

# Detección molecular de *Cinara cupressi* en bosques de *Austrocedrus chilensis* en Argentina

El Mujtar V.<sup>1</sup>, Covelli J.<sup>1</sup>, Delfino M.A.<sup>2</sup>, Grau O.<sup>1,3</sup>.

<sup>1</sup> Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM), CCT La Plata CONICET: Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. Calle 49 y 115 s/n (1900). La Plata. Buenos Aires. Argentina.

[verel@biol.unlp.edu.ar](mailto:verel@biol.unlp.edu.ar)

<sup>2</sup> Cátedra de Entomología. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba. Comisión Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas.

<sup>3</sup> Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires.

## RESUMEN

Los áfidos son un grupo de agentes bióticos fuertemente asociados con enfermedades de plantas, existiendo un importante número de especies en el género *Cinara* Curtis que viven sobre coníferas. *Cinara cupressi* ha sido reportada en Europa, América y África viviendo sobre *Juniperus*, *Cupressus*, *Thuja*, *Chamaecyparis*, *Widdringtonia* y otras coníferas. Un complejo de especies se propuso para los áfidos usualmente identificados como *C. cupressi*, el cual incluiría a *C. cupressi*, *Cinara tujafilina* y una nueva especie denominada *Cinara (Cupressobium) cupressivora* (Watson y Voegtlin). Sin embargo, hasta el momento, la discriminación entre *C. cupressi* y *C. cupressivora* es controvertida, al igual que la participación de *C. tujafilina* en el mencionado complejo. La diferenciación tradicional entre *C. cupressi* y *C. tujafilina* es, por otra parte, difícil debido a que comparten muchos caracteres morfológicos y microscópicos. La identificación de especies patogénicas y no patogénicas y el conocimiento de la dinámica de población de las diferentes especies, requiere de un método rápido y simple. En este trabajo se reporta la primer detección molecular de *C. cupressi* en bosques de *A. chilensis* en Argentina, mediante la aplicación de un método de RFLP-PCR diseñado para la identificación de *C. cupressi* y *C. tujafilina*.

## INTRODUCCIÓN

Muchas enfermedades de plantas son producidas por áfidos, los cuales pueden afectar al huésped en forma directa o indirecta. La acción directa deriva de la remoción de savia o las lesiones que producen, en tanto que la acción indirecta implica su actuación como vectores de otros patógenos. Delfino y Binazzi (2002) presentan una revisión actual de las asociaciones entre

áfidos y coníferas (nativas o exóticas) en Argentina. *Cinara (Cupressobium) cupressi* (Buckton, 1881) ha sido reportada en Europa, América y África colonizando *Juniperus*, *Cupressus*, *Thuja*, *Chamaecyparis*, *Widdringtonia* y otras coníferas. La primer detección de *C. cupressi* en Argentina se produjo en el año 2001 (Delfino y Binazi, 2005) y correspondió a la afección de cipreses exóticos en la provincia de Córdoba. En el año 2003 se detectó en la provincia de Santa Cruz, nuevamente sobre cupresáceas exóticas, demostrando una amplia distribución de la especie en el país.

En Argentina, los bosques de *A. chilensis* muestran un estado sanitario deficiente debido a la presencia del disturbio denominado “mal del ciprés” (Varsavsky et al., 1975; Hranilovich, 1988, Havrylenko et al., 1989). Por tanto, el ingreso de especies agresivas de *Cinara* o su propagación descontrolada podrían producir un daño considerable en los mismos. En Chile, *C. cupressi* ha mostrado gran capacidad de dispersión, adaptabilidad a climas y especies hospedantes. Fue detectada sobre cipreses exóticos en el año 2003 (Silva et al., 2005) y en el año 2004 ya afectaba muchas especies en los géneros *Austrocedrus*, *Cupressus*, *Chamaecyparis*, *Juniperus* y *Thuja*. Aunque Watson et al. (1999) propusieron que las especies *C. cupressi*, *Cinara (Cupressobium) tujafilina* (del Guercio, 1909) y una nueva especie denominada *Cinara (Cupressobium) cupressivora* (Watson and Voegtlin) constituyen un complejo de especies, el mismo no ha sido completamente aceptado. Remaudière y Binazzi (2003) rechazan la creación de *C. cupressivora* debido a que el 25% de los especímenes analizados no pueden ser identificados utilizando la función de discriminación propuesta por Watson et al. (1999). Análisis morfológicos y microscópicos exhaustivos son requeridos para la identificación de especies por métodos tradicionales. *C. cupressi* y *C. tujafilina* comparten muchos caracteres y aunque la coloración de las patas ha sido propuesta como un carácter útil en la diferenciación, es altamente variable y se requiere la evaluación simultánea de marcadores suplementarios (Remaudière y Binazzi, 2003). Hasta el momento, la separación entre *C. cupressi* y *C. cupressivora* es controvertida, al igual que la participación de *C. tujafilina* en el complejo propuesto. La aplicación de nuevas metodologías, frecuentemente usadas en identificación molecular, podría ayudar a resolver algunos de estos interrogantes. Varios tipos de marcadores moleculares han sido desarrollados y pueden ser fácilmente empleados en entomología (Loxdale y Lushai, 1998). Los genes mitocondriales citocromo oxidasa I y II (COI y COII), y los genes nucleares correspondientes al factor de elongación 1 $\alpha$  o al tRNA del aminoácido Leucina, han sido empleados en estudios

taxonómicos y filogenéticos (Loxdale y Lusahi, 1998; Normark, 2000). El mtDNA posee una tasa de mutación mayor que el DNA nuclear, por lo que numerosos marcadores mitocondriales son usados para diferenciar razas o biotipos. La molécula de mtDNA presenta regiones altamente conservadas sobre las cuales se han desarrollado primers universales que permiten la amplificación de regiones útiles para estudios evolutivos y filogenéticos.

La identificación molecular de *C. cupressi* y *C. tujafilina* permitiría avanzar en el análisis de la dinámica natural de ambas especies, acelerando la detección y la evaluación del impacto de los métodos de control biológico que están siendo empleados para su manejo (Silva et al., 2005).

En este trabajo aplicamos y evaluamos un método de RFLP-PCR diseñado para la identificación de *C. cupressi* y *C. tujafilina*. Muestras de áfidos obtenidas en bosques de *A. chilensis* en Argentina fueron utilizadas con tal fin.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Muestreo.** Las muestras empleadas corresponden a colonias aisladas recolectadas desde *Thuja* sp., *Cupressus* sp. y *A. chilensis*, en la localidad de El Bolsón, provincia de Río Negro en Octubre del 2006 y Abril del 2007. Muestras recolectadas desde *A. chilensis* en San Ramón (área de estepa, provincia de Río Negro), durante el mes de Octubre del 2006, fueron también empleadas. Los áfidos utilizados en estudios microscópicos fueron conservados en etanol 65%, preparados de acuerdo con el método propuesto por Remaudière (1992) e identificados morfológicamente siguiendo los criterios propuestos por Watson et al. (1999), Remaudière y Binazzi (2003) y Delfino y Binazzi (2005).

**RFLP-PCR.** La extracción de DNA (Hammond et al., 1996) se realizó sobre áfidos provenientes de colonias de *C. cupressi* o *C. tujafilina* morfológicamente identificadas; y desde áfidos, no identificados, provenientes de colonias aisladas recolectadas desde *A. chilensis*. Los primers universales COIS, 5'-GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCC-3' (C1-J-1718 Simon et al. 1994) y COIA, 5'-GCTAATCATCTAAAAATTTAATTCCTGTTGG-3' (C1-J-2441, modificado desde Simon et al. 1994) se utilizaron para amplificar un fragmento de COI de aproximadamente 700 pares de bases (excluyendo la secuencia de los primers). Las reacciones fueron hechas en 25 µl en 1X buffer con 200 µM dNTPs, 0.5 µM primers directo y reverso, 2 mM MgCl<sub>2</sub> y 0.02 U/µl de *Taq* DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies, USA). Se utilizó un termociclador GeneAmp

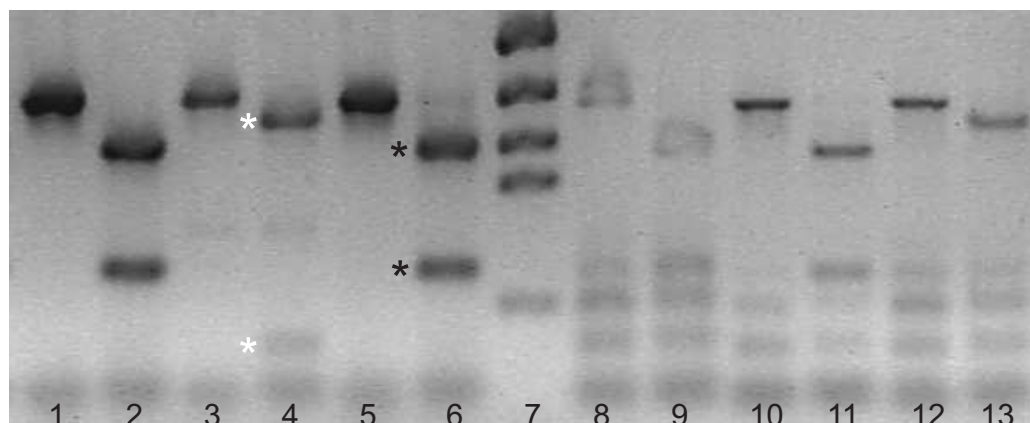
PCR System 9700 (Applied Biosystems), con los siguientes parámetros de ciclado: desnaturalización inicial a 94°C por 6 min, seguida de 35 ciclos que consisten de desnaturalización a 94°C por 1 min, annealing de primers a 50°C por 90 sec, y amplificación a 72°C por 90 sec, con un paso de extensión final a 72°C por 5 min. Las amplificaciones fueron digeridas con la enzima de restricción Hae III y los productos de digestión separados mediante electroforesis en gel de agarosa (2%) en TAE 1X.

## RESULTADOS

El desarrollo de un método de identificación molecular precisa de especímenes individuales de cada especie en estudio. La identificación tradicional, por su parte, requiere preparaciones especiales de especímenes adultos que no pueden ser luego empleados en el análisis molecular. Dos hospedantes alternativos fueron utilizados en un trabajo previo para generar las secuencias nucleotídicas correspondientes a COI de cada especie. DNA extraído desde áfidos provenientes de colonias morfológicamente identificadas colectadas desde *Cupressus* sp. fueron empleadas para *C. cupressi*; en tanto que para *C. tujafilina* se recolectaron desde *Thuja* sp. Sobre la base de estas secuencias se seleccionó la enzima de restricción Hae III para la identificación de ambas especies mediante RFLP-PCR.

En el presente trabajo, DNAs extraídos desde áfidos provenientes de colonias aisladas colectadas desde *A. chilensis* fueron amplificados por PCR, digeridos con Hae III y separados en gel de agarosa (2%) en TAE 1X. La Figura 1, muestra los patrones de restricción obtenidos para 3 muestras provenientes de *A. chilensis* de la zona de El Bolsón (calles 9, 11 y 13) y 1 muestra proveniente de *A. chilensis* de la zona de San Ramón (calle 2). DNAs extraídos desde colonias de áfidos colectados desde *Thuja* sp. y *Cupressus* sp. (previamente identificados por métodos tradicionales) fueron amplificados, digeridos y separados en el mismo gel utilizándose como marcadores internos de referencia. Los patrones de restricción obtenidos para estos marcadores coinciden con lo esperado (análisis *in silico*): dos bandas de 530 y 220 pares de bases para *C. cupressi* (calle 6) y dos bandas de 640 y 110 pares de bases para *C. tujafilina* (calle 4). Las muestras provenientes de *A. chilensis* presentan el patrón de digestión de la especie *C. cupressi* (calles 2, 9 y 11) o el patrón de digestión de la especie *C. tujafilina* (calle 13). *C. cupressi* se detectó en las dos áreas geográficas analizadas, El Bolsón (zona mésica) y San Ramón (zona de estepa).

Estos resultados constituyen la primer detección molecular de la especie *C. cupressi* en bosques de *A. chilensis* en Argentina y confirman la utilidad del método de RFLP-PCR en la rápida detección de *C. cupressi* y *C. tujafilina* en muestras provenientes de *Cupressus* sp., *Thuja* sp. o *A. chilensis*.



**Figura 1:** Amplicones obtenidos por PCR (calle 1, 3, 5, 8, 10 y 12) y correspondientes patrones de restricción (calles 2, 4, 6, 9, 11, 13) separados por electroforesis en gel de agarosa (2%) en TAE 1X. Calles 8 a 13, muestras provenientes de *A. chilensis* (El Bolsón). Calles 8 y 9: muestra A18A-2B. Calles 10 y 11: muestra A40A-1. Calles 12 y 13: muestra A-6S-2B. Calles 1 y 2: muestra proveniente de *A. chilensis* (San Ramón): muestra A-SR. Marcadores internos de referencia: calles 3 y 4 *C. tujafilina* recolectada desde *Thuja* sp; calles 5 y 6 *C. cupressi* recolectada desde *Cupressus* sp. Marcador de peso molecular (calle 7): pcDNAII digerido con DdeI/XhoI (1140, 758, 540, 409 y 166 pb). Bandas esperadas para *C. cupressi* se indican con asteriscos negros, bandas esperadas para *C. tujafilina* se indican con asteriscos blancos.

## DISCUSIÓN

El ingreso de *C. cupressi*, ha sido reportado recientemente en Brazil, Chile y Argentina, evidenciando su gran capacidad de dispersión, adaptabilidad a climas y a especies hospedantes diversas (Sousa-Silva and Ilharco, 2000; Silva et al., 2005; Delfino and Binazzi, 2005; Ortego, 2006). Varias estrategias de manejo están siendo implementadas en Chile (Silva et al., 2005) tomando como base los métodos aplicados en África (Ciesla, 1991). Sin embargo, la evaluación del impacto del control biológico y de los cambios observados en la dinámica de población de

*C. cupressi* (y especies relacionadas) se ve retrasada por la dificultad de la identificación morfológica tradicional. El estudio de la distribución de *C. cupressi* en áreas extendidas u hospedantes alternativos y los cambios en la dinámica natural de *C. tujafilina* como consecuencia del ingreso de *C. cupressi*, se vuelven imprácticos y poco factibles a través del empleo de la identificación microscópica. Por otra parte, los bosques de *A. chilensis* en Argentina son afectados por “mal del ciprés” (El Mujtar and Andenmatten, 2007a, b) y es esperable que la deficiencia de su estado sanitario se intensifique por el ingreso de *C. cupressi*. Este contexto planteó la necesidad de un método de identificación rápido y simple.

En este trabajo reportamos la primer detección molecular de *C. cupressi* en bosques de *A. chilensis* en Argentina, a través del empleo de un método de RFLP-PCR. El método fue útil para identificar la especie y se presenta como una herramienta valiosa para el análisis de la variación estacional, la distribución en hospedantes o regiones para *C. cupressi* y *C. tujafilina*. Secuencias nucleótídicas correspondientes a la misma región del gen COI han sido generadas para otras especies de *Cinara* que colonizan coníferas presentes en la zona, por lo que el método podría ser extendido para discriminar un mayor número de especies en el género.

## CONCLUSIONES

La aplicación de un método molecular (RFLP-PCR) permitió la rápida detección de *C. cupressi* y *C. tujafilina* en muestras provenientes de *A. chilensis*, *Cupressus* sp. o *Thuja* sp..

## LITERATURA CITADA

- Ciesla, W. 1991. Cypress aphid, *Cinara cupressi*, a new pest of conifers in eastern and southern Africa. *FAO Plant Protection Bulletin* 39: 82-93.
- Delfino, M; Binazzi, A. 2002. Áfidos en Coníferas en la Argentina (Hemiptera: Aphididae). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina* 61 (3/4): 27-36.
- Delfino, M; Binazzi, A. 2005. Further data on conifer aphids from Argentina (Aphididae Lachninae Eulachinini). *REDIA LXXXVIII*: 3-7.
- El Mujtar, V; Andenmatten, E. 2007b. Análisis del “Mal del ciprés” mediante un “Modelo de Enfermedad”: Vacíos de información y perspectivas. *Revista de la Facultad de Agronomía (Univ. Nac. La Plata)* 106(2): 119-133.

- El Mujtar, V; Andenmatten, E. 2007a. Mal del ciprés: Búsqueda de la causa más probable de daño mediante un análisis deductivo y comparativo. *Bosque* 28(1): 3-9.
- Hammond, JBW; Spanswick, G; Mawn, JA. 1996. Extraction of DNA from preserved animal specimens for use in randomly amplified polymorphic DNA analysis. *Analytical Biochemistry* 240: 298-300.
- Havrylenko, M; Rosso, PH; Fontenla, SB. 1989. *Austrocedrus chilensis*: contribución al estudio de su mortalidad en Argentina. *Bosque* 10: 29-36.
- Hranilovich, S. 1988. Informe Histórico sobre el «mal del Ciprés» de la Cordillera (*Austrocedrus chilensis*). *Revista de la Asociación Forestal Argentina XLII* (3): 58-62.
- Loxdale, H; Lushai, G. 1998. Molecular markers in entomology. *Bulletin of Entomological Research*, 88: 577–600.
- Normark, B. 2000. Molecular Systematics and Evolution of the Aphid Family Lachnidae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 14 (1): 131–140.
- Ortego, J. 2006. Actualización de la lista de Pulgones (Hemiptera: Aphididae) de Jujuy y Salta. Registro de *Cinara cupressi* (BUCKTON). *RIA* 35 (1): 107-120.
- Remaudière, G. 1992. A simplified method for mountain aphids and other small insects in Canada balsam. *Revue Française d'Entomologie* 14 (4): 185-186.
- Remaudière, G; Binazzi, A. 2003. Les *Cinara* du Pakistan. II. Le sous-genre *Cupressobium* (Hemiptera, Aphididae, Lachninae). *Revue Française d'Entomologie* 25 (2): 85-96.
- Silva, J; Ruilova, A; Urrutia, A. 2005. El Complejo *Cinara cupressi* (Hemiptera: Aphididae): una amenaza para las cupresáceas nativas de Chile. Corporación Nacional Forestal, Nota técnica 23 (46): 1-7.
- Simon, C; Frati, R; Beckenbach, A; Crespi, B; Liu, H. 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: 651-701.
- Sousa-Silva, C; Ilharco, F. 2001. First report of *Cinara cupressi* (Lachninae: Cinarini) in Brazil. *Revista de Biología Tropical* 49 (2): 768.
- Varsavsky, E; Bettuci, L; Rodríguez García, D; Gómez, C. 1975. Observaciones preliminares sobre la mortalidad del ciprés (*Austrocedrus chilensis*) en los Bosques Patagónicos. *Fundación Bariloche* 19: 1-11.

Watson, G; Voegtlin, D; Murphy, S; Footitt, R. 1999. Biogeography of the *Cinara cupressi* complex (Hemiptera: Aphididae) on *Cupressaceae*, with description of a pest species introduced into Africa. *Bulletin of Entomological Research* 89: 271-283.





UNIVERSIDAD DE TALCA  
FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES  
4° CONGRESO CHILENO DE CIENCIAS FORESTALES

**Aceptación para publicación en plataforma virtual**

Señores  
Comisión Organizadora  
4° Congreso Chileno de Ciencias Forestales  
Universidad de Talca, Chile.

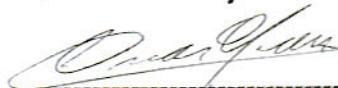
Estimados Señores


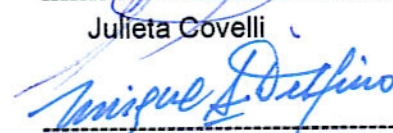
Quien suscribe, autores de la ponencia: "Deteccion molecular de *Cinara cupressi* en bosques de *Austrocedrus chilensis* en Argentina." autorizan a los organizadores del 4° Congreso Chileno de Ciencias Forestales, a la publicación del texto completo en la plataforma virtual *Dspace* de la Biblioteca de la Universidad de Talca, permitiendo con ello a su acceso a través de la Internet.

El texto, que se envió en formato Word, será transformado a formato pdf para su publicación. Su difusión estará disponible hasta el mes de Octubre del 2010.

Atentamente,

  
-----  
Verónica El Mujitar

  
-----  
Oscar Grau

  
-----  
Julieta Covelli  
  
-----  
Miguel A. Delfino

Talca, junio de 2009.