

***Dactylopius coccus* y *Dactylopius* sp.: detección de polimorfismos en el DNA usando RAPD-PCR y comparación entre especies**

Fernando García, Alberto Rojas, Eduardo Pétriz y Fidel Hernández

RESUMEN

Dactylopius coccus Costa (grana o cochinilla fina), homóptero originario de México, se cultiva sobre nopales para producir ácido carmínico. Las especies silvestres de *Dactylopius* son plaga del nopal y del cultivo de grana fina.

En este trabajo estudiamos variaciones genéticas entre las poblaciones finas y silvestres de cochinilla, utilizando la amplificación arbitraria de polimorfismos de DNA mediante PCR (RAPD-PCR), sobre el DNA de ninfas I y machos adultos; las ninfas silvestres y los machos de *D. coccus* presentaron patrones de amplificación con un número discreto de bandas polimórficas; mientras que las ninfas de *D. coccus* mostraron patrones marcadamente polimórficos, lo cual sugiere gran cantidad de rearrreglos en su DNA.

INTRODUCCIÓN

Las cochinillas del nopal o de la grana son insectos homópteros que pertenecen al género *Dactylopius*; crecen sobre el nopal *Opuntia* sp., el cual se considera originario de México. La especie *Dactylopius coccus* Costa o grana fina se cultiva para la producción de ácido carmínico, colorante natural con múltiples aplicaciones en la industria de alimentos, farmacológica y de cosméticos (Santibáñez, 1988). Hasta ahora se han descrito varias especies de cochinilla silvestre, las cuales se identifican de acuerdo con sus características morfológicas y según la variedad del nopal que parasitan. Las especies silvestres (*D. indicus*, *D. confusus* y *D. tomentosus*) tienen gran velocidad de dispersión y crecimiento, lo que las hace capaces de destruir cultivos de nopal y de grana fina. La cochinilla silvestre se ha difundido a diferentes partes del mundo debido a la introducción de nopales infestados.

Estos insectos presentan resistencia a insecticidas (Brana, Mann y MacGregor, 1975); sin embargo, en Sudáfrica, las especies silvestres *D. austrinus* y *D. confertus* se utilizan para el control biológico de los nopales *Opuntia stricta*, *O. streptacantha* y *O. ficus indica* que invaden los

pastizales dedicados a la producción ganadera. En estudios comparativos se menciona que entre 12 especies de insectos cactófagos introducidos, 5 tipos de cochinilla resultaron efectivos para controlar la invasión de estos nopales en los pastizales (Zimmermann, 1998).

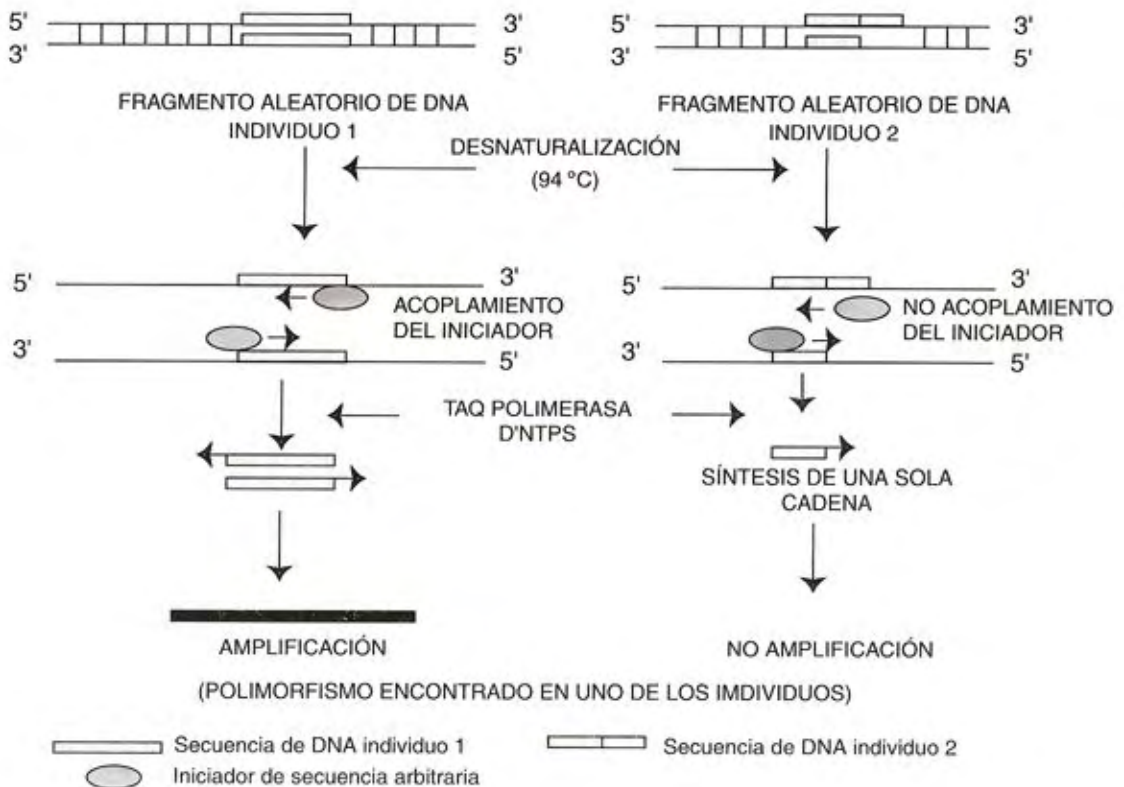
De las experiencias obtenidas usando *Dactylopius* para control biológico, se ha establecido la importancia de contar con los medios para identificar las especies de cochinilla, monitorear su dinámica poblacional y favorecer la dispersión de la especie o especies para

controlar una variedad de nopal y evitar interferencia entre las variedades de *Dactylopius* (Zimmermann, 1991).

Estos mismos conocimientos serían útiles en las especies de cochinilla presentes en México, tanto para implementar técnicas de mejoramiento en el caso de *D. coccus*, como en el diseño de métodos de control para la cochinilla silvestre.

En la técnica de RAPD-PCR (*Random Amplification of Polymorphic DNA by Polymerase Chain Reaction*) se busca amplificar secuencias pequeñas de DNA de los individuos en estudio para analizarlas y compararlas por electroforesis. En las bandas del DNA amplificado se identifican secuencias que son constantes (monomórficas) o aquellas que cambian entre individuos (polimórficas) (Fig. 1).

Fig 1. Principio de RAPD-PCR



El esquema muestra una de las cadenas de amplificación para dos individuos con diferencias en una región de su DNA, utilizando el mismo iniciador. El iniciador no reconoce una de las cadenas del DNA en el individuo 2, uno de los sitios de acoplamiento por lo que sólo amplifica aquella donde sí existe reconocimiento entre las secuencias del iniciador y el DNA molde.

Las secuencias polimórficas corresponden a regiones del DNA que han sufrido cambios a lo largo del tiempo y pueden funcionar como marcadores genéticos para reconocer especies y poblaciones (Williams *et al.*, 1990).

En este trabajo nos propusimos conocer las variaciones que existen a nivel de secuencia de DNA entre individuos y poblaciones de varias especies de *Dactylopius*, con el propósito de establecer marcadores genéticos útiles para la identificación y selección de mejores individuos productores de carmín, así como para conocer la dinámica poblacional de las especies de cochinilla.

MATERIALES Y MÉTODOS

Insectos. Se colectaron 13 individuos del estado ninfal I y 20 machos adultos de la especie *D. coccus* (grana fina) —obtenidos en el estado de Oaxaca— y 13 ninfas I de la especie *Dactylopius sp.* (grana silvestre). La cochinilla fina se cultivó sobre cladodios colgados de la especie *Opuntia ficus indica* dentro de un invernadero, con una temperatura anual de 23 °C máxima y 10 °C mínima. Los individuos silvestres se obtuvieron de pencas plantadas a cielo abierto de *Opuntia ficus indica* (variedad Atlixco) en el municipio de Teotihuacán, Estado de México.

Aislamiento de DNA. El DNA de los insectos se preparó a través del método descrito por Coen *et al.*, (1982), el cual se basa en la obtención de un homogeneizado de tejido que es lisado y las proteínas precipitadas con SDS y acetato de potasio. Posteriormente los ácidos nucleicos se precipitaron con etanol.

RAPD-PCR. Para las reacciones de amplificación el DNA individual (40-50 ng/μl de DNA genómico por reacción) fue amplificado en reacciones de PCR según técnicas

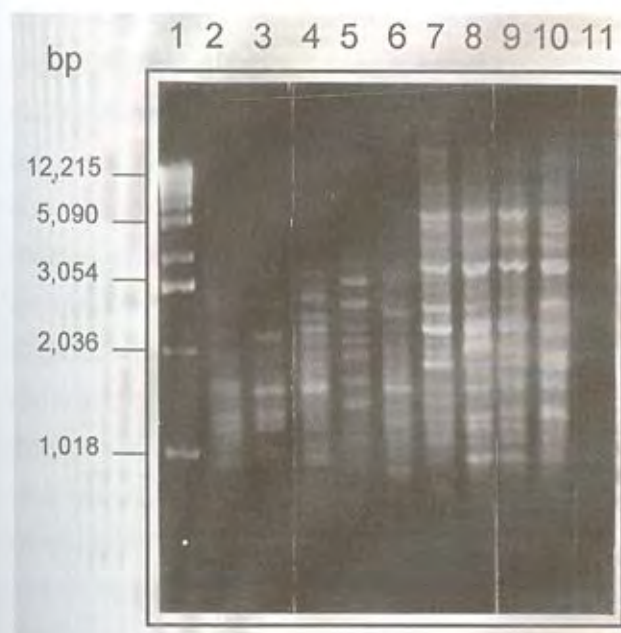
estándar (Ivinson y Taylor, 1992), utilizando como iniciadores 7 oligonucleótidos de 10 bp denominados OPA07, OPA10, OPC11, OPB08, OPA05, OPB10 Y OPA02, a partir de un kit de oligonucleótidos (*Operon Biotechnologies*) diseñados para RAPD-PCR (Black, 1993a). Las reacciones se realizaron en un termociclador Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 2400, bajo las siguientes condiciones:

1. 95 °C por 5 min
2. 92 °C por 1 min
3. 35 °C por 1 min
4. 72 °C por 2 min
5. 72 °C por 7 min

Las condiciones 2-5 se repitieron 44 veces para un total de 45 ciclos (Black y Duteau, 1996).

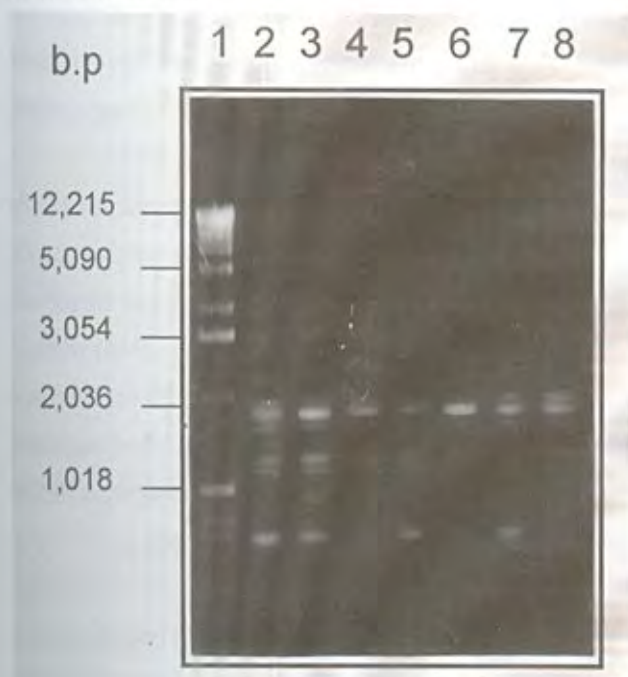
Análisis de los fragmentos amplificados. El DNA amplificado obtenido por PCR se analizó por electroforesis en geles de agarosa, utilizando un amortiguador de corrida TAE 1X (Sambrook *et al.*, 1989). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio, se observaron bajo luz U.V y se fotografiaron. Las bandas polimórficas se registraron individualmente; los datos se analizaron mediante los programas RAPDPLOT y NEIGHBOR; y se construyeron dendrogramas que incluyeron a los individuos de cada población.

Fig. 2. Comparación de los patrones de amplificación que fueron obtenidos por medio de RAPD-PCR en las especies *D. coccus* y *Dactylopius sp.* (estadio ninfal I), mediante el iniciador OPA-05 (5'-AGGGGTCTTG-3')



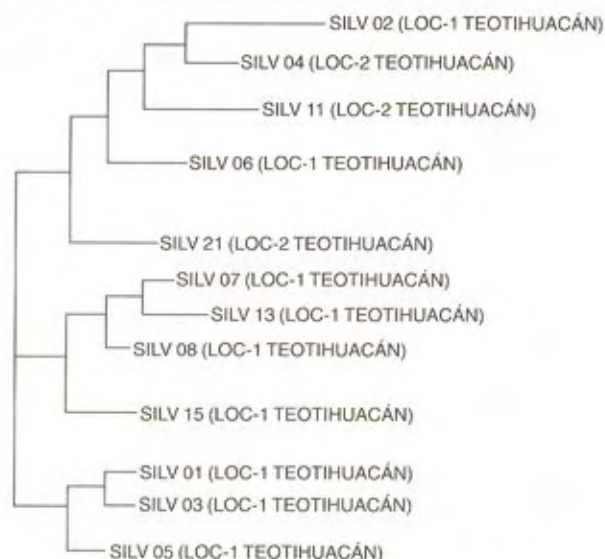
Cada carril muestra el DNA amplificado de un individuo. Carril 1: polímeros de DNA múltiplos de 1 Kb; carriles 2-6: *D. coccus*; carriles 7-10: *Dactylopius sp.*; carril 11: control negativo de la reacción PCR.

Fig. 3. Patrones de amplificación por RAPD-PCR en adultos machos de la especie *D. coccus*, usando el iniciador OPA-05 (5'-AGGGGTCTTG-3')



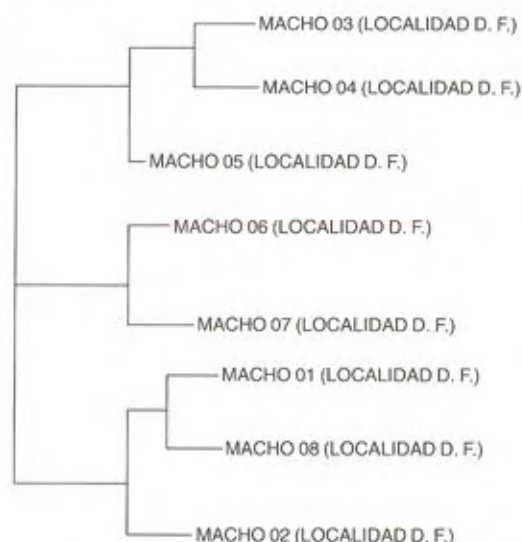
Cada carril muestra el DNA de un individuo. Carril 1: polímero de 1Kb; carriles 2-7: individuos machos de *D. coccus*.

Fig. 4. Relaciones de parentesco entre individuos de *Dactylopius sp.* de dos localidades del municipio de Teotihuacán



Se seleccionaron 12 individuos (SILV01-SILV12) de *Dactylopius sp.* (grana silvestre) de dos diferentes localidades (L-I y L-II), colectados en el municipio de Teotihuacán, Estado de México. Se les extrajo el DNA y se les procesó para su amplificación según el método RAPD-PCR. Se registraron las bandas polimórficas y se analizaron con los programas RAPDPLOT y NEIGHBOR, para establecer índices de similitud genética entre los individuos y sus relaciones, representándose en forma de dendrograma.

Fig. 5. Dendrograma de adultos machos de *D. coccus* 10 individuos (MACHO 01-MACHO10) se procesaron por RAPD-PCR



Las bandas polimórficas se registraron y analizaron para establecer índices de similitud genética; sus relaciones se representan en forma de dendrograma.

RESULTADOS

Se analizaron 26 ninfas de estadio I, 13 pertenecientes a *D. coccus* y 13 a *Dactylopius sp.*; en todos se obtuvieron bandas de DNA amplificado en el rango de 8140 a 1018 bp. Los patrones observados en los individuos silvestres de *Dactylopius sp.* presentaron un gran número de bandas monomórficas y un número discreto de bandas polimórficas que se registraron para su análisis (Fig. 2). Para el caso de *D. coccus*, los patrones de amplificación de los individuos presentaron gran número de bandas polimórficas (Fig. 2). Por otra parte, en 10 individuos machos de *D. coccus* se obtuvieron patrones similares a los observados en ninfas silvestres (Fig. 3). Para construir los dendrogramas, los individuos de cada población se situaron en sus posiciones con base en su similitud genética, calculada en función del número de polimorfismos presentados por los individuos. El tamaño de las líneas en los dendrogramas es proporcional a las distancias que se establecieron entre cada individuo analizado (Figs. 4 y 5). Las ninfas de *D. coccus* presentaron las distancias genéticas más grandes entre sí, en contraste con lo observado, comparadas con las ninfas de *Dactylopius sp.* y los machos adultos de *D. coccus*.

DISCUSIÓN

En los insectos la identificación de especies y poblaciones es un problema, debido a que sus morfologías cambian constantemente en función del ambiente (Marjorie, 1994).

El uso de la técnica de RAPD-PCR ha permitido identificar y diferenciar especies de las órdenes *Diptera*, *Aphidae* e *Hymenoptera*, entre otras. En la genética poblacional este método permite analizar la variación poblacional gracias al análisis sistematizado de gran número de marcadores genéticos distinguibles en cada individuo de una población.

Por ejemplo, en la mosquita blanca de la papa dulce (*Bemisia tabaci*), homóptero relacionado con *Dactylopius coccus*, considerada como una plaga causante de grandes pérdidas en daños a cultivos en zonas áridas del suroeste de Estados Unidos, el uso de los RAPD-PCR ha servido para conocer que en poblaciones de este insecto, aisladas geográficamente, no hay variaciones significativas entre los individuos, lo cual indica que se trata de una misma especie. Además, se ha probado que los patrones de amplificación son constantes en los estadios de desarrollo del insecto (Gawel, 1993).

Al analizar *Dactylopius sp.* se observaron, con todos los iniciadores usados, patrones de bandas típicas que permitieron registrar la presencia y frecuencia de bandas polimórficas en los individuos para su análisis estadístico y construcción de dendrogramas.

En los dendrogramas correspondientes a las poblaciones de ninfas de *D. coccus* y *Dactylopius sp.*, se observaron tendencias a agrupar a los individuos según la localidad de muestreo; en el caso de los machos encontramos las menores distancias genéticas de las tres poblaciones analizadas.

En contraste, en las ninfas I de *D. coccus* se observaron patrones anormalmente polimórficos que sugieren que *D. coccus*

puede tener alta frecuencia de rearrreglos en su DNA. Este tipo de dinámica del DNA ocurre en algunos nemátodos como *Parascaris univalens* que presenta alta variabilidad en los cromosomas.

En esta especie se han descrito rearrreglos cromosómicos que incluyen reducción de cromatina, fragmentación heterocromática y condensación diferencial, los cuales ocurren durante la meiosis en las gónadas de machos y hembras (Teschke, 1991). La posibilidad de que exista alta frecuencia de rearrreglos cromosómicos en *D. coccus* se apoya en datos citológicos de los cóccidos.

En estudios realizados en cuatro especies de cochinilla del nopal—incluyendo *D. coccus* (Aquino, 1990)—, se determinó que durante la meiosis existen rearrreglos cromosómicos tipo Comstockiella, que consisten en la destrucción e inactivación cromosómica de *Dactylopius* en la preprofase durante la meiosis, como ocurre en *P. univalens*.

Las diferencias en el comportamiento del DNA entre los machos de *D. coccus*, sugieren que durante la diferenciación y determinación sexual ocurren fenómenos genéticos desconocidos que deben ser estudiados para diseñar programas de mejoramiento genético.

El comportamiento del DNA de las hembras de *D. coccus* contrasta con lo que ocurre en *Dactylopius sp.*, sugiriendo que los mecanismos de rearrreglos y eliminación del material cromosómico son particulares de las hembras de la cochinilla fina. ☉

BIBLIOGRAFÍA

- Andresen, K., Ibrahim, M. E., Theander, T. G. y Kharazami, A. (1996). Random amplified polymorphic DNA for the differentiation of *Leshmania donovani* isolates from Sudan. *Trans Roy Trop Med and Hyg*, 90, 204-205.
- Antolin, M. F., Bosio, C. F., Cotton, J., Sweeney, W., Strabjand, M. R. y Black, W. C. 4th. (1996). Intensive linkage mapping in a wasp (*Bracon hebetor*) and a mosquito (*Aedes aegypti*) with single-strand conformation polymorphism analysis of random amplified polymorphic DNA markers. *Genetics*, 143, 1727-1738.
- Aquino, P. G. (1991). *Estudio cromosómico en cuatro tipos de cochinilla (Dactylopius spp.) (Homóptera, Dactylopiidae) del nopal (Opuntia spp.)*. Tesis de maestría, Colegio de Posgraduados, Universidad Autónoma de Chapingo.
- Black, W. (1993a). Use of genetic polymorphisms detected by the Random-Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR) for differentiation and identification of *Aedes Aegypti* subspecies and populations. *Am. J. Trop. Med Hyg*, 47, 893-901.
- Black, W. (1993b). PCR with arbitrary primers: approach with care. *Insect Mol. Biol*, 2, 16.
- Black, W., Duteau, N. M., Puterka, G. J., Nechols, J. R. y Pettorini, 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 (1983). Ser. Zool. 1, 217-223.
- 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.
- Cruz, D. (1990). *Determinación de algunos aspectos biológicos de la grana o cochinilla del nopal Dactylopius coccus Costa (Coccidae: Dactylopiidae) en Chapingo, México*. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Chapingo.
- Di Stilio, V. S., Kesseli, R. V. y Mulcahy, D. L. (1998). A pseudoautosomal random amplified polymorphic DNA marker for the sex chromosomes of *Silene dioica*. *Genetics*, 149, 2057-2062.
- Gawel, N. J. y Bartlett, C. (1993). Characterization of differences between white flies using RAPD-PCR. *Insect Mol. Biol.*, 2, 33-38.
- Hunt, G. J. y Page, R. Jr. (1996). Linkage map of the honey bee, *Apis mellifera*, based on RAPD markers. *Genetics*, 139, 1371-1382.

- Kambhampati, S., Black, C. y Karamjit, S. R. (1992). Random Amplified DNA of Mosquito Species and Populations (Diptera: Culicidae): Techniques, Statistical, Analysis and Applications. *J. Med. Entomol.*, 29, 939-945.
- Marjorie, A. H. (1994). *Insect Molecular Genetics. An introduction to principles and applications*. New York: Academic Press.
- Montiel, R. L. (1995). *Morfología de Dactylopius coccus Costa (Homóptera: Dactylopiidae), y su biología y producción en dos Fotoperíodos*. Tesis de maestría, Colegio de Posgraduados, Universidad Autónoma de Chapingo.
- Ivinson, J. A. y Graham, R. T. (1992). PCR in genetics diagnosis. En McPherson, M. J., Quirke, P. y Taylor, G. R. (Eds). *A practical approach. The practical approach series* (pp. 215-239). New York: Oxford University Press.
- Rasmussen, S. W. (1977). The transformation of the synaptonemal complex into the elimination chromatin in *Bombyx mori* oocytes. *Chromosoma*, 60, 205-221.
- Sambrook, E. y Fritsch, T. M. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. (Second Edition). (Appendix 3). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santibáñez, M. T. (1988). El cultivo de la grana cochinilla del nopal (*Dactylopius coccus* Costa) del nopal (*Opuntia* spp.) en Oaxaca. En *Memorias de la Tercera Reunión Nacional y Primera Internacional sobre el Conocimiento y Aprovechamiento del Nopal*. México: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro de Saltillo, Coahuila.
- Teschke, C., Solleder, G. y Moritz, B. C. (1991). The highly variable pentameric repeats of the AT-rich germline limited DNA in *Parascaris univalens* are telomeric repeats of somatic chromosomes. *Nucl. Acids. Res.*, 19, 2677-2683.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Rafalski, J. A. y Tingey, S. V. (1991). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic 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.
- Zimmermann, H. G. (1998). South Africa's Contribution To The Property of the Cochineal Industry Plant Protection Research Institute. En *Memorias del Primer Congreso Internacional de Grana Cochinilla y Colorantes Naturales*. México: FONART.