



Figura 1. Larva de plaga primaria, o de desarrollo interno, dentro de un grano de arroz.

Puesta a punto de un nuevo método molecular para la detección e identificación de insectos plaga en cereales almacenados

Nuria Agustí, Mireia Solà y Jordi Riudavets

IRTA, Protección Vegetal Sostenible, Cabrils (Barcelona)

En las últimas décadas hay una tendencia a incorporar métodos moleculares como herramientas de diagnóstico. En el presente trabajo se presenta la puesta a punto de una PCR multiplex, que permite la detección y la identificación simultáneas de las cinco principales especies plaga que se desarrollan en el interior de los granos de cereales: la polilla *Sitotroga cerealella*, el coleóptero *Rhyzopertha dominica* y los tres gorgojos *Sitophilus granarius*, *S. oryzae* y *S. zeamais*. Los resultados han mostrado que el método molecular propuesto es específico para las cinco especies diana. Además de que es muy sensible, ya que detecta 0.1 individuos/kg de arroz, y permite la detección en diferentes tipos de grano. La utilización de esta técnica molecular por parte de las industrias cerealistas puede ser muy útil para el análisis de las contaminaciones por plagas de insectos y para ayudar a la toma de decisiones en almacenes agroalimentarios.

Palabras clave: insectos plagas, cereales almacenados, detección, identificación, PCR multiplex.

Entre el 60% y el 80% de las calorías de la dieta de los países en desarrollo se obtienen directamente de los cereales; en el mundo desarrollado, hasta un 30%. Sin embargo, incluso en estas sociedades más prósperas que dependen menos del consumo directo de cereales, siguen siendo el producto alimenticio más importante, ya que proporcionan la mayoría de los nutrientes para el ganado, que forma una parte importante de la dieta en estas regiones (Awika, 2011). La mayor parte del grano se almacena antes de ser procesado y distribuido al consumidor por un periodo de tiempo que puede llegar a ser incluso de más de un año. La seguridad de estos alimentos es susceptible de verse afectada cuando se almacenan, transportan y procesan. Se estima que las pérdidas en poscosecha debidas a insectos ascienden al 9% y el 20% en países desarrollados y en desarrollo, respectivamente (Phillips y Throne, 2010).

Entre las plagas de insectos, las plagas primarias, también llamadas de desarrollo interno, porque se desarrollan y alimentan dentro de los granos, se consideran las más dañinas de los cereales almacenados (Figura 1). Las cinco principales especies son la polilla *Sitotroga cerealella* (Olivier) (Lepidoptera: Gelechiidae), el coleóptero *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) (Coleoptera: Bostrichidae) y tres gorgojos del género *Sitophilus* (*S. granarius* (L.), *S. oryzae* (L.) y *S. zeamais* (Motschulsky)) (Coleoptera: Curculionidae), muy difíciles de diferenciar morfológicamente (Castañé y Riudavets, 2015).

La creciente preocupación de los consumidores sobre la inocuidad y la salubridad de los alimentos ha generado una disminución en los umbrales de plagas por insectos tolerados en los alimentos y, al mismo tiempo, de los residuos tóxicos que dejan los insecticidas que se utilizan para su control (Trematerra, 2013). Esta situación ha conllevado cambios en los estándares de calidad aplicados a los granos, enfatizando la necesidad de enfoques regulatorios por parte de las administraciones (Stejskal y col., 2014). La falta de control de las infestaciones de insectos en el campo, así como en los mismos almacenes, puede conllevar una contaminación



Figura 2. Los análisis rutinarios se realizan mediante el tamizado del grano para detectar los insectos adultos presentes.

extensa del grano almacenado. De ahí la importancia de establecer estrategias para el diagnóstico temprano.

Con el objetivo de detectar esta contaminación por insectos, se suelen llevar a cabo análisis rutinarios, como la inspección del grano por tamizado, para detectar y separar los insectos adultos presentes (Figura 2). Sin embargo, las infestaciones internas del grano por parte de los estadios preimaginaes de las plagas no son detectables mediante esta metodología. Hoy en día, existe una gran variedad de otras técnicas que serían alternativas para la detección de insectos en el interior de los granos de cereales, como los rayos X, los análisis NIR o los sensores acústicos, aunque resultan económicamente inviables o son menos sensibles ante bajas densidades de población (Neethirajan y col., 2007; Trematerra, 2013). En los últimos años, la utilización de técnicas moleculares ha ganado importancia debido a su simplicidad, rapidez y especificidad. Las técnicas basadas en la detección del ADN, como la PCR (*Polymerase Chain Reaction* o Reacción en Cade-

na de la Polimerasa) han sido principalmente relevantes para el análisis de Organismos Genéticamente Modificados (OGM) en alimentos. Entre estas técnicas, la PCR multiplex es altamente eficiente ya que es capaz de identificar simultáneamente las especies presentes en una muestra con una sola reacción de PCR (King y col., 2011), en comparación con la PCR singleplex, que permite la identificación de una sola especie a la vez. En relación a ello, hemos puesto a punto una PCR multiplex para la detección e identificación de las cinco especies plaga principales y potencialmente presentes en el interior de los granos de cereales almacenados (*S. cerealella*, *R. dominica*, *S. granarius*, *S. oryzae* y *S. zeamais*). El primer paso fue la realización de una extensa prueba de especificidad que cubriera una amplia gama de especies potencialmente presentes en las instalaciones de granos almacenados, para asegurar la ausencia de detección de especies no diana (falsos positivos). La sensibilidad de este protocolo se determinó teniendo en cuenta todas las etapas del desarrollo (de huevo a adulto), el tiempo que hacía que había muerto

el insecto (tiempo *postmortem*) y la detección en diferentes tipos de grano. Finalmente, se comprobó el método analizando algunas muestras reales procedentes de una fábrica de pasta de sopa.

Material y Métodos

Para la puesta a punto de esta PCR multiplex se diseñaron cinco pares de *primers* o cebadores específicos, uno para cada especie plaga diana (Solà y col., 2018). Una vez optimizada la amplificación de las cinco especies se puso a punto su detección por PCR multiplex mediante los siguientes experimentos:

Pruebas de especificidad. La especificidad de esta PCR multiplex se evaluó mediante el análisis de diez individuos de cada una de las cinco especies diana, además de tres individuos de otras 46 especies potencialmente presentes en almacenes de grano, entre las que se incluyeron 31 coleópteros, cinco lepidópteros, cinco himenópteros y cinco ácaros. Las cinco especies diana provenían de crías de laboratorio mantenidas en el Centro del IRTA de Cabrils, que se mantuvieron en cámaras climáticas a 28°C, 70% de humedad relativa (HR) y un fotoperiodo de 16:8h de luz y oscuridad, respectivamente. Las otras 46 especies de insectos que se analizaron provenían de muestreos de fábricas alimentarias o de crías de laboratorio externas.

Pruebas de sensibilidad. El umbral de sensibilidad de la técnica utilizada se determinó mediante el análisis por PCR multiplex de infestaciones artificiales que contenían el equivalente de 100, 10, 1 y 0,1 pupas de cada especie plaga diana/kg de arroz.

Análisis postmortem. Para estudiar la degradación del ADN con el tiempo y, por tanto, el umbral de detección de las especies diana después de muertas, se analizaron varios adultos de cada especie diana muertos por congelación y posteriormente mantenidos durante diferentes periodos de tiempo (0, 30, 90, 150, 365, 548 y 760 días) en cámaras climáticas (28°C, 70% HR y 16:8h).

Pruebas en diferentes granos. La detección de estos insectos plaga se

probó mediante infestaciones artificiales de adultos de *S. zeamais* en seis tipos de grano y pasta alimentaria: cebada, maíz, avena, espelta, arroz, trigo harinero y macarrones de trigo duro. Para ello, se infestaron 250g de cada cereal o pasta con diez adultos de *S. zeamais* y se mantuvieron durante quince días en la cámara climática en las mismas condiciones descritas anteriormente. Posteriormente, el grano se tamizó para hacer recuento de los adultos presentes y se dividió en dos porciones de 125g. Una de ellas se analizó molecularmente, mientras que la otra se mantuvo en la cámara climática (mismas condiciones) durante cuarenta días. Los adultos de *S. zeamais* que emergieron de ésta segunda porción de grano se contaron para estimar el número de larvas ocultas dentro del grano en la primera porción (la analizada por PCR multiplex).

Análisis de muestras comerciales.

Se analizaron cinco muestras comerciales de grano procedentes de una fábrica de pasta de sopa para determinar la presencia o ausencia de las cinco especies diana por PCR multiplex. El procedimiento habitual de esta fábrica para verificar la presencia de insectos cuando llega el grano a fábrica para ser procesado consiste en tamizar 1 kg de grano. Realizado este tamizado, estas muestras fueron enviadas a nuestro laboratorio para su análisis por PCR multiplex, donde se tamizaron una segunda vez y se contaron e identificaron los insectos obtenidos. Posteriormente, cada muestra se dividió en dos porciones de 500 g; una para el análisis molecular y la otra se mantuvo durante 40 días en cámara climática (mismas condiciones anteriores) para determinar la presencia de insectos adultos pasado este período de tiempo.

Resultados

Pruebas de especificidad y sensibilidad.

La PCR multiplex puesta a punto detectó las cinco especies diana mostrando fragmentos de ADN a diferentes alturas en los geles de agarosa, los cuales permiten además la identificación de las especies presentes (Figura 3).

Cuando las otras 46 especies de insectos se analizaron con la PCR multiplex diseñada, ninguna de ellas fue detectada, demostrando así la elevada especificidad del método puesto a punto.

Al analizar diferentes dosis de infestación artificial, el umbral de sensibilidad de la PCR multiplex se determinó en 0.1 pupa/kg de arroz para las tres especies de *Sitophilus* y *S. cerealella*, mientras que en el caso de *R. dominica* se llegó a detectar hasta diez pupas por kilo de arroz.

Análisis postmortem y en diferentes granos.

Los adultos de las cinco especies diana se detectaron hasta transcurridos 365 días desde su muerte. Además, tres de ellas (*S. cerealella*, *S. zeamais* y *S. oryzae*) todavía se detectaron pasados 760 días, es decir, más de dos años después de muertas. El ADN de *S. zeamais* se detectó en todas las infestaciones artificiales realizadas en los diferentes granos y pasta analizados por PCR multiplex. Estos resultados fueron corroborados después de tamizar la porción mantenida en cámara climática durante cuarenta días y obtener adultos de *S. zeamais* en las muestras de grano y pasta.

Análisis de muestras comerciales.

El análisis molecular de las muestras de grano de la fábrica de pasta de sopa concordó con los resultados obtenidos con el tamizado realizado en la misma industria. Esta industria nos informó que en dos de las cinco muestras enviadas encontraron insectos adultos en su cribaje al llegar a fábrica. Cuarenta días después, en el tamizado realizado en laboratorio, se observaron adultos de *Sitophilus* en las dos muestras positivas. El análisis molecular de estas dos muestras mostró que se trataba de *S. oryzae* en ambos casos. Cuando en una muestra no se encontraron insectos en los tamizados, el análisis por PCR multiplex tampoco detectó ADN de las especies diana.

Discusión

En el presente estudio se ha puesto a punto una PCR multiplex para detectar las cinco especies principales de plagas primarias del grano, ofreciendo ventajas significativas para el

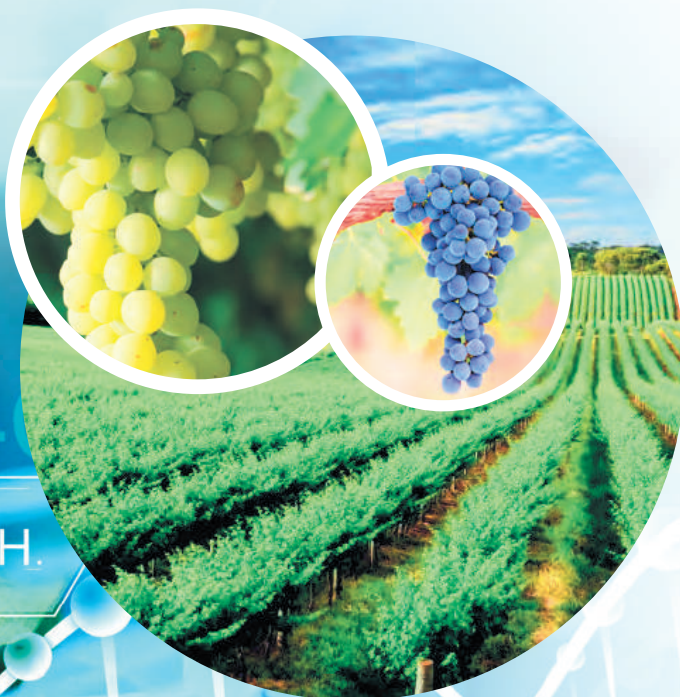


fytosave

fitovacuna **vegetal**

Activa y estimula la inmunidad innata de las plantas frente a Oídio y Mildiu

Nuevo uso en uva de mesa y vid de vinificación



nº de registro ES-00209

AUTORIZADO para uso en **CULTIVO ECOLÓGICO**

Fitosanitario de bajo riesgo

Prevenir es Seguridad, Eficacia, Rentabilidad...

Prevenir es Proteger

LIDA
plant research



www.lidaplantresearch.com

transferencia tecnológica

| cereales |

análisis rutinario. Este protocolo resultó altamente sensible, mostrando un umbral de sensibilidad más elevado que las técnicas de detección estándares utilizadas para la presencia de insectos en fábricas de alimentos, basadas en la detección visual de adultos, de granos dañados por insectos o incluso de fragmentos de insectos.

Las etapas inmaduras de algunas de estas especies son particularmente difíciles de identificar, como es el caso de las tres especies de *Sitophilus* identificadas en este estudio. Los procedimientos de identificación se basan en la caracterización morfológica de los adultos, aunque en el caso de especies tan próximas, como *S. oryzae* y *S. zeamais*, es complicado y requiere la experiencia de un taxónomo y el uso de técnicas de microscopía. Utilizando esta PCR multiplex conseguimos no solo distinguir los adultos de *Sitophilus*, sino también llegar a identificar los estadios inmaduros de estas especies. Es sabido que *S. oryzae* es más resistente a la fosfina, uno de los insecticidas químicos más utilizados en el grano almacenado a nivel mundial, que *S. zeamais* (Hagstrum y col., 1999). Por tanto, el uso de éste método molecular de identificación es de gran ayuda para la toma de medidas de control apropiadas.

La degradación del ADN en organismos muertos aumenta con el tiempo, lo cual podría imposibilitar su detección. Por ello, se ha analizado la detección de las cinco especies diana a varios tiempos post-mortem. Los resultados han mostrado que esta PCR multiplex es capaz de detectar las cinco especies diana incluso después de un año desde su muerte, o incluso más en tres de las especies. El hecho de que los insectos muertos puedan ser detectados durante largos períodos de tiempo tiene aspectos positivos y negativos. Por un lado, esta detección da una idea de la contaminación presente en el grano, incluso en el pasado. Por otro lado, la imposibilidad de discriminar entre insectos muertos y vivos podría conllevar una sobreestimación de las medidas de control necesarias y un consiguiente exceso de tratamiento del grano (Solà y col. 2018). Por ello, estamos intentando poner a punto

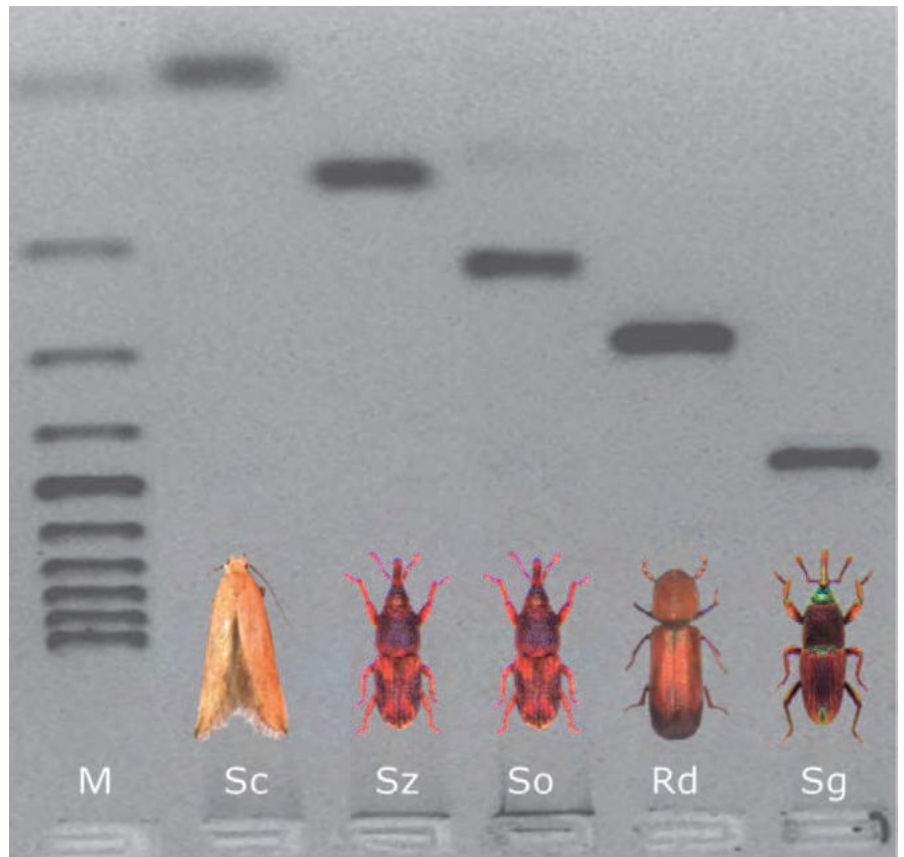


Figura 3. Productos de PCR multiplex amplificados para cada una de las cinco especies diana: Sc: *Sitotroga cerealella*, Sz: *Sitophilus zeamais*, So: *Sitophilus oryzae*, Rd: *Rhyzopertha dominica*, Sg: *Sitophilus granarius*. M: marcador 100 pb.

un método que, utilizado conjuntamente con esta PCR multiplex, permita discriminar entre el ADN proveniente de un insecto vivo o de uno muerto.

Los cultivos de cereales dominantes en todo el mundo son el arroz, el trigo, el maíz, el mijo, la cebada y el centeno (Pimentel y col., 1997) y en todos ellos aparecen especies de desarrollo interno cuando se almacena el grano. Por ello, hemos analizado si la detección de las cinco plagas diana era posible en la mayoría de esos granos (arroz, trigo harinero, maíz, avena, espelta y cebada). Como estos granos habitualmente se procesan, analizamos también la presencia de insectos en pasta (macarrones de trigo duro). Los resultados obtenidos mostraron que el método detecta etapas inmaduras de *S. zeamais* en todos los granos analizados, así como en la pasta, lo que sugiere que también se detectarían las otras cinco especies diana.

La estabilidad del ADN, que puede soportar temperaturas de pasteurización y esterilización (Laube y col.,

2007), sugiere que el uso de técnicas moleculares como técnica de diagnóstico en fábricas de alimentos permitiría una identificación inequívoca de los insectos en los alimentos en cualquier punto de procesamiento. Sin embargo, son necesarios más estudios para corroborar esta afirmación, particularmente después de los procesos de fabricación que conllevan en muchos casos extrusiones a alta presión y cociones y secados a alta temperatura. Después de analizar muestras comerciales de una fábrica de pasta de sopa, los resultados concordaron con los obtenidos mediante los tamizados realizados en la industria por lo que se refiere a la detección de adultos, aunque no a la de estadios inmaduros, que son imposibles de detectar mediante el tamizado. Esto demuestra el potencial de este método molecular para ser introducido en industrias de procesado para el diagnóstico de la presencia de insectos. Este servicio puesto a punto por el IRTA se ha transferido a una empresa de análisis genéticos (Sistemas Genómicos), con la finalidad de que resulte más rápido



Valbon®



VALBON®

FUNGICIDA PARA CONTROL DE REPILO Y REPILO PLOMIZO EN OLIVAR

- Fungicida para control de Repilo y Repilo Plomizo en Olivar.
- Incluido en Producción Integrada.
- Eficaz en las distintas fases de desarrollo del hongo.
- Acción preventiva, curativa y efecto erradicante.
- Óptimo para usar en estrategias de reducción de Cobre.

sipcamiiberia.es

Uso reservado a agricultores y aplicadores profesionales. Lea siempre la etiqueta antes de usar el producto y siga las instrucciones.



SIPCAM
IBERIA

y eficiente, y que se pueda realizar un uso generalizado de estas técnicas por parte de los potenciales usuarios (<https://agro.sistemasgenomicos.com/es/producto/deteccion-de-insectos-en-granos-almacenados>).

El presente método detecta e identifica infestaciones de insectos en grano con alta precisión y sensibilidad. Esta información es vital para poder implementar prácticas de control integrado de plagas, desarrollar umbrales económicos y establecer estrategias de toma de decisiones para usar plaguicidas de forma más selectiva y, por lo tanto, ser más respetuosos con el medio ambiente. También puede ayudar a los gerentes de la industria alimentaria a tomar decisiones sobre el rechazo de lotes, almacenamiento de grano, medidas de control a utilizar, procesar granos o transportarlos a otro mercado con estándares menos estrictos.

Conclusiones

En este estudio, se describe la puesta a punto de una PCR multiplex para la detección e identificación de *R. domi-*

nica, *S. granarius*, *S. oryzae*, *S. zeamais* y *S. cerealella*, principales plagas primarias de los granos de cereales. Esta técnica permite identificar simultánea y específicamente estas especies con una elevada sensibilidad e incluso un año después de muertas. También permite la detección de insectos en diferentes tipos de grano del cereal, así como en alimentos procesados. El uso de esta PCR multiplex mejoraría la calidad de los alimentos, al evitar contaminaciones por insectos, así como por los insecticidas que se utilizan para su control. Proponemos la utilización de estos métodos por parte de las industrias agroalimentarias para el diagnóstico de la presencia de estas especies plaga de insectos.

Abstract

In the last decades there is a tendency to incorporate molecular methods as diagnostic tools. In the present work we present the development of a multiplex PCR, which allows the simultaneous detection and identification of the five main pest species that develop inside the cereal grains:

the moth *Sitotroga cerealella*, the beetle *Rhyzopertha dominica* and the three weevils *Sitophilus granarius*, *S. oryzae* and *S. zeamais*. Results have shown that the proposed molecular method is specific for the five target species. Besides, it is highly sensitive since is able to detect 0.1 individuals/kg of rice and allows insect detection in different types of cereal grain. The use of this molecular method by the cereal industries can be very useful for the analysis of contamination by insect pests and to help decision-making in agri-food stores.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA) con los proyectos RTA2011-00025-CO2-O1 y RTA2014-00006-CO2-O1. Agradecer también la financiación al programa CERCA de la Generalitat de Catalunya. También queremos agradecer su colaboración a J. Mas and J. A. Gonzalez de Productos Alimenticios Gallo S.L. por facilitar muestras comerciales de sus fábricas.

Bibliografía

- Awika J.M. 2011. Major cereal grains production and use around the world. In: Advances in cereal science: implications to food processing and health promotion. ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC.
- Castañé, C., Riudavets, J. 2015. Sampling arthropod pests and natural enemies in stored barley. *Journal of Stored Products Research*, 64, 54–61.
- Hagstrum, D.W., Reed, C., Kenkel, P. 1999. Management of stored wheat insect pests in the USA. *Integrated Pest Management Reviews*, 4, 127–143.
- King, R.A., Moreno-Ripoll, R., Agusti, N., Shayler, S.P., Bell, J.R., Bohan, D.A., Symondson, W.O.C. 2011. Multiplex reactions for the molecular detection of predation on pest and nonpest invertebrates in agroecosystems. *Molecular Ecology Resources*, 11, 370–373.
- Laube, I., Zagon, J., Spiegelberg, A., Butschke, A., Kroh, L. W., Broll, H. 2007. Development and design of a 'ready-to-use' reaction plate for a PCR-based simultaneous detection of animal species used in foods. *International Journal of Food Science and Technology*, 42, 9–17.
- Neethirajan, S., Jayas, D.S., White, N.D.G. 2007. Detection of sprouted wheat kernels using soft X-ray image analysis. *Journal of Food Engineering*, 81, 509–513.
- Phillips, T.W., Throne, J.E. 2010. Biorational approaches to managing stored-product insects, annual review of entomology. *Annual Review of Entomology*, 55, 375–397.
- Pimentel, D., Wilson, C., McCullum, C., Huang, R., Dwen, P., Flack, J., Tran, Q., Saltman, T., Cliff, B. 1997. Economic and environmental benefits of biodiversity. *BioScience*, 47, 747–757.
- Solà M., Riudavets J., Agustí N. 2018. Detection and identification of five common internal grain insect pests by multiplex PCR. *Food Control*, 84: 246-254.
- Stejskal, V., Aulicky, R., Kucerova, Z. 2014. Pest control strategies and damage potential of seed-infesting pests in the Czech stores: A review. *Plant Protection Science*, 50, 165–173.
- Trematerra, P. 2013. Aspects related to decision support tools and integrated pest management in food chains. *Food Control*, 34, 733–742.