, Adams L, Groot A, Leonard R, Parker R, Payne G, Perera OP, Terán-Vargas AP, Azuara-Domínguez A. 2009. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac resistance frequency in tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology* 102(1): 381-387.
- De Maagd RA, Bosch D, Stiekema W. 1999. *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. *Trends in Plant Science* 4: 9–13.
- Domingues FA, Silva-Brandão KL, Abreu AG, Perera OP, Blanco CA, Cònsoli FL, Omoto C. 2012. Genetic structure and gene flow among Brazilian populations of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology* 105(6):2136-2146.

- Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin* 19: 11-15.
- Endersby NM, McKechnie SW, Ridland PM, Weeks AR. 2006. Microsatellites reveal a lack of structure in Australian populations of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *Molecular Ecology* 15(1):107-118.
- Franck P, Reyes M, Olivares J, Sauphanor B. 2007. Genetic architecture in codling moth populations: Comparison between microsatellite and insecticide resistance markers. *Molecular Ecology* 16(17): 3554-3564.
- Fuentes-Contreras E, Espinoza JL, Lavandero B, Ramírez CC. 2008. Population genetic structure of codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) from apple orchards in Central Chile. *Journal of Economic Entomology* 101(1): 190-198.
- Gahan LJ, Gould F, Heckel DG. 2001. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science* 293: 857-860.
- Gassmann AJ, Carrière Y, Tabashnik BE. 2009. Fitness costs of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology* 29: 147-163.
- Gould F, Anderson A, Reynolds A, Bumgarner L, Moar W. 1995. Selection and genetic analysis of a *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) strain with high levels of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Journal of Economic Entomology* 88: 1545-1559.
- Groot AT, Classen A, Inglis O, Blanco CA, López Jr. J, Terán-Vargas A, Schal C, Heckel DG, Schöfl G. 2011. Genetic differentiation across North America in the generalist moth *Heliothis virescens* and the specialist *H. subflexa*. *Molecular Ecology* 20: 2676-2692.
- Huang F. 2006. Detection and monitoring of insect resistance to transgenic Bt crops. *Insect Science* 13: 73-84.
- Jurat-Fuentes JL, Gould FL, Adang MJ. 2003. Dual resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac and Cry2Aa toxins in *Heliothis virescens* suggests multiple mechanisms of resistance. *Applied and Environmental Microbiology* 69(10): 5898-5906.

- Jurat-Fuentes JL and Adang MJ. 2006. Cry toxin mode of action in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* 92: 166-171.
- Moar W, Dennehy T, Anilkumar K, Head G. 2010. Bt resistance in *Helicoverpa zea* (Boddie): from biology to monitoring. *Southwestern Entomologist* 35(3): 395-398.
- Molina-Ochoa J, Hutchison WD, Blanco CA. 2010. Estado actual de *Helicoverpa zea* y *Heliothis virescens* dentro de un panorama cambiante en el Sur de los Estados Unidos de Norte América y México. *Southwestern Entomologist* 35(3): 347-354.
- Morin S, Biggs RW, Sisterson MS, Shriver L, Ellers-Kirk C, Higginson D, Holley D, Gahan LJ, Heckel DG, Carrière Y, Dennehy TJ, Brown JK, Tabashnik BE. 2003. Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA* 100: 5004–5009.
- Semagn K, Bjørnstad Å, Ndjiondjop MN. 2006. Review: An overview of molecular marker methods for plants. *African Journal of Biotechnology* 5(25): 2540-2568.
- Stehr, FW. 2005. *Immature Insects*. Vol. 1. Kendall Hunt Publishing. Dubuque, IA. USA.
- Tabashnik BE, Van Rensburg JBJ, Carrière Y. 2009. Field-evolved insect resistance to Bt crops: Definition, theory, and data. *Journal of Economic Entomology* 102(6): 2011-2025.
- Terán-Vargas AP, Rodríguez JC, Blanco CA, Martínez-Carrillo JL, Cibrian-Tovar J, Sánchez-Arroyo H, Rodríguez-del-Bosque LA, Stanley D. 2005. Bollgard cotton and resistance of tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) to conventional insecticides in southern Tamaulipas, Mexico. *Journal of Economic Entomology* 98: 2203-2209.
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20:176-183.