Revista Cuba & Caña Vol. 24, No. 2, Julio-Diciembre, 2021

ARTÍCULO ORIGINAL

CUBA & CAÑA

URL: http://www.cuba-cane.inica.azcuba.cu E-mail: journal.cuba.cane@gmail.com

CU-ID: 2258/v24n2e05

AMPLIFICACIÓN DEL MARCADOR MOLECULAR COI PARA LOS DÍPTEROS *LIXOPHAGA DIATRAEAE* Y *EUCELATORIA* SP

AMPLIFICATION OF THE COI MOLECULAR MARKER FOR THE DIPTERA *LIXOPHAGA DIATRAEAE* AND *EUCELATORIA* SP

YAIMY BLANCO-MACHADO*, DIAGNE CASAÑAS-CANINO, MARIO ALBERTO CASAS-GONZÁLEZ, JUANA DE LAS MERCEDES PÉREZ-PÉREZ, MÉRIDA RODRÍGUEZ-REGAL, MARÍA DE LA LUZ LA O-HECHAVARRÍA

Instituto de Investigaciones de Caña de Azúcar (INICA), Boyeros, La Habana, Cuba.

*Autora para correspondencia: Yaimy Blanco-Machado, e-mail: yaimy.blanco@inica.azcuba.cu

Palabras clave:

ADN mitocondrial
moscas
taquínidos

RESUMEN

Los dípteros *Lixophaga diatraeae* y *Eucelatoria* sp., controles biológicos del barrenador del tallo (*Diatraea saccharalis*) y de desfoliadores en caña de azúcar respectivamente, se producen de forma artesanal en los Centros de Reproducción de Entomófagos y Entomopatógenos (CREE) como parte del Programa Nacional de Lucha Biológica (PNLB) que desarrolla el Grupo Empresarial Azucarero (AZCUBA) desde la década de los 80. El control de calidad de estas especies ha descansado fundamentalmente en indicaciones productivas conductuales y caracteres morfológicos externos, lo cual complejiza la diferenciación de los insectos de similitud anatómica. El uso de herramientas moleculares para la identificación de las especies ha revolucionado la forma de su caracterización ya que proporciona elementos más precisos y proporcionan mayor información a nivel específico. La taxonomía molecular de algunas especies, fundamentalmente de dípteros, como el caso que nos ocupa, sigue sin estar resuelta, de ahí que se proponga estudiar regiones del genoma que pueden contribuir a una mejor identificación de las especies entomológicas de interés. El objetivo del estudio fue obtener el marcador molecular mitocondrial citocromo oxidasa subunidad 1 (COI) para las moscas *Lixophaga diatraeae*, y *Eucelatoria* sp., para contribuir al diagnóstico a nivel de CREE como una alternativa viable para elevar el nivel en el control de calidad de sus producciones. El análisis permitió la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la región del ADN mitocondrial correspondiente al gen COI mediante los cebadores universales utilizados obteniéndose las bandas esperadas de 750 pares de bases (pb) para ambas especies.

Keywords:

Mitochondrial DNA
Flies
Tachinidae

ABSTRACT

The dipters *Lixophaga diatraeae* and *Eucelatoria* sp. biological controls of the stem borer (*Diatraea saccharalis*) and defoliators respectively in sugar cane, are produced by artisan work at the Centers for Reproduction of Entomophagues and Entomopathogens (CREE) as part of the National Program of Biological Struggle (PNLB in Spanish initials) being developed by the Azcuba Enterprise Group since the decade of eighties last century. The quality control of the production of these species has leaned mainly in productive behavior indications and external morphological characters whch make difficult to differentiate insects of anatomical similarities. The employ of molecular tools for an accurate identification of species has revolutionized the form of their characterization and provide bigger information at specific level. The molecular taxonomy of some species mainly dipters, as these two flies, is still not resolved, with the result that, studies of genome regions are proposed to contribute to a better identification of enthomological species of interest The aim of the study was to obtain the mitochondrial molecular marker cytochrome oxidase subunit 1 (COI) for the flies *L. diatraea* and *Eucelatoria* sp. to contribute to diagnose at CREE level as a viable alternatve to enhance the quality control of their productions. The analysis allowed the amplification by polymerase chain reaction (PCR) of the DNA mitochondrial region corresponding to the gene COI by means of the universals primers used that produced the expected bands of 750 base pairs (bp).

Recibido: 13 de febrero de 2021

Aceptado: 13 de noviembre de 2021

Este artículo se encuentra bajo los términos de la licencia Creative Commons Attribution License CCBY-NC (4.0) internacional.
https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/

INTRODUCCIÓN

El control biológico de plagas de la caña de azúcar en Cuba comenzó en 1913 cuando el entomólogo norteamericano Roger Wolcott Sperry observó, por primera vez, huevos y las larvas de *Diatraea saccharalis* Fab., barrenador del tallo de la caña de azúcar parasitados con *Trichogramma* sp. y *Lixophaga diatraeae* (Townsend) (Díptera: Tachinidae) con una amplia dispersión en los cañaverales.

Por la viabilidad del descubrimiento y la necesidad de contener la incidencia del barrenador en la década del 30 del siglo pasado se inaugura el primer laboratorio para la reproducción masiva de *L. diatraeae* Town., lo que resultó el punto de partida del control biológico aplicado en el cultivo de caña de azúcar en Cuba (Fernández *et al*., 2015; Fernández, 2002).

A finales de 1979 se organiza el Programa Nacional de Lucha Biológica (PNLB) en caña de azúcar, donde se generaliza la producción de *L. diatraeae* a nivel de país en los Centros de Reproducción de Entomófagos y Entomopatógenos (CREE) según (INICA, 2019) y a partir de los 90, por el incremento de la presencia de desfoliadores en el cultivo, se incorpora en los CREE la reproducción de *Eucelatoria* sp. (MINAZ, 1997).

L. diatraeae se ha multiplicado de forma consecutiva por más de 70 años y alrededor de 40 sobre el hospedante artificial *Galleria mellonella*, además las mermas productivas por diversos eventos adversos han propiciado el intercambio de material de un centro a otro como pie de cría, aspectos que actuar en detrimento de la calidad de la producción.

El control de calidad de las producciones de estas especies ha descansado en determinados indicadores productivos, conductuales y caracteres morfológicos externos, lo cual complejiza la diferenciación de los insectos de similitud anatómica, por otra parte, no se cuenta con la documentación referencial del material salvaje que dio origen a la producción inicial que permita establecer comparaciones con las producciones actuales.

Los entomófagos, como los seres vivos están sujetos a transformaciones evolutivas y sus multiplicaciones continuadas pueden influir en sus características morfológicas y biológicas, lo que pudiera repercutir en la viabilidad económica de los centros al reducir el valor de su producción. La identificación y caracterización de insectos basado únicamente en caracteres externos podría enmascarar cambios en la especie y entre especies de similitud morfológica.

El uso de herramientas moleculares para la identificación de las especies ha revolucionado la forma de su caracterización ya que proporciona elementos más precisos y proporcionan mayor información a nivel específico (Thakur & Sandhu, 2010).

No obstante, la taxonomía molecular de algunas especies, fundamentalmente de dípteros, como el caso que nos ocupa, sigue sin estar resuelta, de ahí que se proponga estudiar regiones del genoma que pueden contribuir a una mejor identificación de las especies entomológicas de interés.

El objetivo del estudio fue obtener el marcador molecular mitocondrial citocromo oxidasa subunidad 1 (COI) para las moscas *Lixophaga diatraeae*, y *Eucelatoria* sp., para contribuir con su diagnóstico a nivel de CREE como una alternativa viable para elevar el nivel en el control de calidad de sus producciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de adultos y pupas procedentes de 4 Centros de Reproducción de Entomófagos y Entomopatógenos (CREE) de AZCUBA, procedente de las provincias de Las Tunas; Granma; Ciego de Ávila y Sancti Spíritus, fijadas en alcohol a 70% se colocaron en campana de extracción de gases durante 15 días, sobre un papel de filtro, para extraer la humedad.

Las muestras se conformaron con seis unidades de cada estadio y se duplicaron para su análisis. El macerado se realizó en el equipo FastPrep96™ (Biomedicals LLC, Santa Ana, Ca. USA) en Eppendorf de 2 mL y la extracción de ácidos nucleicos totales de las muestras se realizó mediante el protocolo de (Aljanabi *et al*., 1999).

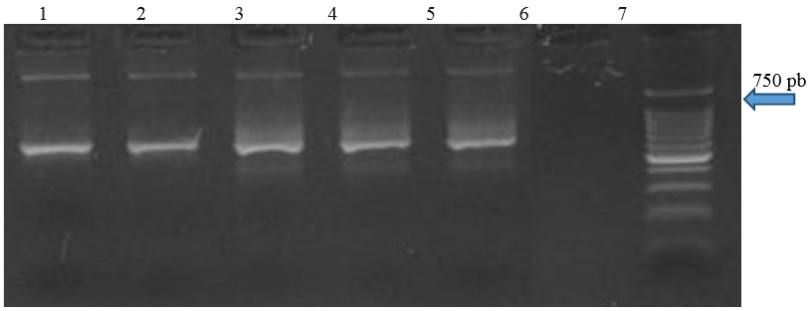
A partir de las muestras de ADN extraídas se amplificó el marcador mitocondrial citocromo oxidasa subunidad 1 (COI) mediante los cebadores universales LCO1490 (*Forward)* (5´-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3´) y HCO2198 (*Reverse*) (5´-TAAACTTCAGGGTGACCA-3´) que amplifican una banda de aproximadamente 750 pb. (Folmer *et al*., 1994).

La reacción de amplificación se realizó con 2,5 µl de ácidos nucleicos totales, 25 pmol de cada cebador, solución amortiguadora para PCR 1X (Promega), 1,25 µl $MgCl_2$ (Promega), 50 µM dNTPs (Promega), 0,5 unidades de ADN-polimerasa (Promega) y agua Milli Q, hasta un volumen final de 40 µl.

La amplificación se desarrolló en un termociclador (BOECO, TC-PRO, Bloque B-96G, Hamburgo, Alemania) según el programa informado por Chesters *et al*. (2012). Las bandas amplificadas se observaron en gel de agarosa 2 % (Merck, KGaA, Alemania) teñido con GelRed™ 0.001 % (Biotium, EE. UU.) en transiluminador con luz ultravioleta. Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (Ladder Promega, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1, se muestra la imagen del ADN genómico extraído de las muestras de *L. diatraeae* y *Eucelatoria* sp., suministradas por 4 CREE del Grupo Azucarero AZCUBA. Se observa que las bandas esperadas amplificaron en los



(1) *Ld* pupas CREE Majibacoa Las Tunas; (2) *Ld*, adulto CREE Majibacoa Las Tunas, (3) *Ld*, adulto CREE Grito de Yara Granma; (4) *Ld* adulto CREE Melanio Hernández, Sancti Spíritus, (5) *Eucelatoria* sp, adulto CREE Primero de Enero Ciego de Ávila, (6) Control negativo y (7) Marcador molecular. *Ld* = *Lixophaga diatraeae*.

Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa a 2% mostrando la amplificación de la región 5´del gen mitocondrial COI en muestras de *L. diatraeae* y *Eucelatoria* sp. suministradas por 4 CREE.

750 pares de bases (pb) de la región del ADN mitocondrial correspondiente al gen citocromo oxidasa subunidad 1 (COI) mediante los cebadores universales utilizados.

Las muestras proporcionadas en los carriles del 1 al 4 correspondientes a adultos y pupas de la especie *L. diatraeae* (Ld) de los CREE Majibacoa Las Tunas; Grito de Yara Granma y Melanio Hernández de Sancti Spíritus, mientras que el 5 a adultos *Eucelatoria* sp, de Primero de Enero de Ciego de Ávila. Los carriles 6 y 7 resultaron el control negativo y el marcador molecular, respectivamente.

Se verifica que el protocolo utilizado, proporciona la calidad requerida al ADN extraído y que los cebadores universales amplifican adecuadamente el fragmento previsto, el cual pude ser utilizado para la obtención del código de barras del taxón de los dípteros estudiados.

La secuenciación del marcador COI obtenido, permitirá la diferenciación molecular de los taxones para ambos taquínidos, así como sus códigos de barras de ADN, lo cual contribuirá con el diagnóstico eficiente de las producciones actuales y la certificación de la calidad biológica del material que se produce en los CREE.

El enfoque basado en el estudio del ADN tiene por objeto asegurar la precisa e inequívoca identificación y delimitación de los insectos, en cualquier etapa de su desarrollo, e independientemente de sus condiciones de preservación (Gil, 2016). Según (Jenkins *et al*., 2012) los análisis basados en marcadores de ADN mitocondrial han demostrado ser muy eficaces en la identificación de dípteros de la familia *Tachinidae*, lo cual se corresponde con los resultados obtenidos.

Los marcadores moleculares COI secuenciados constituyen una región que asegura una adecuada discriminación para muchas especies, incluyendo gran variedad de artrópodos y dípteros de la familia *Tachinidae*, grupo taxonómico de moscas parasitoides que controlan una gran variedad de plagas agrícolas. Cabe destacar que el locus COI dispone de gran cantidad de secuencias en las bases de datos moleculares, lo que supone una ventaja cuando se trabaja con especies poco estudiadas como los dípteros (Gil, 2016).

CONCLUSIONES

El ADN extraído de las muestras analizadas permitió la amplificación del marcador mitocondrial COI para ambas moscas en estudio.

RECOMENDACIONES

La secuenciación del marcador COI obtenido de ambos dípteros taquínidos, permitirá obtener el taxón molecular de los mismos, su código de barras de ADN, lo cual contribuirá al control de calidad de sus producciones en los CREE.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aljanabi, S. M., Forget, L., & Dookun, A. (1999). An improved and rapid protocol for the isolation of polysaccharide-and polyphenol-free sugarcane DNA. *Plant Molecular Biology Reporter*, *17*(3), 281-282. ISSN: 0735-9640. Publisher: Transaction Periodicals.

Chesters, D., Wang, Y., Yu, F., Bai, M., Zhang, T. X., Hu, H. Y., Zhu, C. D., Li, C. D., & Zhang, Y. Z. (2012). The integrative taxonomic approach reveals host specific species in an encyrtid parasitoid species complex. *PLoS One*, *7*(5), 1-7. ISSN: 1932-6203. Publisher: Public Library of Science San Francisco, USA.

Fernández, G. C., Risco, G. L., Espinosa, H. D., Tapia, R. J. L., & Ponce, F. H. (2015). Sesión: Control biológico de plagas con entomófagos. *Fitosanidad*, *19*(2), 99-100.

Fernández, M. N. (2002). Scaramuzza Pandini: Una personalidad en la historia de la Sanidad Vegetal. *Fitosanidad*, *6*(2), 51-61. Publisher: Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (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.

Gil, A. M. A. (2016). *Entomología molecular: Diversidad y filogenia de dípteros de interés médico-legal y veterinario, y su aplicación en situaciones reales* [Tesis Doctoral]. Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibertsitatea. Departamento de Zoología y Biología Celular Animal.

INICA. (2019). *Informe central de la Reunión Nacional de Variedades Semilla y Sanidad Vegetal* [Informe central]. Instituto de Investigaciones de Caña de Azúcar (INICA).

Jenkins, C., Chapman, T. A., Micallef, J. L., & Reynolds, O. L. (2012). Molecular techniques for the detection and differentiation of host and parasitoid species and the implications for fruit fly management. *Insects*, *3*, 763-788. Publisher: Molecular Diversity Preservation International.

MINAZ. (1997). *Informe central de la Reunión Nacional de Lucha biológica* (p. 17) [Informe central]. Ministerio del Azúcar (MINAZ).

Thakur, R., & Sandhu, S. S. (2010). Species confirmation of fungal isolates by molecular analysis. *Indian journal of microbiology*, *50*(3), 280-291. Publisher: Springer.

Yaimy Blanco-Machado, Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA). Carretera a CUJAE, km. 1½, Boyeros, La Habana, Cuba, C.P. 19390, e-mail: yaimy.blanco@inica.azcuba.cu

Diagne Casañas-Canino, Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA). Carretera a CUJAE, km. 1½, Boyeros, La Habana, Cuba, C.P. 19390, e-mail: diagne.casañas@inica.azcuba.cu

Mario Alberto Casas-González, Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA). Carretera a CUJAE, km. 1½, Boyeros, La Habana, Cuba, C.P. 19390, e-mail: mario.casas@inica.azcuba.cu

Juana de las Mercedes Pérez-Pérez, Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA). Carretera a CUJAE, km. 1½, Boyeros, La Habana, Cuba, C.P. 19390, e-mail: juana.perez@inica.azcuba.cu

Mérida Rodríguez-Regal, Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA). Carretera a CUJAE, km. 1½, Boyeros, La Habana, Cuba, C.P. 19390, e-mail: merida.rodriguez@inica.azcuba.cu

María La O-Hechavarría, Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA). Carretera a CUJAE, km. 1½, Boyeros, La Habana, Cuba, C.P. 19390, e-mail: yaimy.blanco@inica.azcuba.cu

Los autores de este trabajo declaran no presentar conflicto de intereses.