

## Código de barras de ADN en *Dactylopius coccus* Costa “cochinilla del carmín” (Hemiptera: Dactylopiidae): Estudio preliminar

Yuriko Ortega<sup>1,2\*</sup>, Norberta Martínez<sup>2</sup>, Juan Agapito<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Genómica y Biología Molecular, Dirección de Investigación y Desarrollo, Instituto Peruano de Energía Nuclear, Av. Canadá 1470, Lima, Perú

<sup>2</sup> Laboratorio de Entomología. Departamento de Zoología. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Av. Venezuela S/N, Lima, Perú

### Resumen

*Dactylopius coccus* Costa “cochinilla del carmín”, parasita los cladodios de las cactáceas del género *Opuntia* y *Nopalea*. Esta especie se cultiva para la producción de ácido carmínico, colorante natural con múltiples aplicaciones en la industria alimentaria, farmacológica y cosmética. Se han descrito varias especies de cochinillas, las cuales se identifican mediante el uso de claves taxonómicas; sin embargo, esta metodología presenta limitaciones y controversias por la similitud de caracteres entre las especies y la dificultad para identificar estadios inmaduros. El propósito de este trabajo fue identificar a la especie *Dactylopius coccus* mediante el código de barras de ADN, utilizando el marcador citocromo oxidasa subunidad 1 (COI). Los resultados preliminares obtenidos indican que el marcador COI puede ser utilizado para la identificación molecular de cochinillas con un alto grado de eficiencia.

**Palabras claves:** *Dactylopius coccus*, cochinilla, citocromo oxidasa I (COI), amplicones

### DNA barcode in *Dactylopius coccus* Costa “carmine cochineal” (Hemiptera: Dactylopiidae): Preliminary study

#### Abstract

*Dactylopius coccus* Costa "carmine cochineal" parasitic cactus cladodes of *Opuntia* and *Nopalea*. This species is grown for the production of carminic acid, natural dye with multiple applications in the food, drug and cosmetic industries. So far we have described several species of scale insects, which are identified using taxonomic keys. However, this approach has limitations and controversies by the similarity of characters between the species and the difficulty in identifying immature stages. The purpose of this study was to identify the species *Dactylopius coccus* by DNA barcode using the marker cytochrome oxidase subunit 1 (COI). Preliminary results indicate that the COI marker can be used for molecular identification of mealybugs with a high degree of efficiency.

**Keywords:** *Dactylopius coccus*, cochineal, cytochrome oxidase I (COI), amplicons

## 1. Introducción

La cochinilla del carmín (*Dactylopius coccus* Costa) pertenece al Orden Hemiptera, familia Dactylopiidae, que contiene diez especies nativas de Norte y Sudamérica [1, 2]. Estas especies de cochinillas son importantes como fuente de colorante natural [3] y como agentes de control biológico del nopal, considerado como una maleza invasora en Australia y Sudáfrica [4]. *Dactylopius coccus* Costa es una especie de gran importancia socioeconómica, cuyos adultos hembras almacenan ácido carmínico, un colorante de alta calidad utilizado en muchos sectores industriales [5].

El Perú es el principal productor de cochinilla

en el mundo, satisfaciendo el 85% de la demanda mundial, seguido por las Islas Canarias con el 10% y el 5% restante corresponde a Chile, Bolivia y Ecuador. Hasta abril de este año, la exportación de ácido carmínico en nuestro país alcanzó los US\$ 7.7 millones con un incremento del 9 % sobre el promedio obtenido el año 2013, siendo Alemania y Brasil los principales destinos [6].

Como resultado de la importancia comercial de este insecto, la mayoría de las investigaciones se centran en la búsqueda de métodos que permitan una producción y explotación del colorante a gran escala. Sin

\* Correspondencia autor: meyo1101@gmail.com

embargo, es necesario realizar estudios sobre la biología de estos organismos, que comprende varios aspectos, entre ellos, la taxonomía. La identificación taxonómica de los dactilópodos se basa en las características morfológicas de las hembras adultas, principalmente en el número, la distribución y tipos de poros y setas [4]. Estos caracteres taxonómicos pueden presentar cierta complejidad, limitando la exactitud del análisis morfológico.

Actualmente, las técnicas moleculares nos permiten corroborar datos morfológicos con la información obtenida de los marcadores moleculares. El código de barras de ADN o *DNA barcode* brinda un conjunto de herramientas indispensables para la identificación de diversas especies, proporcionando información valiosa que nos permita discriminar estos organismos [7]. De esta manera, es importante comenzar a asociar secuencias de ADN a las descripciones morfológicas con el fin de tener un conjunto de datos más completo e informativo de este grupo de animales.

Hasta la actualidad, son pocos los estudios moleculares disponibles en la literatura sobre *Dactylopius coccus*. En México se utilizaron marcadores RAPD para detectar polimorfismos en algunas especies silvestres de dactilópodos, incluyendo a *D. coccus* [8, 9]. Por este motivo, el objetivo de este trabajo fue identificar a la especie *Dactylopius coccus* mediante el código de barras de ADN, utilizando el marcador citocromo oxidasa subunidad 1 (COI).

## 2. Experimental

### 2.1 Muestra biológica

Las muestras de *Dactylopius coccus* “cochinillas” en diferentes estadios (huevo, ninfa I, ninfa II, hembra y macho adultos) fueron provistas por el Laboratorio de Entomología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Figura 1).

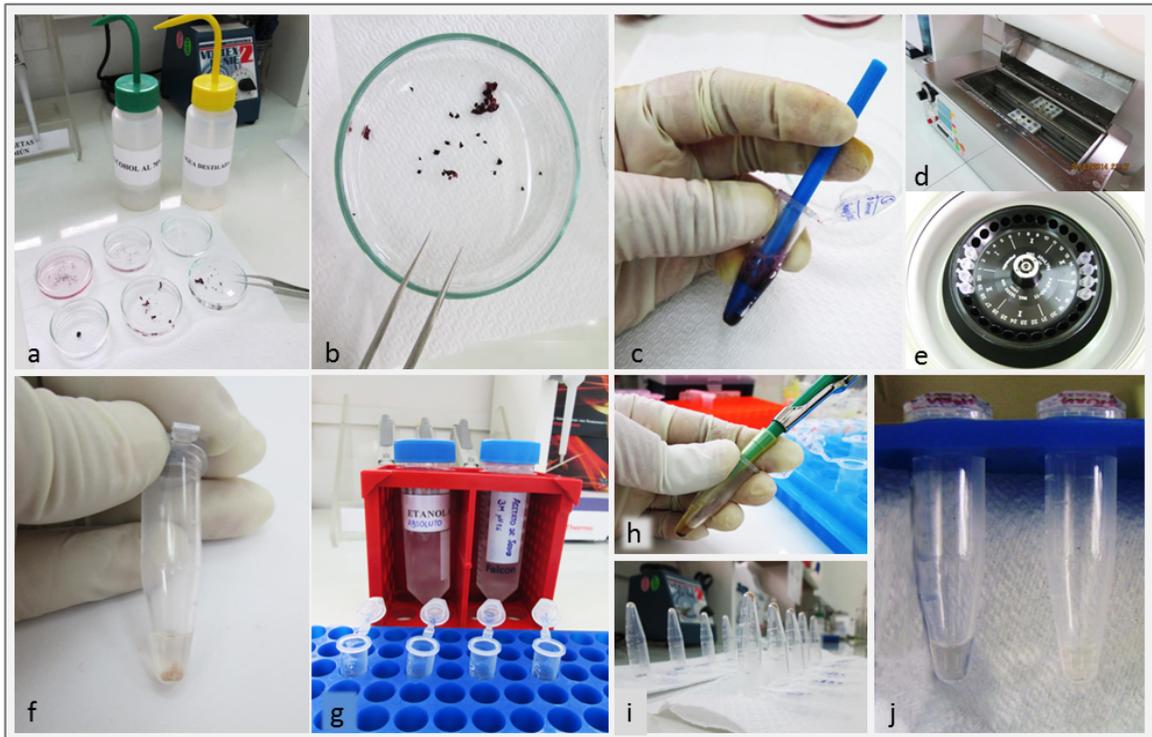


**Figura 1:** a. Huevos de *D. coccus* extraídos de hembra grávida; b. Especímenes hembra de *D. coccus*, nótese los estadios de ninfa I, ninfa II y hembra adulta; c. Macho adulto de *D. coccus*, alado y con antenas moniliformes desarrolladas; d. Hembra adulta de *D. coccus*, ovoide y de color bruno-rojizo y de apariencia lustrosa.

## 2.2 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó utilizando el método descrito por [10] que fue estandarizado para las muestras de *Dactylopius coccus* (Figura 2). Cada muestra de cochinilla fue colocada en una placa petri estéril con etanol 70 % para limpiar la cera que recubre su cuerpo y extraer el ácido carmínico (a). Luego, las muestras fueron lavadas 3 veces con agua destilada autoclavada (b). El tejido que se obtuvo fue homogenizado en un tubo de 1.5mL con 500  $\mu$ l de buffer TNES-úrea (10mM de Tris-HCl

pH 8.0, 125mM de NaCl, 10mM de EDTA pH 8.0, 0.5% SDS y úrea 4M) y 10 $\mu$ l de proteinasa K (20mg/mL), incubándolo a 55 °C (c, d). Del lisado centrifugado a 8000 rpm por 5 minutos, se recogió 200  $\mu$ l de sobrenadante que fue precipitado en acetato de sodio 3M y etanol absoluto frío (e, f, g); después, se centrifugó nuevamente a 12000 rpm por 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y se secó el pellet a 37 °C (h, i). Finalmente, se resuspende el pellet en 80 $\mu$ l de buffer TE 10:1 (j).



**Figura 2:** Protocolo de extracción de ADN en muestras de *D. coccus* “cochinilla del carmín”.

## 2.3 PCR

La secuencia parcial del gen citocromo oxidasa subunidad 1 (COI) fue amplificada por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se utilizaron los primers universales desarrollados por [11] en un volumen final de 17  $\mu$ l, con Buffer de PCR 1X (*Applied Biosystems*), 0.5  $\mu$ M de cada cebador (LCO1490: 5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3' y HCO2198: 5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3'), 3.5 mM de MgCl<sub>2</sub> (*Applied Biosystems*), 0.8 mM de dNTPs (Promega), y 0.05 U/ $\mu$ l de GoTaq® *DNA Polymerase* (Promega). Los

ciclos de amplificación tuvieron un protocolo de denaturación inicial a 94 °C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de denaturación a 94 °C por 45 segundos, hibridación (*annealing*) de los primers a 60 °C por 45 segundos y extensión a 72 °C por 1 minuto, y una extensión final durante 11 minutos. Como control negativo de la amplificación, se utilizó 1 $\mu$ l de agua libre de nucleasas (NFW) en lugar del ADN, manteniendo la misma cantidad de los demás componentes.

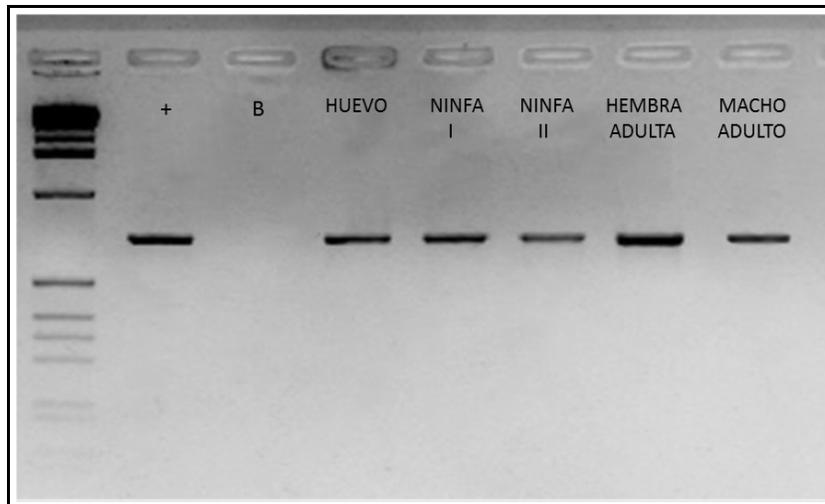
#### 2.4 Electroforesis en geles de agarosa

La calidad del ADN extraído se verificó con una corrida electroforética en agarosa al 1%, utilizando un marcador de 100 pb (Figura 3). Los productos de PCR fueron evidenciados

en geles de agarosa al 1%, teñidos con Bromuro de etidio y visualizados con transiluminador UV. Se utilizó el marcador de peso molecular lambda  $\lambda$  digerido con *PstI* (Figura 4).



**Figura 3:** Calidad de ADN extraído de *D. coccus* en diferentes estadios (huevo, ninfa I, ninfa II y hembra y macho adultos). Marcador 100 pb.



**Figura 4:** Amplicones del gen citocromo oxidasa I (COI) para *D. coccus* en diferentes estadios + = Control positivo, B = Blanco de PCR. Marcador lambda  $\lambda$  digerido con *PstI*.

### 3. Resultados y discusión

El método descrito por [10] para extraer ADN a partir de muestras de peces fue modificado para el aislamiento de ADN en cochinilla (*Dactylopius coccus*); obteniéndose una elevada concentración de ADN. La cuantificación se realizó por espectrofotometría con NanoDrop™ 1000. La cantidad de ADN obtenida y la pureza (descrita por la relación proteínas/ADN), fueron óptimas para los procesos de PCR. La calidad del ADN extraído fue verificada en geles de agarosa al 1 %, obteniéndose ADN puro y sin evidencias de degradación (Figura 3).

El protocolo de amplificación, así como las cantidades y concentraciones de los componentes del *master mix* de PCR fueron estandarizados anteriormente en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. La amplificación del marcador citocromo oxidasa I (COI) se realizó sin mayores dificultades, evidenciada en bandas únicas por muestra durante la electroforesis, comprobándose una amplificación específica.

Se obtuvieron amplicones de 710 pb aproximadamente, que tiene correlación con el tamaño de los primers descritos por [11] (Figura 4).

### 4. Conclusiones

El método de extracción de ADN descrito por [10] y modificado para la cochinilla permite obtener ADN en buen estado y sin evidencia de degradación.

Se ha determinado que la secuencia parcial del gen citocromo oxidasa I puede ser utilizada para la identificación molecular de cochinillas con un alto grado de eficiencia.

Cabe resaltar que las técnicas moleculares son herramientas que nos permiten corroborar la información base obtenida por la taxonomía clásica. Por lo tanto, esta nueva fuente de datos, en ningún caso, debería sustituir a los tradicionales sino solo complementarlos.

Es importante mencionar que este estudio preliminar corresponde a la primera parte de la investigación sobre código de barras de ADN en *Dactylopius coccus* “cochinilla del

carmín”, constituyendo el primer reporte de esta naturaleza para este insecto benéfico.

### 5. Agradecimientos

Esta investigación fue realizada en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (FCB-UNMSM) en colaboración con el Instituto Peruano de Energía Nuclear (IPEN). Los autores agradecen al Blgo. Roger Quiroz y al Bach. Sergio Barahona, miembros del Laboratorio de Ecología Molecular y Biodiversidad de la FCB-UNMSM, a las Bach. Blanca Cuadros y Gabriela Huamán del Laboratorio de Entomología de la FCB-UNMSM y a la Bach. Gladys Tello del Laboratorio de Genómica y Biología Molecular- IPEN, por la colaboración en el desarrollo de esta investigación.

### 6. Bibliografía

- [1] Rodríguez L, *et al.* Direction of dispersion of cochineal (*Dactylopius coccus* Costa) within Americas. *Antiquity*. 2001; 75:73-77.
- [2] Portillo M, Viguera A. A review on the cochineal species in México, host and natural enemies. *Acta Hort*. 2006; 728:249-256.
- [3] Méndez J., *et al.* Color quality of pigments in cochineals (*Dactylopius coccus* Costa), geographical origin characterization using multivariate statistical analysis. *J. Agric. Food Chem*. 2004; 52(5):1331-1337.
- [4] Pérez-Guerra G. Biosystematics of the family Dactylopiidae (Homoptera: Coccinea) with emphasis on the life cycle of *Dactylopius coccus* Costa. Ph. Dissertation. *Virginia Polytechnic Institute and State University*. Blacksburg, Virginia. 1991. 168 p.
- [5] Aldama-Aguilera C, *et al.* Producción de grana-cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa) en plantas de nopal a la intemperie y en microtúneles. *Agrociencia*. 2005; 39:161-171.
- [6] Cochinilla, Laca, Carmín Perú Exportación Abril 2014. Disponible en: <http://www.agrodataperu.com/2014/05/cochinilla-laca-carmin-peru-exportacion-abril-2014.html>
- [7] Hebert P, *et al.* Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London Biological Sciences Series B*. 2003; 270, 313-21.

- [8] García F, et al. *Dactylopius coccus* y *Dactylopius* sp: Detección de polimorfismos en el DNA usando RAPD-PCR y comparación entre especies. Revista de Investigación de la Universidad Simón Bolívar. 1999; N° 1 (ISSN 1665-692X).
- [9] García F, et al. 2000. Descripción de marcadores genéticos que permitan identificar poblaciones y migraciones del parásito del nopal *Dactylopius* sp. Revista de Investigación de la Universidad Simón Bolívar. 2000; N° 2 (ISSN 1665-692X).
- [10] Asahida T, et al. Tissue preservation and total DNA extraction from fish stored at ambient temperature using buffers containing of urea. Fisheries Science. 1996. 62:727-730.
- [11] Folmer O, et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular Marine Biology and Biotechnology. 1994; 3(5):294-299.
- [12] Marín LR, Cisneros VF. Biología y morfología de la cochinilla del carmín *Dactylopius coccus* Costa (Homoptera: Dactylopiidae). Revista Peruana de Entomología. 1977; 29:70-76.
- [13] Ramírez-Puebla S, et al. Molecular phylogeny of the genus *Dactylopius* (Hemiptera: Dactylopiidae) and identification of the symbiotic bacteria. Environmental Entomology. 2010; 39(4):1178-1183.