



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSGRADO DE FITOSANIDAD

ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

**CRÍA DEL ESTADO LARVAL
Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR
DE *Comadia redtenbacheri***

MARÍA DEL ROSARIO CÁRDENAS AQUINO

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2018



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, la que suscribe, "**María del Rosario Cárdenas Aquino**", alumna de esta institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección de la Doctora "**María Celina Micaela Llanderal Cázares**", por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis "**CRÍA DEL ESTADO LARVAL Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Comadia redtenbacheri***", y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes; por ello me comprometo a no realizar alguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Campus Montecillo, a 10 de diciembre de 2018.

MRCA

María del Rosario Cárdenas Aquino

Vo. Bo. María Celina Micaela Llanderal Cázares

La presente tesis titulada: CRÍA DEL ESTADO LARVAL Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Comadia redtenbacheri*, realizada por la alumna: María del Rosario Cárdenas Aquino bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA


Dra. María Celina Micaela Llanderal Cázares

ASESOR


Dr. Héctor González Hernández

ASESOR


Dr. Mateo Vargas Hernández

ASESORA


Dra. Norma Marina Alarcón Rodríguez

ASESORA


Dra. Ernestina Valadez Moctezuma

ASESOR


Dr. Hussein Sanchez Arroyo

Montecillo, Texcoco, Estado de México, diciembre de 2018

CRÍA DEL ESTADO LARVAL Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

DE *Comadia redtenbacheri*

María del Rosario Cárdenas Aquino, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2018

RESUMEN

La larva del gusano rojo del maguey *Comadia redtenbacheri* (Hammerschmidt) es un insecto comestible con alta demanda en varias regiones de México. La venta no regulada de este gusano contribuye a la disminución de sus poblaciones y podría conducir a su extinción. *Comadia redtenbacheri* es el único miembro de la familia Cossidae descrito como fitófago especialista de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck, distribuyéndose principalmente en México y EUA. En este trabajo se evaluaron dos dietas para el estado larval; además de implementar un nuevo protocolo de extracción para secuenciar el gen COI de poblaciones recolectadas en cinco estados de México, para la delimitación de la especie. También se emplearon marcadores ISSR en la comprensión de la variabilidad genética de *C. redtenbacheri* en cinco poblaciones de México. Finalmente se realizó una amplificación exitosa de algunos RAPDs utilizando RNA convertido a cDNA en la expresión de algunos genes involucrados en la interacción gusano rojo del maguey y su principal hospedante. Los resultados mostraron que la formulación de una dieta comercial fue la más adecuada para el aumento de biomasa y la supervivencia de *C. redtenbacheri*. Por otro lado, las muestras de *Comadia* se agruparon dentro de un clado monofilético, que además están estrechamente relacionadas con organismos barrenadores de árboles. Un total de 14 iniciadores ISSR mostraron polimorfismos y produjeron perfiles de amplificación, donde cada individuo mostró diferencias, revelando que existe variabilidad en la especie. Mediante la técnica de RAPD, 15 iniciadores exhibieron polimorfismos y perfiles de amplificación para el análisis de la expresión de los genes involucrados en la interacción planta-insecto.

Palabras clave: Insecto comestible, supervivencia, gen COI, polimorfismos, inducción de genes, *Agave salmiana*.

BREEDING OF LARVAL STAGE AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Comadia redtenbacheri*

María del Rosario Cárdenas Aquino, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2018

ABSTRACT

The agave red worm *Comadia redtenbacheri* (Hammerschmidt), is an edible insect with high demand in several regions of Mexico. Due to its sale is not regulated this has contributed to the declining of its populations and it could lead to its extinction. *Comadia redtenbacheri* is the only member of the Cossidae family that has been described as a phytophagous specialist of *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck, which is mainly distributed in Mexico and USA. In this work, two diets for the larval stage were evaluated; in addition, a new extraction protocol for sequencing the COI gene was implemented from populations collected in five states of Mexico, for the delimitation of the species, also ISSR markers were used in the understanding of the genetic variability of *C. redtenbacheri* in five populations of Mexico; and finally, a successful amplification of some RAPDs was carried out using RNA converted to cDNA in the expression of some genes involved in the agave red worm interaction and its main host. The results showed that the formulation of a commercial diet was the most suitable for the increase of biomass and the survival of *C. redtenbacheri*. The samples of *Comadia* were grouped within a monophyletic clade, which are also closely related to tree borers. A total of 14 ISSR primers showed polymorphisms and produced amplification profiles, where each individual showed differences, revealing that there is variability in the species. Using the RAPD technique, 15 primers showed polymorphisms and amplification profiles for the analysis of the expression of the genes involved in the plant–insect interaction.

Key words: Edible insect, survival, COI gene, polymorphisms, gene induction, *Agave salmiana*.

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia quisiera agradecer al CONACYT por el apoyo económico brindado para realizar este proyecto.

A la Dra. Celina, por haberme aceptado como su estudiante y ser mi consejera, ya que de otra manera nunca hubiera podido terminar el doctorado.

Al Dr. Mateo, Dra. Norma, Dr. Héctor y al Dr. Hussein por ser parte de mi Consejo, puesto que sin su ayuda no hubiera concluido esta tesis.

A la Dra. Ernestina, que me permitió acceder a su laboratorio sin ser su estudiante, y posteriormente le agradezco por formar parte de mi Consejo y enriquecer este trabajo de investigación.

Al M.C. Jorge Valdez-Carrasco por las fotografías de la genitalia, cápsulas cefálicas, así como de la larva y de la formación de galerías para el artículo y la tesis respectivamente.

Al M.C. Luis Emilio Castillo Márquez por el análisis del desarrollo de las larvas mediante las cápsulas cefálicas.

A mis compañeros-amigos de laboratorio y de institución: Norma, el Dr. Manuel, Abraham, Ricardo, la Dra. Kalina, Sarita, Ulises, Ana, Carmen, Patricio, Jesús "Chucho", Jimena, Ricardo Parra, Reyna, Enhe, Sergio y Liliana. Además quiero agradecer a María Dolores Luna Almanza y a Aldo G. Bustamente Ortiz por haberme ayudado y asesorado cuando estuve en Chapingo.

A mi mamá, muchísimas gracias por apoyarme siempre!!!. Al resto de mi familia que de igual manera han estado conmigo; y en memoria de mi querida Polita.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	v
AGRADECIMIENTOS.....	vi
LISTA DE CUADROS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xii
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
LITERATURA CITADA.....	3
CAPÍTULO I. Evaluación de dietas para la cría del estado larval de <i>Comadia redtenbacheri</i> (Lepidoptera: Cossidae)	
Resumen.....	5
Abstract.....	6
1. Introducción.....	7
2. Materiales y Métodos.....	8
3. Resultados y Discusión.....	11
4. Conclusiones.....	18
5. Literatura citada.....	18
CHAPTER II. Molecular delineation of the agave red worm <i>Comadia redtenbacheri</i> (Lepidoptera: Cossidae)	
Abstract.....	21
1. Introduction.....	22
2. Materials and methods.....	24
2.1. Sampling.....	24
2.2 DNA extraction.....	24
2.3. DNA amplification and sequencing.....	26

2.4. Nucleotide sequence determination, sequence recruitment, alignment and phylogenetic reconstruction.....	27
3. Results and discussion.....	29
4. Conclusions.....	35
5. Acknowledgments.....	36
6. References.....	36
Appendix.....	40

CAPÍTULO III. Variabilidad genética en *Comadia redtenbacheri* (Lepidoptera: Cossidae) mediante marcadores ISSR

Resumen.....	43
Abstract.....	44
1. Introducción.....	45
2. Materiales y Métodos.....	46
2.1. Muestreo.....	46
2.2. Extracción de DNA genómico.....	46
2.3. Amplificación de ISSR y electroforesis en gel de poliacrilamida.....	46
2.4. Análisis de los perfiles electroforéticos.....	47
3. Resultados y Discusión.....	48
4. Conclusiones.....	53
5. Literatura citada.....	53

CAPÍTULO IV. Evaluación preliminar de marcadores RAPDs utilizando cDNA, en la expresión de genes involucrados en la interacción gusano rojo del maguey-hospedante

Resumen.....	56
Abstract.....	57
1. Introducción.....	58
2. Materiales y Métodos.....	59

3. Resultados preliminares y Discusión.....	62
4. Conclusiones y perspectivas.....	65
5. Literatura citada.....	66

LISTA DE CUADROS

CAPÍTULO I	Página
Cuadro 1. Componentes de la dieta artificial JV (Jiménez-Vásquez <i>et al.</i> , 2015) para el desarrollo del estado larval de <i>Comadia redtenbacheri</i>	10
Cuadro 2. Biomasa y supervivencia larval en las dietas JV (Jiménez-Vásquez <i>et al.</i> , 2015) y la dieta comercial Southland Products [®] , Inc.....	12
Cuadro 3. Biomasa y supervivencia larval en la dieta comercial Southland Products [®] , Inc. durante el segundo año.....	13
Cuadro 4. Estadísticos básicos relacionados con los ocho posibles instares de <i>Comadia redtenbacheri</i> y la probabilidad de una mala clasificación.....	17
CHAPTER II	Page
Table 1. Localities where <i>Comadia redtenbacheri</i> larvae were collected in five states of the North Central, South Central and East Central regions of México.....	26
Table 2. Primer sequence used to amplify the mitochondrial COI gene from <i>Comadia redtenbacheri</i> based on Fisher and Smith (2008).....	26
Table 3. Details of 40 partial sequences of the COI gene from species of the Cossinae subfamily used in this study. New sequences are in bold letters.....	32
Table 4. Changes in the partial sequence of the COI gene from the sample collected in the state of Tlaxcala, México.....	34
Table 5. Percentage of identity among the sequences of <i>Comadia redtenbacheri</i> collected from several locations from North Central, South Central and East Central regions of México, using the Needle algorithm.....	35
CAPÍTULO III	Página
Cuadro 1. Lista de 14 iniciadores ISSR usados para caracterizar el genoma de cinco poblaciones de <i>Comadia redtenbacheri</i>	47

CAPÍTULO IV

Página

Cuadro 1. Lista de 15 iniciadores RAPD usados para el análisis de la expresión de los genes involucrados en la interacción gusano rojo-agave.....	62
---	----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I	Página
Figura 1. a) Charolas de bioensayo de 16 cavidades con dieta comercial con tapa auto adherible; b) Frasco de vidrio tipo Gerber® con dieta comercial que muestra las galerías formadas por las larvas; c) desecador Magic Touch® ice bucket blue de PVC (Sigma-Aldrich, EUA)10	10
Figura 2. Porcentaje de supervivencia en función de las dietas. Línea roja=dieta comercial Southland Products®, Inc; Línea azul=dieta JV (Jiménez-Vásquez et al., 2015).....12	12
Figura 3. Larva de <i>Comadia redtenbacheri</i> desarrollada en la dieta comercial Southland Products®, Inc.....14	14
Figura 4. Identificación de ocho instares larvales de <i>Comadia redtenbacheri</i> con base en la anchura cefálica (cefálica (μm)).....17	17
CHAPTER II	Page
Figure 1. Last instar <i>Comadia redtenbacheri</i> larvae in rhizome tissue of <i>Agave salmiana</i>23	23
Figure 2. Female <i>Comadia redtenbacheri</i>27	27
Figure 3. Complete genitalia of <i>Comadia redtenbacheri</i> male. From left to right: side, dorsal, ventral and hind view29	29
Figure 4. Maximum Likelihood bootstrap consensus tree based on the COI partial gene depicting 40 branches that represent 19 species of the Cossinae subfamily.....33	33
CAPÍTULO III	Página
Figura 1. Perfiles obtenidos con el iniciador ISSR9. Nótese la nitidez de los fragmentos de DNA y los polimorfismos no detectados (señalados con flechas). Entiéndase	

por individuos 1–3 (Tlaxcala), 4–6 (Querétaro), 7–9 (Hidalgo), 10–12 (Estado de México), 13–15 (Zacatecas).....49

Figura 2. Dendrograma agrupado con UPGMA considerando el total de huellas de DNA obtenidas con los 14 iniciadores ISSR y que ilustra la relación de las cinco poblaciones de *Comadia redtenbacheri*. EdoMéx: Estado de México, Hgo: Hidalgo, Tlax: Tlaxcala, Zac: Zacatecas, Qro: Querétaro.....51

CAPÍTULO IV

Página

Figura 1. a) Corte transversal en la base de las hojas; b) en el tallo subterráneo de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck donde se muestra la galería generada por larvas de *Comadia redtenbacheri*.....61

Figura 2. Perfiles obtenidos con el iniciador RAPD15. Nótese la nitidez de los fragmentos de cDNA y la presencia de polimorfismos. C=Control; E=Experimental.....63

INTRODUCCIÓN GENERAL

Actualmente, dentro del clado Apoditrysia que alberga a la superfamilia Cossoidea (van Nieukerken *et al.*, 2011), está incluida la familia Cossidae y dentro de ésta, la subfamilia Cossinae, en la que se ubica la especie *Comadia redtenbacheri* (Hammerschmidt, 1847) (Lepidoptera: Cossidae). Llanderal-Cázares *et al.* (2017) confirman que sus características morfológicas hacen que este insecto forme parte del género *Comadia*.

El gusano rojo del maguey *C. redtenbacheri* comestible en su etapa larval, se caracteriza por ser una especie univoltina. Los huevos tienen la superficie ornamentada con polígonos de tamaño más o menos constante y son ovipositados en masas. Las larvas adquieren el color rojo que las distingue a medida que avanzan de instar y tienen en el último segmento una proyección quitinosa en forma de "cuerno" o espina, de color oscuro. Las pupas tienen a lo largo del dorso y de la pleura dos hileras de espinas gruesas dirigidas hacia atrás. El adulto presenta el cuerpo de color café claro con dos marcas blanquecinas en forma de "V" invertida en las alas anteriores, cuando se encuentran en posición de reposo; los machos tienen un período de vida muy corto, de tres a cinco días, ya que el aparato bucal está atrofiado, además de presentar antenas bipectinadas, mientras que en las hembras son ligeramente aserradas. La emergencia de los adultos en laboratorio se presenta en marzo o abril, mientras que en campo ocurre en enero (Llanderal-Cázares *et al.*, 2007; Castro-Torres y Llanderal-Cázares, 2015; Miranda-Perkins *et al.*, 2016).

La colecta tradicional de este insecto para el consumo humano se realiza a partir de larvas de poblaciones silvestres (Ramos-Elorduy, 2006). Al ser un recurso renovable y gracias a su interés comercial, han existido intentos por parte de algunos productores para establecer cultivos de gusano rojo como se menciona en los trabajos de Nolasco-Miguel *et al.* (2002) y Camacho *et al.* (2005). Sin embargo, al ser un atractivo para los nativos y comida gourmet para extranjeros, se ha inducido una demanda continua de este recurso, lo que ocasiona la disminución de las poblaciones de este insecto, al grado de ser considerado como el insecto comestible con mayor peligro de extinción, al igual que la población de su hospedante, el agave pulquero, debido a que estos agaves no son replantados después de la recolecta (Ramos-Elorduy, 2006; Llanderal-

Cázares *et al.*, 2010). Algunos investigadores han intentado dar mantenimiento al recurso, tal como se describe en el trabajo de Llanderal-Cázares *et al.* (2007; 2010), en el cual, los autores concluyen que para obtener una buena cantidad de larvas, con peso aceptable, es indispensable definir el nivel óptimo de humedad, tomando en cuenta también el tamaño del maguey hospedante y la madurez de su sistema radical.

Desde 1940 se desarrollan investigaciones sobre nutrición de insectos y hábitos de alimentación, pero los grandes avances en técnicas de cría de insectos con dietas artificiales ocurrieron a partir de Singh (1977), quien hizo una selección de dietas para la cría de más de 1300 especies de insectos, en su mayoría lepidópteros, coleópteros y dípteros, ya que son los de mayor importancia económica como plagas. En el caso del gusano rojo del maguey, sus hábitos crípticos y el ciclo de alrededor de un año, complican los esfuerzos para estudiar su biología (Llanderal-Cázares *et al.*, 2007), como resultado la formulación y evaluación de dietas artificiales son una alternativa viable para documentar el crecimiento y desarrollo de *C. redtenbacheri* (Lepidoptera: Cossidae) en condiciones de laboratorio, tema que se abordará dentro del Capítulo I.

En los estudios de Ramos-Elorduy (2006) y Ramos-Elorduy *et al.* (2011), se ubica a la especie *Comadia redtenbacheri* dentro de la subfamilia Chilecomadiinae o dentro del género *Xyleutes*, mientras que Vergara *et al.* (2012) colocan a la especie *Cossus redtenbacheri* como una sinonimia de *Comadia redtenbacheri*, pero al registrarlo en el GenBank lo hacen bajo el nombre de *Comadia redtenbacheri*, lo que indica que en ninguna de dichos artículos se siguió una clasificación estándar, tal como refieren Llanderal-Cázares *et al.* (2017), quienes realizaron una exhaustiva revisión de la misma y mencionan que se le ha clasificado principalmente con base en datos morfológicos.

En esta tesis se realiza por vez primera la determinación de *C. redtenbacheri*, considerando que ésta ya fue descrita morfológicamente por Hammerschmidt, se elaboró un análisis basado en el gen COI, lo que contribuyó a enriquecer su historia taxonómica dentro de la familia Cossidae, tema que se aborda en extenso en el Capítulo II. Otro objetivo es la caracterización molecular de *C. redtenbacheri*, ya que no se ha analizado la variación genética dentro de las poblaciones de gusano rojo del maguey mediante la amplificación de regiones de DNA bordeadas por secuencias simples de microsatélites (inter simple sequence repeats-ISSR), por lo que este tema se desarrolló dentro del Capítulo III y permitió discriminar si los individuos colectados

en diferentes regiones del país presentan variaciones intraespecíficas, lo cual podría repercutir en algunos otros aspectos de tipo fenotípico o morfológico.

Un último objetivo, pero esta vez aplicado al hospedero *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck, es la técnica de amplificación aleatoria de DNA polimórfico RAPDs mediante la expresión del RNA utilizando cDNA, con la finalidad de identificar posteriormente diferencias a nivel de expresión genética durante la interacción gusano de maguey-hospedante. Sin embargo este objetivo se establece como una prueba preliminar dentro del Capítulo IV.

LITERATURA CITADA

- Camacho, A.D., A. Nolasco-Miguel, J.E. Jiménez-Luna, y F. Rivera-Torres. 2005. Reintroducción de maguey y cultivo del gusano rojo *Comadia redtenbacheri* H. (Lepidoptera: Cossidae). Entomol. Mex. 4: 599–603.
- Castro-Torres, R.E., y C. Llanderal-Cázares. 2015. Principales caracteres morfológicos para el reconocimiento de *Comadia redtenbacheri* Hammerschmidt (Lepidoptera: Cossidae). Entomol. Mex. 2: 798–803.
- Hammerschmidt, K.E. 1847. Beschreibung eines neuen mexicanischen Schmetterlinges *Zeuzera* (*Cossus*) *redtenbacheri* Hmrschdt. Naturwissenschaftlichen Abhandlungen 2: 151–152.
- Llanderal-Cázares, C., R. Nieto-Hernández, I. Almanza-Valenzuela, y C. Ortega-Álvarez. 2007. Biología y comportamiento de *Comadia redtenbacheri* (Hamm) (Lepidoptera: Cossidae). Entomol. Mex. 6: 252–255.
- Llanderal-Cázares, C., H.M. De los Santos-Posadas, I. Almanza-Valenzuela, R. Nieto-Hernández, y C. Castillejos-Cruz. 2010. Establecimiento del gusano rojo en plantas de maguey en invernadero. Acta Zool. Mex. (n.s.) 26: 25–31.
- Llanderal-Cázares, C., R. Castro-Torres, and K. Miranda-Perkins. 2017. Bionomics of *Comadia redtenbacheri* (Hammerschmidt, 1847) (Lepidoptera: Cossidae). Shilap-Rev. Lepidopt. 45: 373–383.
- Miranda-Perkins, K., C. Llanderal-Cázares, M. Cadena-Barajas, and J. López-Sauceda. 2016. Adult emergence and reproductive behavior of *Comadia redtenbacheri* in confinement. Southwest Entomol. 41: 657–665.

- Nolasco-Miguel, A., J.E. Jiménez Luna, y A.D. Camacho. 2002. Inducción de la pupación y colonización del gusano rojo del maguey *Comadia redtenbacheri* H. (Lepidoptera: Cossidae). Entomol. Mex. 1: 125-130.
- Ramos-Elorduy, J. 2006. Threatened edible insects in Hidalgo, Mexico and some measures to preserve them. J. Ethnobiol. 2: 1–10.
- Ramos-Elorduy, J., J.M.P. Moreno, A.I. Vázquez, I. Landero, H. Oliva-Rivera, and V.H.M. Camacho. 2011. Edible Lepidoptera in Mexico: Geographic distribution, ethnicity, economic and nutritional importance for rural people. J. Ethnobiol. Ethnomed.7: 2.
- Singh, P. 1977. Artificial diets for insects, mites, and spiders. IFI/Plenum Press, New York. USA. 594 p.
- van Nieukerken, E.J., *et al.* 2011. Order Lepidoptera Linnaeus, 1758. *In*: Zhang ZQ, editor. Animal biodiversity: an outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness. Zootaxa 3148: 212–221.
- Vergara, F., R.C. Everroad, G. Andraca, J. Kikuchi, and H. Makihara. 2012. Plant host differences between *Cossus redtenbacheri* and *Cossus insularis*: insights from mechanical tests and molecular phylogeny. Bull. Insectology 65: 217–222.

CAPÍTULO I. Evaluación de dietas para la cría del estado larval de *Comadia redtenbacheri* (Lepidoptera: Cossidae)

Resumen

La larva del gusano rojo del maguey *Comadia redtenbacheri*, se considera un insecto comestible con amplia importancia económica y alimenticia, con alta demanda en varias regiones de México, lo que contribuye a la disminución de sus poblaciones. En el grupo de los barrenadores como el gusano rojo del maguey, la cría en dietas artificiales permite la observación directa de los insectos para estudios de biología y de comportamiento. En este trabajo se evaluaron dos dietas para el estado larval de *C. redtenbacheri*. Entre las variables evaluadas en las larvas se tiene supervivencia, biomasa promedio, duración del período, mudas con base en la presencia de cápsulas cefálicas y medición de su anchura. Los resultados muestran que la formulación de la dieta comercial fue más adecuada para el aumento de biomasa y la supervivencia de *C. redtenbacheri*; además de que las larvas presentaron el color rojo característico que adquieren cuando se alimentan de su hospedante natural. La cría del estado larval de *C. redtenbacheri* bajo esta dieta fue posible hasta la quinta muda en condiciones de laboratorio y se registró la presencia de dos posibles instares larvarios adicionales a los documentados previamente.

Palabras clave: Gusano rojo del maguey, desarrollo, supervivencia, biomasa, instares.

CHAPTER I. Evaluation of diets for the rearing of the larval stage of *Comadia redtenbacheri* (Lepidoptera: Cossidae)

Abstract

Agave red worm *Comadia redtenbacheri* (Hammerschmidt), is considered an edible insect with wide economic and nutritional importance, with high demand in several regions of Mexico, which has contributed to the decline of its populations. In the group of borers such as the agave red worm, breeding under artificial diets allows direct observation for studying their biology and behavior. In this work, two diets for the larval stage of *C. redtenbacheri* were evaluated. Among the variables evaluated in the larvae there is survival, average biomass, duration of the period, moults based on the presence of the cephalic capsules and measurement of their width. The results showed that commercial diet was most adequate for increasing biomass and the survival of *C. redtenbacheri*; besides that, the larvae presented the characteristic red color acquired when they feed on their natural host. The breeding of the larval stage of *C. redtenbacheri* under this diet was possible until the fifth molt in laboratory conditions and the presence of two possible larval instars was recorded in addition to those previously documented.

Keywords: Agave red worm, development, survival, biomass, instars.

1. Introducción

Los insectos se consideran un grupo altamente nutritivo, son una fuente de proteína y proporcionan energía, además de que hay una gran aceptación para su consumo (Ramos-Elorduy y Pino, 1990; Ladrón de Guevara *et al.*, 1995; Ramos-Elorduy, 2006).

Uno de los insectos comestibles dentro del grupo de los lepidópteros que se encuentra en varias entidades federativas de México, es la larva del gusano rojo del maguey *Comadia redtenbacheri* (Lepidoptera: Cossidae) (Ramos-Elorduy *et al.*, 2011), la cual tiene un desarrollo dentro del tallo subterráneo del agave de donde se alimenta, principalmente de la especie *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck, que en la literatura se menciona como su hospedante natural y en este trabajo así se consideró (Ancona, 1931; Brown, 1975; Granados, 1993).

Algunos especialistas han intentado hacer más sustentable este recurso (Llenderal-Cázares *et al.*, 2007). Los estudios de Llenderal-Cázares *et al.* (2010) y de Delgado-Tejeda *et al.* (2017), se enfocaron en definir procedimientos para la infestación de plantas de *A. salmiana* con *C. redtenbacheri*. van Huis *et al.* (2013) consideran que la cría de insectos en condiciones controladas que contemplen el papel de la recolección tradicional de los insectos en la naturaleza, a través de un perfeccionamiento en la eficiencia de la recolección, así como la expansión de la agricultura de insectos, a través del desarrollo de procedimientos para manejar el recurso en instalaciones en pequeña o gran escala, podría evitar su sobre-explotación en la naturaleza.

Las dietas artificiales son una alternativa viable para la cría y reproducción de insectos en condiciones de laboratorio. La especie *C. redtenbacheri*, se caracteriza porque el estado larval permanece oculto en sus galerías dentro del tallo subterráneo del maguey durante varios meses, lo cual hace difícil su estudio, una aproximación es la dieta artificial, que permite observar su crecimiento y desarrollo. El objetivo de este estudio fue evaluar dos dietas para la cría en estado larval de dicha especie, a partir de la supervivencia, biomasa promedio, duración del período larval, así como el desarrollo mediante medición de las cápsulas cefálicas.

2. Materiales y Métodos

Los experimentos se llevaron a cabo de agosto de 2016 a agosto de 2018, con dos generaciones de larvas neonatas de *C. redtenbacheri*, 505 para el primer año (del 11 de agosto al 3 de febrero de 2017) y 108 para el segundo año (del 17 julio de 2017 al 31 de julio de 2018), procedentes de masas de huevos ovipositados en el laboratorio de Fisiología de Insectos del Colegio De Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Edo. de México, de acuerdo con el protocolo establecido por Miranda-Perkins *et al.* (2016).

Se evaluaron dos dietas, la JV formulada para el gusano rojo del maguey por Jiménez-Vásquez *et al.* (2015) y la dieta comercial Southland Products[®], Inc., para *Spodoptera frugiperda*. La formulación de la dieta meridica JV (Jiménez-Vásquez *et al.* 2015), la cual es un medio de cultivo en el cual se añadió por lo menos una sustancia o preparación de estructura desconocida, se enlista en el Cuadro 1. Aproximadamente cada 15 días y en cinco individuos tomados al azar, reemplazamos la dieta y se midió la biomasa larval promedio y la duración del período larval en cada dieta. Además, se registró el desarrollo por medición de las cápsulas cefálicas. Las larvas con las dietas se mantuvieron en charolas de bioensayo de 16 cavidades (Bio-Assay Tray BIO-BA-128[®] C-D International Inc., Pitman, N.J., EUA), con tapas auto adheribles (PULL N' PEEL TAB BIO-CV-16 para charolas Bio-Assay Tray BIO-BA-128[®] C-D International Inc. Pitman, N.J., EUA) y a medida que aumentaban en biomasa fueron ubicadas en frascos de vidrio tipo Gerber[®], que se colocaron dentro de desecadores Magic Touch[®] ice bucket blue de PVC (Sigma-Aldrich, EUA), para mantenerlas en completa oscuridad y con poca variación de temperatura y humedad (Figura 1).

Los datos de temperatura y humedad relativa fueron obtenidos con un DataLogger RHT10 versión 5.0 (EXTECH[®] Massachusetts, EUA), que se colocó dentro del desecador. El registro de la temperatura se obtuvo cada 60 min durante el transcurso del período larval.

Para determinar los posibles instares de *C. redtenbacheri*, se obtuvo la anchura de 160 cápsulas cefálicas con análisis computarizado de imágenes. Las fotografías se capturaron en un microscopio Carl Zeiss Discovery V20[®], con cámara Canon 50D[®]. Se capturó también la imagen de un micrómetro de objeto marca Zeiss[®], graduado en centésimas de mm. Para medir las imágenes de las cápsulas cefálicas, se usó el

programa Fiji for Mac 1.0, con base en ImageJ2 (Rueden, *et al.*, 2017). Con la imagen de la regilla, se calibró el programa y se utilizó el micrómetro como unidad de medida. La medición de la anchura se tomó uniéndolo con la herramienta de línea del programa, los puntos más externos de los bordes laterales de las genas en cada cápsula. La unidad de medición de las cápsulas fue la micra.

Con los datos obtenidos de las mediciones se construyeron varias tablas de frecuencia simple con anchuras de intervalo diferentes, para poder identificar aquellas tablas cuyas frecuencias de conteo finales permitieran vislumbrar, al momento de graficar los picos (modas) de los posibles instares de *C. redtenbacheri*. Después de seleccionar y graficar la tabla de frecuencia simple con las modas más relevantes, se determinaron la media, varianza y desviación estándar iniciales de los datos ubicados a la derecha e izquierda de las modas, asumiendo que estos datos pertenecen a una distribución Normal. A partir de una amplitud del valor de tres veces la desviación estándar alrededor de la media (3σ) se realizó la primera aproximación hacia los límites inferiores y superiores de cada instar. Se realizaron procesos de simulación modificando los valores de σ^2_i entre parejas de distribuciones Normales adyacentes, generando la probabilidad acumulada para el Instar $X \sim N(\mu_1, \sigma^2_1)$ y el Instar $X_{+1} \sim N(\mu_2, \sigma^2_2)$ con el fin de detectar el valor de anchura de cápsula cefálica donde la probabilidad de la cola superior del Instar X_i es igual a la probabilidad de la cola inferior del Instar X_{i+1} . Con los valores de σ^2_i , en donde existió un valor de anchura de la cápsula cefálica que tenía una probabilidad de mala clasificación semejante para el instar X y el instar X_{+1} , se establecieron los límites finales de cada instar.

Cuadro 1. Componentes de la dieta artificial JV (Jiménez-Vásquez *et al.*, 2015) para el desarrollo del estado larval de *Comadia redtenbacheri*.

Ingrediente/Reactivo	Cantidad en g/L
Ácido sórbico	1.5
Agar	20
Aureomicina	0.25
Germen de trigo	40
Glucosa	30
Harina de soya	60
Harina de maíz	60
Harina de tallo subterráneo de maguey liofilizado	80
Metil p-hidroxibenzoato	2
Mezcla de sales de Wesson	14
Mezcla de vitaminas de Vanderzant	6
Propionato de calcio	3
Puré de manzana	150
Alcohol etílico absoluto	7 MI
Formaldehído	2 MI



Figura 1. a) Charola de bioensayo de 16 cavidades con dieta comercial con tapa auto adherible; b) Frasco de vidrio tipo Gerber® con dieta comercial que muestra las galerías formadas por las larvas; c) desecador Magic Touch® ice bucket blue de PVC (Sigma-Aldrich, EUA).

3. Resultados y Discusión

El estudio de los barrenadores a menudo se ve limitado, tanto por la falta de métodos efectivos de cría para producir cantidades adecuadas del insecto en cuestión, como por la composición de la dieta (Forschler y Nordin, 1989). La fórmula para elaborar una dieta meridica que contiene ingredientes comerciales y disponibles puede ser una ventaja, como es el caso de la dieta JV (formulada por Jiménez-Vásquez *et al.* 2015) para el estado larval del gusano rojo del maguey.

Al iniciar el estudio con la dieta meridica JV se observó que la supervivencia y la biomasa de las larvas era baja (Cuadro 2) y en la dieta había oxidación antes de los 15 días, lo cual podría deberse a la inclusión del puré de manzana. Se reporta que la incorporación de materiales frescos en las dietas para la cría de insectos no es recomendable, ya que se modifica la consistencia debido al alto contenido de agua y en una dieta artificial es difícil encontrar y mantener el contenido apropiado del agua, ya que causa cambios adversos en la textura (Reinecke, 1985; Singh y Moore, 1985).

Los resultados en este trabajo con relación al porcentaje de supervivencia larval, revelan que bajo la dieta JV, no se presenta mayor ganancia con respecto a la dieta comercial (Figura 2, Cuadro 2). El uso de dietas para la cría de barrenadores es restringido, en gran parte por la duración prolongada del estado larval, que implica el reemplazo de dieta en períodos cortos de tiempo, además del mantenimiento en condiciones de oscuridad y la protección contra temperaturas extremas.

Cuadro 2. Biomasa y supervivencia larval en las dietas JV (Jiménez-Vásquez *et al.*, 2015) y la dieta comercial Southland Products[®], Inc.

Dieta	Período larval (días)	Supervivencia larval (<i>n</i>)	% de supervivencia	Biomasa promedio (g)
Dieta comercial	1	312	100	0.001
	40	252	81	0.01624
	56	110	35	0.03972
	68	107	34	0.08224
	89	77	25	0.19665
	127	68	22	0.45794
	160	66	21	0.50342
	177	65	21	0.57576
Dieta JV	1	193	100	0.001
	21	165	85	0.00118
	37	118	61	0.01364
	49	112	58	0.00972
	70	18	9.3	0.00221
	108	10	5.18	0.00221
	141	5	2.6	0.00616
	158	0	0	0.0

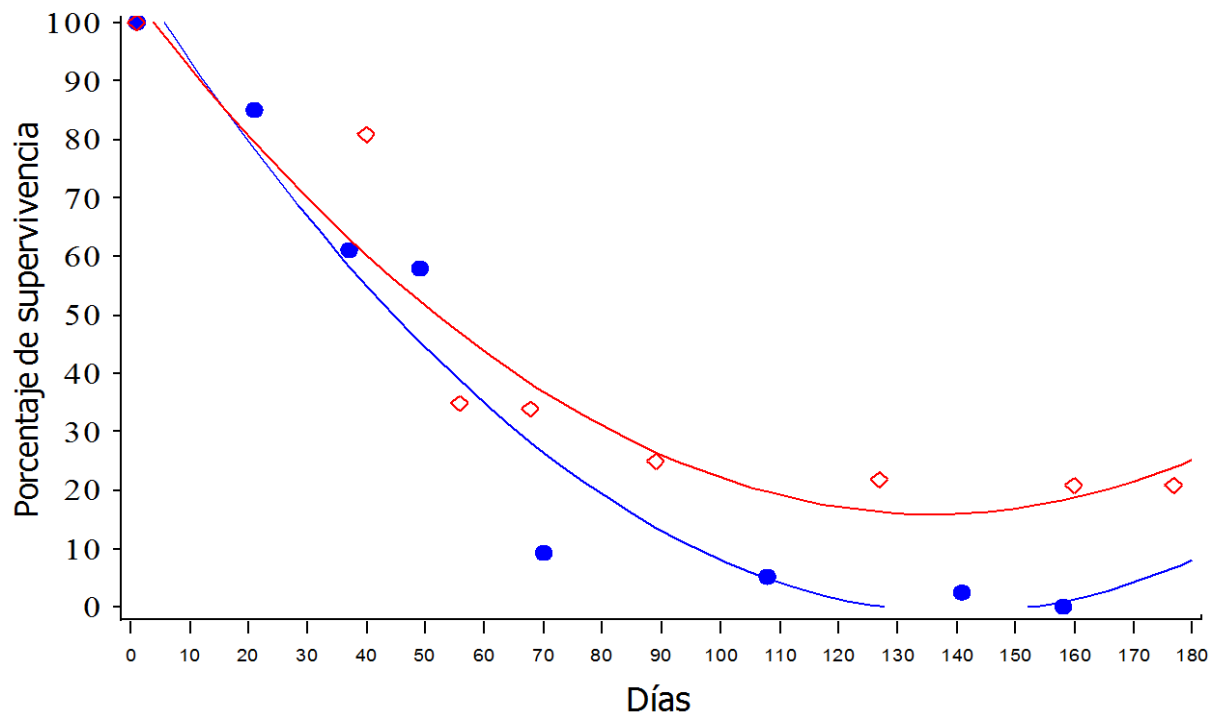


Figura 2. Porcentaje de supervivencia en función de las dietas. Línea roja=dieta comercial Southland Products[®], Inc; Línea azul=dieta JV (Jiménez-Vásquez *et al.*, 2015).

La dieta comercial Southland Products[®], Inc., fue la más adecuada para el crecimiento, desarrollo y supervivencia de *C. redtenbacheri* (Cuadro 3). Es importante mencionar que el porcentaje de supervivencia larval bajo la dieta comercial es similar en las pruebas realizadas durante dos años consecutivos, presentando una pequeña variación durante el segundo año con respecto al primero (Cuadros 2 y 3). Asimismo, las larvas que se desarrollaron en la dieta comercial presentaron el color rojo característico, aunque de menor intensidad, que adquieren cuando se alimentan de su hospedante natural (Figura 3).

Cuadro 3. Biomasa y supervivencia larval en la dieta comercial Southland Products[®], Inc. durante el segundo año.

Período larval (días)	Supervivencia larval (<i>n</i>)	% de supervivencia	Biomasa promedio (g)
1	108	100	0.001
53	73	67	0.0106
64	57	53	0.0121
85	54	50	0.0191
107	52	48	0.0289
129	49	45	0.0483
150	47	43	0.0822
188	38	35	0.1209
218	34	31	0.1355
233	34	31	0.1868
276	31	29	0.2536
302	31	29	0.2686
338	31	29	0.2773
380	30	28	0.2858



Figura 3. Larva de *Comadia redtenbacheri* desarrollada en la dieta comercial Southland Products®, Inc.

Jiménez-Vásquez *et al.* (2015) estipulan que la dieta debe ser blanda para los primeros instares y de mayor consistencia a medida que avanza el estado larval, lo que en este estudio se aplicó para la dieta comercial. Asimismo, ambas dietas fueron reemplazadas cada 15 días debido al olor producido por su descomposición. En el caso de la dieta para las larvas de *C. redtenbacheri* se requiere poca humedad, por lo cual se optó por usar desecadores en lugar de cámaras de cría, con registro de la temperatura, obteniendo un promedio de 21.11 ± 0.66 °C a lo largo del experimento.

Entre las observaciones directas realizadas al mantener a las larvas bajo dietas artificiales, sobresale que no se percibió canibalismo o depredación entre las larvas como lo mencionan Ichikawa y Ueda (2009) para la familia Cossidae, aunque como no todas las larvas mudan al mismo tiempo, creímos que era posible esa interacción. Además, cuando las larvas se mantenían en charolas estas migraban al fondo y se mantenían agrupadas (gregarismo), formando senderos, mientras que al trasladarse a frascos de vidrio tipo Gerber®, podían observarse los característicos túneles que forman los barrenadores (Figura 1), lo cual puede deberse al espacio físico que se torna más compacto dentro de las cavidades de las charolas.

Asimismo, el análisis bromatológico de 8 g de larvas de *C. redtenbacheri* procedentes de la dieta comercial, que se mandó realizar al Departamento de Zootecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, se observaron diferencias con base en la literatura entre el contenido de lípidos y proteína cruda (PC) de la larva con respecto a otras larvas de lepidópteros. El análisis indicó que la composición de lípidos de las larvas de *C. redtenbacheri* fue de 32.35%, lo que representa un porcentaje ligeramente mayor del que se reporta en promedio para algunas larvas dentro del orden Lepidoptera (Rumpold y Schlüter, 2013); respecto al porcentaje de PC, fue del 50.54%, un valor relativamente cercano al peso seco de otras larvas de lepidópteros como en *Corcyra cephalonica* Stainton (1866) (Pyralidae) (39.90%) y en *Pectinophora gossypiella* Saunders (1844) (Gelechiidae) (39.60%) (Lizhang *et al.*, 2008); cabe mencionar que el contenido de PC de los insectos depende de la especie y puede oscilar entre 40% y 60% (Makkar *et al.*, 2014). El porcentaje de PC en dietas puede variar dependiendo de la tecnología de producción y de la composición del alimento (Tschirner y Simon, 2015; Kierończyk *et al.*, 2018).

En el presente estudio, la duración del período larval total no se registró en ambas dietas, puesto que las larvas pueden seguir alimentándose hasta los ocho y 13 meses respectivamente y a medida que se alarga la duración del estado larval la población empieza a declinar (Cuadros 1 y 2). En este contexto, los insectos que reciben alimento de bajo valor nutricional, en calidad y cantidad, pueden tener estrategias compensatorias como una extensión del período de alimentación o un aumento de la ingesta de alimentos (Behmer, 2009). Por ejemplo, larvas de *Spodoptera cosmioides* Walker (1858) (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas con hojas de maíz, tuvieron un período larval más largo, menor peso de las pupas y una menor tasa de supervivencia, que cuando las larvas fueron alimentadas con hojas de algodón y soya (da Silva *et al.*, 2017).

Al medir la anchura de 160 cápsulas cefálicas de larvas mantenidas en la dieta comercial, la tabla de frecuencia simple seleccionada consistió de 85 intervalos con una anchura de 24.73 micras a partir del valor mínimo de 392.00 micras y un valor máximo de 2494.13, en la cual se observan ocho modas que se asumen corresponden a los diferentes instares de *C. redtenbacheri* (Figura 4). Al ajustar a los datos cercanos a los picos se obtuvieron ocho distribuciones Normales (instar I ~ $N(\mu_1, \sigma^2_1)$) hasta el instar

VIII $\sim N(\mu_8, \sigma^2_8)$. Los valores difieren ligeramente de σ^2_i entre instares (distribuciones Normales) adyacentes y generando la probabilidad acumulada para el instar $X \sim N(\mu_1, \sigma^2_1)$ y el Instar $X_{+1} \sim N(\mu_2, \sigma^2_2)$ se detectó el punto donde la probabilidad de la cola superior del Instar X fue muy semejante a la probabilidad de la cola inferior del Instar X_{+1} .

Al final de todo el proceso descrito se obtuvieron ocho instares [instar I $\sim N(400, 1104.6981)$, instar II $\sim N(614.146, 1532.252)$, instar III $\sim N(873.940, 2251.787)$, instar IV $\sim N(1139.400, 1683.707)$, instar V $\sim N(1411.525, 2467.605)$, instar VI $\sim N(1736.470, 3438.649)$, instar VII $\sim N(2069.510, 2742.931)$, instar VIII $\sim N(2375.000, 2445.895)$]. Los diferentes valores de σ^2_i en cada instar, permitieron establecer los límites de los instares que tienen probabilidades de mala clasificación muy semejantes (Cuadro 4). Cabe señalar que estos resultados no coinciden con los intervalos de clase reportados por Hernández-Livera *et al.* (2005), lo cual puede deberse a que los valores en el estudio previamente citado, fueron obtenidos con larvas de *C. redtenbacheri* colectadas de poblaciones de campo, con la consiguiente dificultad para obtener larvas neonatas y asegurar que aunque se hicieron muestreos periódicos durante varios meses, se obtuvieran todos los instares, mientras que en este estudio se registraron siete mudas a lo largo de 13 meses, gracias a la posibilidad de obtener las cápsulas cefálicas de cada muda en las dietas artificiales.

Es importante mencionar que en esta investigación no se logró la pupación ni la emergencia de adultos, que serían los indicadores del número total de mudas y por lo tanto de instares de la especie. Se debe tener en cuenta que, debido a los hábitos crípticos de la especie y a lo extenso de su ciclo generacional, se requieren de más experimentos para identificar la presencia de posibles instares adicionales, o si se trata de una variación, dependiendo de si el desarrollo se lleva a cabo bajo dieta artificial o en su hospedante.

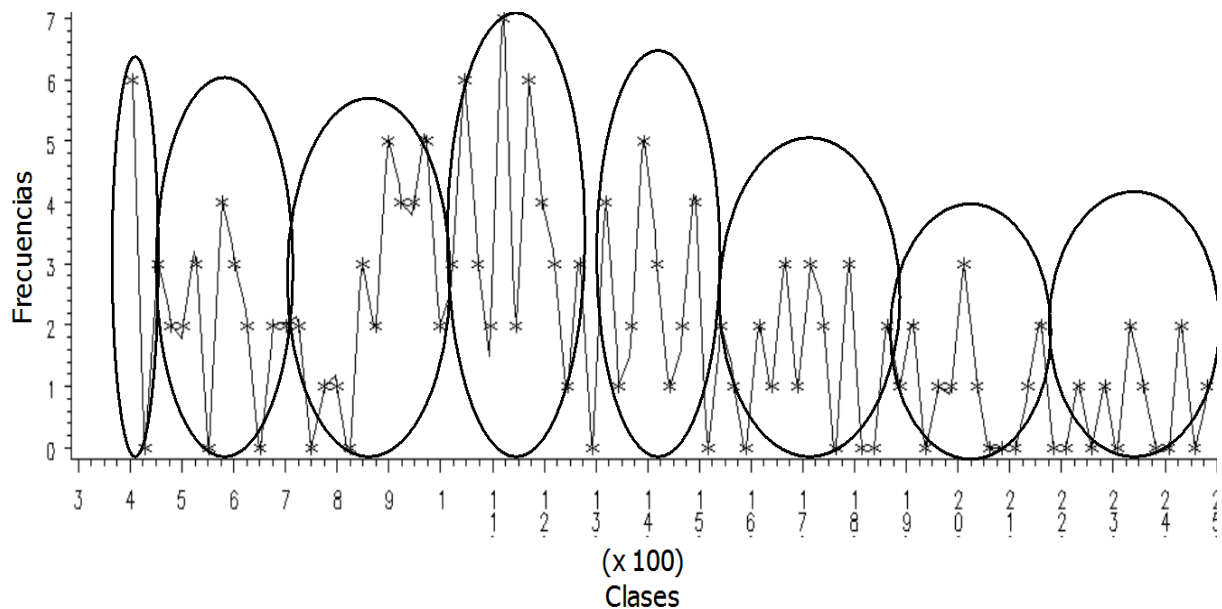


Figura 4. Identificación de ocho instares larvales de *Comadia redtenbacheri* con base en la anchura cefálica (μm).

Cuadro 4. Estadísticos básicos relacionados con los ocho posibles instares de *Comadia redtenbacheri* y la probabilidad de una mala clasificación.

Instar	LI	LS	Media	Desv. Est.	Prob. LI	Prob. LS
I	0	496.711	400	33.237	--	0.001808
II	496.712	731.580	614.146	39.144	0.001349	0.001349
III	731.581	1016.300	873.940	47.453	0.001349	0.001349
IV	1016.301	1262.500	1139.400	41.033	0.001349	0.001349
V	1262.501	1560.550	1411.525	49.675	0.001349	0.001349
VI	1560.551	1912.390	1736.470	58.640	0.001349	0.001349
VII	1912.391	2226.630	2069.510	52.373	0.001349	0.001349
VIII	2226.631	--	2375.000	49.456	0.001349	--

LI=Límite inferior; LS=Límite superior; Media=Media; Desv. Est.=Desviación estándar; Prob. LI=Probabilidad de que una observación asociada al instar X_i en realidad pertenezca al instar X_{i-1} ; Prob. LS= Probabilidad de que una observación asociada al instar X_i en realidad pertenezca al instar X_{i+1} .

4. Conclusiones

La cría del estado larval de *C. redtenbacheri* en la dieta comercial Southland Products[®], Inc. a través de 13 meses, permitió el desarrollo hasta una quinta muda. El mantenimiento del estado larval de *C. redtenbacheri* en dietas artificiales posibilitó la observación de aspectos conductuales como el gregarismo, además de que no se percibió canibalismo o depredación entre las larvas, lo que difícilmente se puede visualizar dentro del grupo de los barrenadores cuando se encuentran dentro de los tejidos de su hospedante.

5. Literatura citada

- Ancona, H.L. 1931. Los chilocules o gusanitos de la sal de Oaxaca. An. Inst. Biol. 2: 265–277.
- Behmer, S.T. 2009. Insect herbivore nutrient regulation. Annu. Rev. Entomol. 54: 165–187.
- Brown, R.M. 1975. A revision of the North American *Comadia* (Cossidae). J. Res. Lepidoptera 14: 189–212.
- da Silva, D.M., A.D. Bueno, C.D. Stecca, K. Andrade, P.M.O.J. Neves, and M.C.N. de Oliveira. 2017. Biology of *Spodoptera eridania* and *Spodoptera cosmioides* (Lepidoptera: Noctuidae) on different host plants. Fla. Entomol. 100: 752–760.
- Delgado-Tejeda, I., C. Llanderal-Cázares, K. Miranda-Perkins, and H.M. De los Santos-Posadas. 2017. Pupation, adult emergence and oviposition of *Comadia redtenbacheri* (Lepidoptera: Cossidae) in the nursery. Agrociencia 51: 447–454.
- Forschler, B.T., and G.L. Nordin. 1989. Techniques for rearing the wood borers *Prionoxystus robiniae* (Lepidoptera: Cossidae) and *Paranthrene dollii* (Lepidoptera: Sesiidae). Fla. Entomol. 72: 224–226.
- Granados, D.S. 1993. Los Agaves en México. Universidad Autónoma Chapingo, México, 252 pp.
- Hernández-Livera, R.A., C. Llanderal-Cázares, L.E. Castillo-Márquez, J. Valdez-Carrasco, and R. Nieto-Hernández. 2005. Identification of larval instars of *Comadia redtenbacheri* (Hamm) (Lepidoptera: Cossidae). Agrociencia 39: 539–544.

- Ichikawa T., and K. Ueda. 2009. Predation on exuded sap-dependant arthropods by the larvae of the Oriental carpenter moth, *Cossus jezoensis* (Matsumura) (Lepidoptera, Cossidae): preliminary observations. Tech. Bull. Fac. Agric. Kagawa Univ. 62: 39–58.
- Jiménez-Vásquez, M., C. Llanderal-Cázares, y A. Pérez-Panduro. 2015. Dieta artificial para el gusano rojo del maguey. pp. 301–304. *In*: Memoria de Avances de Investigación Posgrado en Fitosanidad.
- Kierończyk, B., M. Rawski, A. Józefiak, J. Mazurkiewicz, S. Świątkiewicz, M. Siwek, M. Bednarczyk, M. Szumacher-Strabel, A. Cieślak, A. Benzertiha, and D. Józefiak. 2018. Effects of replacing soybean oil with selected insect fats on broilers. Anim. Feed Sci. Tech. 240: 170–183.
- Ladrón de Guevara, O., P. Padilla, L. García, J.M. Pino, and J. Ramos-Elorduy. 1995. Amino acid determination in some edible mexican insects. Amino Acids 9: 161–173.
- Lizhang, W., J.L. Viejo-Montesinos, y Y. Dinghong. 2008. Los insectos como fuente de alimento: análisis del contenido en proteína y grasa de 100 especies. B. Mus. Municipal Funchal 14: 55–70.
- Llanderal-Cázares, C., R. Nieto-Hernández, I. Almanza-Valenzuela, y C. Ortega-Álvarez. 2007. Biología y comportamiento de *Comadia redtenbacheri* (Hamm) (Lepidoptera: Cossidae). Entomol. Mex. 6: 252–255.
- Llanderal-Cázares, C., H.M. De los Santos-Posadas, I. Almanza-Valenzuela, R. Nieto-Hernández, y C. Castillejos-Cruz. 2010. Establecimiento del gusano rojo en plantas de maguey en invernadero. Acta Zool. Mex. 26: 25–31.
- Makkar, H.P., G. Tran, V. Heuzé, and P. Ankers. 2014. State-of-the-art on use of insects as animal feed. Anim. Feed Sci. Tech. 197: 1–33.
- Miranda-Perkins, K., C. Llanderal-Cázares, M. Cadena-Barajas, and J. López-Sauceda. 2016. Adult emergence and reproductive behavior of *Comadia redtenbacheri* in confinement. Southwest Entomol. 41: 657–665.
- Ramos-Elorduy, J. 2006. Threatened edible insects in Hidalgo, Mexico and some measures to preserve them. J. Ethnobiol. 2: 1–10.
- Ramos-Elorduy, J., y J.M. Pino. 1990. Contenido calórico de algunos insectos comestibles de México. Rev. Soc. Quim. Mexico 34: 56–68.

- Ramos-Elorduy, J., J.M.P. Moreno, A.I. Vázquez, I. Landero, H. Oliva-Rivera, and V.H.M. Camacho. 2011. Edible Lepidoptera in Mexico: Geographic distribution, ethnicity, economic and nutritional importance for rural people. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 7: 2.
- Rueden, C.T., J. Schindelin, M.C. Hiner, B.E. DeZonia, A.E. Walter, E.T. Arena, and K.W. Eliceiri. 2017. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics* 18: 529.
- Reinecke, J.P. 1985. Nutrition: Artificial Diets. pp. 391-419. *In: Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Kerkut, G.A., and L.I. Gilbert (eds.). Vol. 4. Pergamon Press, Inc. Oxford. New York USA.
- Rumpold, B., and O. Schlüter. 2013. Nutritional composition and safety aspects of edible insects. *Mol. Nutr. Food Res.* 57: 802–823.
- Singh, P., and R.F. Moore. 1985. *The Handbook of Insect Rearing, Vol. I*. Elsevier. New York. 474 P.
- Tschirner, M., and A. Simon. 2015. Influence of different growing substrates and processing on the nutrient composition of black soldier fly larvae destined for animal feed. *J. Insect. Food Feed* 1: 249–259.
- van Huis, A., J. van Itterbeeck, H. Klunder, E. Mertens, A. Halloran, G. Muir, and P. Vantomme. 2013. *Edible Insects—Future Prospects for Food and Feed Security*. FAO Forestry Paper 171.

CHAPTER II. Molecular delineation of the agave red worm *Comadia redtenbacheri* (Lepidoptera: Cossidae)

Abstract

Comadia redtenbacheri (Hammerschmidt) (agave red worm) is the only member of the family Cossidae that has been described as a phytophagous specialist of the plant genus *Agave*, which is mainly distributed in México. A new extraction protocol has been implemented for sequencing the COI gene from samples collected in five states of the North Central (Querétaro and Zacatecas), South Central (Estado de México) and East Central (Hidalgo and Tlaxcala) regions of México with the purpose of contributing to delineation of the species. A Maximum Likelihood (ML) tree based on these COI sequences as well as COI sequences from other Cossinae species was developed to complement the existing morphological and taxonomic approaches to delineation of this species. As expected, our *Comadia* samples cluster together within a monophyletic clade that includes four *C. redtenbacheri* sequences previously reported. This group seems to be consistent with our reconstruction, which is supported by a bootstrap value of over 99%. The closely related branches associated with the latter group include organisms known to be the plant and tree borers of the Cossinae subfamily. The COI sequences from our samples were analyzed to determine the percentage of identity among the *C. redtenbacheri* in a first attempt to detect differences in the sequence that matches a particular region of México.

Key words: Maguey red worm, México, COI gene, phytophagous specialist, *Agave* sp.

1. Introduction

Comadia redtenbacheri (Hammerschmidt), also known as agave red worm, is an edible insect of high economic importance in several states of central México and of high commercial value for the mescal industry (Millán-Mercado *et al.*, 2016). Until now, its consumption has depended on collection of wild populations, which has been unregulated due to lack of knowledge of its biology and behavior (Llanderal-Cázares *et al.*, 2007; Castro-Torres and Llanderal-Cázares, 2015). Their larvae have seven instars (Hernández-Livera *et al.*, 2005). When they hatch, they are white, while the last larval instar has an intense red color (Figure 1). Adults are light brown with four transverse rows of whitish scales that form an inverted “V” shape on the forewings when they are in a resting position (Figure 2). The antennae in males are strongly bipectinate to the tip and serrate in females. Pupae are light brown and get darker when they are about to emerge; they have two rows of thick spines directed toward the posteriad along the dorsum and pleura (Castro-Torres and Llanderal-Cázares, 2015; 2016). *C. redtenbacheri* is a species of the Cossidae family that has been described as a phytophagous of the genus *Agave* (Ancona, 1931; Brown, 1975; Castro-Torres and Llanderal-Cázares, 2015), which is distributed in México (Brown, 1975; Schoorl, 1990; Castro-Torres and Llanderal-Cázares, 2015). The agave red worm has been collected in states of the North Central (Guanajuato, Querétaro and Zacatecas), South Central (Estado de México and México City), East Central (Hidalgo, Puebla, Tlaxcala and Veracruz), West (Michoacán) and Southwest (Oaxaca) regions of México (Ancona, 1931; Ramos-Elorduy *et al.*, 2011).

Currently, there is only one phylogenetic study that includes *C. redtenbacheri* using partial sequences of the cytochrome c oxidase I gene (COI). That study proposes that *C. redtenbacheri* is closely related to other species of the genus *Cossus*, the group of shrub and tree borers (Vergara *et al.*, 2012). According to Castro-Torres and Llanderal-Cázares (2016), the first description of the species was made by Hammerschmidt (1847), who classifies this insect as *Zeuzera (Cossus) redtenbacheri*. After that, in 1870 in his work “Insectos del maguey”, Blásquez (1870) names the species *Bombyx agavis*, without realizing that it had already been described. Dyar (1910) reclassifies it as *Hypopta chilodora* from a few specimens collected in central México. Ancona (1931) renames *H. chilodora* as *Hypopta agavis*, but Dyar (1937)

decides that both species are synonyms of *Hypopta redtenbacheri*. Brown (1975) makes an ample revision of the genus *Comadia* and considers that the morphology of *H. redtenbacheri* fits the genus *Comadia* and thus reclassifies it as *Comadia redtenbacheri*. In the extensive revision of Cossidae, Schoorl (1990) validates the taxonomic and phylogenetic position of the insect after comparing the morphological traits of a large number of genera. More recently, Llanderal-Cázares *et al.* (2017) confirm that its morphological characteristics make this insect part of the genus *Comadia*.



Figure 1. Last instar *Comadia redtenbacheri* larvae in rhizome tissue of *Agave salmiana*.

Since microgenomic identification systems, discrimination is possible by analyzing a small segment of the genome. These systems are a promising approach to the study of biological diversity (Nanney, 1982; Pace, 1997; Allander *et al.*, 2001; Hamels *et al.*, 2001; Hebert *et al.*, 2003). In fact, the mitochondrial genome of animals is a better target for analysis, because it lacks introns, has limited exposure to recombination and its mode of inheritance is haploid (Saccone *et al.*, 1999; Hebert *et al.*, 2003). For these

reasons, the cytochrome c oxidase I gene (COI) has important advantages. First, the primers for this gene are very robust. Second, COI appears to possess a greater range of phylogenetic signal, and third, the evolution of this gene is rapid enough to allow the discrimination of not only closely related species, but also phylogeographic groups within some single species phyla (Folmer *et al.*, 1994; Zhang and Hewitt, 1997; Knowlton and Weigt, 1998; Cox and Hebert, 2001; Wares and Cunningham, 2001; Hebert *et al.*, 2003). COI-based identification systems can also aid the initial delineation of species (Hebert *et al.*, 2003).

In this study, the cytochrome c oxidase I gene (COI) from the Mexican species *C. redtenbacheri* is used as taxonomic marker for DNA barcoding and phylogenetic analysis of the species from North Central, South Central and East Central regions of México. A Maximum Likelihood (ML) tree that includes *C. redtenbacheri* COI sequences, as well as COI sequences from other cossid species, was developed. In this analysis five partial sequences of the COI gene fragment of larvae collected in five different states of México (Estado de México, Hidalgo, Tlaxcala, Querétaro and Zacatecas) were used to complement the morphological and taxonomic approach that exists for this species. Additionally, COI gene sequences from the five samples were analyzed to determine the percentage of identity among the *C. redtenbacheri* sequences.

2. Materials and methods

2.1 Sampling. Samples of *C. redtenbacheri* larvae were collected from *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck, its main host (Granados, 1993), in five states of the North Central (Querétaro and Zacatecas), South Central (Estado de México) and East Central (Hidalgo and Tlaxcala) regions of México during October 2016 (Table 1). Corroboration of species identification was done with adults according to Triplehorn and Johnson (2005).

2.2. DNA extraction. Genomic DNA was extracted from five larvae of *C. redtenbacheri*, one per state. The larvae were immobilized by refrigeration at 4 °C for ten minutes and disinfected with 70% ethanol to eliminate biological residues that

might contaminate the sample. The larvae were beheaded and a longitudinal cut was made on the back to extirpate the digestive tract and avoid extraction of DNA from intestinal bacteria present in the larvae (Hernández-Flores *et al.*, 2015). It is important to mention that only 0.08–0.1 g of tissue specifically from the thorax was sampled, including the thoracic legs; the rest of the larva was discarded. Samples not used in the dissection were preserved in alcohol 70% for future research. DNA was immediately extracted using 100 mM Tris-HCl pH 8, EDTA 10 mM and 2% SDS buffer solution adjusted from Stewart and Via (1993). The following protocol we standardized for the species is given here in detail. The samples were pulverized in liquid nitrogen, then 700 μ L (microliter) buffer solution, 12.5 μ L [20 mg/ml] proteinase K and 1 μ L/mL RNase were added for further incubation at 38 °C during 30 min. After this time, 30 μ L 10% CTAB and 70 μ L 5M NaCl were added, mixed in a vortex Genie 2[®] (Cole-Parmer Instrument Company, Vernon Hills, IL) and incubated at 65 °C for 20 min. Fifty μ L 5M potassium acetate were added, mixed by immersion and frozen at -20 °C for 30 minutes. Extraction was then performed with 700 μ L chloroform: isoamyl alcohol (24:1) and centrifugation at 13,200 rpm in a microcentrifuge Eppendorf 5415D[®] (Eppendorf, Hauppauge, NY) for 10 min. The supernatant was transferred to a new tube and 640 μ L cold isopropanol and 60 μ L 3M pH 8 sodium acetate were added, mixed by immersion and incubated at -20 °C for 10 min. The tube was then spun at 13,200 rpm for 10 min and the supernatant was transferred to a new tube, 500 μ L of 70% ethanol were added and spun at 13,200 rpm for 10 min. Finally, the ethanol was decanted and the pellet was dried by inverting the tube on blotting paper. The DNA was re-suspended in 50 μ L HPLC water and later checked by electrophoresis on a 0.8% agarose (Invitrogen[®]) gel stained with ethidium bromide. DNA concentrations were determined using a Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer[®] (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA).

Table 1. Localities where *Comadia redtenbacheri* larvae were collected in five states of the North Central, South Central and East Central regions of México.

State	Location	Geographic coordinates
Estado de México	Acolman	19.650298, -98.905641
Hidalgo	Chapultepec de Pozos	19.779506, -98.578519
Querétaro	Palmillas	20.345047, -99.941725
Zacatecas	Pinos	22.301608, -101.583862
Tlaxcala	Calpulalpan	19.603618, -98.557953

2.3. DNA amplification and sequencing. DNA amplification through PCR was carried out with the protocol used previously by Fisher and Smith (2008). The corresponding sequences of the primers used to amplify about 600 bp of the COI gene are shown in Table 2. Amplificons were separated electrophoretically in 2% agarose gel (Invitrogen®) and stained with ethidium bromide for visualization. These products were sent for purification and bidirectional sequencing to MacroGen® (Geumcheon-gu, Seoul, Korea).

Table 2. Primer sequence used to amplify the mitochondrial COI gene from *Comadia redtenbacheri* based on Fisher and Smith (2008).

Primer	Primer sequence (5'- 3')
Forward	ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG
Reverse	TAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA



Figure 2. Female *Comadia redtenbacheri*.

2.4. Nucleotide sequence determination, sequence recruitment, alignment and phylogenetic reconstruction. For each of the five samples of *C. redtenbacheri*, forward and reverse reads were assembled into contigs with the software BioEdit® v.7.2.5 (Hall, 1999). Low quality bases and ambiguous bases at the ends were manually edited based on the chromatograms of both reads.

Additional COI sequences for other cossid species were downloaded from GenBank of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Benson *et al.*, 2005) and BOLD systems (Ratnasingham and Hebert, 2007) (Table 3) during February 2017. We discriminated over the entire universe of COI sequences from members of the the Cossinae subfamily based on: a) the close evolutionary relationship between the the *Acossus*, *Cossodes*, *Cossus*, *Culama*, *Dyspessa*, *Eogystia*, *Holcocerus*, *Idioses*, *Macrocyttara*, *Miacora*, *Prionoxystus* and *Zyganisus* genera and the *Comadia* genus that have available COI gene sequences in the public databases and b) comparison levels that can be achieved using equivalent segments of the COI gene, since databases have more than one partial fragment of the COI gene which by definition are not comparable. The final set of sequences include representatives of the genera mentioned before comprising 40 sequences that belong to 19 species.

Sequences were aligned using mafft v7.205 (Kato and Standley, 2013) implementing its native behavior (without modifiers). Then the alignment was used to carry out statistical selection of best-fit models of nucleotide substitution using jModelTest 2.1.10 (Darriba *et al.*, 2012) implementing 11 substitution schemes (88 models), +F base frequencies, +I+G rate variation, nCat = 4, ML optimized tree for likelihood calculations and a NNI base tree search, which suggested a special case of the GTR substitution model called TIM2+I+G. Finally, we built a phylogenetic reconstruction using the French web port of PhyML 3.0 (Guindon *et al.*, 2010), using the GTR substitution model implementing empirical equilibrium frequencies, fixed transition/transversion ratio, estimated proportion of invariable sites, 4 substitution rate categories, an estimated gamma shape parameter, BIONJ starting tree, NNI tree improvement, without a number of random starting tree and 1000 bootstrap branch support.

To determine the identity percentage among the *C. redtenbacheri* sequences, the Needle algorithm was implemented in the web portal of the European Molecular Biology Open Software Suite (EMBOSS) (McWilliam *et al.*, 2013) from the European Molecular Biology Laboratory (EMBL) and the European Bioinformatics Institute (EBI).

3. Results and discussion

According with Brown (1975) *C. redtenbacheri* is found in México associated with agave plants. Images of the male genitalia are included (Figure 3), which were described in detail by Castro-Torres and Llanderal-Cázares (2016).

Based on the genetic marker, the five samples collected are most likely of the species *C. redtenbacheri* (Appendix). The phylogenetic tree included members of the subfamily Cossinae, which includes the genus *Comadia* (Hammerschmidt). Of all the species of the genus *Comadia* distributed in North America and reported by Brown (1975), until now, only four partial COI sequences of *C. redtenbacheri* have been available in GenBank/BOLD systems. The other collected Cossinae sequences are specified in Table 3. The limited sequence availability and the extent of the COI fragment of the genetic marker determines that our approach cannot construct a phylogeny of the Cossinae subfamily or provide deep insight into the evolutionary history of all the members of the subfamily. Instead, reconstruction focuses on recognizing the evolutionary relationship between our samples of *C. redtenbacheri* and its closest relatives and allows us to delineate the species.



Figure 3. Complete genitalia of *Comadia redtenbacheri* male. From left to right: side, dorsal, ventral and hind view.

The five samples of *C. redtenbacheri* collected by our group cluster in a monophyletic group, consistent in our reconstruction supported by a bootstrap value over 99%. This monophyletic group also includes the *C. redtenbacheri* sequences reported by Vergara *et al.* (2012) and two *C. redtenbacheri* sequences reported by the Smithsonian Institution National Museum of Natural History (Figure 4, red clade). In our study, the position of the *C. redtenbacheri* specimens from five regions of North Central, South Central and East Central regions of México were evaluated against other 18 species of the Cossinae subfamily, an advantage over Vergara *et al.* (2012), who reported a comparison against 10 species of the Cossidae family but included *Trigonocyttara clandestina* (Turner) (subfamily Psychidae), which does not belong to the Cossidae family. Our phylogenetic tree clusters the branches that represent species of the genera *Eogystia* (Alphéraky) from Asia, *Dyspessa* (Borkhausen) from Europe, *Cossus* (Linnaeus) from Europe, as well as members of the genus *Prionoxystus* (Guérin-Méneville and Peck) and *Acossus* (Walker and Lintner) present in North America (Figure 4, green clade) next to the *Comadia* clade. Given the close relationship of the two groups, it is reasonable to assume that *C. redtenbacheri* is closely related to some plant borer species of the genus *Dyspessa* hosted by plants of the genus *Allium* (Yakovlev 2015) and tree borer species such as *Prionoxystus robiniae* that feeds on trees and bushes of *Populus* spp. and *Salix* spp., among others (Zack *et al.*, 2009).

Phytophagous insects obtain their food supply from plants that are available in its geographic and ecologic range (Ehrlich and Raven, 1964), not necessarily meaning that all members of a family or genus of plants are equally acceptable for a particular species (Dethier, 1954). This idea may explain the close relationship between the agave red worm and its maguey host and supports our hypothesis that *C. redtenbacheri* forms an independent clade that shows a well-established preference for the agave species (Ancona, 1931; Brown, 1975; Castro-Torres and Llanderal-Cázares, 2015) and the proposal of Vergara *et al.* (2012) that "*C. redtenbacheri* is not genetically distant from the wood boring *Cossus* species". Many chemical factors operate in plants, as well as structural and mechanical difficulties that represent plant characteristics of resistance or defense against herbivorous species. Thus, exploitation of a particular plant as a food source implies metabolic adjustment for an insect population (Ehrlich and Raven, 1964). These characteristics may be reflected in the

preference of *C. redtenbacheri* for the agave species and explains its phylogenetic distribution, where this species forms an independent well-supported clade apart from its closest relatives, the plant and tree borers.

Vergara *et al.* (2012) mentions that feeding on agave is confirmed as a trait within the genus *Cossus* that is not derived from mechanical limitations. They also state that phylogeny does not explain agave red worm specialization, which may be due to ecological factors, although these factors are not discussed within their work. The so called *Cossus insularis* was collected in pear by Vergara *et al.* (2012); however, it is most probably named *Holcocerus arenicola* (Japan) as showed by the Integrated Taxonomic Information System (ITIS) (<https://www.itis.gov>). Vergara *et al.* (2012) also collected *Comadia redtenbacheri* (North America) from agave but mistakenly referred it as *Cossus redtenbacheri*. Their conclusions were based on two main proposals, a) both species are capable of indistinctly boring either pear branches or agave leaves and b) both are considered to be closely related within their phylogenetic reconstruction. However, lack of consistency in the classification of Vergara *et al.* (2012) of these organisms is indicated by the fact that sequences of *Cossus redtenbacheri* were registered under the name *Comadia redtenbacheri* in GenBank, evidencing that they did not follow any strict homogenous standard classification.

Table 3. Details of 40 partial sequences of the COI gene from species of the Cossinae subfamily used in this study. New sequences are in bold letters.

Species	GenBank/BOLD Systems	Region where it is reported
<i>Acosus populi</i> (Walker)	KT146884.1	Canada (North America)
<i>Acosus centerensis</i> (Lintner)	GU091514.1	Canada (North America)
<i>Comadia redtenbacheri</i> (Hammerschmidt) 1	JN673376.1	México (North America)
<i>Comadia redtenbacheri</i> (Hammerschmidt) 2	JN673377.1	México (North America)
<i>Comadia redtenbacheri</i> (Hammerschmidt) 3	LNAUS061-12	USA (North America)
<i>Comadia redtenbacheri</i> (Hammerschmidt) 4	LNAUS062-12	USA (North America)
<i>Comadia redtenbacheri</i> (Hammerschmidt) 5	Appendix	México (North America)
<i>Comadia redtenbacheri</i> (Hammerschmidt) 6	Appendix	México (North America)
<i>Comadia redtenbacheri</i> (Hammerschmidt) 7	Appendix	México (North America)
<i>Comadia redtenbacheri</i> (Hammerschmidt) 8	Appendix	México (North America)
<i>Comadia redtenbacheri</i> (Hammerschmidt) 9	Appendix	México (North America)
<i>Cossodes lyonetii</i> (White)	HQ951881.1	Australia
<i>Cossus cossus</i> (Linnaeus)	GU828604.1	Europe
<i>Culama australis</i> (Walker)	HQ951860.1	Australia
<i>Culama australis</i> (Walker)	HQ951861.1	Australia
<i>Culama australis</i> (Walker)	HQ951875.1	Australia
<i>Culama crepera</i> (Turner)	HQ951864.1	Australia
<i>Culama crepera</i> (Turner)	HQ951865.1	Australia
<i>Culama crepera</i> (Turner)	HQ951866.1	Australia
<i>Culama</i> sp. (Walker)	HQ951844.1	Australia
<i>Culama</i> sp. (Walker)	HQ951845.1	Australia
<i>Culama</i> sp. (Walker)	HQ951846.1	Australia
<i>Dyspessa ulula</i> (Borkhausen)	KX046819.1	Europe
<i>Eogystia sibirica</i> (Alphéraky)	KC791482.1	Asia (China)
<i>Eogystia sibirica</i> (Alphéraky)	KC791483.1	Asia (China)
<i>Holcocerus arenicola</i> (Staudinger)	JN673375.1	Japan
<i>Idioses littleri</i> (Turner)	HQ951811.1	Australia
<i>Idioses littleri</i> (Turner)	HQ951812.1	Australia
<i>Idioses littleri</i> (Turner)	HQ951813.1	Australia
<i>Idioses</i> sp. (Turner)	HQ951814.1	Australia
<i>Idioses</i> sp. (Turner)	HQ951815.1	Australia
<i>Macrocyttara expressa</i> (T.P. Lucas)	HQ951847.1	Australia
<i>Macrocyttara expressa</i> (T.P. Lucas)	HQ951848.1	Australia
<i>Macrocyttara pamphaea</i> (Turner)	HQ951858.1	Australia
<i>Miacora</i> sp. (Dyar)	JQ554176.1	Costa Rica (Central America)
<i>Prionoxystus macmurtrei</i> (Guérin-Méneville)	GU087518.1	USA (North America)
<i>Prionoxystus robiniae</i> (Peck)	GU090139.1	USA (North America)
<i>Prionoxystus robiniae</i> (Peck)	GU090140.1	USA (North America)
<i>Prionoxystus robiniae</i> (Peck)	KT135577.1	USA (North America)
<i>Zyganisus caliginosus</i> (Walker)	HQ951876.1	Australia

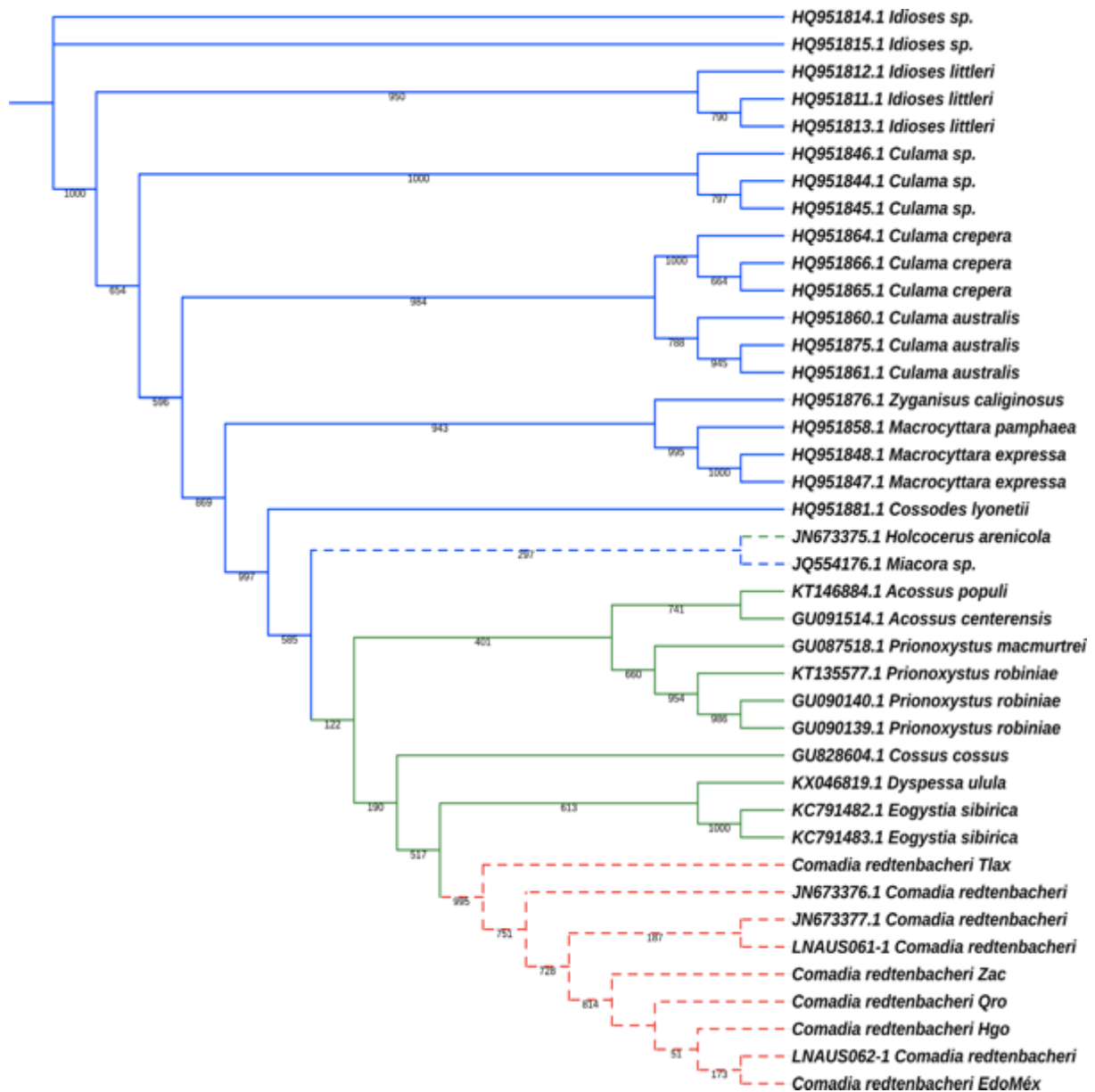


Figure 4. Maximum Likelihood bootstrap consensus tree based on the COI partial gene depicting 40 branches that represent 19 species of the Cossinae subfamily. Red dotted branches cluster *Comadia redtenbacheri* members. This well-supported clade is composed essentially of the five samples collected by our group, two more characterized by Vergara *et al.* (2012) and the last two deposited in the BOLD systems by members of the Smithsonian National Museum of Natural History. Green branches represent the closely related genera that group seven species from North America, Europe and Asia, respectively. Blue and green dotted branches represent two species from Central America and Japan, respectively. Blue branches represent nine species from Australia. The tree was visualized and decorated using the Interactive Tree of Life, iTOL v3.6.1 (Letunic and Bork 2016).

Distinction of feeding resources may play a significant role in separating intraspecific morphs (Smith and Skúlason, 1996), and preference for a host could be explained by the absence of genetic variation after a colonization event of approximately 150 years (Zangerl *et al.*, 2002). The latter may help us understand why the preference of *C. redtenbacheri* for the agave has led to differentiation from other Cossinae. According to Janz and Nylin (1997) and Bergström *et al.* (2004), if the change in preference for a locally abundant host, the agave in this case, is large enough to result in speciation, the species may have the capability of discerning quality of individuals of the host species. This ability has been observed in the field when collecting *C. redtenbacheri* larvae in the Estado de México. These larvae exhibited some degree of preference for three-year-old agaves (Delgado-Tejeda *et al.*, 2017) with a height of 30–50 cm from the base of the leaves (Llanderal-Cázares *et al.*, 2010).

In our analysis, the degree of variability is low and only detectable in the sequence of the sample from Tlaxcala (Table 4). The percentage of identity among the sequences of *C. redtenbacheri* is reported in detail in Table 5. In this work, the genetic variation among our sequences is almost non-existent, the sequence from the sample collected in Tlaxcala shows four distinctive point mutations (Table 4 and Appendix) that distinguish it from the other samples. This could be due to insect feeding habits on different *Agave* spp. hosts, translated as changes in genetic frequency over time as suggested by Diehl and Bush (1984) and Bergström *et al.* (2004), but can also be explained merely by genetic variation within the population.

Table 4. Changes in the partial sequence of the COI gene from the sample collected in the state of Tlaxcala, México.

Position	Type of mutation
283	T ↔ C (Transition)
365	T ↔ A (Transversion)
581	C ↔ T (Transition)
593	A ↔ G (Transition)

Table 5. Percentage of identity among the sequences of *Comadia redtenbacheri* collected from several locations from North Central, South Central and East Central regions of México, using the Needle algorithm.

	Sequence length	% of identity	% of spaces	Score
EdoMéx ^a /Hgo ^b	602/604	99.7%	2/604 (0.3%)	3010.0
EdoMéx/Qro ^c	602/608	99.0%	6/608 (1.0%)	3010.0
EdoMéx/Zac ^d	602/604	99.7%	2/604 (0.3%)	3010.0
EdoMéx/Tlax ^e	598/604	99.0%	2/604 (0.3%)	2974.0
Hgo/Qro	604/608	99.3%	4/608 (0.7%)	3020.0
Hgo/Zac	602/606	99.3%	4/606 (0.7%)	3010.0
Hgo/Tlax	600/604	99.3%	0/604 (0.0%)	2984.0
Qro/Zac	604/608	99.3%	4/608 (0.7%)	3020.0
Qro/Tlax	600/608	98.7%	4/608 (0.7%)	2984.0
Zac/Tlax	598/606	98.7%	4/606 (0.7%)	2974.0

^aEdoMéx: Estado de México, ^bHgo: Hidalgo, ^cQro: Querétaro, ^dZac: Zacatecas, ^eTlax: Tlaxcala

4. Conclusions

The COI gene was partially sequenced for the five samples collected by our group. *C. redtenbacheri* is a cossid species in México that is distinguished for feeding and developing in several agave species including *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck.

However, because of the lack of available COI sequences of other members of the Cossinae family and other genetic markers in public databases, it is still not possible to reconstruct a phylogeny of the Cossinae subfamily that reflects the specific position that *C. redtenbacheri* occupies among those species that are believed to be most closely related and that are characteristic of other feeding niches.

There are no significant genetic differences in the COI gene among the samples collected from Hidalgo, Querétaro, Estado de México and Zacatecas. The only sequence that exhibits genetic variation comes from the sample collected in Tlaxcala. This result has two possible interpretations: a) that there is not enough genetic variation in the COI gene of *C. redtenbacheri* collected from these areas to allow identification of individuals that inhabit particular regions from North Central, South Central and East Central regions of México, or b) that the small sample does not reflect the genetic variation that exists within populations that inhabit these areas and more sampling should be done to solve this issue.

5. Acknowledgments

We thank Dr. Ernestina Valadez Moctezuma and technician María Dolores Luna Almanza for access to the Molecular Biology Laboratory of the Department of Plant Science (Fitotecnia) at the Universidad Autónoma Chapingo; MSc Arit Seleny de León-Lorenzana for reviewing the English version and MSc Jorge Valdez-Carrasco for his assistance in obtaining the images of genitalia. The first author thanks the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for the scholarship grant (418940) and for funding the study through project 166898 "Biología de *Comadia redtenbacheri* Hamm."

6. References

- Allander, T., S.U. Emerson, R.E. Engle, R.H. Purcell, and J. Bukh. 2001. A virus discovery method incorporating DNase treatment and its application to the identification of two bovine parvovirus species. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 11609–11614.
- Ancona, H.L. 1931. Los chilocuiles o gusanitos de la sal de Oaxaca. *An. Inst. Biol.* 2: 265–277.
- Benson, D.A., I. Karsch-Mizrachi, D.J. Lipman, J. Ostell, and D.L. Wheeler. 2005. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 33 (Supplement 1): D34–D38.
- Bergström, A., S. Nylin, and G.H. Nygren. 2004. Conservative resource utilization in the common blue butterfly—evidence for low costs of accepting absent host plants? *Oikos* 107: 345–351.
- Blásquez, I. 1870. Insectos del maguey. *La Naturaleza* 1: 282–290.
- Brown, R.M. 1975. A revision of the North American *Comadia* (Cossidae). *J. Res. Lepidoptera* 14: 189–212.
- Castro-Torres, R.E., y C. Llanderal-Cázares. 2015. Principales caracteres morfológicos para el reconocimiento de *Comadia redtenbacheri* Hammerschmidt (Lepidoptera: Cossidae). *Entomol. Mex.* 2: 798–803.
- Castro-Torres, R., and C. Llanderal-Cázares. 2016. Detailed morphology of all life stages of the agave red worm, *Comadia redtenbacheri* (Hammerschmidt) (Lepidoptera: Cossidae). *Neotrop. Entomol.* 45: 698–711.

- Cox, A.J., and P.D.N. Hebert. 2001. Colonization, extinction, and phylogeographic patterning in a freshwater crustacean. *Mol. Ecol.* 10: 371–386.
- Darriba, D., G.L. Taboada, R. Doallo, and D. Posada. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods.* 9: 772.
- Dethier, V.G. 1954. Evolution of Feeding Preferences in Phytophagous Insects. *Evolution* 8: 33–54.
- Delgado-Tejeda, I., C. Llanderal-Cázares, K. Miranda-Perkins, and H.M. De los Santos-Posadas. 2017. Pupation, adult emergence and oviposition of *Comadia redtenbacheri* (Lepidoptera: Cossidae) in the nursery. *Agrociencia* 51: 447–454.
- Diehl, S.R., and G.L. Bush. 1984. An evolutionary and applied perspective of insect biotypes. *Annu. Rev. Entomol.* 29: 471–504.
- Dyar, H.G. 1910. New Lepidoptera from Mexico, Cossidae. *Proc. USNM* 38: 269–271.
- Dyar, H.G. 1937. Cossidae. *In* Seitz, A., *Macrolepidoptera of the world*. Fritz Lehman Verlag, Stuttgart, pp. 1–1275.
- Ehrlich, P.R., and P.H. Raven. 1964. Butterflies and plants: a study in coevolution. *Evolution* 18: 586–608.
- Fisher, B.L., and M.A. Smith. 2008. A revision of Malagasy species of *Anochetus* Mayr and *Odontomachus* Latreille (Hymenoptera: Formicidae). *PLoS ONE* 3: e1787.
- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz, and R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotech.* 3: 294–299.
- Granados, D.S. 1993. *Los Agaves en México*. Universidad Autónoma Chapingo, México, 252 pp.
- Guindon, S., J.F. Dufayard, V. Lefort, M. Anisimova, W. Hordijk, and O. Gascuel. 2010. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 59: 307–321.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/ NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41: 95–98.
- Hamels, J., L. Gala, S. Dufour, P. Vannuffel, N. Zammateo, and J. Remacle. 2001. Consensus PCR and microarray for diagnosis of the genus *Staphylococcus*, species, and methicillin resistance. *BioTechniques* 31: 1364–1372.

- Hammerschmidt, K.E. 1847. Beschreibung eines neuen mexicanischen Schmetterlinges *Zeuzera (Cossus) redtenbacheri* Hmrschdt. Naturwissenschaftlichen Abhandlungen 2: 151–152.
- Hebert, P.D.N., A. Cywinska, S.L. Ball, and J.R. deWaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Roy. Soc. B-Biol. Sci. 270: 313–321.
- Hernández-Livera, R.A., C. Llanderal-Cazáres, L.E. Castillo-Márquez, J. Valdez-Carrasco, and R. Nieto-Hernández. 2005. Identification of larval instars of *Comadia redtenbacheri* (Hamm) (Lepidoptera: Cossidae). Agrociencia 39: 539–544.
- Hernández-Flores, L., C. Llanderal-Cázares, A.W. Guzmán-Franco, and S. Aranda-Ocampo. 2015. Bacteria present in *Comadia redtenbacheri* larvae (Lepidoptera: Cossidae). J. Med. Entomol. 52: 1150–1158.
- Katoh, K., and D.M. Standley. 2013. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. Mol. Biol. Evol. 30: 772–780.
- Knowlton, N., and L.A. Weigt. 1998. New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama. Roy. Soc. B-Biol. Sci. 265: 2257–2263.
- Janz, N., and S. Nylin. 1997. The role of female search behavior in determining host plant range in plant feeding insects: a test of the information processing hypothesis. Roy. Soc. B-Biol. Sci. 264: 701–707.
- Letunic, I., and P. Bork. 2016. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. Nucleic Acids Res. 44: 242–245.
- Llanderal-Cázares, C., R. Nieto-Hernández, I. Almanza-Valenzuela, y C. Ortega-Álvarez. 2007. Biología y comportamiento de *Comadia redtenbacheri* (Hamm) (Lepidoptera: Cossidae). Entomol. Mex. 6: 252–255.
- Llanderal-Cázares, C., H.M. De los Santos-Posadas, I. Almanza-Valenzuela, R. Nieto-Hernández, y C. Castillejos-Cruz. 2010. Establecimiento del gusano rojo en plantas de maguey en invernadero. Acta Zool. Mex. 26: 25–31.
- Llanderal-Cázares, C., R. Castro-Torres, and K. Miranda-Perkins. 2017. Bionomics of *Comadia redtenbacheri* (Hammerschmidt, 1847) (Lepidoptera: Cossidae). Shilap-Rev. Lepidopt. 45: 373–383.

- McWilliam, H., W. Li, M. Uludag, S. Squizzato, Y. Mi-Park, N. Buso, A. Peter-Cowley, and R. Lopez. 2013. Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res.* 41: 597–600.
- Millán-Mercado, E., C. Llanderal-Cazás, J. Valdez-Carrasco, and A.L. Viguera. 2016. Color and Turgidity Retention of the Mezcal Worm, *Comadia redtenbacheri*, in Bottled Mezcal. *Southwest Entomol.* 41: 751–760.
- Nanney, D.L. 1982. Genes and phenes in *Tetrahymena*. *BioScience* 32: 783–788.
- Pace, N.R. 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276: 734–740.
- Ramos-Elorduy, J., J.M.P. Moreno, A.I. Vázquez, I. Landero, H. Oliva-Rivera, and V.H.M. Camacho. 2011. Edible Lepidoptera in Mexico: Geographic distribution, ethnicity, economic and nutritional importance for rural people. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 7: 2.
- Ratnasingham, S., and P.D.N. Hebert. 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Mol. Ecol. Notes* 7: 355–364.
- Saccone, C., C. De Giorgi, C. Gissi, G. Pesole, and A. Reyes. 1999. Evolutionary genomics in the Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. *Gene* 238: 195–209.
- Schoorl, J.W. 1990. A phylogenetic study on Cossidae (Lepidoptera: Ditrysia) based on external morphology. *Zool. Verhandelingen Leiden* 263: 1–295.
- Smith, T.B., and S. Skúlason. 1996. Evolutionary significance of resource polymorphisms in fishes, amphibians, and birds. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 27: 111–133.
- Stewart, C.N. Jr., and L.E. Via. 1993. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *Biotechniques* 14: 748–750.
- Triplehorn, C.A., and N.F. Johnson. 2005. Borror and DeLong's Introduction to the Study of Insects. 7th ed. Thomson Brooks/ Cole, Belmont, CA., 865 pp.
- Vergara, F., R.C. Everroad, G. Andraca, J. Kikuchi, and H. Makihara. 2012. Plant host differences between *Cossus redtenbacheri* and *Cossus insularis*: insights from mechanical tests and molecular phylogeny. *Bull. Insectology* 65: 217–222.
- Wares, J.P., and C.W. Cunningham. 2001. Phylogeography and historical ecology of the North Atlantic intertidal. *Evolution* 55: 2455–2469.

- Yakovlev, R.V. 2015. Patterns of Geographical Distribution of Carpenter Moths (Lepidoptera: Cossidae) in the Old World. *Contemp. Probl. Ecol.* 8: 36–50.
- Zack, R.S., P.J. Landolt, and D. Strenge. 2009. Goat moths (Lepidoptera: Cossidae) of the Hanford Site and Hanford National Monument, Washington State. *Pan-Pac. Entomol.* 85: 182–186.
- Zangerl, A.R., T. Huang, J.L. McGovern, and M.R. Berenbaum. 2002. Paradoxical host shift by *Depressaria pastinacella* in North America: is enemy-free space involved? *Oikos* 98: 431–436.
- Zhang, D.X., and G.M. Hewitt. 1997. Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial COI primers in insects. *Insect Mol. Biol.* 6: 143–150.

Appendix

Partial sequence of COI gene from *Comadia redtenbacheri*, isolate EdoMex 602 bp (GenBank accession number: MH443780.1).

ATAGGTA CTT CATT AAGT CTT TTA ATT C GAG CCG AATT AGG AAT CCAGG ATCTCT AATT GG
 AAATGATCAAATTTATAACTATCGTTACAGCCCACGCTTTTATTATAATTTTTTTCATAGT
 AATACCAATTATAATTGGAGGATTTGGTAATTGATTAATCCCATTAATATTAGGAGCTCCAG
 ATATAGCTTTCCACGAATAAATAACATAAGATTTTGATTACTCCCCCATCATTAACTCTCC
 TTATTTCAAGAAGTATTGTAGAAAATGGAGCTGGCACAGGATGAACTGTATAACCCCTT
 TATCATCCAATATTGCCCATGGAGGAAGATCAGTTGATTTAGCAATTTTTTCATTACATTTA
 GCTGGAATTTTCATCTATTTTAGGAGCTATTA ACTTTTATTACA ACTATTATTAATATACGACC
 CCACAATATATCCTTTGATCAAATACCTTTATTCGTATGAGCAGTTGGAATTACAGCTTTAC
 TTTTACTTTTATCTTTACCAGTATTAGCTGGAGCAATTACTATACTATTAACAGATCGAAAT
 TTAAATACATCTTTTTTTGATCCCGCAGGAGGGGAGATCCAAT

Partial sequence of COI gene from *Comadia redtenbacheri*, isolate Hgo 604 bp (GenBank accession number: MH443781.1).

TAATAGGTA CTT CATT AAGT CTT TTA ATT C GAG CCG AATT AGG AAT CCAGG ATCTCT AATT
 GGAAATGATCAAATTTATAACTATCGTTACAGCCCACGCTTTTATTATAATTTTTTTCAT
 AGTAATACCAATTATAATTGGAGGATTTGGTAATTGATTAATCCCATTAATATTAGGAGCTC
 CAGATATAGCTTTCCACGAATAAATAACATAAGATTTTGATTACTCCCCCATCATTAACT

CTCCTTATTTCAAGAAGTATTGTAGAAAATGGAGCTGGCACAGGATGAACTGTATACCCCC
CTTTATCATCCAATATTGCCCATGGAGGAAGATCAGTTGATTTAGCAATTTTTTCATTACAT
TTAGCTGGAATTTTCATCTATTTTAGGAGCTATTAACCTTTATTACAACCTATTATTAATATACG
ACCCACAATATATCCTTTGATCAAATACCTTTATTCGTATGAGCAGTTGGAATTACAGCTT
TACTTTTACTTTTATCTTTACCAGTATTAGCTGGAGCAATTACTATACTATTAACAGATCGA
AATTTAAATACATCTTTTTTTGATCCCGCAGGAGGGGGAGATCCAAT

Partial sequence of COI gene from *Comadia redtenbacheri*, isolate Oro 608 bp
(GenBank accession number: MH443782.1).

TAATAGGTACTTCATTAAGTCTTTTAATTCGAGCCGAATTAGGAAATCCAGGATCTCTAATT
GGAAATGATCAAATTTATAATACTATCGTTACAGCCCACGCTTTTATTATAATTTTTTTCAT
AGTAATACCAATTATAATTGGAGGATTTGGTAATTGATTAATCCCATTAATATTAGGAGCTC
CAGATATAGCTTTCCACGAATAAATAACATAAGATTTTGATTACTCCCCCATCATTAACT
CTCCTTATTTCAAGAAGTATTGTAGAAAATGGAGCTGGCACAGGATGACTGTATACCCCC
TTTATCATCCAATATTGCCCATGGAGGAAGATCAGTTGATTTAGCAATTTTTTCATTACATT
TAGCTGGAATTTTCATCTATTTTAGGAGCTATTAACCTTTATTACAACCTATTATTAATATACGA
CCCCACAATATATCCTTTGATCAAATACCTTTATTCGTATGAGCAGTTGGAATTACAGCTTT
ACTTTTACTTTTATCTTTACCAGTATTAGCTGGAGCAATTACTATACTATTAACAGATCGAA
ATTTAAATACATCTTTTTTTGATCCCGCAGGAGGGGGAGATCCAATTCTT

Partial sequence of COI gene from *Comadia redtenbacheri*, isolate Zac 604 bp
(GenBank accession number: MH443784.1).

ATAGGTACTTCATTAAGTCTTTTAATTCGAGCCGAATTAGGAAATCCAGGATCTCTAATTGG
AAATGATCAAATTTATAATACTATCGTTACAGCCCACGCTTTTATTATAATTTTTTTCATAGT
AATACCAATTATAATTGGAGGATTTGGTAATTGATTAATCCCATTAATATTAGGAGCTCCAG
ATATAGCTTTCCACGAATAAATAACATAAGATTTTGATTACTCCCCCATCATTAACTCTCC
TTATTTCAAGAAGTATTGTAGAAAATGGAGCTGGCACAGGATGAACTGTATACCCCCCTTT
ATCATCCAATATTGCCCATGGAGGAAGATCAGTTGATTTAGCAATTTTTTCATTACATTTAG
CTGGAATTTTCATCTATTTTAGGAGCTATTAACCTTTATTACAACCTATTATTAATATACGACCC
CACAATATATCCTTTGATCAAATACCTTTATTCGTATGAGCAGTTGGAATTACAGCTTTACT
TTTACTTTTATCTTTACCAGTATTAGCTGGAGCAATTACTATACTATTAACAGATCGAAATT
TAAATACATCTTTTTTTGATCCCGCAGGAGGGGGAGATCCAATTC

Partial sequence of COI gene from *Comadia redtenbacheri*, isolate Tlax 604 bp (GenBank accession number: MH443783.1). Possible mutations are in bold and underlined letters.

TAATAGGTACTTCATTAAGTCTTTTAATTTCGAGCCGAATTAGGAAATCCAGGATCTCTAATT
GGAAATGATCAAATTTATAATACTATCGTTACAGCCCACGCTTTTATTATAATTTTTTTCAT
AGTAATACCAATTATAATTGGAGGATTTGGTAATTGATTAATCCCATTAATATTAGGAGCTC
CAGATATAGCTTTCCACGAATAAATAACATAAGATTTTGATTACTCCCCCATCATTA
ACTCTCCTTATTTCAAGAAGTATTGTAGAAAATGGAG**I**TGGCACAGGATGAACTGTATACCCC
CTTTATCATCCAATATTGCCCATGGAGGAAGATCAGTTGATTTAGCAATTTTTT**C**TTACAT
TTAGCTGGAATTTTCATCTATTTTAGGAGCTATTA
ACTTTTATTACA
ACTATTATTAATATACG
ACCCACAATATATCCTTTGATCAAATACCTTTATTCGTATGAGCAGTTGGAATTACAGCTT
TACTTTTACTTTTATCTTTACCAGTATTAGCTGGAGCAATTACTATACTATTAACAGATCGA
AATTTAAATACATCTTTTTTTGAC**C**CCCGCAGGAGG**A**GGAGATCCAAT

CAPÍTULO III. Variabilidad genética en *Comadia redtenbacheri* (Lepidoptera: Cossidae) mediante marcadores ISSR

Resumen

En México la demanda de insectos comestibles va en aumento, aunque su venta no está regulada. Un insecto altamente comestible es la larva de *Comadia redtenbacheri*. Las larvas se caracterizan porque liberan una secreción odorífera volátil, además de que presentan el color rojo característico a medida que avanzan de instar. Es importante mantener a las poblaciones de *C. redtenbacheri*, ya que al ser una especie que no se ha domesticado, podría conducir a su extinción. Algunas técnicas moleculares como la de ISSR basada en PCR se han aplicado para evaluar la diversidad genética y la diferenciación de poblaciones en diferentes especies de insectos. Este es el primer reporte del empleo de marcadores ISSR en la comprensión de la variabilidad genética de *C. redtenbacheri* en cinco poblaciones de México. Un total de 14 iniciadores de 30 evaluados, se utilizaron para tipificar genéticamente a las cinco poblaciones, los cuales mostraron polimorfismos y produjeron perfiles de amplificación claros y reproducibles y aún cuando no se separaron estrictamente las poblaciones, cada individuo mostró diferencias, revelando que existe variabilidad en la especie. El dendrograma mostró que la mayoría de los individuos de la misma región son diferentes al separarse en distintos clados. La distribución geográfica es posiblemente el factor principal que induce la variabilidad genética.

Palabras clave: Insectos comestibles, gusano rojo del maguey, DNA genómico, polimorfismos.

CHAPTER III. Genetic variability at *Comadia redtenbacheri* (Lepidoptera: Cossidae) through ISSR markers

Abstract

In Mexico, the demand for eatable insects is increasing, although its sale is not regulated. A highly edible insect is the larva of *Comadia redtenbacheri*. The larvae are characterized by the release of a volatile odoriferous secretion, as well as the characteristic red color as they move from instar. It is important to maintain the populations of *C. redtenbacheri*, since being a species that has not been domesticated, it could lead to its extinction. Some molecular techniques such as the ISSR-PCR, have been applied to evaluate genetic diversity and differentiation of populations in several insect species. This is the first report with ISSR markers in order to explore the genetic variability of *C. redtenbacheri* in five populations of Mexico. A total of 14 primers out of 30 evaluated were used to genetically typify the five populations, which showed polymorphisms and produced clear and reproducible amplification profiles; and even when the populations were not strictly separated, everyone showed differences, revealing that there is variability in the species. The dendrogram showed that most individuals from the same region are different when separated into the clades. Geographic distribution is possibly the main factor that induces genetic variability.

Keywords: Edible insects, agave red worm, genomic DNA, polymorphisms.

1. Introducción

Tanto en México como a nivel internacional, la demanda de insectos comestibles va en aumento. En este país, los insectos comestibles se comercializan en diversos establecimientos, principalmente de tipo gourmet. Sin embargo, su venta no está sujeta a normas oficiales de regulación ambiental o dentro de acuerdos internacionales sobre conservación de la biodiversidad, lo que conlleva a una explotación de los recursos de una manera irracional, deterioro del ambiente y agotamiento de los recursos, lo que afecta directamente su mantenimiento y conservación (Ramos-Elordoy *et al.*, 2006).

La larva de *Comadia redtenbacheri* es un insecto comestible con gran demanda en México. La hembra oviposita los huevos en masa en la base de las pencas externas del maguey y al emerger del huevo, las larvas barrenan los tejidos y migran en grupo hacia el tallo subterráneo de diferentes especies de agave y a medida que maduran adquieren el color rojo que las caracteriza (Llanderal-Cázares *et al.*, 2017). A lo largo de su ciclo de vida que es univoltino, pasan por siete instares larvales (Hernández-Livera *et al.*, 2005, Llanderal-Cázares *et al.*, 2007). Su área de distribución geográfica abarca Texas, EUA y se encuentra muy extendida en México, donde se localiza *A. salmiana* Otto ex Salm-Dyck su hospedante principal (Brown, 1975; Granados, 1993). Debido a que las poblaciones silvestres son extensivamente recolectadas se considera una especie amenazada (Ramos-Elorduy, 2006).

Algunas técnicas moleculares proporcionan una identificación rápida, debido a que el DNA puede extraerse de cualquier etapa y someterse a un análisis inmediato (Nybom, 2002; Zheng *et al.*, 2010). En este caso, la técnica de ISSR-PCR (Inter Simple Sequence Repeats, por sus siglas en inglés) utiliza iniciadores capaces de detectar abundantes loci polimórficos, comparado con otros marcadores, además de que producen bandas confiables y reproducibles debido al uso de temperaturas de alineamiento generalmente superiores a los 50 °C (Zietkiewicz *et al.*, 1994).

Es importante mencionar que estos marcadores se han aplicado para evaluar la diversidad genética y la diferenciación de poblaciones en diversas especies de insectos (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Abbot, 2001; Ge *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2016). En este estudio se presenta el análisis basado en ISSR y las relaciones genéticas de cinco poblaciones de *C. redtenbacheri*.

2. Materiales y Métodos

2.1. Muestreo

Se recolectaron larvas de *C. redtenbacheri* de tallos subterráneos de su hospedante *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck, en cinco estados de México de la zona centro Norte (Querétaro y Zacatecas), centro Sur (Estado de México) y centro Este (Hidalgo y Tlaxcala), durante octubre de 2016 (ver Cárdenas-Aquino *et al.*, 2018). El instar de cada una de las larvas en este estudio se determinó con base en Hernández-Livera *et al.* (2005).

2.2. Extracción de DNA genómico

El DNA genómico se extrajo de 15 larvas de *C. redtenbacheri*, tres individuos por cada estado larval. El protocolo de extracción se reporta a detalle en Cárdenas-Aquino *et al.* (2018).

2.3. Amplificación de ISSR y electroforesis en gel de poliacrilamida

El DNA genómico extraído anteriormente se utilizó como molde en las reacciones de PCR para el análisis de ISSR. Treinta iniciadores ISSR (11–22 bases) con repeticiones tetra-, hexa-, hepta- y octa- nucleótidos (Sigma Aldrich, EUA), se usaron para analizar la variabilidad genética dentro de las cinco poblaciones de la especie *C. redtenbacheri*, entendiéndose por individuos 1–3 de Tlaxcala, 4–6 de Querétaro, 7–9 de Hidalgo, 10–12 del Estado de México y 13–15 de Zacatecas, respectivamente. Para el análisis de variabilidad se seleccionaron 14 iniciadores ISSR (Cuadro 1) que produjeron bandas reproducibles y claras de las cinco poblaciones.

La mezcla de reacción para cada ISSR consistió en 80 ng (nanogramos) de DNA molde, 1X de Taq Buffer con KCl (Thermo Scientific Inc., EUA), 2.5 mM (milimoles) de MgCl₂ (Promega Madison, EUA), 200 μM (micromoles) de dNTP's (Promega Madison, EUA), 20 pmol (picomoles) de cada iniciador y 1.5 unidades de DNA Taq polimerasa (Thermo Scientific Inc., EUA). El volumen final se ajustó a 25 μL (microlitros) con agua HPLC. Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador digital Maxygene (Axygen Inc., EUA) programado con las condiciones siguientes: la desnaturalización inicial del DNA molde se llevó a cabo a 94 °C durante 5 min, seguido de 35 ciclos (45 seg a 94 °C para la etapa de desnaturalización, 45 seg a 54 °C para

la etapa de alineamiento y extensión a 72 °C por 2 min); la extensión final de los productos de PCR se llevó a cabo a 72 °C durante 10 min. Los productos de PCR se separaron en geles de poliacrilamida 8% en 1X TBE buffer por electroforesis a 230 volts por 110 min y se tiñeron con AgNO₃ 0.2%, siguiendo el protocolo de Valadez-Moctezuma y Kahl (2000). En las corridas electroforéticas se incluyeron los marcadores de peso molecular de 100 y de 1000 pares de bases (pb) como referencia (Promega Madison, EUA) y fueron fotografiados con un transiluminador de luz visible. Tanto las reacciones de PCR como sus separaciones en geles de poliacrilamida se realizaron por duplicado para confirmar la reproducibilidad.

Cuadro 1. Lista de 14 iniciadores ISSR usados para caracterizar el genoma de cinco poblaciones de *Comadia redtenbacheri*.

No. del iniciador	Secuencia del iniciador (5´-3´)	No. de bandas	Rango de tamaño de banda (pb)
ISSR1	(CT) ₈ A	27	150-1500
ISSR2	(AC) ₈ G	28	180-1600
ISSR3	(AG) ₈ YA	28	180-1500
ISSR4	(CT) ₈ RG	22	220-1600
ISSR5	(CA) ₈ RG	23	170-1600
ISSR6	HVH(TG) ₇	18	200-1300
ISSR7	(GACA) ₄	35	130-1300
ISSR8	(GGAT) ₄	33	190-1500
ISSR9	(TCC) ₅ RY	42	170-2000
ISSR10	(GACA) ₄ GT	37	170-1600
ISSR11	(GT) ₈ YA	32	50-1100
ISSR12	AGGTCGCGGCCGCNNNNNATG	41	50-1000
ISSR13	BHB(GA) ₇	38	170-2000
ISSR14	(AC) ₈ T	25	180-1500
Total	-	429	-

2.4. Análisis de los perfiles electroforéticos

Se construyó una matriz binaria (0 y 1) a partir de los diferentes perfiles de DNA, donde "1" indicó la presencia de un fragmento y "0" su ausencia entre cada uno de los individuos de cada población para derivar una matriz de distancia genética (Nei, 1978). Se generó un dendrograma utilizando el método de grupo de pares no

ponderados con media aritmética "UPGMA" (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic average, por sus siglas en inglés), con coeficiente Nei & Li/Dice y 100 re-muestréos tipo Bootstrap, por cada iniciador ISSR y al final se generó un dendrograma con 1000 re-muestréos tipo Bootstrap que agrupaba a todos los iniciadores, mediante el software Free Tree 0.9.1.50 y se graficó con Tree View 1.6.6 (Hampl *et al.*, 2001; Page, 2001).

3. Resultados y Discusión

A simple vista las larvas presentaban el color rojo característico, así como un cuerno de color marrón oscuro, endurecido y curvado hacia el extremo cefálico del cuerpo, presente en el último segmento abdominal, características mencionadas por Castro-Torres y Llanderal-Cázares (2016). Al medir las cápsulas cefálicas de cada una de las larvas, se observó que todas pertenecían al séptimo instar, de acuerdo a lo reportado por Hernández-Livera *et al.* (2005).

Al utilizar la técnica de ISSR, solamente 14 de los 30 iniciadores utilizados fueron capaces de tipificar genéticamente a las cinco poblaciones de *C. redtenbacheri*, ya que mostraron polimorfismos y produjeron perfiles de amplificación claros y reproducibles; sin embargo, aún cuando no se diferenciaron totalmente las cinco poblaciones, los iniciadores utilizados sí diferenciaron a cada uno de los individuos, mostrando las similitudes y diferencias entre ellos. Lo anterior revela que existe variabilidad en el genoma de los individuos de *C. redtenbacheri*, procedente de diferentes regiones de México consideradas en el estudio. De acuerdo con Ramos-Elorduy (2006) y Ramos-Elorduy *et al.* (2011) *C. redtenbacheri* se distribuye en la Ciudad de México, Estado de México, Guanajuato, Hidalgo, Michoacán, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Tlaxcala, Veracruz y Zacatecas. El estudio se enfocó en el Estado de México, Hidalgo, Querétaro, Tlaxcala y Zacatecas, por ser los principales estados donde se ha colectado a *C. redtenbacheri* (Castro-Torres y Llanderal-Cázares, 2016; Delgado-Tejeda *et al.*, 2017; Llanderal-Cázares *et al.*, 2007; 2017; Cárdenas-Aquino *et al.*, 2018).

Asimismo, los perfiles/huellas de esta técnica fueron abundantes y nítidos. El número de bandas producidas por cada iniciador fue aproximadamente de 18–42. Los tamaños de banda de los productos amplificados se encontraron entre 50 y 2000 pb

(Cuadro 1). Los iniciadores que mostraron más variabilidad genética dentro de las cinco poblaciones de *C. redtenbacheri* (debido a que distinguieron entre individuos y no entre poblaciones) fueron el ISSR1, ISSR2, ISSR3, ISSR4, ISSR5, ISSR7, ISSR9, ISSR10, ISSR11 y el ISSR14; a su vez, los iniciadores que mostraron menor variabilidad genética puesto que agruparon a las poblaciones de *C. redtenbacheri* por región fueron el ISSR6, ISSR8, ISSR12 y el ISSR13.

Algunos iniciadores como son el ISSR1, ISSR4, ISSR5 y el ISSR6 indicaron que a nivel de individuos, ya sea de diferente o de la misma población, la variabilidad genética es muy similar. Un ejemplo de un perfil de ISSR-PCR utilizando el iniciador (TCC)₅RY (ISSR9) en las cinco poblaciones de *C. redtenbacheri* en gel de poliacrilamida, se muestra en la Figura 1.

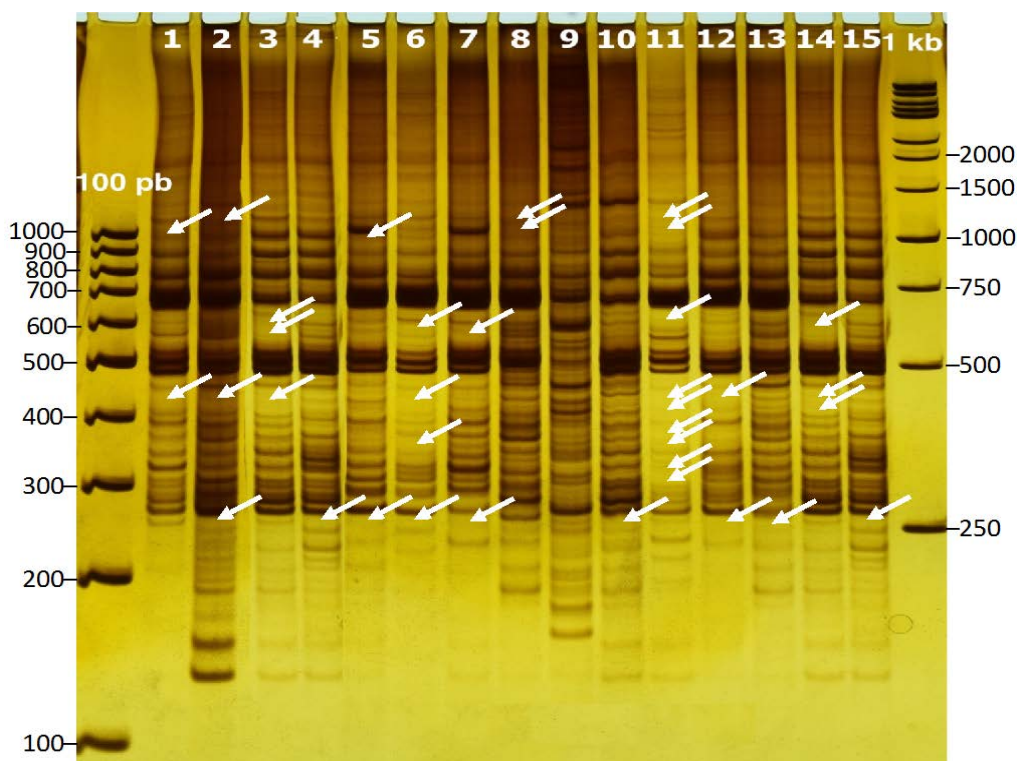


Figura 1. Perfiles obtenidos con el iniciador ISSR9. Nótese la nitidez de los fragmentos de DNA y los polimorfismos no detectados (señalados con flechas). Entiéndase por individuos 1–3 (Tlaxcala), 4–6 (Querétaro), 7–9 (Hidalgo), 10–12 (Estado de México), 13–15 (Zacatecas).

El dendrograma general reveló que los individuos están visiblemente divididos en dos grupos, donde la mayoría de la misma región geográfica mostraron una variabilidad genética distinta, al separarse en diferentes clados. Únicamente los individuos de Querétaro mostraron una variabilidad genética similar, ya que se ubicaron dentro del mismo clado (Figura 2), lo que tal vez se debe a que su densidad relativa podría generar un flujo genético continuo en dicha población y, en consecuencia, se reduciría la diferenciación genética, que es similar a lo mencionado por Nishimura *et al.* (2005) y Meng-Kai *et al.* (2014), quienes trabajaron con *Tetranychus kanzawai* Kishida (1927) (Acari: Tetranychidae) y *Lepidoglyphus destructor* Schrank (1781) (Acari: Glycyphagidae), respectivamente.

Por otra parte, los individuos 1, 9 y 10 recolectados de Tlaxcala, Hidalgo y el Estado de México respectivamente, se separan del resto (Figura 2), lo que tal vez se deba a que algunos factores bióticos y abióticos puedan desempeñar un papel en su agrupación, para que las poblaciones exploten un nicho ecológico específico, lo que podría derivar en cambios genéticos significativos resultado de algunas mutaciones, que de acuerdo con Sun *et al.* (2012), son una de las principales fuentes de variabilidad genética. Además, de acuerdo con Weeks y Hoffmann (1998), una población con alta variabilidad genética debería evolucionar más rápido para responder a un ecosistema cambiante (Meng-Kai *et al.*, 2014).

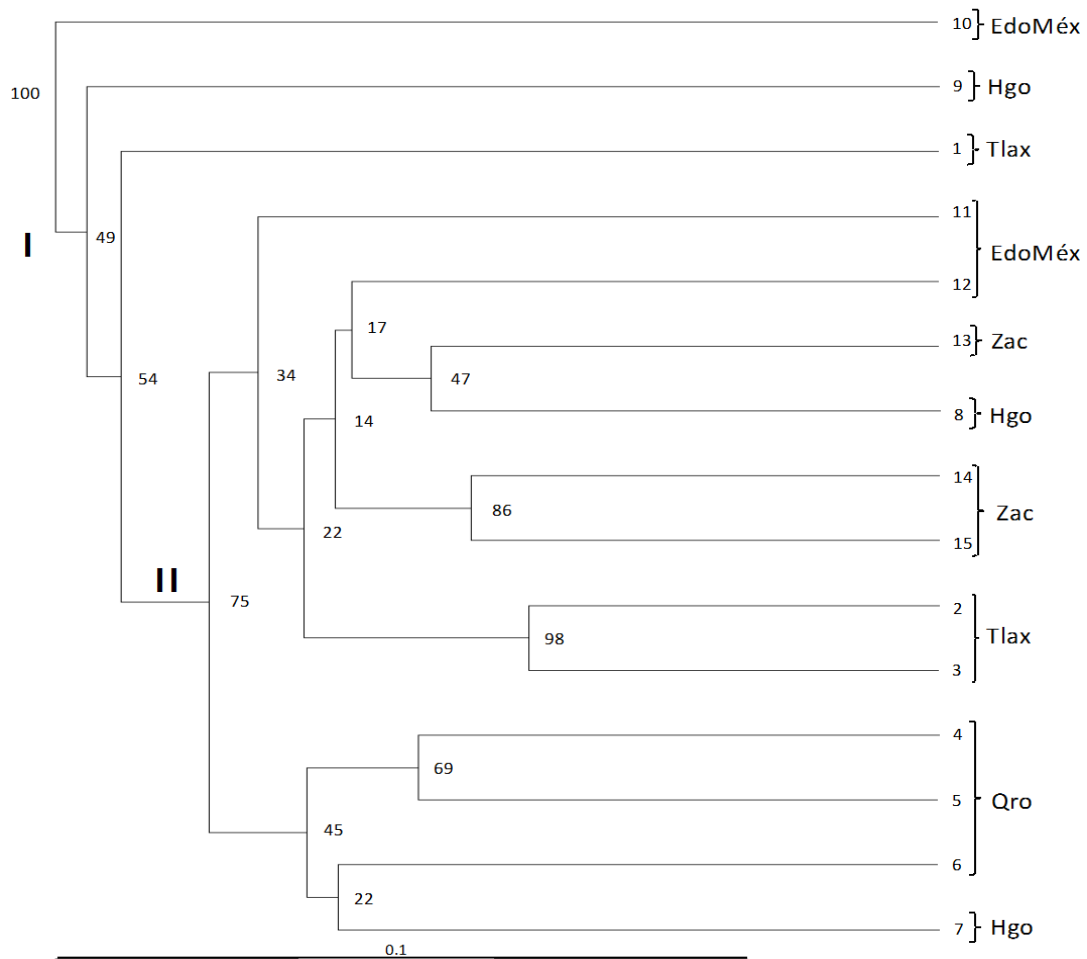


Figura 2. Dendrograma agrupado con UPGMA considerando el total de huellas de DNA obtenidas con los 14 iniciadores ISSR y que ilustra la relación de las cinco poblaciones de *Comadia redtenbacheri*. EdoMéc: Estado de México, Hgo: Hidalgo, Tlax: Tlaxcala, Zac: Zacatecas, Qro: Querétaro.

Otra explicación de por qué no se separaron todas las poblaciones, pudiera responder a que el hospedero incluyendo las larvas, también es sujeto a movilización a otras regiones del país para utilizarse como nuevo cultivo, de manera que exceptuando las muestras de Querétaro, el resto de las poblaciones se encuentran mezcladas (Valadez-Moctezuma com. pers.). Asimismo, la movilidad de las larvas puede explicar el por qué se encuentran entrelazadas sus poblaciones, debido a su comportamiento natural, puesto que las larvas de último instar salen de la planta y recorren distancias variables en busca de protección para iniciar la pupación, al parecer estimuladas por las lluvias torrenciales en los meses de julio a octubre, lo cual lo

aprovechan para su recolección (Llanderal-Cázares *et al.*, 2007; Delgado-Tejeda *et al.*, 2017).

Se conoce que el ambiente interactúa con los procesos del desarrollo y juega un papel en la determinación del fenotipo, interacción que se denomina plasticidad fenotípica y es el cambio en la expresión fenotípica de un genotipo en función del ambiente (Scheiner, 1993). Se ha descrito a *C. redtenbacheri* como una especie que por su condición univoltina resiste factores bióticos y abióticos adversos, tales como temperaturas variables a través de diferentes estaciones del año; otras características que además lo protegen de enemigos naturales, como son: permanencia de las larvas dentro de su hospedante por sus hábitos barrenadores, coloración aposemática de los últimos instares larvales, oviposición en masa y comportamiento gregario de las larvas, esto último considerado como una respuesta a la estructura de la planta huésped, coloración críptica que protege al estado adulto, secreción de olores como mecanismo de defensa, proovigenia en la hembra que emerge con la mayoría de los ovocitos listos para ser fertilizados y ovipositados en unas pocas horas, lo cual es similar a otros lepidópteros con adultos de vida corta y sin alimentación, ya que el aparato bucal está atrofiado (Llanderal-Cázares *et al.*, 2017). Al respecto, Garland y Carter (1994) consideran que los organismos que viven en ambientes extremos tienen probabilidades de exhibir adaptación evolutiva, debido presumiblemente a su intenso pasado de presión y selección.

Por otro lado, la técnica ISSR-PCR resultó ser una excelente herramienta para la visualización de polimorfismos de DNA, ya que las diferencias entre las amplificaciones con pesos moleculares específicos se aprecian fácilmente, proporcionando un buen número de datos. Pradeep *et al.* (2011) reportaron resultados similares utilizando la misma técnica para la larva de *Samia cynthia* Drury (1773) (Lepidoptera: Saturniidae), especie comercialmente importante por la producción de seda. En dicho estudio se analizaron 15 poblaciones de *S. c. ricini* recolectadas de diferentes altitudes, mediante 20 iniciadores ISSR y los autores argumentan que las poblaciones de dicha especie se ven afectadas significativamente bajo diversos regímenes altitudinales que contribuyeron a una alta plasticidad fenotípica, por lo que concluyen que se necesitan nuevos enfoques para categorizar loci asociados con la interacción genotipo-ambiente.

4. Conclusiones

1. Los marcadores ISSR utilizados en el análisis de genotipado de larvas de *C. redtenbacheri* provenientes de cinco regiones geográficas revelaron variabilidad en su genoma.

2. La diversidad de hábitats de las zonas geográficas consideradas para el muestreo de las larvas de *C. redtenbacheri* son posiblemente las causas que inducen a la variación dentro de la especie.

Para sustentar la variabilidad genómica observada, en futuros estudios se recomienda incrementar el número de individuos y el número de zonas geográficas en donde se cultive el hospedante de *C. redtenbacheri*.

5. Literatura citada

- Abbot, P. 2001. Individual and population variation in invertebrates revealed by inter-simple sequence repeats (ISSRs). *Insect* 1: 1–3.
- Brown, R.M. 1975. A revision of the North American *Comadia* (Cossidae). *J. Res. Lepidoptera* 14: 189–212.
- Cárdenas-Aquino, M.R., N.M. Alarcón-Rodríguez, M. Rivas-Medrano, H. González-Hernández, M. Vargas-Hernández, H. Sánchez-Arroyo, and C. Llanderal-Cázares. 2018. Molecular delineation of the agave red worm *Comadia redtenbacheri* (Lepidoptera: Cossidae). *Zootaxa* 4375: 358–370.
- Castro-Torres, R., and C. Llanderal-Cázares. 2016. Detailed morphology of all life stages of the agave red worm, *Comadia redtenbacheri* (Hammerschmidt) (Lepidoptera: Cossidae). *Neotrop. Entomol.* 45: 698–711.
- Delgado-Tejeda, I., C. Llanderal-Cázares, K. Miranda-Perkins, and H.M. De los Santos-Posadas. 2017. Pupation, adult emergence and oviposition of *Comadia redtenbacheri* (Lepidoptera: Cossidae) in the nursery. *Agrociencia* 51: 447–454.
- Garland, T., and P.A. Carter. 1994. Evolutionary physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 56: 579–582.
- Ge, M.K., E.T. Sun, C.N. Jia, D.D. Kong, and Y.X. Jiang. 2014. Genetic diversity and differentiation of *Lepidoglyphus destructor* (Acari: Glycyphagidae) inferred from inter-simple sequence repeat (ISSR) fingerprinting. *Syst. Appl. Acarol-UK* 19: 491.

- Granados, D.S. 1993. Los Agaves en México. Universidad Autónoma Chapingo, México, 252 pp.
- Hapl, V., A. Pavlíček, and J. Flegr. 2001. Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program FreeTree: application to trichomonad parasites. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 51: 731–735.
- Hernández-Livera, R.A., C. Llanderal-Cázares, L.E. Castillo-Márquez, J. Valdez-Carrasco, and R. Nieto-Hernández. 2005. Identification of larval instars of *Comadia redtenbacheri* (Hamm) (Lepidoptera: Cossidae). *Agrociencia* 39: 539–544.
- Liu, J.N., F.R. Gui, and Z.Y. Li. 2014. Genetic diversity of *Sogatella furcifera* (Hemiptera: Delphacidae) in china detected by inter-simple sequence repeats. *J. Insect Sci.* 14: 233.
- Llanderal-Cázares, C., R. Nieto-Hernández, I. Almanza-Valenzuela, y C. Ortega-Álvarez. 2007. Biología y comportamiento de *Comadia redtenbacheri* (Hamm) (Lepidoptera: Cossidae). *Entomol. Mex.* 6: 252–255.
- Llanderal-Cázares, C., R. Castro-Torres, and K. Miranda-Perkins. 2017. Bionomics of *Comadia redtenbacheri* (Hammerschmidt, 1847) (Lepidoptera: Cossidae). *Shilap-Rev. Lepidopt.* 45: 373–383.
- Meng-Kai, Ge, S. En-Tao, J. Chao-Nan, K. De-Di, and J. Yu-Xin. 2014. Genetic diversity and differentiation of *Lepidoglyphus destructor* (Acari: Glycyphagidae) inferred from inter-simple sequence repeat (ISSR) fingerprinting. *Syst. Appl. Acarol.* 19: 491–498.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583–590.
- Nishimura, S., N. Hinomoto, and A. Takafuji. 2005. Gene flow and spatio-temporal genetic variation among sympatric populations of *Tetranychus kanzawai* (Acari: Tetranychidae) occurring on different host plants, as estimated by microsatellite gene diversity. *Exp. Appl. Acarol.* 35: 59–71.
- Nybom, H. 2002. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Mol. Ecol.* 13: 1143–1145.
- Page, R.D.M. 2001. TreeView version 1.6.6. Ayudas On-Line <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html>, Glasgow, Escocia, Reino Unido.

- Pradeep, A.R., A.K. Awasthi, C.K. Singh, H.J. Anuradha, C.G. Rao, and N.B. Vijayaprakash. 2011. Genetic evaluation of eri silkworm *Samia cynthia ricini*: ISSR loci specific to high and low altitude regimes and quantitative attributes. *J. Appl. Genet.* 52: 345–53.
- Ramos-Elorduy, J. 2006. Threatened edible insects in Hidalgo, Mexico and some measures to preserve them. *J. Ethnobiol.* 2: 1–10.
- Ramos-Elorduy, J., J.M. Pino, y M. Conconi. 2006. Ausencia de una reglamentación y normalización de la explotación y comercialización de insectos comestibles en México. *Folia Entomol.* 45: 291–318.
- Ramos-Elorduy, J., J.M.P. Moreno, A.I. Vázquez, I. Landero, H. Oliva-Rivera, and V.H.M. Camacho. 2011. Edible Lepidoptera in Mexico: Geographic distribution, ethnicity, economic and nutritional importance for rural people. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 7: 2.
- Scheiner, S.M. 1993. Genetics and evolution of phenotypic plasticity. *Annu Rev. Ecol. Syst.* 24: 35–38.
- Sun, J.T., C.L. Lian, M. Navajas, and X.Y. Hong. 2012. Microsatellites reveal a strong subdivision of genetic structure in Chinese populations of the mite *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *BMC Genetics* 13: 8.
- Valadez-Moctezuma, E. y G. Kahl. 2000. Huellas de DNA en genomas de plantas (teoría y protocolos de laboratorio). Mundi-prensa, México.
- Wang, Y., E. Sun, W. Wang, K. Wang, H. Wang, and M. Ge. 2016. Effects of habitat fragmentation on genetic diversity and population differentiation of *Liposcelis bostrychophila badonnel* (Psocoptera: Liposcelididae) as revealed by ISSR markers. *J. Stored Prod. Res.* 68: 80–84.
- Weeks, A.R., and A.A. Hoffmann. 1998. Intense selection of mite clones in a heterogeneous environment. *Evolution* 52: 1325–1333.
- Zheng, X., J. Hu, S. Puthiya K., and C. Xiaoguang. 2010. Identification of necrophagous fly species from 12 different cities in China using ISSR and SCAR markers. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 3: 510–514.
- Zietkiewicz, E., A. Rafalski, and D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176–183.

CAPÍTULO IV. Evaluación preliminar de marcadores RAPDs utilizando cDNA, en la expresión de genes involucrados en la interacción gusano rojo del maguey-hospedante

Resumen

En la actualidad se están adoptando técnicas de biología molecular para enfocarse en las interacciones entre los patógenos y sus hospedantes, examinando la expresión de los genes, logrando que se incorporen rasgos deseables, como la resistencia a enfermedades causadas por patógenos. Un ejemplo de la interacción plaga-hospedante, es el gusano rojo del maguey y su principal hospedante *Agave salmiana* Otto ex Salm Dyck; sin embargo, el gusano rojo del maguey como tal, no es considerado una plaga, más bien como un recurso renovable que se utiliza para el consumo humano, lo que explica su interés comercial. La evaluación de la expresión de genes involucrados en la interacción gusano rojo del maguey y su hospedante, ayudaría a determinar los mecanismos involucrados en la resistencia del agave hacia la irrupción causada por las larvas de *Comadia redtenbacheri*. Este trabajo se enfocó en la amplificación de algunos RAPDs utilizando RNA convertido a cDNA en la expresión de algunos genes involucrados en dicha interacción, debido a que los RAPDs requieren una estandarización estricta de los protocolos para garantizar que sea reproducible. Mediante la técnica de RAPD, 15 de los 20 iniciadores utilizados mostraron polimorfismos y produjeron perfiles de amplificación claros y reproducibles para el análisis de la expresión de los genes involucrados en la interacción gusano rojo del maguey-hospedante. Además, se pudo observar la expresión de diferentes genes entre las plantas control respecto a las plantas experimentales. Esta información será vital para diseñar e implementar programas de manejo sobre la recolección de este recurso y mantenerlo a largo plazo.

Palabras clave: Interacción planta-insecto, *Comadia redtenbacheri*, inducción de genes, *Agave salmiana*.

CHAPTER IV. Preliminary evaluation of RAPD markers using cDNA in the expression of genes involved in the agave red worm-host interaction

Abstract

Nowadays molecular biology techniques are being adopted to focus on the interactions between pathogens and their hosts, examining the expression of genes, making it possible to incorporate desirable traits, such as resistance to diseases caused by pathogens. An example of the interaction is the agave red worm and its main host *Agave salmiana* Otto ex Salm Dyck. However, the agave red worm, as such, is not considered a pest but is a renewable resource that is used for human consumption, which explains its commercial interest. The evaluation of the expression of genes involved in the agave red worm interaction and its host, would help to determine the mechanisms involved in the resistance of the agave due to the attack by *Comadia redtenbacheri*. This work was focused on the evaluation of RAPD primers using the cDNA product of the expression of genes involved in this interaction, resulting in a successful amplification; especially considering that the RAPDs require a strict standardization of the protocols to guarantee their reproducibility. Using this technique, 15 of the 20 initiators produced DNA bands in acceptable numbers, clear and reproducible; which will lead to a subsequent analysis to know the type of genes involved in this interaction. In addition, through the profiles obtained, differences in the level of expression between the control plants could be observed with respect to the experimental plants. This information will be vital to know specifically the genes that are expressed during the interaction of both biological systems and will allow to design and implement management programs in how to use this resources to maintain this in the long term.

Key words: Plant-insect interaction, *Comadia redtenbacheri*, gene induction, *Agave salmiana*.

1. Introducción

Actualmente se están adoptando técnicas de biología molecular para enfocarse en las interacciones entre los patógenos y sus hospedantes, ya que examinan el control de la expresión de genes descifrando problemas que no han podido ser resueltos por métodos de investigación convencionales, tanto bioquímicos como fisiológicos (Goodman *et al.*, 1986). Estos estudios se pueden clasificar en cinco categorías principales: (1) correlación de la variación de la expresión con las diferencias en los rasgos morfológicos; (2) genes reguladores dentro de la expresión de rasgos/locus cualitativos; (3) vías de señalización y rutas metabólicas conocidas; (4) especificidad tisular de las influencias genéticas; y (5) estudios enfocados en genes reguladores; estos últimos han logrado que se incorporen rasgos deseables, como la resistencia a enfermedades causadas por patógenos (Williams *et al.*, 2007).

Un patógeno es un organismo o virus capaz de causar una desviación dañina de la función fisiológica normal en un huésped o rango de huéspedes y la resistencia es la capacidad del huésped para suprimir o retrasar la actividad de un patógeno (Collinge y Slusarenko, 1987); por mencionar un ejemplo, el gusano rojo del maguey y su principal hospedante *Agave salmiana* Otto ex Salm Dyck, ya que las larvas se alimentan de los tejidos de la base de las pencas, las raíces y del tallo subterráneo, donde penetran y se establecen hasta completar su desarrollo larvario (Granados, 1993). Sin embargo, el gusano rojo del maguey en México no representa una plaga, ya que es un recurso renovable que se utiliza para el consumo humano (Ramos-Elorduy, 2006), lo que explica el interés comercial por parte de algunos recolectores para hacer más sustentable este recurso.

En el caso de la interacción del gusano rojo del maguey y la mayoría de las especies de *Agave* sp., en las que se hospeda, se considera que las larvas de *Comadia redtenbacheri* (Lepidoptera: Cossidae) deben tener adaptaciones anatómicas o bioquímicas, o incluso relaciones simbióticas con microorganismos que les permitan alimentarse de estas plantas (Llanderal-Cázares *et al.*, 2017), a pesar de que éstas tienen paquetes de rafidios (cristales con forma de aguja compuestos por oxalato de calcio) en sus tejidos como medio de defensa (Wattendorf, 1976; Ishii, 1992; Blunden, *et al.*, 2008; Llanderal-Cázares *et al.*, 2017).

Una técnica que se basa en el análisis del DNA con PCR y que se ha utilizado para estudiar principalmente la diversidad genética en diferentes organismos, es la técnica "RAPD" (Random Amplified Polymorphisms DNA, por sus siglas en inglés). Los iniciadores RAPD generan productos de amplificación por reconocimiento de sitios específicos homólogos en el DNA molde, que se distribuyen aleatoriamente en el genoma (Williams *et al.*, 1990; Welsh y McClelland, 1990; Yadav *et al.*, 2017).

La evaluación de la expresión de genes (a manera de cDNA) involucrados en la interacción gusano rojo del maguey y su hospedante, ayudaría a determinar los mecanismos involucrados en la resistencia del agave hacia la irrupción causada por las larvas de *C. redtenbacheri* y este tipo de análisis, permitirá conocer el tipo de genes y su participación en las rutas metabólicas en la especie *A. salmiana*. Dicha información será vital para diseñar e implementar programas de manejo con la finalidad de mantener este recurso a largo plazo. El conocimiento sobre tales aspectos es importante para el éxito de las prácticas de cultivo, especialmente para comprender la aparición de resistencia en su hospedero, siendo este tipo de expresión genética específica del tejido de la planta. Por este motivo, en este trabajo se enfocó en la evaluación de algunos RAPDs utilizando cDNA para detectar diferencias a nivel de expresión de genes involucrados en dicha interacción. Cabe mencionar que esta técnica requiere de una estandarización estricta de los protocolos para garantizar que éste sea reproducible (Black, 1993), pero el éxito que ofrecen este tipo de marcadores debido al tipo de iniciadores que emplean, es prácticamente seguro.

2. Materiales y Métodos

Se recolectaron plantas de *A. salmiana* Otto ex Salm-Dyck, en la zona de Santiago Zacualuca, Teotihuacan, Estado de México (19° 42'07" N; 98° 54'58" W), durante junio de 2018. La corroboración de la especie se realizó con la ayuda del Dr. Jorge Alberto Gutiérrez Gallegos, experto en botánica del Herbario-Hortorio del área de preparatoria agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

Se extrajo RNA de seis plantas, cuatro de *A. salmiana* Otto ex Salm-Dyck con presencia de *Comadia redtenbacheri* (experimentales) y como controles, dos sin presencia del insecto. Antes de extraer el RNA de las muestras, se lavaron los morteros y pistilos, se desinfectaron con etanol al 70%, se esterilizaron y se colocaron a -20 °C para eliminar los residuos biológicos que podrían contaminar la muestra. Se realizaron dos extracciones por cada planta, uno en la base de las hojas y el otro en el tallo subterráneo, como se definen las estructuras de este grupo de plantas xerófitas de acuerdo con García-Mendoza (2007) (Figura 1). Es importante mencionar que se tomaron de 0.05 a 0.08 g de tejido para las extracciones, por cada planta.

Las muestras se pulverizaron en nitrógeno líquido en los morteros, luego se agregaron 700 µL (microlitros) de agente clarificante junto con 1 µL de beta-marcaptoetanol del kit de purificación Maxwell® 16 Total RNA (Promega Madison, EUA). Posteriormente se transfirió la muestra a las columnas clarificantes del mismo kit. Se centrifugaron a 13,200 rpm en una microcentrífuga Eppendorf 5415D® (Eppendorf, Hauppauge, NY) durante 2 min. El sobrenadante de cada muestra se concentró en los tubos colectores del kit y se volvieron a transferir a las columnas clarificantes añadiendo 700 µL de agente clarificante, posteriormente se centrifugaron a 13,200 rpm durante 2 min. Finalmente, el sobrenadante de cada muestra se transfirió a un cartucho Maxwell® 16 RNA (Promega Madison, EUA) junto con un émbolo para ser procesado por el equipo Maxwell® 16 Instrument (Promega Madison, EUA) y dentro del mismo equipo se insertaron columnas colectoras con 700 µL de agua libre de nucleasas del mismo kit, para obtener la muestra de RNA purificada.

Del total de la muestra de RNA purificado anteriormente, se utilizaron 11 µL para su conversión a cDNA mediante el kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific Inc., EUA). El RNA convertido a cDNA se utilizó como molde en las reacciones de PCR para el análisis de RAPDs. Quince iniciadores RAPD (Cuadro 1) que produjeron bandas reproducibles y claras, se seleccionaron para el análisis de la expresión de los genes involucrados en la interacción gusano rojo-agave.

La mezcla de reacción para cada RAPD consistió en 160 ng (nanogramos) de cDNA, 1X de Taq Buffer con KCl (Thermo Scientific Inc., EUA), 2.5 mM (milimoles) de MgCl₂ (Promega Madison, EUA), 200 µM (micromoles) de dNTP's (Promega Madison, EUA), 100 pmol (picomoles) de cada iniciador y 1 unidad de DNA Taq polimerasa

(Thermo Scientific Inc., EUA). El volumen final se ajustó a 25 μ L (microlitros) con agua HPLC. Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador digital Maxygene (Axygen Inc., EUA) programado con las condiciones siguientes: la desnaturalización inicial del cDNA se llevó a cabo a 94 °C durante 5 min, seguido de 35 ciclos (1 min a 94 °C para la etapa de desnaturalización, 1 min a 40 °C para la etapa de alineamiento y extensión a 72 °C por 1:30 min); la extensión final de los productos de PCR se llevó a cabo a 72 °C durante 5 min. Los productos de PCR se separaron en geles de poliacrilamida 8% en 1X TBE buffer por electroforesis a 230 volts por 110 min y se tiñeron con AgNO_3 0.2%, siguiendo el protocolo de Valadez-Moctezuma y Kahl (2000). En las corridas electroforéticas se incluyeron los marcadores de peso molecular de 100 y de 1000 pares de bases (pb) como referencia (Promega Madison, EUA), y fueron fotografiados con un transiluminador de luz visible. Tanto las reacciones de PCR como sus separaciones en geles de poliacrilamida se realizaron por duplicado para confirmar la reproducibilidad.

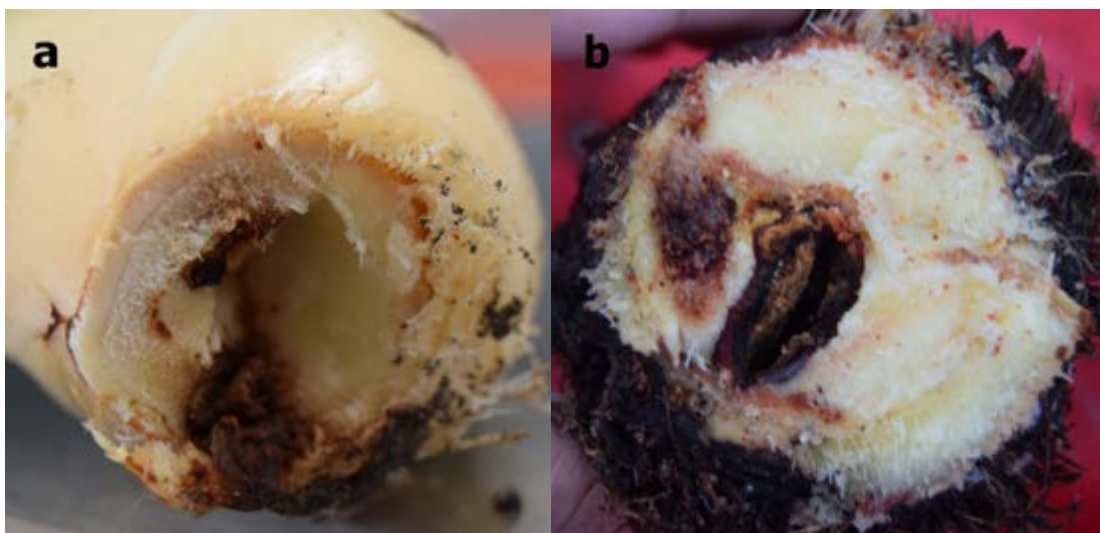


Figura 1. a) Corte transversal en la base de las hojas; b) en el tallo subterráneo de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck donde se muestra la galería generada por larvas de *Comadia redtenbacheri*.

Cuadro 1. Lista de 15 iniciadores RAPD usados para el análisis de la expresión de los genes involucrados en la interacción gusano rojo-agave.

No. del iniciador	Nombre del oligo	Secuencia del iniciador	No. de bandas BH	Rango de tamaño de banda (pb)	No. de bandas TS	Rango de tamaño de banda (pb)
RAPD1	Roth-F01	ACGGATCCTG	12	280–2000	27	150–2000
RAPD2	Roth-F04	GGTGATCAGG	30	100–2000	26	180–2000
RAPD3	Roth-F14	TGCTGCAGGT	23	180–2000	23	150–2000
RAPD4	Roth-G02	GGCACTGAGG	29	150–1500	36	130–2000
RAPD5	Roth-G06	GTGCCTAACC	11	280–2000	25	240–1500
RAPD6	Roth-G13	CTCTCCGCCA	16	190–1800	28	170–2000
RAPD7	Roth-G16	AGCGTCCTCC	35	100–1800	30	140–2000
RAPD8	Roth-H18	GAATCGGCCA	39	130–2000	37	120–2000
RAPD 9	Roth-H19	CTGACCAGCC	28	150–2000	30	150–2000
RAPD10	Roth-J19	GGACACCACT	31	210–2000	36	150–2000
RAPD11	Roth-J20	AAGCGGCCTC	39	150–2000	28	150–2000
RAPD12	Roth-K04	CCGCCCAAAC	34	190–2000	39	150–2000
RAPD13	Roth-K07	AGCGAGCAAG	39	180–2000	37	140–2000
RAPD14	Roth-K11	AATGCCCCAG	12	310–2000	24	230–2000
RAPD15	Roth-K16	CACAGGCGGA	21	100–1300	35	100–1500
Total	-	-	399	-	461	-

BH=Base de las hojas; TS=Tallo subterráneo.

3. Resultados y Discusión

Al utilizar la técnica de RAPD, 15 de los 20 iniciadores utilizados mostraron información relevante como: número de bandas alto, polimorfismos y perfiles de amplificación claros y reproducibles. Los perfiles/huellas de esta técnica fueron abundantes y nítidos. El número de bandas producidas por cada iniciador fue aproximadamente de 11–39. Los tamaños de banda de los productos amplificados se encontraron entre 100 y 2000 pb (Cuadro 1).

Se puede observar que se expresaron diferentes genes entre las plantas control respecto a las plantas experimentales, que es lo que indican los polimorfismos. Por otro lado, también se observan monomorfismos (fragmentos de DNA iguales entre ambos sistemas, lo que sugiere la presencia de genes probablemente propios del metabolismo y que no están sujetos a diferencias de expresión (Fig. 2). Se pueden observar dos perfiles RAPD en gel de poliacrilamida utilizando el iniciador Roth-K16 (RAPD15) en muestras de la base de las hojas y en las del tallo subterráneo. Cabe

mencionar que se observan más polimorfismos en el tallo subterráneo (Cuadro 1), posiblemente debido a que en esta parte de la planta es donde ocurre la interacción planta-insecto.



Figura 2. Perfiles obtenidos con el iniciador RAPD15. Nótese la nitidez de los fragmentos de cDNA y la presencia de polimorfismos. C=Control; E=Experimental.

Sin embargo, para dilucidar cuales son los genes que se están expresando en esta interacción, se requiere secuenciar estos productos de amplificación, así como un exhaustivo análisis bioinformático, por lo que en este trabajo no se pudo abordar debido a la falta de tiempo y recursos. Posteriormente serán objeto de estudio en el grupo de trabajo de la Dra. Ernestina Valadez.

Es importante señalar que la inducción de una serie de genes no implica que está involucrado un solo mecanismo regulador y el principal esfuerzo de investigación en patología molecular de plantas en los próximos años, se dirigirá a dilucidar los

mecanismos por los cuales la expresión de genes de defensa se regula y coordina. Esta clase de variación tiene un interés biológico particular porque, en principio, puede utilizarse para identificar grupos de genes que comparten un control común (genes reguladores). La variación correlacionada en grupos de genes, así como en genes individuales, puede tener consecuencias fenotípicas significativas (Williams *et al.*, 2007).

Durante el proceso de evolución, muchos grupos de plantas e insectos irradian simultáneamente, y las interacciones planta-insecto ha sido una fuerza motriz poderosa en la coevolución (Ehrlich y Raven, 1964). Por ejemplo, en el trabajo de Reymond *et al.* (2004), se compararon los patrones de transcripción en *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., en respuesta a las larvas de un insecto especialista *Pieris rapae* Linnaeus (1758) (Lepidoptera: Pieridae) y ante un insecto generalista *Spodoptera littoralis* Boisduval (1833) (Lepidoptera: Noctuidae), por lo que es importante mencionar que dada la naturaleza compleja de los componentes salivales de los insectos y las diferencias entre las especies, se observaron perfiles de transcripción casi idénticos con ambos insectos.

En otro estudio se determinó si la variación en la expresión de las defensas naturales entre especies domesticadas vs. especies silvestres de maíz *Zea* spp. (teosintes) se correlaciona con los cambios en la resistencia contra *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith (1797) (Lepidoptera: Noctuidae). Sus resultados mostraron evidencia de que las plantas de teosintle son más resistentes al herbívoro porque expresan genes de defensa inducibles de forma diferente al maíz domesticado (conservan genes de resistencia). Esto implica que el proceso de domesticación puede haber causado cambios importantes en la forma en que las plantas de maíz responden a los herbívoros; a su vez, las consecuencias ecológicas de la variación geográfica en las poblaciones de plantas silvestres de *Zea* spp., puede conducir a la identificación de genes de defensa clave responsables de la resistencia superior de los teosintles contra la herbivoría. Los autores concluyen que si la expresión alterada de las defensas es causada por la pérdida de la regulación transcripcional, la transformación del maíz con genes de teosintles que regulan la transcripción de estas defensas, restauraría su función de defensa (Degenhardt *et al.*, 2009).

Suzuki *et al.* (2012), demostraron que si la herbivoría juega un papel importante en la expresión génica de la planta de jitomate *Solanum lycopersicum* L., son los niveles mejorados de peroxidasa en hojas de jitomate los que alteran la expresión de genes que codifican algunas enzimas defensivas y otras proteínas vegetales. Además, indicaron que la alimentación de larvas de *Helicoverpa zea* Boddie (1850) (Lepidoptera: Noctuidae) en hojas de jitomate en plantas con alta concentración de la enzima peroxidasa, produce cambios adicionales en la expresión génica, en comparación con la herbivoría en plantas de tipo silvestre. En resumen, es probable que la actividad de la peroxidasa sea uno de los factores importantes de la determinación de la actividad de defensa de las plantas de jitomate.

Descubrir si la pérdida de la función del gen o genes, o los cambios en la regulación transcripcional son responsables de la pérdida de la resistencia, probablemente dependerá de las tecnologías de secuenciación de próxima generación, que puedan cuantificar las diferencias en la secuencia y en la expresión de los genes, en diferentes especies donde se estudie la interacción planta-insecto (Szczepaniec *et al.*, 2013).

4. Conclusiones y perspectivas

La utilización de 15 de los 20 marcadores RAPD evaluados en este trabajo resultó exitosa para la detección de genes en la interacción gusano rojo-agave, debido a que se observaron diferentes perfiles de expresaron entre las plantas control respecto a las plantas experimentales. También se observaron genes probablemente propios del metabolismo que no están sujetos a diferencias de expresión, por lo que se manifestaron en ambos casos como fragmentos monomórficos de DNA. Al comparar los perfiles de las muestras obtenidas a partir del tejido del tallo subterráneo, se distinguieron más poliformismos en comparación a los perfiles procedentes de la base de las hojas, posiblemente debido a que en éste es donde ocurre la interacción planta-insecto.

Como perspectiva en este aspecto, se pretende secuenciar los productos de PCR obtenidos a través de metagenómica y su posterior análisis bioinformático, con el fin de conocer genes de la planta que codifican algunas proteínas o enzimas en la defensa

contra el gusano rojo del maguey en el estado de desarrollo en el cual se tomaron las muestras para el análisis respectivo.

Sin embargo, este conocimiento será un buen antecedente para plantear nuevos experimentos que proporcionen información para a) presuponer cuál es la edad ideal del hospedante para ser infestado; b) ¿cuáles podrían ser las características morfológicas y fisiológicas del hospedante para ser infestado?; c) ¿el “patógeno” podría aceptar plantas que sean cultivadas *in vitro* o tiene preferencia por plantas silvestres?; e) ¿el gusano rojo del maguey podría infestar otras variedades de agave a nivel de plantación? entre otras cuestiones.

5. Literatura citada

- Black, W.C. 1993. PCR with arbitrary primers: approach with care. *Insect Mol. Biol.* 2: 1–6.
- Blunden, G., Y. Yi, and K. Jewers. 2008. The comparative leaf anatomy of *Agave*, *Beschorneria*, *Doryanthes* and *Furcraea* species (Agavaceae: Agaveae). *Bot. J. Linn. Soc.* 66: 157–179.
- Collinge, D.B., and A.J. Slusarenko. 1987. Plant gene expression in response to pathogens. *Plant Mol. Biol.* 9: 389–410.
- Degenhardt, J., I. Hiltbold, T.G. Kollner, M. Frey, and A. Gierl. 2009. Restoring a maize root signal that attracts insect-killing nematodes to control a major pest. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 106: 13213–13218.
- Ehrlich, P.R., and P.H. Raven. 1964. Butterflies and plants: a study in coevolution. *Evolution* 18: 586–608.
- García-Mendoza, A.J. 2007. Los agaves de México. Ciencias, UNAM. Pp 14–23.
- Goodman, R.N., Z. Kinlly, and K.R. Wood. 1986. *The Biochemistry and Physiology of Plant Disease*. University of Missouri Press, Columbia, Missouri, USA.
- Granados, D.S. 1993. *Los Agaves en México*. Universidad Autónoma Chapingo, México, 252 pp.
- Ishii, Y. 1992. Needle crystal of calcium oxalate monohydrate found in plant. *J. Electron Microsc.* 41: 53–56.

- Llenderal-Cázares, C., R. Castro-Torres, and K. Miranda-Perkins. 2017. Bionomics of *Comadia redtenbacheri* (Hammerschmidt, 1847) (Lepidoptera: Cossidae). *Shilap-Rev. Lepidopt.* 45: 373–383.
- Ramos-Elorduy, J. 2006. Threatened edible insects in Hidalgo, Mexico and some measures to preserve them. *J. Ethnobiol.* 2: 1–10.
- Reymond, P., N. Bodenhausen, R.M.P. Van Poecke, V. Krishnamurthy, M. Dicke, and E.E. Farmer. 2004. A conserved transcript pattern in response to a specialist and a generalist herbivore. *Plant Cell* 16: 3132–3147.
- Suzuki, H., P.F. Dowd, E.T. Johnson, S.M. Hum-Musser, and R.O. Musser. 2012. Effects of elevated peroxidase levels and corn earworm feeding on gene expression in tomato. *J. Chem. Ecol.* 38: 1247–1263.
- Szczepaniec, A., S.E. Widney, J.S. Bernal, and M.D. Eubanks. 2013. Higher expression of induced defenses in teosintes (*Zea* spp.) is correlated with greater resistance to fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Entomol. Exp. Appl.* 146: 242–251.
- Valadez-Moctezuma, E. y G. Kahl. 2000. Huellas de DNA en genomas de plantas (teoría y protocolos de laboratorio). Mundi-prensa, México.
- Wattendorff, J. 1976. A third type of raphide crystal in the plant kingdom: six-sided raphides with laminated sheaths in *Agave americana* L. *Planta (Berlin)* 130: 303–311.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531–6535.
- Williams, R.B.H., E.K.F. Chan, M.J. Cowley, and P.F.R. Little. 2007. The influence of genetic variation on gene expression. *Genome Res.* 17: 1707–1716.
- Welsh, J., and M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18: 7213–7218.
- Yadav, S.K.U., J. Singh, B. Padmanaban, and L.S. Kumar. 2017. Genetic variability in Indian populations of banana corm weevil [*Cosmopolites sordidus* (Coleoptera: Curculionidae)] assessed by RAPDs and AFLPs. *Int. J. Trop. Insect Sc.* 37: 149–162.