

NOTA CIENTÍFICA

**Determinación del umbral de detección de
Pseudococcus viburni (Hemiptera: Pseudococcidae) por
PCR**

**VERA, Diana, Silvina GARRIDO, Elizabet AUN, Jonatan LAGO y
Liliana CICHON**

INTA EEA Alto Valle. Contralmirante Guerrico Ruta Nac. N° 22 Km. 1.190. Provincia de Río Negro; e-mail: dianavera@correo.inta.gov.ar

**Determination of the detection threshold of *Pseudococcus viburni*
(Hemiptera: Pseudococcidae) by PCR**

■ **ABSTRACT.** The obscure mealybug *Pseudococcus viburni* (Signoret) is a quarantine pest present in the Upper Valley of Río Negro and Neuquén, Argentina. The detection of any growth stage of the mealybug in quarantine inspections often results in rejections of fresh fruit in countries where the fruit is exported. In this study the detection threshold of *P. viburni* was determined by PCR technique. The DNA extraction kit, DNAzol™, was used as a fast DNA extraction method. By using the above extraction kit, good DNA quality and concentration was obtained from specimens of *P. viburni* of different developmental stages (including eggs, nymphs and adults) which were preserved in pro-analysis ethanol at -20°C following the manufacturer protocol. One aliquote of this DNA was used as a template in a PCR reaction using specific *P. viburni* primers recorded in the literature and DNA of *P. viburni* from an entomological collection was used as a control. In all stages the amplification generated an expected size band of 650 bp visualized in an agarose 1.5% gel. The detection threshold of *P. viburni* using our method was an egg. These results involve a specific detection technique for *P. viburni* and reliable species identification in a space of 48 h.

KEY WORDS. Mealybug of the fruit. Quarantine inspection. Quarantine pest. Threshold PCR.

■ **RESUMEN.** La cochinilla harinosa de los frutales *Pseudococcus viburni* (Signoret) es una plaga cuarentenaria, presente en el Alto Valle de Río Negro y Neuquén, Argentina. Su detección durante la fiscalización aduanera, aun en los estados inmaduros, provoca rechazos de la fruta fresca argentina con destino a los mercados internacionales. Las técnicas actuales de identificación de pseudocócidos y otros cocoideos implican la realización de preparados microscópicos que requieren varios días. Por esto, la disminución de los tiempos de identificación es importante sobre todo en las tareas de fiscalización. En este trabajo, se determinó el umbral de detección específica de *P. viburni* mediante PCR, como así también, la implementación de un método rápido de extracción de ADN mediante DNAzol™. Insectos de diferentes estados de desarrollo (huevo, ninfas (tres estados ninfales) y adulto), conservados en etanol pro análisis a -20 °C, provenientes de montes

frutales del Alto Valle, Argentina, fueron procesados según el protocolo del fabricante y se logró obtener ADN de buena calidad y concentración. Una alícuota del mismo fue utilizado como templado para una reacción de PCR usando *primers* específicos para *P. viburni*, registrados en bibliografía y como control positivo ADN de *P. viburni* de colección entomológica. Los *primers* utilizados y sus secuencias son A4 (5'-cccgcggccgttctctctt-3') y A5 (5'-atatgttgatagttgtgtgctgc-3'), diseñados por Beuning *et al.* (1999). La amplificación generó una banda de peso molecular esperado de 650 pb. en gel de agarosa al 1.5% en todos los estadios, se determinó como límite de detección el estado de huevo. Esta técnica constituye una detección específica de *P. viburni* en un lapso máximo de 48 h.

PALABRAS CLAVE. Cochinilla harinosa de los frutales. Control aduanero. Plaga cuarentenaria. Umbral de detección PCR.

Algunas especies de la Superfamilia Coccoidea son plagas destructivas de cultivos de gran importancia económica como el arroz, los cítricos, el café y la caña de azúcar; como también de plantas ornamentales (Ben-Dov *et al.*, 2009). La especie *Pseudococcus viburni* (Signoret) es una plaga cuarentenaria presente en los frutales del Alto Valle de Río Negro y Neuquén. Su detección durante la fiscalización aduanera, aun en los estados inmaduros, provoca el rechazo de la fruta fresca con destino a mercados como el de México (Gonzalez & Volosky, 2004; Protocolo de exportación SENASA, 2009). Las técnicas clásicas de identificación se basan en la manufactura de preparados microscópicos y el uso de claves dicotómicas, por otra parte, los métodos moleculares utilizan la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La primera técnica es laboriosa, consume varios días de trabajo y para la mayoría de las especies no permite tipificar estados inmaduros. La segunda requiere de equipamiento específico y personal entrenado, pero es rápida, sensible, confiable y permite identificar huevos y ninfas (Beuning *et al.*, 1999). Adicionalmente, estas mismas han demostrado ser útiles para el análisis de un número elevado de muestras (Nowaczyk *et al.*, 2009). Países como Nueva Zelanda y Australia, entre otros, usan tecnologías basadas en la biología molecular, tanto con fines de fiscalización como de ciencia básica y taxonómicos (Tittiger, 2004; Meier *et al.*, 2006; Lanteri, 2007; Kerr *et al.*, 2007).

Los especímenes fueron recolectados en montes comerciales del Alto Valle de Río Negro, en todos los estados de desarrollo y conservados por triplicado en microtubos que contenían 500 μ l de etanol pro-análisis. Los mismos fueron conservados a -20°C hasta su maceración (Beuning *et al.*, 1999). Se realizó la extracción de ADN desde especímenes en todos los estados larvales con DNAzol™, siguiendo las recomendaciones del comerciante Invitrogen™. La maceración se realizó en un microtubo estéril con Tissue Ruptor (Qiagen™). El ADN fue chequeado en agarosa al 1% TAE y corrido en electroforesis a 80 V durante 40 min. Como marcador de peso molecular se usó Ladder 100 pb. de Biodynamics™ (datos no mostrados).

Para realizar la detección específica mediante PCR se usó 1 ng de ADN extraído de cochinillas, siguiendo el protocolo establecido por Beuning *et al.* (1999) y usando los oligonucleótidos específicos A4 y A5. El programa de amplificación fue el descrito. El control positivo de la amplificación fue ADN de *Pseudococcus viburni* enviado por la Dra. Penny Gullan (Universidad de California, Davis).

Finalmente para la determinación del límite de detección se utilizó 1 μ l de ADN de 1, 5 y 10 individuos en todos los estados de madurez por triplicado. El tamaño esperado del amplificado en gel de agarosa al 1.5 % es de 650 pb.

Como resultado, al realizar la determinación del umbral de detección, fue

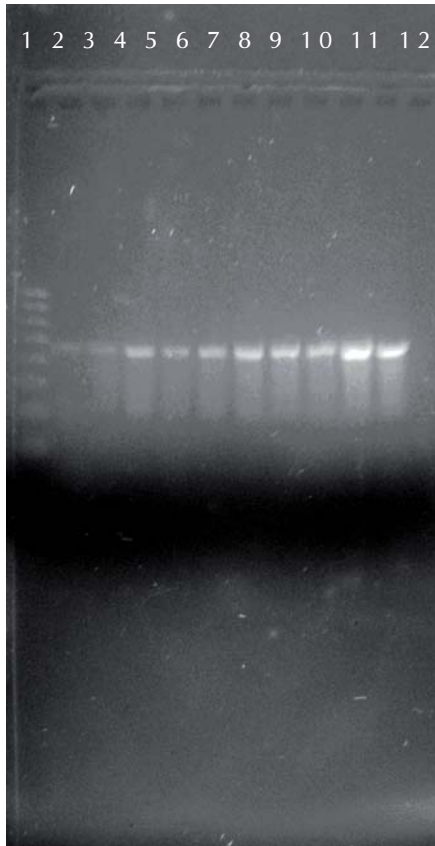


Fig. 1. Límite de detección de *Pseudococcus viburni* mediante PCR. Línea 1: ladder 100 pb; 2: PCR de 1 huevo; 3: PCR de 5 huevos; 4: PCR de 10 huevos; 5: PCR de 1 ninfa; 6: PCR de 5 ninfas; 7: PCR de 10 ninfas; 8: PCR de 1 adulto; 9: PCR de 5 adultos; 10: PCR de 10 adultos; 11: control positivo *P. viburni* colección entomológica; 12: control negativo.

posible obtener amplificado en todos los estados de desarrollo de *P. viburni*, inclusive el estado de huevo (Fig. 1)

La importancia de este resultado radica no solo en la detección temprana de especies con estatus cuarentenario, sino también en la detección de especies exóticas introducidas que podrían amenazar la estabilidad del ecosistema (Cock *et al.*, 2003). En Argentina, se ha informado la presencia de las especies *Pseudococcus erioceri* Williams, *Pseudococcus* sp. "grupo sorghiellus" (Forbes), *P. maritimus* (Ehrhorn) y *Phenacoccus peruvianus* Granara de Willink (Granara de Willink *et al.*, 2011), cuyos

hospederos también incluyen perales, entre otros. La técnica desarrollada en este estudio permitiría prevenir rechazos innecesarios en inspecciones aduaneras, ya que con esta metodología se puede diferenciar a *P. viburni* de otras especies morfológicamente similares. Es muy importante poder contar con técnicas como el PCR que permiten identificar una especie de pseudocócido en los estados inmaduros.

El presente trabajo muestra que es posible determinar específicamente *P. viburni* a través de un único huevo, como umbral mínimo de detección en un lapso de 48 horas. Las técnicas convencionales de identificación, utilizando claves dicotómicas, no permiten obtener esta información en ese tiempo y, además, la mayoría de las mismas no contemplan los estados inmaduros, lo cual retrasa las tareas de inspección aduanera.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Penny Gullan, por la amabilidad de enviarnos especímenes de *P. viburni* fijados en etanol. A los revisores pares, por sus comentarios y correcciones.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- BEN-DOV, Y., D. R. MILLER & G. A. P. GIBSON. 2009. ScaleNet. A Data Base of the Scale Insects of the World. <http://www.sel.barc.usda.gov/scalenet/scalenet.htm>
- BEUNING, L. L., P. MURPHY, E. WU, T. A. BACHELOR & B. A. M. MORRIS. 1999. Molecular-based approach to the differentiation of mealybug (Hemiptera: Pseudococcidae) species. *J. Econ. Entomol.* 92 (2): 463-472.
- COCK, M. J. W., M. KENIS & R. WITENBURG. 2003. Biosecurity and forests: an introduction with particular emphasis on forest pests. FAO Forest Health and Biosecurity Working Paper FBS/2E. doi:10.11111/j.1471.8286.2006.01670.x
- GONZALEZ, R. H. & C. VOLOSKY. 2004. Chanchitos blancos y polillas de la fruta: problemas cuarentenarios en fruticultura de exportación. *Rev. Frutic.* 25 (2): 41-62.
- GRANARA DE WILLINK, M. C., L. CICHON, S. GARRIDO, E. AUN & J. LAGO. 2011. Pseudocócidos asociados a los frutales de pepita del Alto Valle de Río Negro. En prensa. Actas y Trab. del Congreso ASAHO 2011, Buenos Aires.
- KERR, K. C. R., M. Y. STOECKLE, C. J. DOVE, L. A. WEIGHT, C. M. FRANCIS & P. D. N. HEBERT. 2007. Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. *Mol. Ecol. Notes.* 7 (4): 535-543.

7. LANTERI, A. 2007. Código de barras del ADN y su posible aplicación en el campo de la Entomología. *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 66 (3-4): 15-25.
8. MEIER, R., K. SHIYANG G, G. VAIDYA & P. K. LING. 2006. DNA Barcoding and Taxonomy in Diptera: A tale of high intraspecific variability and low identification success. *Syst. Biol.* 55 (5): 715-728.
9. NOWACZYK K., A. OBREPALSKA-STEPLOWSKA, M. GAWLAK, J.E. THRONE, P. OLEJARSKI P & J. NAWROT. 2009. Molecular techniques for detection of *Tribolium confusum* infestations in stored products. *J. Econ. Entomol.* 102 (4): 1399-1728.
10. SENASA. 2009. Plan de trabajo para la exportación de manzana y pera de Argentina a México bajo un enfoque de sistemas. Protocolos de exportación. <http://www.senasa.gov.ar/Archivos/File/File1978-archivo2.pdf>
11. TITTIGER, C. 2004. Functional genomics and insect chemical ecology. *J. Chem. Ecol.* 30: 2335-2358.