

## **DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ESPECIES DEL GÉNERO *Xyleborus* (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE: SCOLYTINAE)**

Ortega-Arenas, Laura Delia<sup>1</sup>; Sosa-Castillo, María Elena<sup>1</sup>; Lara-Reyna, Joel<sup>2</sup>;  
Hernández-Alfonsina, Judith<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Fitosanidad, Entomología y Acarología y <sup>3</sup>Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Km. 36.5 Carretera México-Texcoco, 56230, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México, <sup>2</sup>Colegio de Postgraduados, Campus Campeche. Km. 17.5 Carretera Haltunchén-Edzna, 24450, Champotón, Campeche, México. Correo-e: ladeorar@colpos.mx

### **Resumen**

En este estudio, se realizó el diagnóstico de especies del género *Xyleborus* mediante la técnica de PCR anidada y 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 (COI). Asimismo, se realizó la extracción de ADN de 26 ejemplares de *Xyleborus* con el kit Qiagen DNeasy® mericom Food (DMF), 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 8 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 COI para las siete especies estudiadas; las secuencias consenso fueron analizadas por homología y depositadas en el GenBank.

**Palabras clave adicionales:** Escarabajos ambrosiales, identificación molecular, gen COI.

## **MOLECULAR DIAGNOSIS OF THE GENUS *Xyleborus* SPECIES (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE: SCOLYTINAE)**

### **Abstract**

In this study, the diagnosis of species of *Xyleborus* was conducted using the nested PCR and 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 mitochondrial gene Cytochrome Oxidase subunit I (COI). Also, DNA extraction from 26 specimens of *Xyleborus* was conducted with the kit Qiagen DNeasy® mericom Food (DMF), which resulted in enough DNA 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 8 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 gene COI to the seven species studied. Consensus sequences were analyzed by homology and deposited in the GenBank.

**Additional keywords:** Ambrosial beetles, molecular identification, COI 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, se tienen bajo vigilancia a 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). Ésta 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 *X. glabratus* 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). 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 evaluar esta herramienta como elemento de diagnóstico de especies de *Xyleborus*.

### **Materiales y Métodos**

Se utilizaron individuos donados a partir de la colección entomológica del Centro Nacional de Referencia Fitosanitario (CNRF, DGSV, SENASICA) y del Colegio de Postgraduados, previamente identificados mediante caracteres taxonómicos por el personal del CNRF, Dr. Armando Equihua Martínez y M.C. Mauricio Pérez Silva (Cuadro 1) y preservados en seco o etanol al 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.

Cuadro 1. Individuos del género *Xyleborus*, utilizados para la extracción de ADN y amplificación del gen COI, 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

Previo a la extracción de ADN, los especímenes se lavaron tres veces con 500  $\mu$ 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), 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  $\mu$ L de buffer de lisis y con la ayuda de un micropistilo (Diagger Company); 2) el volumen de los reactivos fue de 0.3  $\mu$ L de Proteinasa K; 100  $\mu$ L de cloroformo, buffer PB y AW2; y 3) el ADN se recuperó con 20  $\mu$ 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.

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 COI, mediante el uso de los oligos externos reportados por Cognato y Sperling (2000): CI-J-2183 5'-CAACATTT ATTTTTGATTTTTTGG-3' y TL2-N-3014 5'-TCCAATGCACTAAT CTGC CATATTA-3' y los oligos internos reportados por Chang et al. (2013) J2210 5'-TCGCAT ATTATTAGGCAAGAAAGAG-3' y N2739 5'-AGAAAT GTTGTG GGAAGAAAG-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), 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  $\mu\text{L}$  por reacción. También se estableció un límite de detección de las muestras de ADN obtenido, considerando que el tamaño de los especímenes de *Xyleborus* es muy pequeño (2.3 mm), excepto *X. horridus* ( $\chi$  4 mm) (Pérez et al., 2015a) y su 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  $10^{-5}$  que correspondieron a 780 ng/ $\mu\text{L}$  (ADN sin diluir) y 0.078 pg/ $\mu\text{L}$ , respectivamente.

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

Los productos de la PCR obtenidos a partir de 26 individuos del género *Xyleborus*, se limpiaron siguiendo proceso establecido en el kit Wizard®SV Gel & PCR Clean-Up System (Promega® Cat: a9282) de acuerdo a 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/clustalo/>) implementado en la versión 6.0 del programa Mega (Tamura et al., 2013).

## Resultados y Discusión

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 distintivos (Rabaglia et al., 2006; Pérez et al., 2015a), mismas que 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).

A pesar de que el kit DFM de Qiagen® no es específico para insectos y no está 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 y con calidad y cantidad suficiente para realizar reacciones de amplificación del ADN por PCR. El total de las extracciones amplificaron un fragmento de ~500 pb correspondientes a una sección del gen COI. Una utilidad práctica del kit DMF Qiagen® fue el hecho de que la mayoría de las muestras procesadas tenían una antigüedad de 8 años de conservación en etanol al 70% ó en seco

como el caso de *X. glabratus*, por lo que su aplicación en material almacenado es evidente, sin embargo, se observó mejor rendimiento de ADN en las muestras con menor tiempo de preservación (Cuadro 2).

Se evaluaron dos polimerasas comerciales, con varias temperaturas de alineamiento y diferentes concentraciones de cada uno de los componentes de la mezcla de reacción. Una vez evaluados los diferentes parámetros, se definieron las condiciones que dieron como resultado alta reproducibilidad en las amplificaciones. La reacción de amplificación se estandarizó para un volumen final de 15  $\mu$ L (Cuadro 3).

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

Especies	Año de colecta	Rendimiento ng/ $\mu$ L
<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

Cuadro 3. Optimización de la reacción de la PCR en volumen de 15  $\mu$ L con la enzima Go Taq® (M3005).

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

El segmento amplificado correspondió a ~500 pb del gen COI. Se observó un 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.

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 un 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 (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.

Con base en el objetivo establecido en este estudio se puede concluir que la implementación del kit DMF fue apta para la obtención de material génico 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, lo que permite la correcta identificación molecular de las especies de insectos evaluados. Se obtuvo la secuenciación parcial del gen COI 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.

#### Literatura Citada

- Atkinson, T.H., D. Carrillo, R.E. Duncan, and J.E. Peña. 2013. Occurrence of *Xyleborus bispinatus* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) Eichhoff in southern Florida. *Zootaxa* 3669(1):96-100.
- Bolívar, A.M., A. Rojas, and P. García-Lugo. 2014. PCR y PCR-Múltiple: parámetros y protocolos de estandarización. *Advanced Biomedical Research* 3(1):25-33.
- Chang, H., Q. Liu, D. Hao, Y. Liu, Y. An, L. Qian, and X. Yang. 2013. DNA barcodes and molecular diagnostics for distinguishing introduced *Xyleborus* (Coleoptera: Scolytinae) species in China. *Mitochondrial ADN*. Early Online 1-7.
- Cognato, A.I., and F.A. Sperling. 2000. Phylogeny of *Ips* DeGeer species (Coleoptera: Scolytidae) inferred from mitochondrial cytochrome oxidase I DNA sequence. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 14:445-460.
- Cornejo, R.A., D. Serrato, A. Rendón, and M.G. Rocha. 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 p.

- 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/cfd338f5bbd3cf63500f97fbca\\_940633.pdf](http://www.cosave.org/sites/default/files/nimfs/cfd338f5bbd3cf63500f97fbca_940633.pdf) (Consulta: Mayo 2015).
- Hernández, G., A.K. y M.M. Guzmán. 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* XVI: 74-85.
- Kuerová, Z., Li Z., and J. Hromádková. 2009. Morphology of nymphs of common stored-product psocids (Psocoptera: Liposcelididae). *Journal Stored Products Research* 45:54-60.
- 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 p.
- Pérez, S.M., A. Equihua M., and T.H. Atkinson. 2015a. Identificación de las especies mexicanas del género *Xyleborus* Eichhoff, 1864 (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Insecta Mundi* 0440:1-35.
- Pérez, S.M., A. Equihua M., E. Estrada V., V. Muñoz A.L., J.M. Valdez C., J. Sánchez E., and T.H. Atkinson. 2015b. Sinopsis de especies mexicanas del género *Xyleborus* Eichhoff, 1864 (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Acta Zoológica Mexicana (n.s.)* 31(2):239-250.
- Pérez-De La Cruz, A. Equihua M.A., J. Romero-Nápoles, J.M. Valdez-Carrasco, and A. De La Cruz-Pérez. 2009. Claves para la identificación de escoltinos (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.
- Rabaglia, R.J., S.A. Dole and A.I. Cognato. 2006. Review of American *Xyleborina* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) occurring north of Mexico, with an illustrated key. *Annals of the Entomological Society of America* 99(6):1034-1056.
- SENASICA. 2015. Escarabajo ambrosial del Laurel Rojo *Xyleborus glabratus*, Eichhoff (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México. 11 p.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson and S. Kumar. 2013. Mega 6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30:2725-2729.