

## DETERMINACIÓN MOLECULAR DE LARVAS DE LA PALOMILLA RESINERA (*Synanthedon novaroensis* Hy. Edwards, 1881) (LEPIDOPTERA: SESSIDAE)

Adriana Rosalía Gijón-Hernández<sup>1</sup>✉, Iris Marley Pérez-Gálvez<sup>1</sup>, Eduardo Jiménez-Quiroz<sup>2</sup>,  
Brenda Torres-Huerta<sup>1</sup>, Víctor Javier Arriola-Padilla<sup>1</sup> y Gabriela Islas López<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Centro 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

<sup>2</sup>Laboratorio de Análisis y Referencia en Sanidad Forestal (LARSF) Dirección de Salud Forestal y Conservación de Recursos Genéticos. Dirección General de Gestión Forestal y de Suelos SEMARNAT. Av. Progreso N° 3, Edif. 1, Planta baja. Col. Del Carmen, Coyoacán, Ciudad de México. C.P. 04100.

✉ Autor de correspondencia: [gijon.adriana@inifap.gob.mx](mailto:gijon.adriana@inifap.gob.mx)

**RESUMEN.** Los insectos exóticos constituyen una gran amenaza para las plantaciones forestales y su impacto es variable de acuerdo a la especie y área invadida. La palomilla resinera (*Synanthedon novaroensis*) se considera una plaga cuarentenaria, y se ha detectado en árboles de navidad procedentes de Estados Unidos de América. Las determinaciones taxonómicas de este insecto enfrentan una serie de obstáculos, debido a que se detecta en etapa larval y la separación a nivel de especie se dificulta mediante el uso de técnicas tradicionales, debido a que presentan características similares, por lo que el objetivo de esta investigación fue caracterizar molecularmente a estados larvales de la palomilla resinera. Se realizó la extracción del ADN genómico de cabeza y segmentos abdominales con el método AP. La PCR se llevó a cabo con los primers LCO1490 y HCO2198. Los productos amplificados fueron secuenciados. Las secuencias fueron alineadas y la homología se determinó en el servidor del National Center for Biological Information (NCBI, 2017). La amplificación de los fragmentos de PCR fueron de aproximadamente 740 Pb. Las muestras secuenciadas presentaron una homología de 98% y 99% de identidad con secuencias de *Synanthedon novaroensis* del banco de genes Genbank, lo que confirmó su identidad.

**Palabras clave:** Palomilla resinera, árboles de navidad, PCR

### Molecular determination of pitch moth larvae (*Synanthedon novaroensis* Hy. Edwards, 1881) (Lepidoptera: Sessidae)

**ABSTRACT.** The exotic insects constitute a great threat for the forest plantations and their impact is variable according to the species and invaded area. The resinous pitch moth (*Synanthedon novaroensis*) it is considered a quarantine pest, since it has been detected in christmas trees from the United States of America. The taxonomic determination of this insect faces a series of obstacles, due to the fact that it is detected in the larval stage and the separation at species level is hindered by the use of traditional techniques, due to the fact that they present similar characteristics, so the objective of this the research was to molecularly characterize the larval stages of the pitch moth. Genomic DNA was extracted from the head and abdominal segments with the AP method. The PCR was carried out with the primers LCO1490 and HCO2198. The amplified products were sequenced. The sequences were aligned and the homology was determined on the server of the National Center for Biological Information (NCBI, 2017). The amplification of the PCR fragments was approximately 740 Pb. The sequenced samples showed a 98% homology and 99% identity with *Synanthedon novaroensis* sequences from the Genbank gene bank, confirming their identity.

**Keywords:** Pitch moth, Christmas trees, PCR

## INTRODUCCIÓN

Las plagas constituyen una gran amenaza para las plantaciones forestales alrededor del mundo (Hurley *et al.*, 2012). Los insectos exóticos son especies que no son nativas de una región en particular, el impacto de estas es variable de acuerdo a la especie y área invadida (UCDAVIS,

2015). En México, existen Normas Oficiales Mexicanas (NOM's) mediante las cuales, se regula la calidad fitosanitaria de diferentes productos y subproductos forestales de importación, estas son: NOM-144-SEMARNAT-2012, para embalaje de madera (SEMARNAT, 2012); NOM-013-SEMARNAT-2010, para árboles de navidad (SEMARNAT, 2010); NOM-029-SEMARNAT-2003, para productos utilizados en cestería y espartería (SEMARNAT, 2003) y NOM-016-SEMARNAT-2013, para madera aserrada (SEMARNAT, 2013), en estas, se mencionan listados de especies de insectos exóticos de importancia forestal que se encuentran regulados y vigilados para evitar su ingreso a través de los productos mencionados, dentro de estas se encuentran géneros y especies de mucha relevancia como son, *Hylastes ater* e *Hylurgus ligniperda* (Col: Curculionidae: Scolytinae), *Sirex noctilio* (Hymenoptera: Siricidae), *Coptotermes* sp. (Isoptera: Rhinotermitidae), *Anoplophora* sp. (Coleoptera: Cerambycidae), *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) y *Agilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae), entre otras.

En 2015, México importó cerca de un millón de árboles de navidad naturales que abastecen más de 54.7% del mercado nacional. Los importadores deben cumplir con la Norma Oficial Mexicana NOM-013-SEMARNAT-2010, que regula sanitariamente la importación de *Pinus*, *Abies* y *Pseudotsuga menziesii*, con el objetivo de reducir el riesgo de introducción de plagas cuarentenarias al país (PROFEPA, 2016; COFEMER, 2018). En 2014, personal de inspección de la PROFEPA en la aduana y punto de ingreso de Nogales, Sonora, detectaron por primera vez larvas vivas de “palomilla resinera” del género *Synanthedon* sp. dañando el fuste de un árbol de navidad de la especie *Pseudotsuga menziesii* proveniente de Estados Unidos de América (PROFEPA, 2014). No obstante que el mencionado insecto no se encuentra listado en la NOM-013-SEMARNAT-2010, basado en la definición de plaga de cuarentena o plaga cuarentenaria de mencionada Norma, “Plaga de importancia económica potencial para el área en peligro, aun cuando la plaga no existe o, si existe, no está extendida y se encuentra bajo control oficial.”, el insecto fue considerado plaga de importancia cuarentenaria, por lo que el cargamento fue retornado. En términos generales, es complicada la determinación taxonómica de insectos en estados inmaduros o larvarios debido principalmente a que no existen claves taxonómicas a género o especie, por tal razón el objetivo de esta investigación fue contar con un método basado en técnicas moleculares para la determinación de especie a partir del estado larval.

## MATERIALES Y MÉTODO

**Material biológico.** Los insectos fueron proporcionados por el Laboratorio de Análisis y Referencia de Sanidad Forestal (LARSF) de la Dirección General de Gestión Forestal y de Suelos de la (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT)).

**Extracción de ADN método AP.** Los ejemplares conservados en alcohol al 70%, fueron lavados tres veces con agua destilada estéril. La cabeza y los tres últimos segmentos abdominales se utilizaron para la extracción del ADN. Las muestras fueron colocadas en tubos eppendorf y tratadas con nitrógeno líquido para ser maceradas, se adicionó buffer de lisis y se dejó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Finalizado en periodo de incubación, se centrifugó 1min a 12,000 rpm, se recuperó el sobrenadante y se le adicionaron 500µL de fenol:cloroformo, se colocó en el vortex durante un minuto y se centrifugó a 12,000 rpm durante 3 min. Se transfirió el sobrenadante a otro tubo y se agregaron 500µL más de fenol:cloroformo. El sobrenadante se trasladó a un tubo y se adicionaron 500µL isopropanol y 50µL de acetato de amonio, se mezclaron ligeramente y se centrifugo durante 5min a 12 000 rpm, se decantó el sobrenadante. La pastilla resultante se lavó con 50µL de etanol al 70%. El precipitado se secó a temperatura ambiente y se suspendió en 50µL de agua libre de nucleasas. El producto se conservó a una temperatura de  $\pm 4^{\circ}\text{C}$  para ser utilizado para la amplificación de ADN ribosomal.

La calidad del ADN se verificó mediante la electroforesis en gel de agarosa al 1% (Sambrok, 2001).

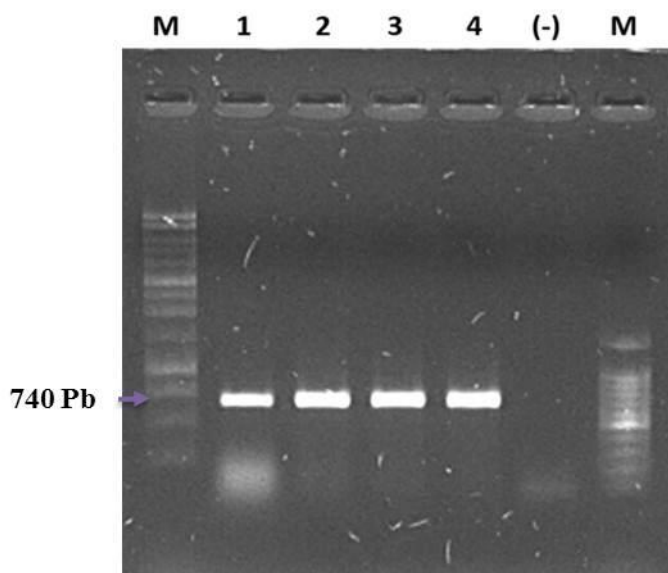
**Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).** Se utilizó el par de primers LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') y HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3') (Folmer *et al.*, 1994) para la amplificación de regiones del ADN ribosomal, los cuales reconocen al gen Citocromo Oxidasa, subunidad I (COI). Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador T100 marca Biorad, usando el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, seguidos de 4 ciclos de 94°C por 30 seg, 45°C por 1 min, 72°C 40 seg, posteriormente 34 ciclos de 94°C 1 min, 50°C 1 min 30 seg, 72°C por 1 min y una extensión final de 72°C por 1 min (Lopes *et al.*, 2015 modificado). El producto de PCR se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los productos de PCR se visualizaron en un fotodocumentador marca Biorad®.

**Purificación de producto de PCR.** Se utilizó el kit WIZARD® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corporation, 1999) para purificar las bandas de interés y los productos de PCR purificados fueron enviados a Macrogen Inc. en Seoul Korea para su secuenciación.

**Edición.** Las secuencias se editaron con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor versión 7.2.5. Las secuencias consenso se sometieron a un análisis de similitud con la herramienta bioinformática BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) en GenBank del National Center of Biotechnology Information (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), se compararon con las disponibles en la base de datos de nucleótidos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los estudios moleculares del estado larval de *Synanthedon novoensis*, indicaron que la banda del producto de PCR fue de un peso aproximado de 740 pb del gen mitocondrial citocromo C oxidasa subunidad I (Figura 1).



**Figura 1.** PCR de *Synanthedon novoensis*. M: Marcador molecular 1kb; carril 1 y 2 cabeza; carril 3 y 4 segmentos abdominales, carril 5 control negativo).

Lopes *et al.* (2015) y Folmer *et al.* (1994) reportó una banda de amplificación de aproximadamente 700 a 710 pb para crisomélidos y artrópodos respectivamente. Gijón *et al.* (2016), reportaron para *D. valens* e *I. cribricollis* un peso aproximado de 750 Pb.

Las muestras secuenciadas presentaron una homología de 98% de identidad con secuencias de *Synanthedon novoaricensis* del banco de genes Genbank, lo que confirmo su identidad.

En este caso, los estudios basados en caracteres moleculares han sido de utilidad como apoyo en la determinación de especie y en particular en especímenes en estado larval, frecuentemente encontradas en árboles de navidad, pero más difíciles de identificar taxonómicamente, a una determinada especie. El género *Synanthedon* tiene varias especies y estos resultados son importantes, ya que se puede prevenir la introducción de especies cuarentenarias a México y por ende evitar su distribución a las zonas forestales.

Por otra parte, esta metodología tiene la ventaja que el ejemplar no se destruye en su totalidad, la cabeza o partes del abdomen funcionan perfectamente bien para realizar los estudios, lo cual es muy importante, ya que cuando se tratan de insectos exóticos en muchas ocasiones solo se cuenta con un ejemplar y en otras ocasiones no vienen completos.

## CONCLUSIÓN

Con la utilización de este método, se pretende contar con una herramienta rápida y efectiva para la determinación taxonómica de especies de insectos exóticos forestales de importancia cuarentenaria en estados inmaduros o larvarios como la “palomilla resinera”, que sea complementaria con las técnicas convencionales utilizadas y así apoyar de mejor manera a prevenir la introducción de esta y otras plagas a nuestro país.

## AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) por el financiamiento otorgado para la realización de esta investigación con No. de Proyecto 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

- Comisión Federal de Mejora Regulatoria (COFEMER). 2018. [www.cofemersimir.gob.mx/expediente/19609/mir/41222/anexo/2948744](http://www.cofemersimir.gob.mx/expediente/19609/mir/41222/anexo/2948744) (Consultado el 06-04-18).
- 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.
- Gijón, H. A. R., Rivera, C. M. I., Arriola, P. V. J. y Pérez, G. I. M. 2016. Protocolo rápido para la identificación molecular de descortezadores (Coleóptera: Curculionidae: Scolytinae). *Revista Entomología mexicana*, 3: 800–804.
- Hurley, B. P., Slippers, J., Wingfield M. J., Dyer, C. and Slippers, B. 2012. Perception and knowledge of the *Sirex* woodwasp and other forest pests in South Africa. *Agricultural and Forest Entomology*, 14: 306–316. doi: 10.1111/j.1461-9563.2012.00570.x.

- 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.
- Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA). 2014. Frena PROFEPA entrada de plaga en árboles de navidad en Nogales, Sonora. [http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/v/6535/1/mx/frena\\_profepa\\_entrada\\_de\\_plaga\\_en\\_arboles\\_de\\_navidad\\_en\\_nogales\\_sonora.html](http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/v/6535/1/mx/frena_profepa_entrada_de_plaga_en_arboles_de_navidad_en_nogales_sonora.html) (Consultado el 06 de abril de 2018).
- Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA). 2016. Concluye PROFEPA “Programa de verificación e inspección a la importación de árboles de navidad”. <https://www.gob.mx/profepa/prensa/concluye-profepa-programa-de-verificacion-e-inspeccion-a-la-importacion-de-arboles-de-navidad> (Consultado el 06-04-18).
- Sambrook, J. and Russell, D. W. 2001. Molecular cloning: A laboratory Manual, Band 1. CSHL Press. Chapter 8. *In vitro* amplification of DNA by the Polymerase Chain Reaction. 8.1-8.76.
- Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). 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. Jueves 24 de julio de 2003. México. 1-5 pp.
- Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). 2012. Norma Oficial Mexicana. NOM-144-SEMARNAT-2012. Diario Oficial de la Federación (DOF). Que establece las medidas fitosanitarias reconocidas internacionalmente para el embalaje de madera, que se utiliza en el comercio internacional de bienes y mercancías. 16 de agosto de 2012. México. [http://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5264439&fecha=16/08/2012](http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5264439&fecha=16/08/2012) (Consultado el 05-06-18)
- Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. (SEMARNAT). 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 mensiessi*. Sábado 6 de noviembre de 2010. México. 1-15 pp.
- Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. (SEMARNAT). 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 mensiessi*. Sábado 6 de noviembre de 2010. México. 1-15 pp.
- SEMARNAT (2015). Análisis de Riesgo de Plagas (ARP) para la modificación de la Norma Oficial Mexicana NOM-013-SEMARNAT-2010. Que regula sanitariamente la importación de árboles de navidad naturales de las especies de los géneros *Pinus* y *Abies* y la especie de *Pseudotsuga menziesii*. Subsecretaría de Gestión para la Protección Ambiental, Dirección General de Gestión Forestal y de Suelos de la SEMARNAT, México, 41 p.
- 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 pp.
- SEMARNAT (Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2005. Norma Oficial Mexicana. NOM-144-SEMARNAT-2004. Diario Oficial de la Federación (DOF). Que establece las medidas fitosanitarias reconocidas internacionalmente para el embalaje de

madera, que se utiliza en el comercio internacional de bienes y mercancías. 18 de enero de 2005. México. 15 pp.

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 pp.

SEMARNAT (Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2013. Norma Oficial Mexicana NOM-016-SEMARNAT-2013. Diario Oficial de la Federación (DOF). Que regula sanitariamente la importación de madera aserrada nueva. 8 de febrero de 2013. México, D.F. 7pp.

UCDAVIS. 2015. [www.ipm.ucdavis.edu/EXOTIC/](http://www.ipm.ucdavis.edu/EXOTIC/) (octubre 2015).