



FICHA TÉCNICA **CB-40**

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE INSECTOS ENTOMÓFAGOS

CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA FITOSANITARIA
DEPARTAMENTO DE CONTROL BIOLÓGICO

INTRODUCCIÓN

La identificación de insectos entomófagos resulta esencial para asignar correctamente los nombres taxonómicos de las especies conocidas, así como para el descubrimiento de nuevas especies, ya que esto determina el éxito de un programa de control biológico de plagas.

A través de la correcta identificación de especies se pueden establecer estrategias de atracción y conservación de estos insectos en los agroecosistemas, conocer sus dinámicas poblacionales (Franck *et al.* 2017) y asegurar la producción y calidad de aquellos insectos que se producen masivamente (Martínez-Palomares *et al.* 2019).

Los taxónomos utilizan dos herramientas para la identificación de insectos entomófagos: la identificación morfológica, basada en sus caracteres fenotípicos; y la identificación molecular, que hace uso de la secuenciación de regiones de ADN (marcadores moleculares) que al ser analizadas en bases de datos públicas permiten determinar el porcentaje de similitud con otros organismos.

Esta ficha técnica abordará dos métodos para la extracción de ADN genómico de insectos y los protocolos para la amplificación del principal marcador molecular utilizado en la identificación de insectos entomófagos.

EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

Existen numerosos métodos de extracción de ADN genómico para insectos y otros organismos. En el Laboratorio de Biología Molecular (LBM) del Departamento de Control Biológico realizamos identificación de insectos entomófagos que pertenecen a la Colección de Insectos Entomófagos (CIE), por lo que dichos especímenes deben de conservarse lo mejor

posible para su posterior consulta por la CIE u otros taxónomos.

Por esta razón, se implementan dos métodos de extracción de ADN: el método no destructivo y el método semidestructivo. En ambos métodos se utiliza el kit comercial *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen).

Para la manipulación del insecto se sugiere utilizar pinzas de disección cuyas puntas deberán ser previamente esterilizadas al rojo vivo (permita el enfriamiento de las puntas).

Algunos insectos de tamaño pequeño pueden requerir del uso de un microscopio estereoscópico para su manipulación. Si el insecto se encuentra en solución de etanol (por ejemplo, al 70%), deberá evaporar el etanol colocando el insecto sobre papel filtro durante 30 min.

Método no destructivo

En este método se preservan prácticamente intactas todas las características morfológicas del insecto; sin embargo, es posible observar una ligera decoloración del insecto. Este método se basa en el método propuesto por Suaste-Dzul *et al.* (2019).

1.- Colocar el insecto en un microtubo nuevo de 2 ml.

2.- Añadir 180 μ l de *Buffer ATL* y 20 μ l de *proteinase K*. Mezclar por pipeteo suave con el fin de no dañar al insecto. Asegure que el cuerpo del insecto quede completamente sumergido. Si el insecto es grande y no queda sumergido deberá añadirse más *Buffer ATL* y *proteinase K* manteniendo la relación volumétrica constante.

3.- Coloque el microtubo en una incubadora a 56 °C durante 36 h, agitando suavemente cada 12 h. No se recomienda el uso de calentadores tipo baño María o Thermomixer, pues la formación de condensados en la tapa del microtubo puede afectar la eficiencia de extracción de ADN genómico. En el LBM también hemos obtenido buenos resultados al reducir el tiempo de incubación a 12 h.

4.- Retire el microtubo de la incubadora, y remueva la mezcla de *Buffer ATL* y *proteinase K* (~200 µl) a un microtubo de 1.5 ml con una micropipeta, evitando dañar al insecto.

5.- Al microtubo de 2 ml que contiene al insecto añadir 200 µl de alcohol al 70% por 5 a 10 min. Retirar el alcohol al 70% y añadir 200 µl de etanol absoluto. Esto se realiza con el fin de lavar los restos de *Buffer ATL* y *proteinase K*. El insecto puede mantenerse en alcohol absoluto indefinidamente.

6.- Al microtúbulo de 1.5 mL que contiene la mezcla de *Buffer ATL* y *proteinase K*, añadir 200 µl de *Buffer AL* y mezclar vigorosamente en vórtex durante 10 seg.

7.- Añadir 200 µl de etanol (96-100%) y mezclar vigorosamente en vórtex.

8.- Cargar todo el volumen (~600 µl) en la columna *DNeasy Mini spin* y centrifugar a 8,000 rpm durante 1 min. Descargar el líquido eluido y el tubo colector.

9.- Colocar un nuevo tubo colector a la columna y añadir a la columna 500 µl de *Buffer AW1* y centrifugar a 8,000 rpm por 1 min.

10.- Descargar el líquido eluido y el tubo colector. Colocar un nuevo tubo colector a la columna y añadir a la columna 500 µl de *Buffer AW2*.

11.- Centrifugar a 14,000 rpm por 3 min. Desechar el tubo colector y el líquido eluido.

12.- Colocar la columna en un microtúbulo de 1.5 ml y añadir 80 µl de *Buffer AE*. Incubar de 1 a 5 min a temperatura ambiente.

13.- Centrifugar a 14,000 rpm durante 1 min. Desechar la columna. El microtubo contiene el ADN genómico del insecto.

Para el método no destructivo no se recomienda utilizar más de 100 µl de *Buffer AE* pues el escaso ADN que se obtiene podría diluirse. Tampoco recomendamos utilizar menos de 80 µl de *Buffer AE* pues la concentración de inhibidores del PCR podría inhibir la reacción de la ADN polimerasa.

Método semidestructivo

En este método se utilizan una o dos patas del insecto, preferentemente de un mismo lado, para poder preservar intacta una de las mitades del insecto. Para el corte de patas se utiliza una pinza de disección esterilizada al rojo vivo y dependiendo del tamaño del insecto puede ser necesario la observación bajo el microscopio estereoscópico.

1.- Colocar una o dos patas del insecto en un microtubo nuevo de 2 ml.

2.- Añadir un balín de Tungsteno de 3 mm (Qiagen) con ayuda de una pinza de disección previamente esterilizada al rojo vivo.

3.- Colocar la muestra en un homogenizador durante 3 min a 20 Hz. Las patas deberán mostrarse desintegradas, las paredes del microtubo adquieren una apariencia opaca.

4.- Añadir 180 µl de *Buffer ATL* y 20 µl de *proteinase K*. Mezclar vigorosamente en vortex, y recolectar todo el líquido mediante

centrifugación breve (*spin*) en la centrífuga (1,000 rpm por 1 seg).

5.- Agitar con movimientos suaves el microtubo para disgregar el botón formado durante el *spin*, evitando que el líquido quede sobre la pared del microtúbulo (el balín de Tungsteno facilita esta tarea).

6.- Incubar a 56 °C toda la noche. No se recomienda uso de calentadores tipo baño María o tipo Thermomixer, para evitar la formación de condensados.

7.- Retirar el microtubo de la incubadora y añadir 200 µl de *Buffer AL* y mezclar vigorosamente en vortex durante 10 seg.

8.- Añadir 200 µl de etanol (96-100%) y mezclar nuevamente en vórtex.

9.- Cargar todo el volumen (~600 µl) en la columna *DNeasy Mini spin* y centrifugar a 8,000 rpm durante 1 min. Descargar el líquido eluído y el tubo colector.

10.- Colocar un nuevo tubo colector a la columna y añadir a la columna 500 µl de *Buffer AW1* y centrifugar a 8,000 rpm por 1 min.

11.- Descargar el líquido eluído y el tubo colector. Colocar un nuevo tubo colector a la columna y añadir a la columna 500 µl de *Buffer AW2*.

12.- Centrifugar a 14,000 rpm por 3 min. Desechar el tubo colector y el líquido eluído.

13.- Colocar la columna en un microtubo de 1.5 ml y añadir 80 µl de *Buffer AE*. Incubar de 1 a 5 min a temperatura ambiente.

14.- Centrifugar a 14,000 rpm durante 1 min. Desechar la columna. El microtubo contiene el

ADN genómico del insecto.

AMPLIFICACIÓN DEL MARCADOR MOLECULAR.

La identificación molecular de insectos se realiza generalmente mediante la secuenciación del marcador molecular citocromo oxidasa I (COI).

Existen numerosas regiones de este marcador que pueden ser utilizadas para identificar molecularmente insectos; sin embargo, la región más ampliamente utilizada es aquella que se obtiene mediante la amplificación por PCR utilizando el coctel de cebadores (o *primers*, en inglés) conocidos como C_LepFolF y C_LepFolR.

Este coctel de cebadores consiste en dos cebadores *forward* (LCO1490 y LepF1) y dos cebadores *reverse* (HCO2198 y LepR1) (**Tabla 1**). Nótese que los dos cebadores *forward* son similares, al igual que los dos cebadores *reverse*, estos son complementarios a una misma región del gen COI.

También es posible utilizar los cebadores de forma "individual", es decir LCO1490 con HCO2198 (Folmer et al., 1994) y LepF1 con LepR1 (Hebert et al., 2003a,b), como fueron diseñados originalmente. Sin embargo, al usarlos como coctel incrementa la posibilidad de tener una amplificación exitosa, y evitamos repetir la amplificación con el otro juego de cebadores.

Al preparar las reacciones de PCR, es recomendable utilizar controles positivos y negativos de amplificación. En el control positivo se utilizará ADN genómico que previamente se ha verificado que muestra amplificación del marcador que se desea utilizar. Para el control negativo se sustituye el volumen del templado por agua desionizada.

Tabla 1. Secuencias del coctel de cebadores utilizados para la amplificación de COI.

Coctel	Cebadores y secuencias (5' → 3')
C_LepFolF	LCO1490 GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG LepF1 ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG
C_LepFolR	HCO2198 TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA LepR1 TAAACTTCTGGATGTCCAAAAATCA

En el LBM utilizamos la enzima *ADN polimerasa Platinum™ Taq Green Hot Start DNA Polymerase* (ThermoFisher Scientific), para la amplificación del marcador COI, siguiendo las indicaciones del fabricante. Las condiciones del PCR se describen en la **Tabla 2**.

La amplificación se verificará por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1%. La amplificación del marcador COI con los marcadores C_LepFolF y C_LepFolR genera un fragmento de aproximadamente 658 pb.

En caso de que la amplificación resulte positiva se procederá a la purificación del producto de PCR utilizando un kit comercial, ya sea a través de su purificación directa o por medio de corte de una banda en gel de agarosa.

Alternativas a los cebadores C_LepFolF y C_LepFolR.

Los cebadores C_LepFolF y C_LepFolR suelen ser considerados como los cebadores universales para la amplificación del marcador COI. Sin embargo, algunas veces no es posible la amplificación de ese marcador con dicho coctel de cebadores para todas las especies de insectos. Una razón que explica lo anterior es

la gran diversidad genética de los insectos, resultando en una baja complementariedad entre los cebadores y la secuencia blanco.

Tabla 2. Condiciones de PCR para la amplificación del marcador COI con el coctel de cebadores C_LepFolF y C_LepFolR.

Paso	Temp.	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94 °C	2 min	-
Desnaturalización	94 °C	30 seg	
Alineación	45 °C	40 seg	5
Extensión	72 °C	1 min	
Desnaturalización	94 °C	30 seg	
Alineación	51 °C	40 seg	35
Extensión	72 °C	1 min	
Extensión final	72 °C	6 min	-

En la identificación de insectos pertenecientes a colecciones, es común que el ADN genómico extraído pueda estar en muy baja concentración o muy fragmentado debido al tipo de extracción de ADN y al tiempo y las condiciones de almacenamiento de la muestra, por lo que resulta difícil la amplificación del marcador COI con los cebadores universales (Hernández-Triana *et al.* 2014).

Una posible solución para dichas situaciones consiste en la amplificación de fragmentos empalmados cortos del marcador COI (**Figura 1**).

Estos fragmentos se obtienen mediante el uso de los cebadores MLepF1 (Hajibabaei y McKenna, 2006) y MLepR2 (Hebert *et al.* 2013) (**Tabla 3**) en conjunto con los cocteles *forward* y *reverse*, respectivamente.

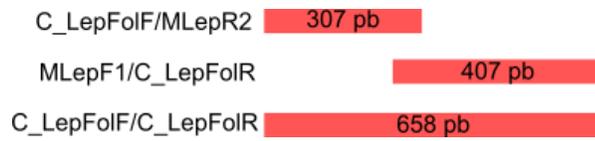


Figura 1. Posición relativa de fragmentos empalmados cortos respecto a la región COI con cebadores C_LepFolF y C_LepFolR. Modificado de Hernández-Triana *et al.* (2014).

Tabla 3. Secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación de fragmentos empalmados cortos.

Cebador	Secuencia 5' ->3'
MLepF1	GCTTTCCCACGAATAAATAATA
MLepR2	GTTCAWCCWGTWCCWGCYCCAT TTTC

Para la amplificación de cualquiera de los dos fragmentos cortos, se recomienda el uso de las condiciones de PCR de la **Tabla 4**.

Para algunos insectos, por ejemplo, los pertenecientes a la familia Chrysopidae, la región amplificada con los cebadores universales suele ser poco informativa, no logrando distinguir entre especies distintas. Para esta familia de insectos se sugiere utilizar otra región de COI, la cual puede ser amplificada utilizando los cebadores C1-J-2183 y TL2-N-3014, comúnmente conocidos como Jerry y Pat, respectivamente (Simon *et al.* 1994) (**Figura 2**).

El uso de los cebadores anteriores permite la amplificación de un fragmento de 831 pb. Las secuencias de dichos cebadores pueden consultarse en la **Tabla 5**.

Tabla 4. Condiciones de PCR para la amplificación de fragmentos empalmados cortos. Las condiciones son útiles para la amplificación de cualquiera de los fragmentos.

Paso	Temp.	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94 °C	2 min	-
Desnaturalización	94 °C	30 seg	
Alineación	45 °C	40 seg	5
Extensión	72 °C	45 seg	
Desnaturalización	94 °C	30 seg	
Alineación	51 °C	40 seg	35
Extensión	72 °C	45 seg	
Extensión final	72 °C	5 min	-

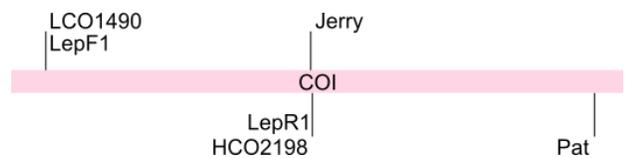


Figura 2. Posición relativa de los juegos de cebadores del coctel universal y Jerry y Pat en el gen de COI.

Tabla 5. Secuencias de los cebadores Jerry y Pat para la amplificación del marcador COI.

Cebador	Secuencia 5' ->3'
Jerry	CAACATTTATTTTGATTTTTGG
Pat	TTCAATGCACTTATTCTGCCATAT TA

Las condiciones para la amplificación del marcador COI con los fragmentos Jerry y Pat se muestran en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Condiciones de PCR para la amplificación del marcador COI con los cebadores Jerry y Pat.

Paso	Temp.	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94 °C	2 min	-
Desnaturalización	94 °C	30 seg	
Alineación	50 °C	30 seg	40
Extensión	72 °C	1 min 30 seg	
Extensión final	72 °C	5 min	-

LITERATURA CITADA

- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz & R. Vrijenhoek. 1994.** DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3: 294-299.
- Franck P., M. Maalouly-Matar & J. Olivares. 2017.** Molecular tools for the detection and the identification of hymenoptera parasitoids in tortricid fruit pests. *International Journal of Molecular Sciences* 18(10): 2031. 10.3390/ijms18102031
- Hajibabaei M. & C. McKenna. 2012.** DNA mini-barcodes. *Methods in Molecular Biology*, 858: 339-353. 10.1007/978-1-61779-591-6_15
- Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L. & J.R. DeWaard. 2003a.** Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270: 313-321. 10.1098/rspb.2002.2218.
- Hebert P.D.N., J.R. de Ward, E.V. Zakharov, S.W.J. Prosser, J.E. Sones, J.T.A. McKeown, B. Mantle & J. La Salle. 2013.** A DNA 'Barcode Blitz': Rapid Digitization and Sequencing of a Natural History Collection. *PLoS One* 8(7): e68535. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068535>
- Hebert P.D.N., S. Ratnasingham & J.R. de Waard. 2003b.** Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270: S96-S99. 10.1098/rsbl.2003.0025
- Hernández-Triana L.M., S.W. Prosser, M.A. Rodríguez-Perez, L.G. Chaverri, P.D.N. Hebert & T. Ryan Gregory. 2014.** Recovery of DNA barcodes from blackfly museum specimens (Diptera: Simuliidae) using primer sets that target a variety of sequence lengths. *Molecular Ecology Resources* 14: 508-518. 10.1111/1755-0998.12208
- Simon C., F. Frati, A. Beckenbach, B. Crespi, H. Liu & P. Flook. 1994.** Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America* 87(6): 651-701. <https://doi.org/10.1093/aesa/87.6.651>
- Suaste-Dzul A.P., J.M. Rodríguez-Vélez, B. Rodríguez-Vélez, H.C. Arredondo-Bernal, A. Gallou. 2019.** Non-destructive DNA extraction methods for entomophagous insects with emphasis on biological control. *Genome* 62: 287-293. <https://doi.org/10.1139/gen-2018-0045>
- Palomares-Pérez M., C. Moreno-Rodríguez, Y. Contreras-Bermúdez, H.C. Arredondo-Bernal & A. Gallou. 2019.** Molecular characterization of the *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae) from commercial insectaries in Mexico. *Molecular Biology Reports* 46: 6577-6583. 10.1007/s11033-019-05034-9

AGRADECIMIENTOS

Al Dra. Alba Priscilia Suaste Dzul por la por la revisión previa a esta publicación.

Dr. Víctor M. Villalobos Arámbula
SECRETARIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL
Ing. Francisco Javier Calderón Elizalde
**DIRECTOR EN JEFE DEL SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD,
INOCUIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA**
M. en B. Francisco Ramírez y Ramírez
DIRECTOR GENERAL DE SANIDAD VEGETAL
M. en C. Guillermo Santiago Martínez
DIRECTOR DEL CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA FITOSANITARIA
M. en C. Jorge Antonio Sánchez González
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE CONTROL BIOLÓGICO

Elaboró:
Facundo Rafael Muñiz Paredes

DEPARTAMENTO DE CONTROL BIOLÓGICO
KM 1.5 CARRETERA TECOMÁN-ESTACIÓN FFCC. C.P.
28110 TECOMÁN, COLIMA.
TEL. (313) 32 4 07 41 y 45
<https://www.gob.mx/senasica/acciones-y-programas/centro-nacional-de-referencia-de-control-biologico-103097>

Sugerencia de como citar esta ficha:

Muñiz-Paredes F. R. 2023. Identificación molecular de insectos entomófagos. Departamento de Control Biológico, Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, Dirección General de Sanidad Vegetal, SENASICA. Ficha Técnica CB-40, 6p.