



ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE LA PRUEBA DE PCR ANIDADA PARA EL DIAGNÓSTICO DE ESPECIES DEL GÉNERO *XYLEBORUS* (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE: SCOLYTINAE)

STANDARDIZATION AND VALIDATION OF THE NESTED PCR TEST FOR THE DIAGNOSIS OF THE GENUS *XYLEBORUS* SPECIES (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE: SCOLYTINAE)

MARÍA ELENA SOSA-CASTILLO,¹ JOEL LARA REYNA,² LAURA DELIA ORTEGA ARENAS^{1,*} Y ALFONSINA JUDITH HERNÁNDEZ³

¹ Fitosanidad, Entomología y Acarología, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. km 36.5 Carretera México-Texcoco, 56230, Montecillo, Texcoco, Edo. de México, México. <ladeorar@colpos.mx> <alfonsina@colpos.mx>

² Colegio de Postgraduados, Campus Campeche. km 17.5 Carretera Haltunchén-Edzna, 24450, Champotón, Campeche, México. <jlara@colpos.mx>

³ Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. km 36.5 Carretera México-Texcoco, 56230, Montecillo, Texcoco, Edo. de México, México.

* Autor para correspondencia: Laura Delia Ortega Arenas <ladeorar@colpos.mx>

Recibido: 28/01/2016; aceptado: 15/09/2016

Editor responsable: Carmen Huerta

Sosa-Castillo, M. E., Lara-Reyna, J., Ortega-Arenas, L. D. y Judith-Hernández, A. (2017) Estandarización y validación de la prueba de PCR anidada para el diagnóstico de especies del género *Xyleborus* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Acta Zoológica Mexicana* (n.s.), 33(1), 18-26.

Sosa-Castillo, M. E., Lara-Reyna, J., Ortega-Arenas, L. D., & Judith-Hernández, A. (2017) Standardization and validation of the nested PCR test for the diagnosis of the genus *Xyleborus* species (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Acta Zoológica Mexicana* (n.s.), 33(1), 18-26.

RESUMEN. En este estudio se estandarizó y validó la técnica de PCR anidada para la detección rápida, sensible y confiable de especies del género *Xyleborus* mediante el uso de los “primers” externos CI-J-2183 y TL2-N-3014 e internos J2210 y N2739, que amplifican una banda de 500 pb de la región del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa subunidad I(CO1). Asimismo, se realizó la extracción de ADN de 26 ejemplares de *Xyleborus* con el kit Qiagen DNeasy® mericom Food (DMF), no reportado previamente su uso para su aplicación en insectos, que resultó en ADN suficiente y de alta calidad para reacciones de amplificación por PCR. El método permitió procesar un solo insecto por extracción, y obtener material genético de muestras conservadas en alcohol de hasta ocho años de antigüedad. El límite de detección se definió hasta una concentración de 780 pg/μl. Se optimizó la PCR en un volumen final de 15 μL sin comprometer calidad de la amplificación. La técnica estandarizada permitió la obtención de ADN de calidad, lo que aseguró alta reproducibilidad y sensibilidad en la detección de especies de *Xyleborus* y la secuenciación parcial del gen CO1 para las siete especies estudiadas; las secuencias consenso fueron analizadas por homología y depositadas en el GenBank.

Palabras clave: Escarabajos ambrosiales, identificación molecular, diagnóstico, gen CO1.

ABSTRACT. In this study it was standardized and validated the nested PCR test for rapid, sensitive and reliable detection of species of the genus *Xyleborus* using external “primers” CI-J-2183 and TL2-N-3014 and internal primers J2210 and N2739 that amplify a band of 500 bp in the region of the gene mitochondrial Cytochrome Oxidase subunit I(CO1). Also, DNA extraction from 26 specimens of *Xyleborus* was realized with kit Qiagen DNeasy® mericom Food (DMF), not previously reported its use for their application in insects, which resulted in enough DNA and high-quality for amplification by PCR reactions. The method allowed to process a single insect by extraction, and obtain genetic material from specimens preserved in alcohol of up to eight years old. The detection limit was defined up to a concentration of 780 pg/μL. The PCR was optimized in a final volume of 15 μL without compromising quality of amplification. The standardized test allowed quality DNA, which ensured high reproducibility and sensitivity in the detection of species of *Xyleborus* and partial sequencing of the CO1 gene to the seven species studied; consensus sequences were analyzed by homology and deposited in the GenBank.

Key words: Ambrosial beetles, molecular identification, diagnosis, CO1 gene.



INTRODUCCIÓN

La apertura de México al libre comercio ha incrementado el riesgo de la introducción de plagas exóticas, que por sus características fisiológicas causan pérdidas económicas, de salud y ambientales (FAO-IPPC 2007). Actualmente, en diversos cultivos de interés económico, se tienen bajo vigilancia 31 plagas identificadas como de alto riesgo, entre las que se encuentran el complejo de escarabajos ambrosiales o escolítidos del género *Xyleborus* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) (SENASICA 2015). La información relativa a especies de *Xyleborus* en México ha ido en aumento debido a que algunas especies representan riesgo para algunos árboles de importancia económica, tal es el caso de *Xyleborus affinis* (Eichhoff, 1868), *X. ferrugineus* (Fabricius, 1801), *X. volvulus* (Fabricius, 1775) y *X. glabratus* (Eichhoff, 1877). Esta última, aunque no se encuentra reportada en México, es considerada plaga potencial debido a que actúa como vector primario del hongo patógeno *Raffaelea lauricola* T.C. Harr., Fraedrich & Aghayeva que causa la “marchitez del laurel”, una enfermedad vascular letal para las plantaciones de aguacate *Persea americana* Mill. Lauraceae (Pérez *et al.* 2015b). La rápida dispersión de la plaga en EUA, aunado a la amplia disposición de hospederos susceptibles en varias entidades de México (Loera 2014), permiten prever que esta especie puede representar a corto plazo una importante amenaza fitosanitaria (SENASICA 2015). Por tanto, contar con diagnóstico preciso y oportuno, será crítico en la prevención de invasión de la especie exótica *X. glabratus*.

El diagnóstico tradicional por caracteres morfológicos específicos de especies del género *Xyleborus* generalmente es difícil, debido a la similitud morfológica existente entre las especies, o porque los ejemplares no cuentan con la calidad requerida para su determinación (Kuerová *et al.*

2009, Pérez-De La Cruz *et al.* 2009, Pérez *et al.* 2015a). Dados estos inconvenientes se han desarrollado técnicas moleculares que permiten determinar con rapidez y sensibilidad la identidad de los organismos (Cognato *et al.* 2011), mediante el uso de marcadores moleculares. En este sentido, Chang *et al.* (2013) identificaron 32 especies del género *Xyleborus* al desarrollar códigos de barras mediante una PCR dirigida a dos regiones del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa subunidad I (CO1). También se han empleado técnicas moleculares para definir la filogenia de *Xylosandrus* (Dole *et al.* 2010), y se ha hecho uso de la secuenciación de proteínas de la subunidad grande del ribosoma (LSU rADN), para la determinación de los hongos asociados con *X. glabratus* (Harrington *et al.* 2010).

La PCR ha ganado aceptación debido a su rapidez, sensibilidad y reproducibilidad en la determinación específica por lo que en este estudio se propuso como objetivo validar y estandarizar esta herramienta como elemento de diagnóstico de especies de *Xyleborus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico. Se utilizaron individuos donados a partir de la colección entomológica del Centro Nacional de Referencia Fitosanitario (CNRF) y del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, México, previamente identificados mediante caracteres taxonómicos por el personal del CNRF, Dr. Armando Equihua Martínez y M.C. Mauricio Pérez Silva. Las muestras incluían individuos pertenecientes al género *Xyleborus*, colectados en diferentes trampas con luz instaladas en plantaciones de cacao y aguacate en Tabasco y Michoacán, México y Florida, EUA (Cuadro 1) y preservados en seco o eta-

Cuadro 1. Especies del género *Xyleborus*, utilizados para la extracción de ADN y amplificación del gen CO1, colectados en trampas de luz instaladas en plantaciones de cacao y aguacate en Tabasco y Michoacán, México y Florida, EUA.

Especie	Hospedero	Lugar de colecta	Fecha de colecta
<i>X. affinis</i> (Eichhoff, 1868)	Aguacate	Uruapan, Mich.	2014
<i>X. ferrugineus</i> (Fabricius, 1801)	Cacao	Cárdenas, Tab.	2007
<i>X. glabratus</i> (Eichhoff, 1877)	Aguacate	Florida, USA	2007
<i>X. horridus</i> (Eichhoff, 1869)	Cacao	Cárdenas, Tab.	2007
<i>X. intrusus</i> (Blandford, 1898)	Cacao	Cárdenas, Tab.	2007
<i>X. spinulosus</i> (Blandford, 1898)	Cacao	Teapa, Tab.	2007
<i>X. volvulus</i> (Fabricius, 1775)	Cacao	Cárdenas, Tab.	2012

nol a 70%. En todos los individuos se documentaron las características morfológicas distintivas de cada ejemplar utilizando un fotomicroscopio Tesovar (Carl Zeiss), para posteriormente realizar la extracción de ADN.

Extracción de ADN a partir de especímenes de *Xyleborus*. Previo a la extracción de ADN, los especímenes se lavaron, tres veces con 500 μ L de TAE 1X durante 5 min, para eliminar el etanol. Cada espécimen se colocó en una sanita estéril, y se dejó secar por 48 h. El ADN se extrajo individualmente de hembras adultas del género *Xyleborus*, empleando el kit de Qiagen DNeasy® mericom Food [69514] (DMF) (Qiagen 2010) siguiendo las instrucciones marcadas por el fabricante, con las siguientes modificaciones: 1) se utilizó un solo espécimen por tubo de reacción, macerando el insecto con 100 μ L de buffer de lisis y con la ayuda de un micropistilo (Diag-ger Company); 2) el volumen de los reactivos fue de 0.3 μ L de Proteínasa K; 100 μ L de cloroformo, buffer PB y AW2; y 3) el ADN se recuperó con 20 μ L de buffer EB. En esta primera etapa se realizaron extracciones de dos ejemplares de *X. affinis* y dos de *X. volvulus*. Una vez verificada la presencia de ADN mediante la medición por espectrofotometría (Nanodrop®), se realizó la extracción con ejemplares representantes de siete especies.

Estandarización y validación del PCR. La estandarización y validación se realizó con ejemplares del género *Xyleborus* y para comprobar que se obtuvo la calidad mínima de ADN extraído para las reacciones de PCR se realizaron reacciones de amplificación con dos pares de oligos dirigidos al gen CO1, mediante el uso de los oligos externos reportados por Cognato y Sperling (2000): CI-J-2183 5'-CAACATTT ATTTTGGATTTTGG-3' y TL2-N-3014 5'-TCCAATGCACTAAT CTGC CATTATTA-3' y los oligos internos reportados por Chang et al. (2013) J2210 5'-TCGCAT ATTATTAGGCAAGA-AAGAG-3' y N2739 5'-AGAAAT GTTGTG GGAAGA-AAG-3. La primera amplificación generó un fragmento de aproximadamente 1300 pb, y la segunda amplificación un fragmento de ~500 pb. En la estandarización de la amplificación se evaluaron dos polimerasas comerciales de Promega (Go Taq® Flexi (M8295) y Go Taq® (M3005)) (Promega 2015), se ajustaron las temperaturas de alineamiento, así como la concentración de los componentes de la reacción (Bolívar et al. 2014). La reacción de PCR se optimizó para realizar en un volumen final de entre 10 y 15 μ L por reacción.

Límite de detección. Fue pertinente establecer el límite de detección (LD) de las muestras de ADN obtenido con-

siderando que el tamaño de los especímenes de *Xyleborus* es muy pequeño (2.3 mm) excepto *X. horridus* (4 mm) (Pérez et al. 2015a), y el peso no llega al mínimo sugerido por el kit comercial (200 mg), por lo que existía la posibilidad de extraer ADN insuficiente para la reacción de PCR. Para establecer el límite de detección se realizaron diluciones seriales con un factor de 10 a partir de las muestras de PCR amplificadas. Así se realizaron diluciones desde 10^{-1} hasta 10^{-5} (Jiménez et al. 2014), que correspondieron a 780 ng/ μ L (ADN sin diluir) y 0.078 pg/ μ L, respectivamente.

Posteriormente los productos de PCR se fraccionaron en un gel de agarosa a 1.5 % que se tiñó con bromuro de etidio (0.5 μ L). La electroforesis se realizó a 90 V por 40 min en una solución amortiguadora TAE 1X (4.68g de Tris Base 1M pH 8.0; 1.14 mL de ácido acético glacial y 2 g de EDTA 0.5M). Para su visualización se comparó el tamaño del amplicon con el marcador de peso molecular (MM) de 100 pb.

Análisis molecular. Los productos de la PCR obtenidos a partir de 26 individuos del género *Xyleborus* se limpiaron siguiendo el proceso establecido en el kit Wizard®SV Gel y PCR Clean-Up System (Promega® Cat: a9282) de acuerdo con las recomendaciones del proveedor. Este producto fue enviado a secuenciar al Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBT UNAM) con los oligos internos (J2210 y N2739). Los electroferogramas se editaron y analizaron mediante un alineamiento por homología utilizando el programa *Clustal W* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/cluster/>) implementado en la versión 6.0 del programa Mega (Tamura et al. 2013).

RESULTADOS

Identificación morfológica. Se corroboró la identidad de los ejemplares de acuerdo a la clave propuesta por Pérez et al. (2015a). La diferenciación de especies del género se hizo con base en caracteres morfológicos como las crenulaciones del pronoto, forma del mazo antenal, forma y ornamentaciones del margen anterior del pronoto, dientes en la protibia y declive elitral, entre otros (Fig. 1) (Wood 1986, Rabaglia et al. 2006, Pérez et al. 2015a). Además, las características distintivas de *Xyleborus affinis*, *X. ferrugineus*, *X. glabratus*, *X. horridus*, *X. intrusus*, *X. spinulosus* y *X. volvulus* (Fig. 1) fueron validadas por el M. en C. Pérez, especialista en el grupo, y que coincidieron con las reportadas en la literatura (Pérez-De La Cruz et al. 2009, Atkinson et al. 2013, Pérez et al. 2015a).

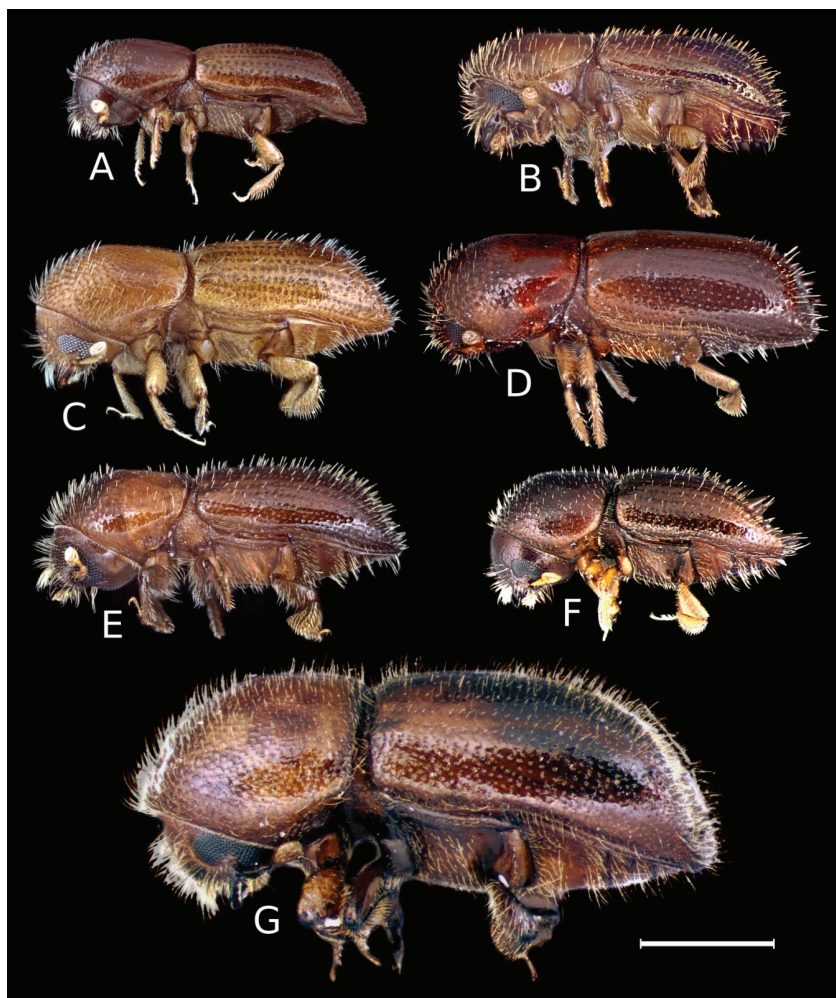


Figura 1. Vista lateral de especies de *Xyleborus*. A) *Xyleborus glabratus*, B) *Xyleborus affinis*, C) *X. ferrugineus*, D) *X. intrusus*, E) *X. volvulus*, F) *X. spinulosus* y G) *X. horridus*. Escala: 1mm.

Extracción de ADN a partir de especímenes de *Xyleborus*. Aun cuando el kit DFM de Qiagen® no es específico para insectos y no estaba documentado su uso para este grupo de organismos, resultó adecuado en la extracción de ADN a partir de un individuo de *Xyleborus*, de manera sencilla, rápida, reproducible con calidad y cantidad suficiente para realizar reacciones de amplificación del ADN. El total de las extracciones amplificaron un fragmento de ~500 pb correspondientes a una sección del gen COI (Fig. 2). Una utilidad práctica del kit DMF Qiagen® fue el hecho de que la mayoría de las muestras procesadas tenían una antigüedad de ocho años de conservación en etanol a 70% o en seco, como el caso de *X. glabratus*, por lo que su aplicación en material almacenado es evidente, sin

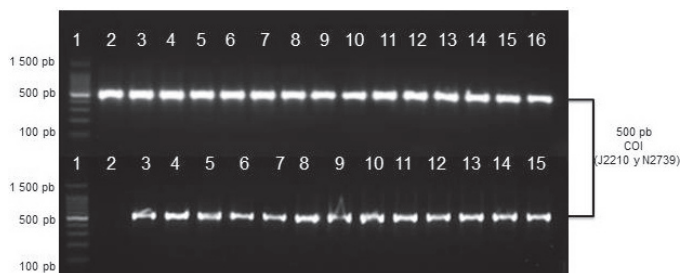


Figura 2. Amplificación del ADN extraído de diferentes muestras de *Xyleborus* con el Kit DMF Qiagen® dirigido al gen COI. Arriba: 1) Marcador de peso molecular (100 pb Ladder), 2-7) *X. affinis*, 8-13) *X. ferrugineus*, 14-16) *X. horridus*. Abajo: 1) MPM, 2) control negativo, 3) *X. glabratus*, 4-6) *X. intrusus*, 7-9) *X. spinulosus*, y 10-15) *X. volvulus*.

Cuadro 2. Rendimiento promedio de ADN extraído de diferentes especies de *Xyleborus* con el Kit DMF Qiagen® dirigido al gen CO1.

Especies	Año de colecta	Rendimiento ng/μL
<i>X. affinis</i>	2014	61.1
<i>X. volvulus</i>	2012	48.5
<i>X. horridus</i> , <i>X. spinulosus</i> , <i>X. intrusus</i> , <i>X. glabratus</i> , <i>X. ferrugineus</i>	2007	10.46

embargo, se observó mejor rendimiento de ADN en las muestras con menor tiempo de preservación (Cuadro 2).

Estandarización y validación de la PCR. El ADN obtenido mediante el kit DMF Qiagen® fue evaluado en su calidad para realizar una reacción de amplificación. Antes de realizar dicho procedimiento se probaron las condiciones de amplificación debido a que algunas amplificaciones iniciales no tuvieron la reproducibilidad esperada, por lo que se procedió a estandarizar las condiciones de amplificación.

Se evaluaron dos polimerasas comerciales, varias temperaturas de alineamiento y diferentes concentraciones de cada uno de los componentes de la mezcla de reacción.

Cuadro 4. Optimización de la reacción de la PCR en volumen de 15 μL con la enzima Go Taq® (M3005).

Reactivos	Concentración final	1X (μL)
Agua HPLC		6.3
Buffer PCR 5X	1X	3.0
dNTP's 10mM	200 μM	0.3
Oligo Forward 10mM	200 μM	0.3
Oligo reverse 10mM	200 μM	0.3
Taqpolimerasa 5U/μL	2 U	0.24
Muestra ADN	10-50 ng/μL	3.0
Volumen final	15 μL	

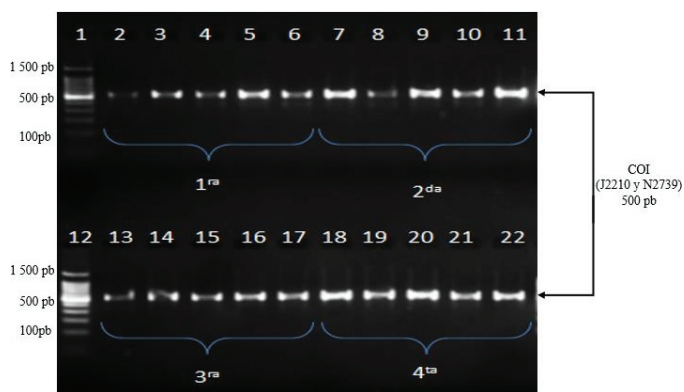


Figura 3. Reproducibilidad de la PCR-anidada, de acuerdo a las condiciones previamente estandarizadas y validadas. 1 y 12) MM 100 pb; 2-6) 1er ensayo del PCR con cinco repeticiones; 7-11) 2do ensayo del PCR con cinco repeticiones; 13-17) 3er ensayo del PCR con cinco repeticiones; 18-22) 4to ensayo del PCR con cinco repeticiones.

Una vez evaluados los diferentes parámetros se definieron las condiciones que dieron como resultado alta reproducibilidad en las amplificaciones (Fig. 3) (Cuadro 3). La reacción de amplificación se estandarizó para un volumen final de 15 μL (Cuadro 4).

Análisis molecular. El segmento amplificado correspondió a ~500 pb del gen CO1. Se observó 100 % de homología entre las secuencias de la misma especie, asimismo, se determinaron los especímenes con base en las características morfológicas distintivas. Las secuencias consenso fueron analizadas por homología y depositadas en el GenBank a través de la aplicación BLAST (Cuadro 5).

Puesto que las amplificaciones se realizaron a partir de especies identificadas taxonómicamente para dar certidumbre, se realizaron las secuenciaciones de cada amplificación por triplicado. Con la secuencias consenso obtenidas de las tres secuencias, el análisis BLAST in-

Cuadro 3. Programa de amplificación para especies del género *Xyleborus*, citado por Chang *et al.* (2013), con modificación en la temperatura de alineación.

Pasos de amplificación	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1 Desnaturalización inicial	94 °C	5 min	1
2 Desnaturalización del ADN molde	94 °C	30 s	
3 Hibridación de los oligonucleótidos	52.5 °C	45 s	35
4 Extensión de la copia	72 °C	45 s	
5 Extensión final	72 °C	10 min	1



Cuadro 5. Número de acceso de secuencias consenso para especies del género *Xyleborus* derivadas de este estudio y depositadas en el GenBank.

Especie	Origen	Número de acceso al GenBank
<i>Xyleborus affinis</i>	Uruapán, Michoacán	KX825867
		KX825868
		KX825869
<i>Xyleborus ferrugineus</i>	Cárdenas, Tabasco	KX825870
		KX825871
		KX825872
		KX825873
		KX825874
<i>Xyleborus glabratus</i>	Florida, USA	KX825879
<i>Xyleborus horridus</i>	Cárdenas, Tabasco	*
<i>Xyleborus intrusus</i>	Cárdenas, Tabasco	*
<i>Xyleborus spinulosus</i>	Cárdenas, Tabasco	*
<i>Xyleborus volvulus</i>	Cárdenas, Tabasco	KX825875
		KX825876
		KX825877
		KX825878

* En proceso de liberación por ser las primeras secuencias del gen CO1 depositadas en el GenBank para las especies.

dicó que para *X. affinis* se obtuvo una homología de 92% con una de las secuencias para *X. affinis* presentes en el GenBank (AF187138.1); las secuencias generadas para *X. spinulosus*, *X. horridus* e *X. intrusus*, presentaron baja homología contra otras especies por no haber secuencias para CO1 disponibles para estas especies. Por tanto, estas son las primeras secuencias del gen CO1 depositadas en el GenBank para estas tres especies. La secuencia generada para *X. ferrugineus* presentó una identidad de 79% contra la secuencia JX424246.1 de la misma especie.

DISCUSIÓN

El diagnóstico tradicional de especies del género *Xyleborus* por caracteres morfológicos específicos generalmente es difícil, debido a la similitud morfológica existente entre las especies. No obstante, mediante el uso de claves específicas como la propuesta por Pérez *et al.* (2015a) fue posible reconocer las características distintivas de las especies estudiadas.

En este estudio, se confirma que el uso del kit de extracción Qiagen DNeasy[®] mericon Food (69514) para obtener material genético de especies del género *Xyleborus* (preservados hasta por ocho años, en seco ó en alcohol a

70%) fue confiable y sensible pues el ADN extraído de un ejemplar de *Xyleborus* fue suficiente (10.46 a 61.1 ng/ μ L) para obtener el producto de la amplificación esperado. El método permitió también obtener ADN de calidad, partiendo incluso de solo una parte del individuo (*X. horridus* tamaño promedio 4.0 mm) debido a que se obtuvo buen producto de amplificación de la cabeza, abdomen y apéndices. Este resultado coincide con lo reportado por autores quienes señalan que la calidad del ADN extraído mediante el uso del kit DFM se debe principalmente a la utilización de CTAB (Bromuro de Cetil-Trimetil-Amónio); reactivo que ayuda a la eliminación de polisacáridos proteínas y polifenoles de la muestra, lo cual mejora la calidad del ADN extraído (Marzachi *et al.* 1998, Reineke *et al.* 1998, Kušec *et al.* 2015, Schwerer *et al.* 2015). Contrario a ello Volk *et al.* (2014), señalan que el bajo rendimiento de ADN (cantidad y calidad) obtenido con el kit DMF, junto con el alto costo, en comparación con otras metodologías, pone en duda el uso práctico del kit. No obstante, se debe considerar que la obtención de material genético para un análisis molecular, ya sea para confirmar identidad como en este trabajo, o para estudios filogenéticos, de diversidad o ecología molecular depende, con frecuencia, del tipo, tamaño y tiempo de preservación del material (Barrio-Caballero 2012, Martínez de la Puente *et al.* 2013), debido a que generalmente se obtienen mejores resultados con ejemplares grandes, frescos y correctamente conservados (Cornejo *et al.* 2014).

Otro factor que repercutió en la calidad de la amplificación fue la temperatura de alineamiento (*T_m*). Si bien se observó amplificación de calidad en las temperaturas de 49.1, 50.7 y 52.5 °C, valores cercanos a la *T_m* (47 °C) utilizada por Chang *et al.* (2013) en la PCR para el diagnóstico de *Xyleborus*, los mejores resultados se lograron con una *T_m* de 52.5 °C debido a que se generó un amplicon de mejor calidad en comparación con el resto de las temperaturas evaluadas (Bolívar *et al.* 2014, Cornejo *et al.* 2014).

Asimismo, los ensayos realizados para determinar la concentración de los dNTP's y oligos indicaron que la amplificación de mejor calidad se logró con la concentración de 200 μ M. Estos valores coinciden con los recomendados por diversos autores, quienes señalan que la concentración tanto de dNTP's y oligos debe usarse con precisión debido a que un exceso o déficit puede ocasionar errores en la PCR (Bolívar *et al.* 2014, Suzuki y Yao 2014). Al respecto Cornejo *et al.* (2014), y Bolívar *et al.* (2014), reportan que la presencia de dímeros, ocasionados por exceso de reactivos (MgCl₂, dNTP's

y oligos) compromete el éxito en la amplificación del ADN molde.

Los ensayos realizados revelaron la estandarización y validación de la técnica al observarse una alta reproducibilidad en la amplificación de las repeticiones de la PCR; es decir, la existencia de 100 % de probabilidad de encontrar el mismo resultado entre las muestras. Estos hallazgos coinciden con autores quienes refieren la alta reproducibilidad de la técnica de PCR y sus variantes como una herramienta confiable en la detección de diferentes organismos, además de su alta sensibilidad y rapidez; características que le confieren gran ventaja frente a los métodos convencionales (Villarreal *et al.* 2008, Cornejo *et al.* 2014, Hernández y Guzmán 2014).

Aun cuando la identificación morfológica de las especies en este estudio, coincide con los caracteres diacríticos para cada especie de acuerdo a las claves taxonómicas y se dio certidumbre a las secuencias obtenidas, ya que se realizaron al menos tres réplicas de secuenciación para cada especie, se presentaron algunas inconsistencias y bajo porcentaje de homología respecto a la información reportada en el GenBank. Por ejemplo, las secuencias de este estudio correspondientes a *X. ferrugineus* presentaron homología con *Xyleborus schaufussi* (Blandford, 1894) (AB588939.1) con una identidad y cobertura de 83% y 99%, respectivamente, especie que de acuerdo con Pérez *et al.* (2015a y b) no está reportada para el país, aspecto que pone en duda la identidad taxonómica de la especie. Por otro lado, en la base de datos solo esta reportada una secuencia para *X. ferrugineus* (JX424246.1) para el gen CO1, sin embargo, la información no es homóloga a la secuencia obtenida para esta especie en el presente estudio. La no coincidencia en secuencias quizás se deba a una determinación errónea, de origen, de la especie y secuencia disponible en el GenBank, puesto que los especímenes que se trabajaron en este estudio fueron determinados con base en clave específica para especies mexicanas, las características distintivas de la especie fueron corroboradas por los especialistas y se revisaron varios especímenes. Algo similar, se presentó con las secuencias para *X. affinis*, *X. volvulus* y *X. glabratus* reportadas por Cognato *et al.* (2011), pues no hubo coincidencia con las reportadas en el presente estudio. La única secuencia donde se encontró concordancia en 93% y 100% de cobertura entre la información encontrada en este trabajo con la reportada en el GenBank fue para *X. affinis* con número de acceso AF187138.1; sin embargo, no se encontró artículo publicado relacionado que permitiera conocer si previo al análisis molecular se corroboró la determinación morfológica

de la especie. Asimismo, no se encontraron secuencias en la base de datos NCBI para confrontar la información de las especies de *X. horridus*, *X. intrusus* y *X. spinulosus*, de modo que las secuencias derivadas de este estudio se constituyen en los primeros registros fiables para dichas especies. Los números de acceso al GenBank de las mismas se anotan en el Cuadro 5.

Aun cuando se tiene un avance en el conocimiento y se cuenta con la técnica de PCR anidada para la detección rápida, sensible y confiable de especies del género *Xyleborus* es necesario ampliar las pruebas a otras especies para conocer con precisión los alcances de la herramienta y obtener información que permita la identificación veraz y oportuna de especies del género *Xyleborus* en cualquier estadio de su ciclo de vida.

CONCLUSIONES

La implementación del kit DMF fue apta para la obtención de material genético de especies del género *Xyleborus* en un menor tiempo y con la calidad adecuada, lo que permite su amplificación mediante PCR-anidada.

El método permitió procesar un solo insecto por extracción, y obtener material genético de muestras de varios años de preservación. Se estandarizó, validó y optimizó la técnica de PCR-anidada con alta reproducibilidad, aportando resultados de mayor confiabilidad permitiendo la correcta identificación molecular de las especies evaluadas. Se obtuvo la secuenciación parcial del gen CO1 para *Xyleborus affinis*, *X. ferrugineus*, *X. glabratus*, *X. horridus*, *X. intrusus*, *X. spinulosus* y *X. volvulus*. De esta manera el implementar esta metodología para el diagnóstico de especies *Xyleborus* constituye una alternativa de diagnóstico complementaria a la tradicional.

AGRADECIMIENTOS. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico para la realización de estudios de Maestría del primer autor, al personal del CNRF, al Dr. Armando Equihua Martínez y Dr. Francisco Javier Avendaño Gutiérrez por los ejemplares proporcionados, al M.C. Mauricio Pérez Silva por la corroboración taxonómica de los ejemplares y al M.C. Jorge Valdez Carrasco por el apoyo técnico en el trabajo fotográfico.

LITERATURA CITADA

- Atkinson T. H., Carrillo, D., Duncan, R. E. & Peña, J. E. 2013. Occurrence of *Xyleborus bispinatus* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) Eichhoff in southern Florida. *Zootaxa*, 3669, 96-100.



- Barrio-Caballero, P. A.** 2012. Revisión de métodos de extracción de ADN a partir de restos óseos en el laboratorio forense. *Revista Española Médico Legal*, 39, 54-62.
- Bolívar A. M., Rojas, A. & García-Lugo, P.** 2014. PCR y PCR-Múltiple: parámetros y protocolos de estandarización. *Avances en Biomedicina*, 3, 25-33.
- Chang H., Liu, Q., Hao, D., Liu, Y., An, Y., Qian, L. & Yang, X.** 2013. DNA barcodes and molecular diagnostics for distinguishing introduced *Xyleborus* (Coleoptera: Scolytinae) species in China. *Mitochondrial ADN*. Early Online, 1-7.
- Cognato A. I., Hulcr, J., Dole, S. A. & Jordal, B. H.** 2011. Phylogeny of haplo-diploid, fungus-growing ambrosia beetles (Curculionidae: Scolytinae: *Xyleborini*) inferred from molecular and morphological data. *Zoologica Scripta*, 40, 174-186.
- Cognato, A. I. & Sperling, F. A.** 2000. Phylogeny of *Ips* DeGeer species (Coleoptera: Scolytidae) inferred from mitochondrial cytochrome oxidase I DNA sequence. *Molecular Phylogenetic Evolution*, 14, 445-460.
- Cornejo, R. A., Serrato D., A., Rendón A., B. & Rocha M., M. G.** 2014. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC), Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-I), 255 pp.
- Dole, S. A., Jordal, B. H. & Cognato, A. I.** 2010. Polyphyly of *Xylosandrus* Reitter inferred from nuclear and mitochondrial genes (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54, 773-782.
- FAO-IPPC** 2007. NIMF N° 2. Marco para el análisis de riesgo de plagas. Normas Internacionales para Medidas Fitosanitarias. Secretaría de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria. Disponible en: <http://www.cosave.org/sites/default/files/nimfs/cfd338f5bbd3cf63500f97fbc940633.pdf> (Consulta: Mayo 2015).
- Harrington T. C., Aghayeva, D. N. & Fraedrich, S. W.** 2010. New combinations in *Raffaelea*, *Ambrosiella* and *Hyalorhynchidiella*, and four new species from the redbay ambrosia beetle, *Xyleborus glabratus*. *Mycotaxon*, 111, 337-361.
- Hernández, G., A. K. & Guzmán B., M. M.** 2014. Detección del virus del amarillamiento de los nervaduras de la hoja de la papa en diferentes órganos de *Solanum tuberosum* grupo Phureja cv Criolla Colombia utilizando RT-PCR convencional y en tiempo real. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 16, 74-85.
- Jiménez A., Cortez, S., Duarte, L. Z., Martínez, M., Flórez, S. Y., Méndez, C., Granados, M. & Villamizar, A.** 2014. Estandarización de una PCR anidada para la identificación de *Lawsonia intracellularis* en porcinos. *Spei Domus*, 10, 23-29.
- Kuerová Z., Li, Z. & Hromádková, J.** 2009. Morphology of nymphs of common stored-product psocids (Psocoptera: Liposcelididae). *Journal Stored Products Research*, 45, 54-60.
- Kušec I. D., Radišić, Ž., Komlenić, M. & Kušec, G.** 2015. Comparison of commercial DNA Kits and traditional DNA extraction procedure in PCR detection of pork in dry/fermented sausages. ISSN 1330-7142. UDK: 637.52:636.082. Disponible en: http://bib.irb.hr/datoteka/779345.47_Djurkin_Kusec_ENGEDIT_20_07_2015.pdf (Consulta: Noviembre 2015).
- Loera, F.** 2014. The family Lauraceae in Mexico. In: *Memoria del Simposio Internacional sobre Manejo y Control de Plagas Cuarentenarias (Caso: Escarabajos ambrosiales, Xyleborus glabratus y Euwallacea sp.) en el aguacatero*. 3 al 7 de noviembre 2014. Xalapa, Veracruz, México. 62 pp.
- Martínez-de la Puente J., Ruiz, S., Soriguer, R. & Figueroa, J.** 2013. Effect of blood meal digestion and DNA extraction protocol on the success of blood meal source determination in the malaria vector *Anopheles atroparvus*. *Malaria Journal*, 12, 109.
- Marzachi, C., Veratti, F. & Bosco, D.** 1998. Direct PCR detection of phytoplasmas in experimentally infected insects. *Annals of Applied Biology*, 133, 45-54. doi: 10.1111/j.1744-7348.1998.tb05801.x
- Pérez, S. M., Equihua M., A. & Atkinson, T. H.** 2015a. Identificación de las especies mexicanas del género *Xyleborus* Eichhoff, 1864 (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Insecta Mundi*, 0440, 1-35.
- Pérez, S. M., Equihua M., A., Estrada V., E., Muñoz V., A.L., Valdez C., J.M., Sánchez E., J. & Atkinson, T. H.** 2015b. Sinopsis de especies mexicanas del género *Xyleborus* Eichhoff, 1864 (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Acta Zoológica Mexicana (n.s.)*, 31, 239-250.
- Pérez-De La Cruz, M., Equihua M., A., Romero-Nápoles, J., Valdez-Carrasco, J. M. & De La Cruz-Pérez, A.** 2009. Claves para la identificación de escolitinos (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) asociados al agro-ecosistema del cacao en el sur de México. *Boletín del Museo de Entomología de la Universidad del Valle*, 10, 14-29.
- Promega** 2015. Certificate of analysis GoTaq ADN polimerasa (M3005). Disponible en: <https://worldwide.promega.com/~media/files/resources/protocols/product%20information%20sheets/g/gotaq%20ADN%20polymerase%20m300.pdf> (Consulta: Agosto 2015).
- Qiagen** 2010. DNeasy® mericon TM Food Handbook for extraction of total nucleic acids from a range of food simple types. Disponible en: <https://www.qiagen.com/hk/resources/resourcedetail?id=d0e372d7-6f6a-415e-9d72-297a53d95854&lang=en> (Consulta: 2015).
- Rabaglia R. J., Dole, S. A. & Cognato, A. I.** 2006. Review of American *Xyleborina* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) occurring north of Mexico, with an illustrated key. *Annals of the Entomological Society of America*, 99, 1034-1056.
- Reineke A., Karlovsky, P. & Zebitz C., P. W.** 1998. Preparation and purification of ADN from insects for AFLP analysis. *Insect Molecular Biology*, 7, 95-99. doi: 10.1046/j.1365-2583.1998.71048.x.
- Schwerer M. J., Vogl, S. & Graw, M.** 2015. Extraction of ADN from gastric content in different stages of digestion. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigss.2015.10.004> (Consulta: Noviembre 2015).
- SENASICA.** 2015. Escarabajo ambrosial del Laurel Rojo *Xyleborus glabratus*, Eichhoff (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México*. 11 pp.
- Suzuki, S. & Yao, I.** 2014. Isolation of nine polymorphic microsatellite loci from the burying beetle, *Nicrophorus quadripunctatus* (Coleoptera: Silphidae). *Applied Entomology*, 49, 493-497.

- Tamura K., Stecher, G., Peterson, D. & Kumar, S.** 2013. Mega 6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30, 2725-2729.
- Villarreal, J., Soto, Z., Pereira, N., Varela, L., Jaramillo, R., Villanueva, D. & Mendoza, E.** 2008. Reacción en cadena de la polimerasa para la detección de *Salmonella sp.* en leche en polvo. Optimización del método en 12 horas. *Salud Uninorte*, 2, 216-225.
- Volk H., Piskernik, S., Kurinčič, M., Klančnik, A. & Jeršek, B.** 2014. Evaluation of different methods for DNA extraction from milk. *Journal of Food and Nutrition Research*, (2), 1-10.
- Wood, S. L.** 1986. A reclassification of the genera of Scolytidae (Coleoptera). *Great Basin Naturalis Memoirs*, 10, 126.