



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

DETERMINACIÓN DE LA DISTANCIA GENÉTICA ENTRE COLONIAS DE  
*Prostephanus truncatus* (HORN) (COLEOPTERA: BOSTRICHIDAE)  
PROVENIENTES DE MÉXICO, TOGO Y TANZANIA, USANDO  
POLIMORFISMOS DEL ADN AMPLIFICADOS AL AZAR (RAPD'S).

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
INGENIERA AGRÍCOLA  
P R E S E N T A :  
KARLA MARÍA GUTIÉRREZ ZAMORA

ASESORES EXTERNOS: DR. MANUEL VÁZQUEZ ARISTA

M.C. MA. DE JESÚS ALVARADO BALLEZA

ASESOR INTERNO: M.C. JOSÉ LEONIDES SÁNCHEZ GONZÁLEZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

2002

TEJIS C. N  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
 UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

UNIVERSIDAD NACIONAL  
 AUTÓNOMA DE  
 MÉXICO

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
 DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
 PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
 Jefe del Departamento de Exámenes  
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Determinación de la distancia genérica entre colonias de *Prostephanus*  
*nuncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae) provenientes de México,  
Togo y Tanzania, usando polimorfismos del ADN amplificadas al azar  
(RAPD's)  
 que presenta la pasante: Karla María Gutiérrez Zamora  
 con número de cuenta: 09208517-0 para obtener el título de:  
Ingeniera Agrícola

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 22 de noviembre del 2001.

PRESIDENTE	<u>Biol. Aurora Vázquez Mora</u>	<u>[Firma]</u>
VOCAL	<u>M.C. Ofelia M. Grajales Muñoz</u>	<u>[Firma]</u>
SECRETARIO	<u>Ing. José Leonides Sánchez González</u>	<u>[Firma]</u>
PRIMER SUPLENTE	<u>M.C. Margarita Tadeo Robledo</u>	<u>[Firma]</u>
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Ing. Angel Casado Hernández</u>	<u>[Firma]</u>

## **AGRADECIMIENTOS.**

### **Al creador:**

Por haberme dado la oportunidad de experimentar esta existencia humana en compañía de esta maravillosa familia y permitirme concluir y compartir uno de mis objetivos cerca de todos a quienes amo.

### **A mis padres Salvador y Carlota:**

Por todo el apoyo brindado a lo largo de mi formación profesional, pero sobre todo por darme la fuerza y el amor necesarios para saber que la vida esta llena de cosas maravillosas que podemos compartir.

### **A mis hermanos Mariana, Fabiola, Enrique y Violeta:**

Por que cada uno ha aportado a mi existir momentos inolvidables, llenos de ternura, comprensión apoyo y muchísimo amor.

### **A todos los que forman parte de mi sistema familiar:**

Por estar siempre juntos y por compartir alegremente la maravillosa experiencia de vivir.

### **A Arturo:**

Por su apoyo en el descubrimiento de mi ser y sobre todo por su gran amor.

**A la UNAM:**

Por haberme permitido ocupar un lugar en sus instalaciones.

**A los profesores de la carrera de Ingeniería Agrícola:**

Que día a día se esfuerzan por dar lo mejor de sí para nuestra formación y así permitirme adquirir los conocimientos base para el buen desempeño de mi carrera profesional.

**Al CINVESTAV – Irapuato:**

Por haberme permitido realizar esta investigación en sus instalaciones.

**Al CONSYTEG:**

Por su apoyo económico para que este trabajo llegare a buen término.

**Al Dr. Manuel:**

Por ayudarme en la realización de este trabajo otorgándome tiempo, apoyo y enseñanza, pero sobre todo por compartir conmigo momentos muy especiales a lado de su maravillosa familia.

**A la M.C. Ma de Jesús:**

Por brindarme incondicionalmente todo su conocimiento y empeño para que este trabajo saliera de la mejor manera posible y muy especialmente por permitirme convivir con las personas más importantes en su vida.

**Al M.C. José Leonides:**

Por su valiosa contribución a la complementación de este trabajo, por su apoyo y gran amistad.

**Al Profesor Edgar Ornelas:**

Por sus aportaciones y sobre todo por el ímpetu que me incitó a seguir adelante.

**Al Dr. Octavio Martínez:**

Por su valiosa contribución para la realización del análisis estadístico.

**A cada uno de los miembros del jurado:**

Por la revisión de la presente tesis, sus sugerencias y correcciones que contribuyeron en gran manera para mejorar y complementar esta investigación.

**A todos mis compañeros y amigos de la generación 20.**

Por todo el apoyo que en su momento me brindaron y todas las aventuras compartidas.

**A Evangelina, Ramón, Gonzalo, Juan y Arturo:**

Por su valiosa amistad y compañerismo a lo largo de nuestra estancia en la carrera profesional.

## INDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CONTENIDO.	i
ÍNDICE DE FIGURAS.	iii
ÍNDICE DE TABLAS.	iv
RESUMEN.	1
1. INTRODUCCIÓN.	2
2. OBJETIVOS.	6
2.1. Objetivo general.	6
2.2. Objetivos específicos.	6
3. HIPOTESIS.	6
4. REVISION DE LITERATURA.	7
4.1. Generalidades de <i>Prostephanus truncatus</i> (Horn).	7
4.1.1. Ubicación taxonómica.	7
4.1.2. Morfología.	8
4.1.3. Ciclo biológico.	9
4.1.4. Distribución.	13
4.1.5. Daños.	17
4.1.6. Métodos de control.	19
4.1.6.1. Controles físico y cultural.	20
4.1.6.2. Control químico.	20
4.1.6.3. Control biológico.	22
4.2. Marcadores moleculares.	24
4.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	26
4.2.2. Polimorfismos del ADN amplificados al azar (RAPD).	31
4.2.3. Polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP).	34
4.2.4. Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP).	34
4.2.5. Repeticiones de secuencias simples (SSR o mini o micro satélites).	35
4.3. Electroforesis.	36
4.4. Métodos de análisis.	37

5. MATERIALES Y MÉTODOS.	40
5.1. Cultivo de insectos.	40
5.2. Extracción y cuantificación del ADN.	41
5.3. Estandarización de los RAPDs.	44
5.4. Electroforesis de los RAPDs.	44
5.5. Análisis de datos para construir dendogramas.	45
5.5.1. Cálculo de la distancia genética.	45
5.5.2. Análisis de agrupamientos.	46
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	47
6.1. Estandarización de las condiciones.	47
6.2. Selección de oligonucleótidos.	50
6.3. Polimorfismos encontrados en los RAPDs.	51
6.4. Análisis de datos para la elaboración de dendogramas.	58
7. CONCLUSIONES.	63
8. GLOSARIO.	65
9. APÉNDICE.	70
9.1. Buffer de extracción de protocolo de Cenis y col.	70
9.2. Buffer de extracción de protocolo de Doyle y Doyle.	70
9.3. Buffer de extracción de protocolo de Vandemark y col.	71
9.4. Buffer de corrida 6X.	71
9.5. Buffer TBE 5X.	72
9.6. Buffer T <sub>10</sub> E <sub>1</sub> p.H. = 8.0.	72
9.7. Abreviaturas de las instituciones que estudian a <i>P. truncatus</i> .	72
10. BIBLIOGRAFÍA.	74



## ÍNDICE DE FIGURAS.

FIGURA	TÍTULO	PÁGINA
FIGURA 1.	<i>P. truncatus</i> adulto y larva.	10
FIGURA 2.	Diferentes perspectivas de <i>P. truncatus</i> .	11
FIGURA 3.	Ciclo biológico de <i>P. truncatus</i> .	12
FIGURA 4.	Distribución de <i>P. truncatus</i> en América.	14
FIGURA 5.	Distribución de <i>P. truncatus</i> en África.	15
FIGURA 6.	Distribución de <i>P. truncatus</i> en México.	16
FIGURA 7.	Daños causados por <i>P. truncatus</i> .	19
FIGURA 8.	Depredador de <i>P. truncatus</i> , <i>Teretriosoma nigrescens</i> .	23
FIGURA 9.	Proceso de obtención de los marcadores RAPD's por PCR.	33
FIGURA 10.	Determinación de la distancia genética a partir de una comparación de marcadores RAPD's.	39
FIGURA 11.	Tiempos y temperaturas estándares.	50
FIGURA 12.	Polimorfismos en OPA-01.	55
FIGURA 13.	Polimorfismos en OPA-06 y en OPA-07.	56
FIGURA 14.	Polimorfismos en OPA-08 y en OPA-16.	57
FIGURA 15.	Dendograma de la matriz de disimilaridad de Skroch.	62
FIGURA 16.	Dendograma de la matriz de similaridad de Jaccard.	62
FIGURA 17.	Dendograma del coeficiente de confianza de Felsenstein.	62

## ÍNDICE DE TABLAS.

TABLA	TÍTULO	PÁGINA
TABLA 1.	Componentes, parámetros y pasos de cada ciclo de reacción en la PCR	28
TABLA 2.	Comparación de métodos de extracción.	48
TABLA 3.	Condiciones estándares para la realización de los RAPD's.	49
TABLA 4.	Secuencias y Número de bandas amplificadas por los oligonucleótidos seleccionados.	51
TABLA 5.	Polimorfismos y pares de bases (pb) encontrados en las colonias de <i>P. truncatus</i> de México (M), Togo (T) y Tanzania (Z), y <i>S. Zeamais</i> (S) con el oligonucleótido OPA-01.	55
TABLA 6.	Polimorfismos y pares de bases (pb) encontrados en las colonias de <i>P. truncatus</i> de México (M), Togo (T) y Tanzania (Z), y <i>S. Zeamais</i> (S) con los oligonucleótidos OPA-06 y OPA-07.	56
TABLA 7.	Polimorfismos y pares de bases (pb) encontrados en las colonias de <i>P. truncatus</i> de México (M), Togo (T) y Tanzania (Z), y <i>S. Zeamais</i> (S) con los oligonucleótidos OPA-08 y OPA 16.	57
TABLA 8.	Matriz de disimilaridad genética.	58
TABLA 9.	Matriz de similaridad genética.	59
TABLA 10.	Valores estadísticos.	60

## RESUMEN.

*Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae) es conocido como el barrenador mayor de los granos. Esta plaga llamó la atención del mundo a finales de los setentas cuando se presentó en África causando pérdidas considerables en maíz y en yuca almacenada. Se ha reportado que *P. truncatus* fue introducido a África desde América Central o México. Algunos reportes mencionan que esta plaga fue introducida a África desde México. Sin embargo, otros investigadores reportan que esta plaga tiene otro origen geográfico. En este estudio se hizo un análisis de la relación filogenética existente entre las colonias de insectos provenientes de México, Togo y Tanzania usando RAPD's (Polimorfismos del ADN Amplificados al Azar) con el fin de tratar de definir su origen. Las colonias de *P. truncatus* fueron analizadas con 161 bandas amplificadas por 10 oligonucleótidos comerciales. La relación filogenética existente entre la colonia de México y las colonias provenientes de África no es tan estrecha como la que se presenta entre las dos colonias africanas, lo cual nos hace pensar que la introducción de *P. truncatus* al continente africano podría tener un origen diferente a México.

## I. INTRODUCCIÓN.

Los cereales han sido a través de la historia la base de la alimentación de los pueblos, por lo que se les considera como fuente importante de nutrición para el hombre, particularmente en los países en vías de desarrollo. Tal es el caso de México, donde el maíz es el cereal de mayor importancia alimenticia y cultural. Sin embargo, una porción considerable de la producción está sujeta a pérdidas, las cuales pueden ocurrir desde el campo, durante la cosecha, el desgranado, el secado, el almacenamiento y la distribución (Saidi, 1990). Esto provoca que la producción merme considerablemente obteniéndose rendimientos en el ámbito nacional de tan sólo 2.16 ton/ha en promedio (SAGAR, 1999), lo cual no es suficiente para cubrir las necesidades de alimentación existentes.

Considerando el almacenamiento como una etapa crítica, los factores que determinan y acentúan las pérdidas en granos almacenados son: a) la carencia de almacenes adecuados y de facilidades de almacenamiento, b) el alto contenido de humedad del grano en el momento de almacenarlo, c) los granos rotos e impurezas que son un sitio favorable para el desarrollo de insectos y microorganismos, d) el manejo deficiente de granos o semillas, y principalmente e) la presencia de plagas, tales como insectos, microorganismos, roedores y aves, que actúan individualmente o en conjunto (Ramírez, 1984).

En el caso de maíz se distinguen tres especies de insectos considerados como plagas primarias por la magnitud y tipo de daños que ocasionan en el grano almacenado tanto en México como en el mundo entero. Estos insectos son: *Sitophilus zeamais* (Motschulsky) (Coleoptera:Curculionidae) o Gorgojo del Maíz, *Sitotroga cerealella* (Olivier) (Lepidoptera: Gelechiidae) o Palomilla Dorada del Maíz y *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera:

Bostrichidae) o Barrenador Mayor de los Granos. La mayoría de los estudios realizados con estos insectos reportan pérdidas por consumo parcial o total, daños físicos por oviposición, así como contaminación por excretas. También se sabe que la presencia de los insectos es capaz de elevar la temperatura de los granos almacenados aumentando así el riesgo de contaminación por hongos (Sandoval, 1991; Vargas, 1998). *P. truncatus* ataca tanto la mazorca como el grano antes de la cosecha y durante el almacenamiento (Demianyk y Sinha, 1987). El barrenador mayor de los granos atrajo la atención del mundo a finales de los setentas cuando por accidente se cree fue introducido al Continente Africano desde América Central o México (Mushi, 1984; Nissen y col., 1991). Existen reportes que hablan de la presencia de este insecto en África, al Este en Tanzania (Dustan y Magazini, 1981) y al Oeste en Togo (Krall, 1984; Harnisch y Krall, 1984; Krall, 1987), y al parecer de ahí emigro a países vecinos. La presencia de este insecto en algunos países africanos ha causado daños considerables en el maíz almacenado y en otros productos agrícolas como la yuca, al mismo tiempo que ha debilitado los sistemas de almacenamiento que se utilizan en estos lugares, los cuales están hechos de madera (Hodges y col., 1983; Hodges 1986; Vargas, 1998).

En Tanzania, en un maíz de reciente cosecha, Hodges (1984) reportó una infestación inicial del 20% de *P. truncatus* y después de 5 - 6 meses aumentó a un 80%. Mientras que en Togo, Krall (1984) reportó daños considerables en los almacenes de maíz, de hasta el 100% en un período de almacenamiento de nueve meses.

En México y Latinoamérica la presencia de *P. truncatus* no representa una amenaza continua, pero cuando está presente puede ser devastador, tal y como lo muestra un estudio de Torre Blanca y col. (1982), donde *P. truncatus* causó una pérdida aparente del 21.9% y una pérdida real del 100% del maíz almacenado, tan sólo en tres meses.

Debido a su amplia distribución y a la gran importancia económica que representa este insecto, ha sido objeto de diversos estudios a nivel mundial. Algunas de las instituciones que se han dedicado al estudio de este insecto son IITA, GTZ, FAO, EAP, NRI, INIFAP, CINVESTAV - Irapuato y la UNAM (Apéndice), todo con el fin de entender el comportamiento de este insecto y así poder tener un mejor control del mismo. Sin embargo y a pesar de los innumerables esfuerzos realizados por estas instituciones *Prostephanus truncatus* sigue causando pérdidas cuantiosas en las diferentes regiones donde se ha reportado su presencia. Se ha observado que los daños en el continente Africano son mayores que en el continente Americano, estos puede deberse a que en África no se encontraban enemigos naturales de *P. truncatus* exacerbándose los daños, sin embargo hoy en día ya se han liberado algunos, tal es el caso de *Teretriosoma nigrescens* el cual es el que ha dado mejores resultados, sin embargo la problemática sigue en pie, dando a lugar a la sospecha de que existan razas de *P. truncatus* complicando su control. Merle y Drumond en una colección de ejemplares de la universidad de Kansas de 1986, argumentaron la posibilidad de que poseían mayor pilidad sobre los élitros y eran más pequeños que los de México y los de Honduras presentaban mayor talla. Nissen y col.(1991), en un estudio con isoenzimas comparó las colonias de *P. truncatus* provenientes de América Central, México y África, encontrando que éstas eran diferentes, aunque las colonias de África y México compartían cierta afinidad, sugiriendo que *P. truncatus* fue introducido a África desde México y no desde América Central. Sin embargo, Vázquez-Arista y col. (1999) encontraron por medio de zimogramas que colonias de África (Togo y Tanzania) y de México tienen diferente actividad proteolítica. lo cual podría sugerir que las colonias de Togo y Tanzania tienen orígenes diferentes. El presente trabajo pretende utilizar el método de Polimorfismos del ADN Amplificado al Azar (RAPD) con el objeto de saber cual es la relación filogenética existente entre las colonias de

México, Togo y Tanzania, y así comprobar la hipótesis de que *P. truncatus* fue introducido al continente Africano desde México. Por otro lado, una vez establecidas las condiciones para realizar RAPDs en *P. truncatus* se tendrá la posibilidad de llevar a cabo estudios para conocer la variabilidad genética que existe en México.

## **II. OBJETIVOS.**

### **2.1. Objetivos general.**

- Determinar la distancia genética entre las colonias de *P. truncatus* provenientes de México, Togo y Tanzania con base a polimorfismos del ADN amplificados al azar.

### **2.2. Objetivos específicos.**

- Estandarizar las condiciones de amplificación para la caracterización de las diferentes colonias de *P. truncatus* mediante la técnica de RAPDs.
- Seleccionar oligonucleótidos que sean reproducibles y nos den información clara en los polimorfismos genéticos del ADN de *P. truncatus*.

## **III. HIPÓTESIS.**

- *P. truncatus* fue introducido al continente Africano desde México, por lo que la relación filogenética existente entre colonias de África y de México es muy cercana.



#### **IV. REVISIÓN DE LITERATURA.**

##### **4.1. Generalidades de *Prostephanus truncatus* (Horn).**

Pertenece al orden Coleoptera y a la familia Bostrichidae, fue clasificado inicialmente por Horn en 1878 como *Dinoderus truncatus*, a partir de especímenes colectados en importaciones de granos procedentes de Centro América. En 1897 fue reclasificado el género por Lesne a *Prostephanus truncatus*. Se le conoce como el barrenador mayor de los granos. Es una plaga endémica en Tanzania, México, Centro y Sur América. Es una especie de importancia económica por su gran capacidad destructiva en grano de maíz y en algunos otros productos como trigo blando, yuca seca y madera. Se han reportado pérdidas de hasta 40% en maíz almacenado durante seis meses (Haines, 1991).

##### **4.1.1. Ubicación Taxonómica.**

Reino	Animalia
Phylum	Arthropoda
Subphylum	Unirramia
Superclase	Mandibulata
Clase	Insecta
Subclase	Pterygota
División	Endopterygota
Orden	Coleoptera

Suborden	Polyphaga
Serie	Bostrichiformia
Superfamilia	Bostrichoidea
Familia	Bostrichidae
Género	<i>Prostephanus</i>
Especie	<i>truncatus</i>

De Lifán, 1998.

#### 4.1.2. Morfología.

Los adultos miden de 3 - 4 mm de largo, tienen el cuerpo cilíndrico y son de color marrón oscuro (Fig. 1). El pronoto tiene en la parte delantera una hilera dentada y la cabeza esta escondida por el protórax, de manera que no es visible desde la parte superior (Haines, 1991; Hodges, 1984).

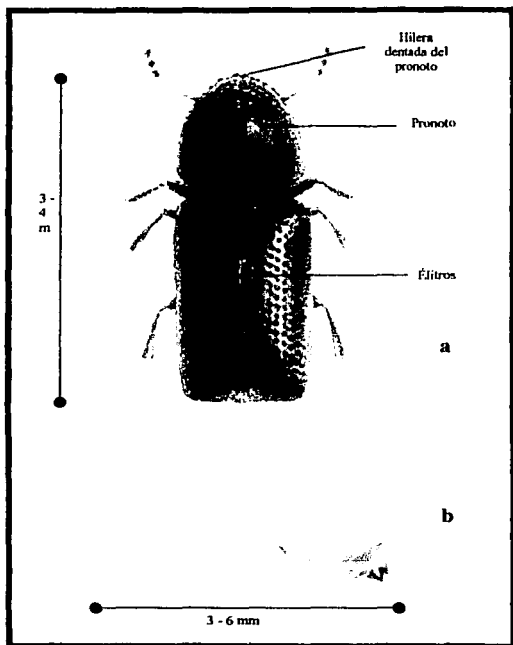
Las antenas son capitadas de diez segmentos, los tres últimos más anchos. El flagelo de la antena es delgado y revestido con largos "pelos", con excepción de los tres últimos que son diferencialmente más grandes, siendo el último segmento aproximadamente igual de largo que de ancho.

Los élitros en su parte posterior son aplanados y excesivamente inclinados, esta región inclinada tiene dos protuberancias laterales en forma de costilla casi al final de los élitros (Fig. 2). El declive aplanado y las protuberancias laterales son dos importantes rasgos para distinguir esta especie de otras, externamente similares, tales como *Dinoderus* spp. (Coleoptera: Bostrichidae) y *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) (Coleoptera: Bostrichidae), las cuales se sabe se reproducen en productos almacenados (Haines, 1991; Hodges, 1984). Las

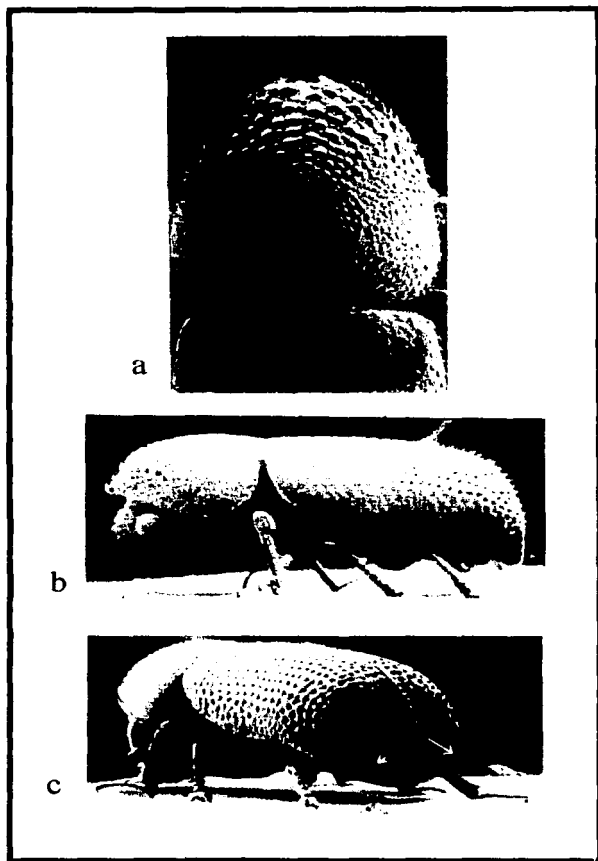
larvas tienen una longitud de 3 - 6 mm, son de color blanquecino, carnosas, gruesas, tienen pocos "pelos" y tienden a enrollarse en forma de C (Fig.1). Los segmentos torácicos son considerablemente más largos que los del abdomen (Haines,1991; Hodges, 1984).

#### 4.1.3. Ciclo biológico.

*P. truncatus* es un insecto que presenta una metamorfosis completa (holometábola); es decir, las hembras oviositan sus huevecillos en el grano de maíz y estos dan origen a estadios juveniles, inmaduros, reciben el nombre de larvas y el estado adulto de imago. Entre estos estados, existe una fase intermedia, quiescente, llamado pupa (Fig. 3). En condiciones de laboratorio se observa que las hembras tienen un período de preoviposición de 5 a 10 días después de la copulación y llegan a poner hasta 50 huevos por hembra, pero se estima que en ataques de campo este número es mayor. El 68% de los huevos son puestos en los granos dañados. Las larvas emergen después de un promedio de 4.1 días bajo condiciones



**Figura 1.** *Prostephanus truncatus*. a) adulto con cuerpo cilíndrico de color marrón y mide de 3 - 4 mm de largo; b) larva de color blanquecino con cuerpo carnoso y en forma de C y mide de 3 - 6 mm de largo.



**Figura 2.** Diferentes perspectivas de *Prostephanus truncatus*. a) vista dorsal del protórax, b) vista lateral, mostrando la pronunciada inclinación de los élitros, c) vista posterolateral, mostrando la curvatura (flechas) en el ápice de los élitros.

óptimas y sufren de 3 a 5 mudas para entrar al estado pupal. El desarrollo larvario ocurre más rápido en los granos intactos que en la harina, alimentándose al parecer del polvo producido por los adultos (Hodges y col., 1985; Dell'Orto y Arias 1985; Dick, 1988).

Su ciclo de vida es influenciado por condiciones de temperatura y humedad, por lo tanto el desarrollo de larva a adulto en condiciones óptimas (32°C y 80% humedad relativa) toma de 24 a 27 días de los cuales 6 – 8 días son pupas. La humedad relativa (H.R.) dentro del rango de 50 a 80% no afecta significativamente el período de desarrollo o mortalidad. A 32°C y con una baja en la H.R. de 80% a 50% (maíz con un contenido de humedad aproximadamente de 10.5%), el período principal de desarrollo se extiende sólo a seis días y se incrementa la mortalidad a 13.3%. Esta tolerancia a las condiciones secas ha sido confirmada en estudios de campo en Nicaragua y Tanzania, en los cuales el maíz tenía un contenido de humedad del 10.6% y 9% respectivamente y fueron infestados fuertemente. La habilidad de *P. truncatus* de desarrollarse en granos con un bajo contenido de humedad, tal vez sea una de las razones de su éxito ya que bajo esas condiciones muchas otras plagas de almacén son incapaces de reproducirse (Shires, 1979; Bell y Watters, 1982; Haines, 1991; Hodges, 1986).

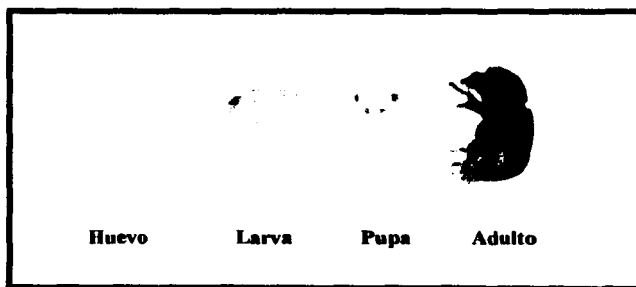


Figura 3. Ciclo biológico de *Prostephanus truncatus*.

#### 4.1.4. Distribución.

Se ha reportado la presencia de *P. truncatus* al Sur de los Estados Unidos de América (Chittenden, 1911; Back y Cotton, 1922). No obstante, esta especie ha sido restringida a México (Chittenden, 1911; Delgado y Hernández-Luna, 1951; Quintana y col., 1960) y América Central; Nicaragua (Giles y Leon, 1975), Guatemala (Cotton y Good, 1937), Panamá, Honduras, El Salvador (McGuire y Crandall, 1967) y Costa Rica (Fisher, 1950). Sin embargo, también se ha registrado en América del Sur; Brasil (Cotton y Good, 1937), Perú (Wright, 1984) y Colombia (Posada y col., 1976) (Fig. 4).

Fuera del continente Americano se ha reportado en Israel (Calderon y Donahaye, 1964) e Iraq (Al- Souis y col., 1970), pero no hay registro de su establecimiento en estos países. Se cree que *P. truncatus* fue introducido en Tanzania a finales de los setenta, sin embargo fue hasta 1981 que se identificó como la plaga causante de severas pérdidas de maíz almacenado en granjas de la región de Tabora, en Tanzania (Golob y Hodges, 1982), extendiéndose a Kenia (Kega y Warui, 1983) y Borundi (Tropical Development and Research Institute, TRDI, no publicado). En 1984 se presentó un serio ataque de *P. truncatus* en Togo, en 1986 se encontró en Benin y en 1989 en Ghana, oeste de África (Haines, 1991) (Fig. 5).

En México el barrenador mayor de los granos se ha encontrado en los estados de Baja California, Sinaloa, Sonora, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas (Wright, 1984), Guanajuato, Jalisco, Veracruz, Chiapas (Leslie y Vázquez-Arista, 1992), Yucatán (Rodríguez y Herrera, 1989), Querétaro, Michoacán, San Luis Potosí, Morelos, Veracruz, Estado de México, Oaxaca y Zacatecas (comunicación personal, Vázquez-Arista, 2000) (Fig. 6).



Figura 4. Distribución de *Prostephanus truncatus* en América.



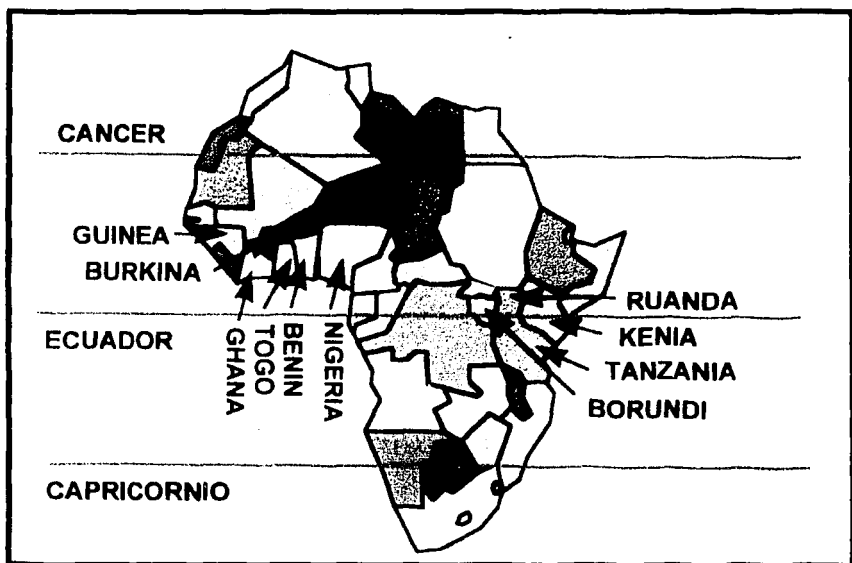
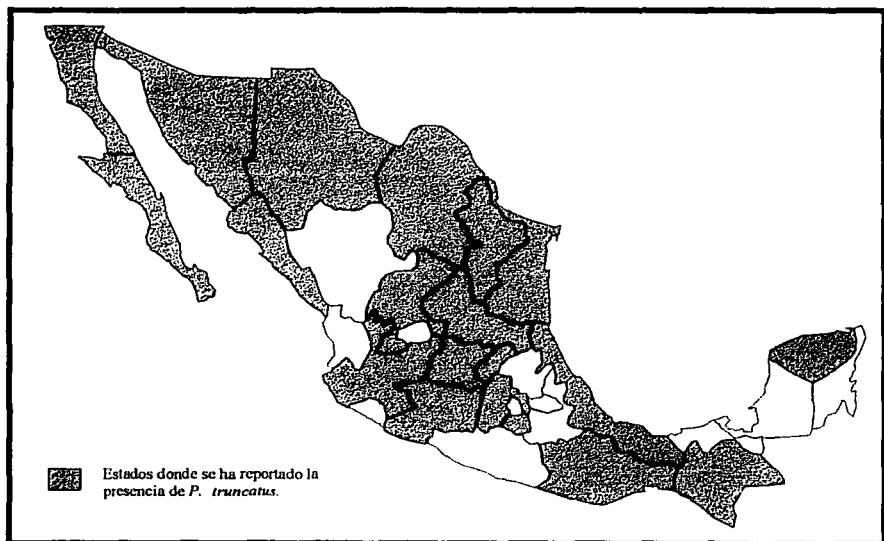


Figura 5. Distribución de *Prostephanus truncatus* en África.



**Figura 6.** Distribución de *Prostephanus truncatus* en México.

#### 4.1.5. Daños.

*P. truncatus* se comporta como una plaga primaria típica de almacén, pues ataca granos enteros y sanos. Los granos y las mazorcas son atacados antes y después de la cosecha. Los adultos barrenan un amplio rango de productos alimenticios (fríjol, cacahuates y otros productos amiláceos) y algunos materiales como madera, recipientes de plástico y algunos polietilenos (Sandoval, 1991). También es capaz de atacar trigo blando y yuca, aunque aparentemente no es capaz de infestar sorgo (Dell'Orto y Arias, 1985).

Cuando infestan las mazorcas, los adultos comienzan su ataque barrenando la base, aunque eventualmente alcanzan el acceso a los granos por el ápice de ésta. Después barrenan los granos de maíz haciendo un agujero limpio y redondo formando túneles de grano en grano, por lo cual van generando grandes cantidades de harina (Fig.7). Este hábito tan destructivo es lo que causa grandes pérdidas (Hodges y Meik, 1984).

En México, Torre Blanca y col.,(1984) llevaron a cabo un estudio donde un lote de 50 Kg de maíz criollo amarillo de reciente cosecha se infestó con una carga de 60 insectos por Kg. de maíz. Se cuantificaron las pérdidas después de 30, 60, 70, 80 y 90 días de incubación y se encontró que *P. truncatus* consumió el 21.9% del peso del maíz, a la vez que produjo un 29.5% del polvo y un 35.6% de grano picado, quedando solamente el 13.3 % de grano sin daño físico el cual debido a la contaminación por hongos no se consideró apto para el consumo humano. Lo anterior indicó que el barrenador mayor de los granos causó una pérdida aparente del 21.9% y una pérdida real del 100% del maíz almacenado. En las montañas centrales de México las pérdidas de maíz alcanzaron el 40% durante 10 meses de almacenamiento, mientras que en el sur de México las pérdidas reportadas fueron superiores al

30%, aunque de acuerdo con los autores esto representa una sobrestimación de los campesinos, debido a la confusión entre daño y pérdida (Rodríguez y Herrera, 1989).

Giles y Leon (1975) reportaron en Nicaragua pérdidas de peso en maíz por arriba del 40% después de seis meses de almacenamiento. Mientras que Hoppe (1986) reportó en Honduras pérdidas superiores al 30%, particularmente asociadas con una fuerte infestación del barrenador mayor de los granos.

En Tanzania, maíz recién cosechado mostró un 20 % de infestación por el barrenador mayor de los granos y después de 5 - 6 meses el 80% (Hodges, 1984). También se observaron, en un almacén, pérdidas de peso superiores al 34% después de 3 - 6 meses con un promedio de pérdida de 8.7% (Hodges y col., 1983). Incluso Keil (1988) reportó pérdidas severas del 17% después de 6 meses y 41.2% después de 8 meses.

En Togo se reportaron daños en almacenes de hasta el 100% en sólo 9 meses (Krall, 1984). Pantenius (1988) reportó que antes de la aparición de *P. truncatus* el porcentaje de pérdidas en esta región era del 7.1 %, después de seis meses de la presencia del barrenador mayor de los granos, se reportó una pérdida de peso del 30.2% y después de 8 meses las pérdidas alcanzaron el 44.8%.

Cuando se comparan los daños ocasionados en maíz por las plagas de almacén más comunes tales como *Sitophilus oryzae* (Linneaus) (Coleoptera: Curculionidae), *S. zeamais*, *Sitotroga cerealella* y *Prostephanus truncatus*, este último se manifiesta como una plaga mucho más voraz (Cowley y col., 1980). Durante toda la temporada de almacenamiento en Zambia, Kenia y Malawi la pérdida de maíz causada por las tres primeras plagas fueron 2-6%, 3-5% y 2-5% respectivamente, mientras que *P. truncatus* ocasionó pérdidas mayores al 80% (Haines, 1991).

Los daños causados por *P. truncatus* en raíces de yuca seca pueden ser muy altos, por ejemplo, en Tanzania las raíces secas son realmente reducidas a polvo por el adulto barrenador provocando pérdidas del 70% en yuca fermentada y 50% en la no fermentada en tan sólo cuatro meses de almacenamiento (Hodges y col., 1985).

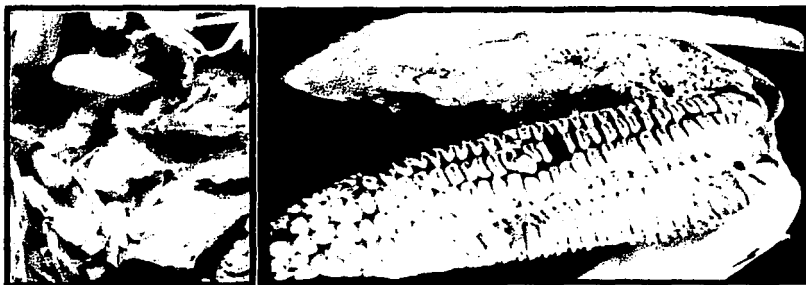


Figura 7. Daños ocasionados en maíz por *Prostephanus truncatus*.

#### 4.1.6. Métodos de control.

Para el control de *P. truncatus* se han implementado diversos tipos de control físico, cultural, biológico y químico. Algunas de las prácticas que aún se llevan a cabo intentando aminorar las pérdidas por el ataque del barrenador mayor de los granos son: controlando la dispersión de la plaga por medio de estatutos como las barreras cuarentenarias, los certificados e inspecciones fitosanitarias, la erradicación de la plaga por fumigaciones en campo o bien tratando los almacenes. Sin embargo no han sido suficientes estas campañas de contención y erradicación por lo que se han invertido considerables esfuerzos en investigaciones a largo

plazo incluyendo a los agentes de control biológico y hasta el momento el más efectivo el control químico.

#### **4.1.6.1. Control físico y cultural.**

Dentro de las prácticas de control físico y cultural que se llevan a cabo esta el dejar la mazorca en la planta o bien hacer montones verticales con el fin de extender el periodo de secado en el campo, antes de llevar la mazorca al almacén. El cribado y tamizado de semillas, así como el desgranado del maíz antes de ser almacenado, ya que al parecer al barrenador se le complica la infestación de los granos.

(<http://www.agrsci.dk/plb/bembi/africa/damage/caupt.htm>).

#### **4.1.6.1. Control químico.**

El control de este insecto se ha realizado utilizando varios insecticidas, la mayoría de los cuales en la práctica sólo tienen un efecto temporal (Torre Blanca y col., 1982).

En los primeros ensayos de campo en África se evaluó la eficacia de los insecticidas organofosforados, pirimifos-metílico, fenitrotion y bromofos a una concentración de 10 ppm en maíz desgranado, encontrándose que sólo el pirimifos-metílico mantuvo el grano en buenas condiciones durante las 27 semanas de experimentación (Golob y col., 1983).

En Tanzania, se probó la eficacia de diferentes insecticidas (lindano, permetrín, metacrifos, fenvenlate, clorpirifos-metílico, fenotrin, malatión, fenitrotión y carbaril), usándolos individualmente y/o mezclados. La respuesta de *P. truncatus* a los compuestos

químicos fue evaluada, en el laboratorio, con pruebas en papel filtro y exposición a pequeñas cantidades de grano tratado con insecticida en polvo. En campo tanto maíz en mazorca como desgranado, fueron espolvoreados con insecticida y expuestos a la infestación natural por 10 meses en un granero de maíz (Golob, 1984; Golob y col., 1985). En estos estudios se encontró que en las pruebas de papel filtro, el lindano (organoclorado) fue el compuesto más efectivo para controlar a *P. truncatus*. Por otro lado, los tratamientos en maíz desgranado fueron mucho más efectivos que los tratamientos en mazorca. También se encontró que los piretroides sintéticos pueden dar mejor control de *P. truncatus* que los compuestos organofosforados. Por lo que hoy en día se emplea la combinación de piretroides sintéticos (para controlar a *P. truncatus*) y organofosforados (para controlar otras plagas), proporcionando una buena alternativa de control de plagas de almacén. Sin embargo, la aplicación del lindano y en general los insecticidas organoclorados han sido restringidos para su aplicación directa al grano para consumo humano (Vázquez-Arista y col., 1995).

En Tanzania, las recomendaciones oficiales de la FAO, son mantener la mazorca con sus hojas y administrar la combinación de insecticidas piretroides y organofosforados, aplicándolos en polvo (Actellic Super) (Golob, 1988, 1991).

Al Oeste de África especialmente en la zona costera donde hay mucha humedad el secado puede ser complicado, por lo que la (Sociedad Alemana de Cooperación Técnica, GTZ) recomienda aplicar, a las mazorcas con todo y hojas, la combinación de insecticidas (Sofagain) capa por capa almacenándolas de la forma tradicional. Algunas pruebas han mostrado que el cóctel de piretroides y organofosforados también es efectivo si se asperja (Biliwa, 1988; Von Berg y Biliwa, 1990).

#### 4.1.6.2. Control biológico.

Se han hecho muchos estudios con el fin de encontrar cuales son los enemigos naturales de *P. truncatus* y de esta forma hacer control biológico. Hasta ahora se han encontrado algunos depredadores que al parecer ejercen cierto control en las poblaciones de *P. truncatus* tal es el caso de la chinche *Calliodis* sp y el parásito *Anisopteromalus calandrae*. También se ha buscado su control por medio de hongos entomopatógenos (Burde, 1988) y otros microorganismos, como los protozoarios (Purrini y Keil, 1989) por ejemplo *Mattesia* sp. y *Nosema* sp. que fueron evaluados como agentes de control en pruebas de campo en Togo (Henning, 1993). Sin embargo la mayoría de los aislados que son patógenos para *P. truncatus*, contienen toxinas riesgosas para los consumidores, por lo que el control microbiano no es muy promisorio. Por lo tanto, hasta hoy, sólo se conoce un depredador de *P. truncatus*, un coleóptero llamado *Teretriosoma nigrescens* (Lewis) (Coleoptera:Histeridae) (Fig. 8), que se ha encontrado asociado a *P. truncatus* en México y América Central. Rees (1985) realizó estudios de laboratorio, con maíz desgranado y diferentes contenidos de humedad (14 % a 18%), donde mostró que 10 adultos de *T. nigrescens* son capaces de impedir el incremento de la población de 100 adultos de *P. truncatus*. Otros estudios de Rees (1987), mostraron que *T. nigrescens* puede suprimir satisfactoriamente el crecimiento de la población de *P. truncatus* en mazorcas con presencia de *S. zeamais* y *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae).

*T. nigrescens* fue liberado en Togo (por la GTZ en colaboración con el Servicio de Protección de Plantas de este país) con el fin de realizar estudios sobre su efectividad como depredador bajo las condiciones naturales de Togo, obteniendo resultados satisfactorios (Helbig, 1995).





**Figura 8.** Depredador *Teretriosoma nigrescens* (Coleoptera:Histeridae).  
a) adultos de *T. nigrescens*, b) larva de *Prostephanus truncatus*.

## 4.2. Marcadores moleculares.

Los **marcadores genéticos** se pueden clasificar en tres categorías: los morfológicos, los bioquímicos y moleculares.

Los marcadores morfológicos son aquellos que afectan caracteres observables en la apariencia microscópica. Desafortunadamente estos marcadores son afectados por factores ambientales, que pueden enmascarar el efecto del gen o los genes de dichos rasgos heredables, sin embargo éstos seguirán siendo esenciales para analizar la variabilidad de las poblaciones a pesar de su limitado poder de discriminación sobre todo en individuos cercanamente relacionados o bajo diferentes condiciones ambientales (Amador, 1995).

Los marcadores bioquímicos que han sido utilizados más ampliamente en la taxonomía y la genética aplicada son las isoenzimas. Sin embargo, estos marcadores presentan las desventajas de que requieren de un proceso analítico especializado que incluye diferentes reactivos de tinción para cada sistema enzimático que se trabaje y el número de marcadores es insuficiente para muchas aplicaciones ya que presentan pocos polimorfismos. Por otro lado, estos marcadores también son susceptibles a efectos ambientales (Amador, 1995).

Los **marcadores moleculares** son aquellos que se refieren a diferencias en la información genética misma. Pueden ser de dos tipos: 1) secuencias de un gen o región particular, tales como la secuencia del ADN mitocondrial, de cloroplastos, y en general cualquier gen o genes para los cuales conocemos su secuencia(s); 2) polimorfismos en tamaño de fragmentos, tales como los RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms), RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms) y SSR (Simple Sequence Repeat polymorphisms like mini o microsatellites (Martínez, 2000).

Los marcadores moleculares también son conocidos como **marcadores del ácido desoxirribonucleico (ADN)**, ya que detectan **polimorfismos** en la secuencia de éste, utilizados para calibrar en un gel de electroforesis, el tamaño de otras muestras, son abundantes y aplicables a todos los organismos (Gil, 1997).

Los RFLP, RAPD, AFLP y SSP están siendo rápidamente incorporados al conjunto de técnicas utilizadas por taxónomos, genetistas y mejoradores (Kirby, 1992; Powell y col., 1996) por su gran cantidad de aplicaciones que va desde la medicina forense hasta protección legal por derecho de obtentor de híbridos y variedades y, por supuesto, el uso científico en el estudio de la ecología, biogeografía, diversidad genética, mejoramiento de plantas y animales, en la obtención de mapas genéticos, para generar huellas genómicas, en genética de poblaciones (taxonomía, diversidad y relaciones filogenéticas) y en evaluaciones de conservación de germoplasma, etc. (Staub y Serquen, 1996, Virk y col., 1995).

Estas técnicas tienen diversas ventajas sobre los marcadores moleculares tradicionales, de las que se pueden citar: a) analizan directamente el genotipo del organismo por lo que las influencias ambientales no representan ningún problema, b) son útiles en todos los organismos analizados a la fecha, c) siguen el tipo de herencia mendeliana, d) normalmente se detecta alto nivel de polimorfismo, e) el poder de discriminación de los marcadores basados en ADN es alto, f) se puede elegir la región de ADN adecuada para el estudio (altamente variables para estudios de paternidad o identificación de cultivares o regiones con variabilidad limitada para investigaciones filogenéticas, en el caso de RAPD y AFLP sirven para los dos tipos de análisis), g) son detectables en todos los tejidos y en todos los estados de desarrollo, h) debido a la posibilidad de producir mapas de ligamento, tienen el potencial de ser usados para estudiar caracteres poligénicos (Amador, 1995; Gil, 1997; López, 1999).

#### 4.2.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

El término PCR (Polimerasa Chain Reaction) se aplica al proceso bioquímico, *in vitro*, mediante el cual las cadenas individuales de ADN blanco o plantilla son duplicadas por la ADN polimerasa en cada uno de los ciclos que integran la reacción, al final de cada uno de los cuales las nuevas cadenas vuelven a ser duplicadas por la misma enzima, lográndose una producción exponencial de millones de copias del gen o segmento de ADN específico sometido al proceso (Arnheim y col., 1990; Barrera y col., 1993; Sardelli, 1993).

Esta técnica es utilizada para el aislamiento específico de fragmentos de ADN, identificación de nuevos genes, sus secuencias y mutaciones, cuantificación de ADN y ARN, reconstrucción de árboles filogenéticos, etc. (Hoy, 1994; Dyer y col., 1998).

La técnica de PCR requiere de un ADN plantilla, oligonucleótidos iniciadores específicos que flanquean el gen o segmento que actúa como blanco para la amplificación, mezcla de desoxinucleótidos trifosfatos (dNTP's), solución amortiguadora de reacción (buffer) y ADN polimerasa (tabla 1) (Innis y Gelfand, 1990; Rafalski y Tingey, 1993; Hoy, 1994).

El PCR trabaja bien con el ADN blanco pero usualmente tienen que ajustarse los parámetros de reacción para incrementar la especificidad y sensibilidad, así como la eficiencia, el aumento en el tamaño de los productos amplificados y el incremento en la versatilidad de amplificaciones a nivel de diagnóstico y de investigación. Estos parámetros críticos son la temperatura, el tiempo, el número de ciclos de amplificación y la estandarización de concentraciones de reactivos (oligonucleótidos, ion magnesio, ADN plantilla y dNTP's) (Innis y Gelfand, 1990; Sardelli, 1993; Wang y col., 1994; Hoy, 1994).

Cada uno de los ciclos de la reacción consta de tres pasos (tabla 1), los cuales están determinados por temperaturas y tiempos específicos, que son:

1. *Desnaturalización:* En este paso se separan las dos cadenas complementarias de ADN blanco. Las dos cadenas de doble hélice se separan completamente cuando todos los enlaces hidrógeno entre ellas se rompen. Este proceso de desnaturalización se lleva a cabo de los 92 a 98 °C en un tiempo de 30 a 90 segundos (Innis y Gelfand, 1990; Barrera y col., 1993; Sardelli, 1993; Hoy, 1994).

2. *Alineación:* Se realiza el apareamiento específico entre los oligonucleótidos iniciadores de la reacción y las cadenas simples del segmento de ADN blanco desnaturalizado. El alineamiento se efectúa a temperaturas de 36 a 60°C en un tiempo de 30 a 60 segundos (Barral y col., 1993; Cenis y col., 1993; Dyer y col., 1998).

3. *Extensión:* La ADN polimerasa extiende la longitud de los oligonucleótidos iniciadores apareados al ADN blanco al ir polimerizando los desoxinucleótidos libres, resultando en nuevas cadenas complementarias a las dos cadenas presentes al inicio de la reacción. Para esto se utilizan temperaturas de 70 a 74°C durante 30 a 90 segundos (Innis y Gelfand, 1990; Ellsworth y col., 1993; Barrera y col., 1993; Sardelli, 1993; Dyer y col., 1998).

El ciclo siguiente se inicia en el mismo tubo, con los mismos componentes de la mezcla de reacción, pero ahora contiene el doble de cadenas sencillas de ADN blanco que el anterior y finaliza convirtiendo éstas en cadenas dobles. La longitud del segmento amplificado por el PCR es el resultado de la suma de la longitud de los dos iniciadores más la distancia del ADN blanco flanqueado por éstos (Barrera y col., 1993).

No obstante, muchas veces es necesario establecer todos los parámetros de la reacción, desde el diseño de oligonucleótidos hasta el análisis del producto amplificado. Es común que en estos casos, al iniciar la estandarización del PCR, surjan dificultades tales como obtener niveles no detectables de producto amplificado, productos inespecíficos o la formación de

**Tabla 1.** Componentes, parámetros y pasos de cada ciclo de reacción en la PCR.

COMPONENTES Y PARÁMETROS	PASOS
1. Oligonucleótidos	1. Desnaturalización
2. ADN blanco	2. Alineación
3. ADN polimerasa	3. Extensión
4. Ion Magnesio	
5. Desoxinucleótidos	
6. Número de ciclos	
7. Temperatura	

**dímeros** de oligonucleótidos que compiten con el ADN blanco en la amplificación. En estas circunstancias es necesario variar cada uno de los parámetros hasta obtener condiciones óptimas para la reacción (Carbonari, y col., 1993). Los parámetros a estandarizar se describen a continuación.

*Oligonucleótidos.* La secuencia de los oligonucleótidos iniciadores es responsable de la amplificación específica del fragmento deseado y para su diseño es indispensable conocer la secuencia del ADN blanco. Los oligonucleótidos deben tener un tamaño que oscile entre 20 y 30 nucleótidos, un contenido de Guanina + Citosina (G + C) de aproximadamente el 50%, una distribución de bases azarosa, una temperatura media de fusión de 55°C, que no sean complementarios entre sí o con sí mismo sobre todo en el extremo 3' y que el tamaño del fragmento flanqueado por los oligonucleótidos no exceda de la capacidad de la polimerasa para la extensión (no mayor de 3000 pares de bases). Se deben evitar los oligonucleótidos con extensiones de **polipurinas** o **polipirimidinas** u otra secuencia inusual, también los que tengan secuencias con estructuras secundarias, especialmente en el extremo 3' (Innis y Gelfand, 1990; Sardelli, 1993; Hoy, 1994). Idealmente en cada 100 µl de reacción la

concentración aceptable de cada oligonucleótido oscila entre 0.05 y 1.0  $\mu\text{M}$ . El uso de concentraciones mayores favorece la amplificación de regiones inespecíficas y la formación de dímeros de oligonucleótidos (Barrera y col., 1993).

*ADN blanco.* La concentración de ADN blanco en la reacción depende de la fuente utilizada e idealmente se requieren aproximadamente de 300 ng a 1  $\mu\text{g}$  de ADN genómico. En caso de usar genes clonados en plásmidos, de 25 a 10 ng de su ADN son más que suficientes. Alternativamente, pueden utilizarse cantidades menores de ADN en la amplificación de genes que existen en varias copias del ADN blanco, o mayores cantidades cuando se utiliza el mismo par de oligonucleótidos para amplificar varios genes pertenecientes a una misma familia (Innis y Gelfand, 1990; Barrera, y col., 1993; Hoy, 1994). Es importante procurar que el ADN blanco este libre de proteasas exógenas, y endógenas, así como de nucleasas, altos niveles de sales y proteínas que precipiten al calor, debido a que pueden degradar o inhibir la actividad de la enzima ADN polimerasa. Las concentraciones muy altas de ADN pueden producir productos inespecíficos o inhibir la reacción (Barrera, y col., 1993; Hoy, 1994).

*ADN polimerasa.* La Taq ADN polimerasa fue aislada de la bacteria *Thermus aquaticus*, la cual habita en aguas termales, por lo cual puede resistir repetidas exposiciones a temperaturas superiores de 94 – 95°C. Esta enzima no tiene actividad de exonucleasa 3'-5' (correctora de pruebas), pero tiene actividad de exonucleasas 5' a 3' durante la polimerización. Esto indica que el índice de error de incorporación es de  $10^{-4}$  nucleótidos por ciclo. (Hoy, 1994; Barrera y col., 1993; Sardelli, 1993). La mayoría de los protocolos recomienda el uso de 1 a 2.5 unidades de enzima por cada reacción de 100  $\mu\text{l}$ . Para establecer la cantidad mínima de enzima requerida para una amplificación exitosa y generar cantidades óptimas de producto, deben realizarse titulaciones en gamas que van de 0.5 a 5 unidades por reacción. Esto

disminuye la amplificación inespecífica, que evidencia la presencia de barridos al analizar el producto amplificado en un gel (Barrera y col., 1993).

*Ion Magnesio.* La concentración del ion Magnesio es determinante en la especificidad de la reacción. Concentraciones muy altas conducen a una baja especificidad, mientras que las concentraciones mínimas disminuyen el índice de incorporación errónea de nucleótidos. Para una reacción estándar se recomienda una concentración entre 0.5 y 2.5 mM. Si se disminuye demasiado la concentración de magnesio, la actividad de la enzima decae al grado de que algunas veces la amplificación es nula (Innis y Gelfand, 1990; Hoy, 1994).

*Desoxinucleótidos.* Una concentración mínima necesaria disminuye el índice de incorporación errónea de nucleótidos, mientras que concentraciones muy altas disminuyen la especificidad de la reacción. Concentraciones entre 20 y 200  $\mu\text{M}$  proporcionan resultados óptimos, debiéndose igualar la concentración de cada uno de los cuatro desoxinucleótidos en concentraciones equimolares (Innis y Gelfand, 1990; Hoy, 1994).

*Número de ciclos.* El nivel de amplificación del ADN en el PCR aumenta en forma exponencial con cada ciclo. Sin embargo después de determinado número de ciclos, la amplificación se detiene gradualmente. Entra primero a una fase lineal y luego a una estacionaria, a la que se denomina fase de meseta. Esta última se debe al agotamiento de la actividad enzimática y a la insuficiencia para llevar a cabo la extensión del número masivo de complejos ADN blanco-oligonucleótidos presentes en los ciclos que anteceden a este fenómeno (Barrera, y col., 1993). Esto puede prevenirse si se aumenta el tiempo de extensión en los últimos ciclos de la reacción o la cantidad de enzima. El número de ciclos promedio oscila entre 20 y 30, dependiendo de la cantidad de ADN inicial, procurando no poner más de 40 ciclos de amplificación, pues se corre el riesgo de incrementar los productos inespecíficos.



Obviamente muy pocos ciclos dan poca concentración del producto (Innis y Gelfand, 1990; Hoy, 1994).

*Temperaturas.* Las temperaturas de desnaturalización y extensión son generalmente estándares para todas las reacciones. La temperatura que tiene el efecto más crítico en la especificidad es la de alineación, la cual está determinada principalmente por la temperatura media de fusión de los oligonucleótidos. Cuando la temperatura de alineación es muy baja existe mayor posibilidad de que los oligonucleótidos se apareen en regiones no específicas del ADN blanco y pueden también ser extendidos, toda vez que la polimerasa Taq posee actividad aún a bajas temperaturas. Si se utilizan temperaturas de hibridación (55 - 65 °C) se reducen grandemente los sucesos de apareamiento inespecífico (Barrera, y col., 1993).

#### 4.2.2. Polimorfismos del ADN amplificadas al azar (RAPD's).

Los RAPD's son generados en base a una modificación de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa. En lugar de utilizar un par de oligonucleótidos iniciadores específicos para amplificar un segmento de ADN, se usa un oligonucleótido de secuencia nucleotídica arbitraria (9 a 10 bases). Los oligonucleótidos iniciadores pueden ser designados sin ninguna información previa de la secuencia de nucleótidos del organismo en estudio. La única condición es que los oligonucleótidos tengan un contenido de G + C entre 50 y 80% y sin la presencia de **repetidos invertidos** (Williams y col., 1990; Welsh y Mc Clelland, 1990). Los polimorfismos se pueden deber a cambios en una o más bases en la secuencia homóloga al oligonucleótido, a deleciones en el sitio de apareamiento inicial y a inserciones o deleciones que pueden cambiar el tamaño de un segmento de ADN. El número de fragmentos obtenidos es dado por la probabilidad de que una secuencia de ADN complementaria al oligonucleótido

esté presente en ambas cadenas en orientación opuesta y a una distancia tal que permita su amplificación por PCR (Waugh y Powell, 1992). Los polimorfismos entre los productos amplificados son detectados en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio (Fig. 9).

Los RAPDs son una herramienta muy poderosa por su simplicidad y la calidad de los datos que proporcionan, por lo cual han sido utilizados previamente en algunos estudios de diversidad genética y en relaciones filogenéticas entre insectos. Un ejemplo es *Diuraphid noxia* (Mordvilko) (Homoptera: Aphididae) o pulgón ruso del trigo que es una plaga importante en granos pequeños incluyendo trigo y cebada. Este insecto es originario del Medio Oriente, Asia Menor y Sur de Rusia, pero fue esparcido accidentalmente en Sudáfrica, México y Estados Unidos. Puterka y colaboradores (1993) hicieron un análisis extensivo de la variación genética y la relación entre colecciones de *D. noxia* usando RAPDs. Ellos encontraron que parte de las poblaciones francesa, sudafricanas, mexicanas y estadounidenses tienen un origen común y Turquía puede ser su origen. Los datos sugieren que la dispersión fue hecha por transporte humano más que por migración.

En la "mosquita" blanca de la papa *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae), se encontró el biotipo "B" el cual dispersó graves problemas agrícolas en Estados Unidos en 1992, pero su condición de especie y origen permaneció en controversia hasta que Gawal y Bartlett (1993) mostraron diferencias consistentes en el ADN de *B. tabaci*, entre los biotipos "A" y "B" usando RAPDs con 20 oligonucleótidos iniciadores, sugiriendo que son especies separadas más que biotipos de la misma especie.

Dyer y colaboradores (1998) usaron la técnica RAPD para demostrar la variabilidad inter e intraespecífica en lombrices de tierra *Aporrectodea* spp. (Oligochaeta: Lumbricidae), entre poblaciones australianas y lombrices introducidas desde Europa. Después de haber encontrado similitud molecular entre individuos y poblaciones de *Aporrectodea*, se pretende

utilizar nuevamente el análisis RAPD con el fin de hallar el origen de éstas exóticas lombrices y proporcionarles su habitat ecológico más apropiado.

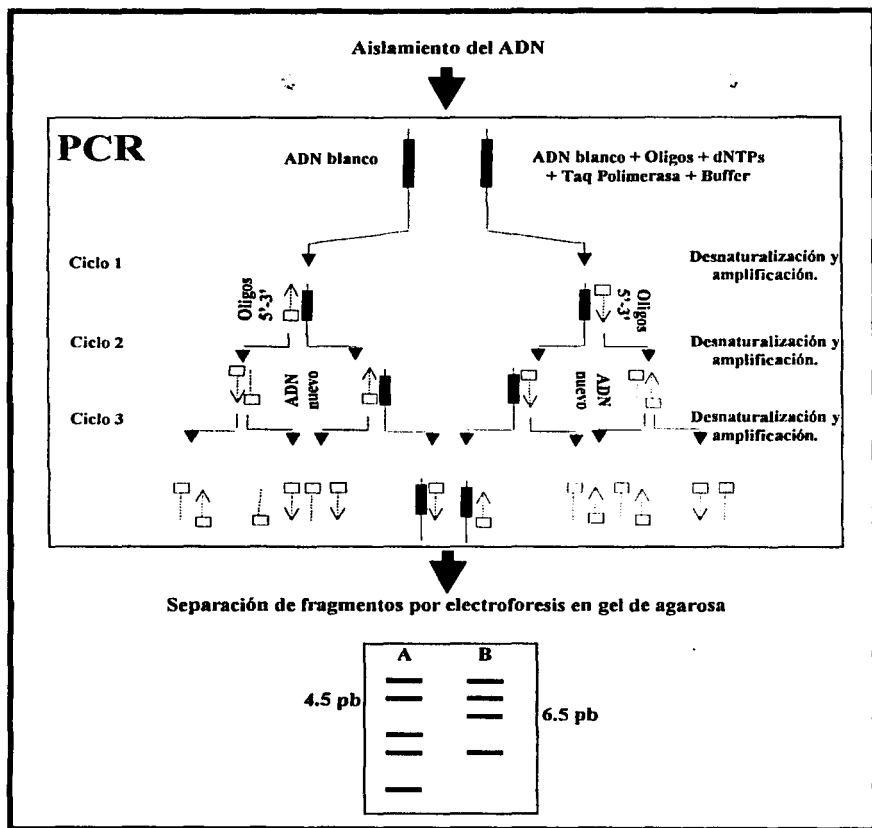


Figura 9. Proceso de obtención de los marcadores RAPD por PCR.

#### **4.2.3. Polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP's).**

Esa técnica se basa en la amplificación selectiva por la reacción en cadena de la polimerasa de fragmentos de restricción provenientes de una digestión total de ADN genómico. En esta técnica se corta el ADN genómico con enzimas de restricción, seguido de una ligación de adaptadores específicos a los extremos terminales cortados y una amplificación con oligonucleótidos iniciadores homólogos a las secuencias de los adaptadores con la adición de una base selectiva (Vos y col., 1995; Zabeau y Vos, 1993).

Para reducir el número de productos amplificados se lleva a cabo una segunda amplificación con oligonucleótidos que contienen tres bases selectivas en lugar de una y que generalmente tiene como resultado de 50 a 100 fragmentos amplificados, los cuales son separados en geles de poliacrilamida y visualizados por autoradiografía (Zabeau y Vos, 1993).

Los polimorfismos en AFLP's dependen del reconocimiento de sitios de restricción en el ADN por parte de las enzimas, de la relación entre el número de nucleótidos selectivos de los oligonucleótidos iniciadores y de la complejidad del genoma (Caetano y Gresshoff, 1997).

Los AFLP's además de su uso en fitomejoramiento, se han usado en mapeo genético y en biología de poblaciones. Aunque han sido usados como **codominantes**, normalmente son **dominantes/recesivos**. Su gran ventaja son los múltiples **loci** que se ven simultáneamente, su consistencia y reproducibilidad (Ellsworth y col., 1993; Zabeau y Vos, 1993; Vos y col., 1995).

#### **4.2.4. Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP's).**

Las enzimas de restricción reconocen y cortan el ADN en una secuencia específica (sitio de restricción), generando una serie de fragmentos que pueden ser separados por

**electroforesis** en geles de agarosa. Si dos individuos difieren en tan solo una base en el sitio de restricción, la enzima cortará el ADN de uno pero no el del otro y generará fragmentos de diferente longitud. Debido a que generalmente se produce un gran número de estos fragmentos, para su identificación es necesario transferirlos a un filtro de nylon o nitrocelulosa después de que han sido separados por electroforesis. El ADN inmovilizado se hibrida con una sonda marcada radiactivamente. Las sondas generalmente son pequeñas (de 500 a 3000 pb) y pueden ser obtenidas de ADN complementario, ADN genómico o de un oligonucleótido sintético. El filtro se pone en contacto con una película fotográfica en donde las desintegraciones radiactivas de la sonda resultan en bandas visibles. Actualmente existen métodos de detección que no utilizan radioactividad (Tijssen, 1993). Los polimorfismos en una longitud de los fragmentos de restricción son visualizados como diferencias en los patrones de bandeo que representan variación a nivel de ADN (Cloutier y Landry, 1994; Staub y Meglic, 1993; Staub y Serquen, 1996). Su principal ventaja es que son codominantes y es posible diferenciar los individuos heterocigotos de los homocigotos (Amador, 1995).

#### **4.2.5. Repeticiones de Secuencias Simples (SSR o satélites).**

Es una secuencia simple de ADN altamente repetida que difiere significativamente en la composición de sus bases, en la mayoría del ADN de los eucariotes. Los satélites de ADN son ricos en secuencias Adenina + Timina (A + T) o secuencias G + C y son encontrados en un **tándem largo** colocados dentro de las regiones **heterocromáticas** de los cromosomas. Algunas veces los satélites son llamados **minisatélites** o **microsatélites** dependiendo de la longitud de las secuencias repetidas (Hoy, 1994; Caetano y Gresshoff, 1997). Los **minisatélites** contienen de 16 a 64 pares de bases por secuencia repetida, mientras que los **microsatélites**

contienen de 2 a 6 pares de bases. Ambos son utilizados como sondas para la identificación de individuos (Sharon y col., 1995).

#### 4.3. Electroforesis.

Es un método usado para separar moléculas en un campo eléctrico de acuerdo a su carga neta, forma y tamaño (Caetano y Gresshoff, 1997). Las moléculas de ADN y ARN son separadas por tamaño y visualizadas por electroforesis en un gel de agarosa o acrilamida. La electroforesis es una herramienta poderosa que nos permite separar la mezcla de moléculas de ácidos nucleicos de cadena simple o doble. Los ácidos nucleicos pueden ser visualizados, *in situ*, directamente en el gel e incluso pueden ser recuperados del gel por varios métodos en pasos subsecuentes en un protocolo particular. En un pH cercano a la neutralidad, el ADN lineal está cargado negativamente y migra desde el cátodo al ánodo en un gel con una movilidad que depende del tamaño del fragmento, del voltaje aplicado, de la composición del buffer de electroforesis, de la composición de la base, de la concentración del gel y de la temperatura. Moléculas de ADN de 0.1 a 60 Kb pueden ser detectadas con geles que contienen diferentes porcentajes de agarosa. De esta manera, es posible separar el ADN de 0.1 a 3 Kb de largo en geles al 2%, el ADN de 0.8 – 10 Kb de largo en geles al 0.7 % y el ADN de 5 – 60 Kb de largo en un gel al 0.3 %. La electroforesis en geles de agarosa usualmente se corre a temperatura ambiente, excepto los de bajo porcentaje de agarosa (< 0.5%), los cuales son más fáciles de manejar a bajas temperaturas y tal vez se fundan si se corren rápido a temperatura ambiente (Hoy, 1994).

El bromuro de etidio es el colorante utilizado para detectar los ácidos nucleicos de cadena simple o doble en un gel de agarosa. Frecuentemente se incorpora dentro del gel y se

corre en un buffer. También los geles pueden teñirse después de la electroforesis, colocándolos en un buffer que contenga bromuro de etidio por 30 minutos (Barrera, y col., 1993; Hoy, 1994).

Un ADN tan pequeño como 0.05  $\mu\text{g}$  puede ser visualizado en una banda cuando el gel es expuesto a luz ultravioleta (UV). El complejo ácido nucleico-bromuro de etidio absorbe la irradiación UV alrededor de los 260 ó 300 nm (Hoy, 1994).

#### 4.4. Métodos de Análisis.

Los patrones electroforéticos de ADN obtenidos en los distintos métodos de evaluación de la diversidad genética representan datos cualitativos los cuales se convertirán en estimaciones cuantitativas calculando la "distancia genética", sabiendo que la ésta es un estimado cuantitativo de que tan divergentes genéticamente son dos secuencias, individuos o taxas (formalmente llamados Unidades Taxonómicas Operacionales o UTO) que forman una población (Fig. 10) (Avice, 1994; Gil, 1997).

Las unidades de la distancia genética dependen de la naturaleza de la información molecular resumida. Se han desarrollado distintos métodos estadísticos para estimar la distancia genética en los diferentes tipos de datos moleculares, entre los cuales destacan, la distancia genética estándar de Nei (1972), de Jaccard (Sneath y Sokal, 1973), de Nei y Li (1979) y de Skroch (Skroch y col., 1992). Todos los métodos son útiles dependiendo de la información obtenida y generan normalmente una matriz de distancia que representa las relaciones filogenéticas entre los individuos analizados (Fig.10) (Avice, 1994).

Uno de los modelos más utilizados para estudiar variación genética es el descrito por Nei y Li (1979), en el que el grado de similitud puede ser cuantificado determinando la fracción de marcadores compartidos entre dos individuos que han sido comparados, pero al igual que el método de Jaccard (Sneath y Sokal, 1973), no toman en cuenta la ausencia de un marcador en ambos individuos (0,0). Skroch y col. (1992) describieron un método simple para determinar distancia genética, asignan el valor de 1 para una diferencia y 0 para una similitud. Si dos genomas son idénticos, el estimado de la distancia genética será 0, lo que indica que en los patrones de fragmentos de estos individuos analizados no se observó ninguna diferencia (individuos estrechamente relacionados) y una distancia de 1 implica que no se encontraron fragmentos comunes entre los individuos (individuos muy alejados).

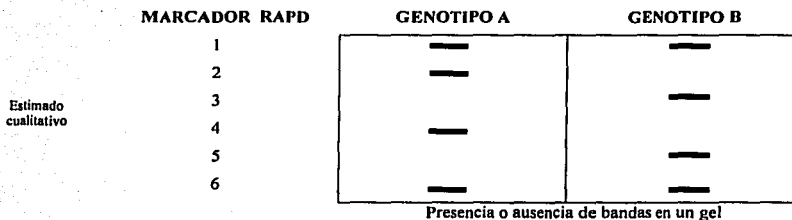
Estos métodos estadísticos agrupan técnicas multivariadas que se conocen como análisis de conglomerados o análisis de grupos. Para visualizar esta información se representa en un sistema de reconstrucción de filogenia, llamados dendogramas, los cuales son representaciones gráficas que consisten de nodos (unidades taxonómicas) y ramas (rutas conectando a los nodos) que describen las relaciones evolutivas entre organismos (Avice, 1994; Gil, 1997).

Los métodos de matriz para construir dendogramas pueden ser tres: 1) Método de la distancia promedio o UPGMA (unweighted pair group with arithmetic average), también conocido como promedio aritmético no-ponderado por pares; 2) Método del vecino cercano o distancia mínima y 3) Método del vecino lejano o distancia máxima. Los métodos o algoritmos para la obtención de dendogramas difieren entre sí en la forma en que se mide la distancia entre grupos. Para calcular el algoritmo general de agrupamiento jerárquico utilizando distancias o disimilaridades, primero se localiza el elemento menor de la matriz y se forma un grupo con los individuos involucrados (en caso de empate, seleccionar el primer par



encontrado), como segundo paso se construye una matriz nueva con las distancias entre grupos (aquí es necesario haber seleccionado la definición de distancia entre grupos) y por último, si la matriz tiene más de un elemento mayor a cero, repetir el primer paso con la matriz construida en el segundo paso (Martínez, 2000).

a)



b)

MARCADOR RAPD		GENOTIPO A	GENOTIPO B	A - B
Estimado cualitativo  0-similitud 1-diferencia	1	1	1	0
	2	1	0	1
	3	0	1	1
	4	1	0	1
	5	0	1	1
	6	1	1	0

c)

$$\begin{aligned}
 \text{Distancia genética (A, B)} &= \frac{\sum |A-B|}{n} \\
 &= 4 / 6 \\
 &= 0.67
 \end{aligned}$$

Estimado  
cuantitativo

Figura 10. Determinación de la distancia genética a partir de una comparación de marcadores RAPDs.

a) Patrón electroforético obtenido en dos genotipos; b) Codificación para los genotipos A y B basada en los patrones mostrados en(a); c) Cálculo de la distancia genética. (Skroch y col., 1992).

## V. MATERIALES Y METODOS.

### 5.1. Cultivo de insectos.

Se utilizaron tres colonias de *P. truncatus*, dos procedentes de África, Togo y Tanzania, y una de México. Las colonias africanas fueron proporcionadas por el Profesor Robert Smith de la Universidad de Leicester y la colonia mexicana fue capturada a los alrededores del CINVESTAV- IPN, Unidad Irapuato. Las tres colonias se han mantenido confinadas desde 1994 en frascos de vidrio de un litro de capacidad con tapas metálicas con un orificio al centro cubierto con papel filtro para evitar la salida de insectos y permitir la ventilación de las colonias. La variedad de maíz empleada fue cacahuazintle, el cual se trató, antes de su inoculación con insectos, colocándolo en bolsas de polietileno durante tres días a  $-20^{\circ}\text{C}$ , lo que permitió evitar una posible infestación interna *per se* que contamine las colonias. Después de la congelación, las bolsas se mantuvieron a temperatura ambiente ( $25 - 27^{\circ}\text{C}$ ) durante tres días antes de la inoculación, para la cual se prepararon frascos con 200 g de maíz y se introdujeron 15 granos infestados con insectos adultos y larvas. Se incubaron a temperatura ambiente, reinoculándose en frascos con maíz limpio cada dos o tres meses aproximadamente. La obtención de larvas se llevó a cabo usando tamices de 710  $\mu\text{m}$  y 1.70mm de apertura, con el fin de separarlas de la harina y del maíz entero. Se tomaron sólo las larvas vivas, para poder obtener un ADN en buen estado y concentración.

## 5.2. Extracción y cuantificación del ADN.

Para aislar el ADN de *P. truncatus* se probaron tres métodos: 1) el método utilizado por Vandemark y col. (2000), empleado para aislar ADN de hongos; 2) el método descrito por Cenis y col. (1993) donde aislaron ADN de áfidos y; 3) el método de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) (Apéndice) descrito por Doyle y Doyle (1990) con algunas modificaciones.

1) Método utilizado por Vandemark y col. (2000). Se pesaron 0.5 g de larvas, conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , macerándolas con nitrógeno líquido y carborandum (como abrasivo) hasta obtener un polvo fino. Las larvas maceradas se colocaron en tubos para centrifuga de 50 ml con 3 ml de buffer de extracción (Apéndice) mezclando por 2 minutos. Posteriormente, para la extracción, se agregó un volumen igual al obtenido en la separación, de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (24:24:1) y se agitó por 10 minutos. Después, la mezcla se centrifugó por 20 minutos a 8 000 rpm y  $4^{\circ}\text{C}$ , se separó el sobrenadante y se le agregó un volumen igual al obtenido en la separación, de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), volviendo a centrifugar por 20 minutos a 8 000 rpm y  $4^{\circ}\text{C}$ . Se separó la parte superior y se agregó 0.5 del volumen, obtenido en la separación, de acetato de amonio 7.5 M y 2.5 volúmenes de etanol al 100%, dejando precipitar toda la noche. Al día siguiente se centrifugó por 15 minutos a 2 000 rpm y  $4^{\circ}\text{C}$ ., después se eliminó el sobrenadante, se agregó etanol al 70 % y se agitó por 10 minutos. Posteriormente se centrifugó por 15 minutos a 8 000 rpm y  $4^{\circ}\text{C}$ , se eliminó el etanol y se escurrió la pastilla la cual fue resuspendida en 1 ml de  $\text{T}_{10}\text{E}_1$ , pH = 8.0 (Apéndice). Las muestras se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

2) Método descrito por Cenis y col. (1993). Se tomaron 10 larvas colocándolas en un tubo de 500  $\mu\text{l}$  agregándoles nitrógeno líquido y macerándolas con una varilla esmerilada.

Posteriormente se les agregó 200 µl de buffer de extracción (Apéndice) y 100 µl de acetato de amonio 2.5 M, incubando a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos. Después se centrifugó 5 minutos a 14000 rpm, a continuación se transfirió el sobrenadante a otro tubo, adicionando un volumen igual al obtenido en la separación, de isopropanol y después de incubar a temperatura ambiente por 15 minutos se centrifugo a 14 000 rpm por 20 minutos y  $4^{\circ}\text{C}$ . Se eliminó el sobrenadante, se lavó la pastilla con etanol al 70% y posteriormente se secó la pastilla a  $55^{\circ}\text{C}$  por 2 minutos. La pastilla se resuspendió en 100 µl de  $\text{T}_{10}\text{E}_1$ ,  $\text{pH} = 8.0$  (Apéndice). Las muestras se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

3) Método descrito por Doyle y Doyle (1990). Se pesaron 0.5g. de larvas, conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , macerándolas con nitrógeno líquido y carborandum (como abrasivo) hasta obtener un polvo fino. Las larvas maceradas se colocaron en tubos para centrifuga de 50 ml con 5 ml de buffer CTAB precalentado en baño María a  $60^{\circ}\text{C}$ , incubándose 30 minutos con agitación ocasional y suave. Posteriormente se agregaron 5 ml de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (24:24:1), centrifugándose por 15 minutos a 6 000 rpm y  $4^{\circ}\text{C}$ . Después de separar la fase superior se le agregó un volumen, igual al obtenido en la separación, de cloroformo:isoamílico (24:1) centrifugándose por 15 minutos a 6 000 rpm y  $4^{\circ}\text{C}$ . Se separó la fase superior y se agregó 0.7 del volumen, obtenido en la separación, de isopropanol dejando precipitar por 24 horas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . A continuación se centrifugó por 10 minutos a 4 000 rpm y  $4^{\circ}\text{C}$ , se eliminó todo el sobrenadante y se lavo la pastilla con 5 ml de etanol al 70%. Se centrifugó por 10 minutos a 5 000 rpm y  $4^{\circ}$ , después de dejó escurrir la pastilla lo más posible, invirtiendo el tubo cuidando que ésta no se caiga. La pastilla se disolvió en 1 ml de agua destilada, desionizada y estéril a  $60^{\circ}\text{C}$  en baño María por 12 minutos, moviendo suavemente a intervalos de 4 minutos. Las muestras se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

Las concentraciones de ADN se determinaron mediante las lecturas de absorbancia a 260 nm en el espectrofotómetro Beckman DU- 50, con celda de cuarzo de 1 cm, en una dilución de 1 a 50.

$$[\mu\text{g}/\mu\text{l ADN}] = \frac{\text{Absorbancia 260 nm. X factor de dilución}}{\text{Coeficiente de extinción con haz que atraviesa 1 cm}}$$

La pureza del ADN se estimó mediante el cociente de las absorbancias a 260 y 280 nm. Una preparación pura de ADN tiene un cociente aproximado a 2.0, entre menos pureza, el cociente será significativamente menor (Sambrook y col. 1989).

La electroforesis se llevó a cabo en un gel de agarosa (Gibco BRL) al 1% en TBE (Apéndice). Se corrió un volumen de 20  $\mu\text{l}$ , el cual contenía: 2  $\mu\text{l}$  de ADN, 4  $\mu\text{l}$  de buffer de corrida 6X (Apéndice) y 14  $\mu\text{l}$  de agua destilada, desionizada y estéril. Como marcador de peso molecular se utilizaron 5  $\mu\text{l}$  de  $\lambda$  Hind III a una concentración de 0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (Gibco BRL) con 4  $\mu\text{l}$  de buffer de corrida 6X y 11  $\mu\text{l}$  de agua destilada, desionizada y estéril. La visualización del ADN se hizo sumergiendo el gel por 5 minutos en una solución de bromuro de etidio a una concentración de 4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  y lavándolo en agua destilada por 10 minutos. Los geles se observaron y se fotografiaron sobre un transiluminador de luz UV con el equipo Fotodyne Incorporated Foto/ Eclipse.

De acuerdo a lo observado en la fotografía del ADN y comparando con el estándar de  $\lambda$  Hind III, se asumió que el 60 % de la muestra es ARN, por lo que se ajustó la concentración del ADN para tener 20  $\text{ng}/\mu\text{l}$ .

### 5.3. Estandarización de los RAPDs.

Para estandarizar las condiciones se probaron dos concentraciones de ADN y dos concentraciones de  $MgCl_2$ . Los volúmenes de reacción fueron de 25  $\mu$ l, conteniendo 40 u 80 ng del ADN total de las diferentes colonias de *P. truncatus* y como organismo de comparación se utilizó ADN de *Sitophilus zeamais*; 1.5 mM ó 3.0 mM de  $MgCl_2$  (Perkin Elmer), 2.5 U de Ampli Taq, ADN polimerasa (Perkin Elmer); 1.25 mM de desoxinucleótidos Gene Amp d'NTP (Perkin Elmer); 2.5  $\mu$ l de solución amortiguadora Buffer II (Perkin Elmer) y 15ng de oligonucleótidos del KIT OPA (Operon Technologies), aforando con agua destilada, desionizada y estéril. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400, dando un precalentamiento a 94°C por 2 minutos, después se programaron 35 ó 40 ciclos con las siguientes temperaturas y tiempos: para la desnaturalización 94°C por 1 minuto, para el alineamiento de 37°C ó 40°C por 1 minuto y para la extensión 72°C por 1 minuto, teniendo una extensión final de 7 minutos a 72°C.

### 5.4. Electroforesis de los RAPDs.

La separación de los fragmentos amplificados se realizó en una cámara horizontal de electroforesis (Horizon 11-14 de Life Technologies) en un gel de agarosa al 1% en TBE y un promedio de 80 volts durante cuatro horas. El volumen de muestra que se corrió fue de 29  $\mu$ l por pozo, 25  $\mu$ l del producto PCR y 4  $\mu$ l de Buffer de corrida 6X (Apéndice), al igual que el de los marcadores de peso molecular:

- 1) 5  $\mu$ l de  $\lambda$  Hind III (Gibco BRL, [0.2  $\mu$ g/ $\mu$ l]), 4  $\mu$ l de buffer de corrida y 20  $\mu$ l de agua destilada, desionizada estéril.
- 2) 4  $\mu$ l de 123 pb (Gibco BRL [1  $\mu$ l/ $\mu$ g]), 4  $\mu$ l de buffer de corrida y 21  $\mu$ l de agua destilada, desionizada estéril.

Para su visualización los geles se sumergieron por 20 minutos en una solución de bromuro de etidio a una concentración de 4  $\mu$ g/ $\mu$ l, y se lavó con agua destilada por 10 minutos. La fotografía se tomó sobre un transiluminador de luz UV con una película Kodak TRI-X Pan film de 10.2 x 12.7 cm., con una cámara Polaroid MP4 land, con una exposición de 20 segundos. El revelado se hizo en un procesador Kodak X-OMAT M20.

## **5.5. Análisis de datos para construir dendogramas.**

### **5.5.1. Cálculo de la distancia genética.**

Los patrones de fragmentos amplificados (bandas) que se obtuvieron con cada oligonucleótido fueron identificados por medio del programa Quantity One para generar una matriz de datos. Estos datos fueron codificados numerándolos consecutivamente a partir de su origen de migración en el gel de agarosa, es decir la parte superior de éste (Fig. 10a), con un "1" para indicar presencia y un "0" para indicar ausencia de bandas, donde las columnas son las colonias y las filas los fragmentos polimórficos (Fig. 10b). Con esta matriz de datos (1 y 0) se determinaron matrices de distancia genética mediante la comparación entre cada par de genotipos utilizando los métodos de Jaccard (similitud) y Skroch (disimilitud). Estas matrices contienen las distancias entre todos los posibles pares de individuos (Fig. 10c).

### **5.5.2. Análisis de agrupamientos.**

El dendograma se construyó a partir de cada una de las matrices de distancia genética por el análisis de agrupamiento utilizando el método UPGMA, con los programas de computadoras S-Plus versión 4.0 para Windows y NTSYS versión 2.0 para Windows. Para calcular los límites de confianza de los dendogramas obtenidos, se usó el método de bootstrapping de Felsenstein, (1985).



## **VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

La utilidad de un sistema de marcador dado es un balance entre el nivel de polimorfismos detectado (contenido de información) y el grado en el cual el análisis puede identificar múltiples polimorfismos (Powell y col. 1996), por lo que en este análisis de resultados frecuentemente nos referiremos a ellos.

### **6.1. Estandarización de las condiciones.**

Los RAPD's requieren de un alto nivel de estandarización en la amplificación de sus productos para que éstos sean reproducibles, confiables y consistentes (Carbonari y col., 1993) ya que el patrón de bandeo puede variar entre experimentos dentro de un mismo laboratorio y aún más entre laboratorios (Ellsworth y col., 1993) por lo cual, este estudio se realizó bajo condiciones estrictamente controladas.

Los parámetros de estandarización evaluados son: calidad y cantidad de ADN, cantidad de  $MgCl_2$ , temperaturas de reacción y número de ciclos.

**ADN.** Uno de los principales problemas en el aislamiento del ADN es la obtención de bajos rendimientos y poca pureza. Por lo cual en este trabajo tuve la necesidad de probar tres métodos de extracción de ADN, tal y como se menciona en materiales y métodos.

En la tabla 2 podemos observar que los métodos de hongos y CTAB presentan mejor concentración de ADN, sin embargo es notorio que la pureza presentada por el método de CTAB se acerca más al valor adecuado (2.0) (Sambrook, y col. 1989), por lo que fue este último método el seleccionado para la amplificación por PCR. El estado y concentración del

ADN fue corroborado con la relación de absorbancias a 260 y 280 nm y su visualización por electroforesis.

**Tabla 2.** Comparación de los métodos de extracción.

MÉTODOS DE EXTRACCIÓN	CONCENTRACIÓN DE ADN ( $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ )	ÍNDICE DE PUREZA 260nm / 280 nm	REFERENCIA
CTAB	2.50	1.8039	Doyle y Doyle, 1990.
Hongos	2.60	0.8575	Vandemark y col., 2000.
Afidos	1.35	1.5973	Cenis y col., 1993.

La cantidad de ADN utilizada para la amplificación por PCR no se consideró determinante, ya que tanto con los 40 ng como con los 80 ng de ADN plantilla utilizados hubo una amplificación eficiente de varios productos RAPD's, generando un buen patrón de bandedo con ambas cantidades de ADN.

**MgCl<sub>2</sub>.** Es este parámetro fue el que más influyó en la obtención de información por medio de productos RAPD's, ya que el ion Mg<sup>2+</sup> ayuda a estabilizar la cadena doble del DNA, sin embargo el exceso de este ion promueve la producción de productos no específicos o bien artefactos dímeros del oligonucleótido.

En la concentración alta (3.0 mM) se observó ausencia de bandas y/o presencia de barridos que no nos permitieron identificar y cuantificar los polimorfismos. El mayor número de polimorfismos con definición más clara y reproducibilidad, fueron obtenidas al utilizar 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub> en comparación de 3 mM, Wang y col. (1994) encontraron que una concentración baja de MgCl<sub>2</sub> (1.5mm) fue óptima para producir patrones RAPD's claros, lo cual concuerda con estos resultados.

**Temperaturas.** Las temperaturas de desnaturalización y extensión utilizadas en este trabajo son las que se emplean en la mayoría de los protocolos RAPD's, sin embargo, como ya ese mencionó en la revisión de literatura, la temperatura que tiene un efecto más crítico en la especificidad es la de alineación (Barrera y col. 1993). La temperatura de alineación de 37°C no presentó el mismo número de bandas en cada repetición, es decir se pierden bandas y el bandeo presentado es poco claro, por tanto la temperatura de alineación con la que se obtuvieron el mismo número de bandas por repetición y patrones de bandeo más claros, fue la de 40°C, tal y como lo reportan Williams y col.(1990).

**Número de ciclos.** El número de ciclos promedio oscila entre 20 y 35 según reportan Barrera y col. (1993) , sin embargo, el número de ciclos que nos proporcionó polimorfismos claros y reproducibles fue el de 40 ciclos en comparación con los 35 ciclos evaluados.

Las condiciones estándares de los parámetros que nos permitieron realizar el presente trabajo se muestran en la Tabla 3 y Figura 11.

**Tabla 3.** Condiciones Estándares para la Realización de los RAPD's.

COMPONENTES	CONCENTRACION EN 25µl DE REACCIÓN
ADN Total	80 ng
MgCl <sub>2</sub>	1.5 mM
Taq polimerasa	2.5 U
Desoxinucleótidos (cada uno)	1.25 mM
Buffer	2.5 µl
Oligonucleótidos	15 ng

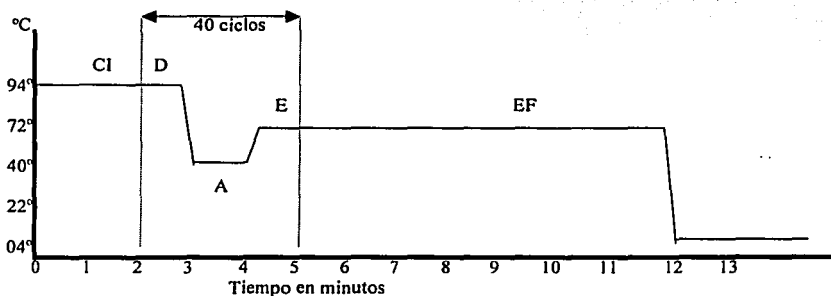


Figura 11. Tiempos y temperaturas estándares. Calentamiento inicial (CI) 94°C por 2 minutos, 40 ciclos a 94°C para la desnaturalización (D) por 1 minuto, 40°C para la alineación (A) por 1 minuto, 72°C para la extensión (E) por 1 minuto. Extensión final (EF) a 72°C por 7 minutos.

## 6.2. Selección de los oligonucleótidos.

De los 20 oligonucleótidos probados, 2 no amplificaron y 18 mostraron evidencia de polimorfismos. Sin embargo, solamente 10 fueron seleccionados para la evaluación final ya que presentaron buen número de polimorfismos, bandeo claro y reproducibilidad. La secuencia de los oligonucleótidos seleccionados y el total de fragmentos polimórficos amplificados se muestran en la Tabla 4.

Solamente se tomaron en cuenta para el análisis, las bandas reproducibles en dos corridas independientes.

Estos diez oligos produjeron un total de 161 bandas. El número total de bandas por oligonucleótido varió de 13 (OPA-07) a 20 (OPA-13) con un promedio de 16.1 bandas por

oligonucleótido, y el tamaño de las bandas vario de 123 a 2583 pb tal y como lo reportan Black IV y col., (1992).

**Tabla 4. Secuencias y Número de Bandas Amplificadas por los Oligonucleótidos seleccionados**

CODIGO	5' A 3'	FRAGMENTOS DE AMPLIFICACIÓN MONOMÓRFICA	FRAGMENTOS DE AMPLIFICACIÓN POLIMÓRFICA
OPA-01	CAGGCCCTTC	3	13
OPA-06	GGTCCCTGAC	2	14
OPA-07	GAAACGGGTG	1	12
OPA-08	GTGACGTAGG	2	13
OPA-11	CAATCGCCGT	3	13
OPA-13	CAGCACCCAC	2	18
OPA-15	TTCCGAACCC	5	12
OPA-16	AGCCAGCGAA	0	15
OPA-17	GACCGCTTGT	2	13
OPA-19	CAAACGTCGG	5	13
TOTAL DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS		25	136

### 6.3. Polimorfismos encontrados en los RAPDs.

Encontramos un alto porcentaje de polimorfismos (84.45%) usando los 10 oligonucleótidos del kit OPA. Las figuras 12, 13 y 14 son algunas de las fotografías de los RAPD's analizados donde se observa la diversidad de polimorfismos y el peso molecular aproximado que presenta cada secuencia de ADN, tomando como referencia a los estándares de peso molecular de 123 pb y  $\lambda$  Hind III. Las tablas 5, 6 y 7 son la representación

esquemática de los polimorfismos observados en los geles mostrados en las figuras 12, 13 y 14 ya que en estas fotografías algunas bandas no se perciben claramente por efectos de la impresión en papel.

Con el oligonucleótido OPA-01 (Fig. 12) se observó claramente el polimorfismo que se da entre las tres colonias de *P. truncatus* de México, Togo y Tanzania, y *S. zeamais* los fragmentos RAPD's que se presentan con este oligonucleótido van de los 452 a los 1908 pb (Tabla 5). Algunas de las bandas que nos permiten observar más parentesco entre las colonias de Togo y Tanzania son las bandas ubicadas en los 1859, 1224 y 497 pb; los polimorfismos que nos permiten diferenciar a estas dos colonias africanas son las bandas marcadas con 1079 pb que sólo aparece en Togo y 825 pb que solo aparece en Tanzania; mientras que las bandas marcadas con 1908, 1667 y 1478 pb sólo aparecen en la colonia mexicana. Algunas bandas se comparten con *S. zeamais* como las ubicadas en 1859, 1224, 1190, 1079, 857 y 497 pb y es el análisis de otras bandas en este y otros geles lo que permite diferenciarlo claramente de *P. truncatus*.

El oligonucleótido OPA-07 (Fig. 13 y Tabla 6), presenta diferentes polimorfismos que van de los 1886 a los 165 pares de bases, con este oligo se observa mayor parentesco entre las colonia de México y Tanzania ya que comparten además de las amplificaciones monomórficas (1111, 846, 809, 699 y 165 pb) el polimorfismo de 1184 pb, por tanto las polimorfismos que marcan la disimilitud entre México y Tanzania son la presencia del fragmento 966 pb en la colonia mexicana y la ausencia del fragmento que comparten Togo y Tanzania con 949 pb. Mientras que a la colonia de Togo la distinguen las bandas marcadas con 1886, 1564, 1229 y 766 pb.

Otro patrón de diversidad de polimorfismos se presenta en las Figuras 13 y 14 donde los oligonucleótidos OPA-08 y OPA-06 mostraron cierto parentesco entre las colonias de

Togo y Tanzania, mientras que los oligonucleótidos OPA-16 y OPA-07 mostraron polimorfismos muy diferentes, habiendo más parentesco entre las colonias de México y Tanzania. Esto nos indicó que los patrones RAPD's presentaron diferencias dependiendo de los oligonucleótidos y el ADN de las colonias amplificadas, las cuales se observaron a través de la presencia o ausencia de bandas. Tal como lo reportó Gibbs y col. (1994) con *Elaphe obsoleta* y *Sistrurus catenatus* donde encontró 40 % y 90 % de polimorfismos dependiendo del oligonucleótido usado.

Al analizar los polimorfismos dados por los diez oligonucleótidos se consideró importante hacer notar que *S. zeamais* presentó un bandeo muy diferente al de las colonias de *P. truncatus*, compartiendo de dos a siete bandas. Por ejemplo, con el oligonucleótido OPA-06 (Fig. 13 y Tabla 6) los fragmentos amplificados de las tres colonias de *P. truncatus*, coincidieron con varios fragmentos amplificados de *S. zeamais*. Las bandas compartidas (Tabla 6) con México son la 5, 6, 7, 10 y 13 con 1225, 1149, 1119, 878 y 675 pb respectivamente, mientras que con Togo y Tanzania comparte la banda 4 con 1228 pb y con Togo comparte sólo la banda 8 de 1020 pb. El oligonucleótido OPA-01 (Fig. 12 y Tabla 5) también tiene varios fragmentos amplificados que se comparten entre las colonias de *P. truncatus* y *S. zeamais*, los polimorfismos que compartió *S. zeamais* con Togo y Tanzania fueron la banda 1859, 1224 y 497 pb; mientras que México no comparte polimorfismos con él, más que en donde se presenta una amplificación monomórfica (1190, 857 y 557 pb).

Sin embargo, no todos los oligonucleótidos presentaron varias bandas en común entre las colonias de *P. truncatus* y *S. zeamais*, tal como se observó en el oligonucleótido OPA-08 (Fig. 14 y Tabla 7) donde sólo comparten las bandas de 949, 774, 730, y 300 pb. Mientras que el bandeo de *P. truncatus* en el oligonucleótido OPA-16 (Fig. 14 y Tabla 7) sólo coincide con dos fragmentos amplificados de *S. zeamais* marcados con los 1503 y 805 pb.

El análisis anterior no considera el bandeo presentado en los 10 oligonucleótidos seleccionados, ya que este método es una forma de ilustrar como se realizó el análisis de cada uno de los geles para poder llegar al análisis general, se observaron 57 bandas polimórficas (35.40%) entre las colonias de México y Togo, para las colonias de México y Tanzania hubo 44 bandas polimórficas (27.32%), finalmente entre las colonias de Togo y Tanzania se redujo a 35 bandas polimórficas (21.73%), dando un total de 136 bandas polimórficas (84.45 %) (Tabla 4).



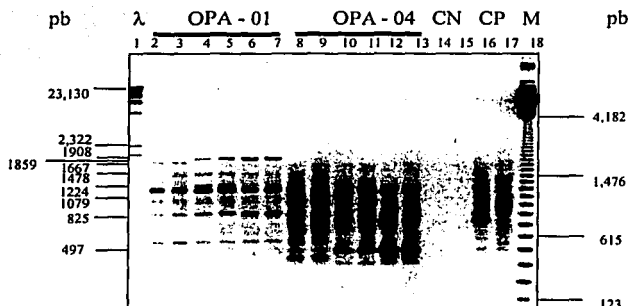


Figura 12. Polimorfismos del OPA-01.  $\lambda$ , Marcador  $\lambda$  Hind III (pozo 1); Oligo OPA-01, México (pозos 2 y 3); Togo (pозos 4 y 5); Tanzania (pозos 6 y 7); Oligo OPA-04 (pозos 8-13) no utilizado para este análisis por poca claridad en el bandejo; CN, controles negativos de los oligos OPA-01 y OPA-04 (pozo 14 y 15 respectivamente); CP, controles positivos (*S. zeamais*) con OPA-01 y OPA-04 (pozo 16 y 17 respectivamente); M, marcador 123 pb (pozo 18); (pb) pares de bases.

Tabla 5. Polimorfismos y pares de bases (pb) encontrados en las colonias de *P. truncatus* de México (M), Togo (T) y Tanzania (Z), y *S. zeamais* (S) con el oligonucleótido OPA-01.

Banda	Pb	OPA-01			
		M	T	Z	S
1	1908	—	—	—	—
2	1859	—	—	—	—
3	1667	—	—	—	—
4	1510	—	—	—	—
5	1478	—	—	—	—
6	1368	—	—	—	—
7	1224	—	—	—	—
8	1190	—	—	—	—
9	1079	—	—	—	—
10	1019	—	—	—	—
11	990	—	—	—	—
12	913	—	—	—	—
13	857	—	—	—	—
14	825	—	—	—	—
15	780	—	—	—	—
16	662	—	—	—	—
17	583	—	—	—	—
18	557	—	—	—	—
19	497	—	—	—	—
20	452	—	—	—	—

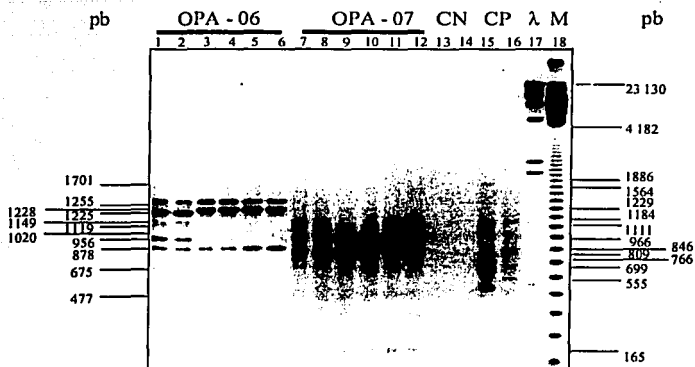


Figura 13. Polimorfismos del OPA-06 y OPA-07. Oligo OPA - 06, México (pozos 1 y 2); Togo (pozos 3 y 4); Tanzania (pozos 5 y 6); Oligo OPA - 07, México (pozos 7 y 8); Togo (pozos 9 y 10); Tanzania (pozos 11 y 12); CN, controles negativos de los oligos OPA-06 y OPA-07 (pozos 14 y 15 respectivamente); CP, controles positivos (*S. zeamais*) con OPA-06 y OPA-07 (pozos 16 y 17 respectivamente);  $\lambda$ , marcador  $\lambda$  Hind III (pozo 18); M, marcador 123 pb (pozo 19); (pb) pares de bases.

Tabla 6. Polimorfismos y pares de bases (pb) encontrados en las colonias de *P. truncatus* de México (M), Togo (T) y Tanzania (Z), y *S. zeamais* (S) con los oligonucleótidos OPA-06 y OPA-07.

OPA-06						OPA-07					
Banda	Pb	M	T	Z	S	Banda	Pb	M	T	Z	S
1	1701					1	1886				
2	1333	---	---	---	---	2	1564		---		
3	1255	---				3	1229		---		
4	1228		---	---	---	4	1184	---		---	
5	1225	---				5	1111	---	---	---	
6	1149	---				6	966	---			
7	1119	---				7	949	---	---	---	
8	1020		---		---	8	846	---	---	---	---
9	956	---	---			9	809	---	---	---	---
10	878	---	---	---	---	10	766	---	---	---	---
11	809	---	---	---	---	11	699	---	---	---	---
12	745					12	555				---
13	675	---				13	165	---	---		
14	619										
15	530										
16	477										

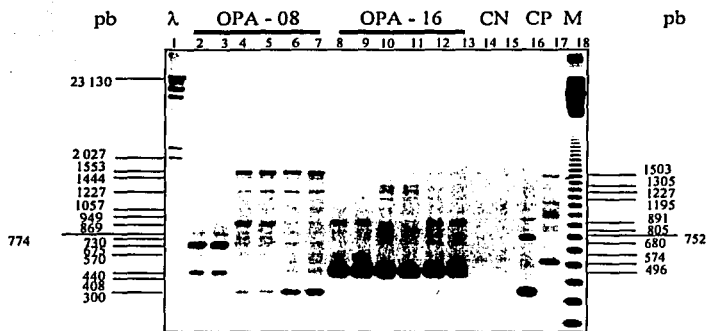


Figura 14. Polimorfismos del OPA-08 y OPA-16.  $\lambda$ , marcador  $\lambda$  Hind III (pozo 1); Oligo OPA-08, México (pозos 2 y 3); Togo (pозos 4 y 5); Tanzania (pозos 6 y 7); Oligo OPA-16, México (pозos 8 y 9); Togo (pозos 10 y 11); Tanzania (pозos 12 y 13); CN, controles negativos de los oligos OPA-08 y OPA-16 (pозos 14 y 15 respectivamente); CP, controles positivos (*S. zeamais*) con OPA-08 y OPA-16 (pозos 16 y 17 respectivamente); M, marcador 123 pb (pozo 18,); (pb) pares de bases.

Tabla 7. Polimorfismos y pares de bases (pb) encontrados en las colonias de *P. truncatus* de México (M), Togo (T) y Tanzania (Z), y *S. zeamais* (S) con los oligonucleótidos OPA-08 y OPA-016.

OPA-08						OPA-16					
Banda	Pb	M	T	Z	S	Banda	Pb	M	T	Z	S
1	1553		—	—	—	1	1503			—	—
2	1444		—	—	—	2	1305		—	—	—
3	1227		—	—	—	3	1227	—	—	—	—
4	1199	—	—	—	—	4	1195		—	—	—
5	1057		—	—	—	5	1152			—	—
6	949		—	—	—	6	1027			—	—
7	869		—	—	—	7	976			—	—
8	774	—	—	—	—	8	891	—		—	—
9	730		—	—	—	9	844			—	—
10	675	—	—	—	—	10	805		—	—	—
11	570	—	—	—	—	11	752		—	—	—
12	490		—	—	—	12	680			—	—
13	440	—	—	—	—	13	574	—		—	—
14	408		—	—	—	14	518			—	—
15	300	—	—	—	—	15	496		—	—	—
						16	433	—	—	—	—

#### 6.4. Análisis de datos para la elaboración de dendogramas.

Los datos obtenidos a partir de los marcadores RAPD's, generados por los 10 oligonucleótidos, se analizaron por dos métodos: 1) se estimó la similitud genética de Jaccard y 2) la disimilitud genética de Skroch. De los pares de individuos analizados, se generaron las matrices de distancia genética entre las tres colonias de *P. truncatus* y *S. zeamais*. La disimilitud genética obtenida por el método de coeficiente de apareamiento simple o de Skroch se muestra en la Tabla 8. Como se esperaba la disimilitud genética entre *S. zeamais* y las colonias de *P. truncatus* es mucho mayor que las distancias que se presentan entre las colonias de *P. truncatus*. El valor más grande de disimilitud encontrado para *P. truncatus* es entre las colonias de México y Togo, siendo de 0.3529, siguiéndole las colonias de México y Tanzania, con una disimilitud genética de 0.2756, mientras que la menor disimilitud genética es la que hay entre las dos colonias africanas de 0.2193. Con el método de Jaccard se obtuvo la similitud entre colonias, teniendo menor similitud México y Togo con un valor de 0.5045, después le siguen México y Tanzania con valor de 0.5784, mientras que Togo y Tanzania presentan la mayor similitud con un valor de 0.6600 (Tabla 9). Concordando lo anterior con la disimilitud mostrada por el análisis de Skroch.

**Tabla 8.** Matriz de disimilitud genética.

	MEXICO	TOGO	TANZANIA	SITOPHILUS
MEXICO	0.0000	0.3529	0.2756	0.5870
TOGO	0.3529	0.0000	0.2193	0.6838
TANZANIA	0.2756	0.2193	0.0000	0.5949
SITOPHILUS	0.5870	0.6838	0.5949	0.0000

Tabla 9. Matriz de similitud genética.

	MEXICO	TOGO	TANZANIA	SITOPHILUS
MEXICO	1.0000	0.5045	0.5784	0.3053
TOGO	0.5045	1.0000	0.6600	0.2535
TANZANIA	0.5784	0.6600	1.0000	0.3088
SITOPHILUS	0.3053	0.2535	0.3088	1.0000

A partir de estas matrices se llevó a cabo el análisis global o de conglomerados donde se obtuvieron los dendogramas que representan en forma gráfica las relaciones genéticas entre las colonias (Figuras 15 y 16) cabe mencionar que la distancia indicada en el dendograma resultó del análisis de agrupamiento y no es la misma que se reporta en las tablas 8 y 9.

En la interpretación del dendograma de disimilitud (Fig. 15) se puede ver que la colonia de Togo está estrechamente relacionada con la colonia de Tanzania, la distancia a la cual estas colonias se agrupan es de 0.2193, lo cual quiere decir que difieren solamente en el 22% de los polimorfismos RAPD's. Las colonias africanas se encuentran a una distancia de 0.31425 de la de México, cuyo valor es el promedio entre los valores de disimilitud mostrados en la tabla 8 entre las colonias africanas, difiriendo la colonia mexicana de las africanas en un promedio de 31% en los polimorfismos RAPD's. La distancia de las colonias de *P. truncatus* con respecto a *S. zeamais* es de 0.6219, es decir tienen un 62% de disimilitud.

Para corroborar la consistencia de los datos, se realizó el mismo análisis utilizando la distancia genética obtenida mediante el modelo de Jaccard y se obtuvo un dendograma con la misma topología (Fig. 16), es decir agrupó de la misma forma a los materiales genéticos

estudiados. También en este dendograma las colonias africanas son las que están más relacionadas en un 66%, es decir presentan una distancia genética de 0.6600. La distancia genética entre las colonias africanas y la de México tiene un valor de 0.5414, es decir comparten el 54% de los polimorfismos RAPD's y la distancia genética de las colonias de *P. truncatus* con respecto a *S. zeamais* es de 0.2892, es decir tienen un 29% de similitud. . .

Es importante recordar que la distancia genética puede ser medida en disimilaridad y similaridad (Avisé, 1994; Martínez, 2000), por lo que en el análisis anterior se presentan diferentes valores de distancia genética para cada dendograma.

Para juzgar la robustez del dendograma se utilizó el método de remuestreo por réplicas (bootstrap) obteniéndose 4, 000 réplicas de la matriz de disimilaridad y los errores estándar para cada una de las disimilaridades (Tabla 10). También se calcularon los coeficientes de confianza de Felsenstein (1985) basados en las 4000 réplicas, obteniéndose el dendograma de la figura 17. Esta figura nos indica el estimado del nivel de confianza para cada nodo, por lo que podemos estar seguros en un 100% que el nodo que une a *S. zeamais* con las colonias de *P. truncatus* es verdadero en todas las réplicas, de la misma manera que el que une a la colonia de México con las colonias africanas, no así el que une a las colonias de Togo y Tanzania, ya que en éstas sólo se presentó en un 88% de las réplicas, sin embargo este porcentaje es suficiente para decir que el nodo existe en el dendograma, lo cual nos permite confiar en que la topología del dendograma es correcta y por tanto tener la certeza de que las colonias de *P. truncatus* de México está realmente separada de las colonias africanas, así como *S. zeamais* de las colonias de *P. truncatus*.

**Tabla 10. Valores estadísticos.**

DISTANCIAS	DISTANCIAS OBSERVADAS	SESGO	MEDIA	ERROR ESTANDAR
Togo y México	0.3529	0.0004197	0.3534	0.3851
Tanzania y México	0.2756	0.0001171	0.2758	0.03552
<i>Sitophilus</i> y México	0.5871	0.0003686	0.5875	0.3958
Togo y Tanzania	0.2194	0.0005263	0.2199	0.03330
<i>Sitophilus</i> y Togo	0.6839	-0.0001378	0.8637	0.3712
<i>Sitophilus</i> y Tanzania	0.5949	-0.0005701	0.5944	0.03849

DISIMILARIDAD

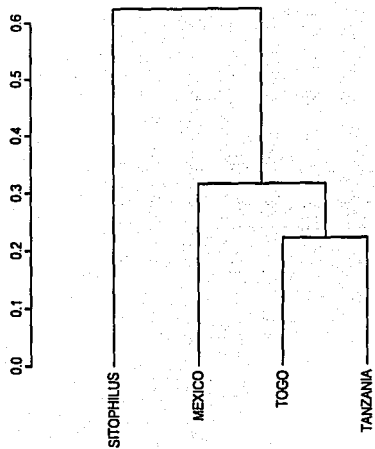


Figura 15. Dendrograma de la matriz de disimilaridad de Skroch.

SIMILARIDAD

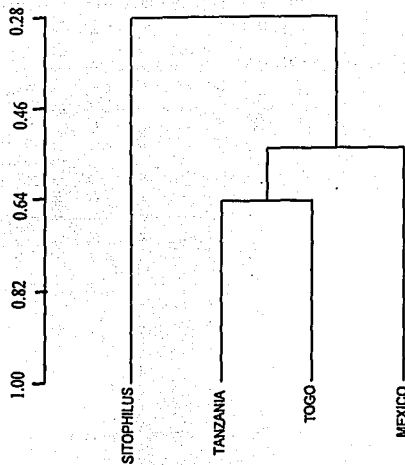


Figura 16. Dendrograma de la matriz de similitud de Jaccard.

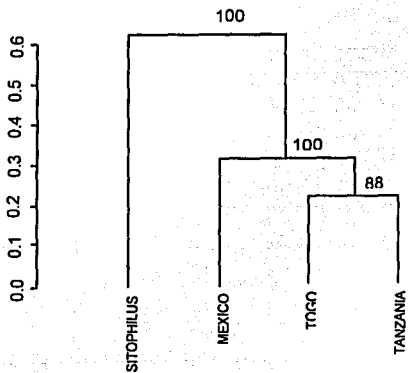


Figura 17. Dendrograma del coeficiente de confianza de Felsenstein.



## VII. CONCLUSIONES.

1. La concentración de  $MgCl_2$  fue determinante en la obtención de polimorfismos, sin embargo las concentraciones de ADN evaluadas no se consideraron determinantes en la amplificación de los fragmentos RAPD's de *P. truncatus*, muy probablemente por que se obtuvo ADN de muy buena calidad.
2. Los mejores patrones de bandeo y reproducibilidad se obtuvieron con una concentración de 1.5 mM de  $MgCl_2$ , 80 ng de ADN total de *P. truncatus*, una temperatura de desnaturalización a 94°C, de alineación a 40°C y de extensión a 72 °C, cada una durante 1 minuto por 40 ciclos.
3. Los oligonucleótidos comerciales OPA-01, OPA-06, OPA-07, OPA-08, OPA-11, OPA-13, OPA-15, OPA-16, OPA-17 y OPA-19 proporcionan un alto porcentaje de polimorfismos (84.45%), suficiente para encontrar la distancia genética entre las tres colonias de *P. truncatus*, sin embargo el OPA-01 fue el oligonucleótido que presentó mejor bandeo, ya que se obtuvo mayor número de bandas y más claridad entre ellas.
4. Los dendogramas obtenidos por ambos métodos nos presentan claramente la estrecha relación que hay entre las colonias de Tanzania y Togo y el distanciamiento que tienen estas colonias africanas con la de México. La colonia de Togo está estrechamente relacionada con la colonia de Tanzania difiriendo en un 22 % de los polimorfismos RAPD's, mientras que las colonias africanas difieren de la colonia mexicana, en un 31

% de los polimorfismos RAPD's y las colonias de *P. truncatus* con respecto a *S. zeamais* tienen un 62 % de disimilaridad.

5. La relación existente entre las colonias de África y la de México no es tan cercana, lo que sugiere que el establecimiento de estas colonias en el continente Africano podría haber tenido orígenes diferentes.

## **GLOSARIO.**

**ADN.** Ácido desoxirribonucleico, polímero formado por secuencias de nucleótidos que consisten de un azúcar (desoxirribosa), una base nitrogenada la cual puede ser de dos tipos, pirimidinas (citosina y timina) o purinas (guanina y adenina) y un grupo fosfato.

**ADN plantilla.** Polímero simple de ADN, complementario a un polímero de ADN ó ARN en formación, que sirve para especificar la secuencia de nucleótidos del polímero en formación.

**ADN polimerasa.** Enzima responsable de la síntesis del ADN a partir de trifosfatos de desoxirribonucleótidos bajo la dirección de un ADN plantilla.

**Agarosa.** Polisacárido obtenido de algas marinas usadas como medio gélido en electroforesis; se usa para separar moléculas de ADN en base a su peso molecular.

**ARN.** Ácido ribonucleico, polinucleótido en el que el azúcar es una ribosa y a demás su base nitrogenada es sustituida por uracilo en lugar de timina.

**Bootstrapping.** Método estadístico basado en repeticiones azarosas de muestras que reemplazan a la muestra original para provocar una colección de estimados nuevos de un parámetro del cual los límites de confianza pueden ser calculados.

**Bromuro de etidio.** Colorante que se adhiere a la doble cadena de ADN. El ADN teñido con el EtBr florece bajo la luz UV.

**Clon.** Población de células idénticas y frecuentemente contienen moléculas de ADN recombinante.

**Codominante.** Alelos que contribuyen de igual manera al fenotipo; ninguno de los dos es dominante sobre el otro.

**Dímero.** Especie molecular formada por la unión de dos moléculas iguales.

**Distancia genética.** Es la medida de divergencia evolucionaria de diferentes poblaciones de una especie, es indicada por el número de sustituciones alélicas que han ocurrido por locus en dos poblaciones.

**Dominante.** Alelo que determina el fenotipo mostrándose en un heterocigoto.

**Electroforesis.** Técnica para separar moléculas basada en su movilidad diferencial en un campo eléctrico.

**Endonucleasa.** Enzima que hidroliza enlaces fosfodiéster internos en un polinucleótido.

**Eucarionte.** Célula u organismo que contiene núcleo y se reproduce por meiosis. La división celular es por mitosis y las enzimas oxidativas se empaquetan en la mitocondria.

**Exonucleasa.** Enzima que hidroliza enlaces fosfodiéster terminales (en los extremos 3' o 5') de un polinucleótido.

**Flanquear.** Colocar en ambos extremos del ADN.

**Gen.** Una secuencia de nucleótidos a los que se les pueda asignar una función específica.

**Gen clonado.** Aquel gen que ha sido insertado en un vector de clonación para ser propagado en un organismo hospedero.

**Heterocromático.** Regiones cromosómicas o cromosomas completos que tienen una estructura densa y compacta en la telofase, la interfase y la profase temprana. No se transcriben y se replican lentamente.

**Loci.** Plural de la palabra locus.

**Locus.** Lugar en un mapa genético en el que reside una mutación o un gen particular.

**Marcador de ADN.** Es un fragmento de tamaño conocido utilizado para calibrar en un gel de electroforesis, el tamaño de otras muestras.

**Marcador genético.** Es cualquier alelo de interés de fenotipo conocido y el cual puede ser utilizado para monitorear la ingerencia de este gen durante cruzamientos genéticos entre organismos con diferentes alelos.

**Nucleasas.** Enzimas capaces de romper los enlaces fosfodiéster de los ácidos nucleicos ADN ó ARN.

**Oligonucleótidos.** Secuencias de nucleótidos cortas.

**Par de bases.** Dos bases nitrogenadas que se complementan por puentes de hidrógeno en ADN o ARN de doble cadena.

**Plásmido.** Elemento genético (molécula de ADN circular y de doble cadena) situado dentro de una célula huésped (bacteria), que se replica inmediatamente de los cromosomas del huésped y se utiliza comúnmente en clonación.

**Polimerasa.** Enzima que reúne en una unidad mayor o polímero, un número de subunidades similares o idénticas.

**Polimorfismo.** La presencia de varias formas (de un rasgo o un gen) en una población, la proporción de loci génicos polimórficos en una población.

**Polipirimidinas.** Referente a la retención de bases pirimidicas en la cadena de ADN.

**Polipurinas.** Referente a la retención de bases puricas en la cadena de ADN.

**Proteasas exógenas y endógenas.** Enzimas capaces de romper los enlaces peptídicos de un polímero de proteína en los extremos o internamente a la molécula.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Repetidos invertidos.** Dos secuencias idénticas de nucleótidos repetidas en orientación opuesta dentro de una molécula de ADN, cualquiera de los dos adyacente a otro o con alguna distancia que los separe.

**Recesivo.** Alelo oculto en el fenotipo de un heterocigoto por un alelo dominante, frecuentemente a causa de inactividad o ausencia del producto del alelo recesivo.

**Tándem.** Repeticiones directas en el codón del ADN, adyacentes una de otra.

## 9. APÉNDICE

### 9.1. Buffer de extracción del protocolo de Cenis y col.

▪ Tris HCl 200 mM pH 8.5	3.152 g.
▪ NaCl 250 mM	1.461 g.
▪ EDTA 25 mM	0.9305 g.
▪ SDS 0.5%	0.500 g

Aforar a 100 ml y esterilizar.

### 9.2. Buffer de extracción del protocolo de Doyle y Doyle.

▪ Tris-HCl 0.5 M = pH 8.0	20 ml
▪ CTAB 3 % (p/v)	3.0 g.
▪ NaCl 1.4 M	8.183 g
▪ EDTA 20 mM	0.745 g
▪ 2 mercaptoetanol 0.1 % (v/v)	0.100 g

Aforar a 100 ml y esterilizar.



### 9.3. Buffer de corrida del protocolo de Vandemark y col.

- Tris HCl = pH 8.0 100 mM      1.576 g.
- NaCl 150 mM                      0.8766 g.
- EDTA 5mM                        0.1861 g.

Aforar 100 ml y esterilizar.

### 9.4. Buffer de corrida 6X.

- Azul de bromofenol 0.25 %      0.25 ml
- Xileno – cianol 0.25 %          0.25 ml
- Glicerol en agua 30 %          30.0 ml

Aforar a 100 ml.

Guardar a 4 °C

### 9.5 Buffer TBE 5X .

- |                       |         |
|-----------------------|---------|
| ▪ Tris – base 1 M     | 54.0 g  |
| ▪ Ácido bórico 0.05 M | 27.5 g  |
| ▪ EDTA 0.05 M pH 8.0  | 20.0 ml |

Aforar a 1000 ml y esterilizar.

### 9.6. Buffer T<sub>10</sub> E<sub>1</sub> pH = 8.0.

- |                           |           |
|---------------------------|-----------|
| ▪ Tris Cl 10 mM (p H 8.0) | 0.1576 g. |
| ▪ EDTA (pH 8.0) 1mM       | 0.0372 g. |

Aforar a 100 ml y esterilizar.

### 9.7. Abreviaturas de las instituciones que estudian a *P. truncatus*.

- Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ)
- Natural Resources Institute (NRI)
- International Institute of Tropical Agriculture (IITA)

- **Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)**
- **Escuela de Agricultura Panamericana (EAP)**
- **Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados (CINVESTAV)**
- **Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)**

## 10. BIBLIOGRAFÍA.

- **Al-Souis E. J., El-Haidari H y Al-Ani J. N. (1970).** Outbreak and new record. *FAO. Plant Protection. Bulletin* 18: 92-93.
  
- **Amador, P. D. (1995).** Micropropagación y análisis de la relación taxonómica de dos especies de zarzaparrilla (*Smilax*), utilizando marcadores RAPDs. Tesis de Maestría. CINVESTAV. Irapuato. México.
  
- **Arnheim, N.T., White y Rainey. W. E. (1990).** Application of PCR: Organismal and population biology. *Bioscience* 40: 174 – 182.
  
- **Avise, J. C. (1994).** Molecular markers, natural history and evolution (1ª ed). New York. Chapman and Hall. Inc. pp.512.
  
- **Back, E. A. y Cotton, R. T. (1922).** Stored grain pest. *Farmer's Bulletin. No. 1260, U. S. Departement of Agriculture.*
  
- **Black IV, W. C., DuTeau, N. M., Puterka, G. J., Nechols, J. R., Pettorini, J. M. (1992).** Use of the random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids (Homoptera: Aphididae). *Bulletin of entomological Research*, 82: 151 – 159.

- **Barral, V., This, P., Imbert-Estabet, D., Combes, C. y Delseny, M. (1993).** Genetic variability and evolution of the *Scistosoma* genome analysis by using Random Amplified Polymorphic DNA markers. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1961: 1 – 11.
- **Barrera, S. H. A., Ortiz, L. R., Rojas, M. A. y Reséndez, P. D. (1993).** Reacción en Cadena de la Polimerasa; una nueva época dorada en la biología molecular. *Ciencia y Desarrollo*, enero- febrero. pp 50 – 60.
- **Bell, R. J. y Watters, F. L. (1982).** Environmental factors influencing the development and rate of increase of *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera:Bostrichidae) on stored maize. *Journal Stored Products. Research*. Vol. 18 pp 131 – 142.
- **\*Biliwa, A. (1988).** Les essais insecticides menés au Togo pour protéger le maïs égrené, le maïs sur l'épi et le manioc séché contre l'infestation par le *Prostephanus truncatus* et le *Sitophilus* sp., pp.85-109. *In* G.G.M. Schulten & A.J. Toet (eds.) *Workshop on the containment and control of the larger grain borer, Arusha, Tanzania, 16-21 May 1988.* Ministry of Agriculture and Livestock Development [Tanzania] with assistance from Food and Agriculture Organization of the United Nations, [Rome, Italy], Report II Technical papers presented at the workshop, ii + 209pp.
- **\*Burde, S. (1988).** Mikrobielle Antagonisten von *Prostephanus truncatus* (Horn) (Col., Bostrichidae) - Grundlagen für eine Biotherapie im tropischen Vorratsschutz. GTZ-Projekt BIBK, Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit GmbH, Hamburg. [Final report] 97pp.

- **Caetano, A. G. y Gresshoff, P.M.. (1997).** DNA markers: protocols, applications and overviews. Wiley- Liss. New York.
- **Calderon, M. y Donahaye, E. (1964).** Records on the occurrence and hosts of stored products pests in Israel. Riv. Parassit. 25:55-68.
- **Carborani, M., Sbarigia, D., Cibati, M. y Fiorilli, M. (1993).** Optimization of PCR performance. Trends Genet. 9: 42 – 43.
- **Cenis, J. L., Pérez, P. y Fereres, A. (1993).** Identification of Aphid (Homoptera: Aphididae) specie and clones by Random Amplified Polymorphic DNA. Entomological Society of America 86: (5): 545-550.
- **Chittenden, F. H. (1911).** Papers on insects affecting stored products. The lesser grain borer. The larger grain borer. Bull. Bur. Ent. U.S. Dep. Agric. 96: 29 – 52.
- **Cloutier, S. y Landry, B. S. (1994) ).** Molecular markers applied to plant tissue culture. In Vitro Cellular and Developmental Biology 30 ; 32 – 39.
- **Cotton R. T. y Good, N. E. (1937).** Annotated list of the insects and mites associated with stored grain and cereal products and of their arthropod parasites and predators. Misc. Publ. U.S. Dep. Agric. No 258.

- **Cowley, R. J., Howard, D. C. y Smith, R. H. (1980).** The effect of grain stability on damage caused by *Prostephanus truncatus* (Horn) on tree pests of stored maize. Journal of Stored Products Research 16: 75 – 78.
- **Delgado, N. M. y Hernández-Luna R. (1951).** Control del gorgojo de la semilla de maíz (*Prostephanus truncatus* (Horn)) Instituto. Nacional de Investigaciones Agrícolas Folleto Misc. 4: 26 – 29.
- **Dell'Orto, T. H. y Arias, V. C. (1985).** Insectos que dañan granos y productos almacenados. Serie tecnología postcosecha 4. Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe. Santiago, Chile.
- **Demianyk, C. J. y Sinha, R. N. (1987).** Effect of infestation by the Larger Grain Borer, *Prostephanus truncatus* (Horn) and the Lesser Grain Borer, *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera:Bostrichidae) on stored corn. Agriculture Canada Research Station. Environ. Entomol. 16: 618 - 624.
- **Dick, K. (1988).** Status of the Larger Grain Borer. *Prostephanus truncatus* a stored pest of maize in África. Overseas Development National Resources Institution, Bulletin 18.
- **Doyle, J. J. y Doyle, J. L. (1990).** Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13 - 15
- **Dustan, W. R. y Magazini, L. A. (1981).** Outbreaks and new records. Tanzania, the Larger Grain Borer on stored products. FAO Plant Protection Bulletin 29:80-81.

- **Dyer, A. R., Fowler, J. C. y Baker, G. H. (1998).** Detecting genetic variation in exotic earthworms, *Aporrectodea spp* (Lumbicidae) in australian soils using RAPD markers. Soil Biol. Biochem 30: (2): 159 – 165.
- **Ellsworth, D. L., Rittenhouse, K. D. y Honeycutt, R. L. (1993).** Artifactual variation in Randomly Amplified Polymorphic DNA banding patterns. Biotechniques 14: 214 – 217.
- **Felsenstein, J. (1985).** Confidence limits on phylogenesis: an approach using the bootstrap. Evolution 39: 173 – 791.
- **Fisher, W. C. (1950).** A revision of the North American species of beetles belonging to the family Bostrichidae. Misc. Publ. U.S. Dep. Agric. N0 698.
- **Gawal, N. J. y Bartlett, A. C. (1993).** Characterization of differences between whiteflies using RAPD – PCR. Insect Mol. Biol. 2: 33 – 38.
- **Gibbs, H. L., Prior, K. A., Weatherhead, P. J. (1994).** Molecular evolution of populations of threatened snake species using RAPD markers. Mol. Ecol. 3: 329 – 337.
- **Gil, V. K. (1997).** Caracterización de *Agave sp* utilizando marcadores moleculares. Tesis de Maestría. CINVESTAV. Irapuato, México.



- **Giles, P. H. y Leon, O. J. (1975).** Infestation problems in farm-stored maize in Nicaragua. Proc. 1<sup>st</sup>. Int. Wkg Conf. Stored- Prod. Ent., Sarannah, Georgia, U.S.A. pp 68 – 76.
  
- **Golob, P. y Hodges, R. J. (1982).** Study of an outbreak of *Prostephanus truncatus* (Horn) in Tanzania. Report G. 164. Tropical Products. Inst. London.
  
- **Golob, P., Dunstan, W. R., Evans, N., Meik, J., Rees, D. y Magazini, I. (1983).** Preliminary field trials to control *Prostephanus truncatus* (Horn) in Tanzania. Tropical Stored Products. Information 45: 15 – 17.
  
- **Golob, P. (1984).** Preliminary field and laboratory trial to control *Prostephanus truncatus* infestation of maize. Proc. GASGA Workshop on the Larger Grain Borer *Prostephanus truncatus* 24 – 25 february, 1983. Tropical Products Institute, Slough. Publ. GTZ, Eschborn, pp 62 – 70.
  
- **Golob, P., Changiaroen, P., Ali, M. y Cox, J. (1985).** Susceptibility of *Prostephanus truncatus* to insecticides. Journal Stored Products Research 21: 141- 150.
  
- **\*Golob, P. (1988).** Chemical control of the larger grain borer, pp. 53-69. In G.G.M. Schulten & A.J. Toet (eds.) Workshop on the containment and control of the larger grain borer, Arusha, Tanzania, 16-21 May 1988. Ministry of Agriculture and Livestock Development [Tanzania] with assistance from Food and Agriculture Organization of the United Nations, [Rome, Italy], Report II Technical papers presented at the workshop, ii + 209pp.

- **\*Golob, P. (1991).** Evaluation of the campaign to control larger grain borer, *Prostephanus truncatus*, in western Tanzania. FAO Plant Protection Bulletin, 39(2-3), 65-71. Golob, P., & R. Hodges. 1982. Study of an outbreak of *Prostephanus truncatus* (Horn) in Tanzania. Report of the Tropical Products Institute, G164. 23pp.
- **GTZ. (1993).** The Pest From Afar: Togo's farmers receive assistance to combat an alien pest which damages their stocks. Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ). Eschborn, Federal Republic of Germany.
- **Haines, C. P. (1991).** Insects and arachnids of tropical stored products: their biology and identification (a training manual). Natural Resources Institute (NRI). Overseas Development Administration, Chatham Maritime, UK.
- **Harnisch, R. y Krall, S. (1984).** Togo. further distribution of the Larger Grain Borer in Africa. FAO. Plant Protection Bulletin 32: 113-114.
- **\*Helbig, J. (1995).** The Ecology of *Prostephanus truncatus* in Togo with particular emphasis on interaction with the predator *Teretriusoma nigrescens*. Eschborn: Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ) GmbH.
- **\*Henning, S.M.I. (1993).** Untersuchungen zur Pathogenität von *Mallesia* sp. (Neogregarinida, Ophryocystidae) and *Nosema* sp. (Microsporida, Nosematidae) an *Prostephanus truncatus* (HORN) (Coleoptera, Bostrichidae) und zum Einsatz der

Protozoen in traditionellen Maislagern Togos. Eschborn: Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ) GmbH. Henning-Helbig, S. (1994). Pathogénicité de *Mattesia* sp. et de *Noxema* sp. sur *Prostephanus truncatus* et la possibilité de l'utilisation de ces protozoaires dans les greniers à maïs traditionnels du Togo. Eschborn: Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ) GmbH.

- Hodges, R. J., Dustan, W. R., Magazini, I. y Golob, P. (1983). An outbreak of *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera:Bostrichidae) in East Africa. *Protection Ecology* 5: 183 – 194.
- Hodges, R. J. (1984). Field ecology and monitoring of *Prostephanus truncatus* (Horn) in proceeding of a GASGA workshop on the Larger Grain Borer *Prostephanus truncatus*. Tropical Products Institute, Slough, UK., GTZ, Eschborn, Federal Republic of Germany.
- Hodges, R. J. y Meik, J. (1984). Infestation of maize cobs by *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera:Bostrichidae) aspects of biology and control. *Journal of Stored Products Research* 20: 205-213.
- Hodges, R. J., Meik, J. y Denton, H. (1985). Infestation of dried cassava (*Manihot esculenta* Crantz) by *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera:Bostrichidae). *Journal of Stored Products Research* 21: 73 – 77.

- **Hodges, R. J. (1986).** The biology and control of *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera:Bostrichidae) a destructive storage pest with an increasing ranges. *Jornal of Stored Products Research* 22: 1-14.
- **Hoppe, T. (1986).** Storage insects of basic grains in Honduras. *Tropical Science* 26: 25 – 38.
- **Hoy, M. A. (1994).** Insect molecular genetics. an introduction to principles and applications. Academic Press.
- **Innis, M. A. y Gelfand, D. H. (1990).** PCR protocols a guide to methods and applications: optimization of PCRs. Academic Press.
- **Kega, V. K. y Warui, C. W. (1983).** *Prostephanus truncatus* in coast province, Kenya. *Tropical Stored Products. Information* 46: 2.
- **Keil, H. (1988).** Losses caused by the Larger Grain Borer in farm stored maize. In Report II Technical Paper Presented at the workshop, workshop on the containment and control of the Larger Grain Borer, Shulten, G. G. M. and A. J. Toet, eds., pp 28 – 52. Arusha, Tanzania.
- **Kirby, L. T. (1992).** DNA fingerprinting an introduction. W.H. Freeman and company, New York. pp 7 – 33.

- **Krall, S. (1984).** A new threat to farm level maize storage in West Africa: *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera:Bostrichidae). Tropical Stored Products Information 50:26-31.
- **Krall, S. (1987).** Experience with a new stored grain pest in Togo and Benin: the Larger Grain Borer, *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera:Bostrichidae). In proceeding of the fourth International Working Conference on Stored Products Protection 21-26. Tel Aviv. Israel.
- **Leslie, J. y Vázquez-Arista, M. (1992).** Survey to provide background information on small holder maize storage systems and insect infestation in four states of Mexico. Natural Resources Institute. United Kingdom.
- **\*López, V. J. A. (1999).** Caracterización molecular de materiales genéticos de mango (*Mangifera indica* L.) utilizando marcadores RAPDs. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Sinaloa Facultad de Ciencias Químico-Biológica, México.
- **Martínez, V. O. (2000).** Taller: análisis e interpretación de polimorfismos en el DNA para el estudio de la diversidad genética. CINVESTAV. Irapuato. México.
- **McGuire, J. U. y Crandall, B. S. (1967).** Survey of insects pest and plant diseases of selected food crops of México, Central America and Panama. U. S. Department of Agriculture.

- **Mushi, A. M. (1984).** The Larger Grain Borer, *Prostephanus truncatus* (Horn) problem in Tanzania. In proceedings of a GASGA Workshop on the Larger Grain Borer, *Prostephanus truncatus*. Tropical Products Institute, Slough, UK TTZ. Germany. pp. 71-78.
- **Nei, M. (1972).** Gentic distance between populations. *Amer. Natur.* 106: 283 – 292.
- **Nei, M y Li, W. H. (1979).** Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 5269 – 5273.
- **Nissen, U., Laborius, A. y Shuiz, F. A. (1991).** Comparison of populations of *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae) of different geographical origins. *Journal of Applied Entomology* 112: 124 – 137.
- **Pantenius, C. U. (1988).** Storage losses in traditional maize granaries in Togo. *Insect Science and its Application* 9: 725 – 735.
- **Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S. y Rafalski, A. (1996).** The comparisons of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germoplasm analysis. *Molecular Breeding* 2: 225 – 238.
- **Posada, O. L., Polani, I. Z., Arevalo, I. S., Saldarriaga, V. A., García R. F. y Cárdenas, M. R. (1976).** Lista de insectos dañinos y otras plagas en Colombia. Inst. Colombiano Agropecuario. Programa de Entomología, Boletín Técnico No. 43.

- **\*Purrini, K., y Keil, H. (1989).** *Ascogregarina bostrichidorum* n. sp. (Lecudinidae, Eugregarinida), a new gregarine parasitizing the larger grain borer, *Prostephanus truncatus* Horn (1878) (Bostrichidae, Coleoptera). Archiv für Protistenkunde 137, 165-171.
- **Puterka, G. J., Black IV., Steiner, W. M. y Burto, R. L. (1993).** Genetic variation and phylogenetic relationships among worldwide collections of Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Mordvilko) inferred from allozyme and RAPD – PCR markers. Heredity 70: 604 – 618.
- **Quintana, R. R. , Wilbur, R. A. y Young, W. R. (1960).** Insectos de grano almacenado que infestan al maíz en campo Agricultura. Técnica. México 10: 32 – 35.
- **Rafalski, J. A. y Tingey, S. V. (1993).** Genetic diagnostics in plant breeding: RAPD's, microsatellites and machines. TIG 9 (8): 275 – 280.
- **Rees, D. P. (1985).** Life history of *Teretriosoma nigrescens* (Lewis) (Coleoptera: Histeridae) and its ability to suppress populations of *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera:Bostrichidae). Journal Stored Products Research 21.
- **Rees, (1987).** Laboratory studies on predation by *Teretriosoma nigrescens* Lewis (Coleoptera: Histeridae) on *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera:Bostrichidae) infesting maize cobs in the presence of other maize pest. Journal of Stored Products Research 23: 191 – 195.

- **Rodríguez, R. y Herrera, R. F. J. (1989).** Entomofauna del maíz almacenado para autoconsumo en la península de Yucatán. En II Reunión Nacional sobre la Problemática de Postcosecha de Granos y Semillas. Irapuato, Gto. México.
- **Ramírez, G. M. (1984).** Almacenamiento y conservación de granos y semillas. C.E.C.S.A. México. pp 30.
- **Sambrook, J., Fritsch, E. F y Maniatis, T. (1989).** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor.
- **Sandoval, C. M. L. (1991).** Purificación y caracterización de enzimas larvales de cuatro insectos que atacan al maíz durante el almacenamiento. Tesis de licenciatura. Universidad de Guanajuato. Centro de Investigaciones y Enseñanzas en Ingeniería Agrícola y Alimentaria. Irapuato, Gto. México.
- **SAGAR – CEA. (1999).** Situación actual y perspectiva de la producción de maíz en México.
- **Saidi, J. K. (1990).** Status of the Larger Grain Borer *Prostephanus truncatus* (Horn) a pest of stored maize in Tanzania, present and future control strategies. Maiz – weevil/ Larger Grain Borer. Resistance Workshop II. CIMMYT. El Batán. México.



- **Sardelli, A. D. (1993).** Plateau effect – understanding PCR limitations. *Amplifications: A forum for PCR users.* Issue 9: 3 –5.
- **Sharon, D., Adato, A., Mhameed, S., Lavi, U., Hillel, J., Gomolka, M., Epplen, C. y Epplen, J. T. (1995).** DNA fingerprints in plants using simple sequence repeat and minisatellite probes. *Hort Science* 30: 109 – 112.
- **Shires, S. W. (1979).** Influence of temperature and humidity on survival, development period and adult sex ratio in *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera:Bostrichidae). *Journal Stored Products Research* 15: 5 – 10.
- **Skroch, P., Tivang, J. y Nienhuis, J. (1992).** Analysis of genetic relationships using RAPD marker data. In *Joint Plant Breeding Symposia*, pp 26 – 30. Crop Science Society of America – America Society for Horticultural Science – American Genetic Association, Minneapolis, Mn..
- **Sneath, P. H. A. y Sokal, R. R. (1973).** *Numerical Taxonomy.* W. H. Freeman and company. New York. pp 131 – 132.
- **Staub, J. E. y Meglic, V. (1993).** Molecular genetic markers and their legal relevance for cultivar discrimination: A case study in cucumber. *HortTechnology* 3: 291 – 300.
- **Staub J. E. y Serquen, F. C. (1996).** Genetic markers, map construction and their application in plant breeding. *HortSciencie* 31: 729 – 740.

- **Tijssen, P. (1993).** Hibridization with nucleic acid probes (Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology). Part II. P.C. Van der Vliet. Ed. Elsevier.
- **Torre Blanca, A., Bourgues, H. y Adem, A. (1982).** Pérdidas por *Prostephanus truncatus* (Horn) en maíz almacenado bajo condiciones de laboratorio. *Tecnología de Alimentos* 8: 10 – 15
- **Vandemark, G., Martínez, O., Pecina, V. y Alvarado, M. J. (2000).** Assessment of genetic relationships among isolates of *Macrophomona phaseolina* using a simplified AFLP technique and two diferen methods of analisis. *Mycologia* 92: (4): 656 – 664.
- **Vargas, B.R. (1998).** Aislamiento e identificación de microorganismos presentes en *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera:Bostrichidae). Instituto de Ciencias Agrícolas Universidad de Guanajuato, México.
- **Vázquez-Arista, M. Ramírez, F.A. y Blanco, L.A. (1995).** Maize and bean storage and their use by rural farmers in central state of Mexico. *Journal Stored Products Research* 31 (4): 325 – 333.
- **Vázquez-Arista, Smith, R. H., Martínez-Gallardo, N. A. y Blanco-Labra, A. (1999).** Enzymatic differences in the digestive system of the adult and larva of *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae). *Journal of Stored Products Resarch* 35: 167 - 174.

- **Virk, P. S., Ford-Lloyd, B. V., Jackson, M. T. y Newbury, H. J. (1995).** Use of RAPD of the study of diversity within plant germoplasm collections. *Heredity* 74: 170 – 179.
  
- **\*Von Berg, A. and A. Biliwa. (1990).** Control of the larger corn borer (*Prostephanus truncatus*)(Horn)(Coleoptera: Bostrichidae) in traditional maize storage structures in southern Togo. *Tropical Pest Management* 36(3): 270-275.
  
- **Vos, P., Hogers, R., Blecker, M., Reijans, M., Van de Lee T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. y Zabeau, M. (1995).** AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407 - 4414.
  
- **Wang, G., Castiglione, S., Zhana, J., Fu, R., Ma, J., Li, W., Sun, Y. y Sala, F. (1994).** Hybrid rice (*Oriza sativa* L.): Identification and parentage determination by RAPD fingerprinting. *Plant Cell Report* 14: 112 – 115.
  
- **Waugh, R. y Powell, W. (1992).** Using RAPD markers for crop improvement. *Trends in Biotechnology* 10: 186 – 191.
  
- **Welsh, J. y Mc Clelland, M. (1990).** Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acid Research*. 18: 7213 – 7218.

- **Williams, J. C. K., Kubelik, A. R., Livak, K.J., Rafalski, J. A. y Tingey, S. V. (1990).** DNA polymorphisms are useful as genetic markers. *Nucleic Acid. Research.* 18: 6531-6535.
  
- **Wright, V. F. (1984).** World distribution of *Prostephanus truncatus*. Proc. GASGA Workshop on the Larger Grain Borer *Prostephanus truncatus*, 24 – 35 february . 1983. Tropical Products Institute, Slough. Publ. GTZ, Eschborn, pp 11 – 16.
  
- **Zabeau, M. y Vos, P. (1993).** Selective Restriction Fragment Amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Application ER0534858.
  
- \*Revisiones encontradas en:  
<http://www.agrsci.dk/plb/bembi/africa/about/contents.html>  
<http://www.agrsci.dk/plb/bembi/africa/research/refs.html>