

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DEL SALIVAZO *Prosapia simulans* (HEMIPTERA: CERCOPIDAE) PLAGA DE LA CAÑA DE AZÚCAR EN TUXTEPEC, OAXACA, MÉXICO

Amilcar Morales-Pérez¹, Obdulía Lourdes Segura-León², Ana Karin Navarro-Martínez³, Oscar Nuñez-Gaona⁴, Rogelio Enrique Palacios-Torres⁵. ¹Division de Estudios de Postgrado, Universidad del Papaloapan, campus Tuxtepec, Circuito Central #200, colonia Parque Industrial, Tuxtepec Oax., C.P. 68301. ² Programa de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados Carretera México-Texcoco Km. 36.5, Montecillo, Texcoco, Estado de México, C.P. 56230. ^{2 y 3} Instituto de Biotecnología Universidad del Papaloapan, campus Tuxtepec, Circuito Central #200, colonia Parque Industrial, Tuxtepec Oax., C.P. 68301. México. ⁵Ingeniería Agrícola Tropical, Universidad del Papaloapan, campus Loma Bonita Av. Ferrocarril s/n, Cd. Universitaria, Loma Bonita, Oax., México C.P. 68400. elaguila_1010@hotmail.com¹, osegura123@gmail.com², anavarro@unpa.edu.mx³, oscarngz@hotmail.com⁴, rpalacios@unpa.edu.mx⁵

RESUMEN: El salivazo genera pérdidas económicas importantes sobre el cultivo de caña en Tuxtepec, Oaxaca. Para el control biológico es necesario identificar la especie que afecta al cultivo. Por lo tanto, en el presente trabajo se realizó la caracterización morfológica y molecular de esta plaga. La identificación morfológica se realizó con claves de la familia Cercopidae, además se realizó la amplificación del gen Citocromo I de la mitocondria de insectos colectados en la región. La morfología de estos los ubica en el género *Prosapia*. Los resultados del análisis molecular señalan que no hay polimorfismo entre los individuos analizados. El análisis comparativo en la bases de datos de NCBI, señala que la muestra está relacionada con *Prosapia bicincta*. Sin embargo, la composición de nucleótidos que comparten es de 94%; finalmente se realizó la comparación con otras secuencias de salivazo de México y Colombia generadas en el Colegio de Postgraduados, en este caso las muestra se ubican como un haplotipo de la especie *Prosapia simulans*.

Palabras clave: Edeago, Citocromo I, haplotipo, *Prosapia simulans*.

Morphological and molecular characterization of spittlebug that affects sugarcane cultivation in the Papaloapan region, in Tuxtepec, Oaxaca, Mexico

ABSTRACT: Grass pittlebugs generate significant economic losses on the sugarcane cultivation in Tuxtepec. For biological control of this pest, it is necessary to identify the species that affect the crop. Therefore, in this study the morphological and molecular characterization of grass spittlebug pest that attacks sugar cane cultivation in the Papaloapan area was performed. Morphological identification was performed using Cercopidae family keys, besides amplification Cytochrome I mitochondrial gene from three insects collected in the area was performed. The morphology of *Prosapia* genus matches with the samples. The results of molecular analyzes indicate that no polymorphism among the samples. Then comparative analysis in the NCBI database show that the samples are close related with *Prosapia bicincta*. However, the nucleotide composition between sequences is 94 %; finally the sequence comparison with other Mexican and Colombian grass spittlebugs generated in the Colegio de Postgraduados, in this case the samples are placed as a haplotype *Prosapia simulans* species.

Key words: Edeagus, Cytochrome I, haplotype, *Prosapia simulans*.

Introducción

En la región del Papaloapan el cultivo de caña es una de las principales actividades agrícolas. El Ingenio Adolfo López Mateos, S.A. de C.V., es la principal empresa de transformación de la caña en Tuxtepec, Oaxaca. Este Ingenio se abastece de más de 23,000 hectáreas de sembradíos, cultivado por más de 2,900 productores cañeros con una producción promedio de 74.428 ton/ha en 2013 (SIAP, 2013) la cual se ve afectada por la presencia de plagas siendo el salivazo el de mayor importancia y otros factores. Esta plaga se presenta principalmente en los meses de lluvia, el daño de la plaga se genera cuando los adultos al alimentarse secretan una toxina que causa la muerte del tejido de las hojas provocando

pérdidas económicas a los productores. En México se han reportado dos géneros de la familia de Cercopidae, *Prosapia* y *Aeneolamia* como plagas de la caña de azúcar y se les llama salivazos o mosca pinta (Bautista, 2006). No se tiene una clara diferenciación de las especies de estos géneros, por lo que comúnmente esta confusión provoca deficiencia en su manejo. Por ejemplo, algunos individuos de *Prosapia simulans* tienen bandas notables mientras otros son oscuros o sin bandas lo que puede confundirse con algunas especies del género *Aeneolamia*.

La taxonomía tradicional junto con el análisis molecular de la región del citocromo I o código de barras para la identificación de especies (Hebert *et al.*, 2003), son herramientas que se utilizan particularmente en insectos (Miller, 2007); la combinación de estas muestran una alta capacidad en la separación de especies permitiendo una eficiente identificación del insecto.

El control biológico del salivazo se ha realizado exitosamente con *Metarhizium anisopliae*; sin embargo se ha señalado que diferentes especies de salivazos son atacadas por diferentes cepas (Tincilley *et al.*, 2003; Toriello *et al.*, 2005; Castro *et al.*, 2007 y Montesinos *et al.*, 2011). Para un correcto control de la plaga en la zona de producción de caña en Tuxtepec por medio de hongos entomopatógenos se requiere conocer la especie de salivazo. Por lo que en el presente trabajo se utilizó claves taxonómicas y herramientas moleculares para la identificación de la especie de salivazo en Tuxtepec.

Materiales y Método

La identificación morfológica y molecular del salivazo se realizó con adultos los cuales se colectaron en el cultivo de caña del productor Eduardo Martínez Cruz en San José Chiltepec, Tuxtepec, Oaxaca. Posteriormente se llevaron al laboratorio de la Universidad del Papaloapan campus Tuxtepec donde se depositaron en jaulas desinfectadas de 90x90x90 cm cubiertas con malla mosquitera. Como fuente de alimento se sembraron hijuelos de caña dentro de cada jaula, siguiendo la metodología propuesta por De La Cruz *et al.*, (2005).

La determinación morfológica de cinco ejemplares de salivazo machos se realizó con el apoyo de las claves taxonómicas de Thompson y León (2005) y la de Castro *et al.*, (2007) en la cual se utilizan las características de las genitalias de machos; así mismo se corroboró con el autor.

La caracterización molecular se realizó en el laboratorio de biología molecular del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo mediante la amplificación del gen Citocromo I de la mitocondria, con el procedimiento propuesto por Hebert *et al.* (2002).

Para la extracción de DNA se utilizó el Kit Phire Animal Tissue Direct PCR de Thermo Scientific® y se emplearon los tarsos del metatórax. Para la amplificación se utilizaron los primers LCO1490 (5'GGTCAACAAATCATAAAG ATATTGG 3') y HCO2198 (5'TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA3') que amplifican un fragmento de 658 pb del gen COI (Hebert *et al.*, 2003). Las condiciones de corrida de PCR se realizó en un termociclador Biometra T personal® con la siguiente secuencia: 98 °C por 5 minutos, 98 °C por 5 segundos, 50.9 °C por 50 segundos, 72 °C por 20 segundos, 72 °C por un minuto y finalmente a 4 °C, en un Seguimiento de esto se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de 5µl de producto de PCR de cada amplificación teñida con red gel al 0.0001%, con buffer TBE 1% por 15 min a 76 Volts. El gel se visualizó en un fotodocumentador BioRad®. Finalmente, los productos de PCR obtenidos se mandaron a secuenciar a MACROGEN en Korea en ambos sentidos con los primers que se utilizaron para la amplificación. Las secuencias resultantes se analizaron con el programa MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013). Además de compararse con las secuencias de nucleótidos disponibles en GenBank.

Resultados y Discusión

Caracterización morfológica. Las genitalias del macho del género *Prosapia* descritas por Castro *et al.*, (2007) y las características morfológicas externas de *Prosapia simulans* descritas por Thomson y León (2005) corresponden a las que presentan los ejemplares de Tuxtepec. Los ejemplares presentan dos estructuras largas correspondientes al escudo genital, que terminan en la parte distal con una punta esclerosada; en la vista lateral se observa los parámetros apoyados sobre el escudo genital. Los parámetros son los típicos del género *Prosapia* que terminan con una especie de gancho pero no tan agudo como en el género *Aeneolamia*; el edeago tiene dos típicos dientes del género *Prosapia*, pequeños y cortos, incrustados en la parte apical del edeago (Fig. 1 B). El promedio del tamaño de 10 machos fue entre 7 y 8 mm con una desviación estándar de 0.04 y el de 10 hembras fue de 10 a 12 mm con una desviación estándar de 0.0822 y son de color café más oscuro que los machos, ambos tienen 6 puntos de color café claro en la parte antero-posterior dorsal (Fig. 1 A y C).

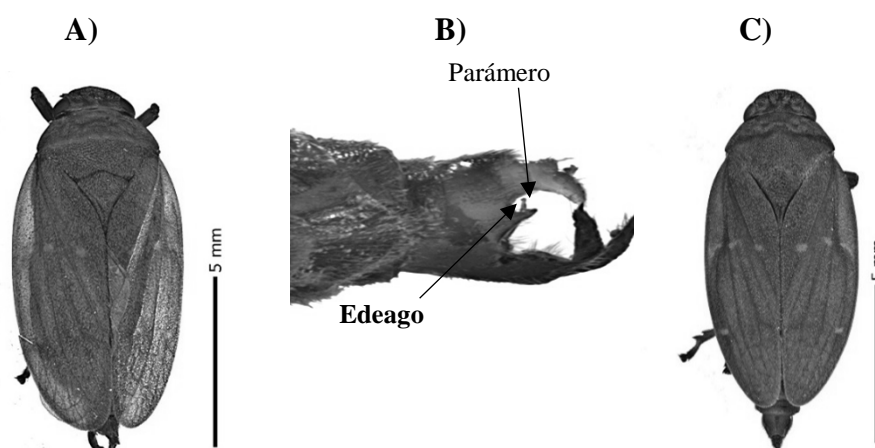


Figura 1. Especímenes del salivazo que atacan el cultivo de caña de azúcar en Tuxtepec. A) Vista dorsal del macho B) Vista lateral del macho C) Vista dorsal de la hembra.

PCR-Amplificación Citocromo Oxidasa. De la extracción de DNA de cinco ejemplares de salivazo, tres (OAX2, OAX3, y OAX4) presentaron mayor producto de PCR (Fig. 2), por lo tanto estas muestras fueron las que se secuenciaron en ambos sentidos. A las secuencias obtenidas se le eliminaron los nucleótidos no definidos para su correcta comparación en el alineamiento. Posteriormente se realizó el alineamiento de las secuencias con el Software MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013). Los resultados del alineamiento de las secuencias señalan que no existe variación entre estas. Por lo tanto, los tres individuos corresponden a misma especie. Con una de las secuencias se realizó la búsqueda en la bases de datos del NCBI GenBank y la de BOLD. Sin embargo, no se encontró registro de la secuencia de esta especie. Las secuencias más relacionadas de las muestras se encontró en el NCBI GenBank y correspondieron a un 94 % con *Prosapia bicincta*; estas también se compararon con las no publicadas de Cercópodos de México y Colombia que se están trabajando en el Colegio de Postgraduados (Segura-León y Castro-Valderrama 2014). El resultado de esta comparación ubica las secuencias obtenidas dentro de la especie de *Prosapia simulans*, que por el momento se puede considerar como un haplotipo de la especie presente en Tuxtepec, Oaxaca. Finalmente las secuencias generadas en esta investigación, se subirán a la base de datos de NCBI.

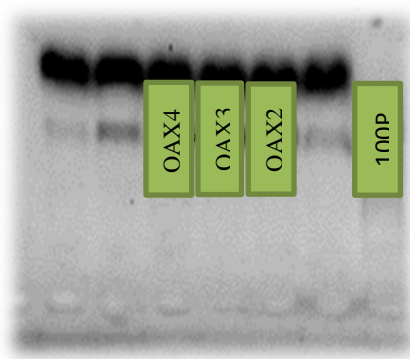


Figura 2. Gel de agarosa de la amplificación de las muestras OAX 2, OAX3 y OAX4.

Conclusiones

Las características morfológicas de los ejemplares de salivazo OAX2, OAX3 y OAX4 son similares y en cuanto a la secuencia de nucleótidos no hay diferencia por lo tanto se determina que se trata de la misma especie.

De acuerdo a la base de datos del NCBI GenBank los individuos OAX2, OAX3 y OAX4 presentan el 94% de similitud con la especie de *Prosapia bicincta* y en esta base no existe ninguna otra relación con otra especie del Género *Prosapia*; sin embargo en comparación con la base de secuencias del Colegio de Postgraduados (Segura-León y Castro-Valderrama 2014), los individuos corresponden a *Prosapia simulans*. Las muestras OAX2, OAX3 y OAX4 presente en Tuxtepec, Oaxaca es un haplotipo de la especie *Prosapia simulans*.

Agradecimientos

AICONACYT por la beca mixta número 290748. Al Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, al Programa de Fitosanidad, al M.C. Jorge M. Valdez Carrasco por su apoyo en la obtención de las imágenes, a la Línea Prioritaria de Investigación 5 del COLPOS y al Programa del Mejoramiento del Profesorado, (PROMEP proyecto 103. 511010246).

Literatura citada

- Bautista, M. N. 2006. Insectos plaga, Una guía ilustrada para su identificación. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México. 113 p.
- Castro, U., Cardona, J. C., Vera, G. J., Miles, J. y G. Garza. 2007. Identificación Morfológica y Molecular de *Prosapia simulans* (Hemiptera: Cercopidae), Selección y Mecanismos de Resistencia a este Salivazo en Híbridos de *Brachiaria*. Neotropical Entomology 36:547-554.
- De la Cruz, L., Vera, G. J., López, C. J. y V. Pinto. 2005. Una técnica simple para el desarrollo de ninfas de *Aeneolamia postica*. Entomología Mexicana. Vol. 44
- Hebert, D., Cywinska, N. A., Ball, S. L. and J. de Waard. 2002. Biological identifications through DNA barcodes. The Royal Society. 270:313-321.
- Hebert, D., Ratnasingham, S. and J. de Waard. 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. The Royal Society. 270:471-2954.

- Miller, S. E. 2007. DNA barcoding and the renaissance of taxonomy. PNAS. 104 (12): 4775-4776.
- Montesinos, M., González, G. V., Alatorre, R. R. and O. Loera. 2011 Relationship between virulence and enzymatic profiles in the cuticle of *Tenebrio molitor* by 2-deoxy-D-glucose-resistant mutants of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Springer. 27:2095–2102.
- Segura L. y U. Castro. 2014. Cercópodos de México y Colombia. Colegio de Postgraduados. Texcoco, México.
- SIAP. 2013. Centro de Estudios de las Finanzas Públicas. Análisis mensual de productos básicos. México. Pp 8
- Tamura, K., Stecher, D. A., Peterson, F. and S. Kumar. 2013. MEGA6 Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution. 30:2725-2729.
- Thompson, V. y R. G. León. 2005. La identificación y distribución de los salivazos de la caña de azúcar y los pastos (Homoptera: Cercopidae) en Costa Rica. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica) 75. 43-51.
- Tincilley, A., Easwaramoorth, S. y and G. Santhalakshmi. 2003. Mass Production of *Beauveria bassiana* Isolated from Sugarcane Root Borer, *Emmalocera depresella* Swinhoe. Society for Sugar Research And Promotion. 5:225-229.
- Toriello, C., Pérez, A. T., Burciaga, H. D., Navarro, B. A., Pérez M. and M. Lorenzana. 2005. Lack of acute pathogenicity and toxicity in mice of an isolate of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from spittlebugs Ecotoxicol. Environ. Saf. 65: 278–287.