

Descripción de marcadores genéticos que permiten identificar poblaciones y migraciones del parásito del nopal *Dactylopius sp.* (cochinilla silvestre)

Fernando García, Alberto Rojas y Fidel Hernández

RESUMEN

La cochinilla silvestre del nopal es un insecto homóptero (Coccidae) perteneciente al género *Dactylopius*. En las regiones nopaleras de México, constituye una verdadera plaga y es considerada una competidora de la grana fina (*Dactylopius coccus*), la cual se utiliza para obtener colorantes naturales.

El propósito de este trabajo fue identificar y medir el potencial de propagación de grana silvestre en poblaciones agrestes a través de marcadores genéticos. Los resultados mostraron que las localidades de Oaxaca y Teotihuacán tienen grandes semejanzas entre sí, a diferencia de la de Morelos, que aparentemente no mostró similitud genética con las otras dos localidades.

INTRODUCCIÓN

Se le llama cochinilla silvestre del nopal a varios insectos homópteros (Coccidae) muy similares entre sí, que pertenecen al género *Dactylopius* (*D. confusus*, *D. tomentosus*, *D. indicus*, *D. austrinus*) y que son invasores de los cultivos de nopal (*Opuntia ficus-indica*). Hasta el momento, las especies de cochinilla silvestre se identifican sólo mediante sus características morfológicas y por la variedad del nopal que parasitan (Hodgson, 1994).

La característica más distintiva de la *Dactylopius sp.* es su gran velocidad de dispersión y crecimiento, lo que la convierte en una plaga altamente destructiva de los cultivos de nopal verdulero, lo cual, a su vez, provoca grandes pérdidas económicas entre los productores. Por otra parte, se han descrito poblaciones de estos insectos que son resistentes a los insecticidas, lo que genera serias dificultades para su control (Brana, MacGregor y Mann, 1980).

En Sudáfrica, para el control biológico de los nopales infectados con *Dactylopius sp.* que invaden los pastizales destinados a la producción ganadera, se utilizan las especies silvestres *D. austrinus* y *D. confertus* (Githure, Zimmermann y Hoffman, 1999). Asimismo, en algunos estudios se describen alrededor de cinco especies de cochinilla silvestre que son efectivas para controlar la invasión de nopaleras. La experiencia

que se desprende de estos casos subraya la importancia de contar con buenos métodos que favorezcan la dispersión de las especies adecuadas para controlar ciertas variedades de nopal específicas y evitar, además, la interferencia entre las variedades silvestres (Zimmermann, 1991).

En México, la cochinilla silvestre constituye una verdadera plaga en las regiones nopaleras, y el control de sus especies representa un grave problema, porque además de ser destructoras del nopal, son competidoras de la grana fina (*Dactylopius coccus* Costa), la cual se cultiva para obtener colorantes naturales (Castillo, 1993).

Tanto por los posibles daños que pueden causar estas especies, como por su utilidad para el control biológico, resulta muy importante tener herramientas para monitorear la dinámica poblacional de la cochinilla silvestre.

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es identificar marcadores genéticos en poblaciones silvestres de *Dactylopius sp.*, mediante el método Random Amplification of Polymorphic DNA by Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR), y usarlos para monitorear algunas poblaciones de *Dactylopius sp.* que fueron recolectadas en tres diferentes estados del país. Esto servirá para establecer criterios de identificación y medir el potencial de propagación de las poblaciones en general.

Con la técnica de RAPD-PCR se busca amplificar pequeñas secuencias de DNA de los individuos de las poblaciones en estudio para usarlos como marcadores genéticos que pueden compararse a través de métodos estadísticos (Williams *et al.*, 1991). En las

bandas del DNA amplificado se identifican secuencias que son constantes (monomórficas) o que cambian entre los individuos (polimórficas). Estos análisis permiten estimar niveles de variación entre alelos, en subpoblaciones de un área geográfica determinada (García *et al.*, 1999).

MATERIAL Y MÉTODOS

Insectos. Se recolectaron 30 individuos del estadio ninfa I de grana silvestre (*Dactylopius sp.*) en pencas de la especie *Opuntia ficus-indica* (variedad Atlixco), plantadas a cielo abierto en tres municipios de diversos estados: 12 individuos en pencas de San Martín de las Pirámides, Teotihuacán; 12 en Coyotepec, Oaxaca; y 6 en Tlayacapan, Morelos.

Obtención del DNA y condiciones de amplificación. El DNA de cada uno de los insectos se extrajo utilizando el método de Coen (Coen, Strachan y Dover, 1982), basado en la obtención de un homogeneizado de tejido del cual se elimina la mayor parte de las proteínas por precipitación con SDS y acetato de potasio. El DNA genómico individual (40-50 ng/ml) se usó como molde de amplificación en reacciones de PCR, según técnicas estándar (Ivinson y Graham, 1992), utilizando como iniciadores cinco oligonucleótidos de 10 bp denominados OPA02 (5'-TGCCGAGCTG-3'), OPA05 (5'-AGGGGTCTTG-3'), OPA07 (5'-GAAACGGGTG-3'), OPB10 (5'-CTGCTGGGAC-3') y OPC11 (5'-AAAGCTGCGG-3'), y diseñados para RAPD-PCR (*Operon Biotechnologies*) (Black, 1993).

Las reacciones se realizaron en un termociclador Perkin Elmer Amp2400, bajo las siguientes condiciones:

- a) 1 min a 95 °C
- b) 1 min a 92 °C

- c) 1 min a 35 °C
- d) 2 min a 32 °C

Las condiciones b-d se repitieron un total de 44 ciclos. Al final las muestras se incubaron 7 min a 72 °C.

Análisis de los datos. El DNA amplificado se analizó mediante electrofresis en geles de agarosa utilizando un amortiguador Tris-acetatos-EDTA (Sambrook y Fritsch, 1989); posteriormente, los geles se tiñeron con bromuro de etidio. Las bandas polimórficas se registraron y analizaron mediante los programas RAPDPLOT, RAPDDIST y NEIGHBOR para establecer índices de similitud genética, referidos para estudios de genética poblacional (Black *et al.*, 1996). Las relaciones de parentesco entre las tres poblaciones colectadas se representaron en forma de dendrograma, y los valores de distancia genética de Nei se calcularon con base en la fórmula de Lynch y Milligan (1994).

RESULTADOS

En todos los casos se obtuvieron bandas de DNA amplificado en el rango de 800–6000 bp. Los patrones observados presentaron un gran número de bandas monomórficas y un número discreto de bandas polimórficas, todas ellas fueron registradas y analizadas (Fig. 1).

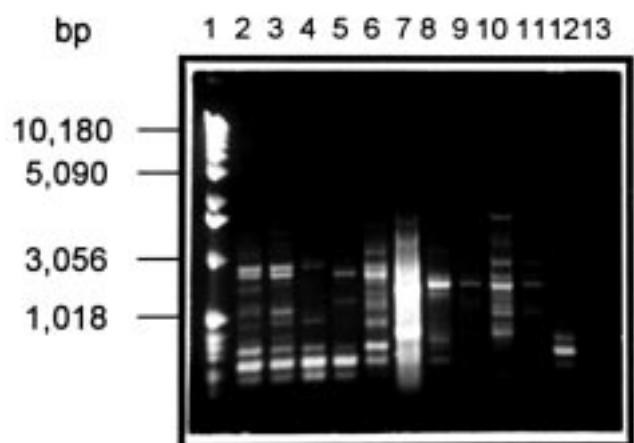
Los individuos de cada población se situaron en los dendrogramas en posiciones con base en el índice de similitud genética, calculada a partir del número de polimorfismos presentados. Por otra parte, también se estimaron las distancias genéticas que existen entre las tres poblaciones estudiadas.

Con los datos obtenidos se construyó un dendrograma poblacional que muestra las tres poblacio-

nes estudiadas. Se obtuvieron dos ramas principales: la primera agrupó las poblaciones recolectadas en las localidades de Oaxaca y Teotihuacán, debido a que presentaron distancias genéticas similares: ($D=0.03290$) y ($D=0.04740$), respectivamente; y la segunda, en cambio, mostró que los resultados genéticos de la población extraída en la localidad de Morelos ($D=0.32435$) se encuentran alejados de los de las dos localidades anteriores, lo cual la convierte en una rama independiente (Fig. 2).

De acuerdo con lo anterior, en el dendrograma que agrupa los ejemplares de cada población se obtuvieron tres ramas principales donde se demuestra que las localidades de Oaxaca y Teotihuacán tienden a agrupar a los individuos y que, por el contrario, la localidad de Morelos agrupa a los suyos en forma independiente (excepto a los individuos 37 y 35 que aparentemente tienen similitud genética con la población de Teotihuacán) (Fig. 3).

Fig. 1. Comparación entre los patrones de amplificación en la especie *Dactylopius sp.*, obtenidos por medio de RAPD-PCR, a través del iniciador OPA10 (5' -GTGATCGCAG- 3')



El DNA de ninfas I de *Dactylopius sp.* de tres localidades (Oaxaca, Teotihuacán y Morelos) se aisló y amplificó siguiendo el método RAPD-PCR, y se analizó por electrofresis. Cada carril muestra el DNA amplificado de un individuo. Carril 1: polímeros de DNA múltiples de 1 Kb; carriles 2-6: *Dactylopius sp.* (Teotihuacán); carriles 7-12: *Dactylopius sp.* (Oaxaca); carril 13: control negativo de la reacción de PCR.

Fig. 2. Relaciones de parentesco entre las tres poblaciones recolectadas (Teotihuacán, Oaxaca y Morelos)

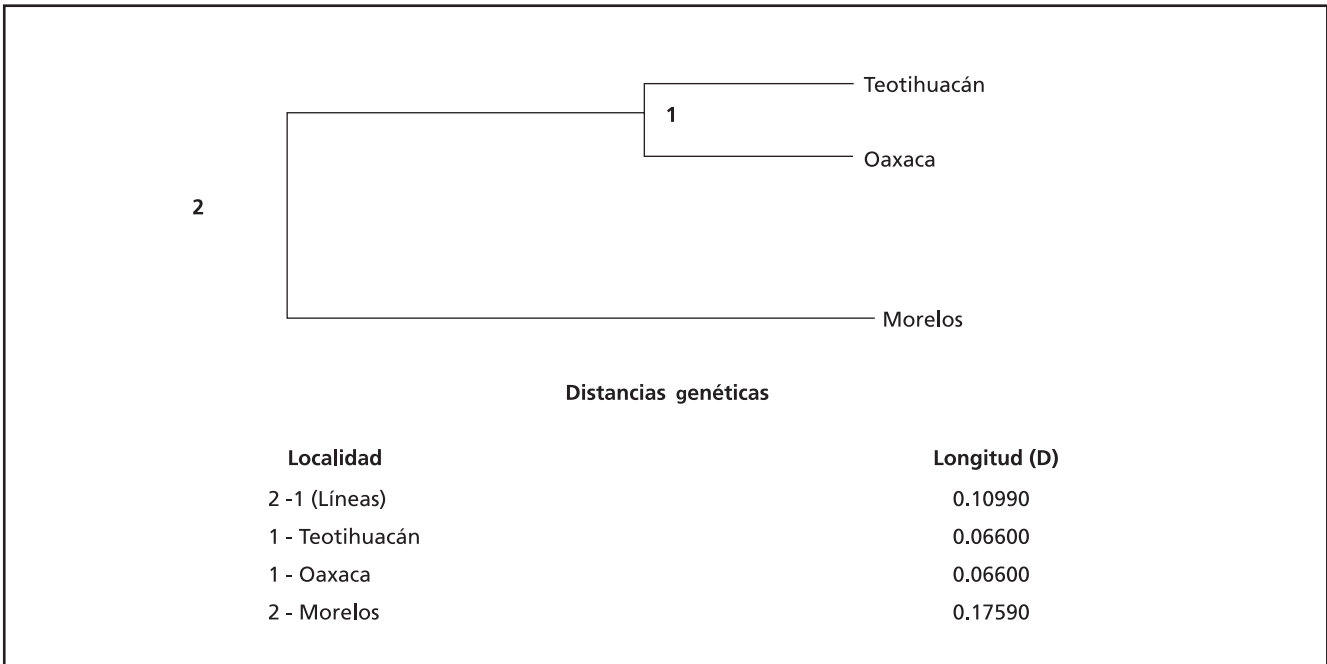
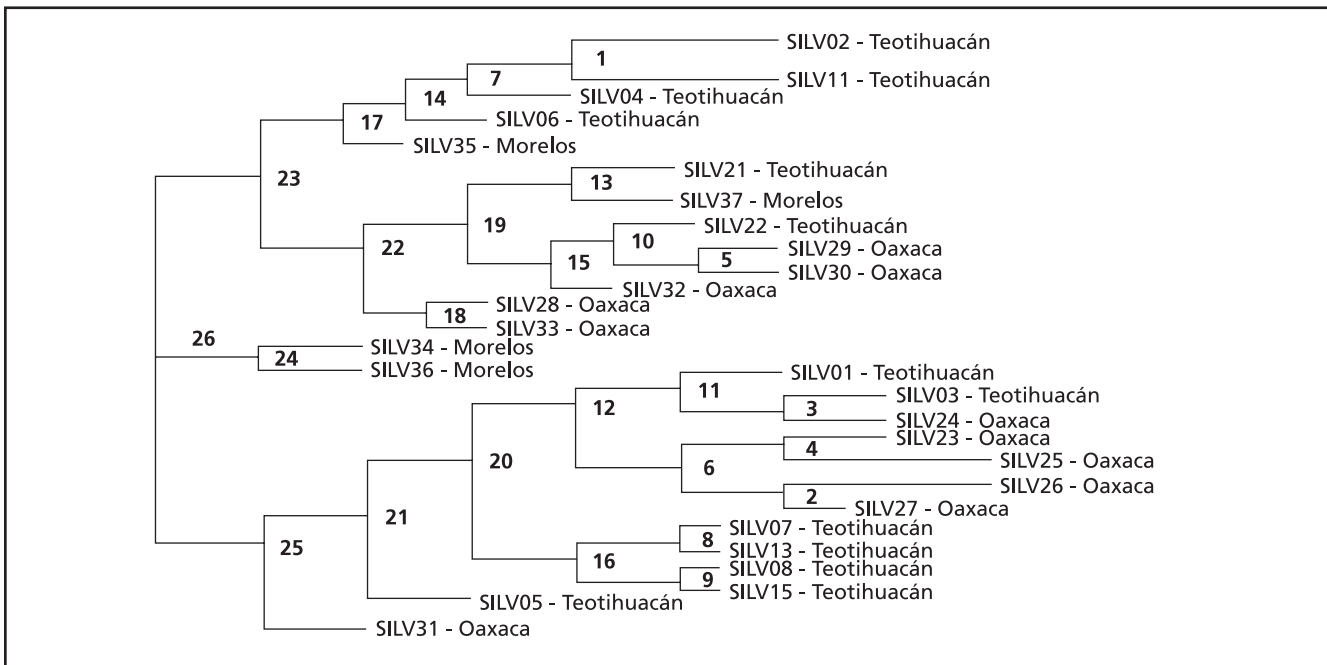


Fig. 3. Relaciones de parentesco entre los individuos de *Dactylopius sp.* de las tres poblaciones recolectadas (Teotihuacán, Oaxaca y Morelos)



Las bandas polimórficas obtenidas por RAPD-PCR de *Dactylopius sp.* se analizaron a través de los programas RAPDPLOT, RAPDDIST y NEIGHBOR, para establecer índices de similitud genética y sus relaciones, lo cual representamos en forma de dendrograma.

DISCUSIÓN

Como lo muestran los dendrogramas, al analizar las poblaciones de *Dactylopius sp.*, se observó una tendencia a agrupar a cada uno de los individuos según la localidad de muestreo. Las poblaciones recolectadas en Oaxaca y Teotihuacán presentaron valores de polimorfismos y heterocigocidad muy similares, lo cual sugiere que existe un alto flujo de genes entre estas poblaciones. Esto puede deberse al intercambio de pencas entre las localidades, o bien, a un "corredor" de presencia ininterrumpida entre los insectos y sus huéspedes.

En el caso de la población obtenida en la localidad de Morelos, se presentaron bajos niveles de polimorfismos y se observó una tendencia a agrupar a los individuos de manera independiente en relación con las otras dos poblaciones estudiadas. Esto hace pensar que probablemente existan "alelos privados", que son propios de los individuos de esta población.

El estudio de las poblaciones naturales de cochinilla silvestre que habitan en México es fundamental y debe dársele gran prioridad debido, entre otras cosas, a que la constante comercialización entre los productores de nopal verdulero favorece el flujo de propagación y dispersión de esta plaga, y esto trae como consecuencia importantes pérdidas en la producción del nopal y la tuna. ★

BIBLIOGRAFÍA

- Apostol, B. L., Black, W. C., Reiter, I. P. y Miller, B. R. (1996). Population genetics with RAPD-PCR markers: *Aedes aegypti* in Puerto Rico. *Heredity*, 76, 325-334.
- Ballinger Crabtree, M. E., Black, W. C. y Miller, B. R. (1992). Use of genetic polymorphisms detected by RAPD-PCR for differentiation and identification of *Aedes aegypti* populations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 47, 893-901.
- Black, W. C. (1993). PCR with arbitrary primers: approach with care. *Insect Mol. Biol.*, 2, 16.
- Black, W. C., Duteau, N. M., Puterka, G. J., Niechols, J. R. y Pettorni, J. M. (1996). Use of the random amplified polymorphic polymorphisms in aphids. *Bull. Ent. Res.*, 82, 151-159.
- Brana, R., MacGregor, L. R. y Mann, J. (1980). Catálogo de cóccidos mexicanos I Familia Dactylopiidae (Homóptera: Coccoidea). *Ann. Inst. Biol., UNAM*, 54 (983). *Ser. Zool.*, 1, 217-223.
- Castillo, V. J. (1993). *Relación entre algunas características anatómicas del nopal (Opuntia spp.) y el establecimiento de la cochinilla (Dactylopius coccus Costa)*. Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Chapingo.
- Coen, E. S., Strachan, T. y Dover, G. (1982). Dynamics of concerted evolution of ribosomal DNA and histone gene families in the melanogaster species subgroup of *Drosophila*. *J. Mol. Biol.*, 158, 17-35.
- García G. F., Rojas, M. A., Petriz, E. E. y Hernández, H. F. (1999). *Dactylopius coccus* y *Dactylopius sp.*: detección de polimorfismos en el DNA usando RAPD-PCR y comparación entre especies. *Imaggen (número especial dedicado a la investigación), Universidad Simón Bolívar*, 48, 16-22.
- Gawel, N. J. y Bartlett, C. (1993). Characterization of diferencias between white flies using RAPD-PCR. *Insect Mol. Biol.*, 2, 33-38.
- Githure, C. W., Zimmermann, H. G. y Hoffman, J. H. (1999). Host specificity of biotypes of *Dactylopius opuntiae* (Cockerell) (Hemiptera: Dactylopiidae): prospects for biological control of *Opuntia stricta* (Haworth) Haworth (Cactaceae) in Africa. *African Entomology*, 7, 43-48.
- Hodgson, C. J. (1994). *The Scale Insect Family Coccidae: An Identification Manual to Genera*. London: International Institute of Entomology/ CAB International.
- Iverson, J. A. y Graham, R. T. (1992). PCR in genetics diagnosis. En McPherson, M. J., Quirke, P. y Taylor, G. R. *A practical approach. The practical approach series* (pp. 215-239). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Lynch, M. y Milligan, B. G. (1994). Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Mol. Ecol.*, 3, 91-99.
- Sambrook, E. y Fritsch, T. M. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. (Second Edition). (Appendix 3). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Williams, J. G., Kubelik, A. R., Rafalski, J. A. y Tingey, S. V. (1991). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids. Res.*, 18, 6531- 6535.
- Zimmermann, H. G. (1991). Biological control of prickly pear, *Opuntia ficus indica* (Cactaceae) in South Africa. *Agricol. Ecosys. Environ.*, 37, 29-35.