



UNIVERSIDAD NACIONAL “PEDRO RUIZ GALLO”

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA



Genotipificación de *Diatraea saccharalis* Fabricius usando los microsatélites Dsc2, Dsc13, Dsc14 en cultivo de *Saccharum officinarum* L. (Caña de Azúcar) de las regiones Lambayeque y La Libertad, Perú – 2020

**TESIS
PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADA EN BIOLOGÍA**

AUTORAS

Br. Barturén Sandoval Julissa Alejandra

Br. Vásquez Montoya Yisela

ASESOR

Dr. Luis Alberto Rodríguez Delfín

Lambayeque - Perú, 2023

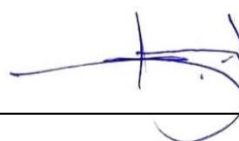
Genotipificación de *Diatraea saccharalis* Fabricius usando los microsatélites Dsc2, Dsc13, Dsc14 en cultivo de *Saccharum officinarum* L. (Caña de Azúcar) de las regiones Lambayeque y La Libertad, Perú – 2020

TESIS

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADA EN BIOLOGÍA**

APROBADA POR:

Dr. César Alberto Guzmán Vigo



PRESIDENTE

MSc. Jhon Wiston García López



SECRETARIO

MSc. Marco Antonio Guzmán Tello



VOCAL

Dr. Luis Alberto Rodríguez Delfín



ASESOR

DEDICATORIA

A mis padres, Ana Delia y Roberto David, por estar presente en cada momento de mi vida, por su esfuerzo incansable para sacar adelante a cada uno de sus hijos y por ser mi soporte y motivación para cumplir todas mis metas.

A mi abuelita Alejandrina, porque desde el cielo es esa luz que me da fuerzas y guía para continuar y ser una mejor persona y profesional.

A mis hermanos, Luis Guillermo y Ángel David, por su apoyo y comprensión en cada noche de desvelo que me tocó pasar.

A mi sobrino, Steffano, por su cariño, amor, alegría y por estar siempre conmigo.

A mi amiga, Yisela, por su amistad incondicional y por formar parte importante de mi desarrollo profesional logrando así culminar satisfactoriamente una meta nuestra trazada.

Julissa Alejandra Barturén Sandoval

DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo a Dios por brindarme sabiduría y la fortaleza necesaria para poder culminar esta meta.

A mi padre Wilfredo Vásquez, por acompañarme en cada paso que doy y guiarme siempre por el buen camino hacia mi superación.

A mi ángel, mi madre, María Olaya Montoya, la persona más fuerte y luchadora que he podido conocer, quién de la mano de mi padre, siempre celebró mis logros y me levantó después de cada caída. Siempre animándome a esforzarme por lo que quiero y la persona más interesada en que culmine con éxito esta etapa de mi vida.

A mis hermanas: Elizabeth y Zarina, por ser ejemplo a seguir y por estar en cada momento importante de mi vida enseñándome el verdadero significado de familia.

A mis sobrinos: Clara Luz, Thiago Geanfranco y Cielo Shantal, por motivarme a ser mejor persona cada día.

A todos ellos, mi familia, porque son la parte más importante de mi vida y a quienes siempre les estaré eternamente agradecida, por todo el esfuerzo empleado y valores brindados, para que sea una excelente profesional y persona.

A mi gran amiga Julissa Alejandra, por estar en cada momento de mi vida y ser parte importante de esta investigación.

Yisela Vásquez Montoya

AGRADECIMIENTOS

Agradecer a Dios, por guiarnos en todos los caminos que tomamos en nuestras vidas, dándonos fuerza para continuar en este proceso de obtener nuestro título profesional.

A nuestros padres y hermanos, por ser nuestro más grande apoyo y el motor que nos impulsa a cumplir todos nuestros objetivos personales y académicos.

Agradecemos profundamente a nuestro asesor y maestro Dr. Luis Alberto Rodríguez Delfín, por sus conocimientos, dedicación y paciencia que nos brindó para la realización de la presente investigación.

A todas aquellas personas presentes en el desarrollo de la investigación, quienes nos compartieron sus conocimientos para poder culminar satisfactoriamente.

A la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo por el financiamiento otorgado para la realización del presente trabajo, mediante resolución N°223-2020-VRINV.

ÍNDICE

RESUMEN	12
ABSTRACT	13
I. INTRODUCCIÓN	14
II. MARCO TEÓRICO	16
2.1 Antecedentes bibliográficos	16
2.2 Bases teóricas	19
2.2.1 <i>Diatraea saccharalis</i>	19
2.2.1.2 Ciclo biológico.....	20
2.2.2 Reacción en cadena de polimerasa (PCR).....	20
2.2.3. Microsatélites	21
III. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1. Población y muestra de estudio.....	22
3.1.1. Población.....	22
3.1.2. Área de estudio	22
3.1.3. Muestra de estudio	24
3.2. Metodología	24
3.2.1. Flujo de trabajo	24
3.2.2. Procedimiento de recolección de las muestras.....	25
3.2.3. Transporte de muestras al Laboratorio de Biología Molecular	25
3.2.4. Extracción de ADN.....	25
3.2.5. Secuencia de cebadores.....	26
3.2.6. Amplificación de ADN de <i>Diatraea saccharalis Fabricius</i> mediante PCR convencional.....	26
3.2.7. Electroforesis	28
3.3. Análisis estadístico.....	29

IV. RESULTADOS	31
4.1. Análisis de los geles de Electroforesis	31
4.1.1. Agroindustria Tumbán	32
4.1.2. Agroindustria Casa Grande	35
4.1.3. Agroindustria Laredo	37
4.2. Heterocigosidad esperada, observada, estadísticos F (F_{IS} , F_{ST} Y F_{IT}) y número de migrantes (N_m) en las agroindustrias de Lambayeque y La Libertad	40
4.3. Frecuencias alélicas, heterocigosidad total y frecuencias genotípicas por locus en la población total	41
4.4. Variación genética entre las poblaciones de las agroindustrias pertenecientes a los departamentos Lambayeque y La Libertad.	44
V. DISCUSIÓN	45
VI. CONCLUSIONES	48
VII. RECOMENDACIONES	48
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	49
ANEXOS	53

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.....	26
Secuencias de cebadores diseñados para detectar <i>Diatraea saccharalis</i> Fabricius	
Cuadro 2.....	27
Condiciones de PCR utilizadas para amplificar, utilizando el microsatélite Dsc2 y Dsc13	
Cuadro 3.....	27
Condiciones de PCR utilizadas para amplificar, utilizando el microsatélite Dsc14	
Cuadro 4.....	28
Condiciones térmicas de la PCR utilizadas para amplificar, utilizando los microsatélites Dsc2, Dsc13 y Dsc14	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	33
Frecuencias alélicas de los locus Dsc2, Dsc13 y Dsc14 de <i>Diatraea saccharalis Fabricius</i> pertenecientes a la Agroindustria Tumán (Departamento de Lambayeque)	
Tabla 2.	33
Frecuencias genotípicas observadas de los locus Dsc2 y Dsc13 de <i>Diatraea saccharalis Fabricius</i> pertenecientes a la Agroindustria Tumán (Departamento Lambayeque)	
Tabla 3.	34
Frecuencias de homocigotos y heterocigotos de los locus Dsc2, Dsc13 de <i>Diatraea saccharalis Fabricius</i> pertenecientes a la Agroindustria Tumán (Departamento Lambayeque)	
Tabla 4.	35
Frecuencias alélicas de los locus Dsc2, Dsc13 y Dsc14 de <i>Diatraea saccharalis Fabricius</i> perteneciente a la Agroindustria Casa Grande (Departamento de La Libertad)	
Tabla 5.	36
Frecuencias genotípicas observadas de los locus Dsc2 y Dsc13 de <i>Diatraea saccharalis Fabricius</i> pertenecientes a la Agroindustria Casa Grande (Departamento de La Libertad)	
Tabla 6.	37
Frecuencias de homocigotos y heterocigotos de los locus Dsc2, Dsc13 de <i>Diatraea saccharalis Fabricius</i> pertenecientes a la Agroindustria Casa Grande (Departamento La Libertad)	
Tabla 7.	38
Frecuencias alélicas de los locus Dsc2, Dsc13 y Dsc14 en larvas de <i>Diatraea saccharalis Fabricius</i> perteneciente a la Agroindustria Laredo (Departamento de La Libertad).	
Tabla 8.	38
Frecuencias genotípicas observadas y de los locus Dsc2 y Dsc13 de <i>Diatraea saccharalis Fabricius</i> pertenecientes a la Agroindustria Laredo (Departamento de La Libertad)	
Tabla 9.	39

Frecuencias de homocigotos y heterocigotos por locus en las larvas de *Diatraea saccharalis Fabricius* de la Agroindustria Laredo (Departamento La Libertad)

Tabla 10. 40

Heterocigosidad observada (H_0), heterocigosidad esperada (H_E) de dos marcadores microsatélites dentro de las poblaciones de *Diatraea saccharalis Fabricius* de los departamentos de Lambayeque y La Libertad.

Tabla 11. 41

Estimación del coeficiente de endogamia (F_{IS}), índice de fijación (F_{ST}) y coeficiente de fijación total (F_{IT}) de los microsatélites dentro de las poblaciones de *Diatraea saccharalis Fabricius* de los departamentos de Lambayeque y La Libertad

Tabla 12. 41

Estimación del número de migrantes por generación (N_m)

Tabla 13. 42

Frecuencias alélicas y heterocigosidad de los locus Dsc2, Dsc13 y Dsc14 en la población total de *Diatraea saccharalis Fabricius* pertenecientes a los departamentos de Lambayeque y La Libertad.

Tabla 14. 43

Frecuencias genotípicas observadas de los locus Dsc2 y Dsc13 en la población de *Diatraea saccharalis Fabricius* de los departamentos de Lambayeque y La Libertad

Tabla 15. 44

Estimación de los estadísticos; G_{ST} : Índice de diversidad genética de Nei., H_T : Heterocigosidad total, H_S : Heterocigosidad media esperada por población, D_{ST} : Diversidad genética entre subpoblaciones de *Diatraea saccharalis Fabricius* en los departamentos de Lambayeque y La Libertad

Tabla 16. 44

Estimación de la identidad genética de Nei y distancia genética de *Diatraea saccharalis Fabricius* de las agroindustrias pertenecientes a Lambayeque y La Libertad. (Software PopGene 1.32)

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	23
Localización geográfica de las áreas de estudio; Agroindustria Tumán (Laboratorio “Rinconazo”) en Lambayeque (1), Agroindustria Casa Grande (2) y Agroindustria Laredo (3) en La Libertad.	
Figura 2	24
Flujo de trabajo utilizado para el procesamiento de muestras de <i>Diatraea saccharalis Fabricius</i>	
Figura 3	32
Corridas electroforéticas de los microsatélites Dsc2(A), Dsc13(B) y Dsc14(C)	
Figura 4	45
Dendograma basado en las distancias genéticas de Nei de <i>Diatraea saccharalis Fabricius</i> para las regiones de Lambayeque y La Libertad. (Software PopGene 1.32)	

RESUMEN

Diatraea saccharalis Fabricius, es una plaga que causa elevadas pérdidas económicas, de importancia para los agricultores dedicados al cultivo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.). Este insecto, perteneciente al orden Lepidóptera disminuye drásticamente la producción de sacarosa en los cultivos. A nivel nacional, los cultivos de caña de azúcar, son una fuente de ingreso monetario importante para la población agrícola del país. Siendo necesario reducir los daños generados por *Diatraea saccharalis Fabricius*, mediante una adecuada técnica que nos permita el eficaz manejo integrado de la plaga (MIP). Por lo que es de importancia tener datos obtenidos a nivel molecular para poder comprender la estructura genética de dicha plaga clave y disminuir su propagación. El presente estudio, tuvo como objetivo principal la genotipificación de poblaciones de *Diatraea saccharalis Fabricius* del cultivo de *Saccharum officinarum* L. (Caña de Azúcar) usando tres marcadores microsatélites (*Dsc2*, *Dsc13*, *Dsc14*), de las regiones Lambayeque y La Libertad; en el que se analizó muestras larvales de tres agroindustrias (Tumán, Casa Grande y Laredo). Se obtuvo como resultado cinco diferentes alelos para los marcadores microsatélites *Dsc2* como para *Dsc13* y un alelo para *Dsc14* (monomórfico); se obtuvo también valores de heterocigosidad observada menor a la esperada. Así mismo, mediante el índice de diversidad genética de Nei, se evidenció diferencias genómicas entre poblaciones equivalente al 43.7% y una variación mayor dentro de las poblaciones, correspondiente al 56.3%. Adicionalmente se estimó el índice de Fijación ($F_{ST}=0.718$), coeficiente de endogamia promedio ($F_{IS}=0.445$), índice de fijación total promedio ($F_{IT}=0.838$) y número de migrantes promedios ($N_m=0.083$). Demostrándose que las poblaciones no se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg y que el déficit de heterocigotos puede deberse a características endogámicas de la población.

Palabras clave: *Diatraea saccharalis Fabricius*, marcadores microsatélites, genotipificación, plaga clave, diversidad genética.

ABSTRACT

Diatraea saccharalis Fabricius, is a pest that causes high economic losses, of importance for farmers dedicated to the cultivation of sugar cane (*Saccharum officinarum* L.). This insect, belonging to the order Lepidoptera, drastically decreases the production of sucrose in crops. At the national level, sugarcane crops are an important source of monetary income for the agricultural population of the country. Being necessary to reduce the damage generated by *Diatraea saccharalis* Fabricius, through an adequate technique that allows us the effective integrated pest management (IPM). Therefore, it is important to have data obtained at the molecular level in order to understand the genetic structure of this key pest and reduce its spread. The present study had as its main objective the genotyping of *Diatraea saccharalis* Fabricius populations from the *Saccharum officinarum* L. (Sugar Cane) crop using three microsatellite markers (Dsc2, Dsc13, Dsc14), from the Lambayeque and La Libertad regions; in which larval samples from three agroindustries (Tumán, Casa Grande and Laredo) were analyzed. Five different alleles for the microsatellite markers Dsc2 as for Dsc13 and one allele for Dsc14 (monomorphic) were obtained as a result; Observed heterozygosity values lower than expected were also obtained. Likewise, through the *Nei genetic diversity* index, genomic differences between populations equivalent to 43.7% and a greater variation within populations, corresponding to 56.3%, were evidenced. Additionally, the Fixation index ($F_{ST}=0.718$), average inbreeding coefficient ($F_{IS}=0.445$), average total fixation index ($F_{IT}=0.838$) and average number of migrants ($N_m=0.083$) were estimated. Demonstrating that the populations are not in Hardy-Weinberg equilibrium and that the deficit of heterozygotes may be due to inbreeding characteristics of the population. **Keywords:** *Diatraea saccharalis* Fabricius, microsatellite markers, genotyping, key pest, genetic diversity.

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo de caña de azúcar es uno de los más importantes del Perú, debido al significativo aporte al valor bruto de la producción agropecuaria (VBP), de aproximadamente 704.3 millones de nuevos soles (Ministerio de Agricultura y Riego, 2013). El cultivo presenta varias zonas productivas en el país, entre ellas figuran los departamentos de Lambayeque, La Libertad, Ancash, Lima y Arequipa. El Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego, en sus reportes estadísticos muestran una producción de 9.8 millones de toneladas de caña de azúcar en 85 mil hectáreas, durante el año 2021. (Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego, 2022)

Los cultivos de caña de azúcar durante su ciclo de desarrollo, son perjudicados por diversos organismos desde virus, bacterias, hongos e insectos. *Diatraea saccharalis Fabricius* es uno de los insectos que afecta drásticamente la productividad de los cultivos, debido a la alta tasa de infestación ocasionada por sus larvas, afectando la calidad del producto al generar la disminución rigurosa de la producción de sacarosa. En consecuencia, se reportan pérdidas económicas de 1 tonelada de caña de azúcar por hectárea cosechada (109 kg de azúcar por hectárea en campo) por 1% de infestación, afectando de forma negativa el aporte al valor bruto de la producción agropecuaria del país. (Echeverri-Rubiano, Chica-Ramírez, & Vargas-Orozco, 2017)

El control de la infestación se ha venido dando a través de la ejecución de un manejo integrado de plagas (Santisteban Aguilar, 2015), que engloban técnicas de control biológico, empleando organismos parasitoides (*Trichogramma sp.*, *Telenomus sp.*, *Cotesia flavipes*, entre otros), otras alternativas son el control químico, mediante el uso de pesticidas y el control etológico, mediante la aplicación de trampas y feromonas con la finalidad de atraer al insecto en etapa adulta; para lo que se requiere de información más detallada sobre la estructura y dinámica de las poblaciones de *Diatraea saccharalis Fabricius*, por esta razón se han usado herramientas de biología molecular aplicada exitosamente en el manejo de plagas, vinculada a la caracterización del flujo de genes entre poblaciones (Silva-Brandão, Santos, Cônsoli, & Omoto, 2015). Esta información se

obtiene en forma eficiente mediante la utilización de marcadores moleculares (Espinoza, Fuentes-Contreras, Barros, & Ramírez, 2007). Entre los que tenemos a microsatélites y RADPs (Random Amplification of Polymorphic DNA).

Actualmente se viene desarrollando un bioproyecto financiado por el Consejo Nacional Brasileño de Desarrollo Científico y Tecnológico, que tiene como finalidad revelar el genoma completo de *Diatraea saccharalis*. Habiéndose reportado a la fecha el primer borrador del genoma de dicha plaga clave; realizado mediante la plataforma *Illumina HiSeq* en la que se estimó un tamaño del genoma de 359Mb, y se logró obtener una longitud total de 453Mb de secuencias genómicas que se ensamblan al genoma de *Diatraea saccharalis*. El análisis también evidencia una variación de las secuencias genómicas de 0.69%, indicando niveles bajos de heterocigosidad. Así mismo el contenido de GC genómico obtenido se ubica dentro del rango reportado para otros lepidópteros con un 33.74%. (Borges dos Santos, y otros, 2021)

En el Perú sólo se ha registrado el estudio realizado mediante RAPDs (Random Amplification of Polymorphic DNA): OPA8, OPA11, OPP17, OPC11 y GyakuU13 para la caracterización y variación molecular en *Diatraea saccharalis Fabricius* (León Alcántara, 2019); sin embargo, no se ha reportado estudios utilizando marcadores microsatélites para la genotipificación de *Diatraea saccharalis Fabricius*.

El objetivo principal de este estudio fue genotipificar poblaciones de *Diatraea saccharalis Fabricius* del cultivo de *Saccharum officinarum L.* (Caña de Azúcar) usando tres microsatélites (*Dsc2*, *Dsc13*, *Dsc14*), de las regiones Lambayeque y La Libertad. Los objetivos específicos del estudio fueron; determinar la frecuencia de alelos de los microsatélites *Dsc2*, *Dsc13*, *Dsc14* y estimar la variación genética entre y dentro de las poblaciones de *Diatraea saccharalis Fabricius*. Los resultados obtenidos proporcionan información que nos permite comprender la variabilidad genética entre poblaciones de las larvas, facilitando el mejoramiento del manejo integrado de la plaga presente en los distintos campos agroindustriales de caña de azúcar.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes bibliográficos

La caracterización molecular del material hereditario ha tenido un gran desarrollo científico con el surgimiento de nuevas herramientas de análisis de ADN, como la PCR y secuenciamiento. El genoma del organismo de interés sanitario y agroindustrial han sido genotipificados para un mejor control epidemiológico de enfermedades infecciosas y control biológico de plagas que atacan a los cultivos. Como es el caso de *Diatraea saccharalis* que afecta a los cultivos de caña de azúcar.

Se utilizó ocho microsatélites para la determinación de la variabilidad genética de 185 individuos pertenecientes a seis poblaciones de *Cydia pomonella* L. (Lepidóptera: Tortricidae) de las principales regiones productoras de manzanas en Chile Central, reportando coeficientes bajos de diferenciación genética entre poblaciones ($F_{ST} = 0,0-0,00097$ y $G_{ST} = 0,005 - 0,127$), con altos niveles de flujo génico (alrededor de 250 migrantes entre poblaciones). Así mismo se encontraron altas frecuencias de alelos nulos ($N_a = 0,292$), lo que se relaciona con el significativo déficit de heterocigotos encontrado. (Espinoza, Fuentes-Contreras, Barros, & Ramírez, 2007)

En el Valle geográfico del río Cauca se desarrolló un proyecto con el objetivo de determinar la diversidad y estructura genética de las poblaciones de *Diatraea spp.* a través de la distribución geográfica de los haplotipos, en el cual utilizaron ADN mitocondrial y caracteres de genitalia interna; como resultado para *Diatraea saccharalis* se obtuvo una diversidad haplotípica de 0,19491 y diversidad nucleotídica de 0,00121 mostrando homogeneidad genética entre las poblaciones. Así mismo, para *Diatraea indiginella* se generó 11 haplotipos, de los cuales siete fueron únicos, además se obtuvo un índice de fijación relativamente bajo ($F_{ST}=0.114$) y un alto flujo de genes ($N_m= 3.88$). (Cadena Goyes, 2008)

En Brasil se realizó un estudio con el objetivo de secuenciar y analizar la región control del ADN mitocondrial de *Diatraea saccharalis*, obteniendo mediante secuenciación un producto amplificado de 568 pb, siendo esto menor al compararlo con lo observado para

Bombyx mori que posee una longitud de 725pb. Además, se identificó la región control, como una secuencia de 338 nucleótidos en el interior del segmento amplificado; los resultados evidencian en dicha región un alto contenido de AT con un 93.59%. incluso la alineación de secuencias mostró que la región posee un 76% de similitud con *Cydia pomonella*, otro individuo perteneciente a los lepidópteros. (Pereira Bravo, Felipes, Bertolini Zanatta, Da Conceição Silva, & Fernández, 2008)

Con el propósito de detectar cambios tempranos en la frecuencia de los alelos de resistencia en poblaciones de campo de *Diatraea saccharalis* se describió la secuencia completa del genoma mitocondrial de esta plaga de gran importancia económica (GenBank: FJ240227), como resultado se obtuvo genes codificantes de proteínas, dos genes de rRNA y 22 genes de tRNA, sumando un total de 15,490 pb. (Li, y otros, 2011)

Pavinato y otros (2013) diseñaron 16 loci de microsatélites que al ser probados en 30 individuos de *Diatraea saccharalis*, se obtuvo 12 locis polimórficos (Dsc1, Dsc2, Dsc3, Dsc7, Dsc9, Dsc10, Dsc11, Dsc13, Dsc14, Dsc16, Dsc19 y Dsc20), con un rango de 2 a 7 alelos para *Diatraea saccharalis*. Así mismo, se evidenció exceso de homocigotos que causaron desviación en las proporciones de *Hardy – Weinberg* debido a la presencia de alelos nulos con una frecuencia de 0.248 (Pavinato, y otros, 2013)

Se realizó una investigación en el sur de Estados Unidos (sur de Texas, este de Texas, Luisiana y Florida), con la finalidad de analizar la variación genética entre las poblaciones de *Diatraea saccharalis Fabricius* pertenecientes a las localidades antes mencionadas; empleándose dos técnicas moleculares distintas; polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP) y análisis de la subunidad I del Citocromo C oxidasa (COI), concluyendo en ambas que la población de Florida no ha podido ser introducida, debido a que es genéticamente diferente al resto de poblaciones. (Joyce, y otros, 2014)

(Barbosa Nascimento, 2015) para determinar la diversidad genética y estructura poblacional de 426 individuos pertenecientes a 17 poblaciones de *Diatraea saccharalis Fabricius*, utilizo 8 marcadores moleculares microsatélites (Dsc1, Dsc3, Dsc7, Dsc9,

Dsc10, Dsc11, Dsc13 y Dsc20), reportando un total de 127 alelos. Así mismo, los loci fueron altamente polimórficos con un promedio de 15.87, siendo los loci Dsc3, y Dsc13 las que presentan mayor variabilidad y los loci Dsc7, Dsc11 y Dsc20 una menor variabilidad genética. En todas las poblaciones, la heterocigosidad observada (H_O) fue menor que la heterocigosidad esperada (H_E). Además, los índices de fijación intrapoblacional (F) por cada población tiene un valor promedio de 0,530, el coeficiente de consanguinidad entre especies fue de 0,399 y los valores estimados de F_{IT} y F_{ST} fueron 0,437 y 0,062 respectivamente, indicándonos que existe una estructura genética entre las poblaciones.

En Colombia se realizó un estudio mediante amplificación cruzada, cuya finalidad fue la identificación de polimorfismos en *Anadara similis*, utilizando 24 marcadores microsatélites diseñados inicialmente para la identificación de *Anadara tuberculosa*, de los cuales solo cinco de ellos lograron amplificar adecuadamente, los 19 restantes presentaron bandas inespecíficas que hacían imposible la lectura de ellas. El estudio también reveló una heterocigosidad observada (0.855 ± 0.964) menor a la esperada (0.346 ± 0.800), lo que evidencia un déficit de heterocigotos, probablemente debido a la presencia de alelos nulos; así mismo, se reportó en equilibrio de *Hardy-Weinberg* solo uno de los locus. (Gil Saavedra, 2015)

Con el propósito de examinar la divergencia genética entre poblaciones de *Diatraea lineolata* y *Diatraea saccharalis* se realizó un estudio en El Salvador en cuatro plantas hospederas (Arroz, Maíz, Sorgo y Caña de azúcar) utilizando las técnicas moleculares; Citocromo oxidasa I de ADN mitocondrial (COI) y Polimorfismo de Longitud de fragmentos amplificados (AFLP), obteniéndose como resultado dos poblaciones genéticamente divergentes para ambas especies, además se evidenció niveles elevados de parasitismo en la planta huésped de ambas polillas. (Joyce, y otros, 2016)

Una investigación realizada en Brasil reportó el análisis de la secuencia intergénica de los rRNA 5.8S y 28S en la región transitoria (ITS 2) de *Diatraea saccharalis* y *Diatraea flavipennella*, lográndose identificar ocho secuencias de microsatélites diferentes, de las

cuales tres de ellas (CA, CAG y TCG) son específicas en *Diatraea saccharalis*. (Regueira Neto, Barros, Morais, Balbino, & Loreto, 2017)

En Argentina se realizó un estudio en el que se caracterizó la estructura genética de *Diatraea saccharalis* a partir de muestras colectadas en cultivos de caña de azúcar y maíz pertenecientes a regiones diferentes de Argentina (Tucumán, Jujuy y Buenos Aires) en comparación con muestras analizadas pertenecientes a regiones de Brasil (San Pablo y Minas Gerais), el estudio fue ejecutado mediante el análisis de la subunidad I del Citocromo C oxidasa (COI), lo que evidenció una diversidad haplotípica de 0.8 y una diversidad nucleotídica de 0.0058. Así mismo, se observó una mayor variabilidad genética (76,7%) dentro de las poblaciones, mientras que entre las poblaciones la variabilidad genética fue menor con un porcentaje de 23.3%. (Fogliata, Perera, Alves-Pereira, Zucchi, & Murúa, 2022)

2.2 Bases teóricas

2.2.1 *Diatraea saccharalis*

2.2.1.1 Clasificación taxonómica

Diatraea saccharalis está clasificada de la siguiente manera por (Argueta & Hernández Chicas, 2011)

Reino	: Animalia
Phylum	: Arthropoda
Clase	: Insecta
Orden	: Lepidoptera
Familia	: Pyralidae
Subfamilia	: Crambidae
Género	: <i>Diatraea</i>
Especie	: <i>Diatraea saccharalis</i>

2.2.1.2 Ciclo biológico

Diatraea saccharalis es un insecto que posee metamorfosis completa; es decir, pasa por las fases de huevo, larva, pupa y adulto.

Los huevos son ovalados y planos, se colocan en masas de aproximadamente 30 huevos o más y al tercer día de haber sido puestos muestran una coloración amarillenta. Las larvas presentan franjas longitudinales a lo largo del dorso de color variable pero más claras que las de otras especies. Durante este período pasa por seis estadios larvales: Larva I, II, III, IV, V, VI. Posteriormente pasa por un estadio de pupa, con las siguientes características: presenta un color oscuro, cuernos cefálicos puntiagudos y la porción dorsal de la pupa posee un relieve en todo el dorso propio de la especie. Finalmente se convierte en adulto, caracterizándose por ser polillas de color amarillento y muestran una posición de las alas en reposo convexa; a manera de techo a dos aguas. (Gómez Laverde & Vargas Orozco, 2014)

2.2.2 Reacción en cadena de polimerasa (PCR)

Es una reacción enzimática *in vitro* que tiene como función replicar o amplificar millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos donde la secuencia de interés es copiada.

Los componentes de la reacción son el templado o molde (ADN o ADNc) de la muestra, la enzima ADN polimerasa, los cebadores, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ión magnesio (Mg⁺), una solución amortiguadora o buffer y agua. Todos estos elementos son participantes en las tres principales etapas pertenecientes al proceso de PCR: desnaturalización, hibridación y extensión y al finalizar el proceso de amplificación se corrobora si se logró amplificar la secuencia de interés, mediante el análisis con la técnica de electroforesis a partir de los amplicones o también llamados productos de la PCR obtenidos. (Tamay de Dios, Ibarra, & Velasquillo, 2013)

2.2.3. Microsatélites

Son secuencias de ADN compuestas por repeticiones de 1 a 6 pares de bases que se repiten en *tándem* (motivos) (Checa Cortés, 2004). Dichas secuencias se han encontrado en genomas eucariontes, procariontes e incluso se han identificado en genomas de mitocondrias y cloroplastos. Estos marcadores se caracterizan por ser altamente polimórficos en cuanto a su longitud y se distribuyen en regiones codificantes y no codificantes. Características idóneas para usarse como marcadores moleculares en el nivel de individuos, población y especie. (Zane, Bargelloni, & Patarnello, 2002).

Los microsatélites también son llamados secuencias simples repetidas o SSRs (simple sequence repeats). Los microsatélites que están compuestos por un motivo único se consideran puros o perfectos; aquellos conformados por dos o más motivos son considerados compuestos y se conocen como interrumpidos cuando un nucleótido o más se insertan en alguna parte de las repeticiones (Schlötterer, 2000)

Los marcadores microsatélites con el transcurso del tiempo han logrado ir complementando con otras técnicas moleculares, los RFLPs, RAPDs, ALPs, y otras, adquiriendo aplicaciones a nivel evolutivo, temas relacionados a la conservación de especies, entre otros, análisis de genética poblacional, creación de mapas genéticos e incluso para la detección de genes de importancia. (Aranguren-Méndez, Román-Bravo, Isea, Villasmil, & Jordana, 2005)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación fue realizada mediante el diseño de investigación de tipo observacional, prospectivo, transversal; ejecutada en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

3.1. Población y muestra de estudio

3.1.1. Población

La población estuvo constituida por individuos de *Diatraea saccharalis* *Fabricius* presentes en los cultivos de caña de azúcar de las agroindustrias Tumán, Casa Grande y Laredo.

3.1.2. Área de estudio

3.1.2.1. Agroindustria Tumán (Laboratorio “Rinconazo”)

Se encuentra ubicado en el caserío “Rinconazo”, distrito Tumán, Provincia de Chiclayo, departamento Lambayeque y se localiza en las coordenadas UTM:

Sur: 6°48'20.0"

Oeste: 79°41'06.0"

3.1.2.2. Agroindustria Casa Grande

Se encuentra ubicado en el distrito de Casa Grande, Provincia de Ascope, departamento de La Libertad y se localiza en las coordenadas UTM:

Sur: 7°45'10.5"

Oeste: 79°11'33.0"

3.1.2.3. Agroindustria Laredo

Se encuentra ubicado en el distrito de Laredo, Provincia de Trujillo, departamento de La Libertad y se localiza en las coordenadas UTM:

Sur: 8°05'00.1"

Oeste: 78°57'49.6"

Figura 1

Localización geográfica de las áreas de estudio; Agroindustria Tumán (Laboratorio “Rinconazo”) en Lambayeque (1), Agroindustria Casa Grande (2) y Agroindustria Laredo (3) en La Libertad.



*Tomado de Google Earth

3.1.3. Muestra de estudio

Un total de 100 individuos de *Diatraea saccharalis* Fabricius fueron analizados siendo 40 de Tumán y 30 de Casa Grande y 30 de Laredo.

3.1.3.1. Criterio de Inclusión: Larvas de *Diatraea saccharalis* Fabricius de estadio III y IV.

3.1.3.2. Criterio de Exclusión: Larvas de *Diatraea saccharalis* Fabricius parasitadas por *Trichogramma* sp, *Paratheresia claripalpis* o infectadas con *Nosema* sp.

3.2. Metodología

3.2.1. Flujo de trabajo

El flujo de trabajo empleado consistió en la recolección y almacenamiento de larvas de *Diatraea saccharalis* Fabricius, extracción del material genético de las muestras, amplificación del material genético extraído y finalmente la electroforesis de los amplicones obtenidos, este procesamiento quedó evidenciado en la siguiente figura:

Figura 2.

Flujo de trabajo utilizado para el procesamiento de muestras de *Diatraea saccharalis* Fabricius



3.2.2. Procedimiento de recolección de las muestras

Las muestras de larvas de *Diatraea saccharalis Fabricius* fueron colectadas en distintos lugares de los campos de cultivo de caña de azúcar pertenecientes a las agroindustrias de Tumbayaco (Lambayeque), Casa Grande y Laredo (La Libertad). La recolección de larvas en campo fue realizada por el personal técnico de las agroindustrias antes mencionadas; extrayendo los individuos encontrados en la planta infectada (corazones muertos) de caña.

3.2.3. Transporte de muestras al Laboratorio de Biología Molecular

Las muestras colectadas fueron depositadas en tubos de plástico de 2.5 ml. con etanol al 70%, los mismos que fueron rotulados por fecha, número de individuo y lugar de colección.

3.2.4. Extracción de ADN

El ADN se extrajo y se purificó según lo indicado por el kit comercial “**High Pure PCR Template Preparation**” – Roche (Roche Diagnostics GmbH, 2019); el protocolo fue modificado basándose en las características de las muestras. La extracción del ADN se realizó siguiendo las siguientes etapas: **1.** Se maceró en un mortero estéril las cabezas de las larvas añadiéndole 300 µl de T.E. (TRIS-EDTA) en proporción de 20:5 y lo obtenido fue colocado en tubos Eppendorf de 1.5 ml. estériles. **2.** Se agregó 200 µl de Buffer de Lisis más 40 µl de Proteinasa K y se incubó en baño María a 56°C por 60 minutos aproximadamente o hasta que se observó la consistencia líquida de la muestra. **3.** Posteriormente, se añadió 200 µl de Binding Buffer, se homogenizó en vórtex durante 10 segundos y se incubó en baño maría a 70°C por 20 minutos, hasta que la muestra obtuvo un color transparente. **4.** Se retiró del baño maría, dejando enfriar. Luego se adicionó 200 µl de Isopropanol helado y se homogenizó lentamente por inversión. **5.** Lo obtenido se transfirió a una columna con matriz de sílice y se centrifugó a 3000 rpm por 2 minutos. **6.** La columna se pasó a un nuevo tubo, se agregó 500 µl de solución inhibidora y se centrifugó a 6000 rpm por 3 minutos. **7.** Se hizo el cambio del tubo que contiene el precipitado, se realizó un doble lavado utilizando 500 µl

de wash buffer y centrifugando a 6000 rpm por 3 minutos para cada lavado. **8.** Se coloca la columna en un nuevo tubo y se realiza el secado centrifugando a 8000 rpm por 3 minutos. **9.** A continuación se realizó la obtención del ADN mediante un lavado con 200 ul de Elution y un proceso de centrifugación de 10000 rpm por 2 minutos. **10.** Finalmente se almacenó a -15 °C.

3.2.5. Secuencia de cebadores

Se utilizaron los locus microsatélites descritos por (Pavinato, y otros, 2013)

Cuadro 1.

Secuencias de cebadores diseñados para detectar *Diatraea saccharalis Fabricius*

Locus	Acceso a GenBank	Secuencias de los cebadores (5' – 3')	Repetición de nucleótidos en tándem	Ta (°C)	Rango de tamaño (pb)
Dsc2	GF111061	F: GCGGTGCCTCTTTGTCATA R: TTGACCAACTACTGCAAGACG	(CA) ₁₉	60	188–230
Dsc13	GF111053	F: CGTGGACTAACCCATAGAAGAT R: GGTTTAGCAGAACTTGGCATA F: CTATTCTCCGTTCCGCTGAT	(GT) ₁₈	54	220–270
Dsc14	GF111991	R:GAATGAGATTATGTGTTATGTGTAT GC	(AC) ₁₆	60	84–104

F= Cebador sentido; R= Cebador antisentido; Ta= Temperatura hibridación

3.2.6. Amplificación de ADN de *Diatraea saccharalis Fabricius* mediante PCR convencional.

Para el proceso de amplificación se utilizó un termociclador punto final de la marca Applied Biosystems. Las condiciones de la PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa) fueron estandarizadas tomando en cuenta el reporte de la web NCBI (Centro nacional de información biotecnológica) tanto para los volúmenes

de las reacciones (Cuadro 2 y 3) como también para las temperaturas de reacción (Cuadro 4)

Cuadro 2.

Condiciones de PCR utilizadas para amplificar, utilizando el microsatélite Dsc2 y Dsc13.

COMPONENTES	[Inicial]	Volumen (ul)	[Final]
Agua	-	13.30	-
Buffer de la reacción	5X	5.00	1X
MgCl₂	25 mM	1.50	1.5 mM
dNTPs	2.5 mM	2.00	200 uM
Cebadores	10 uM	1.00	0.4 uM
Taq Polimerasa	5 u/ul	0.20	1 u/ul
ADN		2.00	
Volumen Total		25.00	

Cuadro 3.

Condiciones de PCR utilizadas para amplificar, utilizando el microsatélite Dsc14.

COMPONENTES	[Inicial]	Volumen (ul)	[Final]
Agua	-	14.80	-
Buffer de la reacción	5X	5.00	1X
MgCl₂	25 mM	1.50	1.5 mM
dNTPs	2.5 mM	1.00	100 uM
Cebadores	10 uM	0.50	0.2 uM
Taq Polimerasa	5 u/ul	0.20	1 u/ul
ADN		2.00	
Volumen Total		25.00	

Cuadro 4.

Condiciones térmicas de la PCR utilizadas para amplificar, utilizando los microsatélites Dsc2, Dsc13 y Dsc14

Paso	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Pre-denaturación	94°C	3 min	1
Denaturación	94°C	30 seg	30
Alineamiento *	55- 65°C	45 seg	
Extensión	72°C	45 seg	
Extensión final	72°C	3 min	1
Conservación	4°C	∞	

*La temperatura de Alineamiento fueron de 65°C, 61°C y 55°C para los cebadores Dsc2, Dsc13 y Dsc14 respectivamente.

3.2.7. Electroforesis

Las muestras amplificadas fueron analizadas mediante electroforesis vertical (Soplpuco Vilchez, 2019) en geles de poliacrilamida al 12% que estuvieron compuestos por 16 ml de Acrilamida-Bisacrilamida en proporción 29:1, 16 ml de Buffer TBE 5X, 50 ul de N, N, N'N' Tetrametiletilendiamina TEMED, 500 ul de Persulfato de Amonio APS al 10% en un volumen final de 40 ml. Posteriormente se dejó polimerizar por 60 minutos, en placas que contenían un peine generador de pocillos. Se implementó en la cámara de electroforesis y se vertió con las placas de vidrio conteniendo el gel, en la cubeta superior e inferior se colocó el buffer de TBE 1X (TRIS-ÁCIDO BÓRICO-EDTA). La migración electroforética se realizó bajo las siguientes condiciones: **1.** Dsc2 y Dsc14 con 100 voltios durante 22 y 15 horas respectivamente. **2.** Dsc13: 110 voltios durante 23 horas. Luego, se procedió a realizar la tinción del gel mediante el siguiente procedimiento: A) solución fijadora (solución de ácido acético) por 5 minutos. B) solución de Nitrato de Plata por 10 minutos y doble lavado con agua. C) Solución reveladora (Hidróxido de Sodio más formaldehído). Finalmente se expuso a la luz blanca del transiluminador para la observación de los amplicones.

3.3. Análisis estadístico

(Software Arlequín 3.5)

Las estimaciones de las frecuencias alélicas fueron obtenidas mediante la fórmula:

$$Frecuencia\ alélica = F(A) = \frac{\text{número de alelos observados}}{\text{número total de alelos}}$$

Las estimaciones de las frecuencias genotípicas fueron obtenidas mediante la fórmula:

$$Frecuencia\ genotípicas = \frac{\text{número de genotipos observados}}{\text{número de muestras}}$$

Los índices de heterocigosidad se obtuvieron mediante el software Arlequín 3.5, lo que fue posteriormente corroborado empleando las siguientes fórmulas:

Heterocigosidad observada (H_o):

$$H_o = \frac{\text{individuos heterocigotos}}{\text{número total de individuos analizados}}$$

Heterocigosidad esperada (H_e) según Nei, 1987:

$$H_e = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{j=1}^k p_i^2 \right)$$

Donde:

n: número de copias génicas de las muestras diploides

k: número de alelos diferentes

Pi: frecuencia alélica por locus

El análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg fue realizada, según Guo and Thompson 1992.

El estadístico F da información sobre la estructura población de las larvas de *Diatraea saccharalis* Fabricius pertenecientes a las agroindustrias Tumán, Casa Grande y Laredo. Para la obtención del estadístico F se emplearon las siguientes fórmulas:

Coeficiente de endogamia (F_{IS})

$$F_{IS} = \frac{\overline{H_S} - H_I}{\overline{H_S}}$$

Donde:

$\overline{H_S}$: heterocigosidad promedio esperada en cada subpoblación.

H_I : heterocigosidad promedio observada en grupos de poblaciones.

Índice de fijación (F_{ST})

$$F_{ST} = \frac{H_T - \overline{H_S}}{H_T}$$

Donde:

$\overline{H_S}$: heterocigosidad promedio esperada en cada subpoblación.

H_T : heterocigosidad esperada en la población total.

Coeficiente de fijación total (F_{IT})

$$F_{IT} = \frac{H_T - \overline{H_I}}{H_T}$$

Donde:

$\overline{H_I}$: heterocigosidad promedio observada en grupos de poblaciones.

H_T : heterocigosidad esperada en la población total.

Para determinar la tasa de migración de *Diatraea saccharalis Fabricius* entre las tres áreas de colecta se utilizó el valor de Nm: Número de migrantes. (Espinoza, Fuentes-Contreras, Barros, & Ramírez, 2007) y se obtiene usando la relación:

$$Nm = \frac{1}{4} \left(\frac{1}{F_{ST}} - 1 \right)$$

Donde:

F_{ST} : Índice de fijación

El índice de diversidad genética de Nei (G-estadístico de Nei; 1973,1977) se determinó mediante las siguientes fórmulas:

$$G_{ST} = \frac{D_{ST}}{H_T}$$

$$D_{ST} = H_T - H_S$$

Donde:

D_{ST} : diversidad genética entre las poblaciones

H_T : heterocigosidad genética en la población total

H_S : diversidad genética dentro de la subpoblación

IV. RESULTADOS

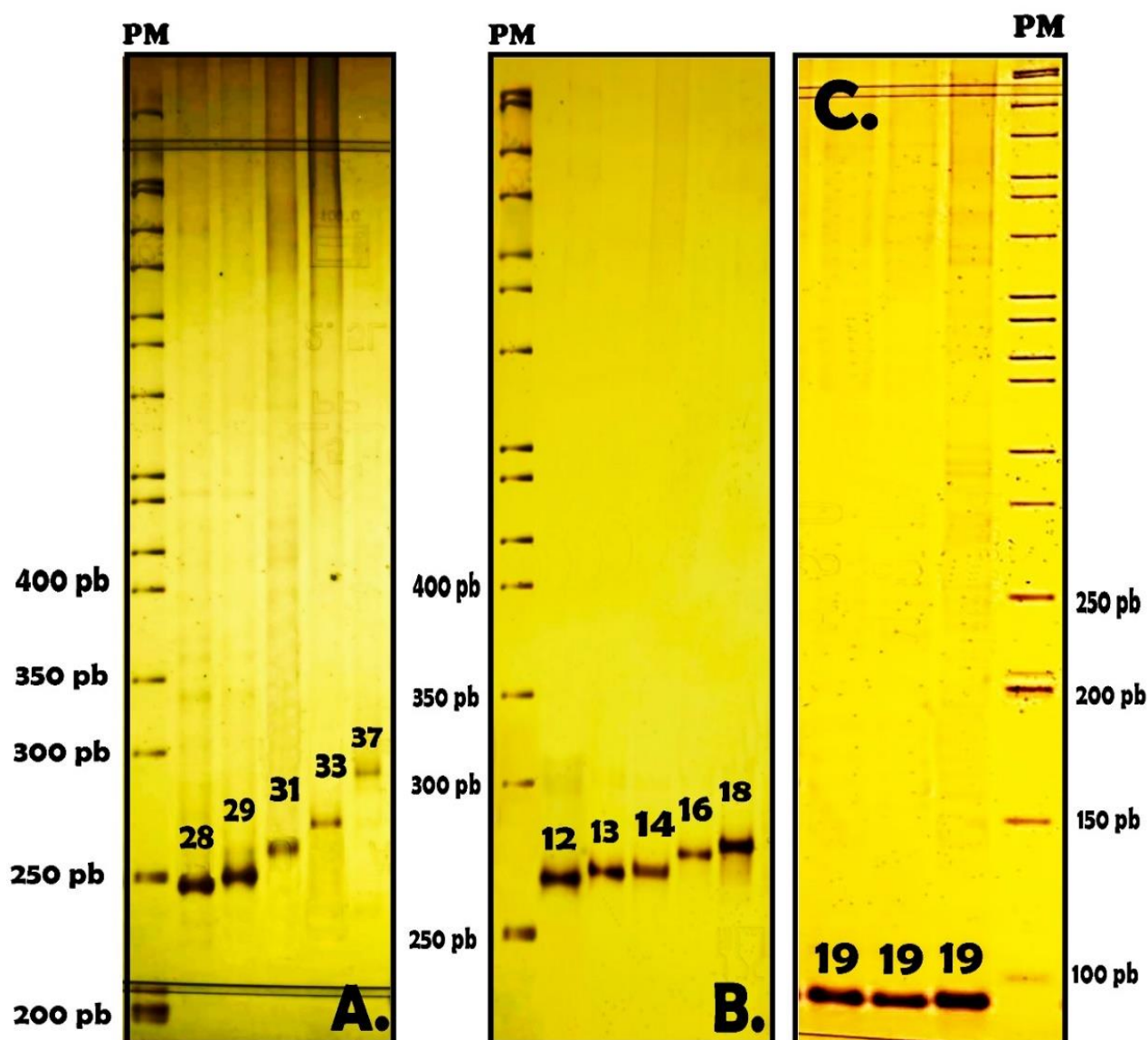
Se analizaron 100 muestras de ADN provenientes de larvas del III y IV estadio de *Diatraea saccharalis Fabricius*, para genotipificación con tres microsatélites (Dsc2, Dsc13, Dsc14).

4.1. Análisis de los geles de Electroforesis

Las imágenes de los tres microsatélites muestran los alelos encontrados en el análisis. Para el Dsc2 observamos cinco alelos con las repeticiones 28, 29, 31, 33 y 37. Además, para Dsc13 observamos cinco alelos con las repeticiones 12, 13, 14, 16 y 18. Para Dsc14 observamos sólo un alelo con repetición 19.

Figura 3.

Corridas electroforéticas de los microsatélites Dsc2(A), Dsc13(B) y Dsc14(C)



4.1.1. Agroindustria Tumán

Las frecuencias alélicas de cada marcador microsatélite se presentan en la tabla 1. Los alelos más frecuentes fueron; 29 (Dsc2) con frecuencia 0.39 y 12 (Dsc13) con frecuencia de 0.45. Los alelos con menos frecuencia fueron: 33 (Dsc2) con 0.01 de frecuencia y 18 (Dsc13) con 0.06 de frecuencia. El locus Dsc14 es monomórfico en los individuos de *Diatraea saccharalis Fabricius*.

Tabla 1.

Frecuencias alélicas de los locus Dsc2, Dsc13 y Dsc14 de *Diatraea saccharalis Fabricius* pertenecientes a la Agroindustria Tumán (Departamento de Lambayeque)

Locus	Alelos	N°	Frecuencias Alélicas
Dsc2	28	23	0.31
	29	29	0.39
	31	19	0.26
	33	1	0.01
	37	2	0.03
Dsc13	12	35	0.45
	13	19	0.24
	14	7	0.09
	16	12	0.15
	18	5	0.06
Dsc14	19	18	1.00

En la tabla 2 se muestra ocho genotipos en la muestra analizada de la Agroindustria Tumán para el locus Dsc2, los genotipos más frecuentes son 28/29 y 29/31 ambos con frecuencia de 0.216. Para el locus Dsc13 se observaron diez genotipos siendo más frecuente el genotipo homocigoto 12/12 con frecuencia de 0.385.

Tabla 2.

Frecuencias genotípicas observadas de los locus Dsc2 y Dsc13 de *Diatraea saccharalis Fabricius* pertenecientes a la Agroindustria Tumán (Departamento Lambayeque)

Locus	Tipo de genotipo	Frecuencias	
		N°	Observada
Dsc2 (37)	28/28	5	0.135
	29/29	6	0.162
	31/31	3	0.081

Dsc13 (39)	37/37	1	0.027
	28/29	8	0.216
	28/31	5	0.135
	29/31	8	0.216
	29/33	1	0.027
	12/12	15	0.385
	13/13	5	0.128
	16/16	5	0.128
	18/18	2	0.051
	12/13	4	0.103
	12/14	1	0.026
	13/14	4	0.103
	13/16	1	0.026
	14/16	1	0.026
	14/18	1	0.026

Al analizar las muestras pertenecientes a la Agroindustria Tumán (Tabla 3). Considerando el locus Dsc2 encontramos los homocigotos y heterocigotos con frecuencias de 0.405 y 0.595 respectivamente. Para el locus Dsc13 se encontraron frecuencias de homocigotos y heterocigotos de 0.692 y 0.308 respectivamente.

Tabla 3.

Frecuencias de homocigotos y heterocigotos de los locus Dsc2, Dsc13 de *Diatraea saccharalis Fabricius* pertenecientes a la Agroindustria Tumán (Departamento Lambayeque)

Locus	Genotipo	Nº	Frecuencia	Tipo de genotipo
Dsc2	Homocigoto (4)	15	0.405	28/28
				29/29
				31/31
				37/37

Dsc13	Heterocigoto (4)	22	0.595	28/29
				28/31
				29/31
				29/33
	Homocigoto (4)	27	0.692	12/12
				13/13
				16/16
				18/18
	Heterocigoto (6)	12	0.308	12/13
				12/14
				13/14
				13/16
				14/16
				14/18

En el anexo 01 se muestran los alelos y genotipos de las 40 muestras analizadas.

4.1.2. Agroindustria Casa Grande

Las frecuencias alélicas de cada marcador microsatélite se presentan en la tabla 4. Los alelos más frecuentes fueron: 29 (Dsc2) con una frecuencia de 0.67 y 16(Dsc13) con una frecuencia de 0.5. Los alelos menos frecuentes fueron 31(Dsc2) con una frecuencia de 0.03 y 18 (Dsc13) con frecuencia de 0.02. El locus Dsc14 es monomórfico.

Tabla 4.

Frecuencias alélicas de los locus Dsc2, Dsc13 y Dsc14 de *Diatraea saccharalis Fabricius* perteneciente a la Agroindustria Casa Grande (Departamento de La Libertad)

Locus	Alelos	N°	Frecuencias alélicas
Dsc2	28	17	0.29
	29	39	0.67
	31	2	0.03

Dsc13	13	11	0.18
	14	17	0.28
	16	31	0.52
	18	1	0.02
Dsc14	19	28	1.00

En la tabla 5 se observa cuatro genotipos en la muestra analizada para el locus Dsc2 en la población de Casa Grande, el genotipo más frecuente es 29/29 con frecuencia 0.552. Para el locus Dsc13 se observan siete genotipos, el más frecuente es 16/16 con frecuencia (0.333).

Tabla 5.

Frecuencias genotípicas observadas de los locus Dsc2 y Dsc13 de *Diatraea saccharalis* *Fabricius* pertenecientes a la Agroindustria Casa Grande (Departamento de La Libertad)

Locus	Tipo de genotipo	Frecuencias	
		Nº	Observadas
Dsc2 (29)	28/28	6	0.207
	29/29	16	0.552
	28/29	5	0.172
	29/31	2	0.069
Dsc13 (30)	13/13	2	0.067
	14/14	3	0.100
	16/16	10	0.333
	13/14	3	0.100
	13/16	3	0.100
	13/18	1	0.033
	14/16	8	0.267

En las muestras procedentes de la Agroindustria Casa Grande (Tabla 6). Al considerar el locus Dsc2 encontramos los homocigotos en mayor frecuencia que los heterocigotos con valores de 0.759 y 0.241 respectivamente. Para el locus Dsc13 se encontraron frecuencias de homocigotos y heterocigotos de 0.500 en ambos casos.

Tabla 6.

Frecuencias de homocigotos y heterocigotos de los locus Dsc2, Dsc13 de *Diatraea saccharalis Fabricius* pertenecientes a la Agroindustria Casa Grande (Departamento La Libertad)

Locus	Genotipo	N°	Frecuencia	Tipo de Genotipo
Dsc2	Homocigoto	22	0.759	28/28
	(2)			29/29
	Heterocigoto	7	0.241	28/29
	(2)			29/31
Dsc13	Homocigoto	15	0.500	13/13
				14/14
				16/16
	Heterocigoto	15	0.500	13/14
				13/16
				13/18
				14/16

En el anexo 02 se muestran alelos y genotipos de las 30 muestras analizadas

4.1.3. Agroindustria Laredo

El análisis de las muestras procedentes de la Agroindustria Laredo (Tabla 7) muestra las frecuencias alélicas de cada marcador microsatélite. Los alelos más frecuentes fueron: 16 (Dsc13) con una frecuencia de 0.71 y 28 (Dsc2) con una frecuencia de 0.70. Los alelos con menos frecuencia fueron: 33 (Dsc2), 37 (Dsc2) y 18 (Dsc13) con una frecuencia de 0.04 en los tres casos. El locus Dsc14 es monomórfico en los individuos de *Diatraea saccharalis Fabricius*.

Tabla 7.

Frecuencias alélicas de los locus Dsc2, Dsc13 y Dsc14 en larvas de *Diatraea saccharalis* *Fabricius* perteneciente a la Agroindustria Laredo (Departamento de La Libertad)

Locus	Alelos	N°	Frecuencias Alélicas
Dsc2	28	39	0.70
	29	13	0.23
	33	2	0.04
	37	2	0.04
Dsc13	13	11	0.20
	14	3	0.05
	16	40	0.71
	18	2	0.04
Dsc14	19	18	1.00

La tabla 8 se muestra se muestra cinco genotipos en la muestra analizada de la Agroindustria Laredo para el locus Dsc2, el genotipo más frecuente es 28/28 con frecuencia de 0.571. Para el locus Dsc13 se observaron seis genotipos siendo más frecuente el genotipo homocigoto 16/16 con frecuencia de 0.679.

Tabla 8.

Frecuencias genotípicas observadas y de los locus Dsc2 y Dsc13 de *Diatraea saccharalis* *Fabricius* pertenecientes a la Agroindustria Laredo (Departamento de La Libertad)

Locus	Tipo de genotipo	Frecuencias	
		N°	Observada
Dsc2 (28)	28/28	16	0.571
	29/29	3	0.107
	33/33	1	0.036
	37/37	1	0.036
	28/29	7	0.250

Dsc13 (28)	13/13	5	0.179
	14/14	1	0.036
	16/16	19	0.679
	18/18	1	0.036
	13/16	1	0.036
	14/16	1	0.036

En muestras de la Agroindustria Laredo (Tabla 9). Al considerar el locus Dsc2 encontramos los homocigotos en mayor frecuencia que los heterocigotos con valores de 0.750 y 0.250 respectivamente. Para el locus Dsc13 se encontró mayor frecuencia de homocigotos que de heterocigotos con valores de 0.929 y 0.071 respectivamente.

Tabla 9.

Frecuencias de homocigotos y heterocigotos por locus en las larvas de *Diatraea saccharalis* Fabricius de la Agroindustria Laredo (Departamento La Libertad)

Locus	Genotipo	Nº	Frecuencia	Tipo de genotipo
Dsc2	Homocigoto (4)	21	0.750	28/28
				29/29
				33/33
				37/37
	Heterocigoto (1)	7	0.250	28/29
Dsc13	Homocigoto (4)	26	0.929	13/13
				14/14
				16/16
				18/18
	Heterocigoto (2)	2	0.071	13/16
				14/16

En el anexo 03 se muestran alelos y genotipos de las 30 muestras analizadas

4.2. Heterocigosidad esperada, observada, estadísticos F (F_{IS} , F_{ST} Y F_{IT}) y número de migrantes (N_m) en las agroindustrias de Lambayeque y La Libertad

Al analizar la heterocigosidad de las tres agroindustrias (tabla 10), se observa que las heterocigosidades esperadas son mayores que las heterocigosidades observadas. Siendo así que, en promedio, la población extraída de la Agroindustria Tumán posee el índice de heterocigosidad observada más alto (0.301) con respecto a las otras dos poblaciones.

Tabla 10.

Heterocigosidad observada (H_o), heterocigosidad esperada (H_E) de dos marcadores microsatélites dentro de las poblaciones de *Diatraea saccharalis* Fabricius de los departamentos de Lambayeque y La Libertad.

Locus	Poblaciones			Promedios
	Tumán	Casa Grande	Laredo	
Dsc2				
H _E	0.692	0.469	0.467	0.543
H _O	0.595	0.241	0.250	0.362
Dsc13				
H _E	0.713	0.629	0.455	0.599
H _O	0.308	0.500	0.071	0.293
Dsc14				
H _E	0.000	0.000	0.000	0.000
H _O	0.000	0.000	0.000	0.000
$\overline{H_E}$	0.468	0.366	0.307	0.380*
$\overline{H_O}$	0.301	0.247	0.107	0.218

*Diversidad genética dentro de la subpoblación (H_s)

La tabla 11 nos muestra que la población extraída de la Agroindustria Laredo posee los valores más altos de coeficiente de endogamia, índice de fijación y coeficiente de fijación total en comparación con las otras dos agroindustrias.

Tabla 11.

Estimación del coeficiente de endogamia (F_{IS}), índice de fijación (F_{ST}) y coeficiente de fijación total (F_{IT}) de los microsatélites dentro de las poblaciones de *Diatraea saccharalis* Fabricius de los departamentos de Lambayeque y La Libertad.

Estadísticos F de Wright	Poblaciones			Promedios
	Tumán	Casa Grande	Laredo	
F_{IS}	0.358	0.325	0.651	0.445
F_{ST}	0.653	0.729	0.772	0.718
F_{IT}	0.777	0.817	0.921	0.838

La tabla 12 nos muestra que la población extraída de la Agroindustria Tumán posee un 0.133 de migrantes, lo que indica un nivel más alto de flujo génico, en comparación con las otras dos agroindustrias.

Tabla 12.

Estimación del número de migrantes por generación (N_m)

	Poblaciones			Promedio
	Tumán	Casa Grande	Laredo	
N_m	0.133	0.093	0.022	0.083

4.3. Frecuencias alélicas, heterocigosidad total y frecuencias genotípicas por locus en la población total

En la población estudiada se encontró cinco diferentes alelos tanto para el locus Dsc2 como para Dsc13 y un solo alelo para Dsc14; siendo más frecuentes los alelos 29 (Dsc2) con 0.43 y 16 (Dsc13) con 0.43. Así mismo, se obtuvo valores de heterocigosidad para los locus Dsc2 (0.628) y Dsc13 (0.722). Dsc14 no presentó valores de heterocigosidad por ser monomórfico. (Tabla 13)

Tabla 13.

Frecuencias alélicas y heterocigosidad de los locus Dsc2, Dsc13 y Dsc14 en la población total de *Diatraea saccharalis* Fabricius pertenecientes a los departamentos de Lambayeque y La Libertad.

Locus	Alelos	N°	Frecuencia Alélica	Heterocigosidad
Dsc2	28	79	0.42	0.628
	29	81	0.43	
	31	21	0.11	
	33	3	0.02	
	37	4	0.02	
Dsc13	12	35	0.18	0.722
	13	41	0.21	
	14	27	0.14	
	16	83	0.43	
	18	8	0.04	
Dsc14	19	64	1.00	Monomórfico
Heterocigosidad Total Promedio				0.675

En la población total en estudio (Tabla 14) se muestra nueve genotipos para el locus Dsc2, los genotipos más frecuentes son 28/28 y 29/29 con frecuencias de 0.287 y 0.266 respectivamente. Para el locus Dsc13 se observaron 12 genotipos siendo más frecuente el genotipo homocigoto 16/16 con frecuencia de 0.351.

Tabla 14.

Frecuencias genotípicas observadas de los locus Dsc2 y Dsc13 en la población de *Diatraea saccharalis* Fabricius de los departamentos de Lambayeque y La Libertad

Locus	Genotipo	Frecuencias	
		Nº	Observada
Dsc2 (94)	28/28	27	0.287
	29/29	25	0.266
	31/31	3	0.032
	33/33	1	0.011
	37/37	2	0.021
	28/29	20	0.213
	28/31	5	0.053
	29/31	10	0.106
	29/33	1	0.011
	12/12	15	0.155
Dsc13 (97)	13/13	12	0.124
	14/14	4	0.041
	16/16	34	0.351
	18/18	3	0.031
	12/13	4	0.041
	12/14	1	0.010
	13/14	7	0.072
	13/16	5	0.052
	13/18	1	0.010
	14/16	10	0.103
	14/18	1	0.010

4.4. Variación genética entre las poblaciones de las agroindustrias pertenecientes a los departamentos Lambayeque y La Libertad.

Al analizar la población total en estudio, se obtuvieron valores de heterocigosidad total (67.5%), heterocigosidad media esperada (38%), diversidad genética entre subpoblaciones ($D_{ST}=29.5\%$) e índice de diversidad genética de Nei ($G_{ST}=0.437$) que nos indica un 43.7% de variación correspondiente a diferencias genéticas entre poblaciones. (Tabla 15)

Tabla 15.

Estimación de los estadísticos; G_{ST} : Índice de diversidad genética de Nei., H_T : Heterocigosidad total, H_S : Heterocigosidad media esperada por población, D_{ST} : Diversidad genética entre subpoblaciones de *Diatraea saccharalis Fabricius* en los departamentos de Lambayeque y La Libertad.

Índices de diversidad	H_T	H_S	D_{ST}	G_{ST}
Población total de <i>Diatraea saccharalis Fabricius</i>	0.675	0.380	0.295	0.437

En la tabla 16 se observa la identidad genética de Nei sobre la diagonal, obteniendo valores que indican similitud mayor (0.890) entre las poblaciones de Laredo y Casa Grande. Bajo la diagonal se muestra las distancias genéticas correspondientes a las agroindustrias Tumán, Casa Grande y Laredo, evidenciándose mayor distancia (0.220) entre las poblaciones de Tumán y Laredo.

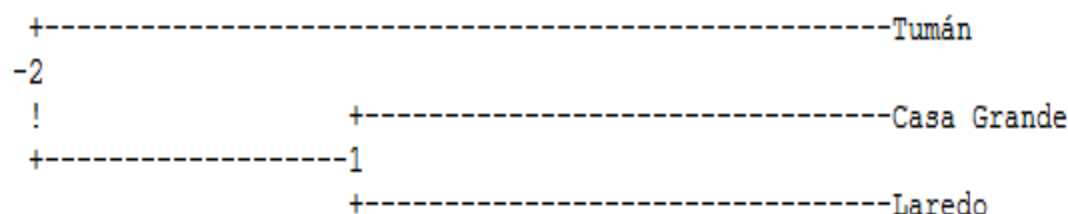
Tabla 16.

Estimación de la identidad genética de Nei y distancia genética de *Diatraea saccharalis Fabricius* de las agroindustrias pertenecientes a Lambayeque y La Libertad. (Software PopGene 1.32)

Pop ID	Tumán	Casa Grande	Laredo
Tumán	****	0.860	0.803
Casa Grande	0.151	****	0.890
Laredo	0.220	0.117	****

Figura 4.

Dendograma basado en las distancias genéticas de Nei de *Diatraea saccharalis Fabricius* para las regiones de Lambayeque y La Libertad. (Software PopGene 1.32)



V. DISCUSIÓN

Se realizó la genotipificación de *Diatraea saccharalis Fabricius*, plaga que afecta a los cultivos de caña de azúcar. Los resultados obtenidos provienen del análisis de 30 y 40 insectos de cada campo de cultivo, similar a los observados en otros estudios. (Espinoza, Fuentes-Contreras, Barros, & Ramírez, 2007) colectaron entre 15 a 40 larvas de la polilla de la manzana (*Cydia pomonella*). En *Diatraea saccharalis Fabricius* se han analizados muestras de ADN de 30 (Pavinato, y otros, 2013) y 35 (Fogliata, Perera, Alves-Pereira, Zucchi, & Murúa, 2022) especímenes. El número y tipos de marcadores estudiados varían en estos estudios, desde el enfoque de búsqueda, de más marcadores para RADPs, SSR y otros, así como del nivel del estudio, diferenciación genética poblacional o evolutiva del insecto (Joyce, y otros, 2014).

Los tres microsatélites seleccionados para el presente estudios fueron los que presentaron mayor número de alelos para cada uno como lo reportado por (Pavinato, y otros, 2013) para *Diatraea saccharalis Fabricius*. La especificidad de la secuencia de los cebadores de Dsc2, Dsc13 y Dsc14 fue verificada usando los programas de la plataforma de NCBI. Estos microsatélites fueron usados por primera vez en las poblaciones de *Diatraea sp.* obtenidas en las tres empresas agroindustriales de la región.

De los seis alelos reportados para el microsatélite Dsc2, cinco fueron encontrados en el estudio, con los alelos 28, 29, 31, 33 y 37. De la misma manera, los alelos 16 y 18 fueron los más y menos recurrentes, con 43% y 4%; el alelo presentó la misma tendencia en las tres localidades

para Dsc13. El Dsc14 fue monomórfico en las tres poblaciones, con el alelo 19; este marcador no tendría el mismo comportamiento al resto de los microsatélites Dsc2 y Dsc13, se debería incrementar el número de especímenes y poblaciones, así como analizar otros microsatélites para esclarecer las causas de la fijación del microsatélite Dsc14 en las poblaciones de *Diatraea saccharalis Fabricius* que infectan a los cultivos de caña de azúcar.

Respecto a los genotipos, nueve y 12 genotipos fueron encontrados para los microsatélites Dsc2 y Dsc13 respectivamente. Los genotipos homocigotos más frecuentes fueron 28/28 para Dsc2 y 16/16 para Dsc13, con 28.7% y 35.1%. Los genotipos 33/33, 29/33, 12/14, 13/18 y 14/18 se encontraron cada uno de ellos en solo un individuo y en Tumán se registran tres de ellos (29/33, 12/14 y 14/18). La heterocigosidad fue 62.8% y 72.2% para cada microsatélite y está relacionado al número de genotipos encontrados en las tres poblaciones.

Con relación al locus microsatélite Dsc2, al realizar el análisis en la población perteneciente a la Agroindustria Tumán, se obtuvo como resultado una heterocigosidad observada de 0.595, que es menor la heterocigosidad total (0.628), representado un 5.3% menos. En la Agroindustria Casa Grande, la heterocigosidad observada es de 0.241, que difiere a la heterocigosidad total (0.628) también con reducción del 61.6%. En el caso de Laredo la heterocigosidad fue 0.250 que es 60.2% menor a la heterocigosidad total. Asimismo, con relación al microsatélite Dsc13, se obtuvo en la población de Tumán una heterocigosidad observada de 0.308, valor menor a la heterocigosidad total (0.722) en un 57.3%. En la Agroindustria Casa Grande se obtuvo un 0.500 de heterocigosidad observada, que es menor en un 30.7% de la heterocigosidad total. En Laredo el valor de heterocigosidad observada (0.071) está muy por debajo a la heterocigosidad total.

Así mismo el coeficiente de diferenciación genómica (G_{ST}) entre las poblaciones poseen un valor de 0.437, equivalente a un 43.7% de la variación detectada y que se atribuye a diferencias genéticas entre poblaciones; mientras el 56.3% restante representa la diversidad genética dentro de las poblaciones de *Diatraea saccharalis Fabricius*. Dicho porcentaje de variación detectada entre poblaciones es mayor a lo reportado por (León Alcántara, 2019) en un 30.7%, pese a haberse trabajado en una población similar, pero mediante la utilización de marcadores moleculares RAPDs. De igual modo, al comparar el presente estudio con lo reportado por

(Fogliata, Perera, Alves-Pereira, Zucchi, & Murúa, 2022) mediante la subunidad I del citocromo C oxidasa (COI), se evidenció 20.5% menos de diferenciación genética entre las poblaciones de *Diatraea saccharalis Fabricius*.

Además, presente estudio reveló un índice de fijación de alelos promedio de 0.718, considerándose un valor muy grande de diferenciación genética entre poblaciones (F_{ST}). Así mismo se estimó el coeficiente de endogamia (F_{IS}) para cada una de las agroindustrias, siendo el valor más alto el obtenido en la población perteneciente a la Agroindustria Laredo con un 0.651. Además, en dicha agroindustria también se obtuvo el mayor índice de fijación total (F_{IT}) con un 0.921. Resultados que ponen en evidencia el desequilibrio de Hardy-Weinberg por ser diferente de cero, tal como lo define (Aranguren-Méndez, Román-Bravo, Isea, Villasmil, & Jordana, 2005), quien indica que dicho desequilibrio puede deberse a elevados niveles de consanguinidad en la población, esto como consecuencia del apareamiento entre individuos con cierto grado de parentesco.

Adicionalmente se realizó la estimación del número de migrantes (N_m) por cada población, siendo el valor presentado por la población de *Diatraea saccharalis Fabricius* perteneciente a la Agroindustria Tumán, el mayor, con un 0.133 correspondiente al flujo génico; esto en comparación con lo obtenido en las poblaciones de las agroindustrias Casa Grande (0.093) y Laredo (0.022). Dichos valores, son relativamente bajos en comparación con lo reportado por (Cadena Goyes, 2008) en su trabajo de caracterización morfológica y molecular de *Diatraea spp.*, donde se obtuvo un 3.88 de flujo génico para *Diatraea indigenella*.

Finalmente, al realizar el análisis de identidad genética de Nei, se evidencia que las poblaciones de *Diatraea saccharalis Fabricius* de las Agroindustrias de Laredo y Casa Grande son las más distantes genéticamente, a la de Tumán; debido a que presentan el menor valor de identidad (0.803); sin embargo, las poblaciones de las Agroindustrias de Laredo con Casa Grande, son las más similares por presentar un valor de 0.890. Además, el dendograma, denominado como Figura 4, nos muestra una agrupación de las poblaciones de *Diatraea saccharalis Fabricius* de las Agroindustrias de Casa Grande y Laredo; asociando dicho resultado a que ambas poblaciones pertenecen al mismo departamento (La Libertad), dejando aparte a la población perteneciente a la Agroindustria Tumán, ubicada en el departamento de Lambayeque. Sin

embargo, el trabajo publicado por (León Alcántara, 2019) en el que se trabajó con poblaciones similares; muestra similitud de las poblaciones de Casa Grande y Barranca en un 91.5% dejando de lado a la población de Laredo, a pesar de pertenecer al mismo departamento que Casa Grande (La Libertad).

VI. CONCLUSIONES

- Se genotipificó tres poblaciones de *Diatraea saccharalis Fabricius* (Tumán, Casa grande y Laredo) usando los marcadores microsatélites Dsc2, Dsc13 y Dsc14 obteniendo cinco alelos tanto para Dsc2 (28,29,32, 33, 37) como para Dsc13 (12, 13, 14, 16, 18) y un solo alelo para Dsc14 (19).
- Se determinó las frecuencias alélicas por cada microsatélite; siendo los alelos más frecuentes: 29 para Dsc2 (43%), 16 para Dsc13 (43%) y 19 para Dsc14 (100%).
- Se concluye que existe un 43.7% de variación genética entre las poblaciones de *Diatraea saccharalis Fabricius* y un 56.3% de variación genética dentro de ellas, siendo Laredo y Casa Grande, las poblaciones con mayor similitud (89%); diferenciándose de la población de Tumán.

VII. RECOMENDACIONES

- Realizar el estudio empleando un mayor número de marcadores microsatélites, para obtener resultados mucho más confiables y un rango de resultados más amplio.
- Es recomendable realizar secuenciamiento de los diferentes alelos resultantes en el presente estudio, para tener conocimiento del tamaño exacto de cada uno de ellos y para la detección de mutaciones de ser el caso.
- Se recomienda ampliar el número de poblaciones de muestreo de la región, para que los resultados sean aún más significativos.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Aranguren-Méndez, J. A., Román-Bravo, R., Isea, W., Villasmil, Y., & Jordana, J. (Enero de 2005). Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN porexcelencia para programas de conservación: una revision. *Archivos Latinoamericanos de producción animal*, 13, 30-42. doi:239931374
- Argueta , E., & Hernández Chicas, W. E. (2011). *Parasitoidismo y control microbiano del Barrenador (Diatraea saccharalis F.) de la caña de azúcar (Saccharum officinarum L.), en el Departamento de Sonsonate, El Salvador, 2009*. Tesis de Licenciatura , Universidad El Salvador. Obtenido de <https://ri.ues.edu.sv/id/eprint/615>
- Barbosa Nascimento, J. (2015). *DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA POPULACIONAL DE Diatraea saccharalis (Fabricius) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) NA CULTURA DO ARROZ (Oryza sativa L.) E CANA DE AÇUCAR (Saccharum officinarum L.)*. Tesis doctoral, Universidade Federal de Goiás, Brasil.
- Borges dos Santos, L., Gomes Viana, J. P., Biasotto Francischini, F. J., Fogliata, S. V., Joyce, A. L., Pereira de Souza, A., . . . Zucchi, M. I. (Mayo de 2021). A first draft genome of the Sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. [version 1; peer review: 2 approved with reservations]. *F1000Research*. doi:10.12688/f1000research.26614.1
- Bustamante, A. V., Maté, M. L., Lamas, H. E., Giovambattista, G., Zambelli, A., & Vidal-Rioja, L. (Junio de 2006). Análisis de diversidad genética en tres poblaciones de llamas (*Lama glama*) del noroeste argentino. *Revista Chilena de Historia Natural*, 79(2), 175-184. doi:10.4067/S0716-078X2006000200004
- Cadena Goyes, P. (2008). *Caracterización morfológica y molecular de especies de Diatraea spp. (Lepidoptera: Crambidae)*. Colciencias Colombia y Cenicaña, Santiago de Cali.
- Checa Cortés, M. L. (2004). *Análisis de la Variabilidad Genética en Razas Equinas autóctonas españolas detectada mediante microsatélites*. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- Echeverri-Rubiano, C., Chica-Ramírez, H. A., & Vargas-Orozco, G. A. (Julio-Diciembre de 2017). Resistencia Varietal al ataque por *Diatraea* spp. (Lepidoptera: Crambidae) en caña de azúcar. *Revista Colombiana de Entomología*, 43(2), 186-194. doi:10.25100/socolen.v43i2

- Espinoza, J. L., Fuentes-Contreras, E., Barros, W., & Ramírez, C. (Julio-Septiembre de 2007). Utilización de microsatélites para la determinación de la Variabilidad genética de la polilla de la manzana *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae) en Chile Central. *Agricultura Técnica*, 67(3), 244-252. doi:10.4067/S0365-28072007000300003
- Fogliata, S., Perera, M., Alves-Pereira, A., Zucchi, M., & Murúa, M. (Abril de 2022). Unraveling the population structure of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*, in Argentina. *Entomología Experimentalis et Applicata*, 170(6), 530-545. doi:10.1111/eea.13174
- Gil Saavedra, J. A. (2015). *Identificación de microsatélites polimorficos por amplificación cruzada en Anadara Similis (Mollusca: arcidae)*. Universidad del Valle, Colombia. Obtenido de <http://hdl.handle.net/10893/7973>
- Gómez Laverde, L. A., & Vargas Orozco, G. A. (2014). *Los barrenadores de la caña de la caña de azúcar, Diatraea spp., en el Valle del río Cauca: Investigación participativa con énfasis en control biológico*. Documento de Trabajo N°734 , Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia (Cenicaña), Santiago de Cali. doi:10.13140/RG.2.1.2544.0165
- Joyce, A. L., Sermeno Chicas, M., Serrano Cervantes, L., Paniagua, M., Scheffer , S. J., & Solis, M. (Noviembre de 2016). Host-plant associated genetic divergence of two *Diatraea* spp. (Lepidoptera: Crambidae) stemborers on novel crop plants. *Ecology and Evolution*, 6(23), 8632 - 8644. doi:10.1002/ece3.2541
- Joyce, A. L., White, W. H., Nuessly, G. S., Solis, M. A., Scheffer, S. J., Lewis, M. L., & Medina, R. F. (Octubre de 2014). Geographic Population Structure of the Sugarcane Borer, *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae), in the Southern United States. *Plos One*, 9(10). doi:10.1371/journal.pone.0110036
- León Alcántara, E. E. (2019). *"Caracterización y variación molecular en Diatraea saccharalis en Saccharum officinarum de las regiones La Libertad y Lima, Perú - 2018"*. Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo. Obtenido de <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/14271>

- Li, W., Zhang, X., Fan, Z., Yue, B., Huang, F., King, E., & Ran, J. (Enero de 2011). Structural Characteristics and Phylogenetic Analysis of the Mitochondrial Genome of the Sugarcane Borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Dna and Cell Biology*, 30(1), 3-8. doi:10.1089/dna.2010.1058
- Ministerio de Agricultura y Riego. (2013). *Principales aspectos de la cadena agroproductiva de la caña de azúcar*.
- Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego. (2022). *Commodities Azucar . Boletín de publicación trimestral Octubre - Diciembre*. Lima. Dirección General de Políticas Agrarias.
- Pavinato, V. C., Silva-Brandão, K. L., Monteiro, M., Zucchi, M. I., Pinheiro, J. B., Dias, F. F., & Omoto, C. (Mayo de 2013). Development and characterization of microsatellite loci for genetic studies of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Genetics and Molecular Research: GMR*, 12(2), 1631-1635. doi:10.4238/2013.May.14.3
- Pereira Bravo, J., Felipes, J., Bertolini Zanatta, D., Da Conceição Silva, J. L., & Fernández, M. A. (Julio - Agosto de 2008). Sequence and Analysis of the Mitochondrial DNA Control Region in the Sugarcane Borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Brazilian archives of Biology and Technology*, 51(4), 671-677. doi:10.1590/S1516-89132008000400004
- Regueira Neto, M., Barros, R., Morais, M., Balbino, V., & Loreto, V. (Agosto de 2017). ITS2 as a molecular marker for the identification of *Diatraea saccharalis* and *D.flavipennella* y posible infección por *Cotesia* spp. *Genetics and Molecular Research: GMR*, 16(3). doi:10.4238/gmr16039732
- Roche Diagnostics GmbH. (Noviembre de 2019). *Roche LifeScience solutions*. Obtenido de <https://pim-eservices.roche.com/eLD/api/downloads/81f7a9ee-980a-ea11-f890-005056a772fd?countryIsoCode=pi>
- Santisteban Aguilar, E. M. (2015). *"Manejo Agronómico de Saccharum officinarum L., en Santiago de Cao, Ascope-La Libertad"*. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo. Obtenido de <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/7589>

- Schlötterer, C. (Septiembre de 2000). Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Cromosoma*, 109(6), 365-371. doi:10.1007/s004120000089
- Silva-Brandão, K. L., Santos, T. V., Cônsoli, F. L., & Omoto, C. (Febrero de 2015). Genetic Diversity and Structure of Brazilian Populations of *Diatraea Saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae): Implications for Pest Management. *Journal of Economic Entomology*, 108(1), 307-316. doi:10.1093/jee/tou040
- Soplapuco Vilchez, V. J. (2019). *Determinación del sexo en muestras de ADN extraídas de restos dentarios de poblaciones Pre-hispánicas de los distritos de Etén, Mórrope y San José usando los genes Amel X y Amel Y*. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque.
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (Mayo - Agosto de 2013). Fundamentos de la reaccion en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo Real. *Investigación en discapacidad*, 2(2), 70-78.
- Zane, L., Bargelloni, L., & Patarnello, T. (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular ecology*, 11(1), 1-16. doi:10.1046/j.0962-1083.2001.01418.x

ANEXOS

Anexo 01. Genotipo de *Diatraea saccharalis* Fabricius pertenecientes a la Agroindustria Tumán (Departamento Lambayeque), analizados con marcadores microsatélites Dsc2, Dsc13 y Dsc14.

N°	Código	Locus		
		Dsc2	Dsc13	Dsc14
1	T01	28/31	12/13	19/19
2	T02	37/37	16/16	-
3	T03	28/28	13/16	-
4	T04	29/31	16/16	-
5	T05	31/31	12/13	19/19
6	T06	29/29	12/12	-
7	T07	29/29	12/12	-
8	T08	29/29	12/13	19/19
9	T09	29/29	12/12	-
10	T10	29/31	-	-
11	T11	28/29	12/12	-
12	T12	29/29	12/13	19/19
13	T13	28/29	12/12	-
14	T14	28/28	12/14	-
15	T15	28/28	13/13	-
16	T16	28/29	13/13	-
17	T17	29/29	12/12	-
18	T18	31/31	16/16	-
19	T19	29/31	13/14	-
20	T20	29/33	16/16	-
21	T21	28/31	18/18	-
22	T22	28/31	12/12	-
23	T23	28/31	13/14	-
24	T24	29/31	12/12	-
25	T25	28/29	12/12	-
26	T26	-	18/18	-
27	T27	-	13/13	19/19
28	T28	28/29	16/16	-
29	T29	29/31	12/12	19/19
30	T30	29/31	14/18	-
31	T31	28/29	12/12	-
32	T32	28/29	14/16	-
33	T33	28/29	13/14	-
34	T34	28/28	13/13	-
35	T35	29/31	12/12	19/19
36	T36	31/31	12/12	19/19
37	T37	28/28	12/12	-
38	T38	29/31	13/13	-
39	T39	-	12/12	19/19
40	T40	28/31	13/14	-

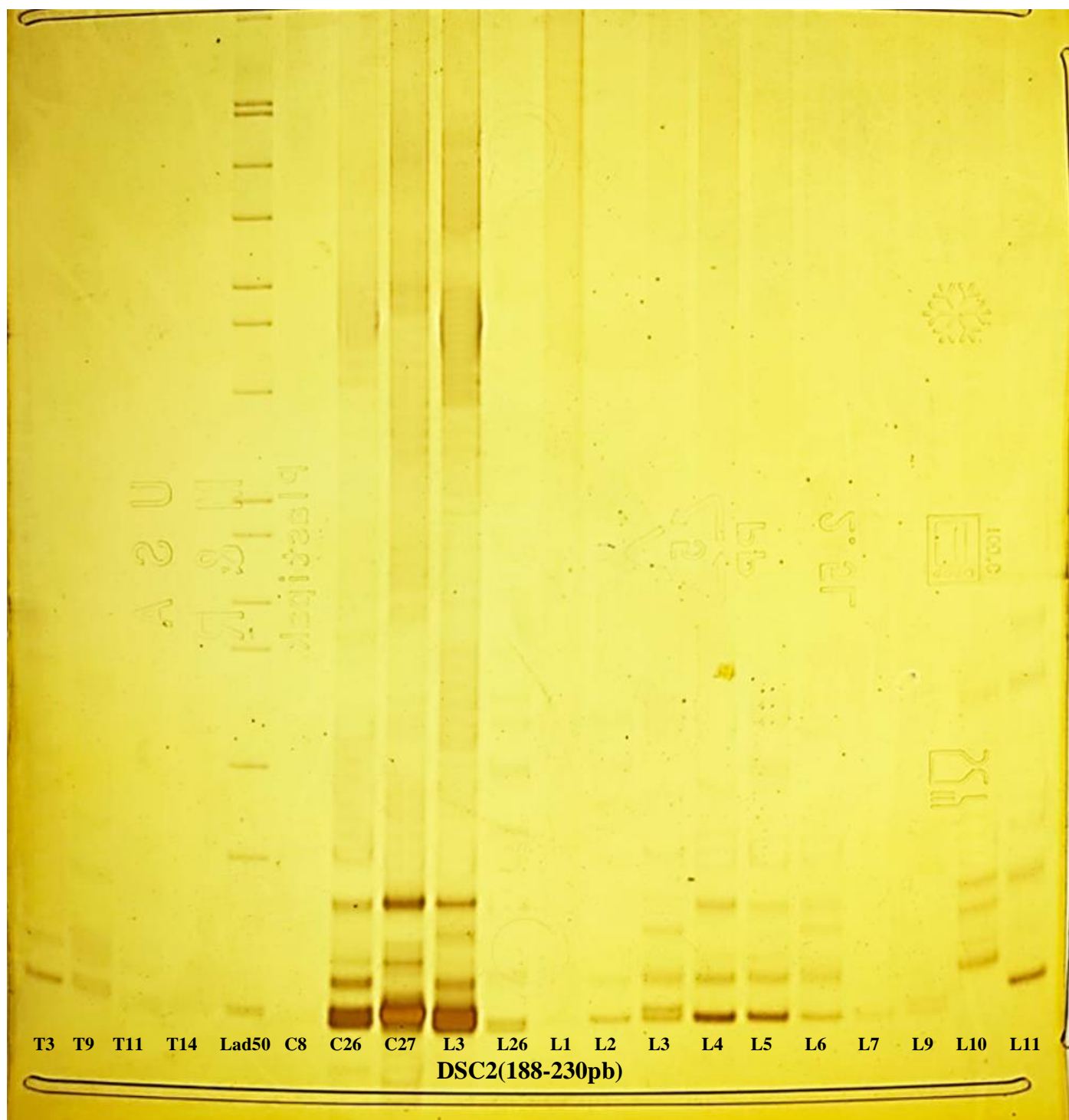
Anexo 02. Genotipo de *Diatraea saccharalis* Fabricius pertenecientes a la Agroindustria Casa Grande (Departamento La Libertad), analizados con microsatélites Dsc2, Dsc13 y Dsc14.

N°	Código	Locus		
		Dsc2	Dsc13	Dsc14
1	C1	29/29	16/16	-
2	C2	29/29	14/16	19/19
3	C3	29/29	16/16	19/19
4	C4	28/29	13/18	19/19
5	C5	28/29	13/16	19/19
6	C6	28/28	13/14	-
7	C7	-	16/16	19/19
8	C8	28/29	13/14	19/19
9	C9	29/29	14/16	-
10	C10	28/28	16/16	-
11	C11	29/29	13/14	19/19
12	C12	28/28	16/16	-
13	C13	28/28	13/16	-
14	C14	29/29	13/16	-
15	C15	29/29	14/16	-
16	C16	29/29	13/13	-
17	C17	28/28	14/16	-
18	C18	29/31	16/16	-
19	C19	29/31	16/16	19/19
20	C20	29/29	13/13	19/19
21	C21	29/29	14/16	-
22	C22	28/28	16/16	-
23	C23	29/29	14/16	-
24	C24	29/29	16/16	19/19
25	C25	29/29	16/16	-
26	C26	28/29	14/14	19/19
27	C27	29/29	14/14	-
28	C28	29/29	14/16	19/19
29	C29	29/29	14/14	19/19
30	C30	28/29	14/16	19/19

Anexo 03. Genotipo de *Diatraea saccharalis* Fabricius pertenecientes a la Agroindustria Laredo (Departamento La Libertad), analizados con microsatélites Dsc2, Dsc13 y Dsc14.

N°	Código	Locus		
		Dsc2	Dsc13	Dsc14
1	L1	28/28	16/16	19/19
2	L2	28/28	13/13	-
3	L3	28/29	16/16	-
4	L4	28/28	13/13	-
5	L5	28/28	13/13	-
6	L6	28/28	16/16	19/19
7	L7	28/28	18/18	-
8	L8	28/28	16/16	19/19
9	L9	28/29	14/16	19/19
10	L10	33/33	16/16	19/19
11	L11	29/29	16/16	-
12	L12	28/28	16/16	19/19
13	L13	37/37	16/16	19/19
14	L14	28/28	13/13	-
15	L15	28/28	-	-
16	L16	28/28	16/16	-
17	L17	-	13/16	-
18	L18	28/29	16/16	-
19	L19	28/28	16/16	-
20	L20	29/29	16/16	19/19
21	L21	28/28	16/16	19/19
22	L22	29/29	16/16	-
23	L23	-	16/16	-
24	L24	28/29	16/16	-
25	L25	28/28	13/13	-
26	L26	28/29	-	-
27	L27	28/29	16/16	-
28	L28	28/28	16/16	-
29	L29	28/29	16/16	-
30	L30	28/28	14/14	-

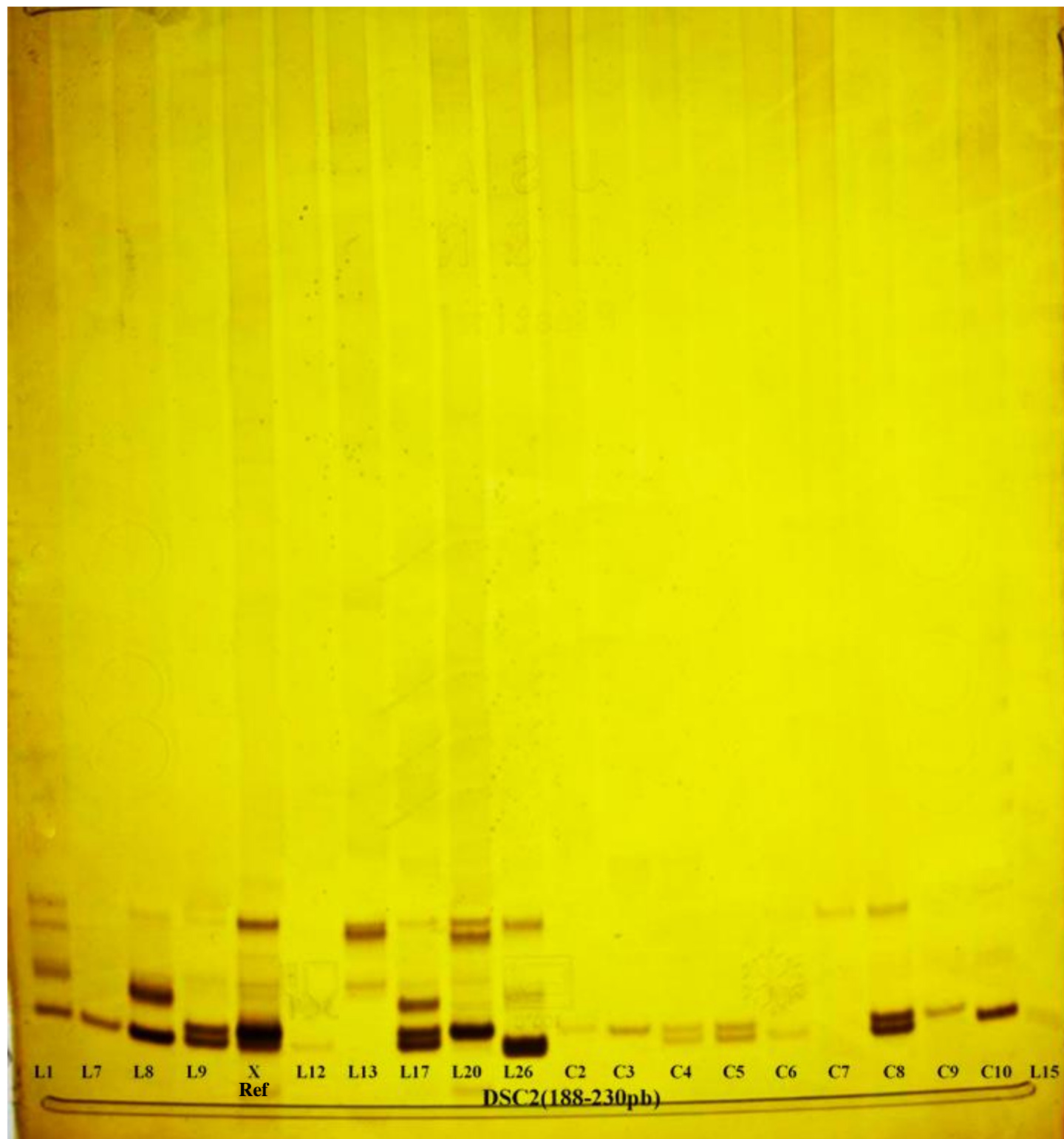
Anexo 04. Gel de electroforesis del producto de PCR con el marcador microsatélites Dsc2.



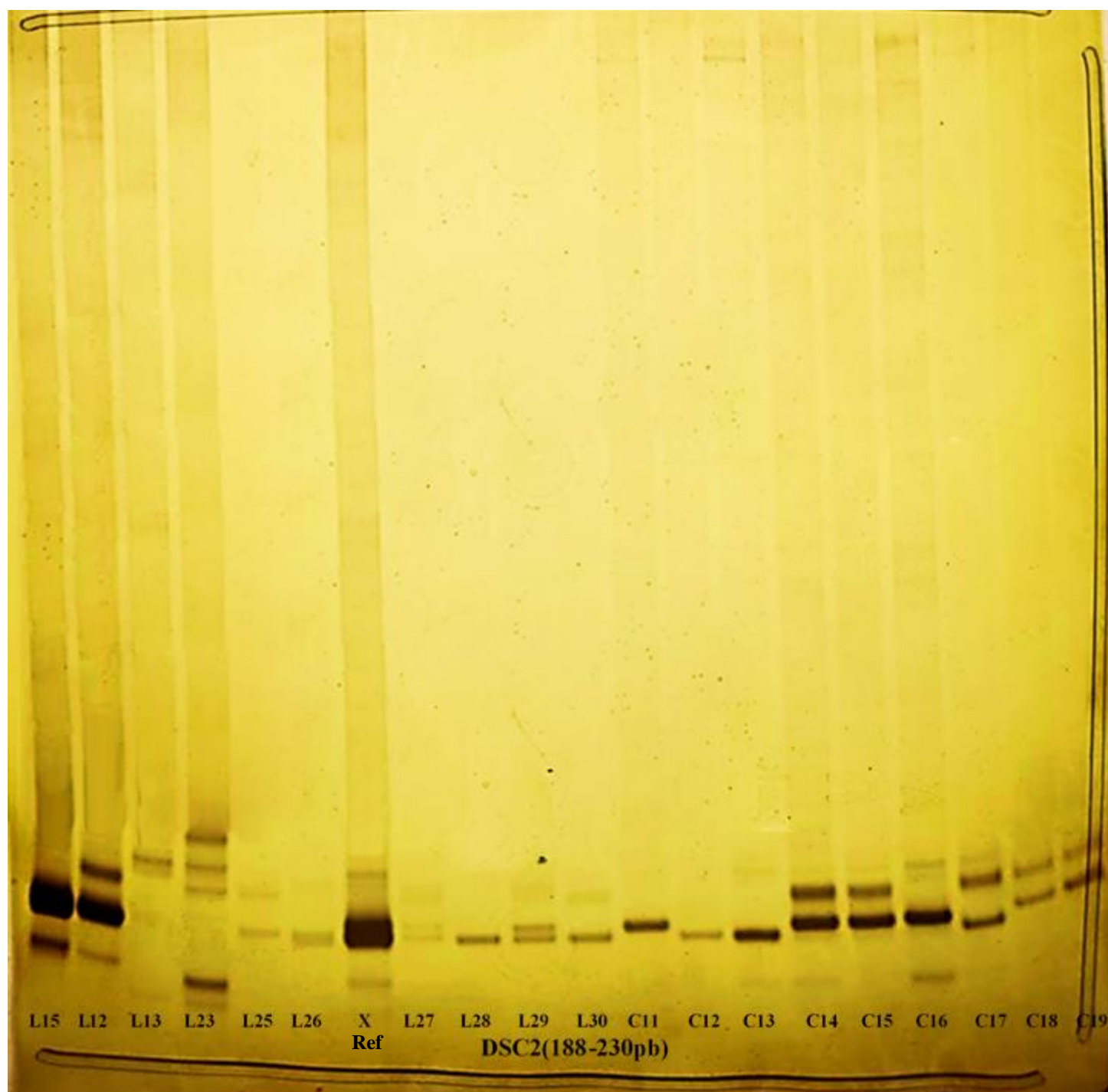
Anexo 05. Gel de electroforesis del producto de PCR con el marcador microsatélites Dsc2.



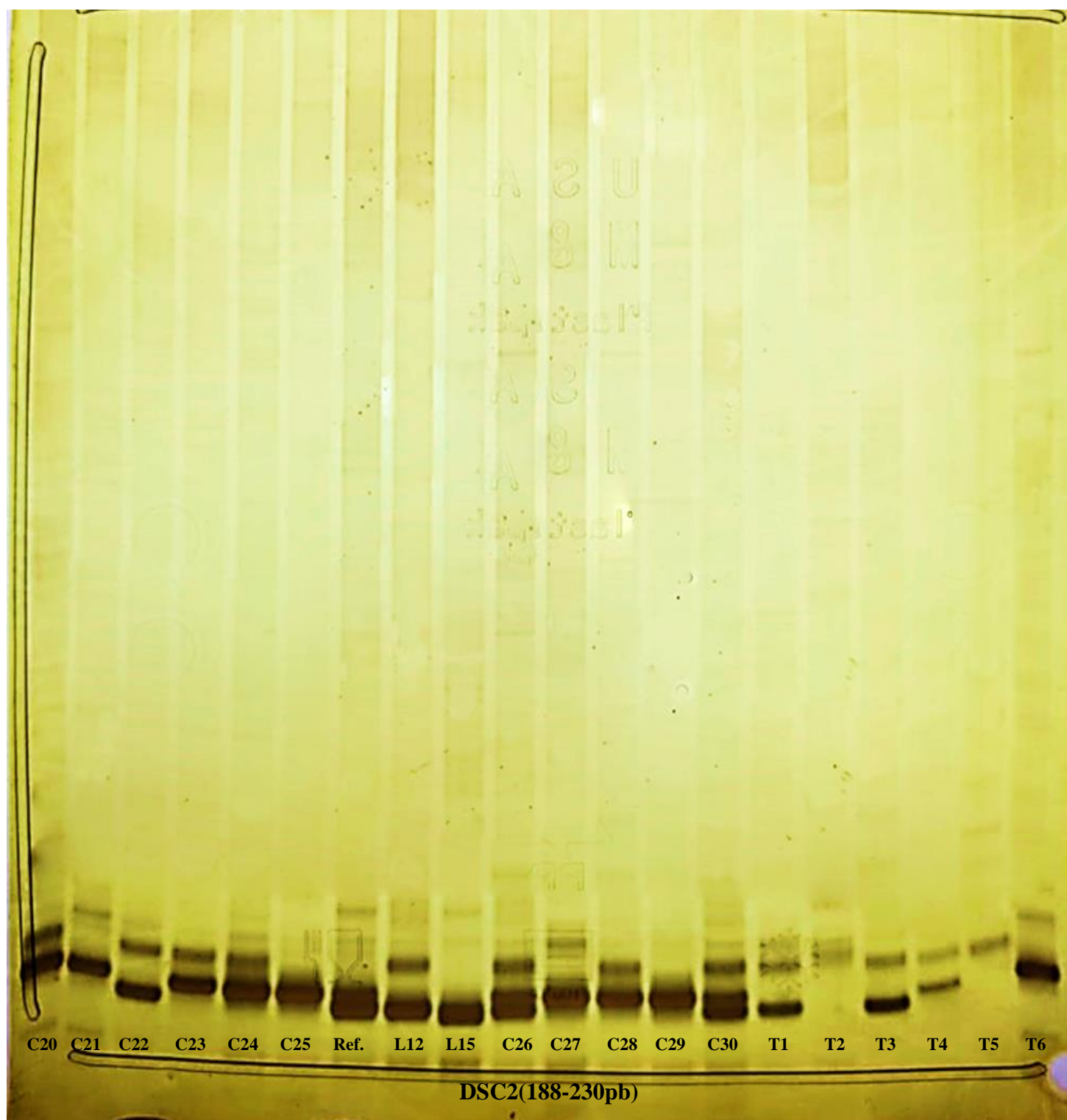
Anexo 06. Gel de electroforesis del producto de PCR con el marcador microsatélites Dsc2.



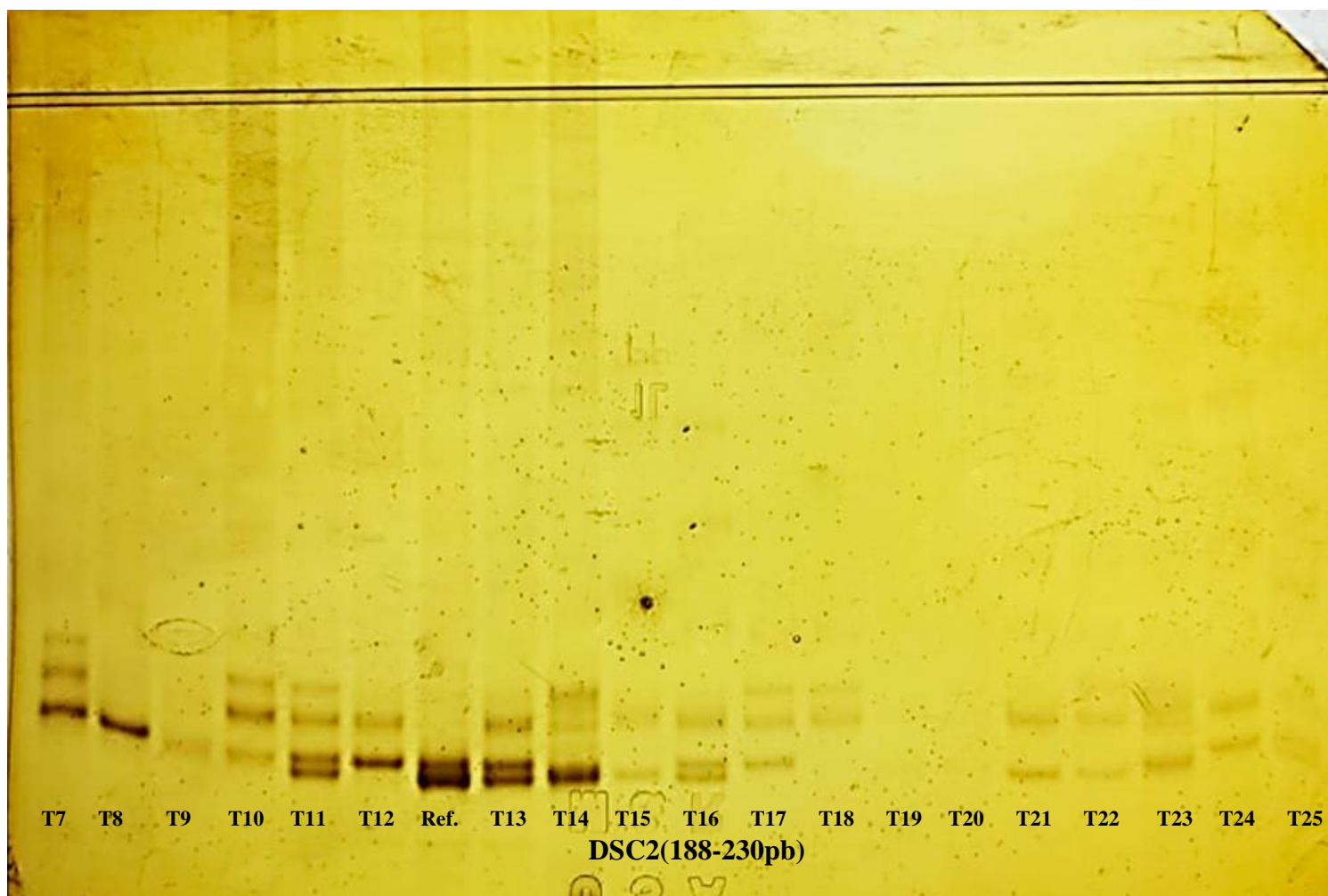
Anexo 07. Gel de electroforesis del producto de PCR con el marcador microsatélites Dsc2.



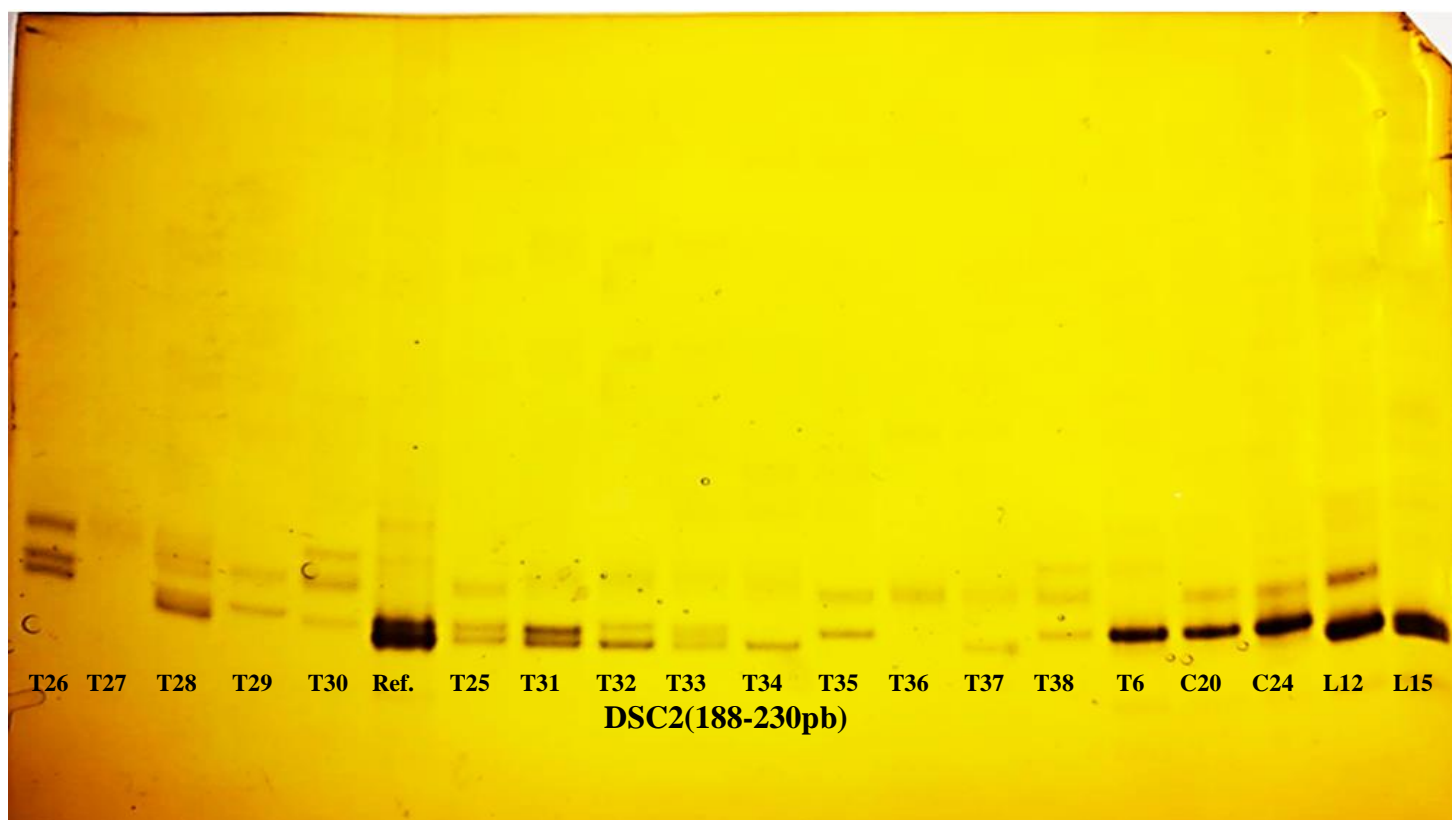
Anexo 08. Gel de electroforesis del producto de PCR con el marcador microsatélites Dsc2.



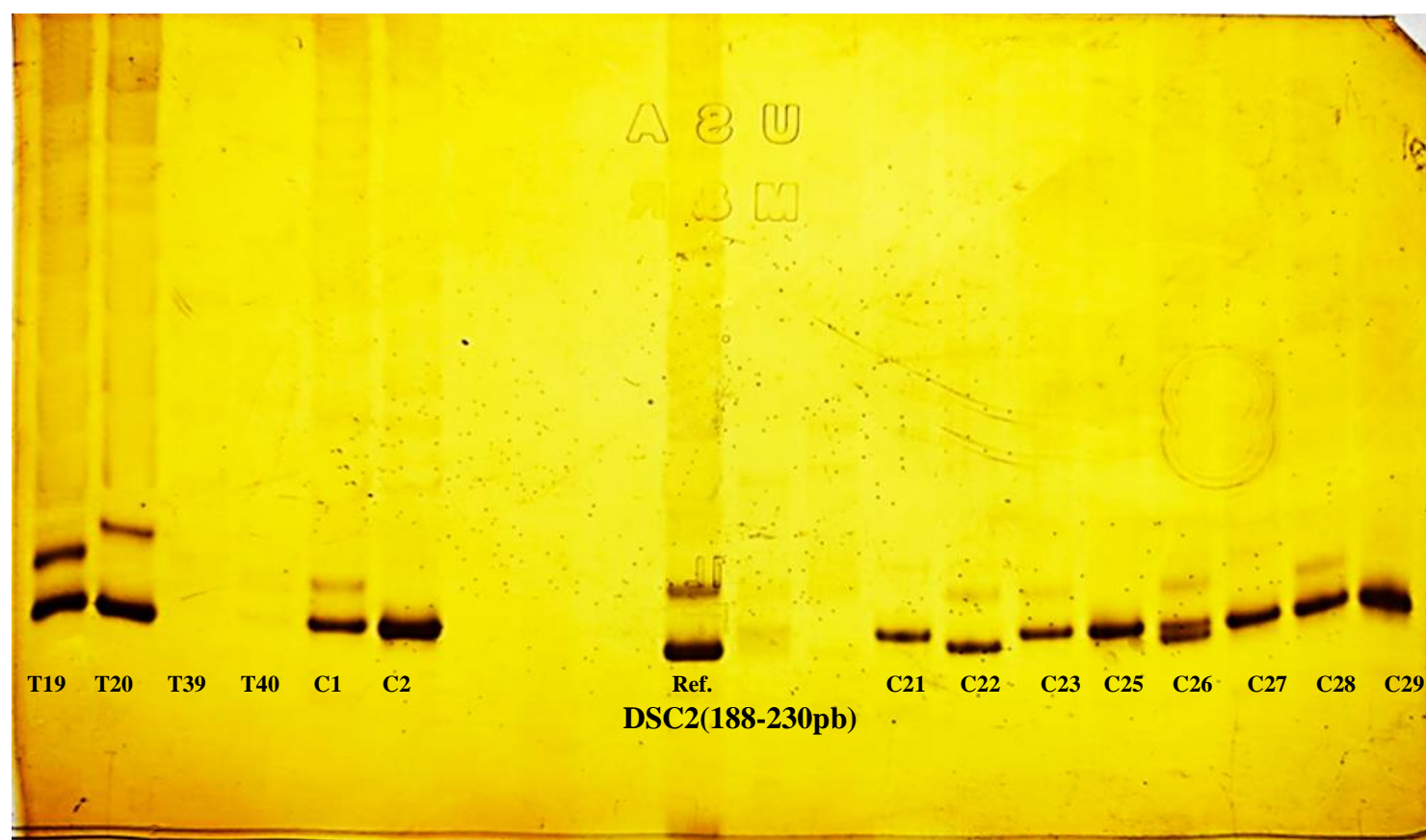
Anexo 09. Gel de electroforesis del producto de PCR con el marcador microsatélites Dsc2.



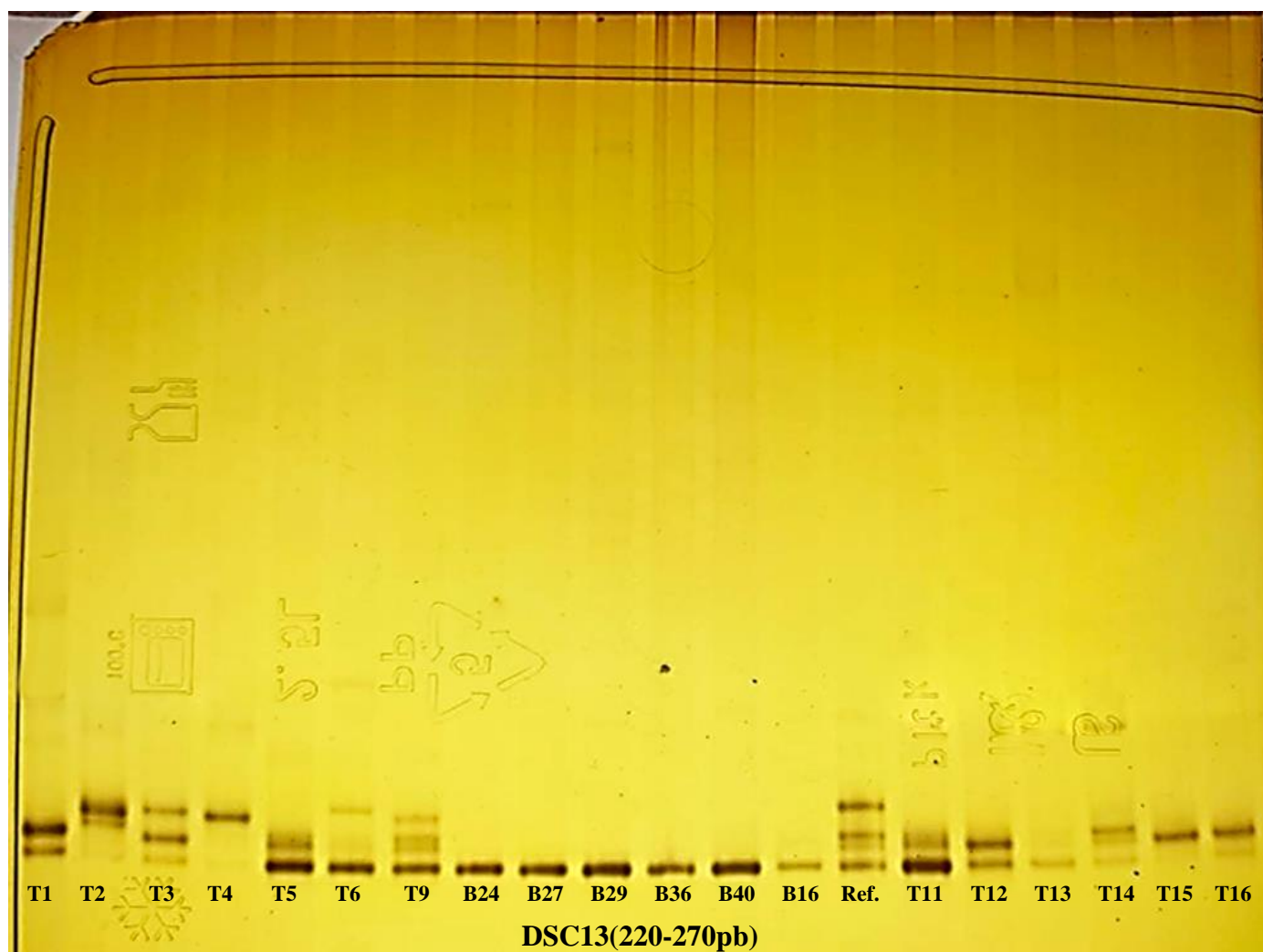
Anexo 10. Gel de electroforesis del producto de PCR con el marcador microsatélites Dsc2.



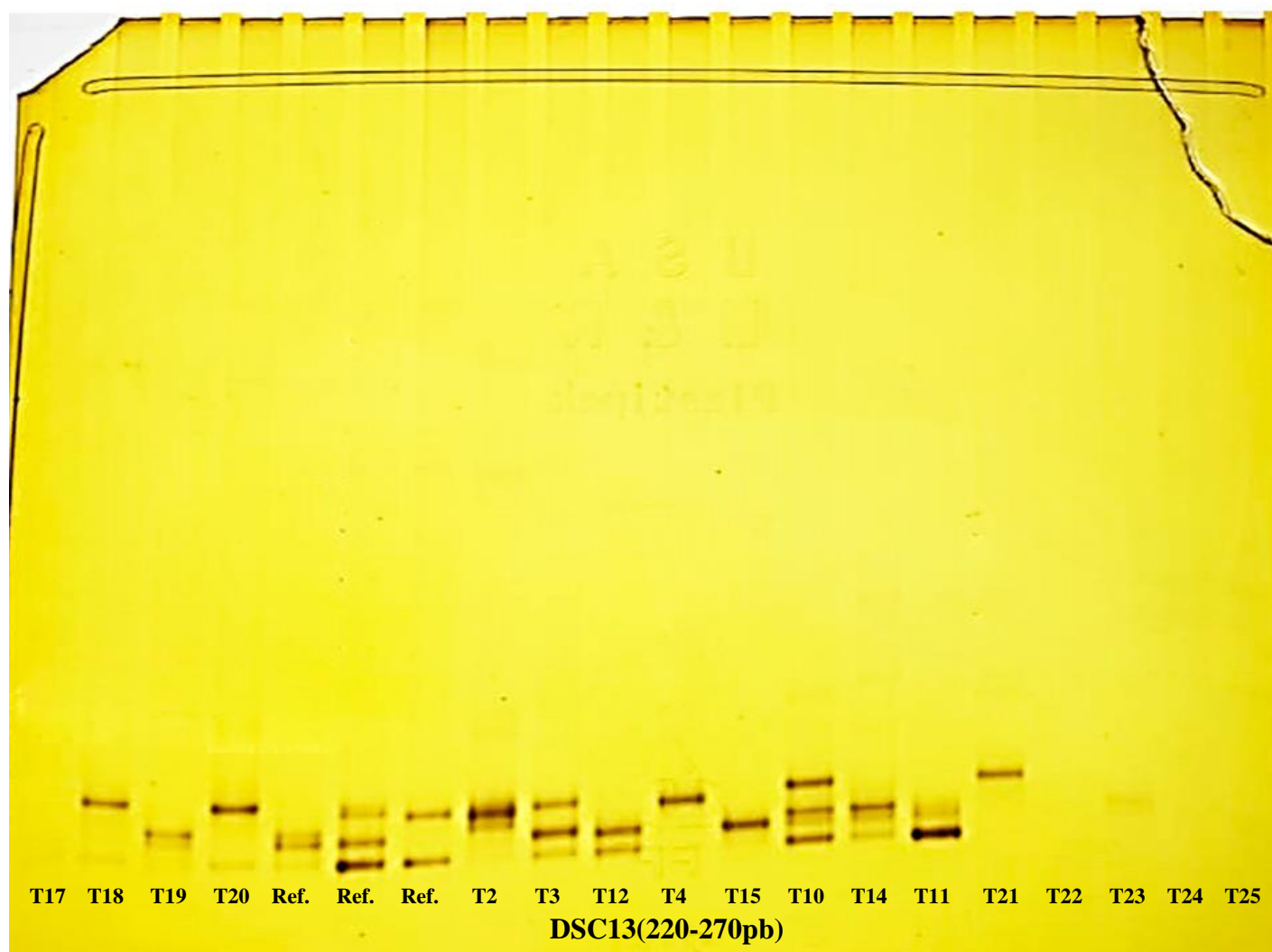
Anexo 11. Gel de electroforesis del producto de PCR con el marcador microsatélites Dsc2.



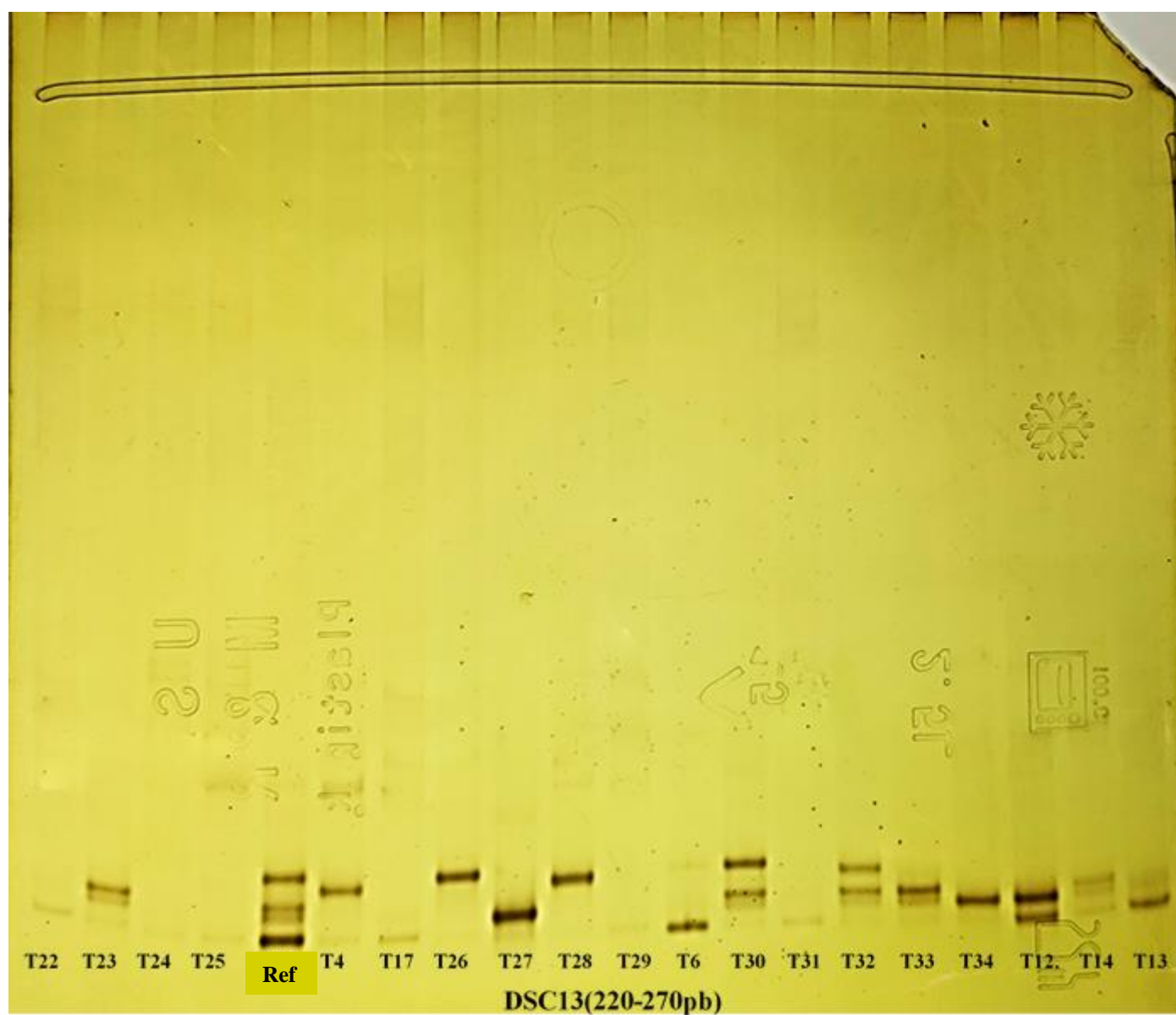
Anexo 12. Gel de electroforesis del producto de PCR con el marcador microsatélites Dsc13.



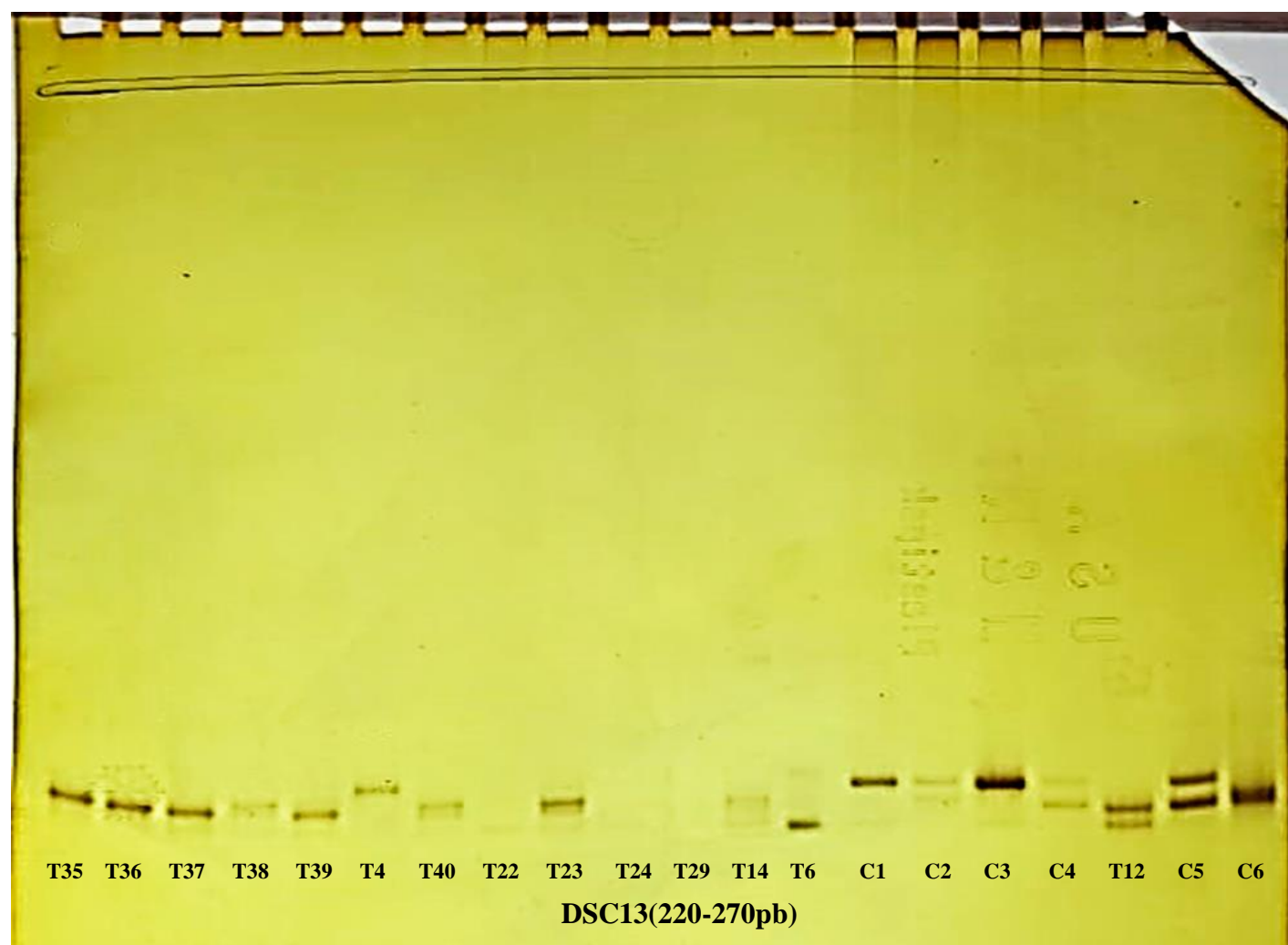
Anexo 13. Gel de electroforesis del producto de PCR con el marcador microsatélites Dsc13.



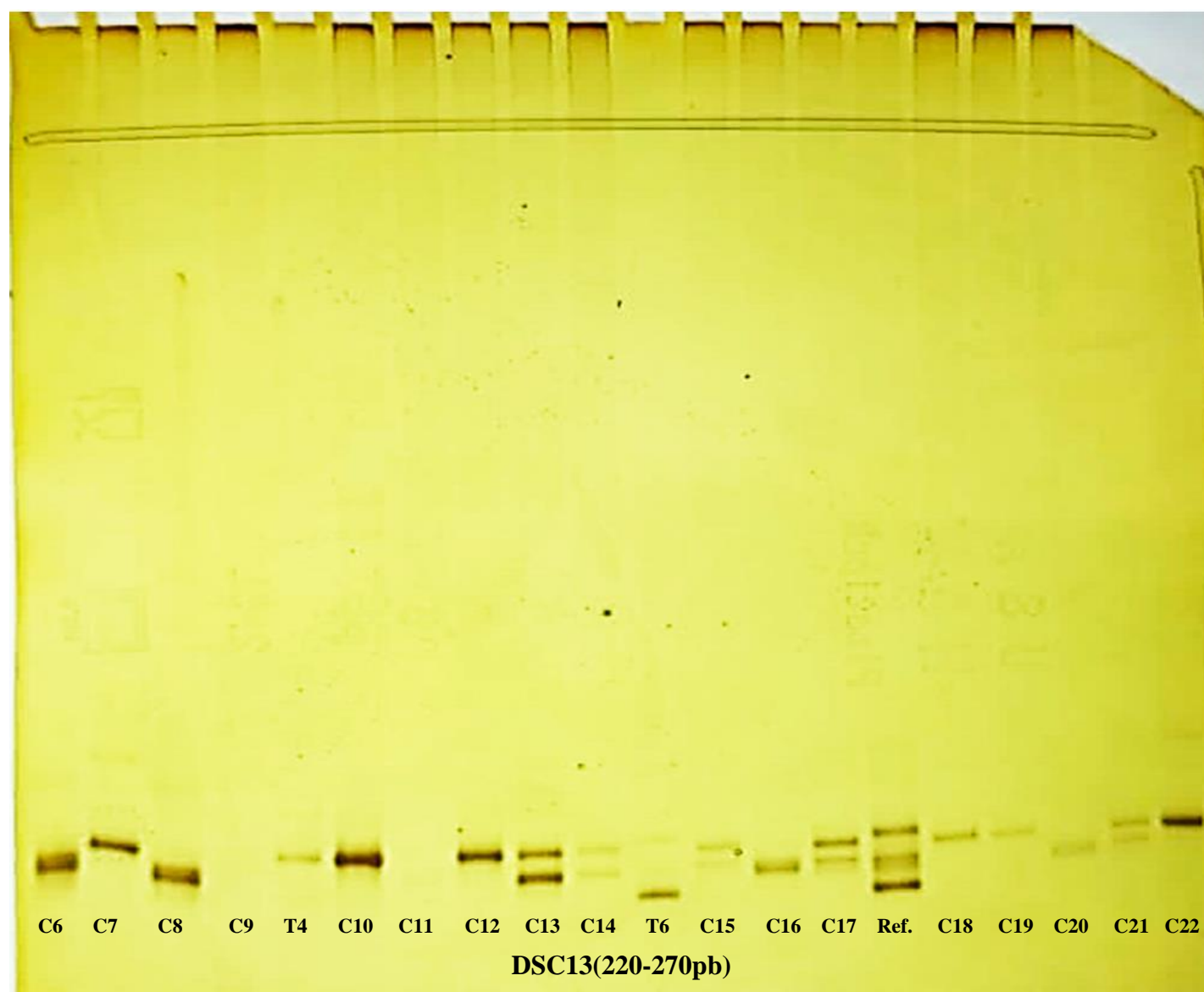
Anexo 14. Gel de electroforesis del producto de PCR con el marcador microsatélites Dsc13.



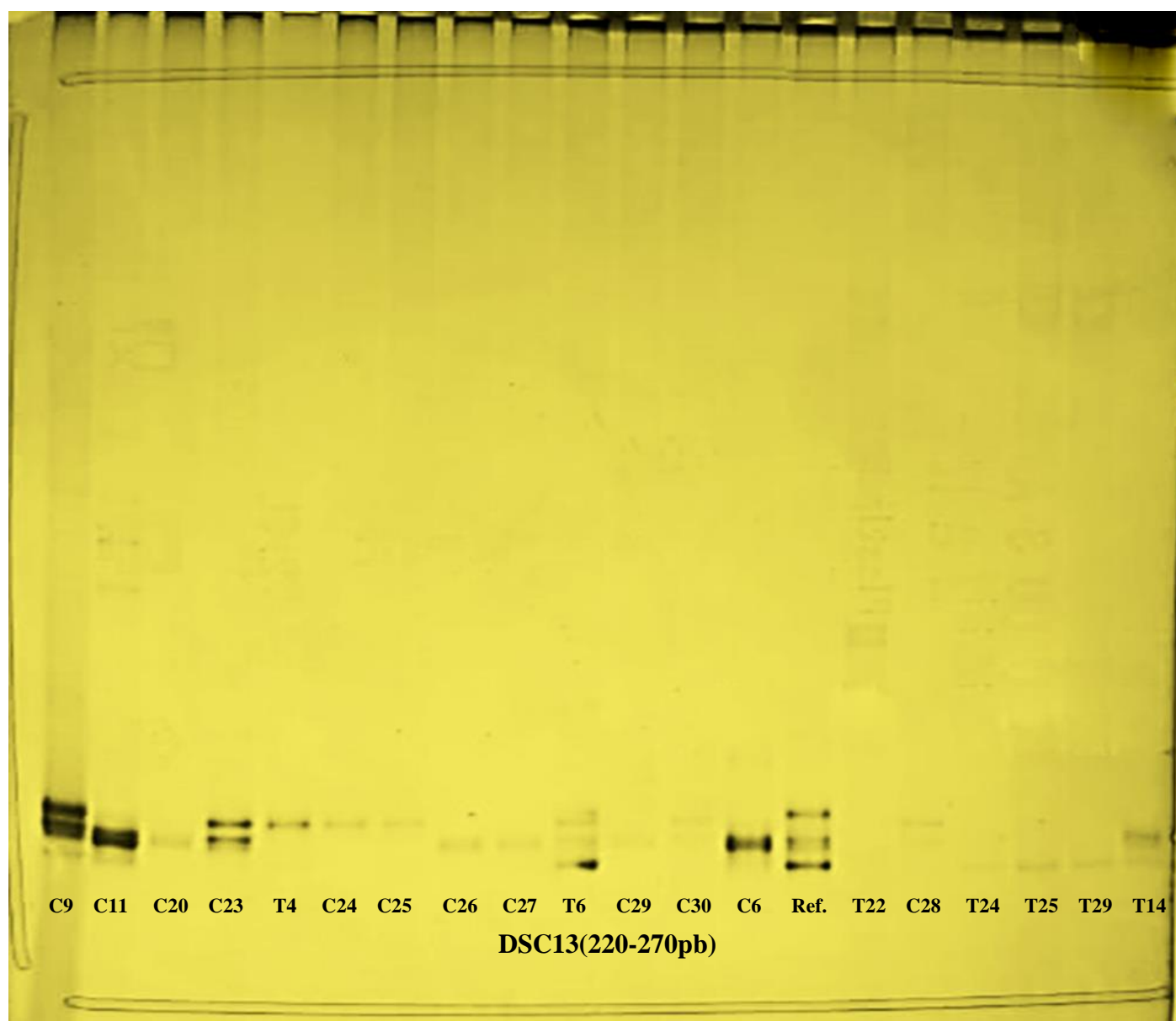
Anexo 15. Gel de electroforesis del producto de PCR con el marcador microsatélites Dsc13.



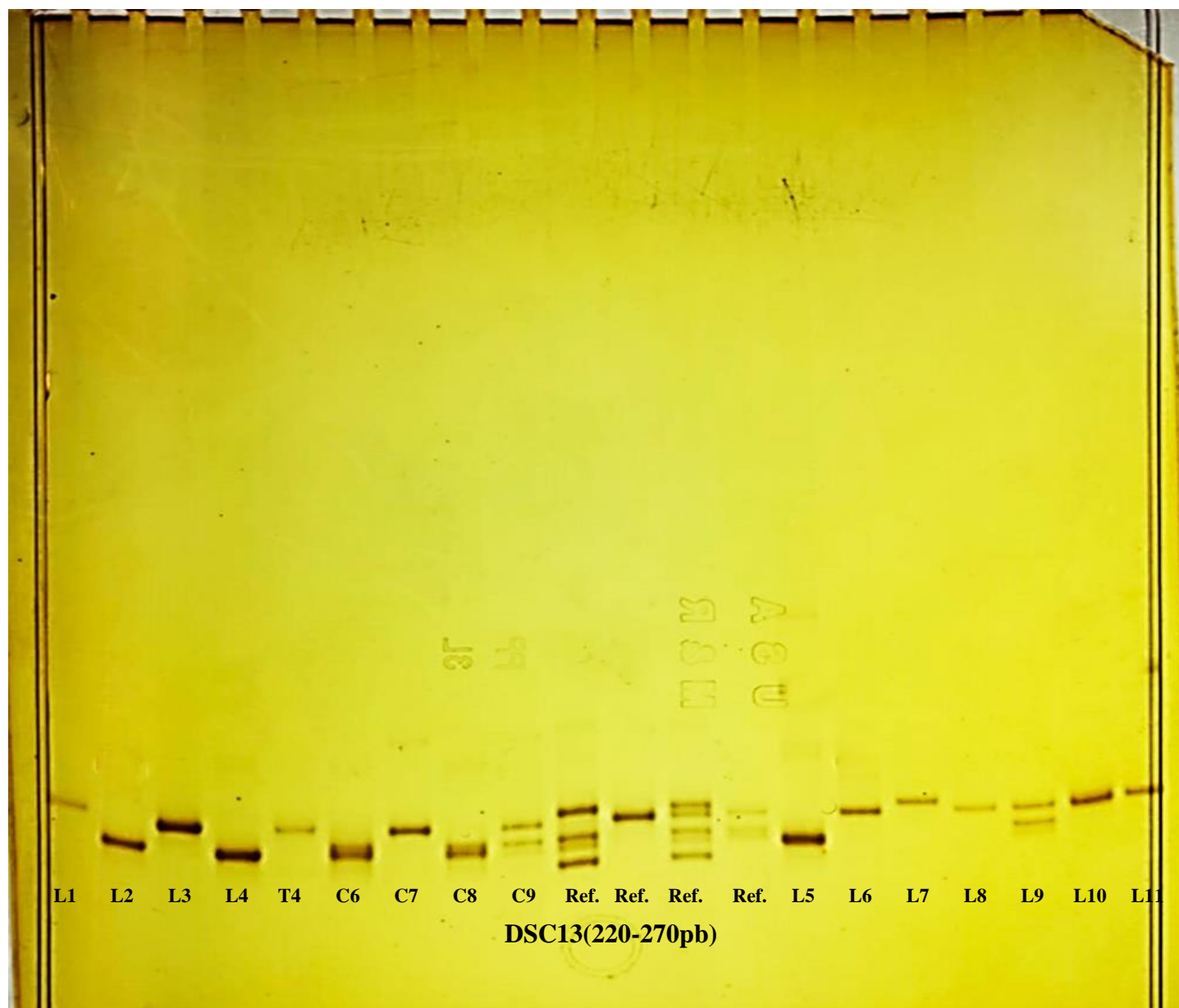
Anexo 16. Gel de electroforesis del producto de PCR con el marcador microsatélites Dsc13.



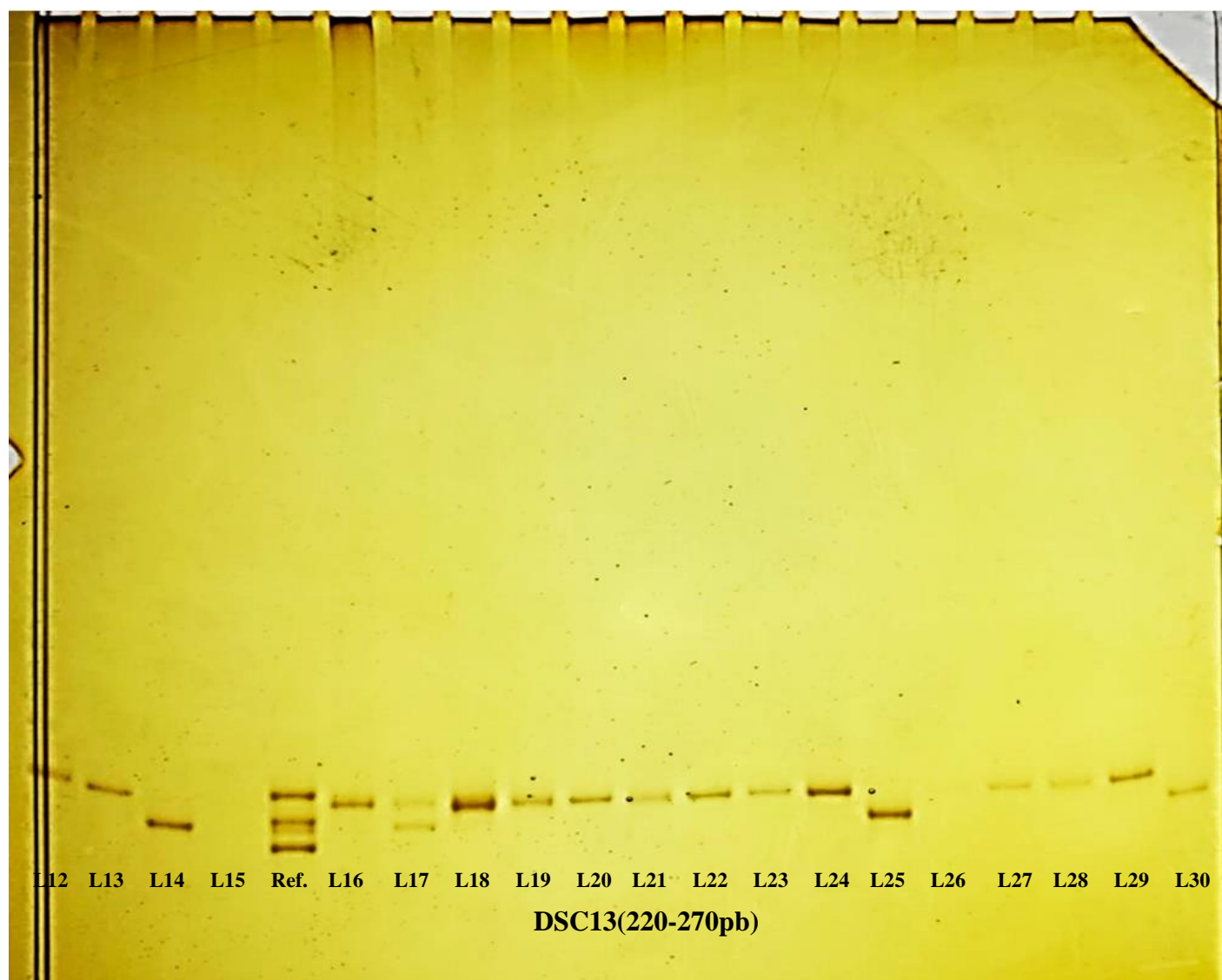
Anexo 17. Gel de electroforesis del producto de PCR con el marcador microsatélites Dsc13.



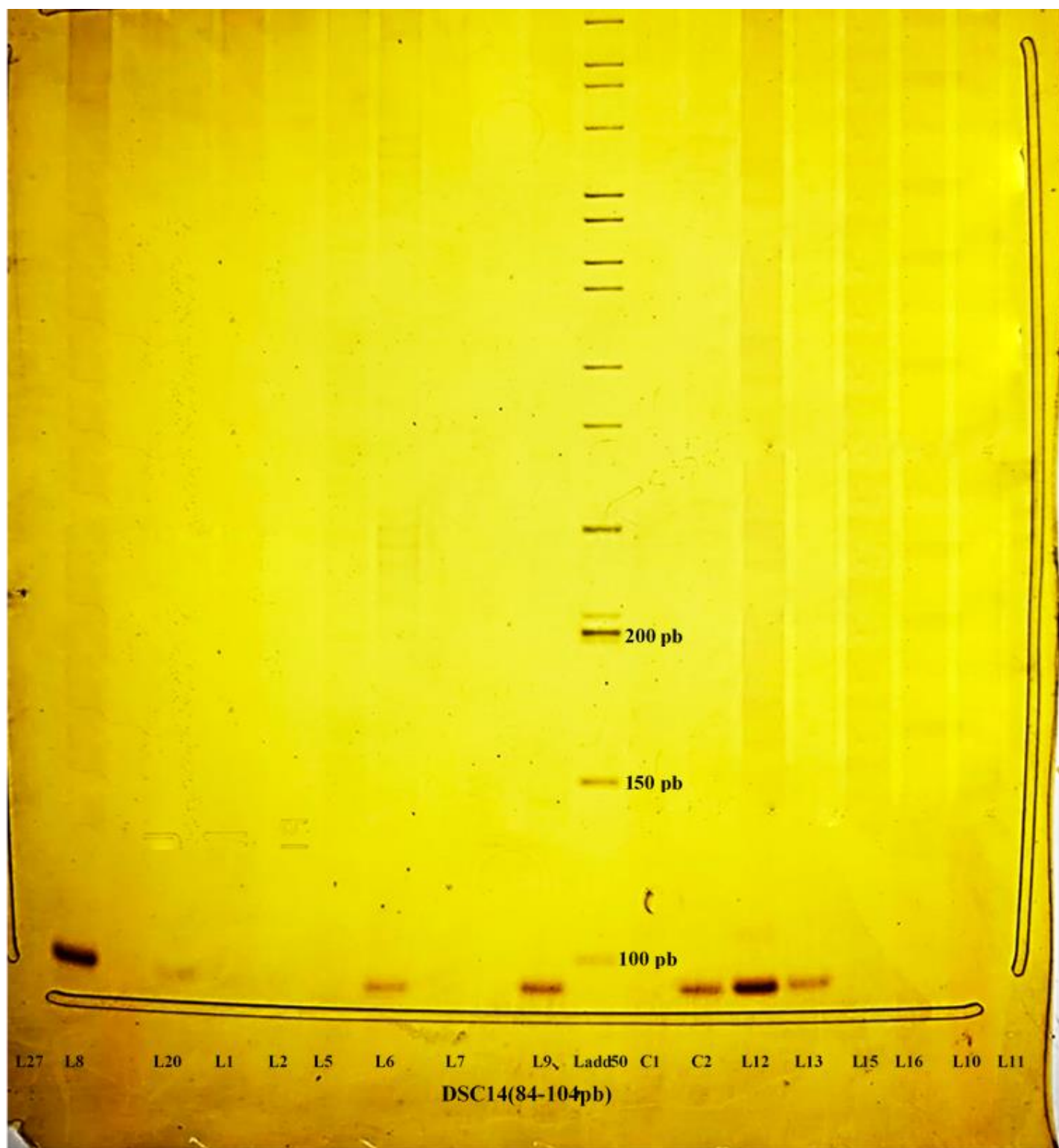
Anexo 18. Gel de electroforesis del producto de PCR con el marcador microsatélites Dsc13.



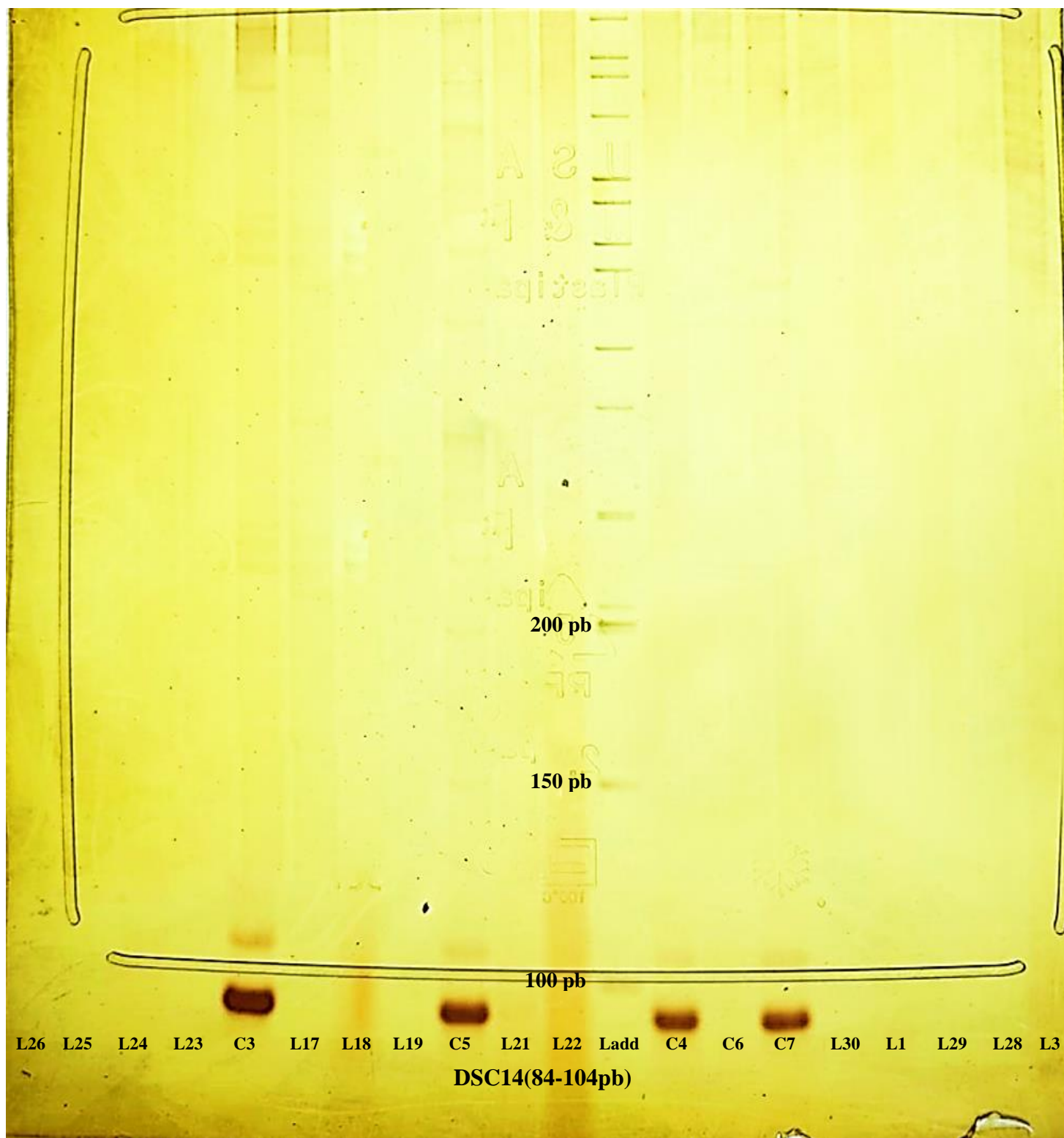
Anexo 19. Gel de electroforesis del producto de PCR con el marcador microsatélites Dsc13.



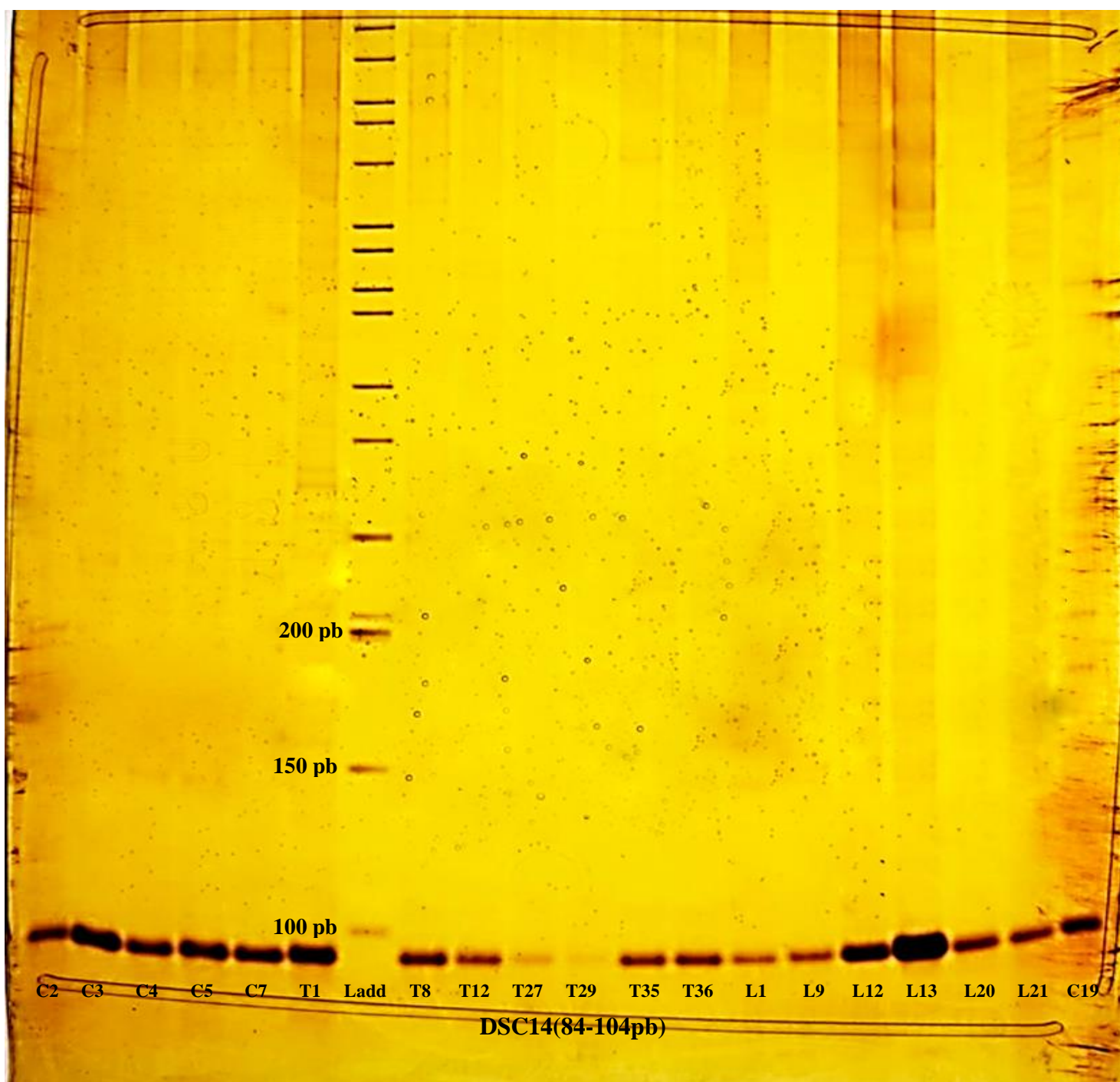
Anexo 20. Gel de electroforesis del producto de PCR con el marcador microsatélites Dsc14.



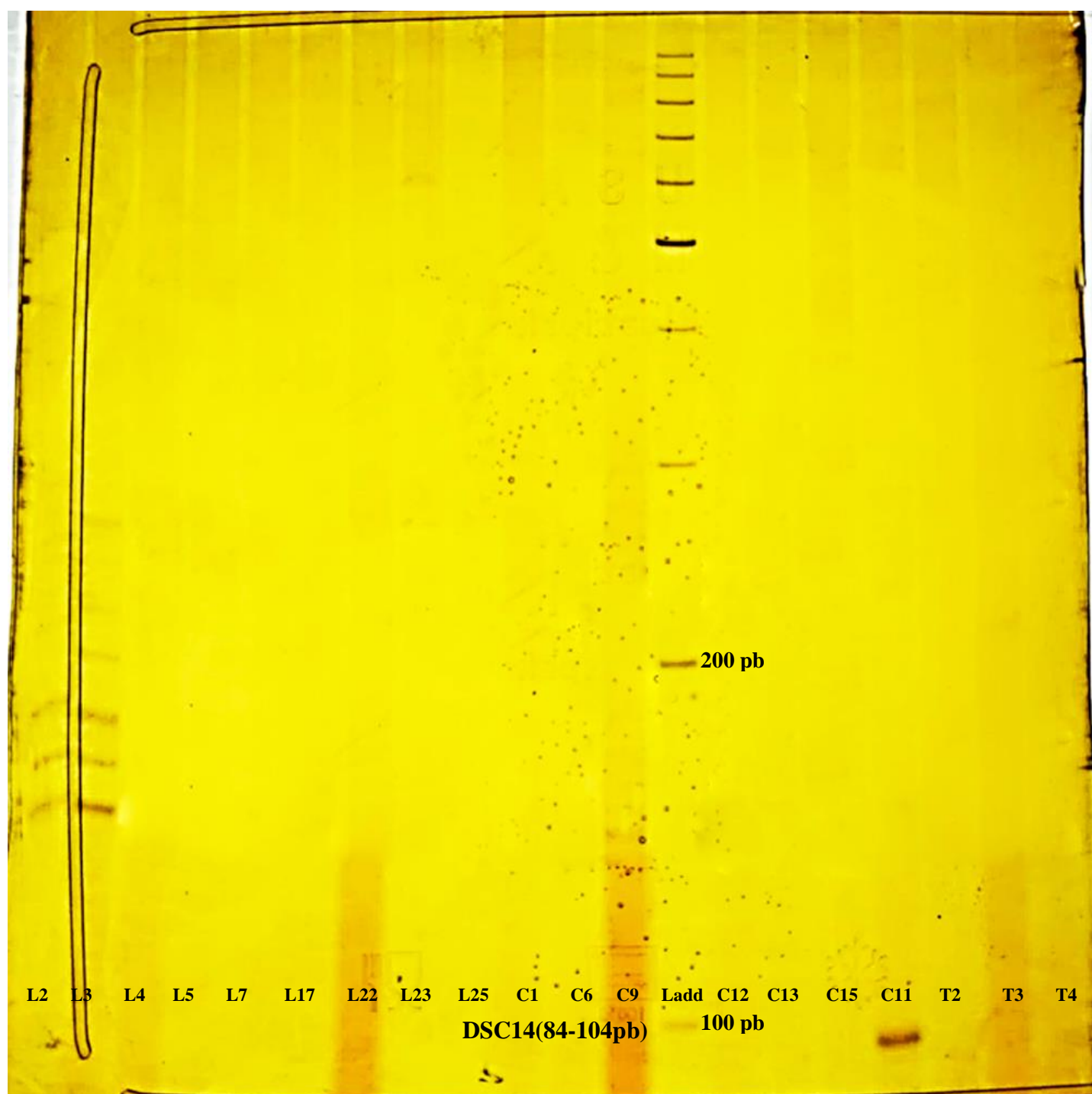
Anexo 21. Gel de electroforesis del producto de PCR con el marcador microsatélites Dsc14.



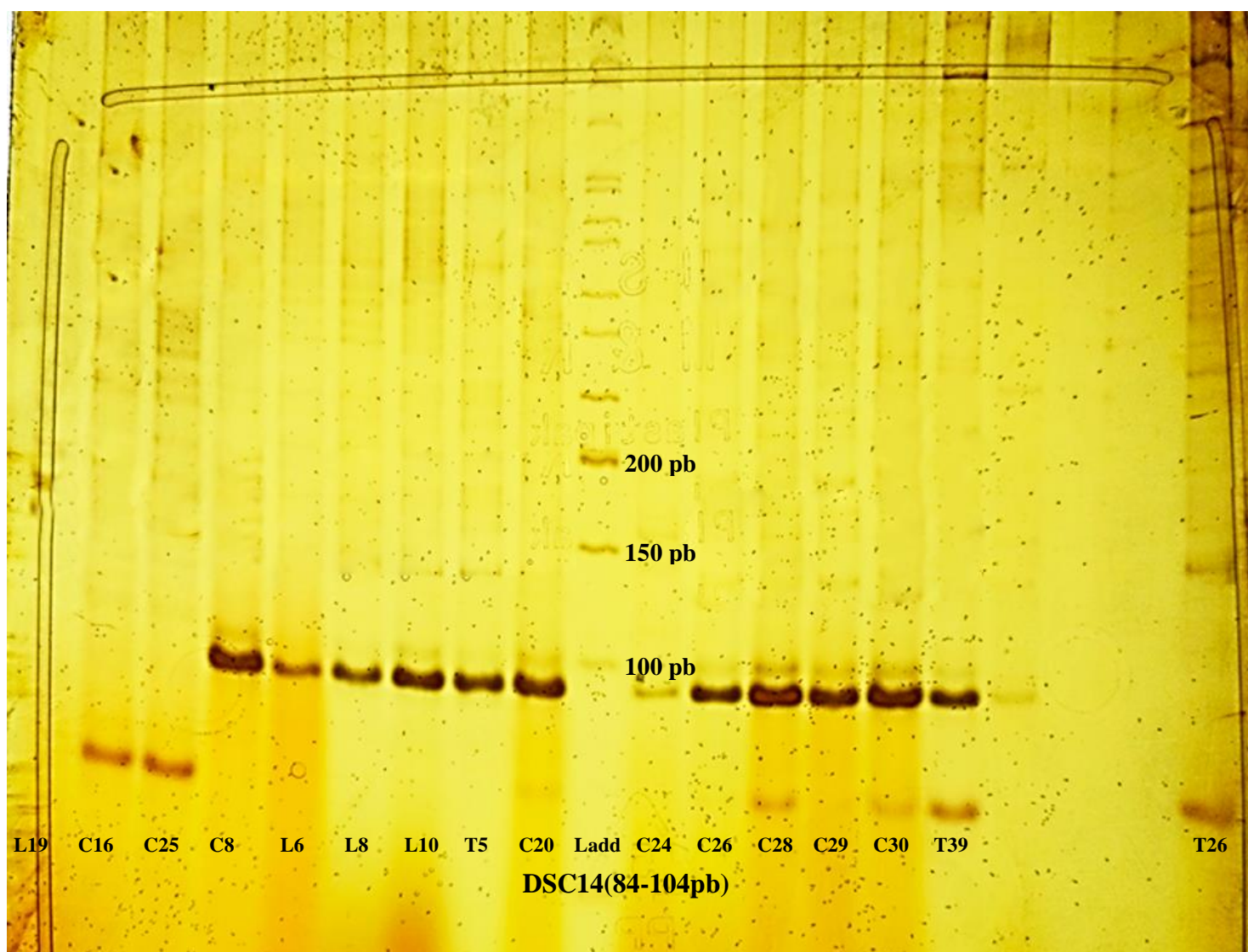
Anexo 22. Gel de electroforesis del producto de PCR con el marcador microsatélites Dsc14.



Anexo 23. Gel de electroforesis del producto de PCR con el marcador microsatélites Dsc14.



Anexo 24. Gel de electroforesis del producto de PCR con el marcador microsatélites Dsc14.





UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUÍZ GALLO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN



ACTA DE SUSTENTACIÓN

ACTA DE SUSTENTACION VIRTUAL N° 001-2023-

FCCBB-UI



Siendo las 18:00 horas del día 06 de enero de 2023, se reunieron vía plataforma virtual meet.google.com/jjz-hgbe-mtp los Miembros de Jurado evaluador de la tesis titulada **“Genotipificación de *Diatraea saccharalis* Fabricius usando los microsátélites Dsc2, Dsc13, Dsc14 en cultivo de *Saccharum officinarum* L. (Caña de Azúcar) de las regiones Lambayeque y La Libertad, Perú–2020”**, designados por Resolución N°045-2019-UI-FCCBB de fecha 09 de setiembre de 2019, con la finalidad de evaluar y calificar la sustentación de la tesis antes mencionada, conformada por los siguientes docentes:

Dr. César Alberto Guzmán Vigo	Presidente
MSc. Jhon Wiston García López	Secretario
MSc. Marco Antonio Guzmán Tello	Vocal
Dr. Luis Alberto Rodríguez Delfín	Asesor

El acto de sustentación fue autorizado por Resolución N° 001-2023-VIRTUAL-FCCBB/D, de fecha 05 de enero de 2023, de la sustentación virtual.

La Tesis fue presentada y sustentada por la **Bachiller JULISSA ALEJANDRA BARTURÉN SANDOVAL** y la **Bachiller YISELA VÁSQUEZ MONTOYA** tuvo una duración de 60 minutos. Después de la sustentación y absueltas las preguntas y observaciones por los miembros del jurado, se procedió a la calificación respectiva, otorgándole el calificativo de MUY BUENO (18) en la escala vigesimal.

Por lo que la **Bachiller JULISSA ALEJANDRA BARTURÉN SANDOVAL** y la **Bachiller YISELA VÁSQUEZ MONTOYA** queda **APTAS** para obtener el título profesional de Licenciada en Biología, de acuerdo con la Ley Universitaria 30220 y la normatividad vigente de la Facultad de Ciencias Biológicas y la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

Siendo las 19:11 pm se dio por concluido el presente acto académico, dando conformidad con la firma de los miembros del jurado.

Dr. César Alberto Guzmán Vigo
Presidente

MSc. Jhon Wiston García López
Secretario

MSc. Marco Antonio Guzmán Tello
Vocal

Dr. Luis Alberto Rodríguez Delfín
Asesor

CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE ORIGINALIDAD DE TESIS

Yo, Luis Alberto Rodríguez Delfín, asesor de la tesis de las Bachilleres Julissa Alejandra Barturén Sandoval y Yisela Vásquez Montoya, titulada: **Genotipificación de *Diatraea saccharalis Fabricius* usando los microsatélites Dsc2, Dsc13, Dsc14 en cultivo de *Saccharum officinarum* L. (Caña de Azúcar) de las regiones Lambayeque y La Libertad, Perú – 2020**, luego de la revisión exhaustiva del documento constato que la misma tiene un índice de similitud del 10% verificable en el reporte de similitud del programa Turnitin.

El suscrito analizó dicho reporte y concluyó que cada una de las coincidencias detectadas no constituyen plagio. A mi leal saber entender la tesis cumple con todas las normas para el uso de citas y referencias establecida por la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

Lambayeque, 04 enero del 2023


Dr. Luis Alberto Rodríguez Delfín

DNI: 08068320

ASESOR

Genotipificación de *Diatraea saccharalis* Fabricius usando los microsatélites Dsc2, Dsc13, Dsc14 en cultivo de *Saccharum officinarum* L. (Caña de Azúcar) de las regiones Lambayeque y La Libertad, Perú –

INFORME DE ORIGINALIDAD

10%

INDICE DE SIMILITUD

10%

FUENTES DE INTERNET

2%

PUBLICACIONES

%

TRABAJOS DEL
ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1

hdl.handle.net

Fuente de Internet

3%

2

dspace.unitru.edu.pe

Fuente de Internet

1%

3

repositorioinstitucional.buap.mx

Fuente de Internet

1%

4

repositorio.unprg.edu.pe:8080

Fuente de Internet

1%

5

bibliotecadigital.exactas.uba.ar

Fuente de Internet

1%

6

docplayer.es

Fuente de Internet

1%

7

www.unprg.edu.pe

Fuente de Internet


1%

8

www.scielo.cl

Fuente de Internet

<1%


Dr. Luis Alberto Rodríguez Delfin
Asesor

9	complete.bioone.org Fuente de Internet	<1 %
10	orcid.org Fuente de Internet	<1 %
11	eol.org Fuente de Internet	<1 %
12	www.senasa.gob.pe Fuente de Internet	<1 %
13	tesis.usat.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
14	repositorio.unsa.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
15	repositorio.upao.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
16	"XXV IUFRO World Congress: Forest Research and Cooperation for Sustainable", XXV IUFRO World Congress: Forest Research and Cooperation for Sustainable, 2019 Publicación	<1 %
17	datospdf.com Fuente de Internet	<1 %
18	www.bioline.org.br Fuente de Internet	<1 %
19	repositorio.ucv.edu.pe Fuente de Internet	<1 %

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 15 words

Excluir bibliografía

Activo


Dr. Luis Alberto Rodríguez Delfín
Asesor

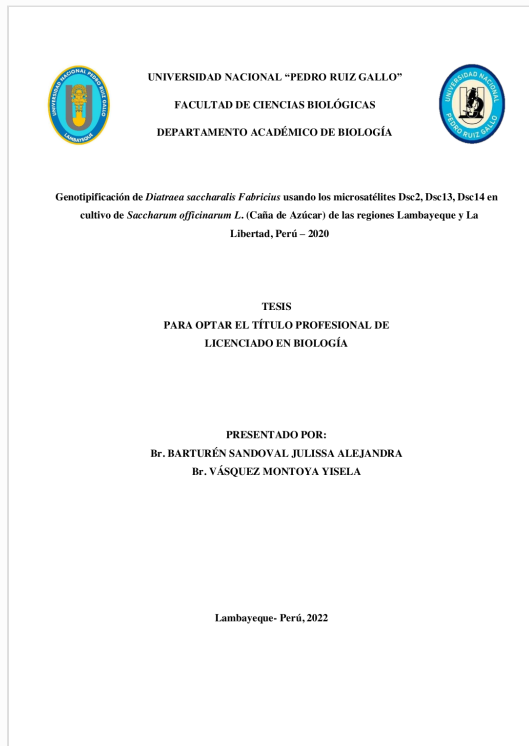


Recibo digital

Este recibo confirma que su trabajo ha sido recibido por **Turnitin**. A continuación podrá ver la información del recibo con respecto a su entrega.

La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega: Yisela Vasquez Montoya
Título del ejercicio: borrado1
Título de la entrega: Genotipificación de *Diatraea saccharalis* Fabricius usando lo...
Nombre del archivo: INFORME_DE_TESIS_-_FINAL_observaciones.pdf
Tamaño del archivo: 1.95M
Total páginas: 76
Total de palabras: 12,390
Total de caracteres: 68,928
Fecha de entrega: 09-ene.-2023 12:04p. m. (UTC-0500)
Identificador de la entrega... 1990306292




Dr. Luis Alberto Rodríguez Delfín
Asesor