

PROTOCOLO RÁPIDO PARA LA IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE DESCORTEZADORES (COLEÓPTERA: CURCULIONIDAE: SCOLYTINAE)

Adriana Rosalía Gijón-Hernández¹✉, María Isabel Rivera-Conde¹, Víctor Javier Arriola-Padilla¹, e Iris Marley Pérez-Gálvez¹

¹Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. CENID-COMEF. Av. Progreso No. 5, Barrio de Santa Catarina, Del. Coyoacán, C.P. 04110. Ciudad de México.

¹Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en conservación y Mejoramiento de Ecosistemas Forestales - INIFAP. Avenida Progreso 5, Colonia Barrio de Santa Catarina, Del. Coyoacán, Ciudad de México C.P. 04010

✉ Autor de correspondencia: gijon.adriana@inifap.gob.mx

RESUMEN. Los insectos constituyen una gran amenaza para las plantaciones forestales, dentro de los principales descortezadores encontramos a especies de los géneros *Dendroctonus* spp., e *Ips* spp., los cuales tienen ciertas limitantes para su identificación, como es la mala preservación de los insectos, así como el diminuto tamaño, por lo cual el uso de la PCR es una herramienta útil para la identificación de los mismos, para llevar a cabo esta técnica la extracción de ADN es un paso fundamental, sin embargo es tardada, por tal razón el objetivo de esta investigación fue obtener un protocolo rápido para la PCR. Mediante esta técnica se obtuvieron productos de PCR con una banda de aproximadamente 750 pb, correspondientes al fragmento esperado, por lo tanto al utilizar este método, se ahorra tiempo y recursos en la identificación de los descortezadores.

Palabras clave: Insectos, árboles, taxonomía, PCR.

Fast protocol for identification of molecular bark beetles (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae)

ABSTRACT. Insects are a major threat to forest plantations within the main barkers we find species of the genera *Dendroctonus* spp., and *Ips* spp., which have certain limitations for identification, such as the poor preservation of insects and the tiny size, so the use of PCR is a useful tool for identifying them, to carry out this technique a fundamental step is DNA extraction, but this step it is time-consuming, for this reason the objective of this research was obtain a rapid protocol for PCR. Mediated this technique PCR products with a band of 750 bp approximately were obtained, corresponding to the expected fragment, therefore when using this method time and resources are saved in bark beetle.

Key words: Insects, trees, taxonomy, PCR.

INTRODUCCIÓN

El grupo más importante de los insectos forestales que atacan las coníferas está constituido por aquellos que se alimentan del floema y cambium, entre estos se encuentran los descortezadores (coleópteros), ya que pueden causar la mortalidad de los árboles tanto en bosques como en el ambiente urbano, esto puede ser un problema; ya que las infestaciones de estos provocan parches en bosques con árboles de diferentes especies, edades y densidades, por lo cual afectan al ecosistema a partir de cambios en el paisaje y por lo tanto cambios en la calidad y cantidad de agua que fluye de las cuencas afectadas. En México entre los géneros más importantes encontramos a *Dendroctonus* spp., *Ips* spp., *Hylesinus* sp., *Phloeosinus* spp., *Pseudohylesinus* sp., *Scolytus* spp., *Hylurgops* spp., *Pityophthorus* spp., *Pseudopityophthorus* spp., y *Pissodes* spp. (Cibrián *et al.*, 1995; FAO, 2009; USDA, 2015). Destaca el género *Dendroctonus* spp., del cual se conocen 11 especies, estas son las plagas forestales más dañinas del país. Otro género de importancia económica es *Ips* spp., ya que pueden causar la muerte de los árboles o reducir la calidad de la

madera. Sin embargo, dentro de estos géneros existen especies de importancia cuarentenaria en base a normas oficiales NOM-013-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT, 2010); NOM-029-SEMARNAT-2003 (SEMARNAT, 2003); NOM-016-SEMARNAT-2013 (SEMARNAT, 2013), tales como: *Dendroctonus armandi*, *D. micans*, *D. murrayanae*, *D. punctatus*, *D. rufipennis*, *D. simplex* y *D. terebrans*, *Ips* spp. (excepto *Ips bonansea*, *I. calligraphus*, *I. cribricollis*, *I. confusus*, *I. grandicollis*, *I. emarginatus*, *I. hoopingi*, *I. integer*, *I. latidens*, *I. lecontei*, *I. mexicanus*, *I. pini*), *Bostrychus capucinus*, *Dinoderus* spp. (excepto *D. minutus*), *Heterobostrychus* spp., entre otros. Las especies cuarentenarias pueden desplazar a las especies nativas, modificar los ecosistemas y provocar pérdidas económicas. Aunque, no todas las especies exóticas se vuelven invasoras de forma inmediata, sus efectos potenciales son impredecibles y pueden llegar a ser devastadores; por lo que la defensa más eficiente es la prevención (Carlton, 2001; Myers *et al.*, 1998), seguida por la detección y erradicación temprana. (CONABIO, 2010); por esta razón, se requiere de una rápida y correcta identificación taxonómica, para llevar a cabo un adecuado control; sin embargo, la determinación taxonómica enfrenta una serie de obstáculos entre los que se encuentran una mala preservación de los insectos, pérdida de caracteres, tamaño pequeño (Dowell *et al.*, 1999; Fernández, 2003; Lan-Yu, 2010). Por lo cual el uso de herramientas moleculares es de suma importancia para la acertada identificación de las mismas. En la actualidad se tratan de establecer protocolos moleculares para su rápida identificación, las cuales típicamente utilizan la reacción en cadena de polimerasa (PCR) para amplificar tramos cortos de ADN, los cuales posteriormente se caracterizan mediante secuenciación (Armstrong y Ball, 2005; Rugman-Jones *et al.*, 2009). Para ello se utiliza el gen mitocondrial de la citocromo C oxidasa subunidad I (COI), el cual se ha reportado tanto para la identificación de coleópteros como otros insectos (Zhuang *et al.*, 2011), sin embargo el paso crucial para el éxito de la PCR es la extracción de ADN, para lo cual existen protocolos comerciales y artesanales, pero que su proceso puede tardar horas o incluso días, lo cual a la vez afecta la generación de resultados rápidos del diagnóstico de plagas de importancia cuarentenaria o exóticas, por lo antes expuesto el objetivo de esta investigación fue generar un protocolo rápido de PCR para insectos descortezadores.

MATERIALES Y MÉTODO

Material biológico. Los insectos fueron proporcionados por la Colección Nacional de entomología forestal del CENID-COMEF-INIFAP ubicado en la ciudad de México. Se utilizaron especímenes de *Dendroctonus valens* LeConte (Curculionidae: Scolytinae) e *Ips cribricollis* (Eich) (Curculionidae: Scolytinae) para estandarizar el protocolo. Los ejemplares conservados en alcohol al 70 %, se enjuagaron tres veces con agua estéril, posteriormente se disectó, se tomó el abdomen y la cabeza (Fig. 1), cada una se colocó en un mortero adicionando 25 μ l de agua libre de nucleasas estéril y se maceró hasta obtener una solución homogénea, luego el contenido se colocó en un tubo eppendorf de 1.7 ml. Posteriormente se realizaron diluciones colocando 2 μ l del macerado y 25 μ l de agua libre de nucleasas para ser utilizadas en la PCR.

Preparación de la mezcla. Se preparó la mezcla de PCR en un volumen final de 25 μ l, que contiene buffer de PCR 1X, 100 μ M de dNTP's, 0.75 mM de MgCl₂, 0.4 μ M de cada primer, 3 μ l del macerado, 0.1U de Taq polimerasa, agua libre de nucleasas (Promega).

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Los primers utilizados fueron LCO1490 (5'-G GTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') y HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAA AATCA-3') (Folmer *et al.*, 1994) los cuales reconocen al gen Citocromo C Oxidasa, subunidad I (COI). El programa de PCR consistió de desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, seguidos de 5 ciclos de 94 °C por 40 seg, 45 °C por 40 seg, 72 °C 1 min, posteriormente 35 ciclos de 94 °C 40 seg, 51 °C 40 seg, 72 °C por 1 min y una extensión final de 72 °C por 7 min (dnabarcodes, 2011;

Lopes *et al.*, 2015 modificado Gijón *et al.*, 2016). El producto de PCR se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %. El gel se preparó con TAE 1X (40 mM Tris base pH 7.8, 20 mM acetato de sodio y 2 mM EDTA) al cual se le agregó 0.2 μ l de bromuro de etidio (bromuro 3,8-diamino-5-etil-6-fenilfenantridinium). En cada pozo se depositaron 5 μ l de producto de PCR más 2 μ l de amortiguador de carga. En el primer pozo se depositaron 3 μ l de marcador molecular 1Kb (Promega). La electroforesis se llevó a cabo a 95 voltios por 45 min. Los productos de PCR se visualizaron en un fotodocumentador Prime Thermal Cycler 2 PRIMEG/02 de la marca TECHNE.

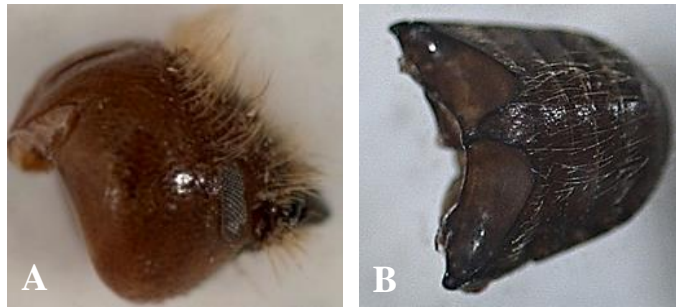


Figura 1. Piezas de *Ips cribricollis* utilizadas en el PCR; A) Cabeza, B) Abdomen

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de PCR indicaron que utilizar el macerado de los insectos es una forma rápida, fácil y de utilidad para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa.

El método rápido de obtención de ADN libera el uso de reactivos destinados para este fin y un ahorro considerable de tiempo y recursos, los cuales se pueden aprovechar avanzando en el procedimiento del protocolo para el diagnóstico de plagas cuarentenarias (Ortega, 2008; Herrera, 2008), por otro lado Powers y Harris, 1993; Powers, 2004 reportan un método similar de obtención de ADN en el diagnóstico de nematodos.

Los estudios moleculares indicaron que la banda del producto de PCR del macerado de cabeza y abdomen de los especímenes de *D. valens* e *I. cribricollis* fue de un peso aproximado de 750 pb del gen mitocondrial citocromo C oxidasa subunidad I (Fig. 2). Lopes *et al.* (2015) y Folmer *et al.* (1994) reportan una banda de amplificación de aproximadamente 700 a 710 pb para crisomélidos y artrópodos.

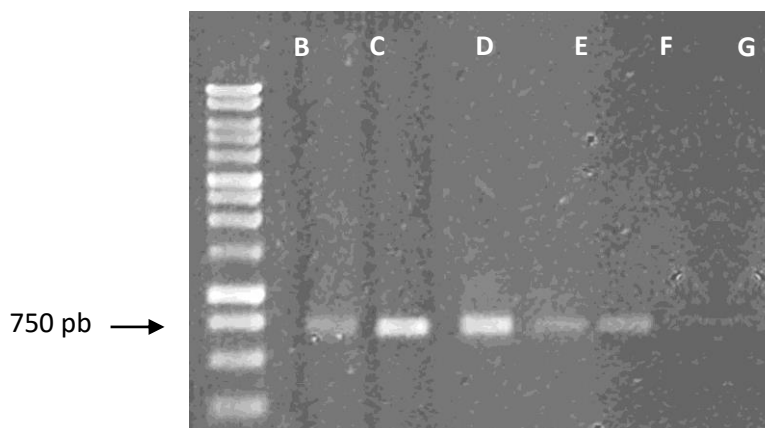


Figura 2. Visualización de los productos de PCR: A) Marcador molecular 1Kb, B) Abdomen dilución 2:25 (*D. valens*), C) Abdomen dilución 2:25 (*I. cribricollis*), D) Abdomen (*D. valens*), E) Cabeza dilución 2:25 (*I. cribricollis*), F) Abdomen (*D. valens*), G) Negativo.

CONCLUSIÓN

Con el método rápido de la PCR se ahorra tiempo y recursos para la identificación de coleópteros. Los primers LCO1490 y HCO2198, son útiles en la identificación de insectos descortezadores. El diagnóstico por PCR vía método rápido amplificando el gen mitocondrial del citocromo C oxidasa subunidad I (COI), facilita su diagnóstico. La cabeza y el abdomen son los segmentos que pueden ser utilizados para la realización de este método.

Agradecimientos

Al Instituto de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) por el financiamiento otorgado para la realización de esta investigación con No. de Proyecto SIGI 1466633470 “Identificación molecular de insectos exóticos de productos y subproductos forestales para prevenir su entrada dispersión y, en su caso control en México”.

Literatura Citada

- Armstrong, K F. and S. L. Ball. 2005. DNA barcodes for biosecurity: invasive species identification. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 360: 1813–1823. doi:10.1098/rstb.2005.1713.
- Carlton, J. T. 2001. *Introduced species in U.S. coastal waters: Environmental impacts and management priorities*. Institute for agricultura and trade policy. Arlington, United States. 28 p.
- Cibrián, T. D., Méndez, J. T. M., Campos, R. B., Yates III H. O. y J. L. Flores. 1995. *Insectos Forestales de México*. Universidad Autónoma Chapingo. 453 pp.
- CONABIO. Comité Asesor Nacional sobre Especies Invasoras. 2010. *Estrategia nacional sobre especies invasoras en México, prevención, control y erradicación*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Comisión Nacional de Áreas Protegidas, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México. 91 p.
- Dnabarcodes. <http://www.dnabarcodes2011>. (Fecha de consulta: XII 2015).
- Dowell, F. E., Throne, J. E., Wang, D. and J. E. Baker. 1999. Identifying stored-grain insects using near infrared spectroscopy. *Journal of Economic Entomology*, 92: 165–169.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2009. *Global review of forest pest and diseases*. Food and Agriculture organization of the United Nations. 222 p.
- Fernández, F. 2003. *Introducción a las hormigas de la región Neotropical*. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Bogotá, Colombia. 398 p.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. and R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 3(5): 294–299.
- Herrera, S. M. E. 2008. *Detección molecular de la palomilla oriental de la fruta Grapholita molesta (Busck) (Lepidoptera, Tortricidae)*. Tesis. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México. 33 pp.
- Itakura, S., Masuta, T., Tanaka, H. and A. Enoki. 2006. Identification of two subterranean termite species (Isoptera: Rhinotermitidae) using cellulase genes. *Journal of Economic Entomology*. 99: 123–128.
- Lan-Yu, L. 2010. Microstructural characters of Lyctinae and Dinoderinae (Coleoptera: Bostrichidae). 2010: 1–8. doi.org/10.1155/2010/607568
- Lopes, S. T., Dourado, C. G., Oliveira, A. R., Silva, I. F., Farinha, A. and M. T. Rebelo. 2015. Molecular Identification of Western-Palaeartic Leaf Beetles (Coleoptera, Chrysomelidae). *Journal of the Entomological Research Society*, 17(2): 93–101.
- Myers, J. H., Savoide, A. and E. Randen. 1998. Eradication and pest management. *Annual Review of Entomology*. 43: 471–491.
- Ortega, R. G. 2008. *Método rápido para la discriminación de Thrips palmi Karny por PCR*. Tesis de Maestría en Protección Vegetal. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México. 105 p.

- Powers, T. O. and T. S. Harris. 1993. A polymerase chain reaction method for the identification of five major *Meloidogone* species. *The Journal of Nematology*, 25: 1–6.
- Powers, T. 2004. Nematode molecular diagnostics: from bands to barcodes. *Annual Review of Phytopathology*, 42: 367–383.
- Rugman-Jones, P. F., Morse, J. G. and R. Stouthamer, 2009. Rapid molecular identification of armored scale insects (Hemiptera: Diaspididae) on mexican ‘Hass’ avocado. *Journal of Economic Entomology*, 102: 1948–1953.
- SEMARNAT (Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales) 2003. *Norma Oficial Mexicana. NOM-029-SEMARNAT-2003. Diario Oficial de la Federación (DOF). Especificaciones sanitarias del bambú, mimbre, bejuco, ratán, caña, junto y rafia, utilizados principalmente en la cestería y espartería*. 24 de julio de 2003. México. 5 p.
- SEMARNAT (Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2010. *Norma Oficial Mexicana. NOM-013-SEMARNAT-2010. Diario Oficial de la Federación (DOF). Que regula sanitariamente la importación de árboles de navidad naturales de las especies de los géneros Pinus y Abies; y la especie Pseudotsuga menziesii*. 6 de noviembre de 2010. 14 p.
- SEMARNAT (Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2011. *Anuario Estadístico de la Producción Forestal 2009. Dirección General de Gestión Forestal y de Suelos. Dirección del Registro y del Sistema Nacional de Gestión Forestal*. México. 218 p.
- SEMARNAT (Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2012. *Proyecto de modificación de la NOM-016-SEMARNAT-2003, que regula fitosanitariamente la importación de madera aserrada nueva*. Diario Oficial de la Federación (DOF). México, D.F. 17 de mayo de 2012. México, D.F.
- USDA (United States Department of Agriculture). 2015. Bark beetles: A natural and dramatic forest disturbance. <http://www.fs.fed.us/rmrs/projects/bark-beetles-natural-and-dramatic-forest-disturbance>. (Fecha de consulta: II-2016).
- Zhuang, Q., Jifen, C., Zhang, M., Feng, H., Guo, Y., Lan, L. and Y. Chen. 2011. Molecular identification of forensically significant beetles (Coleoptera) in China based on COI gene. *Revista Colombiana de Entomología*, 37: 95–102.