



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN
FUNCIONAL DE LAS PROTEÍNAS OLFATIVAS
NO RECEPTORAS EN EL TRANSCRIPTOMA DE
Dendroctonus adjunctus (COLEOPTERA:
CURCULIONIDAE)**

BRENDA TORRES HUERTA

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2020

La presente tesis titulada: "IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LAS PROTEÍNAS OLFATIVAS NO RECEPTORAS EN EL TRANSCRIPTOMA DE *Dendroctonus adjunctus* (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)" realizada por la alumna: Brenda Torres Huerta bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA



Dra. Obdulia Lourdes Segura León

ASESOR



Dr. Héctor González Hernández

ASESORA



Dra. Adriana Rosalía Gijón Hernández

Montecillo, Texcoco, Estado de México, 26 de junio de 2020

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LAS PROTEÍNAS
OLFATIVAS NO RECEPTORAS EN EL TRANSCRIPTOMA DE *Dendroctonus
adjunctus* (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)**

Brenda Torres Huerta, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2020

RESUMEN

El descortezador de las alturas *Dendroctonus adjunctus* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) es una de las cinco plagas primarias más importantes en ecosistemas forestales de México, su comportamiento de dispersión y de apareamiento, están regulados por un sistema de comunicación mediado por semioquímicos, cuyo conocimiento a nivel molecular tiene el potencial para el desarrollo de herramientas y aplicaciones biotecnológicas. Este estudio, representa el primer análisis del transcriptoma de cabeza de machos y hembras de *D. adjunctus* y la identificación del repertorio de genes olfativos no receptores involucrados en la percepción de olores y su caracterización funcional, mediante la búsqueda de dominios proteicos, patrones de motivos de *novi* y su comparación en el análisis filogenético con OBPs, CSPs y SNMPs de especies relacionadas, además del diseño de la estructura tridimensional de proteínas mediante modelización comparativa y por homología. El ensamblaje *de novo* resultó en 44,420 unigenes y la ontología de genes fue similar al de transcriptomas de antenas de otras especies de insectos, que reflejan procesos metabólicos relacionados al olfato y transducción de señales. En este estudio, se identificaron tres familias de genes olfativos no receptores que incluyen 27 DadjOBPs, 7 DadjCSPs y 2 DadjSNMPs, cuyos transcritos se anotaron con base a la similitud-homología y búsqueda de dominios conservados. El análisis de motivos de las proteínas no receptoras, proporcionó información clara sobre las características distintivas de cada familia y sus subclases, además, la comparación de los patrones de motivos conservados y los árboles filogenéticos, sugieren agrupamientos en las tres familias de proteínas con regiones distintivas que podrían tener importancia funcional y que junto con las relaciones con proteínas homólogas, cuyos perfiles de expresión han sido estudiados, proporciona un valioso recurso para futuras investigaciones de diferentes especies de *Dendroctonus*. Finalmente, las cinco estructuras tridimensionales de DadjOBPs (2), DadjCSPs (3) y DadjSNMP1a, resultaron en modelos precisos y de alta calidad que pueden utilizarse para estudios de acoplamiento o simulación

molecular. Estos resultados incrementan el conocimiento sobre las bases moleculares del sistema perireceptor para especies de descortezadores y ayudará al desarrollo de herramientas que complementen las estrategias de manejo de estas plagas.

Palabras clave: transcriptoma, ontología de genes, proteínas olfativas, dominios, motivos.

IDENTIFICATION AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF NON-RECEPTOR OLFACTORY PROTEINS IN THE TRANSCRIPTOME OF *Dendroctonus adjunctus* (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)

**Brenda Torres Huerta, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2020**

ABSTRACT

The round-headed pine beetle *Dendroctonus adjunctus* is one of the five most critical primary pests in forest ecosystems in Mexico, whose dispersion, and colonization behavior are linked to a communication system mediated by semiochemicals, its study at molecular level has the potential for the development of biotechnological tools and applications. This study provides the first head transcriptome analysis of *D. adjunctus* and the identification of the non-receptor olfactory genes involved in the perception of odors. *De novo* assembly resulted in 44,420 unigenes and, GO annotations were similar to antennal transcriptomes of other beetle species, which reflect metabolic processes related to smell and signal transduction. We identified three families of non-receptor olfactory genes that includes 27 DadjOBPs, 7 DadjCSPs, and 2 DadjSNMPs, whose transcripts were annotated based on similarity/homology and searching for conserved domains. Motif analysis of non-receptor proteins provided clear information about the distinctive features of each family and its subclasses. The comparison of conserved motif patterns with the phylogenetic trees suggested clusters in the three families with distinctive regions that could have functional importance, and in addition to relationships with homologous proteins with expression profiles that have been studied, provides a valuable resource for future research on different *Dendroctonus* species. Finally, the five three-dimensional structures of DadjOBPs (2), DadjCSPs (3), and DadjSNMP1a, resulted in accurate and high-quality models that can be used for docking and molecular simulation studies. These results increase the knowledge about the molecular basis of the perireceptor system for bark beetle species and will contribute to the development of tools to complement management strategies.

Keywords: transcriptome, gene ontology, chemosensory proteins, domains, motifs

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para llevar a cabo el actual proyecto de investigación.

Al Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, por el equipo y las instalaciones donde se realizaron los experimentos y la asesoría de sus profesores.

A la Dra. Obdulia Lourdes Segura León, por apoyarme en la realización de la investigación, su disposición, motivación y entusiasmo influyeron para que decidiera tomar este gran reto y adentrarme en el área de evolución molecular, las ciencias omicas y bioinformática, las cuales han cambiado por completo mi visión de la ciencia actual y su aplicación en el área entomológica y agrícola.

Al INIFAP CENID-COMEF, por el apoyo y financiamiento para la colecta de material biológico.

A la Comisión Nacional Forestal y la Base Militar 31, por el apoyo en la selección de zonas con de colectas y el trabajo en campo.

A los mimebors de mi Consejo Particular conformado por el Dr. Héctor González Hernández y la Dra. Adriana Rosalía Gijón Hernández, sus sugerencias y observaciones me permitieron enriquecer este trabajo.

Al M. en C. Marco A. Aragón Magadán, por los conocimientos que has compartido conmigo y el apoyo en la parte bioinformática.

A mis amigos, en especial a Verónica Romero, Gerardo Acevedo, Iris Pérez y Marino Cid, por las charlas, risas y momentos compartidos, gracias por el apoyo durante esta etapa.

Por último, a todos quienes directa o indirectamente colaboraron con la realización de este trabajo.

DEDICATORIAS

A MIS PADRES

Sr. José Antonio Torres Monroy & Sra. María del Pilar Huerta Hernández

Gracias por ser mi ejemplo a seguir, por su apoyo, comprensión, cariño, amor y enseñanzas. Valoro todo el esfuerzo que han hecho por darme lo mejor, ustedes han hecho de mí la persona que soy y son mi motivación para lograr mis objetivos y metas.

A MIS HERMANAS

Barbara Torres Huerta, Berenice Torres Huerta & Cecilia Lizeth Gerónimo Huerta

Por creer en mí, ser mis confidentes y apoyos en momentos difíciles, por ser mis compañeras de vida y cómplices.

Perla Xatzibe Rosas Peñaloza & Anahí Monroy Tapia

Por nuestra amistad que ha perdurado a través del tiempo, han sido parte y participes de mi crecimiento personal y profesional, gracias por su apoyo incondicional.

&

PROFESORA

Biol. Miriam Hernández †

Por ser un maravilloso ser humano y una magnífica profesora, por fomentar en sus estudiantes el amor a la ciencia, lo cual ha sido una gran influencia en mis decisiones profesionales, gracias por todo.

CONTENIDO

RESUMEN	iii
ABSTRACT	v
AGRADECIMIENTOS	vi
DEDICATORIAS	vii
LISTAS DE FIGURAS.....	x
LISTAS DE CUADROS.....	xvi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. <i>Dendroctonus adjunctus</i>	4
2.2. Sistema de comunicación de los escarabajos descortezadores	5
2.3. Percepción y procesamiento de señales de odor en insectos.	8
2.4. Proteínas olfativas no receptoras	12
2.4.1. Proteínas de unión a odorantes (OBPs).....	12
2.4.2. Proteínas quimiosensoriales (CSPs).....	15
2.4.3. Proteínas sensoriales de membrana neuronal (SNMPs).....	16
2.7. Aplicaciones.....	17
2.6. Antecedentes	19
3. OBJETIVOS	21
3.1. Objetivo general.....	21
3.2. Objetivos específicos	21
4. HIPÓTESIS.....	22
5. MATERIALES Y MÉTODOS	22
5.1. Colecta del material biológico	22
5.2. Extracción de ARN total, construcción de librerías de cDNA y secuenciación	22
5.3. Limpieza y ensamble de secuencias	23
5.4. Anotación de Ontología de Genes (GO) y análisis de homología	23
5.5. Clasificación y caracterización funcional de las proteínas no receptoras	24
5.6. Análisis filogenéticos.....	25
5.7. Construcción de los modelos 3D de proteínas olfativas no receptoras.....	25
6. RESULTADOS	25

6.1. Limpieza y ensamble de secuencias	26
6.2. Anotación de Ontología de Genes (GO) y análisis de homología	26
6.3. Identificación de los genes no receptores olfativos candidatos.	29
6.4. Proteínas de unión a olores (OBPs)	30
6.5. Proteínas quimiosensoriales (CSPs)	39
6.6. Proteínas de la membrana de neurona sensorial (SNMPs)	43
6.7. Modelaje de la estructura tridimensional de las proteínas no receptoras.....	46
7. DISCUSIÓN	60
8. CONCLUSIONES	70
9. REFERENCIAS.....	71
ANEXOS	87

LISTAS DE FIGURAS

- Figura 1.** Filogenia de las especies *Dendroctonus* e *Ips* y la interpretación de la evolución de las feromonas. Los cuadrados rellenos indican la presencia de un componente químico como parte de la mezcla activa de feromonas. Tomado de Symonds y Elgar, 2008.7
- Figura 2.** Órganos quimiosensoriales de los insectos y modelo de la transducción de señales. (a) Apéndices quimiosensoriales cubiertos por sensilla. (b) Los olores ingresan por los poros cuticulares para dirigirse al ORN. Tomado de Suh *et al.*, 2014.....9
- Figura 3.** Distintas clases de odorantes activan grupos específicos de receptores transmembranales que se expresan en los OSN e interactúan con proteínas especializadas que se encargan de transportar y detectar los diferentes volátiles para activar los receptores. Tomado de Suh *et al.*, 2014.....10
- Figura 4.** Análisis GO de transcriptoma de cabeza de *D. adjunctus*. Corresponde a 6,200 transcritos clasificados en la categoría de función molecular (a), los cuales se representan en nivel 2 de la categorización GO y de nivel 3 para las subcategorías de unión (b) y actividad catalítica (c). Los grupos clasificados se representan en porcentajes de acuerdo al número total transcritos con asignación GO.....27
- Figura 5.** Análisis GO de transcriptoma de cabeza de *D. adjunctus*. Corresponde a 7,683 transcritos clasificados en las categorías de componente celular (a) y procesos biológicos (b), los cuales se representan en nivel 2 de la categorización GO. Los grupos clasificados se representan en porcentajes de acuerdo al número total transcritos con asignación GO.....28
- Figura 6.** Distribución de los resultados de homología. Porcentaje de transcritos mapeados contra la base de datos uniprotKB. (a) Distribución del E-value; (b) distribución del porcentaje de similitud; (c) distribución de las especies.....29

- Figura 7.** Alineación de secuencias de las OBP clásicas de *D. adjunctus*, las secuencias de aminoácidos fueron alineadas por Clustal Omega y editadas con Genodoc. Las marcas azules muestran residuos conservados >90%.....33
- Figura 8.** Alineación de las OBP (a) minus-C de *D. adjunctus* y (b) plus-C con proteínas homólogos de *D. ponderosae* e *I. typographus*. Las secuencias de aminoácidos fueron alineadas por Clustal Omega y se editaron con Genodoc. Las marcas moradas muestran los residuos conservados > 80% y las verdes del 100%.....34
- Figura 9.** Análisis de motivos de OBPs clásicas de *D. adjunctus* y ortólogos. Los parámetros utilizados para el descubrimiento de los motivos fueron nmotif=10, minw=6 y maxw=10. Los números de los recuadros corresponden a los motivos que se muestran en la parte superior de la figura, el tamaño de los residuos está directamente asociado con la frecuencia de estos en el alineamiento y los valores de E-value más pequeños significan una alta conservación.....35
- Figura 10.** Análisis de motivos de las OBPs minus-C de *D. adjunctus* y ortólogos. Los parámetros utilizados para el descubrimiento de los motivos fueron nmotif=10, minw=6 y maxw=10. Los números de los recuadros corresponden a los motivos que se muestran en la parte superior de la figura, el tamaño de los residuos está directamente asociado con la frecuencia de estos en el alineamiento y los valores de E-value más pequeños significan una alta conservación.....36
- Figura 11.** Análisis de motivos de las OBPs plus-C de *D. adjunctus* y ortólogos. Los parámetros utilizados para el descubrimiento de los motivos fueron nmotif=10, minw=6 y maxw=10. Los números de los recuadros corresponden a los motivos que se muestran en la parte superior de la figura, el tamaño de los residuos está directamente asociado con la frecuencia de estos en el alineamiento y los valores de E-value más pequeños significan una alta conservación.....37
- Figura 12.** Árbol filogenético del análisis BEAST de las proteínas candidatas de unión a olores (OBPs). Análisis bayesiano de OBPs putativas de *Dendroctonus adjunctus* (Dadj, en

negritas), *D. ponderosae* (Dpon), *D. valens* (Dval), *D. armandi* (Darm), *Ips typographus* (Ityp) y *T. castaneum* (Tcas). El árbol fue editado en iTOL, las clases de OBP se muestran en colores, clásico (amarillo), menos-C (verde) y más-C (púrpura). Sólo se muestran los valores de probabilidad posteriores por encima del 70% y para cada OBP se incluyeron los patrones de los motivos ($p < 0,0001$) obtenidos del análisis en MEME.38

Figura 13. Alineación de las secuencias de CSPs de *D. adjunctus*, las secuencias de aminoácidos se alinearon con Clustal Omega y se editaron con Genodoc. Las marcas verdes muestran residuos conservados al 100%.40

Figura 14. Motivos de las CSPs de *D. adjunctus* y ortólogos. Los parámetros utilizados para el descubrimiento de los motivos fueron $n\text{motif}=10$, $\text{minw}=6$ y $\text{maxw}=10$ Los números de los recuadros corresponden a los motivos que se muestran en la parte superior de la figura, el tamaño de los residuos está directamente asociado con la frecuencia de estos en el alineamiento y los valores de E-value más pequeños significan una alta conservación.41

Figura 15. Árbol filogenético del análisis BEAST de las proteínas quimiosensoriales (CSPs). Análisis bayesiano de CSPs putativas de *Dendroctonus adjunctus* (Dadj, en negritas), *D. ponderosae* (Dpon), *D. valens* (Dval), *D. armandi* (Darm), *I. typographus* (Ityp) y *T. castaneum* (Tcas). El árbol fue editado en iTOL, sólo se muestran los valores de probabilidad posteriores por encima del 70% y para cada CSP se incluyeron los patrones de los motivos ($p < 0,0001$) obtenidos del análisis en MEME.42

Figura 16. Probabilidades posteriores de la ubicación y coordenadas de las hélices transmembrana y regiones de bucle de la proteína (a) DadjSMP1a y (b) DadjSNMP1b.44

Figura 17. Análisis de motivos de las SNMPs candidatas de *D. adjunctus* y sus ortólogos. Los parámetros utilizados para el descubrimiento de los motivos fueron $n\text{motif}=10$, $\text{minw}=45$ y $\text{maxw}=95$. Los números de los recuadros corresponden a los motivos que

se muestran en la parte superior de la figura, el tamaño de los residuos está directamente asociado con la frecuencia de estos en el alineamiento y los valores de E-value más pequeños significan una alta conservación.....44

Figura 18. Alineación de DadjSNMP1a y DadjSMP1b con SNMPs de otras especies de insectos. Los residuos con más del 80% de similitud se muestran en rosa y los idénticos (100%) en azul. Los asteriscos indican los residuos de cisteína conservados, las áreas en el cuadro debajo del número 1-4 indican los cuatro motivos obtenidos del análisis MEME, y TMD1/TMD2 muestra el dominio transmembrana predicho en TMHMM v3.0.....45

Figura 19. Análisis bayesiano de SNMPs putativas de *Dendroctonus adjunctus* (Dadj, en negritas), *D. ponderosae* (Dpon) *I. typographus* (Ityp), *T. castaneum* (Tcas), *C. lapponica* (Clap), *G. daurica* (Gdau), *A. corpulenta* (Acor), *H. parallela* (Hpar) y *A. gambiae* (Agam), el árbol se editó en iTOL y se muestran los valores de probabilidad posterior superiores al 90%.....46

Figura 20. (a) Resultados de la estructura seleccionada para el modelaje de DadjOBP21 a partir de una búsqueda con BLAST y HHBlits; **(b)** Calidad del modelo en comparación con los puntajes obtenidos para estructuras cristalinas de alta resolución.47

Figura 21. (a) Análisis comparativo de DadjOBPJ75 (21504) a partir del análisis de dominios de las secuencias de OBPs de estructura homologas; **(b)** Estimación de error en angstroms por residuo del modelo obtenido para DadjOBPJ75.....48

Figura 22. Representación de la estructura primaria y modelo tridimensional de DadjOBP21. **(a)** Los péptidos de señal predichos (PS) y α -hélices están ilustrados en cajas negras y grises. Se muestran los tres puentes de disulfuro (PD) entrelazados entre las cisteínas conservadas (C1-6) y las terminales N y C. **(b)** Plegamientos de las seis α -hélices en el modelo tridimensional y **(c)** ubicación de los residuos de cisteínas que forman tres puentes de disulfuro.....49

Figura 23. Representación de la estructura primaria y modelo tridimensional de DadjOBPJ75.

(a) Los péptidos de señal predichos (PS) y α -hélices están ilustrados en cajas negras y grises. Se muestran los tres puentes de disulfuro (PD) entrelazados entre las cisteínas conservadas (C1-6) y las terminales N y C. (b) Plegamientos de las seis α -hélices en el modelo tridimensional y (c) ubicación de los residuos de cisteínas que forman tres puentes de disulfuro.....49

Figura 24. Diagrama de Ramachandran que muestran los ángulos de torsión phi (ϕ) y psi (ψ)

de los residuos de la estructura terciaria de (a) DadjOBP21 y (b) DadjOBPJ75.
.....50

Figura 25. Calidad de las estructuras tridimensionales de (a) DadjCSP1, (b) DadjCSP2 y (c)

DadjCSP3 en comparación con puntajes obtenidos para estructuras cristalinas de alta resolución.....52

Figura 26. Representación de la estructura primaria y modelo tridimensional de DadjCSP1. (a)

Los péptidos de señal predichos (PS) y α -hélices están ilustrados en cajas negras y grises. Se muestran los tres puentes de disulfuro (PD) entrelazados entre las cisteínas conservadas (C1-6) y las terminales N y C. (b) Plegamientos de las seis α -hélices en el modelo tridimensional y (c) ubicación de los residuos de cisteínas que forman dos puentes de disulfuro.....53

Figura 27. Representación de la estructura primaria y modelo tridimensional de DadjCSP2. (a)

Los péptidos de señal predichos (PS) y α -hélices están ilustrados en cajas negras y grises. Se muestran los tres puentes de disulfuro (PD) entrelazados entre las cisteínas conservadas (C1-6) y las terminales N y C. (b) Plegamientos de las seis α -hélices en el modelo tridimensional y (c) ubicación de los residuos de cisteínas que forman dos puentes de disulfuro.....54

Figura 28. Representación de la estructura primaria y modelo tridimensional de DadjCSP3. (a)

Los péptidos de señal predichos (PS) y α -hélices están ilustrados en cajas negras y

grises. Se muestran los tres puentes de disulfuro (PD) entrelazados entre las cisteínas conservadas (C1-6) y las terminales N y C. **(b)** Plegamientos de las seis α -hélices en el modelo tridimensional y **(c)** ubicación de los residuos de cisteínas que forman dos puentes de disulfuro.....54

Figura 29. Diagrama de Ramachandran que muestran los ángulos de torsión phi (ϕ) y psi (ψ) de los residuos de la estructura terciaria de **(a)** DadjCSP1, **(b)** DadjCSP2 y **(c)** DadjCSP3.....55

Figura 30. (a) Análisis comparativo de DadjSNMP1a (21703) a partir del análisis de dominios de las secuencias de estructuras homologas; **(b)** Estimación del error en angstroms por residuo del modelo obtenido para DadjOBPSNMP1a.....57

Figura 31. Modelo tridimensional de DadjSNMP1a. **(a)** Vista completa de la estructura terciaria en donde se observan los extremos C y N que forman parte de la región transmembrana, **(b)** motivo helicoidal en el ápice de la proteína con residuos de cisteínas conservados en color naranja, **(c)** cadenas de láminas- β en el núcleo de la proteína.58

Figura 32. Diagrama de Ramachandran que muestran los ángulos de torsión phi (ϕ) y psi (ψ) de los residuos de la estructura terciaria de DadjSMP1a.....59

Figura 33. Vista lateral de los descortezadores *Dendroctonus adjunctus* (a) e *Ips* spp. (b), colectados en fustes de *Pinus oocarpa* en la Zona Militar 11, San Cristóbal de las Casas, Chiapas.....87

LISTAS DE CUADROS

Cuadro 1. Resumen del proceso de secuenciación y ensamble <i>de novo</i>	26
Cuadro 2. Genes olfativos candidatos del transcriptoma de cabeza de <i>D. adjunctus</i>	29
Cuadro 3. Anotación de Blastx contra la base de datos de UniprotKB para las OBPs candidatas de <i>D. adjunctus</i>	30
Cuadro 4. Anotación funcional de las DadjOBPs mediante la búsqueda de dominios en las bases de datos PFAM, SUPERFAMILY T CATH-Gene3D.....	32
Cuadro 5. Anotación de Blastx contra la base de datos de UniprotKB para las CSPs candidatas de <i>D. adjunctus</i>	39
Cuadro 6. Anotación funcional de las DadjCSPs mediante la búsqueda de dominios en las bases de datos PFAM, SUPERFAMILY T CATH-Gene3D.....	40
Cuadro 7. Anotación de Blastx contra la base de datos de UniprotKB para las SNMPs candidatas de <i>D. adjunctus</i>	43
Cuadro 8. Anotación funcional de las DadjSNMPs mediante la búsqueda de dominios en las bases de datos PFAM, SUPERFAMILY T CATH-Gene3D.....	43
Cuadro 9. Resumen de los resultados de la validación de los modelos tridimensionales de las OBPs de <i>D. adjunctus</i> en Molprobability.....	51
Cuadro 10. Resultados de los moldes seleccionados para la predicción de DadjCSP1, DadjCSP2 y DadjCSP3 en Swiss-Model.....	52
Cuadro 11. Resumen de los resultados de la validación de los modelos tridimensionales de las CSPs de <i>D. adjunctus</i> en Molprobability.....	56

Cuadro 12. Resumen de los resultados de la validación de los modelos tridimensionales de las CSPs de <i>D. adjunctus</i> en Molprobitry.....	59
Cuadro 13. Resultado del análisis de enriquecimientos de ontología de genes GO del transcriptoma de cabezas de machos y hembras de <i>D. adjunctus</i>	88
Cuadro 14. Nombre de la proteína y números de acceso utilizados en los árboles filogenéticos	90

1. INTRODUCCIÓN

Los escarabajos descortezadores son un componente integral de los ecosistemas forestales, conservan la estructura arbórea e intervienen en la renovación y saneamiento natural de los bosques (Coulson y Witter, 1990; Hlásny *et al.*, 2019). Estos insectos colonizan árboles enfermos o muertos, pasan la mayor parte de su ciclo de vida en un hábitat críptico debajo de la corteza, en niveles endémicos atacan solo árboles aislados o en grupos pequeños, sin embargo, existen especies cuyas poblaciones bajo ciertos factores como inundaciones, sequías, incendios y calidad nutricional de los hospederos, se tornan en epidemias, las cuales pueden durar varios años y afectar grandes extensiones forestales (Landaverde, 2001; Bentz, 2004).

Son pocas las especies de escarabajos descortezadores que pueden causar la mortalidad de árboles vigorosos, la mayoría pertenecen al género *Dendroctonus* Erichson (Curculionidae: Scolytinae), el cual comprende los descortezadores de mayor importancia en los ecosistemas forestales de Norteamérica y México (Rodríguez *et al.*, 2010; Salinas *et al.*, 2010). Al respecto, en México se tienen registradas cuatro especies de escarabajos descortezadores consideradas plagas primarias, de éstas, la más importante en alturas elevadas es *Dendroctonus adjunctus* Blandford (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), considerada la principal plaga forestal que afecta los bosques de pinos que se encuentran por arriba de los 2,800 msnm y sus infestaciones requieren de la aplicación de campañas emergentes de saneamiento sobre rodales, con árboles de edad avanzada y sometidos a incendios frecuentes (Cibrián *et al.*, 1995; McFarlane y Witson, 2008; Fonseca, 2008; FAO, 2009).

Estos escarabajos han desarrollado un complejo sistema de comunicación química guiado por sustancias conductuales (semioquímicos), que dirigen comportamientos importantes como la localización de los huéspedes, la agregación y el apareamiento (Raffa *et al.*, 2015; Raffa *et al.*, 2016). Los semioquímicos pueden influir en la dinámica poblacional de estos escarabajos de cinco maneras básicas, pero la mediación de agregación y ataque masivo a nuevos árboles, es la de mayor relevancia, involucra la interacción entre las kairomonas, que son moléculas propias de la resina que produce el árbol al momento del ataque, que funcionan como atrayentes para las poblaciones de descortezadores y las feromonas de agregación producidas por el sexo pionero (inician el proceso de colonización al hospedero), no obstante, ambos sexos contribuyen

al complejo de semioquímicos que intervienen en las cuatro fases del proceso de colonización: dispersión, selección, concentración y establecimiento (Borden, 1989; Zhang y Schlyter, 2004; Andersson *et al.*, 2010; Blomquist *et al.*, 2010).

Por otro lado, las antenas son los principales sensores olfativos de los insectos, las moléculas de olor (químicos volátiles que tienen pesos moleculares bajos), ingresan por difusión a los poros de los sensilos y son detectadas por proteínas que transportan estos compuestos a través de la linfa sensillar, a receptores específicos que se expresan en las neuronas sensoriales olfativas (OSN), en donde se transduce la señal química en una respuesta eléctrica, que será interpretada por el cerebro del insecto y que desencadenará un comportamiento específico (Hansson y Stensmyr, 2011; Sachse y Krieger, 2011). El procesamiento olfativo está compuesto de diferentes eventos perireceptores que involucran la unión, el transporte de los odorantes y su degradación, además de la activación de receptores específicos y la transducción de la señal, los componentes funcionales que intervienen en la ruta olfativa se pueden dividir en dos tipos de acuerdo a su función: las proteínas receptoras y no receptoras (Leal, 2005; Pelosi *et al.* 2006).

Las proteínas receptoras se encargan de reconocer y discriminar una variedad de semioquímicos del ambiente, incluyen proteínas transmembranales como los receptores de olores (ORs, por sus siglas en inglés), receptores ionotrópicos (IRs) y receptores gustatorios (GRs) (Leal, 2013; Depetris-Chauvin *et al.*, 2015; Gómez-Díaz *et al.*, 2018). Por otro lado, las no receptoras agrupan tres clases de proteínas: las de unión a odorantes (OBPs), las quimiosensoriales (CSPs), que solubilizan y transportan pequeños compuestos hidrofóbicos del medio externo y las proteínas de la membrana de la neurona sensorial (SNMPs), las cuales juegan un papel en la mediación de las interacciones entre ligandos y ORs (Pelosi *et al.*, 2014; Benton *et al.*, 2007).

Las OBPs y CSPs representan un grupo complejo de polipéptidos solubles de tamaño pequeño (12–18 kDa), que poseen una cavidad de unión hidrofoba hecha principalmente de dominios α -helicoidales plegados en dos patrones diferentes (Tegoni *et al.*, 2004; Pelosi *et al.*, 2005). Las OBPs están conformadas por tres puentes de disulfuro entrelazados con cisteínas (Cys) y de acuerdo al número de Cys conservadas, se dividen en cinco subclases, las clásicas, que incluyen las PBPs (proteínas de unión a feromonas) y GOBPs (Proteínas de unión a olores generales),

C-minus, Plus-C, dímeras y atípicas (Zhou, 2010). Por otro lado, las CSPs poseen un motivo de cuatro Cys conservadas, que forman dos enlaces disulfuro inter-helicoidal con dos pequeños bucles, formando una cavidad rígida hidrófoba y en contraste con las OBPs forman un grupo más homogéneo (Sánchez-Gracia *et al.*, 2009; Kulmuni y Havukainen, 2013).

Inicialmente, las funciones de las OBPs y CSPs se restringieron a mecanismos de quimiorrecepción, ya que se describieron principalmente en antenas, órganos bucales y otras estructuras quimiorreceptoras (Pelosi *et al.*, 2018). Sin embargo, en los últimos 10 años, se han reportado y caracterizado en diferentes órganos no sensoriales; lo cual ha sugerido que ambas clases de proteínas pueden desarrollar funciones fisiológicas alternas, en la detección y liberación de feromonas de glándulas especializadas al medio externo, como acarreadoras de nutrientes, e incluso en secuestrar y enmascarar moléculas tóxicas de insecticidas en diferentes partes del cuerpo (Nagnan-Le *et al.*, 2000; Dani *et al.*, 2011; Gu *et al.*, 2013; Bautista *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2016).

Las SNMPs comprenden un subclado de genes de insectos, homólogos con la familia CD36 de mamíferos que transportan ácidos grasos y colesterol (Rogers *et al.* 1997, Nichols y Vogt, 2009). Actualmente, se han caracterizado dos subfamilias (SNMP1 y SNMP2) en diferentes órdenes como Diptera, Lepidoptera, Hymenoptera, Orthoptera y Coleoptera (Vogt *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2016). La SNMP1 se ha descrito asociada a receptores de neuronas olfativas específicas de feromonas, lo que ha sugerido un rol central en la detección de feromonas; mientras que, la SNMP2 se ha identificado expresada en células de soporte de sensillas sensibles a feromonas, en patas y alas de dos especies de dípteros y su expresión en tejido no olfativo, podría sugerir un papel multifuncional en insectos (Zhang *et al.*, 2015; Jin *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018).

Dado el impacto ecológico y económico que ocasionan las especies del género *Dendroctonus* a nivel mundial, en los últimos años se ha incrementado la investigación de los genes y las proteínas involucradas en la percepción de semioquímicos, debido a que el conocimiento sobre la fisiología y biología molecular aplicado en el procesamiento de señales, tiene el potencial para el desarrollo de herramientas y aplicaciones biotecnológicas, que puedan integrarse al

esquema de manejo fitosanitario de los descortezadores plaga (Zhou *et al.*, 2010; Venthur y Zhou, 2018).

Además, el reconocimiento olfativo de los insectos difiere de acuerdo a su ambiente e historia evolutiva, por lo que es necesario investigar otras especies de escarabajos descortezadores para tener un mejor entendimiento de las proteínas olfativas periféricas involucradas en los eventos perireceptores. Es por ello que en este estudio se identificó y se realizó la caracterización funcional del repertorio de proteínas olfativas no receptoras en el transcriptoma de cabezas de machos y hembras del descortezador de las alturas *D. adjunctus*, debido a que su identificación tiene el potencial para el desarrollo y aplicación de herramientas basadas en los procesos de reconocimiento olfativo.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. *Dendroctonus adjunctus*

El límite altitudinal de *Dendroctonus adjunctus* Blandford (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) se ubica entre los 1,300 y 3,940 msnm, con un intervalo preferente entre los 2,500 y 3,000 msnm. La distribución se extiende del suroeste de los Estados Unidos de América hasta Nicaragua, con presencia en climas semifríos a una temperatura media de 12°C y precipitaciones medias anuales de 850 a 1,500 mm. Esta especie está presente en 17 estados (Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Distrito Federal, Durango Guerrero, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Tlaxcala, Veracruz y Zacatecas) y se distribuye en todos los sistemas montañosos, excepto en la Sierra de Baja California (Wood 1982; Salinas-Moreno *et al.*, 2010a).

Se han reportado 18 especies de pino hospederas de *D. adjunctus*, como: *Pinus ayacahuite* Ehrenb, *P. arizonica* Engelm, *P. chihuahuana* Engelmann, *P. durangensis* Martínez, *P. flexilis* E. James, *P. hartwegii* Lindl, *P. herrerae* Martínez, *P. lawsoni* Roezl, *P. maximinoi* H.E. Moore, *P. michoacana* Martínez, *P. montezumae* Lamb, *P. patula* Schltld. & Cham., *P. pinceana* Gordon & Glend, *P. ponderosa* Douglas ex C. Lawson, *P. pseudostrobus* Lindl y *Pinus oocarpa* Schiede

ex Schltdl (Cibrián *et al.*, 1995; Paine *et al.*, 1997; Salinas *et al.*, 2004). Esta especie presenta una generación al año, aunque de acuerdo a la altitud local, existe una variación en la duración del ciclo de vida y las temporadas en las que se presentan los distintos estados de desarrollo. En general, se han registrado dos períodos marcados de ataque, de agosto a marzo y de septiembre a noviembre, con periodos de mayor vuelo de mediados de octubre y principios de noviembre (Chansler, 1967; Cibrián *et al.*, 1995). Su ubicación en el fuste del árbol es variable y depende de la altura, en promedio la mayor densidad de insectos por unidad de superficie en árboles jóvenes se encuentra en los primeros metros de altura del fuste, mientras que, en árboles más longevos en el tercio medio (Torres y Sánchez, 2005).

En la última década se presentaron brotes epidémicos atípicos e inéditos de insectos descortezadores en varios estados del norte, centro y sur de la República Mexicana. En 2013, la superficie afectada por estos descortezadores fue en un promedio anual de 15,000 ha y superó con un 12% a la superficie afectada por incendios forestales, siendo la Sierra Madre Occidental la zona con más afectaciones; además, Durango y Chihuahua, presentaron un porcentaje de daños del 25% y 18%, respectivamente. Por otro lado, en los últimos cinco se han reportado fuertes ataques en la Sierra Madre Oriental (Coahuila, Nuevo León, Querétaro y Tamaulipas), el Eje Volcánico Transversal (Michoacán y Jalisco) y la Sierra Madre del Sur (Oaxaca, Guerrero y Chiapas) (Salinas-Moreno *et al.*, 2004; Salinas-Moreno *et al.*, 2010b; Sánchez-Martínez, 2018; Cervantes-Martínez *et al.*, 2019). Esto ha ocasionado un incremento de áreas forestales sometidas a saneamientos fitosanitario, basado principalmente en la tala de los árboles infestados y la aplicación de insecticidas organosintéticos, lo cual ha provocado importantes pérdidas económicas y deterioro del ambiente.

2.2. Sistema de comunicación de los escarabajos descortezadores

La ecología química de estos escarabajos es compleja, los descortezadores, al igual que otros insectos, utilizan sustancias químicas conductuales (semioquímicos) para comunicarse e interactuar con sus huéspedes y otras especies de insectos. Estos semioquímicos intervienen en la búsqueda y colonización de hospederos, agregación o disgregación de individuos y en el apareamiento (Billings, 1995; Seybold *et al.*, 2008).

Los semioquímicos se pueden dividir en aleloquímicos o feromonas, de acuerdo al emisor o receptor. Las señales efectivas intraespecíficas se denominan “feromonas” y se clasifican de acuerdo a su función y modo de acción en: feromonas de alarma, agregación, seguimiento, marcaje, sexual y de determinación de castas (Soroker *et al.*, 2015). Por otro lado, los aleloquímicos son señales entre las diferentes especies y según su función biológica, se clasifican en: alomonas (benefician al emisor), kairomonas (benefician al receptor), sinomonas (benefician tanto al emisor y al receptor) o apneumonas (proviene de fuentes no vivas) (Nordlund, 1982; van Tol *et al.*, 2001).

El determinante más importante del fitness de los escarabajos de corteza es la ubicación de un huésped adecuado (Raffa, 2001), muchos de los escolítinos incluyendo al género *Dendroctonus*, responden a señales olfativas para determinar la identidad y calidad del huésped mientras se encuentran en vuelo. Además de los volátiles, se ha reportado que existen señales visuales que permiten a los escarabajos orientarse y aterrizar en los árboles adecuados, sin embargo, los semioquímicos son esenciales para una colonización exitosa (Raffa *et al.*, 1993; Byers *et al.*, 2007). En el ciclo de vida típico de *D. adjunctus*, las hembras fungen como pioneras al seleccionar el hospedero, los componentes de la resina producida por el árbol, tras la etapa de colonización, juegan un papel paradójico, ya que ésta es secretada como una defensa, pero posee volátiles específicos que atraen a los descortezadores y componentes que son utilizados como precursores de feromonas (Wallin y Raffa, 2002; Erbilgin *et al.*, 2003).

Las especies de escarabajos de corteza como *D. adjunctus* que pueden colonizar y matar con éxito árboles sanos, exhiben una atracción secundaria y coordinan ataques masivos utilizando feromonas de agregación, cuando las hembras de *D. adjunctus* logran penetrar a la parte del floema, inician la emisión de feromonas específicas de agregación, cuya composición cualitativa y cuantitativa, es única dentro de las especies, ya que se utilizan para la reproducción, el aislamiento y la agregación de conoespecíficos (Byers y Zhang, 2011; van Tol *et al.*, 2001).

Los miembros del mismo género suelen utilizar una misma “gamma” de productos químicos para producir sus feromonas, como resultado de las vías biosintéticas compartidas. Respecto a

la filogenia de descortezadores del género *Dendroctonus* e *Ips* y los componentes activos de las feromonas de cada especie (Figura 1), Symonds y Elgar (2008), señalan que existen diferencias notables en los componentes de feromonas utilizados por los dos géneros, sin embargo, dentro de cada género, muchas de las especies de *Dendroctonus* tienen diferentes composiciones de feromonas (Kelley y Farrell, 1998; Symonds y Elgar, 1999; Tillman *et al.*, 1999; Cognato y Sperling, 2000).

Las feromonas de los descortezadores, en combinación con las kairomonas del huésped, incrementan la atracción de machos y coordinan el ataque a huéspedes específicos (Byers, 1989; Seybold *et al.*, 2000). Para *D. adjunctus*, se ha reportado la atracción al monoterpeno α -Pineno y a las feromonas de agregación frontalina (1S, 5R)-1,5-dimethyl-6,8-dioxa-[3,2,1]-bicyclooctano) y exo-brevicomina (exo-7-ethyl-5-methyl-6,8-dioxabicyclo [3.2.1]octano) ().

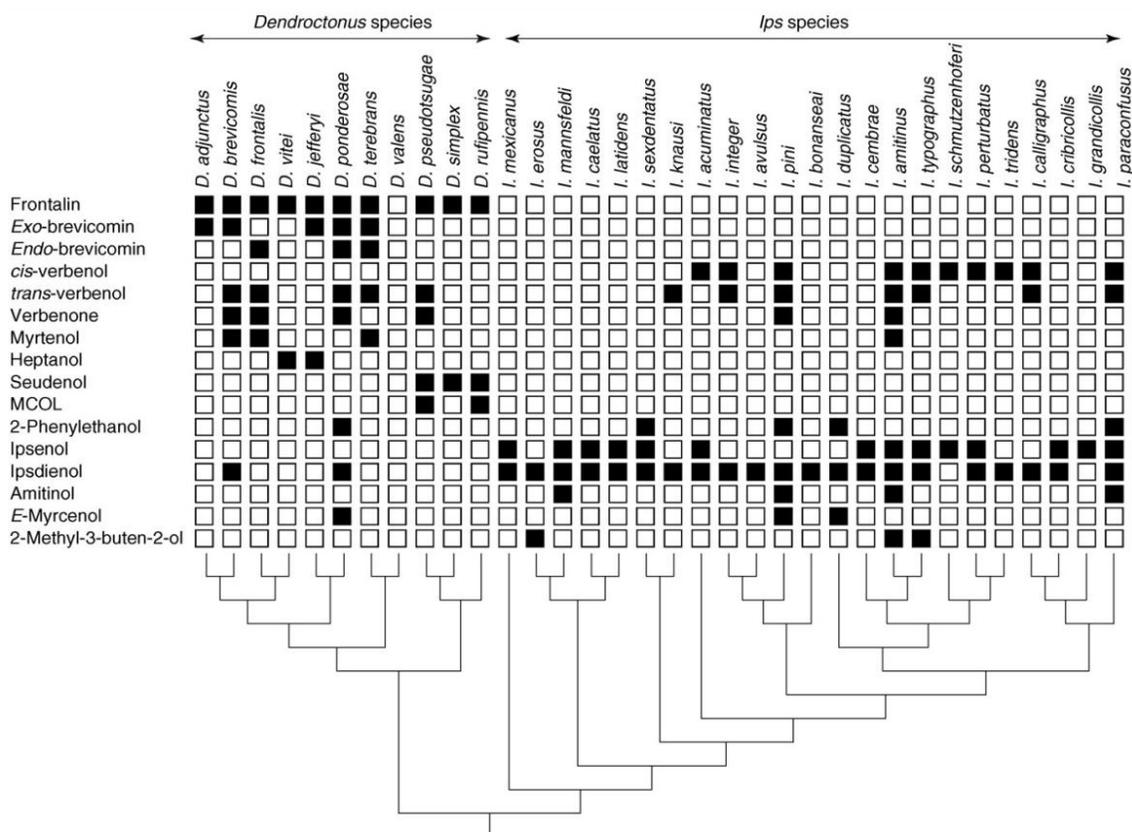


Figura 1. Filogenia de las especies *Dendroctonus* e *Ips* y la interpretación de la evolución de las feromonas. Los cuadrados rellenos, indican la presencia de un componente químico como parte de la mezcla activa de feromonas. Tomado de Symonds y Elgar, 2008.

Por otro lado, se ha mencionado que algunas especies de descortezadores pueden emitir una feromona antiagregante una vez que el árbol está completamente colonizado, la cual, hace que los individuos eviten la colonización en parches de alta densidad de ataque y se disminuya la agregación. La verbenona (4,6,6-trimetilbicyclo [3.1.1]-hept-3-en-2-one) inicialmente fue identificada en *D. ponderosae* Hopkins y *D. frontalis* Zimmerman, posteriormente en otras especies de descortezadores entre ellas *D. adjunctus*. Al parecer este compuesto se produce por la oxidación de monoterpenos α -pineno por microorganismos asociados a las hembras (Macías-Sámamo, 2001; Lindgren y Miller, 2002; Macías-Sámamo *et al.*, 2004).

Las investigaciones de los aspectos de la ecología química del escarabajo descortezadores se han centrado en los semioquímicos que intervienen en la selección y colonización del huésped, la dispersión, agregación y antiagregación, sin embargo, son muy pocos los estudios moleculares que en la actualidad aborden su sistema olfativo. Algunos de los campos de oportunidad, están relacionado a la identificación de los genes que codifican las proteínas implicadas en la biosíntesis de las feromonas, la percepción de los semioquímicos, así como el procesamiento de las señales y los genes involucrados en las respuestas conductuales provocadas por los semioquímicos (Field *et al.*, 2000).

2.3. Percepción y procesamiento de señales de odor en insectos.

La comunicación entre los insectos es extremadamente importante para su supervivencia, los olores desempeñan un papel importante en la eficacia biológica, intervienen en la búsqueda de alimento u hospedero, agregación, evasión intraespecífica o interespecífica (Touhara y Vosshall, 2009). Las señales olfativas de los insectos surgen de diversas fuentes, generalmente son mezclas complejas de compuestos químicos, tanto volátiles como no volátiles, que funcionan como moléculas de señal que permiten al insecto comunicarse con individuos de su misma o de diferentes especies (Suwannapong y Benbow, 2011).

El principal órgano olfativo en insectos son las antenas, estos apéndices tienen una gran variedad de formas y tamaños, lo cual depende de la historia evolutiva y ecología de cada especie y se

encuentran cubiertas de unidades morfofuncionales llamadas “sensillas” distribuidas sobre el flagelo (Fig. 2a). Existen cuatro tipos de sensillas olfativas: trichodea, basicónica, placodea y coelocónica, cada una está conectada a una o varias neuronas receptoras (ORN) bipolares que extienden sus dendritas hacia la linfa antenal donde ocurren los eventos de transducción de señales olfativas (Steinbrecht, 1998; Shanbhag *et al.*, 2000).

El olfato se puede dividir en diferentes niveles (Fig. 2b), el primero inicia con la recepción de semioquímicos en la periferia, seguido del procesamiento de señales en lóbulos antenales, la integración en los centros de procesamiento superiores del cerebro y la traducción de señal a un comportamiento específico. Este sistema olfativo sofisticado deriva de la capacidad del sistema periférico para detectar selectivamente e inactivar cantidades diminutas de olores una vez que han transmitido la información (Mustaparta, 1996; Suwannapong y Benbow, 2011).

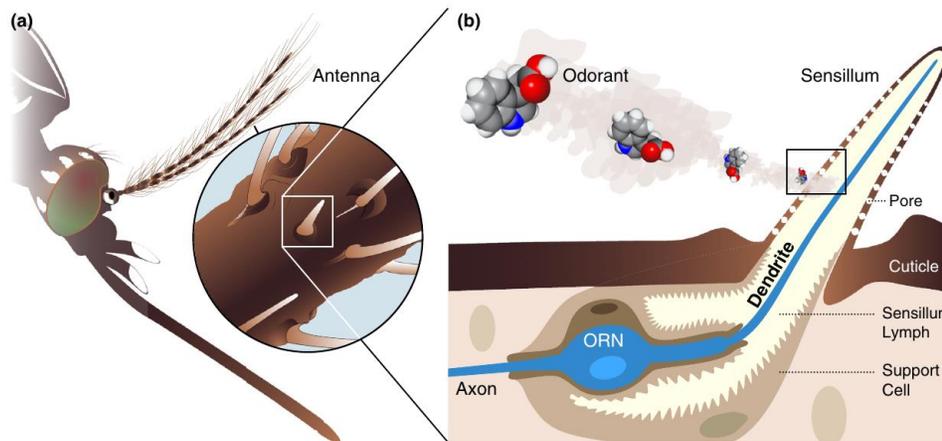


Figura 2. Órganos quimiosensoriales de los insectos y modelo de la transducción de señales. (a) Apéndices quimiosensoriales cubiertos por *sensilla*. (b) Los olores ingresan por los poros cuticulares para dirigirse al ORN. Tomado de Suh *et al.*, 2014.

La fase inicial en el procesamiento olfativo también llamado “perireceptor”, implica la absorción, unión, el transporte y la inactivación de los olores, así como la activación del receptor y transducción de la señal. Los olores se reconocen por las neuronas sensoriales olfativas (OSN), que se encuentran en las dendritas de las células sensoriales, dentro de la sensilla en la superficie antenal. Existen diferentes familias multigénicas involucradas en los procesos moleculares que tienen lugar a nivel de estas neuronas sensoriales y que permiten la transducción de información química en señales eléctricas, que pueden ser interpretadas por el cerebro del insecto (Fig. 3),

además, las proteínas involucradas en estos eventos se pueden clasificar en tres tipos principales: receptoras olfativas, no receptoras y enzimas degradadoras de odorantes (Leal, 2005).

Los receptores son proteínas transmembranales responsables de detectar la mayoría de los olores, su número es muy variable entre los grupos de insectos, se expresan en la superficie de las OSNs y se clasifican en tres familias: receptores de olor (ORs), receptores ionotrópicos (IRs) y receptores gustativos (GRs) (Leal, 2012).

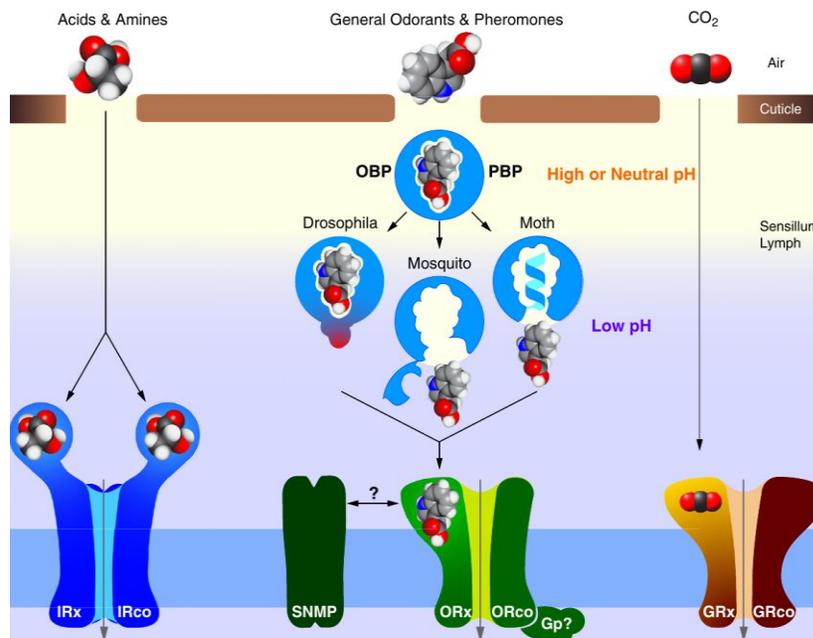


Figura 3. Distintas clases de odorantes activan grupos específicos de receptores transmembranales que se expresan en los OSN e interactúan con proteínas especializadas que se encargan de transportar y detectar los diferentes volátiles para activar los receptores. Tomado de Suh et al., 2014.

La familia más grande de receptores de membrana quimiosensorial son los ORs, son específicos de los insectos y probablemente han evolucionado de los receptores gustativos en un ancestro común de insectos alados (Missbach *et al.*, 2014), pueden unirse a varias moléculas lipofílicas transportadas por el aire como compuestos aromáticos, terpenos y los derivados de ácidos grasos (constituyentes de muchas feromonas) (Hallem y Carlson, 2006; Tanaka *et al.*, 2009; Montagné *et al.*, 2015). Algunos receptores de los insectos forman complejos funcionales con un

correceptor (Orco), que también se requiere para la correcta orientación de las moléculas de odor a la membrana dendrítica, el complejo OR-Orco forma un canal de cationes no selectivos ligados, que puede abrirse directamente al ser activado por un ligando apropiado (Larsson *et al.*, 2004; Sato *et al.*, 2008).

Los receptores ionotrópicos surgieron durante la evolución de los protostomados (artrópodos, lombrices, moluscos y anélidos) a partir de los receptores de glutamato ionotrópico (iGluR). Los insectos poseen un número bajo de estos receptores (~10-30), que se distinguen en dos subclases, los "IRs antenales" que probablemente definen la primera familia de receptores olfativos de los insectos y los "IRs divergentes", que se expresan en las neuronas gustativas periféricas e internas y podrían intervenir en funciones gustativas (Rytz *et al.*, 2007; Croset *et al.*, 2010). Por último, los GRs son miembros de una gran familia de receptores acoplados a la proteína G filogenéticamente diferentes a los receptores de sabor de la mayoría de animales, varios GRs pueden coexistir en un solo receptor de neurona. Otros estudios revelaron que este sistema receptor, forma parte del sentido de gusto de los insectos, cubre un amplio espectro de azúcares, sustancias amargas o sales (Isono y Morita, 2010).

Mientras que algunos odorantes hidrófilos (ácidos o aminos) pueden disolverse fácilmente en la linfa sensillar y ser detectados por los receptores, la mayoría de las moléculas volátiles son lipofílicas, por lo que para llegar a los receptores de las OSNs se solubilizan y transportan por proteínas especializadas. Estos componentes funcionales se clasifican como proteínas no receptoras que agrupan tres clases de proteínas: de unión a odorantes (OBPs), quimiosensoriales (CSPs) y proteínas de la membrana de la neurona sensorial (SNMPs) (Pelosi *et al.*, 2014). Los odorantes que entran por los poros de las sensillas se unen inmediatamente a las OBPs o CSPs que transportan los volátiles a través de la linfa sensillar hasta los receptores de odor, mientras que las SNMPs juegan un papel en la mediación de las interacciones entre ligandos y ORs (Benton *et al.*, 2007).

La unión de los odorantes y receptores desencadena una reacción que, de manera general, ocasiona la apertura de canales de iones o chaperones similares a los canales de iones, si hay suficientes odorantes presentes y varios canales iónicos abiertos simultáneamente, se libera un

potencial de acción a lo largo de la dendrita al lóbulo antenal, sin embargo, el proceso no está del todo entendido, por lo que se han descrito cuatro modelos de transducción de señales olfativas en insectos (Sachse y Krieger, 2011). Una vez que se activan los receptores y el volátil es liberado, inicia la degradación por una enzima específica para evitar que la misma molécula desencadene más señales y se sobre estimulé los OSNs. La linfa sensorial contiene muchas enzimas hidrolíticas conocidas como “enzimas degradadoras de odorantes” (ODEs) que incluyen enzimas degradadoras de feromonas (EDF) y las enzimas degradadoras de olores (EDP) (Vogt, 2003; Touhara y Vosshall, 2009; Sato y Touhara, 2009; Leal, 2012).

2.4. Proteínas olfativas no receptoras

En los insectos, la quimiorrecepción está mediada por receptores transmembranales olfativos (ORs, GRs e IRs) responsables de reconocer y discriminar una variedad de semioquímicos y olores del ambiente, sin embargo, antes de llegar a las dendritas de las neuronas sensoriales, las moléculas volátiles tienen que ser solubilizadas y transportadas desde el entorno externo, tarea que es realizada por dos familias de proteínas no receptoras llamadas OBPs y CSPs que se expresan en alta concentración alrededor de las dendritas olfativas en la linfa sensillar y forman parte del primer filtro en la detección y liberación de estímulos químicos, estas proteínas tienen una alta eficiencia como portadores de compuestos hidrofóbicos, lo cual ha favorecido la expansión y la evolución de los genes que las codifican y su participación en diferentes contextos de la fisiología de los insectos (Pelosi y Maida, 1995; Wicher, 2015; Carraher *et al.*, 2015; Pelosi *et al.*, 2006).

Otra familia de proteínas clasificadas como no receptoras son las SNMPs, proteínas transmembranales con similitud alta a la familia de receptores CD36 de los mamíferos (Rogers *et al.*, 2001). Pese a que su función principal no es el transporte de volátiles, estudios recientes han revelado que podrían estar implicadas en la liberación de moléculas y funcionar como correceptores que "atrapan" compuestos y los "transfieren" a receptores específicos en las neuronas que responden a feromonas (Forstner *et al.*, 2008).

2.4.1. Proteínas de unión a odorantes (OBPs)

Las OBPs son un grupo de pequeñas proteínas extracelulares, se caracterizan por ser hidrofílicas, con puntos isoeléctricos ácidos, de tamaño pequeño (10 a 30 kDa) y globulares. Estas proteínas tienen tres funciones primarias, como portadores que solubilizan las moléculas de semioquímicos y las transportan a los ORs de membrana, liberadores de volátiles a SNMP que luego entregan las moléculas de olor, a un OR específico y en la protección de las moléculas a la degradación por enzimas, esto permite a los insectos tener sistemas olfativos sensibles y específicos para detectar los compuestos y diferenciarlos con alta resolución (Ishida y Leal, 2008; Laughlin *et al.*, 2008; Gong *et al.*, 2009; Venthur *et al.*, 2014).

Las proteínas de unión en insectos no presentan homología con las de vertebrados y a diferencia de otras proteínas olfativas, son exclusivas de insectos (Vogt *et al.*, 1991; Benton, 1999). La diversificación adaptativa en una gran variedad de hábitats con múltiples moléculas de olor ha dado lugar a una gran familia de OBPs que muestra una gran divergencia entre ordenes, baja similitud (10-15%) de residuos entre especies, pero una alta conservación entre las especies en un mismo género (Zhou *et al.*, 2004a). La alta diversidad entre OBPs indica que intervienen en la detección de diferentes ligandos o una unión al mismo ligando de diversas formas, por el contrario, OBPs altamente conservadas indican una función fisiológica común y específica en las especies (Fan *et al.*, 2011).

La característica más llamativa entre todas las secuencias de OBP es la existencia de residuos de cisteínas altamente conservados con una longitud de secuencia específica entre ellas. Estos patrones se han convertido en una "firma" para OBPs de insectos y junto con otros rasgos como su tamaño, la naturaleza globular soluble en agua y la presencia de un péptido señal, se han utilizado en la anotación de estas proteínas en genomas y transcriptomas, lo cual ha permitido identificar y clonar en los últimos años, alrededor de 400 OBPs de más de 40 especies de insectos pertenecientes a 10 órdenes (Zhou, 2010).

Las OBPs se dividen en subfamilias según el número de residuos de cisteína altamente conservados en su secuencia primaria, las **OBP clásicas** tienen seis residuos de cisteína conservados que forman tres enlaces de disulfuro; las **OBP Plus-C** tienen cisteínas adicionales y una prolina altamente conservada; las **OBP Minus-C** tienen menos de seis cisteínas y las **OBP**

atípicas tienen seis cisteínas conservadas y un terminal C largo (Hekmat-Scafe *et al.*, 2002; Zhou, 2010).

Las OBPs clásicas también se han clasificado de acuerdo a sus patrones de expresión en proteínas de unión a feromonas (**PBP**), las cuales se expresan principalmente en insectos machos y están involucrados en la respuesta a las feromonas sexuales; proteínas generales de unión a olores (**GOBP**) que se expresan en insectos hembras y están involucradas en la respuesta a los volátiles de los hospederos y proteínas específicas de antena o proteínas de unión a antenas (**ASP** o **ABP**) (Vogt *et al.*, 1991; Vogt, 2003). Esta agrupación fue con base a los primeros estudios que se realizaron en lepidópteros, por lo que, entre más proteínas de olor se describen y anotan de diferentes órdenes de insectos, los patrones de expresión y esta clasificación es menos clara e involucra más excepciones (Zhou *et al.*, 2010). Por otro lado, recientemente se ha descrito un nuevo modelo de OBP de acuerdo a su C-terminal y estructura en 3D, llamada OBPs clase C8. Lagarde *et al.* (2011) sugieren que esta proteína está más evolucionada como resultado de un incremento en la complejidad de su estructura, poseen ocho residuos de Cys y cuatro puentes disulfuro con un C-terminal más largo, en comparación de las OBPs clásicas (Vierira y Rozas, 2011).

En cuanto a su estructura, las OBPs tienen un patrón de plegado altamente conservado que es completamente diferente de sus contrapartes en vertebrados. Estas proteínas están compuestas de 130–140 residuos y comparten un dominio que consiste en al menos seis α -hélices que se mantienen unidas por tres puentes disulfuro (cys1-cys3, cys2-cys5 y cys4-cys6) que entrelazan las seis cadenas helicoidales y que están directamente relacionados con las restricciones estructurales, lo cual hace posible la unión de ligandos. Sin embargo, las estructuras estudiadas hasta ahora, muestran que a pesar de los pliegues similares de todas las OBPs, existen variaciones significativas en cuanto a longitud, posición e inclinación de las α -hélices y la conformación de sus cadenas terminal C (Presenti *et al.*, 2008; Tzotzos, 2013).

Aunque en los últimos 20 años muchos estudios han contribuido a la comprensión de las OBPs, el mayor reto es descubrir exactamente como estas proteínas juegan su papel en la percepción olfativa de los insectos, siguiendo el enfoque convencional, la identificación homológica es una estrategia disponible para identificar OBPs en diferentes especies que comparten la misma

recepción semioquímica, además, el estudio de la modelización puede enriquecer y desarrollar comparaciones de la muy complicada condición fisiológica del sistema olfativo de los insectos (Archunan, 2018).

2.4.2. Proteínas quimiosensoriales (CSPs)

Las CSPs y OBPs tienen una función parecida, sin embargo, no comparten similitud en sus secuencias de aminoácidos, en contraste con las OBPs, las CSPs tienen una mayor conservación con residuos entre 40-50% de identidad entre los ortólogos de especies filogenéticamente distantes y se pueden encontrar en otros artrópodos como crustáceos, miriápodos y quelicerados (Pelosi *et al.*, 2005; Forêt *et al.*, 2006; Iovinella *et al.*, 2013).

Estas pequeñas proteínas con longitudes entre 100-120 residuos, globulares y solubles, poseen un motivo de cuatro cisteínas que contiene dos enlaces disulfuro entre residuos adyacentes (Zhou, *et al.*, 2006; Briand *et al.*, 2002). Los enlaces de disulfuro son intercelulares, con dos pequeños bucles que forman una cavidad hidrofóbica rígida y en comparación con las OBPs, son más flexibles, por lo que pueden adaptarse para unir diferentes ligandos con una gama más amplia de tamaños (Jansen *et al.*, 2007; Leal, 2013)

Los primeros genes que codifican las CSPs se identificaron en *Drosophila melanogaster* Meigen y se denominaron OS-D (McKenna *et al.*, 1994) y A10 (Pikielny *et al.*, 1994), sin embargo, las proteínas resultantes de su expresión no se reconocieron como de unión semioquímica hasta que se demostró que las CSPs tenían altos niveles de expresión en la linfa sensillar de las antenas, desde estos primeros informes un gran número de CSPs se han identificado en diferentes especies (Mameli *et al.*, 1996; Tuccini *et al.*, 1996; Angeli *et al.*, 1999; Marchese *et al.*, 2000).

Estas proteínas quimiosensoriales se encuentran principalmente en el olfato y los órganos gustativos de los insectos, pero también se han descrito en tórax, abdomen, patas, alas, glándulas de feromonas y órganos reproductores (Nagnan-Le Meillour *et al.*, 2000; Ban *et al.*, 2003; Pelosi *et al.*, 2006; Vieira y Rozas, 2011; Gu *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2016). La versatilidad excepcional de las CSPs podría estar relacionada con su gran capacidad de detectar una amplia gama de compuestos no volátiles y semioquímicos, como volátiles de plantas, feromonas, hidrocarburos,

lípidos cuticulares y pigmentos visuales (Briand *et al.*, 2002; Ozaki *et al.* 2005; González *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2016).

Estos sofisticados perfiles de expresión y capacidad de unión a ligandos sugieren que el papel de las CSPs es complejo y abarca otras funciones además de la quimiorrecepción. Al respecto, se ha sugerido que estas proteínas además de estar involucradas en la solubilización de componentes volátiles, también intervienen en procesos fisiológicos como la muda, la formación o regeneración de tejidos y la resistencia a moléculas tóxicas (Nomura *et al.*, 1992; Kitabayashi *et al.*, 1998; Jacquín-Joly *et al.*, 2001; Sabatier *et al.*, 2003; Wanner *et al.*, 2005; Dani *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2012).

2.4.3. Proteínas sensoriales de membrana neuronal (SNMPs)

Las SNMPs se encuentran en la membrana dendrítica de las neuronas en los órganos sensoriales gustativos y olfativos de los insectos, son homólogos de la familia de genes de mamíferos CD36 (Benton *et al.* 2007; Vogt, 2009). Estas proteínas tienen una longitud de 519-525 residuos con dos dominios transmembranales, N y C-terminal citosólicos y un bucle extracelular, el primer motivo extiende \approx 44 aminoácidos hacia la N-terminal y el segundo motivo contiene \approx 92 aminoácidos cerca de la C-terminal (Nichols y Vogt, 2008; Zhang *et al.*, 2018).

Los SNMP se identificaron por primera vez en la membrana neuronal sensorial de feromonas de *Antheraea polyphemus* Cramer (Lepidoptera: Saturniidae), lo que sugirió un papel en la recepción de feromonas de insectos (Rogers *et al.*, 1997), posteriormente, se identificaron en otras especies de lepidópteros como *Bombyx mori* Linnaeus (Bombycidae), *Manduca sexta* Linnaeus (Sphingidae) y *Heliothis virescens* Fabricius (Noctuidae) (Forstner *et al.*, 2008; Rogers *et al.*, 2001a; Rogers *et al.*, 2001b). Actualmente se han reportado en dípteros, lepidópteros, himenópteros y coleópteros y se clasifican en las subfamilias SNMP1 y SNMP2, las cuales presentan patrones diferentes de expresión (Nichols y Vogt 2008, Liu *et al.* 2014).

La estructura de los SNMP y su diversidad relativamente baja, sugiere que su función es distinta de la de un OR, hay tres modelos hipotéticos sobre su funcionalidad, aunque, podría estar implicada en liberar moléculas quimiosensoriales, como un complejo con un receptor o como

un mecanismo de internalización (Ashourian, 2014). La SNMP1 son específicas de antena y se asocian con neuronas olfativas específicas de feromonas, lo que sugiere un papel importante en su detección (Krieger *et al.*, 2003; Benton *et al.*, 2007; Jin *et al.*, 2008), sin embargo, su función sigue siendo controvertida (Vogt *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2014). Por el contrario, el subtipo SNMP2 se asocia con sensilla asociada a feromonas, pero se expresa en las células de soporte, en lugar de neuronas (Forstner *et al.*, 2008).

Los genes SNMP1 y SNMP2 están bien expresados en las antenas de algunas especies de insectos, lo que refleja su función en la sensación olfativa, sin embargo, los SNMP2 también se han reportado expresados en tejido no olfativo, en pata y alas de *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera: Culicidae) y *D. melanogaster*. La expresión de los genes SNMP2 en tejidos corporales, indica roles multifuncionales en los insectos (Jin *et al.*, 2008; Vogt *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015).

2.7. Aplicaciones

La búsqueda y detección de las sustancias químicas que intervienen en la comunicación de los insectos, originó un área de investigación conocida como ecología química, aplicada principalmente al manejo de plagas de importancia agrícola y forestal (Field *et al.*, 2000; Wehrenfennig *et al.*, 2013). Actualmente, se han identificado más de 3,000 semioquímicos, sin embargo, el estudio de los sistemas sensoriales de los insectos impone un gran reto, por lo que se requiere de investigación interdisciplinaria que integre campos complementarios, desde la genómica, hasta la ecología, lo cual proporciona la oportunidad de investigar las interacciones entre el genoma, los procesos neurobiológicos, así como el comportamiento y el entorno de un insecto (Field *et al.*, 2000; Apps, 2013; Rützler y Zwiebel, 2005).

La comprensión de los comportamientos de diversas plagas depende en gran medida de una mejor comprensión del mecanismo molecular que subyace en el sistema olfativo, los insectos dependen de diversas clases de proteínas quimiosensoriales para detectar olores y sabores del medio ambiente. El estudio de las proteínas olfativas, en específico de las familias no-receptoras, ha tenido un auge en la última década debido a que proporcionan información para

el desarrollo de diversas herramientas y aplicaciones biotecnológicas patentables en agricultura, medicina e industria (Brito *et al.*, 2016; Dimitratos *et al.*, 2019).

Las OBPs, CSPs y SNMPs son proteínas no receptoras reconocidas por actuar como portadoras e intermediarias de feromonas y volátiles de los hospederos, pese a que las tres familias presentan un potencial en su aplicación dentro del manejo de plagas, las SNMPs han sido menos estudiadas, esto podría atribuirse a su naturaleza como proteína transmembranal y poca estabilidad en condiciones ambientales adversas (Pelosi *et al.*, 2018). Por otro lado, las OBPs y CSPs poseen características fisicoquímicas que les permiten ser resistentes a disolventes, degradación proteolítica y desnaturalización térmica, por lo que su estructura sólo se ve afectada ligeramente a temperaturas de 70-75 °C, además, tienen una alta especificidad para un rango amplio de ligandos y su producción en sistemas bacterianos es sencilla, de bajos costos y rendimientos de 20-50 mg/L (Wei *et al.*, 2008; Pelosi *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2010; Venthur y Zhou, 2018).

La adaptación de las OBPs y CSPs a una variedad de funciones, ha sugerido diferentes usos en aplicaciones tecnológicas en agricultura, entre las que destacan la fabricación de biosensores individuales ajustados a productos químicos específicos o el diseño de detectores de olores multipropósito, empelando conjuntos de sensores ensamblados en una matriz, los cuales pueden ser aplicados para el monitoreo del ambiente, la detección y monitoreo de organismos de seguridad alimentaria, la detección de plaguicidas y metales pesados. Sin embargo, la creación de biosensores está en una primera etapa de desarrollo y se requieren de estudios de rendimiento, toma de muestras y la detección en condiciones de campo (Vargas-Bernal *et al.*, 2012; Lampson *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2014; Yi *et al.*, 2015; Ali *et al.*, 2017; Dimitratos *et al.*, 2019).

Por otro lado, se han desarrollado otras aplicaciones como el diseño de compuestos químicos que puedan servir como atrayentes o repelentes específicos para el manejo de plagas, mediante la elaboración de modelos de homología de las proteínas no receptoras de interés y métodos de simulación computacional, como el acoplamiento y la dinámica molecular (Plettner, 2002; Sun *et al.*, 2011; Mutis *et al.*, 2014; Ingham, 2015; Devillers, 2018; Portilla-Pulido *et al.*, 2019). Asimismo, el desarrollo de mecanismos de silenciamiento génico con ARNi, los cuales pueden

aplicarse como agente de biocontrol para interrumpir el proceso de localización-colonización de los hospederos y del comportamiento de apareamiento (Pelletier *et al.*, 2010; Antony *et al.*, 2018).

2.6. Antecedentes

Las tecnologías de secuenciación de siguiente generación (NGS) han promovido el desarrollo de las ciencias ómicas en el estudio de insectos. Tradicionalmente, los estudios a esta escala se limitaban a los organismos modelo, sin embargo, en los últimos años, la aparición de las NGS permitió el incremento de estudios de especies cuya información genómica es inexistente o limitada. Esto posibilita el estudio de cualquier organismo y elimina el sesgo que representa la comparación con especies modelo, ya que no reflejan la biología de sus parientes cercanos y muestran una fracción de la diversidad de organismos, sobre todo en un grupo tan grande como los insectos (Huey *et al.*, 2005; Metzker, 2010; Tagu *et al.*, 2014).

El creciente interés y la aplicación de las NGS ha llevado a una rápida y dramática disminución de sus costos, hoy en día, es ampliamente accesible y proporciona un enfoque rentable de la investigación genómica gracias a la rápida adquisición de datos, la gran cantidad de información que se obtiene del material de origen y la inversión de tiempo, en comparación con la secuenciación de Sanger (Mardis, 2011). Actualmente, hay dos métodos principales que pueden utilizarse para generar perfiles de expresión genética: Tag-seq y RNA-Seq. El primero es la opción más económica, sin embargo, requiere el mapeo a un genoma o transcriptoma de referencia, mientras que, el RNA-Seq permite un análisis más exhaustivo, utiliza lecturas cortas que se ensamblan *de novo* o pueden asignarse a un genoma o transcriptoma de referencia si están disponibles, además, es más adecuado para detectar genes funcionales, ya que todas las secuencias obtenidas provienen de genes codificantes (De Wit *et al.*, 2012).

Las grandes cantidades de datos producidos por las NGS, han requerido el desarrollo paralelo de nuevos algoritmos, el uso de bases de datos y la aplicación de herramientas bioinformáticas para el análisis de secuencias. En estudios de entomología, la falta de conocimiento especializado es una limitante en la aplicación de esta tecnología (Montagné *et al.*, 2015). Desde

2008, se han secuenciado transcriptomas de 68 especies de insectos, de siete órdenes, cuyos estudios se centran en el descubrimiento de nuevos genes, el desarrollo de marcadores moleculares, la elaboración de perfiles de expresión génica, filogenómica, genómica de poblaciones y metagenómica, con el objetivo de comprender como interactúan estos organismos en su entorno y potenciar la producción de bienes y servicios biotecnológicos (Qi-Lin y Ming-Long, 2013).

Por décadas, se ha realizado investigación sobre la biología y ecología química de escarabajos descortezadores y los semioquímicos que intervienen en sus sistemas de comunicación, sin embargo, la aplicación de tecnologías ómicas en esta área es reciente. Las primeras líneas de investigación en donde se planteó el estudio de los mecanismos genómicos y moleculares de plagas primarias de descortezadores, fueron impulsadas en 2007 por The Tria Project: Mountain Pine Beetle System Genomics en Canadá. Las líneas impulsadas incluyeron el estudio de los genes involucrados en el olfato (sistema de comunicación), la desintoxicación (que permite a los escarabajos sobrevivir a la resina del árbol) y la biosíntesis de feromonas (feromonas que intervienen en el ataque masivo a los hospederos), con el objetivo de emplear la información generada para analizar y abordar los desafíos de los brotes epidémicos de estos escolítinos (Patrick y Dezene, 2019; Cullingham *et al.*, 2019).

En los últimos años, se han investigado especies como *D. ponderosae* Hopkins, *D. valens* LeConte, *D. armandi* Tsai & Li e *Ips typographus* Linnaeus, donde los objetivos en general han sido analizar el transcriptoma de las antenas, en específico de las familias de genes quimiosensoriales involucrados en la recepción y transporte de las moléculas de olor, su identificación, patrones de expresión y caracterización funcional (Andersson *et al.*, 2013; Gu *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2018).

Por otro lado, Zhang *et al.* (2016) secuenciaron y analizaron mediante la tecnología de ARNi el gen DarmOrco mediante PCR, PCR RACE y cebadores degenerados basados en secuencias homólogas, el perfil de expresión fue principalmente en las antenas de ambos sexos, y el silenciamiento de este gen provocó tanto en machos y hembras, una reducción en la capacidad de detectar un conjunto de volátiles de hospederos y feromonas de agregación. Asimismo, Li *et*

al. (2018) caracterizaron nueve genes que codifican proteínas quimiosensoriales (CSP) de *D. armandi*, los cuales se expresaron en diferentes etapas de desarrollo y tejidos adultos, lo que indica varios papeles en la metamorfosis del desarrollo, el olfato y la gustación, realizaron ensayos de acomplamiento DarmCSP2 (específica de antena) contra feromonas y volátiles de huéspedes y corroborados mediante RNAi.

En la actualidad, existen más de 10 bioproyectos registrados en el *National Center of Biotechnology Information* (NCBI), que buscan ampliar el conocimiento del transcriptoma y expresión génica de diferentes especies de descortezadores mediante RNA-Seq. En el 2011 y 2013 The Joint Genome Institute (ID: 79903) y The University of British Columbia (ID: 187208), registraron bioproyectos enfocados en la expresión de genes y el genoma del escarabajo del pino del sur *Dendroctonus frontalis*. La mayoría de los estudios se centran en solo cuatro especies de *Dendroctonus*, las cuales son consideradas plagas primarias en países como Canadá y China, sin embargo, el reconocimiento olfativo de los insectos difiere de acuerdo a su ambiente e historia evolutiva, por lo que es necesario investigar diferentes especies de descortezadores para tener un mejor entendimiento en la diversificación de los genes quimiosensoriales y las proteínas involucradas en los eventos perireceptores.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Identificar y realizar la caracterización funcional del repertorio de proteínas olfativas no receptoras, mediante el análisis del transcriptoma de cabeza del descortezador de las alturas *Dendroctonus adjunctus*.

3.2. Objetivos específicos

-Secuenciar tres librerías de cDNA, a partir de una mezcla de cabezas de hembras y machos adultos de *D. adjunctus*.

-Clasificar los unigenes en las categorías de Ontología de Genes (términos GO).

-Identificar y realizar el análisis funcional de los transcritos candidatos de OBPs, CSPs y SNMPs.

-Clasificar los transcritos de proteínas olfativas no receptoras de *D. adjunctus* y compararlas con secuencias homólogas de otros coleópteros, mediante la búsqueda de motivos secuenciales y el análisis filogenético.

-Construir modelos tridimensionales para las proteínas olfativas no receptoras de *D. adjunctus*, que sean de interés para un futuro estudio de acoplamiento molecular.

4. HIPÓTESIS

A partir de la creación de un perfil transcriptómico de cabezas de escarabajos maduros de *D. adjunctus* colectados en el frente activo de un brote, se podrán identificar los genes quimiosensoriales no receptores que intervienen en la unión y el transporte de odorantes que dirigen comportamientos importantes para la supervivencia del descortezador.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Colecta del material biológico

Los adultos maduros de *D. adjunctus* se colectaron a finales de octubre de 2018, en fustes de tres pinos (*Pinus oocarpa* Schiede ex Schltd.) con diámetros mayores a 20 cm y alturas \approx 15 m, ubicados en el frente activo un brote, en la Zona Militar 31, Rancho Nuevo, ubicado en San Cristóbal de las Casas, Chiapas. Los escarabajos se preservaron en microtubos con 80 μ l de RNAlater™ Storage Solution, Thermo Fisher Scientific, con el fin de mantener integro el RNA, se colocaron durante una noche en refrigeración a -4°C y permanecieron a -20°C hasta su procesamiento.

5.2. Extracción de ARN total, construcción de librerías de cDNA y secuenciación

Se contabilizaron los descortezadores colectados y se verificaron a nivel de especie con claves taxonómicas (Wood, 1985; Armendáriz-Toledano y Zuñiga, 2016). Se sexaron por medio de genitalia, se disectaron las cabezas y se separaron por sexo, todas las muestras se almacenaron a -20°C en RNAlater™. La extracción del ARN total se realizó en tres pools de 40 cabezas (20 hembras y 20 machos) con el kit SV Total RNA Isolation System, Promega siguiendo las instrucciones del fabricante, la calidad y concentración del ARN se verificó en un NanoDrop 2000. La construcción de tres bibliotecas de cDNA y la secuenciación con la plataforma BGISEQ-500 se realizó en BGI Hong Kong, China.

5.3. Limpieza y ensamble de secuencias

La calidad de las tres librerías se verificó con FastQC v0.10. (Andrews, 2010) y con FastP (Chen *et al.*, 2018) se realizó la limpieza de adaptadores y lecturas de baja calidad. Se realizó un ensamble de novo a partir de las tres librerías con Trinity v 2.0.6 (Haas *et al.*, 2013) con el valor default de kmer=25. La calidad del ensamble completo se verificó con el programa rnaQUAST v.0.3.0 (Bushmanova *et al.*, 2016). Se registró el número total de lecturas generadas, longitud N50, longitud media y el GC%, posteriormente se eliminaron las redundancias para obtener el número final de unigenes.

5.4. Anotación de Ontología de Genes (GO) y análisis de homología

Para obtener información de la función molecular, componente celular y proceso biológico asociados a los unigenes se utilizó la rutina de mapeo de HMMER2GO-version 0.17.9 (Zenodo, 2019) contra una base de datos personalizada HMM de Pfam, los resultados se visualizaron en WEGO 2.0 (Ye *et al.*, 2018). Para la anotación de los transcritos se realizó un análisis de homología con BLASTx contra un conjunto de datos que se construyó con la base de datos para Insecta de UniProtKB con un umbral de valor E de 1e-6. Los resultados se importaron a Blast2GO (Conesa *et al.*, 2005) para obtener la distribución de las especies, del valor de E (E-value) y porcentaje de similitud encontradas en los hits y se filtraron aquellos cuya descripción correspondieran con genes involucrados en la recepción de olores, en específico de las proteínas olfativas no receptoras.

5.5. Clasificación y caracterización funcional de las proteínas no receptoras

A partir de los unigenes de OBPs, CSPs y SNMPs se realizó la búsqueda de los marcos de lectura abiertos (ORFs) y la predicción de las regiones de codificación probables con Transdecoder (<https://github.com/TransDecoder/TransDecoder>) con una longitud mínima de 100, y como criterio para la retención de marcos de lectura se incluyó un test de homología BLASTp contra la base de datos de Insecta UniprotKB con el fin de maximizar la sensibilidad de obtener ORFs con significado funcional. Los ORFs pronosticados para las proteínas no receptoras se utilizaron para la anotación funcional a partir de la búsqueda de dominios en las bases de datos de PFAM (Finn *et al.*, 2010), SUPERFAMILY (Wilson *et al.*, 2006), CATH-Gene3D (Pearl *et al.*, 2005) y PANTHER (Mi *et al.*, 2016) el servidor InterPro (Mitchell *et al.*, 2015).

Las secuencias de aminoácidos se utilizaron para la clasificación y el descubrimiento de motivos *de novo*, para ello, las OBPs y CSPs de *D. adjunctus* se analizaron junto con secuencias de ortólogos de cuatro especies de Scolytinae y el escarabajo modelo *T. castaneum* y, para el análisis de las SNMPs se utilizaron proteínas homólogas de *D. ponderosae*, *I. typographus*, *T. castaneum*, *Chrysomela lapponica* Linnaeus, *Galeruca daurica* Joannis, *Anomala corpulenta* Motschulsky, *Holotrichia parallela* Motschulsky y *Anoplophora gambiae* Giles.

La clasificación de las proteínas se realizó con base a alineamientos de CLUSTAL-O (Sievers y Higgins, 2018) con los parámetros default de penalización por gaps y de acuerdo a los perfiles de cisteínas conservados (Hekmat-Scafe *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2004a). El análisis de motivos secuenciales se realizó en MEME versión 3.5.7 (Timothy *et al.*, 2009), para las OBPs y CSPs se emplearon parámetros de ancho mínimo=6, máximo=10, número máximo de motivos para encontrar=8 y para las SNMP se utilizó un mínimo=40 máximo=95 y número de motivos=10, en los tres casos se seleccionaron los motivos con un valor $p < 0.0001$. Por otra parte, se realizó la búsqueda de péptidos de señal en las OBP y CSPs candidatas con SignalP4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) y la predicción de los dominios transmembrana de las SNMP con el servidor TMHMM v3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>).

5.6. Análisis filogenéticos

Para la construcción del árbol filogenético se utilizaron los conjuntos de las secuencias de las proteínas predichas de OBPs, CSPs y SNMPs y los ortólogos de especies cercanas y modelo (Anexo 3). Se llevó a cabo un multialineamiento para cada set de secuencias con el método CLUSTAL-O y la búsqueda del modelo evolutivo se obtuvo con ModelTest-NG (Darriba *et al.*, 2019). La reconstrucción filogenética se realizó con Inferencia Bayesiana mediante Markov Chains Monte Carlo en el programa BEAST v1.10.4 (Suchard *et al.*, 2018) con un modelo inicial WAG (Whelan y Goldman, 2001) y 4, 000, 000 de generaciones, el diagnóstico de la salida MCM se observó en Tracer (Rambaut *et al.*, 2018). Para la anotación del mejor árbol se descartó el 30% de los árboles y probabilidades iniciales generadas, la probabilidad posterior se determinó con los árboles restantes, la visualización y edición de los árboles se realizó en iTOLS (Letunic y Bork, 2019).

5.7. Construcción de los modelos 3D de proteínas olfativas no receptoras

Para el diseño de la estructura terciaria se emplearon dos métodos, para la construcción por homología se realizó una búsqueda con BLASTp en las bases de datos de PDB y para cada OBP se seleccionó como molde la proteína cuyos porcentajes de similitud fueron > 30% y los modelos en 3D se construyeron en el servidor SWISS-MODEL (Schwede *et al.* 2003). Para aquellas proteínas cuya estructura tridimensional no pudo ser obtenida a partir del diseño por homología, se realizó una construcción por modelaje comparativo con el servidor Robetta (Kim *et al.*, 2004). Todos los modelos generados se validaron con el software Molprobit (Davis *et al.*, 2007) y editaron en CHIMERA (Pettersen *et al.*, 2004).

6. RESULTADOS

De los 198 descortezadores (Curculionidae: Scolytinae) colectados, 142 se identificaron como *Dendroctonus adjunctus* y 56 *Ips* spp. (Anexo 1).

6.1. Limpieza y ensamble de secuencias

Con la plataforma BGISEQ-500 se obtuvo en promedio 96, 631, 854 lecturas (3.5 GB) con una longitud total de 100 pb a partir de tres librerías de cabezas de machos y hembras de *D. adjuntus*, con un Q20 de 98.13% y GC (%) de 36.89 (Cuadro 1). Las librerías presentaron porcentajes bajos de adaptadores (0.081%) y lecturas con calidad Phred >30. El ensamble *de novo* resultó en 71,174 transcritos con una longitud media de 574 pb, una longitud N50 de 3,126 pb y un GC% de 41.2, posterior a la agrupación y el filtrado de redundancia se obtuvo un total de 44, 420 unigenes.

Cuadro 1. Resumen del proceso de secuenciación y ensamble *de novo*

Librerías	Lecturas	Long. Media (pb)	Datos con limpieza			
			No. De lecturas	GC %	Q20	Q30
1	95,865,730	100	95,865,730	38.41	98.39%	92.67%
2	96,397,504	100	96,397,504	37.21	98.39%	92.65%
3	97,397,326	100	97,612,326	35.01	98.32%	92.35%
Ensamble combinado de las tres librerías						
Número total de transcritos			71,174			
Longitud media (pb)			574			
Unigen N50			3,126			
GC %			41.21%			
Unigenes			44,420			

6.2. Anotación de Ontología de Genes (GO) y análisis de homología

Con base en la homología de la secuencia el 31.25% (13,883) de los 44, 420 transcritos se clasificaron en 25, 861 términos de anotación de las tres categorías GO divididas en 57 grupos

funcionales (Anexo 2). Las anotaciones asociadas con función molecular (MF) fueron más abundantes con un 44.66% que incluyeron 12 grupos, las principales subcategorías representadas en MF (Fig. 4a) con más del 90% de anotaciones fueron de unión (53.2%) y actividad catalítica (40.5%), siendo la unión a compuestos orgánicos cíclicos-heterocíclicos, unión de iones y proteína de unión las funciones más representativas (Fig. 4b), mientras que la actividad hidrolasa fue una de las actividades catalíticas más abundantes (Fig. 4c).

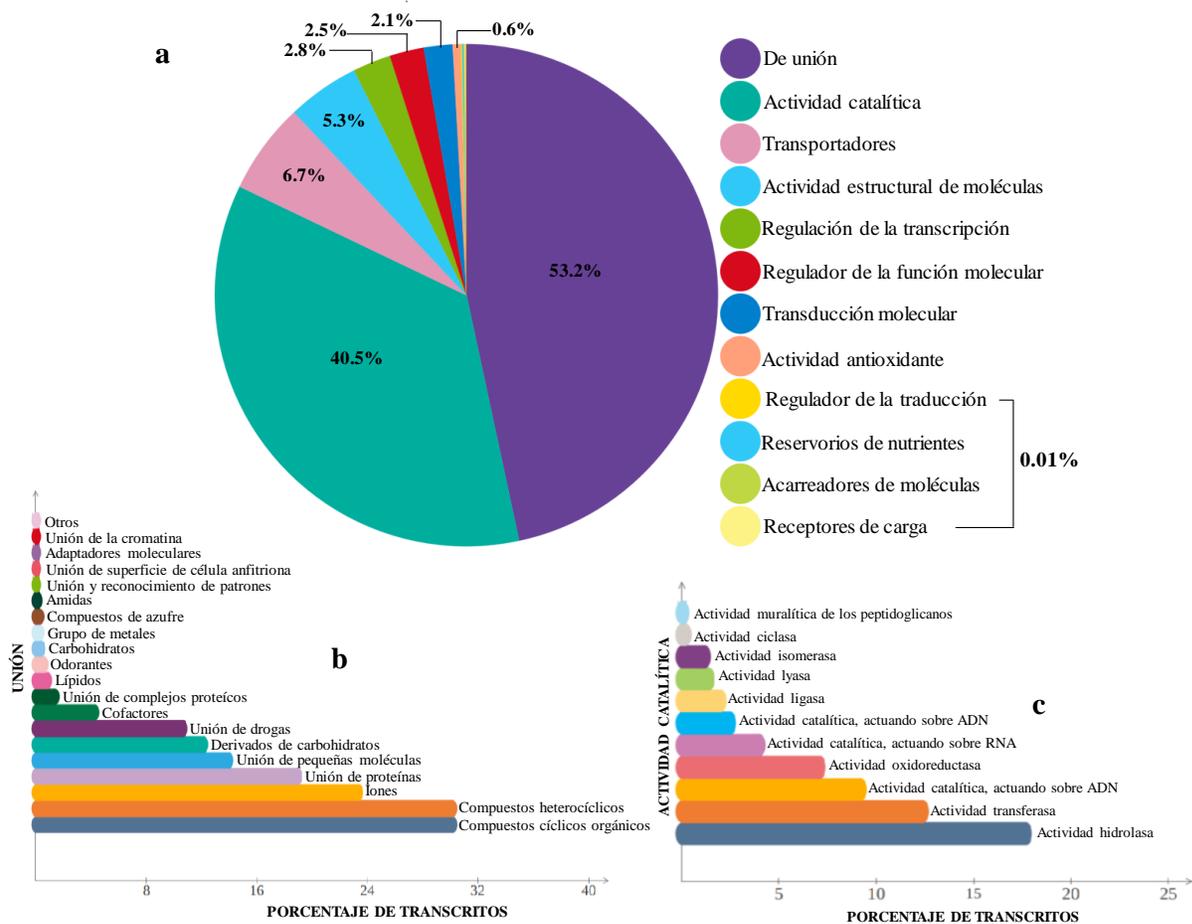


Figura 4. Análisis GO de transcriptoma de cabeza de *D. adjunctus*. Corresponde a 6,200 transcritos clasificados en la categoría de función molecular (a), los cuales se representan en nivel 2 de la categorización GO y de nivel 3 para las subcategorías de unión (b) y actividad catalítica (c). Los grupos clasificados se representan en porcentajes de acuerdo al número total transcritos con asignación GO.

Las categorías de proceso biológico (BP) y componentes celulares (CC) estuvieron representadas con un 34.03% con 27 grupos y 21.03% con 18 grupos respectivamente. Procesos moleculares (41%) y metabólicos (44%) fueron las principales subcategorías representadas de BP (Fig. 5a), mientras que en CC (Fig. 5b) las partes celulares (22%) se encuentran entre las subcategorías con más transcritos anotados.

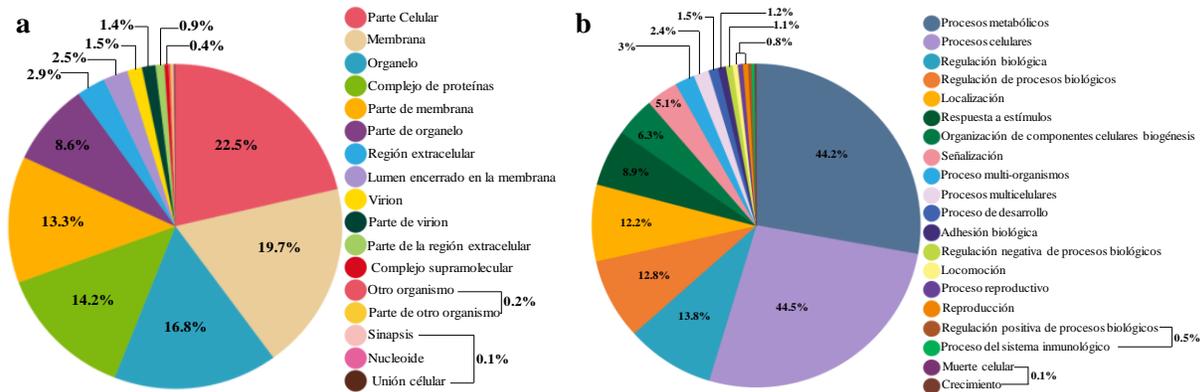


Figura 5. Análisis GO de transcriptoma de cabeza de *D. adjunctus*. Corresponde a 7,683 transcritos clasificados en las categorías de componente celular **(a)** y procesos biológicos **(b)**, los cuales se representan en nivel 2 de la categorización GO. Los grupos clasificados se representan en porcentajes de acuerdo al número total transcritos con asignación GO.

De acuerdo al análisis de homología, del total de transcritos (44,420), 16, 290 fueron mapeados al realizar la búsqueda mediante BlastX contra la base de datos de UniprotKB con un E-value de 10^{-5} . El 57.14% de los transcritos se encontraron entre los de mayor coincidencia con valores de muy alta calidad por debajo de $1.0E^{-45}$ (figura 6a), mientras que el 42.86% tuvieron rangos entre $1.0E^{-45}$ a $1.0E^{-5}$, además, casi el 50% del total de los transcritos tuvieron arriba del 90% de similitud (figura 6b).

Respecto a la distribución de las especies (figura 6c), más de tres cuartas partes de los unigenes coincidieron con especies de Coleoptera y más del 50% tuvieron compatibilidad con los genes de *D. ponderosae* el cual es una especie cercana que pertenece a la misma subfamilia (Scolytinae) de Curculionidae, el 6.46% con *Photinus pyralis* Linnaeus, 1767 y el 5.84% con *T. castaneum*.

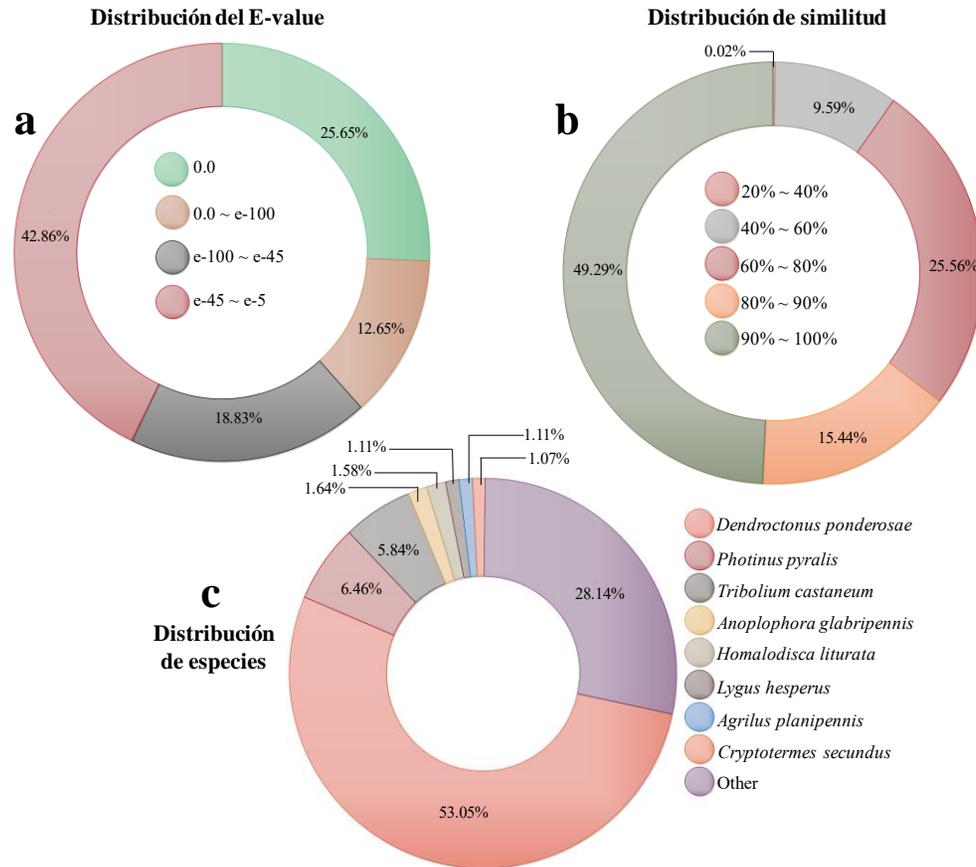


Figura 6. Distribución de los resultados de homología. Porcentaje de transcritos mapeados contra la base de datos uniprotKB. **(a)** Distribución del E-value; **(b)** distribución del porcentaje de similitud; **(c)** distribución de las especies.

6.3. Identificación de los genes no receptores olfativos candidatos.

El análisis del transcriptoma de *D. adjunctus* se enfocó en las familias de genes no receptoras asociados al procesamiento de olores, mediante la búsqueda por homología se identificaron un total de 168 genes con funciones de procesamiento olfativo de los cuales 27 fueron genes codifican OBPs candidatas, 7 CSPs y 2 SNMPs (Cuadro 2).

Cuadro 2. Genes olfativos candidatos del transcriptoma de cabeza de *D. adjunctus*

Genes candidatos	Número total
Proteínas de unión a odorantes	27
Proteínas quimiosensoriales	7
Proteínas de la membrana de la neurona sensorial	2

Genes candidatos	Número total
Receptores de olores	77
Receptores ionotrópicos	31
Receptores gustatorios	20
Receptores ionotrópicos de glutamato	4

6.4. Proteínas de unión a olores (OBPs)

Se identificaron 27 transcritos de OBP candidatas, 22 con un marco de lectura abierto (ORF) completo, una con truncamiento en la región 5' y cuatro en la 3', que codifican proteínas con longitudes entre 110 a 390 residuos, en todas las secuencias se registraron péptidos con señal predicha a excepción de DadjOBP15. Las 27 OBPs tuvieron homólogos con proteínas de olor de coleópteros con identidades >40% a excepción de DadjOBP15 y DadjOBP24, además, 21 secuencias presentaron identidades altas con OBPs de escolítinos de las cuales 19 tuvieron similitudes >80% con *D. ponderosae* (Cuadro 3). Por otra parte, con excepción de DadjOBP3, DadjOBP9 y DadjOBP31, todas las secuencias fueron anotadas funcionalmente mediante la búsqueda de dominios dentro de la superfamilia de feromonas de insectos/proteínas de unión de olores (Cuadro 4).

Cuadro 3. Anotación de Blastx contra la base de datos de UniprotKB para las OBPs candidatas de *D. adjunctus*

Gen	SP	ORF		Mejor resultado (hit) del BlastX				
		bp	C	Nombre	No. Acc.	Especie	E-value	Id (%)
DadjOBP2	1-21	267	Y	OBP2	M4VUV4	<i>D. ponderosae</i>	3.78E-33	93.99
DadjOBP3	1-18	123	N	OBP3	M4VR73	<i>D. ponderosae</i>	5.38E-42	84.41
DadjOBP4	1-18	414	Y	OBP4	N6UHS9	<i>D. ponderosae</i>	2.02E-102	95.27
DadjOBP5	1-25	389	Y	OBP5	M3UZD2	<i>I. typographus</i>	8.16E-40	50.93
DadjOBP6	1-23	141	Y	OBP6	M4VTI4	<i>D. ponderosae</i>	1.39E-85	94.11
DadjOBP8	1-15	128	N	OBP8	M4VRL6	<i>D. ponderosae</i>	6.61E-75	90.59

DadjOBP9	1-19	112	N	OBP9	M4VRM7	<i>D. ponderosae</i>	2.59E-45	89.87
DadjOBP11	1-16	117	Y	OBP11	M4W9C1	<i>D. ponderosae</i>	6.11E-71	91.37
DadjOBP11t	1-22	127	Y	OBP11	D6WZK0	<i>T. castaneum</i>	8.32E-48	64.49
DadjOBP12	1-22	170	Y	OBP12	M3VHC4	<i>I. typographus</i>	3.27E-82	72.32
DadjOBP121	1-15	147	Y	OBP12	A0A0B4K ZC3	<i>L. oryzoophilus</i>	8.24E-36	43.80
DadjOBP13a	1-44	156	Y	OBP13	M4VRL1	<i>D. ponderosae</i>	5.32E-81	86.26
DadjOBP13b	1-19	149	Y	OBP13	J3JVJ5	<i>D. ponderosae</i>	4.16E-52	97.97
DadjOBP15	NO	213	Y	OBP9	A0A0S3J3 B4	<i>C. bowringi</i>	2.33E-26	38.28
DadjOBP16	1-17	118	Y	OBP16	M4W9C3	<i>D. ponderosae</i>	4.79E-70	85.47
DadjOBP18	1-18	142	Y	OBP18	A0A0H3 W579	<i>D. ponderosae</i>	7.12E-80	87.23
DadjOBP21	1-19	136	Y	OBP21	A0A0H3 W5P0	<i>D. ponderosae</i>	2.96E-93	96.29
DadjOBP22	1-19	149	Y	OBP22	M4VRM1	<i>D. ponderosae</i>	1.16E-84	89.55
DadjOBP23	1-17	140	Y	OBP23	A0A2P9J ZF8	<i>A. grandis</i>	2.06E-44	46.71
DadjOBP24	1-15	132	Y	OBP3	A0A1C8K 2C2	<i>R. ferrugineus</i>	3.22E-17	34.37
DadjOBP27	1-21	131	Y	OBP27	M4VTJ4	<i>D. ponderosae</i>	4.11E-78	87.40
DadjOBP30	1-18	134	Y	OBP30	M4W9B7	<i>D. ponderosae</i>	1.36E-90	97.74
DadjOBP31	1-22	127	Y	OBP11	D6WZK0	<i>T. castaneum</i>	8.32E-48	64.48
DadjOBPJ74	1-18	124	N	OBP	I1VJ74	<i>D. ponderosae</i>	9.83E-75	93.86
DadjOBPJ75	1-19	136	Y	OBP	I1VJ75	<i>D. ponderosae</i>	6.27E-96	97.77
DadjOBPJ79	1-21	146	Y	OBP	I1VJ79	<i>D. ponderosae</i>	1.29E-98	92.41
DadjOBPJ77	1-19	138	N	OBP	I1VJ77	<i>D. ponderosae</i>	2.37E-93	94.16

SP: Péptido señal, ORF-C: Marco de lectura abierto completo, No. Acc.: Número de acceso. Especie: *Dendroctonus ponderosae*, *Ips typographus*, *Tribolium castaneum*, *Lissorhoptrus oryzoophilus* Kuschel, *Colaphellus bowringii*, *Anthonomus grandis* Boheman, *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier.

Cuadro 4. Anotación funcional de las DadjOBPs mediante la búsqueda de dominios en las bases de datos PFAM, SUPERFAMILY T CATH-Gene3D

OBP	InterPro					
	IPR006170		IPR036728			
	PFAM (PF01395)		SUPERFAMILY (SSF47565)		CATH-Gene 3D (G3DSA:1.10.238.20)	
	Rango	E-value	Rango	Evalue	Rango	E-value
DadjOBP2	N	N	123-219	8.72E-7	N	N
DadjOBP4	18-127	2.0E-19	21-127	1.12E-21	21-128	7.7E-21
DadjOBP5	N	N	297-383	1.83E-7	288-385	2.4E-8
DadjOBP6	28-131	1.6E-15	27-139	5.76E-22	24-140	5.8E-23
DadjOBP8	18-123	5.8E-16	26-113	7.85E-18	10-121	1.4E-18
DadjOBP11	32-100	6.3E-6	24-100	4.58E-10	2-107	6.8E-10
DadjOBP12	35-164	5.6E-9	80-165	3.14E-10	29-172	1.6E-10
DadjOBPL12	20-134	1.7E-14	26-140	4.19E-21	18-144	6.0E-23
DadjOBP13I	43-149	2.9E-8	46-150	8.37E-13	42-155	2.8E-12
DadjOBP13II	18-127	2.0E-19	21-127	1.15E-21	21-128	7.7E-21
DadjOBP15	97-201	3.8E-11	79-208	1.96E-14	86-202	8.4E-18
DadjOBP16	24-101	2.1E-7	21-110	1.31E-11	19-117	1.6E-9
DadjOBP18	34-138	1.9E-16	35-138	2.88E-22	33-139	2.7E-20
DadjOBP21	23-129	2.4E-8	28-129	4.58E-14	23-130	1.2E-12
DadjOBP22	23-129	2.4E-8	28-129	4.58E-14	23-130	1.2E-12
DadjOBP23	20-126	2.8E-18	25-127	3.01E-25	22-127	3.9E-22
DadjOBP24	21-125	1.9E-15	23-127	8.63E-20	24-127	3.6E-19
DadjOBP27	N	N	26-118	1.01E-5	23-122	1.5E-8
DadjOBP30	18-127	2.0E-19	21-127	1.15E-21	21-128	7.7E-21
DadjOBPJ74	19-109	2.0E-12	19-112	4.97E-15	18-117	4.5E-17
DadjOBPJ75	22-127	8.0E-22	21-134	5.49E-31	17-134	5.4E-31
DadjOBPJ77	25-128	1.5E-15	24-136	5.36E-22	22-137	3.8E-23
DadjOBPJ79	26-135	1.5E-16	28-144	1.07E-18	25-145	2.1E-22

PFAM (PF01395): familia PBP/GOBP; SUPERFAMILY (SSF47565) y CATH-Gene 3D (G3DSA:1.10.238.20): feromonas de insectos/proteínas de unión de olores

EL alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de DadjOBPs con proteínas ortólogas de especies de Coleoptera permitió clasificar las proteínas en tres subclases de las cuales 15 DadjOBPs se agruparon en clásicas (Fig. 7) con el patrón general reportado para Coleoptera, 10 en minus-C con ausencia de la cisteína C2/C5 (Fig. 8a) y todas comparten el mismo patrón de cisteínas con excepción de DadjOBP11 la cual tiene 10 residuos entre la C2-C3 y DadjOBP4 que posee cisteínas adicionales en la región C-terminal. Por último, la proteína DadjOBP2 se clasificó como plus-C (Fig. 8b), presenta un patrón similar al de las clásicas, pero con siete cisteínas adicionales y una prolina conservada en la C-terminal.

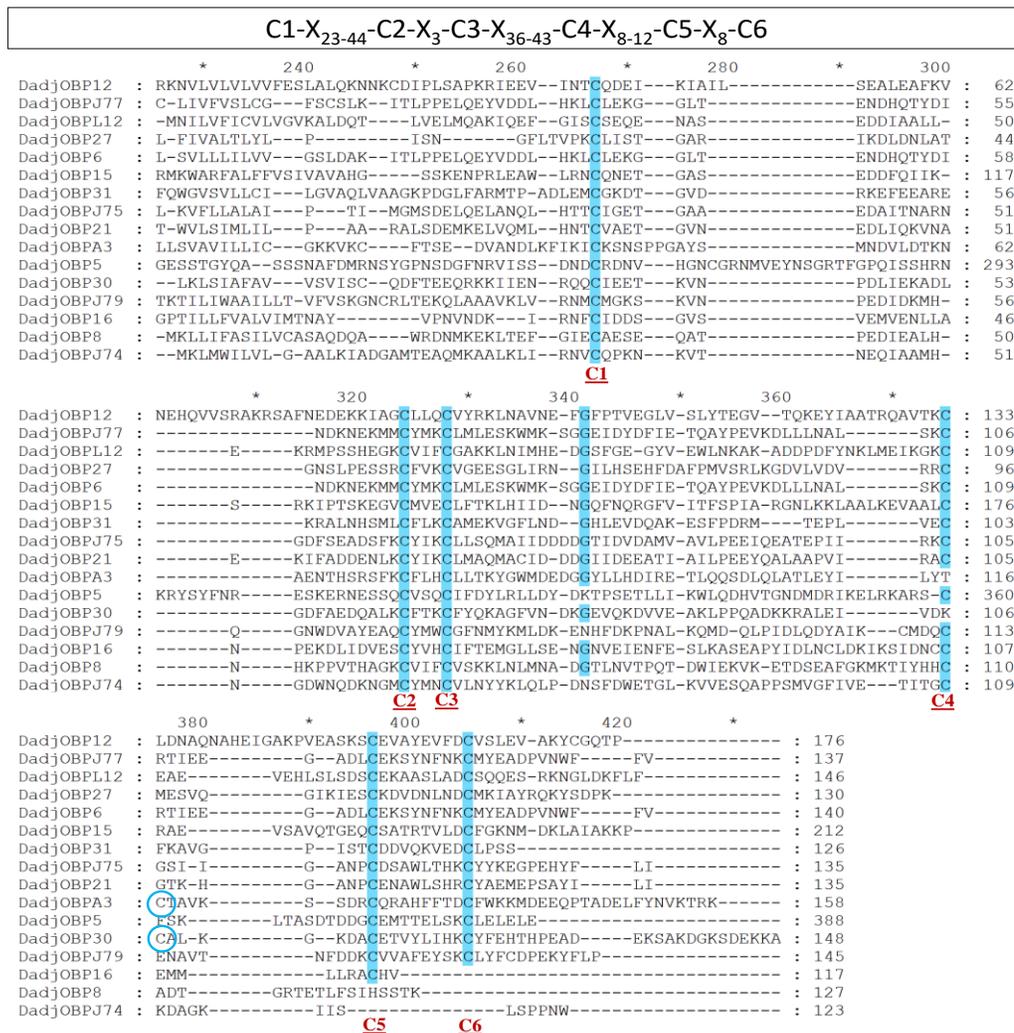


Figura 7. Alineación de secuencias de las OBP clásicas de *D. adjunctus*, las secuencias de aminoácidos fueron alineadas por Clustal Omega y editadas con Genodoc. Las marcas azules muestran residuos conservados >90%.

patrones se registró entre el 13-7% del total de las secuencias y poseen motivos adicionales (6, 8, 7 y 4) ubicados en las mismas posiciones a lo largo de las secuencias.

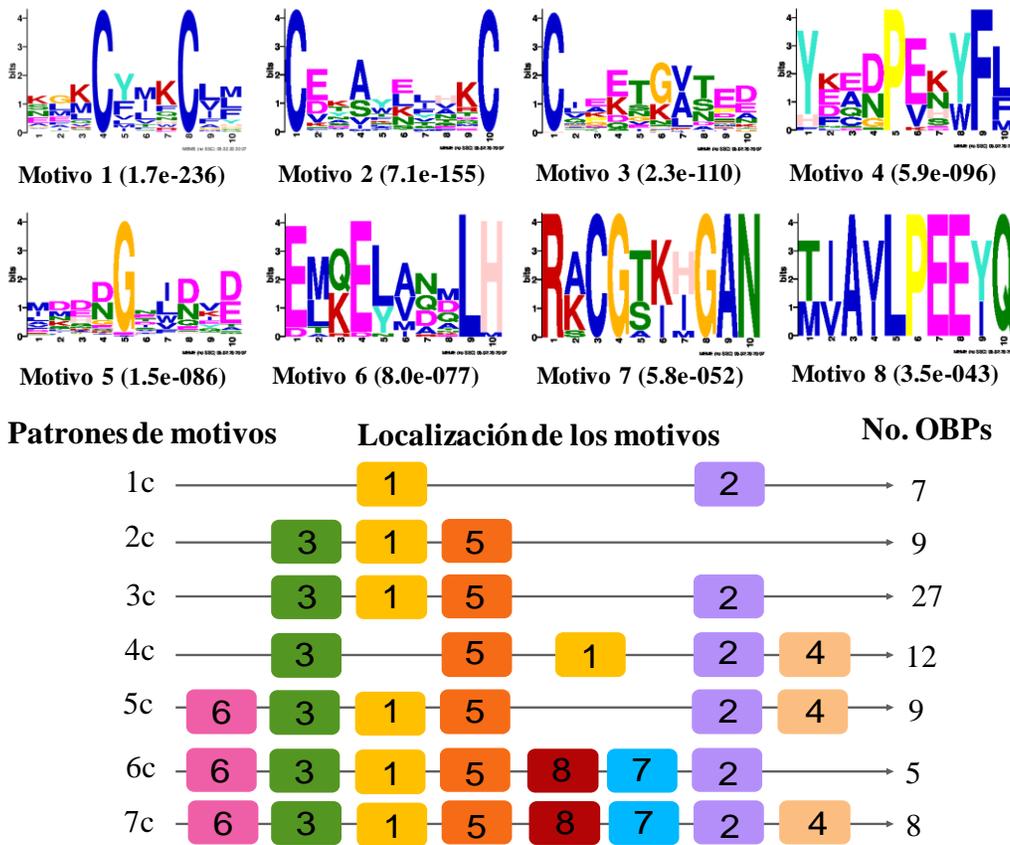


Figura 9. Análisis de motivos de OBPs clásicas de *D. adjunctus* y ortólogos. Los parámetros utilizados para el descubrimiento de los motivos fueron nmotif=10, minw=6 y maxw=10. Los números de los recuadros corresponden a los motivos que se muestran en la parte superior de la figura, el tamaño de los residuos está directamente asociado con la frecuencia de estos en el alineamiento y los valores de E-value más pequeños significan una alta conservación.

Para la subclase minus-C se analizaron un total de 55 proteínas, de estas se obtuvieron ocho motivos representados en siete patrones de motivos diferentes (Fig. 10), de los cuales el 3, 1 y 2 se registraron en el 100% de las OBPs, mientras que el 6 en el 90.2%. Estas proteínas se caracterizan por tener 4 cys conservadas, en ese sentido, los motivos 3 y 2 corresponden a las C2-C4, los motivos 5 y 4 aunque no se encuentran representadas en todas las secuencias poseen dos cys con posiciones invariables que corresponden a la C1-C3 del patrón general, mientras que el motivo 2 presenta dos posiciones con lisinas(K) conservadas que se encuentran en todas las OBPs. El patrón de motivos más frecuente fue el 5m y 6m con el 46% de secuencias, solo

estos dos patrones contienen los motivos 5-3-1-4-2 que incluyen las características principales de esta subfamilia.

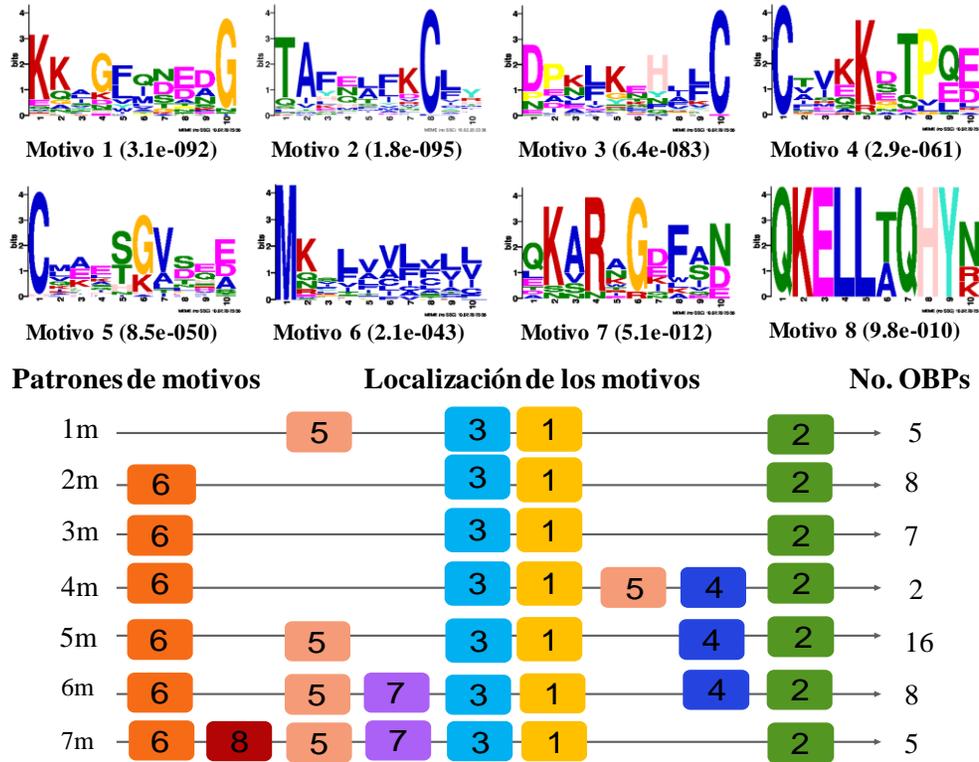


Figura 10. Análisis de motivos de las OBPs minus-C de *D. adjunctus* y ortólogos. Los parámetros utilizados para el descubrimiento de los motivos fueron nmotif=10, minw=6 y maxw=10. Los números de los recuadros corresponden a los motivos que se muestran en la parte superior de la figura, el tamaño de los residuos está directamente asociado con la frecuencia de estos en el alineamiento y los valores de E-value más pequeños significan una alta conservación.

Por último, la subclase plus-C estuvo representada por cuatro secuencias con 8 motivos secuenciales (Fig. 11), de los cuales solo DadjOBP2 y DponOBP2(2) tuvieron patrones (1p) en donde se representan todos los motivos, mientras que la proteína ItypOBP2 no cuenta con los motivos 8 y 7. Cabe mencionar que estas características solo se encontraron en especies de descortezadores y la frecuencia de los residuos en cada una de las diez posiciones de los motivos permanecieron en su mayoría sin variación, lo cual nos indica un grupo de proteínas muy conservado.

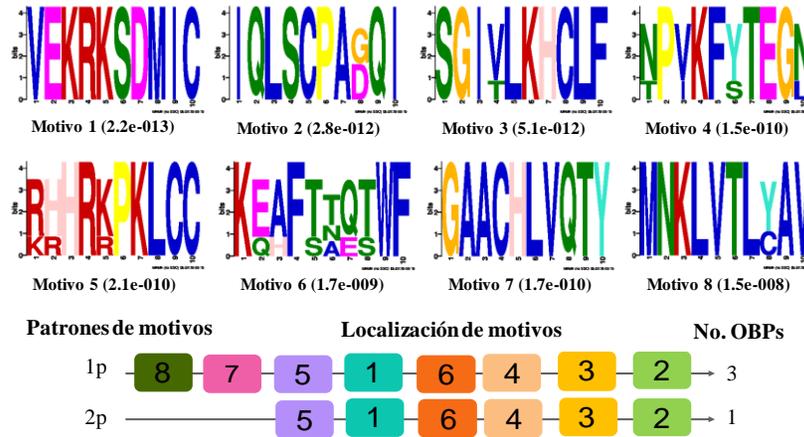


Figura 11. Análisis de motivos de las OBPs plus-C de *D. adjunctus* y ortólogos. Los parámetros utilizados para el descubrimiento de los motivos fueron nmotif=10, minw=6 y maxw=10. Los números de los recuadros corresponden a los motivos que se muestran en la parte superior de la figura, el tamaño de los residuos está directamente asociado con la frecuencia de estos en el alineamiento y los valores de E-value más pequeños significan una alta conservación.

Con el objetivo de comprender la relación evolutiva de las OBPs de *D. adjunctus* con las OBPs de otros descortezadores y *T. castaneum* (Anexo 3) se construyó un árbol filogenético mediante inferencia Bayesiana y se incluyeron los patrones de motivos obtenidos con MEME. El dendograma (Fig. 12) tiene soportes con probabilidades superiores al 70%, en su mayoría del 100%, y se observa la división de las tres subclases de proteínas, las DadjOBPs se encuentran dispersas en varios clados formando pequeños clusters con OBPs de descortezadores principalmente de *D. ponderosae* a excepción de DadjOBP15, DadjOBPT11 y DadjOBP23, las cuales se agrupan con OBPs de *T. castaneum*.

Al comparar los resultados de MEME con la filogenia observamos que existe una relación en la topología del árbol y los patrones de motivos, las proteínas con el patrón (3c) que contiene los motivos presentes en todas las OBPs clásicas se encuentran dispersas en todas las ramas de esta subclase junto con patrones 2c (DadjOBP16, DadjOBP15 y DadjOBPT11) los cuales en comparación con los 3c carecen del motivo 2. Las OBPs con patrones 6c y 7c (Fig. 9) en donde solo se representa los motivos 6, 8, 7 y 4 (DadjOBP21 y DadjOBPJ75) se encuentran separadas en dos subgrupos dentro del mismo clado relacionado con proteínas de patrón 5c (DadjOBPJ77 y DadjOBP6) que comparten los motivos 6 y 4, pese a que las secuencias con patrón 4c (DadjOBPJ74 y DadjOBPJ79) contiene el motivo 4, se encuentran en un clado distinto dividido

en dos subgrupos. Además, OBPs con patrón 1c (DadjOBP5) el cual solo contiene tres motivos de los ocho descritos (figura 3a) se encuentran en un clado lejano agrupado con proteínas de tipo Plus-C que incluyen a DadjOBP2 la cual comparte los mismos patrones de motivos con DponOBP2 y una identidad de aminoácidos >90% (Fig. 11).

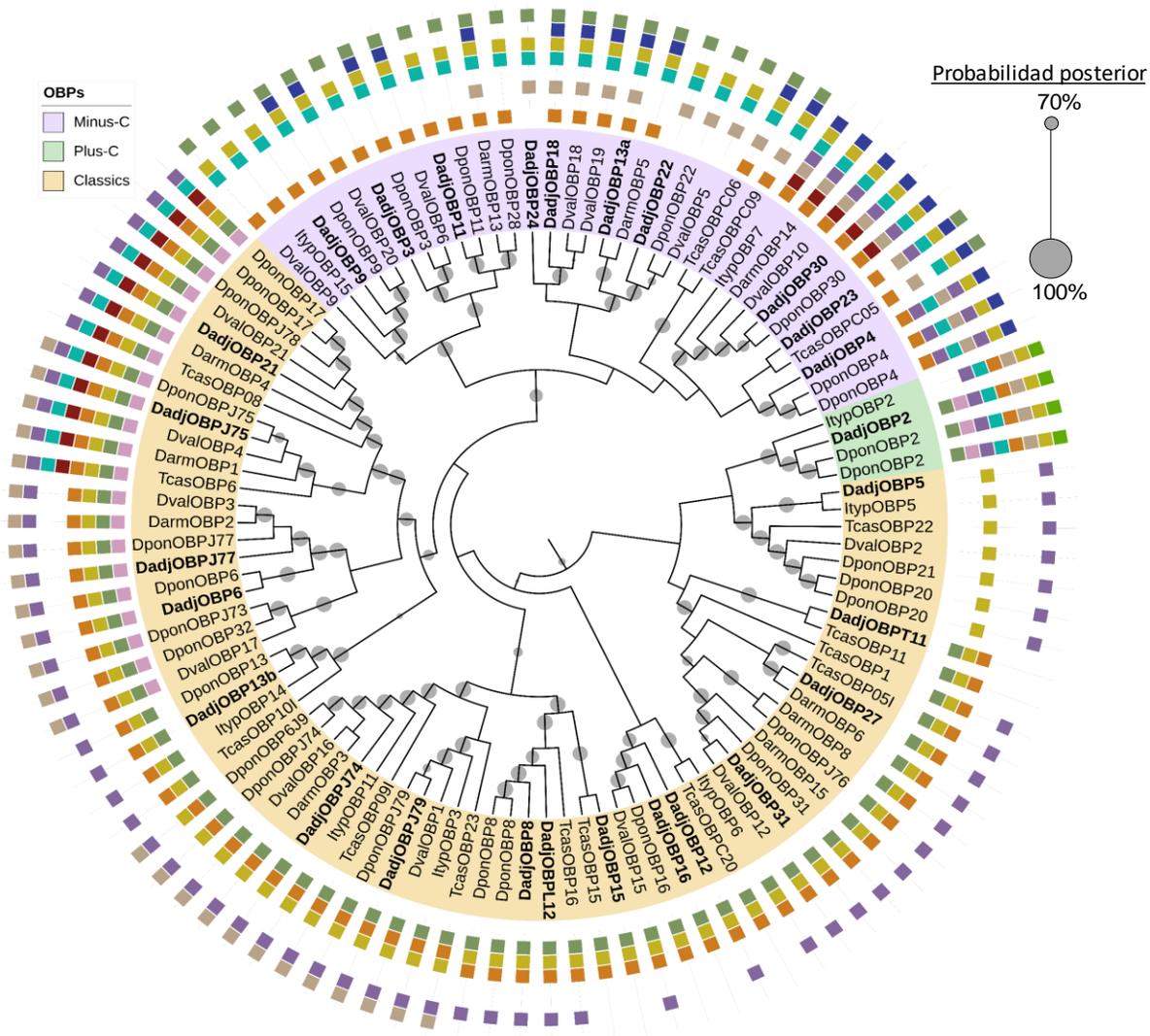


Figura 12. Árbol filogenético del análisis BEAST de las proteínas candidatas de unión a olores (OBPs). Análisis bayesiano de OBPs putativas de *Dendroctonus adjunctus* (Dadj, en negritas), *D. ponderosae* (Dpon), *D. valens* (Dval), *D. armandi* (Darm), *Ips typographus* (Ityp) y *T. castaneum* (Tcas). El árbol fue editado en iTOL, las clases de OBP se muestran en colores, clásico (amarillo), menos-C (verde) y más-C (púrpura). Sólo se muestran los valores de probabilidad posteriores por encima del 70% y para cada OBP se incluyeron los patrones de los motivos ($p < 0,0001$) obtenidos del análisis en MEME.

Los miembros de la clase Minus-C se agrupan en un solo clado relacionado a las OBPs clásicas (Fig. 12) y pese a tener variación en la presencia o ausencia de motivos 5 y 4, todas las proteínas tienen conservados en las mismas posiciones los patrones 6-3-1-2 (Fig. 10). Los motivos 7 y 8 representados en patrones 6m (DadjOBP30) y 5m (DadjOBP23) se encuentran divididos en dos subgrupos dentro del mismo clado relacionadas a proteínas con patrón 7m, grupo que posee un cambio en la distribución y orden de motivos, las proteínas con este patrón (DadjOBP4/DponOBP4) tienen las características de tipo minus-C, pero poseen ocho Cys adicionales conservadas en la C-terminal y una longitud mayor por lo que podrían pertenecer a una clase atípica.

6.5. Proteínas quimiosensoriales (CSPs)

Se identificaron 7 transcritos CSPs candidatas en *D. adjunctus* con ORFs completos que codifican proteínas de longitudes entre 116-296 residuos. Todas las CSPs tuvieron homólogos con proteínas quimiosensoriales de *D. ponderosae* con identidades >80% (Cuadro 5) y todas las secuencias de DadjCSPs fueron anotadas funcionalmente mediante la búsqueda de dominios dentro de la superfamilia de proteínas quimiosensoriales y de unión a olores de insectos A10/Proteína específica del bulbo de eyaculación 3 (Cuadro 6).

Cuadro 5. Anotación de Blastx contra la base de datos de UniprotKB para las CSPs candidatas de *D. adjunctus*

Gen	ORF			Mejor resultado (hit) del BlastX				
	SP	pb	C	Nom.	No. Acc.	Especie	E-value	Id (%)
DadjCSP1	1-16	121	Y	CSP1	A0A0H3W576	<i>D. ponderosae</i>	7.90e-44	80.38
DadjCSP2	1-18	122	Y	CSP2	M4VTH9	<i>D. ponderosae</i>	3.62e-78	90.90
DadjCSP3	1-19	138	Y	CSP3	I1VJ19	<i>D. ponderosae</i>	7.85E-91	91.97
DadjCSP4	NO	296	Y	CSP4	A0A0H3W5L5	<i>D. ponderosae</i>	2.66e-146	81.34
DadjCSP6	NO	154	Y	CSP6	M4VTH1	<i>D. ponderosae</i>	9.11E-88	91.54
DadjCSP8	NO	150	Y	CSP8	M4VR62	<i>D. ponderosae</i>	6.80e-86	95.28
DadjCSP9	1-25	116	Y	CSP9	A0A345BT19	<i>D. ponderosae</i>	4.20E-68	94.78

SP: Péptido señal, ORF-C: Marco de lectura abierto completo, No. Acc.: Número de acceso, Especie: *Dendroctonus ponderosae*.

Cuadro 6. Anotación funcional de las DadjCSPs mediante la búsqueda de dominios en las bases de datos PFAM, SUPERFAMILY T CATH-Gene3D

InterPro						
IPR005055			IPR036682			
GCH	PFAM (PF03392)		SUPERFAMILY (SSF100910)		CATH-Gene 3D (G3DSA:1.10.2080.10)	
CSP	Rango	E-value	Rango	Evalue	Rango	E-value
DadjCSP1	19-110	1.9E-37	19-122	1.7E-41	16-124	5.3E-44
DadjCSP2	21-111	6.1E-35	21-120	1.96E-38	19-121	7.4E-39
DadjCSP3	27-118	1.8E-36	27-126	6.15E-40	24-130	3.5E-46
DadjCSP4	56-146	5.2E-29	56-156	6.67E-34	53-158	1.6E-33
DadjCSP6	48-138	2.3E-34	48-151	1.31E-38	45-153	1.7E-41
DadjCSP8	44-136	2.5E-37	44-148	4.18E-40	42-149	3.7E-44
DadjCSP9	38-113	1.3E-15	37-113	3.79E-22	34-115	6.5E-19

PFAM (PF03392) y CATH-Gene 3D (G3DSA:1.10.2080.10): Proteína de unión a olores de insectos A10/Proteína específica del bulbo de eyaculación 3; SUPERFAMILY (SSF100910): Proteínas quimiosensoriales

A partir del multialineamiento de DadjCSP con proteínas ortólogas de otros escarabajos observamos las principales características de esta familia, cuatro cisteínas conservadas (Fig. 13) en todas las secuencias con un patrón general C1-X₆-C2-X₁₈-C3-X₂-C4.

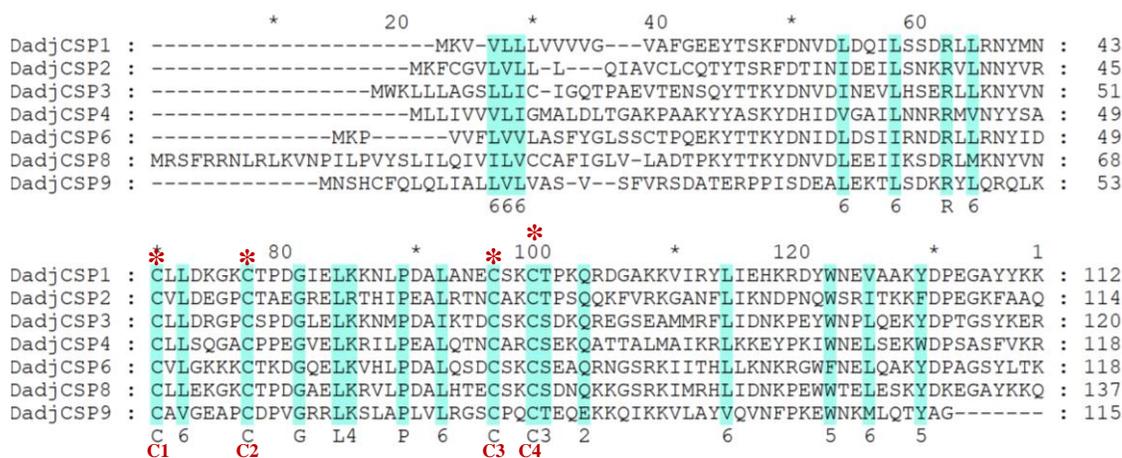


Figura 13. Alineación de las secuencias de CSPs de *D. adjunctus*, las secuencias de aminoácidos se alinearon con Clustal Omega y se editaron con Genodoc. Las marcas verdes muestran residuos conservados al 100%.

Las secuencias del multialineamiento anterior se utilizaron para el análisis de motivos secuenciales, a partir de 55 CSPs se registraron un total de 8 motivos (Fig. 14) de los cuales el 1, 5 y 2 estuvieron presentes en todas las secuencias, los motivos 1 y 2 corresponden a las regiones características de las CSPs encargadas de formar dos enlaces disulfuro (C1-X₆-C2 y C3-X₂-C4), mientras que el 5 se encuentra en la región entre las Cys dos y tres con residuos con altas frecuencias de características ácidas, alifáticas y básicas. El total de secuencias se agrupó en cinco patrones de motivos (Fig. 14), el 5 está representado por el 65% de proteínas y posee los ocho motivos descritos en un patrón 4-6-1-5-2-7-3-8, además de tener las regiones características de esta familia, los residuos en la mayoría de los motivos se encuentran en las mismas posiciones altamente conservados en todas las proteínas.

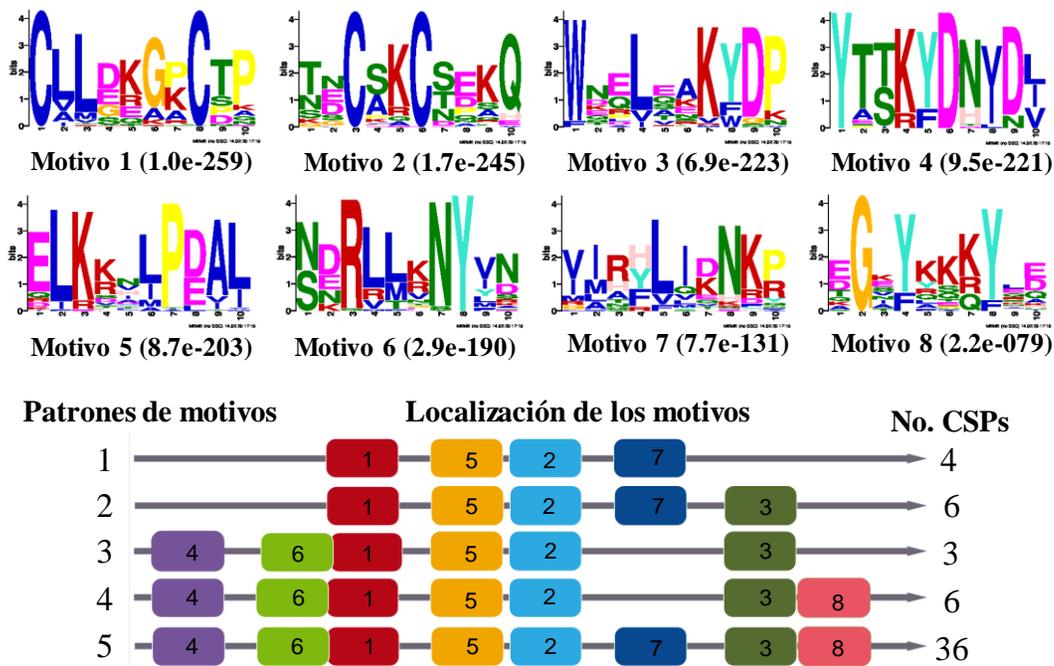


Figura 14. Motivos de las CSPs de *D. adjunctus* y ortólogos. Los parámetros utilizados para el descubrimiento de los motivos fueron nmotif=10, minw=6 y maxw=10. Los números de los recuadros corresponden a los motivos que se muestran en la parte superior de la figura, el tamaño de los residuos está directamente asociado con la frecuencia de estos en el alineamiento y los valores de E-value más pequeños significan una alta conservación.

Se realizó una filogenia para las CSPs candidatas de *D. adjunctus* con 48 proteínas de cuatro especies de descortezadores y *T. castaneum* (Anexo 3) y en la construcción del árbol se

adicionaron los resultados obtenidos a partir del análisis de motivos. Las CSPs se dispersaron en diferentes ramas del árbol en pequeños clusters con proteínas de descortezadores (Fig. 15), todas las CSPs de *D. adjunctus* se relacionaron estrechamente con secuencias de *D. ponderosae* con probabilidades posteriores del 100%. La comparación de los motivos de las diferentes CSPs con la topología del árbol filogenético muestra a los patrones 3, 4 y 5 distribuidos en las ramas dentro del mismo clado, aunque en su mayoría poseen los ocho motivos descritos, los patrones 3 y 4 que tienen variación en la presencia del motivo 7 y 8 se encuentran dentro de un mismo subclado. Por otro lado, las proteínas con patrón 1 y 2 solo tienen la presencia de cinco motivos con variación en el 3 y se encuentran en un clado externo agrupas en dos clusters.

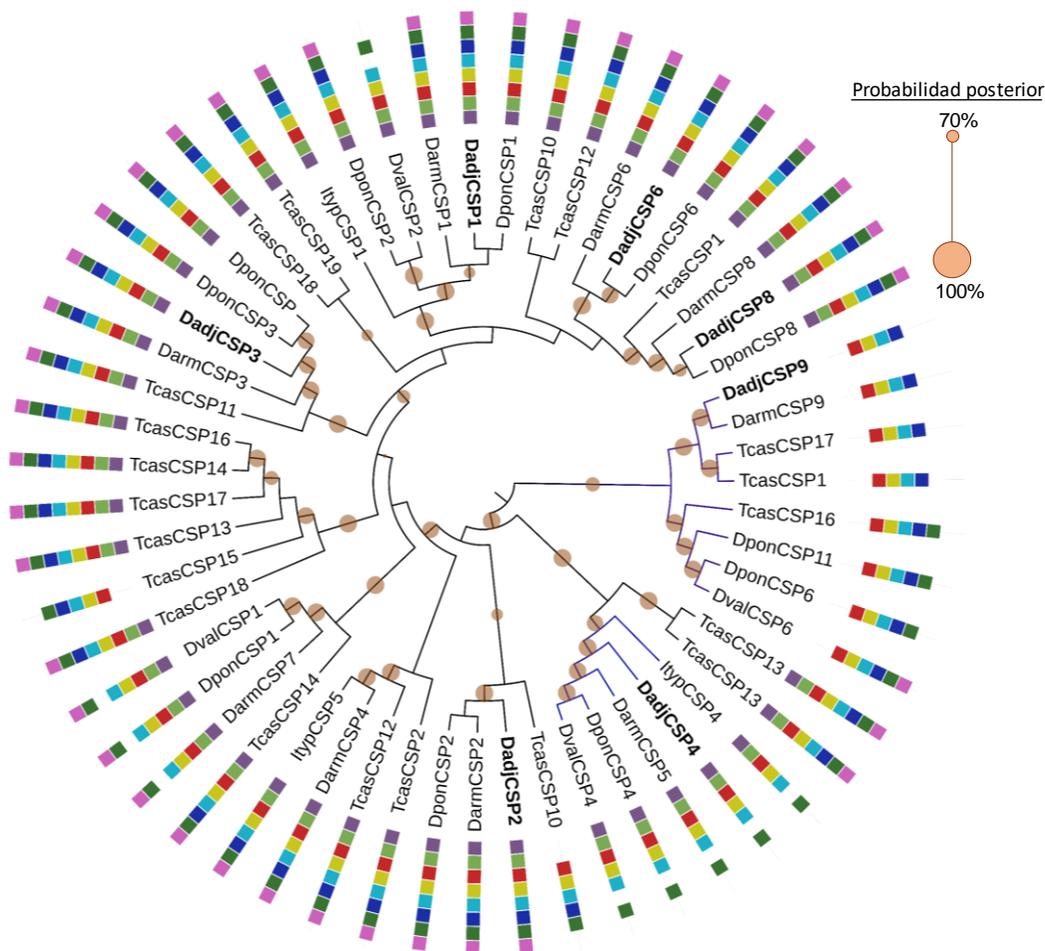


Figura 15. Árbol filogenético del análisis BEAST de las proteínas quimiosensoriales (CSPs). Análisis bayesiano de CSPs putativas de *Dendroctonus adjunctus* (Dadj, en negritas), *D. ponderosae* (Dpon), *D. valens* (Dval), *D. armandi* (Darm), *I. typographus* (Ityp) y *T. castaneum* (Tcas). El árbol fue editado en iTOL, sólo se muestran los valores de probabilidad posteriores

por encima del 70% y para cada CSP se incluyeron los patrones de los motivos ($p < 0,0001$) obtenidos del análisis en MEME.

6.6. Proteínas de la membrana de neurona sensorial (SNMPs)

Se encontraron dos transcritos que codifican para SNMPs los cuales tuvieron homólogos con SNMP1a y SNMP de *D. ponderosae* con E-value igual a 0 e identidades $>90\%$ (Cuadro 7). Ambas secuencias de DadjSNMPs fueron anotadas funcionalmente mediante la búsqueda de dominios dentro de la superfamilia CD36 (Cuadro 8).

Cuadro 7. Anotación de Blastx contra la base de datos de UniprotKB para las SNMPs candidatas de *D. adjunctus*

Gen	ORF		Mejor resultado (hit) del BlastX				
	pb	C	Nombre	No. Acc.	Especie	E-value	Identidad (%)
DadjSNMP1	520	Y	SNMP1a	M4W9B3	<i>D. ponderosae</i>	0.00E+00	85.336
DadjSNMP1	543	Y	SNMP	I1VJ82	<i>D. ponderosae</i>	0.00E+00	94.702

SP: Péptido señal, ORF-C: Marco de lectura abierto completo, No. Acc.: Número de acceso, Especie: *Dendroctonus ponderosae*.

Cuadro 8. Anotación funcional de las DadjSNMPs mediante la búsqueda de dominios en las bases de datos PFAM, SUPERFAMILY T CATH-Gene3D

IPR002159				
SNMP	PFAM (PF01130)		PANTHER (PTHR11923)	
	Range	E-value	Range	E-value
DadjSNMP1a	11-472	1.6E-116	1-507	1.0E-191
DadjSNMP1b	18-482	9.3E-119	12-498	7.5E-191

PFAM (PF01130): Superfamilia CD36; PANTHER (PTHR11923): Receptor scavenger clase B tipo-1 SR-B1

Como resultado del análisis de la topología de las SNMP en THMM, se predijeron para DadjSNMP1a y DadjSNMP1b (Fig. 16) dos hélices transmembranales en las regiones N y C terminal con un loop extracelular largo, las dos regiones transmembrana de DadjSNMP1a se ubicaron en los residuos 7-26 y 452-474 con loops de 424aa, mientras que para DadjSNMP1b en los residuos 13-32 y 463-482 con loops 429 aa.

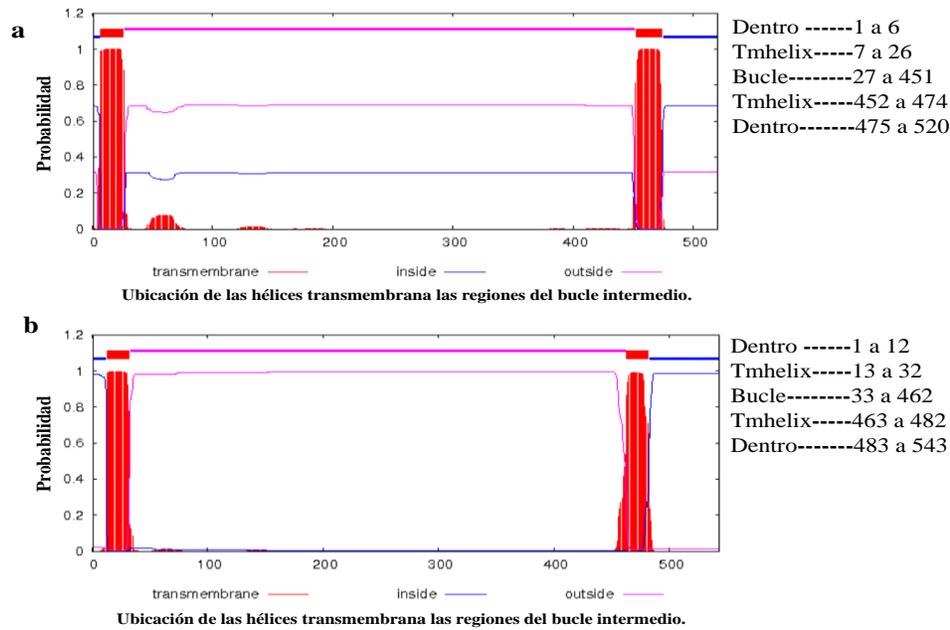


Figura 16. Probabilidades posteriores de la ubicación y coordenadas de las hélices transmembrana y regiones de bucle de la proteína **(a)** DadjSMP1a y **(b)** DadjSNMP1b.

A partir del análisis en MEME se obtuvieron cuatro motivos presentes en el 100% de las SNMPs de las diferentes especies distribuidos en un patrón 2-4-3-1 (Fig. 17), al realizar su anotación dentro del multialineamiento (Fig. 18) observamos que corresponden a cuatro regiones conservadas dentro del loop extracelular con residuos conservados en más del 80%. Los motivos 2, 4 y 3 engloban a los dos dominios reportados en diversos estudios que poseen una conservación de secuencia relativamente alta en la región del ectodominio, el motivo 1 se ubicó cerca de la C-terminal y se observaron siete residuos de cisteína conservados.

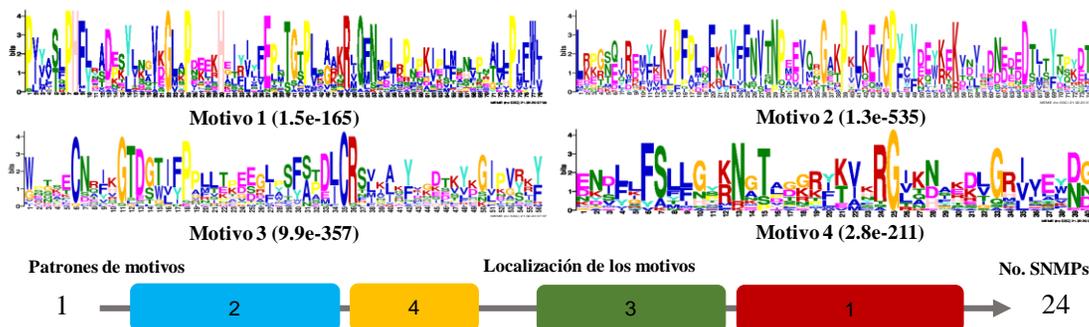


Figura 17. Análisis de motivos de las SNMPs candidatas de *D. adjunctus* y sus ortólogos. Los parámetros utilizados para el descubrimiento de los motivos fueron $n_{motif}=10$, $minw=45$ y $maxw=95$. Los números de los recuadros corresponden a los motivos que se muestran en la

parte superior de la figura, el tamaño de los residuos está directamente asociado con la frecuencia de estos en el alineamiento y los valores de E-value más pequeños significan una alta conservación.

El multialineamiento y la comparación de las proteínas permitió observar mejor el nivel de conservación en la composición y orden de los residuos entre los miembros de SNMP1 y SNMP2. Finalmente, la topología del dendograma (Fig. 19) de estas dos subfamilias sugiere la división en dos subclados, las SNMPs de *D. adjunctus* se agruparon en el subclado de SNMP1 relacionadas con proteínas de *D. ponderosae* con probabilidades del 100%.

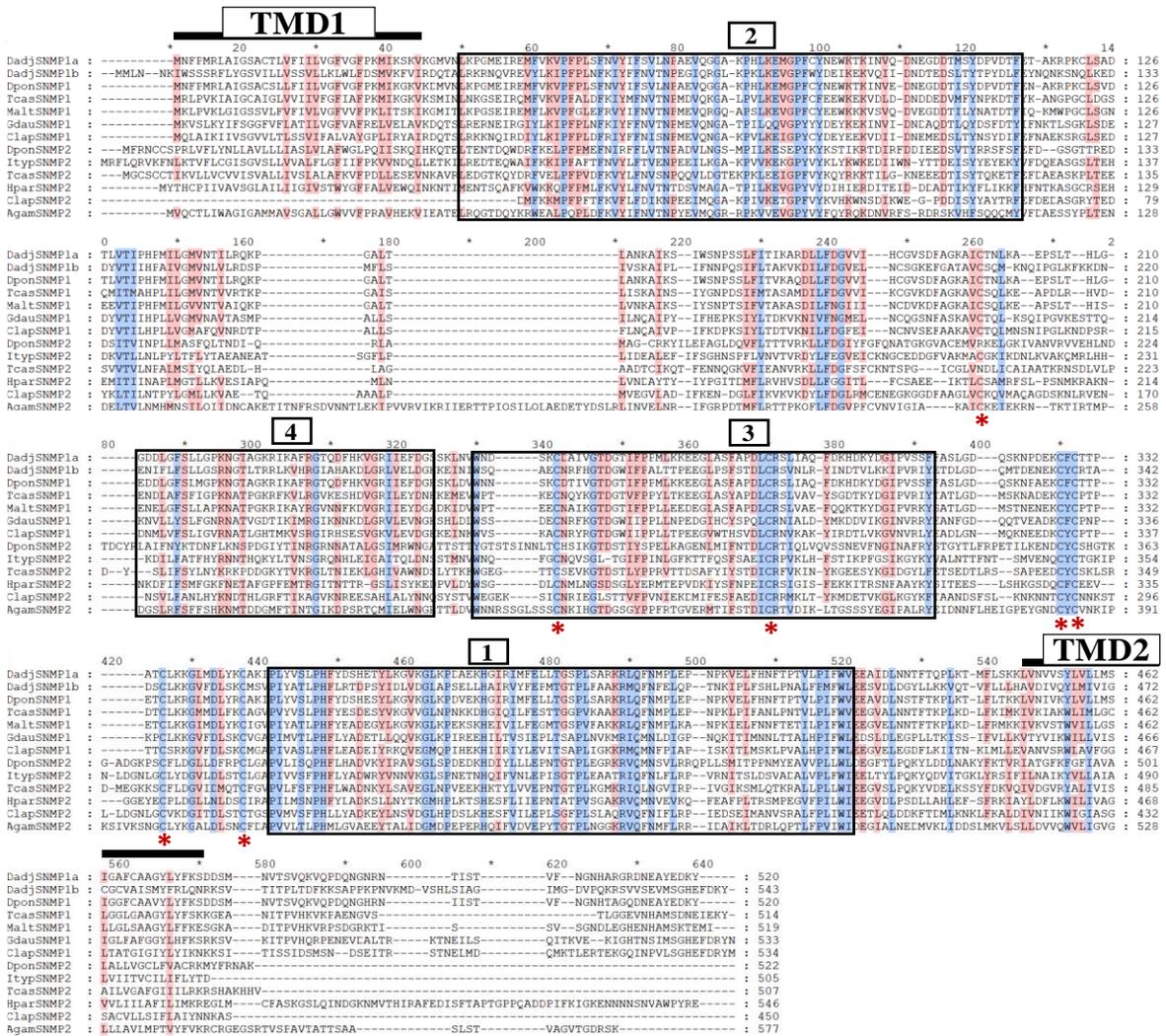


Figura 18. Alineación de DadjSNMP1a y DadjSNMP1b con SNMPs de otras especies de insectos. Los residuos con más del 80% de similitud se muestran en rosa y los idénticos (100%) en azul. Los asteriscos indican los residuos de cisteína conservados, las áreas en el cuadro debajo

del número 1-4 indican los cuatro motivos obtenidos del análisis MEME, y TMD1/TMD2 muestra el dominio transmembrana predicho en TMHMM v3.0.

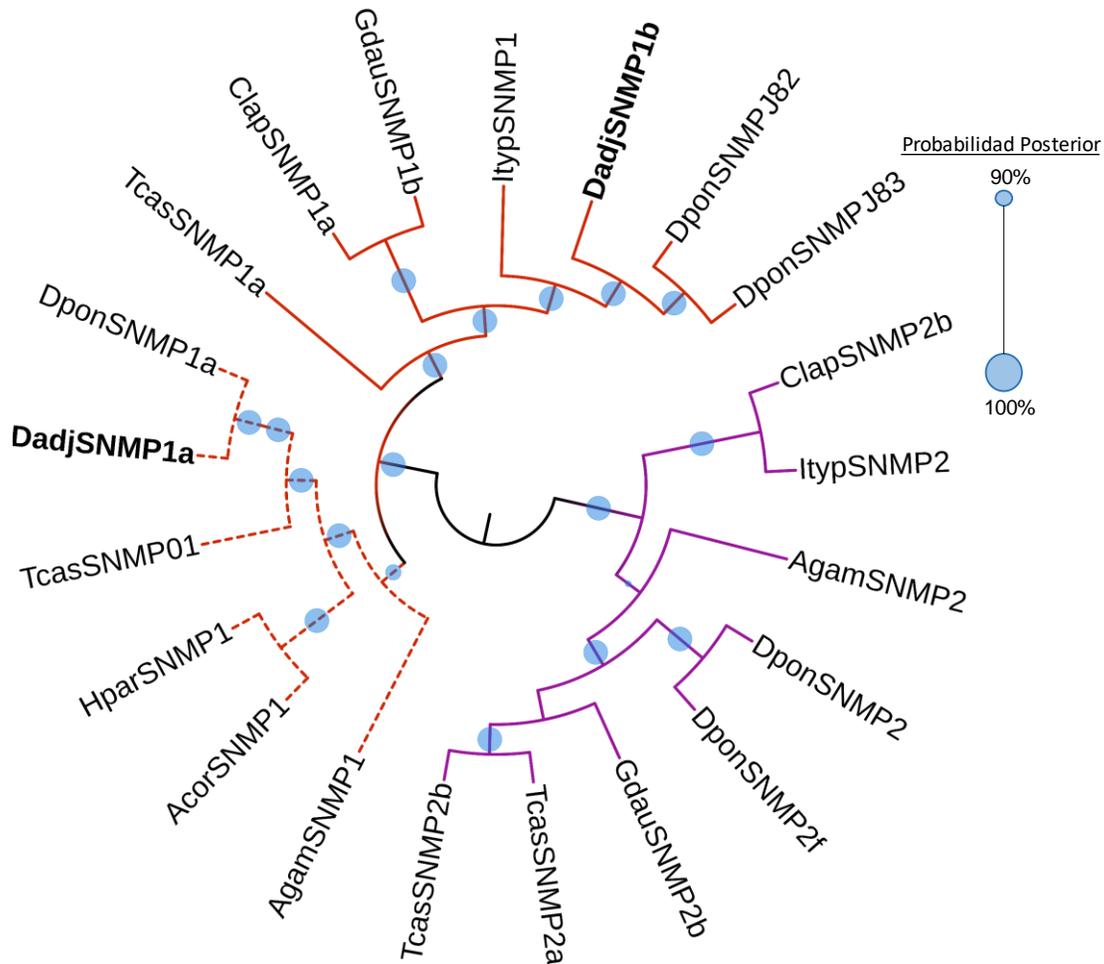


Figura 19. Árbol filogenético del análisis BEAST de las proteínas membranales de neurona sensorial (SNMPs). Análisis bayesiano de SNMPs putativas de *Dendroctonus adjunctus* (Dadj, en negritas), *D. ponderosae* (Dpon), *I. typographus* (Ityp), *T. castaneum* (Tcas), *C. lapponica* (Clap), *G. daurica* (Gdau), *A. corpulenta* (Acor), *H. parallela* (Hpar) y *A. gambiae* (Agam), el árbol se editó en iTOL y se muestran los valores de probabilidad posterior superiores al 90%.

6.7. Modelaje de la estructura tridimensional de las proteínas no receptoras

Se realizó la predicción de la estructura tridimensional de seis proteínas no receptoras. En el caso de OBPs, se seleccionaron las proteínas DadjOBP21 y DadjOBPJ75, que, de acuerdo al análisis de motivos y filogenia, se encuentran agrupadas dentro de un clado con proteínas homólogas que forman parte de un linaje PBP/GOBP específico de Coleoptera. La estructura

terciaria de DadjOBP21 se realizó mediante un análisis de homología en Swiss-Model. Se encontraron 141 plantillas con estructuras relacionadas a DadjOBP21, la plantilla que se seleccionó como molde corresponde a la estructura cristalina de OBP de *Culex quinquefasciatus* Say (3ogn.1.A) con una resolución de 1.30 Å, la cual comparte una identidad con DadjOBP21 del 31.09% y 37% de similitud con una cobertura del 80%. El modelo resultante tuvo un valor de GMQE (estimación global de la calidad del modelo) de 0.66 y de QMEAN normalizado menor a 1.0 (Fig. 20).

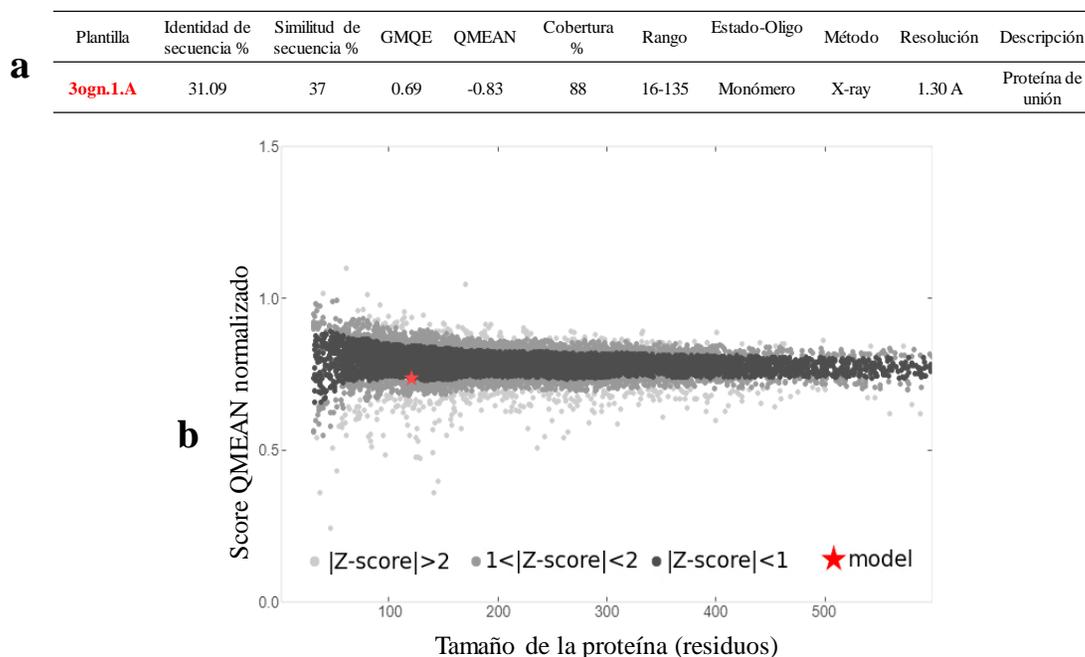


Figura 20. (a) Resultados de la estructura seleccionada para el modelaje de DadjOBP21 a partir de una búsqueda con BLAST y HHBlits; **(b)** Calidad del modelo en comparación con los puntajes obtenidos para estructuras cristalinas de alta resolución.

Al realizar la predicción para la proteína DadjOBPJ75 en Swiss-Model no se encontró una plantilla que cumplieran con los estándares mínimos del porcentaje de similitud y cobertura, por lo que se empleó un método comparativo con el servidor Robetta el cual utiliza una implementación automatizada del software Rosetta. Para la obtención del modelo se realizó un análisis comparativo de dominios (Fig. 21a) con 28 estructuras de OBPs homólogas de *Aedes aegypti* Linnaeus, *C. quinquefasciatus*, *Apis mellifera* Linnaeus, *Locusta migratoria* Linnaeus, *Chrysopa pallens* Rambur y *A. gambiae*. El modelo obtenido tuvo una confianza del 87%,

que corresponde a la concordancia entre la estructura de los modelos con DadjOBPJ75, por otra parte, la mayoría de los errores estimados por residuos se encuentran por debajo de los 2 angstroms (Fig. 21b).

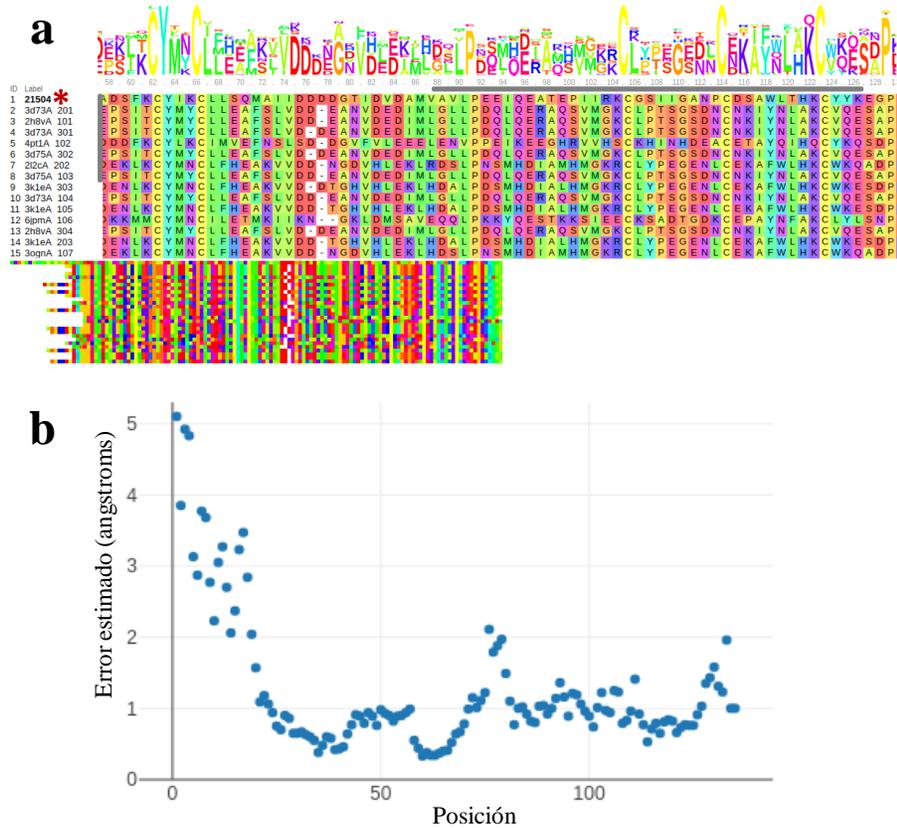


Figura 21. (a) Análisis comparativo de DadjOBPJ75 (21504) a partir del análisis de dominios de las secuencias de OBPs de estructura homologas; **(b)** Estimación de error en angstroms por residuo del modelo obtenido para DadjOBPJ75.

Los modelos de ambas DadjOBPs exhibieron un plegamiento en seis α -hélices, característica general de los OBP clásicos. Las α -hélices del modelo DadjOBP21 (Fig. 22) se ubicaron entre los residuos Asp22-Thr39 (α 1), Glu43-Asn50 (α 2), Glu59-Gln71 (α 3), Glu83-Ala88 (α 4), Glu92-Ile102 (α 5) y Pro113-Met127 (α 6), y se identificaron seis residuos de Cys conservados conectados por tres puentes de disulfuro en las Cys35-Cys67, Cys63-Cys114 y Cys105-Cys123. Las α -hélices de la estructura 3D de DadjOBPJ75 (Fig. 23) se encontraron entre los residuos Asp22-Gly40 (α 1), Glu46-Gly52 (α 2), Asp58-Gln70 (α 3), Val83-Ala88 (α 4), Glu92-Gly106 (α 5) y Pro113-Lys126 (α 6) con tres puentes de disulfuro conectados en las Cys35-Cys66, Cys62-Cys114 y Cys105-Cys123.

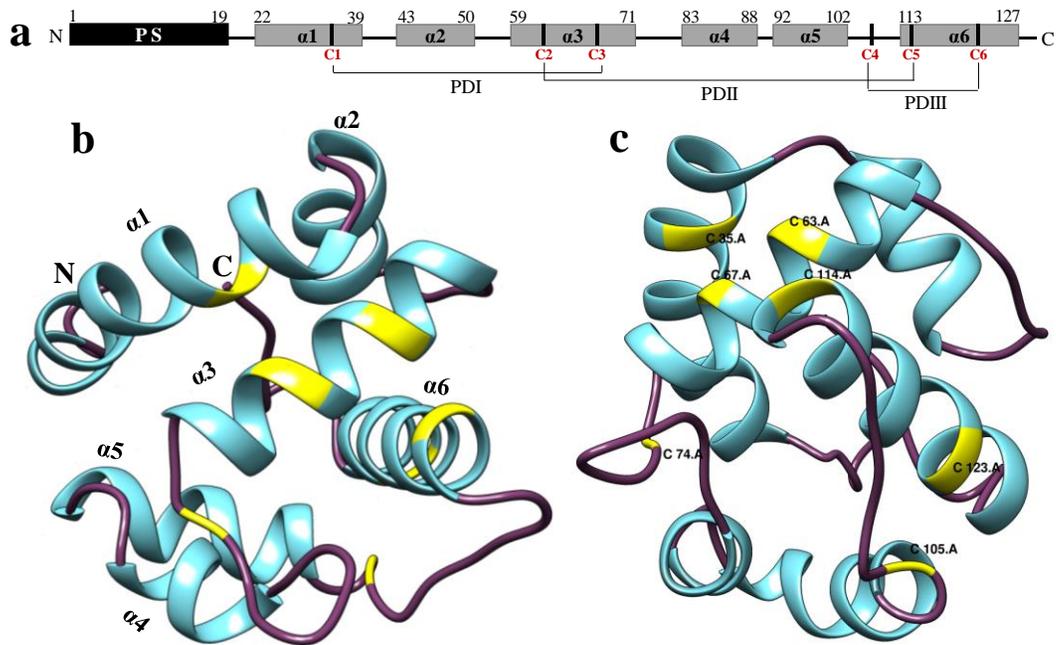


Figura 22. Representación de la estructura primaria y modelo tridimensional de DadjOBP21. (a) Los péptidos de señal predichos (PS) y α -hélices están ilustrados en cajas negras y grises. Se muestran los tres puentes de disulfuro (PD) entrelazados entre las cisteínas conservadas (C1-6) y las terminales N y C. (b) Plegamientos de las seis α -hélices en el modelo tridimensional y (c) ubicación de los residuos de cisteínas que forman los tres puentes de disulfuro.

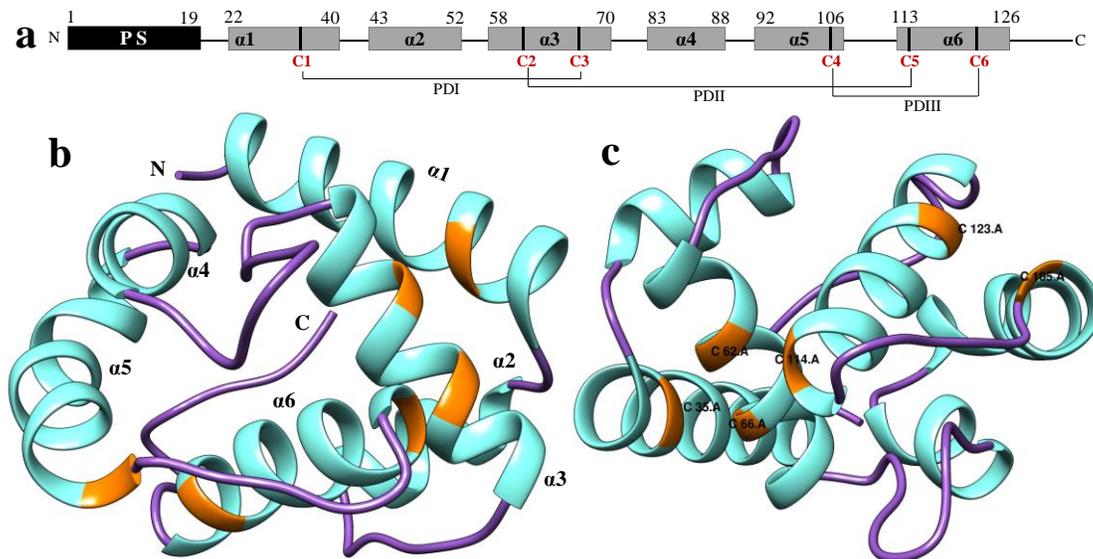


Figura 23. Representación de la estructura primaria y modelo tridimensional de DadjOBP75. (a) Los péptidos de señal predichos (PS) y α -hélices están ilustrados en cajas negras y grises. Se muestran los tres puentes de disulfuro (PD) entrelazados en las cisteínas conservadas (C1-6)

y las terminales N y C. (b) Plegamientos de las seis α -hélices en el modelo tridimensional y (c) ubicación de los residuos de cisteínas que forman los tres puentes de disulfuro.

La calidad tridimensional de ambos modelos fue evaluada por el diagrama de Ramachandran. El resultado reveló que para DadjOBP21 el 90.9% de todos los residuos estaban en las regiones más favorables (Fig. 24a), y para DadjOBPJ75 el 98.0% (Fig. 24b), ambos modelos tuvieron el 100% de sus residuos en regiones permitidas y no presentaron valores atípicos.

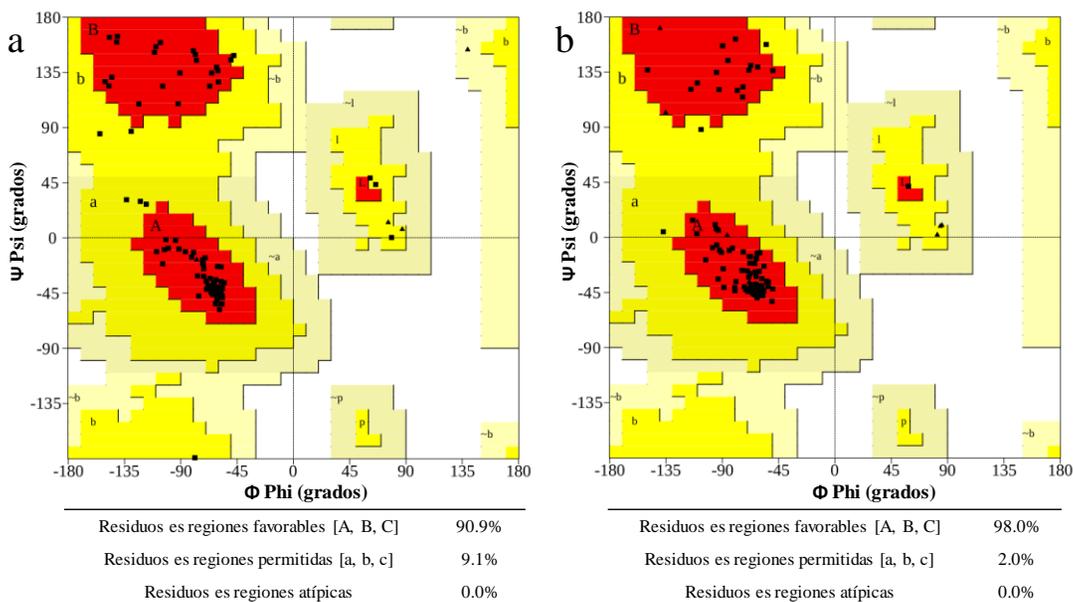


Figura 24. Diagrama de Ramachandran que muestran los ángulos de torsión phi (ϕ) y psi (ψ) de los residuos de la estructura terciaria de (a) DadjOBP21 y (b) DadjOBPJ75.

A partir de la evaluación en Molprobitry para los modelos de DAdjOBP21 y DadjOBPJ75 se obtuvieron rangos percentiles para el análisis del contacto de los átomos > 90 y puntuaciones de Molprobitry con percentiles de 98 y 100 lo cual indica modelos de alta calidad (Cuadro 9). El 95.92% de los rotámeros de la cadena lateral de DadjOBP21 se encontraron favorables y el 1% con valores atípicos, con una desviación $c\beta$ del 0.86%, mientras que DadjOBPJ75 no obtuvo valores atípicos con el 98% de rotámeros favorables y no se presentaron desviaciones $c\beta$. Las uniones de ambos modelos son de alta calidad y presentan alrededor del 0.7% de ángulos malos, los cuales se pueden corregir mediante el refinamiento de los modelos. Todos estos parámetros sugieren que la estructura tridimensional de DadjOBP21 y DadjOBPJ75 son de alta calidad y puede utilizarse para una posterior exploración virtual.

Cuadro 9. Resumen de los resultados de la validación de los modelos tridimensionales de las OBPs de *D. adjunctus* en Molprobit.

Categorías		DadjOBP21	DadjOBPJ75
CA	Puntaje de choque	6.06 (P 90)	0.98 (P 99)
		N=1784	N=1784
GP	Rotámetros favorables	1.0%	0.0%
	Rotámetros atípicos	95.92%	98.0%
	Puntaje de Molprobit	1.34 (P 98)	0.85 (P 100)
	Desviaciones $c\beta > 0.25 \text{ \AA}$	0.86%	0.0%
	Uniones de calidad	0.0%	0.0%
	Ángulos atípicos	0.1%	0.14%

CA: contacto de todos los átomos, GM: geometría de la proteína; P: percentil. De acuerdo a los estándares para cada categoría, los resultados se clasifican en verde, amarillo y azul que muestran los límites bueno, precaución y advertencia, respectivamente.

Para las proteínas quimiosensoriales se realizó la predicción de tres DadjCSPs que comparten homología con CSPs de *D. armandi* y que se han reportado con perfiles de expresión específica en antenas y unión a volátiles de hospedero o compuestos feromonales. Para obtener la estructura tridimensional de DadjCSP1, DadjCSP2 y DadjCSP3 se empleó la predicción por homología en Swiss-Model. Como resultado de la búsqueda inicial, se encontraron 100 plantillas con estructuras relacionadas a DadjCSP1, 96 a DadjCSP2 y 63 plantillas para DadjCSP3. En el cuadro 10 se muestran las plantillas que obtuvieron los mejores resultados y se utilizaron para crear los modelos tridimensionales.

Para la predicción de las CSPs de *D. adjunctus* se emplearon tres estructuras cristalinas de CSPs de *Mamestra brassicae* Linnaeus con resoluciones entre 1.40-1.80 Å. Como resultado, el modelo de DajCSP1 tuvo un valor de GMQE de 0.66 y QMEAN normalizado menor a 1.0, y presentó una identidad con la estructura cristalina 1n8u del 51.69% y 47% de similitud con una cobertura del 72%. Por otra parte, DadjCSP2 y DadjCSP3 tuvieron valores de QMEAN normalizados menores a 1 (Fig. 25) y GMQE de 0.71 y 0.68, respectivamente. DadjCSP2 presentó una identidad y similitud en la secuencia con la estructura 1n8v del 40.20% y 42% con

una cobertura del 82% (Fig. Xb), mientras que DadjCSP3 tuvo una similitud e identidad en la secuencia del 45% y 45.95% con la estructura 1kx9 y una cobertura del 80%.

Cuadro 10. Resultados de los moldes seleccionados para la predicción de DadjCSP1, DadjCSP2 y DadjCSP3 en Swiss-Model.

Resumen	DadjCSP1	DadjCSP2	DadjCSP3
Plantilla	1n8u.1.A	1n8v.2.A	1kx9.1.A
Identidad (%)	51.69	40.20	44.55
Similitud (%)	47.0	42.0	44.0
GMQE	0.66	0.71	0.67
QMEAN	0.14	-0.67	-0.48
Cobertura (%)	72	84	80
Rango	19-107	19-120	27-134
Estado-Oligo	monómero	monómero	monómero
Método	Rayos-X	Rayos-X	Rayos-X
Resolución	1.80 Å	1.39 Å	1.65 Å

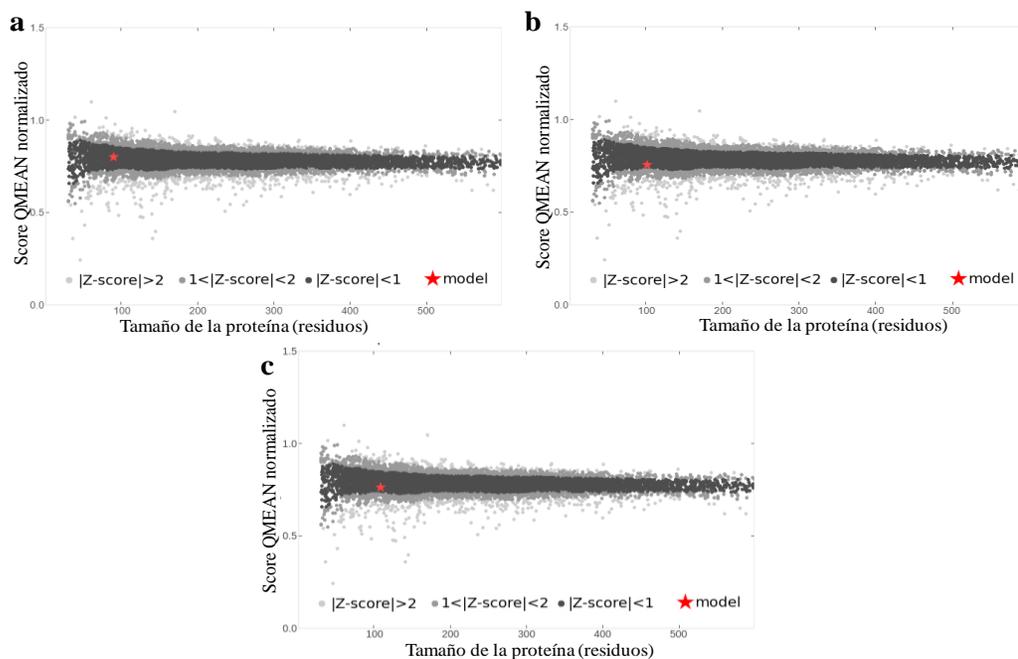


Figura 25. Calidad de las estructuras tridimensionales de (a) DadjCSP1, (b) DadjCSP2 y (c) DadjCSP3 en comparación con puntajes obtenidos para estructuras cristalinas de alta resolución.

El modelo de DadjCSP1 exhibió un plegamiento de cinco α -hélices (Fig. 26) ubicadas entre los residuos Asp27-Ser33 (α 1), Asp35-Leu45 (α 2), Pro53-Asn68 (α 3), Pro75-His91 (α 4) y Arg93-Tyr103 (α 5) conectados por dos puentes de disulfuro entre las Cys44-Cys51 y Cys70-Cys73.

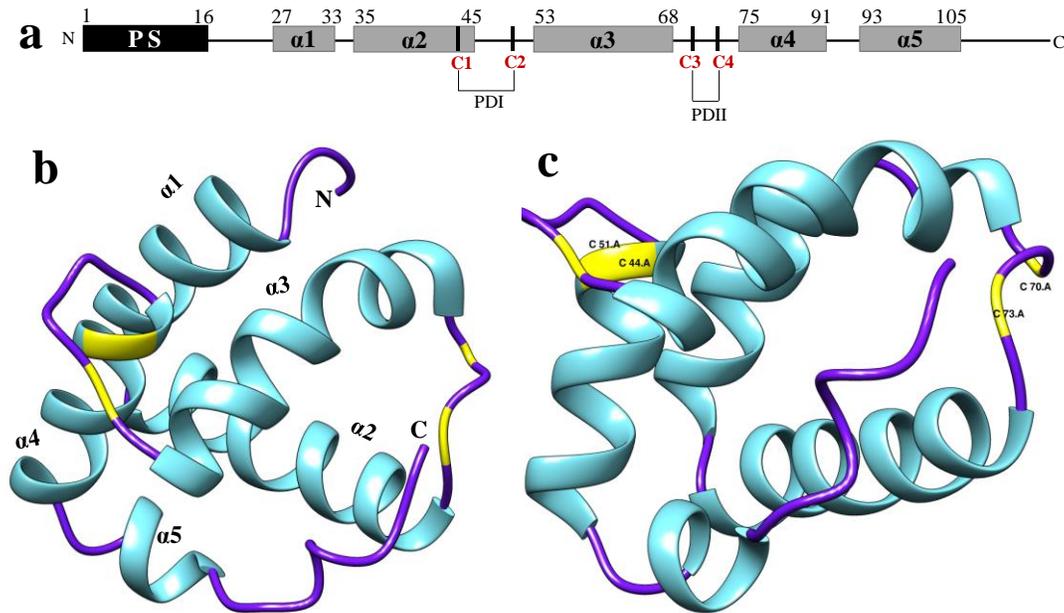


Figura 26. Representación de la estructura primaria y modelo tridimensional de DadjCSP1. (a) Los péptidos de señal predichos (PS) y α -hélices están ilustrados en cajas negras y grises. Se muestran los tres puentes de disulfuro (PD) entrelazados entre las cisteínas conservadas (C1-6) y las terminales N y C. (b) Plegamientos de las seis α -hélices en el modelo tridimensional y (c) ubicación de los residuos de cisteínas que forman dos puentes de disulfuro.

Para DadjCSP2 y DadjCSP3 se obtuvieron dos modelos con plegamientos en seis α -hélices, las cuales en DadjCSP2 (Fig. 27) se ubicaron entre los residuos Ile30-Ser35 (α 1), Lys37-Val47 (α 2), Ala55-Thr70 (α 3), Pro77-Asn93 (α 4), Pro95-Phe105 (α 5) y Ala112-Leu119106 (α 6) con un par de puentes de disulfuro entre las Cys46-Cys53, Cys72-Cys75, mientras que para DadjCSP3 (Fig. 28), las cinco α -hélices se ubicaron entre los residuos Thr28-His41 (α 1), Glu43-Leu53 (α 2), Pro61-Thr76 (α 3), Asp83-Asn99 (α 4), Pro101-Tyr111 (α 5) y Ser116-Ala127 (α 6) conectados por dos puentes de disulfuro entre las Cys59-Cys52 y Cys78-Cys81.

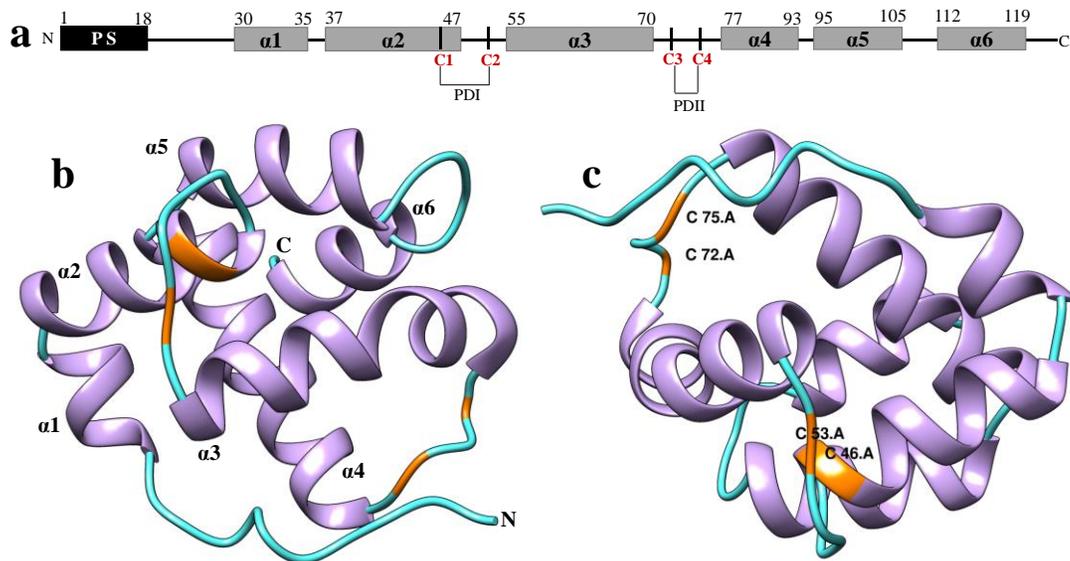


Figura 27. Representación de la estructura primaria y modelo tridimensional de DadjCSP2. **(a)** Los péptidos de señal predichos (PS) y α -hélices están ilustrados en cajas negras y grises. Se muestran los tres puentes de disulfuro (PD) entrelazados entre las cisteínas conservadas (C1-6) y las terminales N y C. **(b)** Plegamientos de las seis α -hélices en el modelo tridimensional y **(c)** ubicación de los residuos de cisteínas que forman dos puentes de disulfuro.

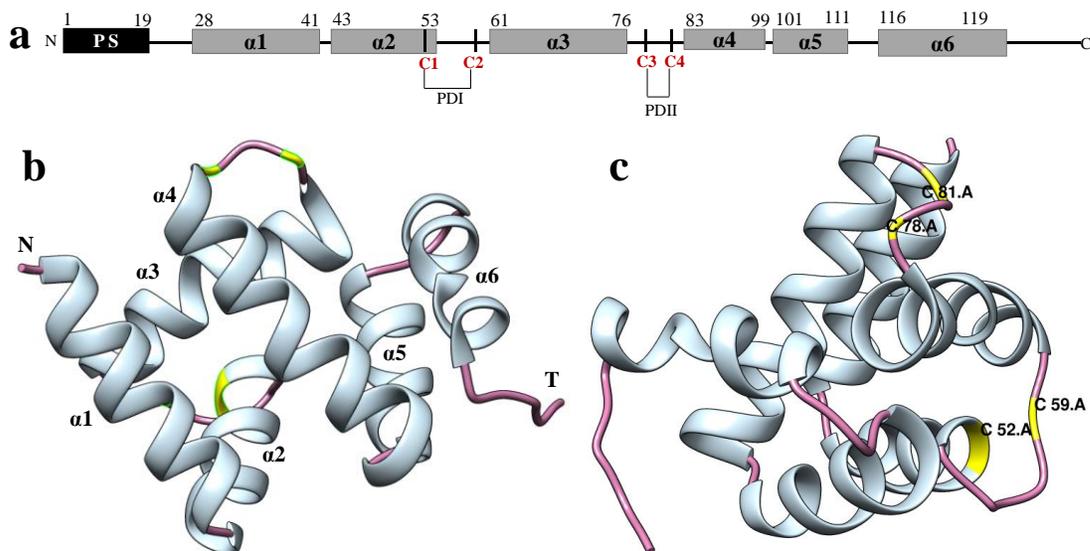


Figura 28. Representación de la estructura primaria y modelo tridimensional de DadjCSP3. **(a)** Los péptidos de señal predichos (PS) y α -hélices están ilustrados en cajas negras y grises. Se muestran los tres puentes de disulfuro (PD) entrelazados entre las cisteínas conservadas (C1-6) y las terminales N y C. **(b)** Plegamientos de las seis α -hélices en el modelo tridimensional y **(c)** ubicación de los residuos de cisteínas que forman dos puentes de disulfuro.

La calidad tridimensional DadjCSP1, DadjCSP2 y DadjCSP3 se evaluó con el diagrama de Ramachandran, para los tres modelos más del 90% de todos los residuos se ubicaron en las regiones más favorables, el 100% en regiones permitidas y no presentaron valores atípicos (Fig. 29).

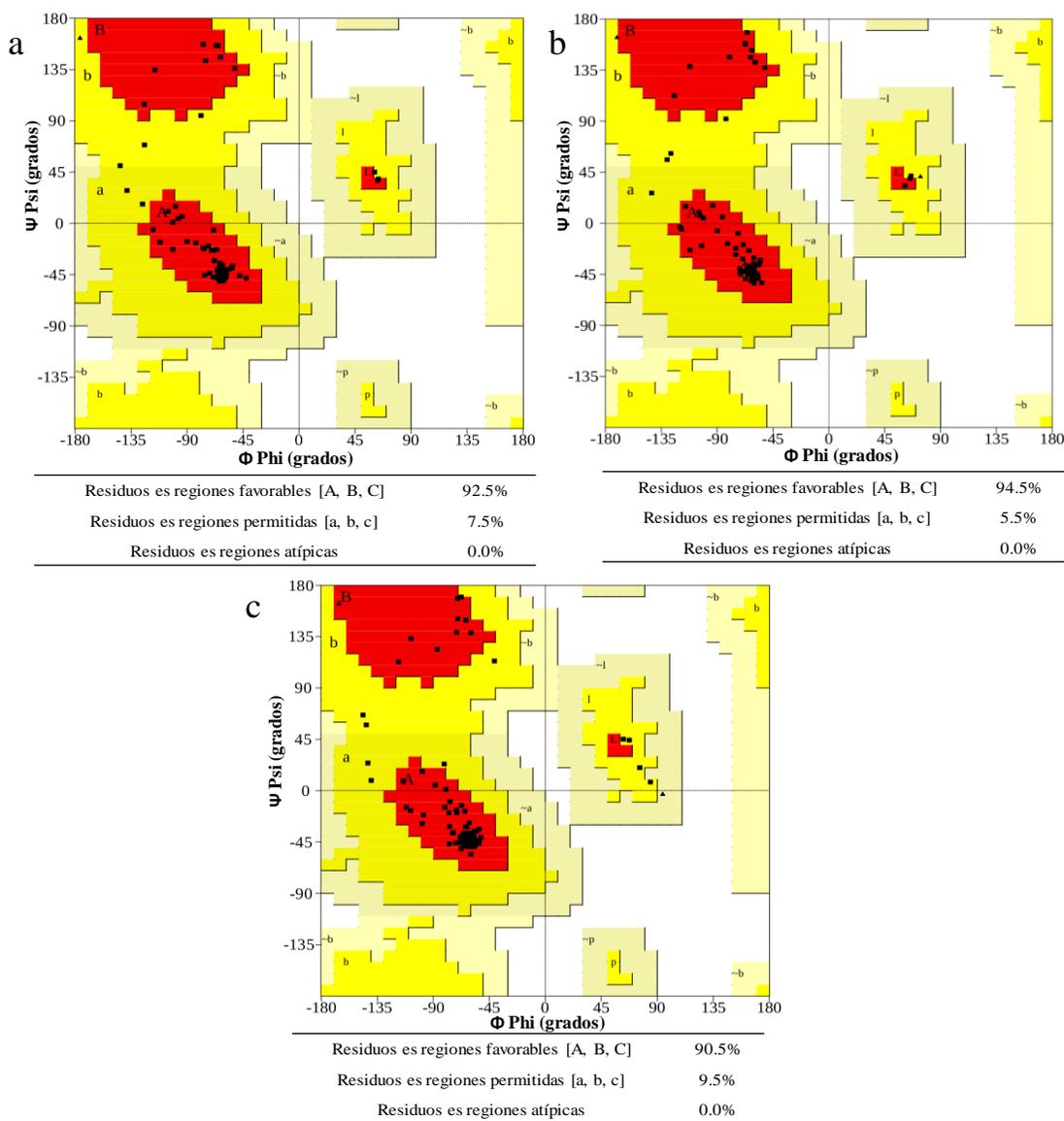


Figura 29. Diagrama de Ramachandran que muestran los ángulos de torsión phi (ϕ) y psi (ψ) de los residuos de la estructura terciaria de **(a)** DadjCSP1, **(b)** DadjOBPJ75 y **(c)** DadjCSP3.

A partir de la evaluación en Molprobitry para los tres modelos se obtuvieron rangos percentiles del análisis del contacto de los átomos entre 98-100 y puntuaciones de Molprobitry con percentiles de 100, lo cual indica modelos de muy alta calidad (Cuadro 11). El 97% de los

rotámeros de la cadena lateral de los tres modelos se encontraron favorables y entre el 1.02-1.75% con valores atípicos, y no se presentaron desviaciones $c\beta$. Las uniones de los tres modelos fueron de alta calidad y presentaron entre el 0.15-0.52% de ángulos malos, estos parámetros sugieren que la estructura tridimensional de las tres proteínas quimiosensoriales son de alta calidad y posterior a un refinamiento puede ser empleadas para simulaciones.

Cuadro 11. Resumen de los resultados de la validación de los modelos tridimensionales de las CSPs de *D. adjunctus* en Molprobit.

Categorías		DadjCSP1	DadjCSP2	DadjCSP3
CA	Puntaje de choque	0 (P 100)	3.03 (P 98)	1.15 (P 99)
		N=1784	N=1784	N=1784
GP	Rotámeros favorables	97.25%	97.74%	97.22%
	Rotámeros atípicos	1.75%	1.09%	1.02%
	Puntaje de Molprobit	0.94 (P 100)	1.12 (P 100)	1.09 (P 100)
	Desviaciones $c\beta > 0.25 \text{ \AA}$	0.0%	0.0%	0.0%
	Ángulos atípicos	0.41%	0.52%	0.15%
	Uniones atípicas	0.0%	0.0%	0.0%

CA: contacto de todos los átomos, GM: geometría de la proteína; P: percentil. De acuerdo a los estándares para cada categoría, los resultados se clasifican en verde, amarillo y azul que muestran los límites bueno, precaución y advertencia, respectivamente.

Para obtener el modelo tridimensional de DadjSNMP1a se utilizó un análisis comparativo de dominios en Robetta, a partir de la búsqueda inicial se identificaron 23 estructuras con residuos conservados similares a la secuencia de DadjSNMP1a (Fig. 30a). Las 23 plantillas consistieron en tres tipos de estructuras proteicas transmembranales de Scarb2 de *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith, la glucoproteína CD36 y el dominio lisosómico limp2 de *Homo sapiens* Linnaeus con similitudes de ~20%. El modelo obtenido tuvo una confianza del 73%, que corresponde a la concordancia entre la estructura de los modelos con DadjSMP1a, por otra parte, más del 70%

de los errores estimados por residuos se encuentran por debajo de los 2 angstroms, sin embargo, las cadenas laterales presentan errores que llegan hasta los 20 angstroms (Fig. 30b).

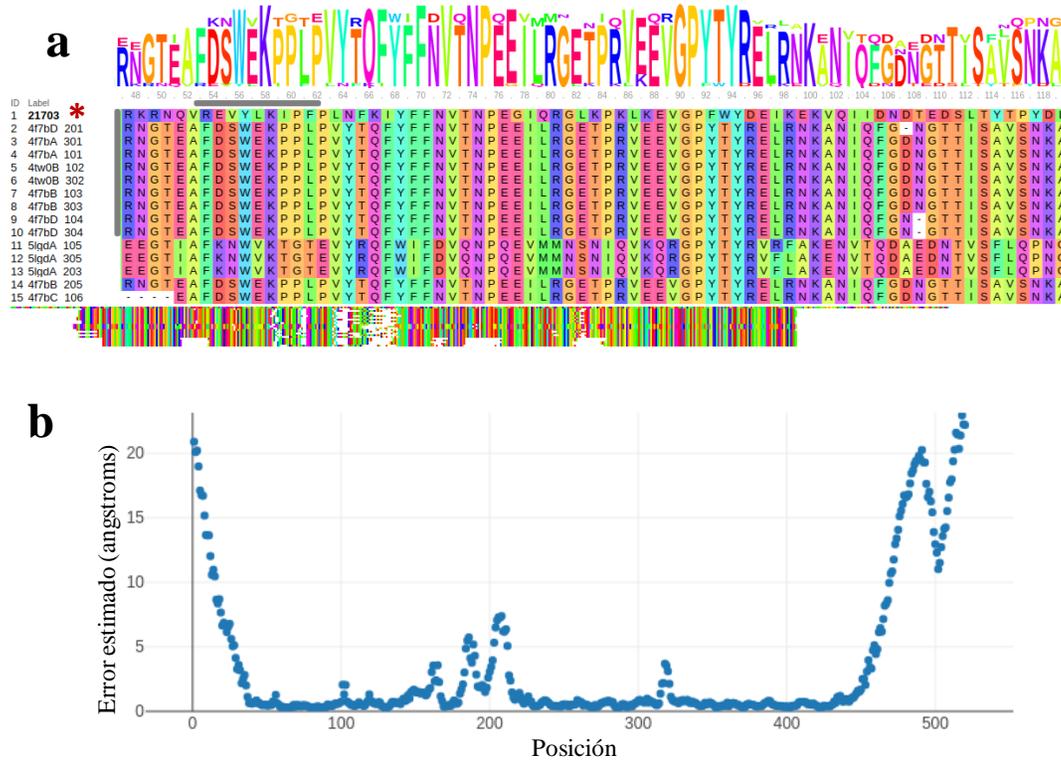


Figura 30. (a) Análisis comparativo de DadjSNMP1a (21703) a partir del análisis de dominios de las secuencias de estructuras homologas; **(b)** Estimación del error en angstroms por residuo del modelo obtenido para DadjOBPSNMP1a.

El modelo de DadjSNMP1a sugiere una estructura en forma de “horquilla”, consistió en dos α -hélices en los extremos C y N que contienen residuos hidrofóbicos los cuales podrían ser parte de las hélices transmembranales que se proyectan en un bucle grande extracelular que presenta una estructura compuesta por cadenas de láminas β largas y retorcidas en el núcleo de la proteína y las cisteínas conservadas en la estructura primaria parecen formar enlaces disulfuros en el asa extracelular (Cys272-Cys337; Cys301-Cys356; Cys339-Cys345) (Fig. 31).

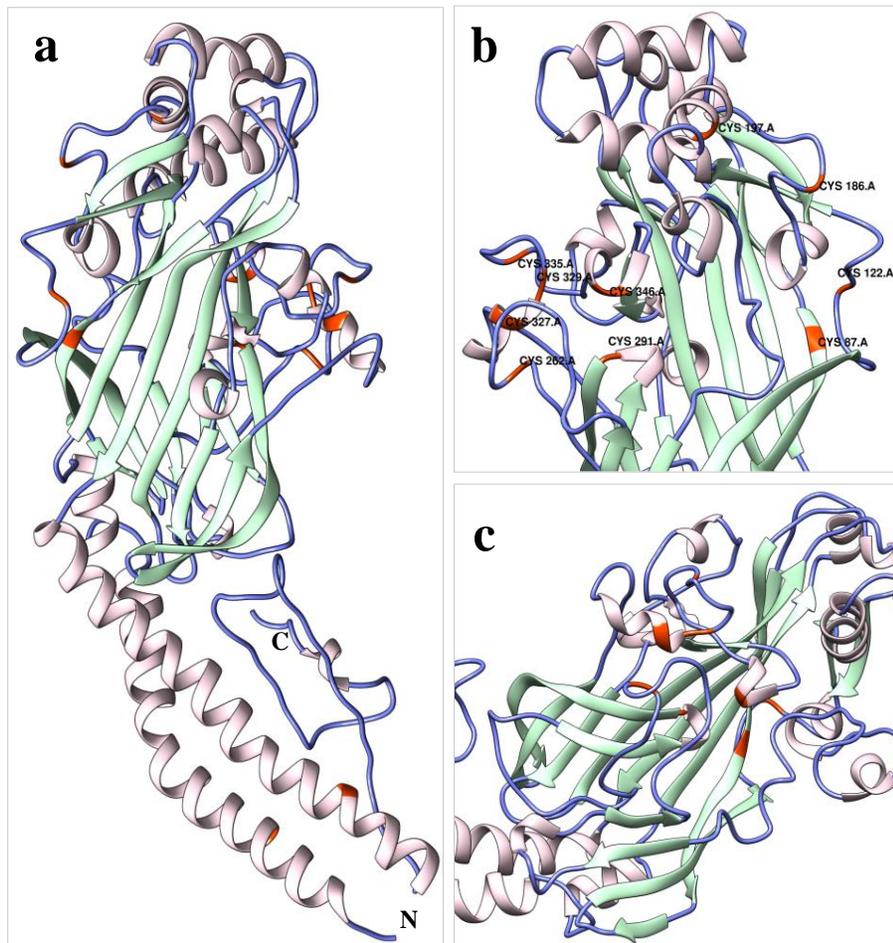


Figura 31. Modelo tridimensional de DadjSNMP1a. (a) Vista completa de la estructura terciaria en donde se observan los extremos C y N que forman parte de la región transmembrana, (b) motivo helicoidal en el ápice de la proteína con residuos de cisteínas conservados en color naranja, (c) cadenas de láminas- β en el núcleo de la proteína.

La calidad tridimensional de DadjSNMP1a se evaluó con el diagrama de Ramachandran, el 95.6% de todos los residuos se ubicaron en las regiones más favorables, el 100% en regiones permitidas y no presentaron valores atípicos (Fig. 32). A partir de la evaluación en Molprobitry se obtuvo un rango percentil del análisis del contacto de los átomos de 99 y puntuaciones de Molprobitry de 1,28 con un percentil de 99, lo cual indica que la predicción del modelo es de muy alta calidad (Cuadro 12). El 99% de los rotámeros de la cadena lateral se encontraron favorables sin valores atípicos, no se presentaron desviaciones $c\beta$, sin embargo, el 0,04% de las uniones fueron de mala calidad con 0.30% de ángulos malos, por lo que debe realizarse un refinamiento para corregir las uniones no favorables de residuos.

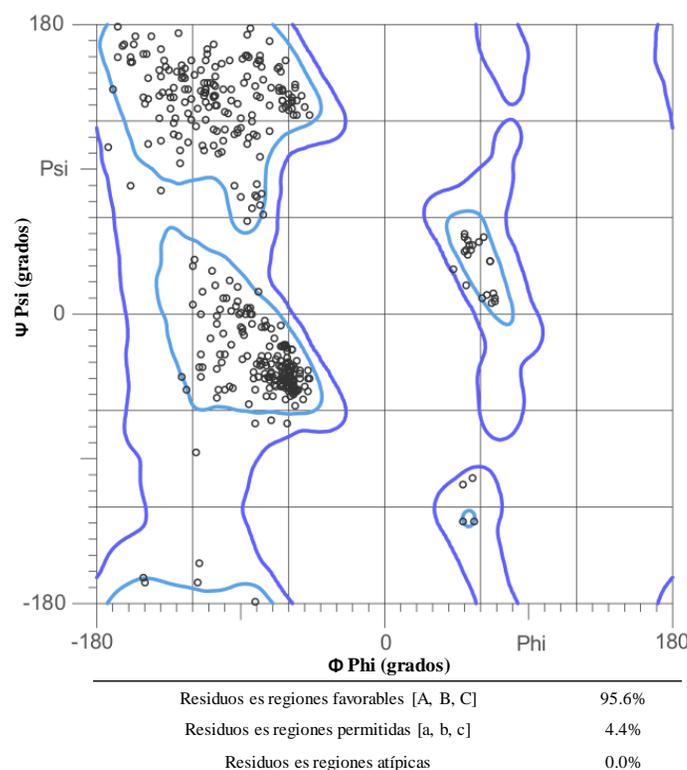


Figura 32. Diagrama de Ramachandran que muestran los ángulos de torsión phi (ϕ) y psi (ψ) de los residuos de la estructura terciaria de DadjSMP1a.

Cuadro 12. Resumen de los resultados de la validación de los modelos tridimensionales de las CSPs de *D. adjunctus* en Molprobit.

Categorías		DadjCSP1
CA	Puntaje de choque	0 (P 100) N=1784
	Rotámetros favorables	97.25%
GP	Rotámetros atípicos	1.75%
	Puntaje de Molprobit	0.94 (P 100)
	Desviaciones $c\beta > 0.25 \text{ \AA}$	0.0%
	Ángulos atípicos	0.41%
	Uniones atípicas	0.0%

CA: contacto de todos los átomos, GM: geometría de la proteína; P: percentil. De acuerdo a los estándares para cada categoría, los resultados se clasifican en verde, amarillo y azul que muestran los límites bueno, precaución y advertencia, respectivamente.

7. DISCUSIÓN

Este estudio representa el primer análisis del transcriptoma de cabeza del descortezador de las alturas *D. adjunctus* y la identificación de los genes olfativos que codifican proteínas no receptoras. De un total de 44, 420 unigenes identificados, el 31.25% fueron anotados en las tres categorías de los términos GO y los grupos funcionales más abundantes muestran una relación con procesos y funciones olfativas, lo cual es similar a lo reportado en transcriptomas antenales de otras especies de descortezadores y coleópteros (Andersson *et al.*, 2013; Gu *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2012; Yi *et al.*, 2018; Hu *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2014).

Los resultados descritos de transcriptoma de cabeza muestran una frecuencia similar en términos relacionados a función molecular, de unión y actividad catalítica al de transcriptomas antenales, lo cual señala que es posible obtener información semejante cuando se incluye toda la cabeza y reduce el número de individuos que se requieren para realizar RNA-seq, en este caso, se utilizaron 120 cabezas, mientras que, en otros trabajos, el número promedio para el procesamiento de antenas es de 1,000 individuos. Por otro lado, la similitud de términos GO ha sugerido una conservación en los patrones de expresión génica en tejidos quimiosensoriales (Dippel *et al.*, 2014) y considerando que los organismos no modelo generalmente tienen conjuntos de datos genómicos o transcriptómicos limitados, el bajo porcentaje de genes anotados con los términos GO indica falta de información para esta especie (Oppenheim *et al.*, 2015).

El 57.14% del total de genes que se tradujeron, tuvieron similitud significativa con las bases de datos de Insecta UniprotKB, principalmente de Coleoptera y más del 50% de los transcritos se relacionaron con *D. ponderosae*, el cual cuenta con un genoma completo (Keeling *et al.*, 2013). El número total de genes olfativos no receptores identificados para *D. adjunctus* (36), son superiores a lo reportado para *D. valens* (32) e *I. typographus* (24), pero inferiores en comparación con *D. ponderosae* (45) y *T. castaneum* (73) (Andersson *et al.*, 2013; Dippel *et al.*, 2014; Gu *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2018). La diferencia de genes quimiosensoriales entre especies, puede ser debido a las adaptaciones fisiológicas y de comportamiento a entornos específicos, lo cual puede conducir a pérdidas de genes funcionales (Goldman-Huertas *et al.*,

2015; Zhou *et al.*, 2012; Lavagnino *et al.*, 2012). Además, los genes de OBP, CSP y SNMP identificados en el transcriptoma de cabeza, tuvieron compatibilidades altas con genes olfativos descritos en antenas. Por otro lado, en diversos estudios (Dani *et al.*, 2011) se ha demostrado que existen OBPs y CSPs expresados en tejidos no sensoriales. Para obtener el número total de genes no receptores en las diferentes especies, se deben explorar otros tejidos en diferentes etapas de desarrollo.

Las OBPs de insectos son una familia multigénica que incluye distintos miembros con características distintivas (Fan *et al.*, 2011). En el transcriptoma de *D. adjunctus* se identificaron 27 OBPs, las cuales se clasificaron en las subclases clásica (16), minus-c (10) y plus-c (1). El análisis de motivos de novo, las secuencias de DadjOBPs y ortólogos se dividieron en los subgrupos identificados, lo que permitió obtener resultados con mayor significancia estadística y sentido biológico, los patrones de motivos muestran las características principales de las tres clases de OBPs y residuos altamente conservados en todas las proteínas de olor.

El análisis filogenético mostró que las DadjOBPs se dividieron en varias ramas con OBPs de cinco especies de coleópteros, las cuales se agruparon de acuerdo al patrón de cys a la que pertenecen, además, se observó una relación en la topología del árbol filogenético y la organización de los motivos. Pese a que se ha señalado que las OBPs son un grupo altamente divergente, las ramas del árbol incluyen diferentes *taxa* que delimitan grupos con gran similitud y secuencias con mismos patrones de motivos, lo cual señala que los clados son correctos, con un origen a partir de un ancestro común y sugiere diferencias funcionales, que podría ser una pista para la caracterización de estas proteínas.

La mayoría de las DadjOBPs que se identificaron poseen características de la subfamilia clásica, las cuales parecen desempeñar un papel más general en el transporte de olores y feromonas (Zhou, 2010). En el análisis de patrones de motivos, se encontraron secuencias de OBPs clásicas (DadjOBP21 y DadjOBPJ75), con características que se han reportado en PBPs y GOBPs, las cuales presentaron motivos (patrones 6C y 7C) conservados entre las C3-C5 y un motivo adicional en la N-terminal (Gu *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2016). Los subgrupos PBP y GOBP han mostrado una alta especificidad para volátiles de hospederos y

feromonas, estas proteínas se identificaron inicialmente en Lepidoptera y en la actualidad se han reportado grupos similares en Diptera, Hymenoptera y Coleoptera (Vogt, 1981; Nikonov *et al.*, 2002; Leal, 2005; Yasukochi *et al.*, 2018), sin embargo, en ningún transcriptoma de descortezador se han reportado, aun cuando es bien sabido que la dinámica poblacional de las especies de *Dendroctonus* es guiada por semioquímicos.

En ese sentido, los patrones de motivos similares y los resultados de la reconstrucción filogenética, en el cual se observa que las secuencias con estos patrones se sitúan en un mismo clado agrupadas con proteínas de otras especies (DponOBP17/TcasOBP08), clasificadas en un linaje PBP/GOBP específico de coleópteros (Hu *et al.*, 2016), sugieren la presencia de este subgrupo de OBPs en el transcriptoma antenal de descortezadores y funciones similares al de sus homólogos, por lo que serían candidatos a estudios estructurales y simulaciones de acoplamiento con modelos de homología y compuestos de feromonas y kairomonas, con el objetivo de entender su función.

Otras subfamilias de OBPs de *D. adjunctus* que se identificaron corresponden a miembros de la subfamilia minus-C y plus-C, las cuales en comparación con las OBP clásicas, han perdido las C2/C5 y poseen cisteínas adicionales conservadas, respectivamente. La identificación de ambos miembros fue respaldada por el análisis filogenético que mostró la agrupación de las DadjOBPs y secuencias de otras especies con características minus-C en un clado interno relacionado con proteínas clásicas y plus-C, las cuales se encuentran en la base del árbol. Esta distribución muestra patrones evolutivos en escalas de corto (mismo género) y largo plazo (entre especies de insectos) e indican una rápida divergencia evolutiva de las tres subfamilias (Sánchez-Gracia *et al.*, 2009).

A partir del análisis de motivos secuenciales, observamos que las proteínas minus-C presentan una menor variación en los motivos conservados a lo largo de la secuencia y se encuentran agrupadas en el dendograma, junto a secuencias con patrones similares, lo cual posiblemente esté vinculado a su función y estructura. Además, se ha postulado que las OBP minus-C podrían ser proteínas ancestrales y que la fuerza impulsora en la evolución de OBPs está orientada en la introducción de un mayor número de puentes disulfuro y complejidad adicional (Vieira y Rozas,

2011; Li *et al.*, 2013), sin embargo, en el dendograma este subgrupo se ubica en un clado más reciente, lo cual sugiere un proceso de diversificación posterior al de las plus-C y clásicas.

Para la subclase plus-C se identificó una proteína (DadjOBP2) que tiene las mismas características de cisteínas conservadas y patrón de motivo a la de los ortólogos DponOBP2a/DponOBP2b con más del 90% de similitud. Se ha planteado que la evolución de esta subfamilia podría haber involucrado un ancestro común temprano en el linaje de los insectos y divergido de manera independiente por un mecanismo de duplicación. Pese a que existe una alta identidad entre especies cercanas, se ha reportado una gran variabilidad de los miembros plus-C entre insectos (Spinelli *et al.*, 2012), lo cual coincide con el porcentaje bajo de similitud de secuencia (<45%) entre la DadjOBP2/DponOBP2 con sus homólogos de *I. typographus* (ItypOBP2/ItypOBP10), aun cuando todas presentan de los residuos de cys conservados. La información disponible sobre las afinidades de unión sobre las subfamilias minus-C y plus-C son limitadas, se han reportado expresadas en antenas, palpos labiales y maxilares, pero también en estructuras no sensoriales (Zheng *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2015; Song *et al.*, 2018; Mei *et al.*, 2018), por lo anterior, se necesita más investigación sobre la estructura y función fisiológica de las OBPs no clásicas.

Las CSP son una familia de proteínas solubles que tienen funciones similares a las OBP en el reconocimiento y transporte de moléculas hidrófobas exógenas (Pelosi *et al.*, 2005), para *D. adjunctus* se identificaron siete CSP mediante Blastx y con base al análisis de motivos se observó que las proteínas quimiosensoriales tienen una menor divergencia que las OBPs, todas las secuencias tienen motivos que representan los cuatro perfiles de cisteína conservados y más del 50% de las secuencias presentan el mismo patrón de motivos. Las DadjCSPs se distribuyeron en diferentes ramas del árbol filogenético lo que señala diversidad entre ellas, sin embargo, se agruparon junto con CSPs de *D. ponderosae* y *D. armandi* con probabilidades posteriores del 100% y motivos similares, lo que señala un origen a partir de un proceso de especiación, cuya variación es resultado de una diversificación en las secuencias de aminoácidos (Mei *et al.*, 2018) por lo que al igual que las OBPs, las CSPs de descortezadores podrían tener formas de expresión y funciones similares a las reportadas por otros autores.

En ese sentido, resultados de un estudio (Li *et al.*, 2018) en donde se evaluaron los perfiles de expresión de 9 CSP de *D. armandi* en diferentes tejidos y etapas de desarrollo, sustentan que todas las DadjCSPs que se identificaron se expresan en tejidos antenales y aparato bucal, por lo cual podrían estar involucradas en el reconocimiento de semioquímicos y la detección de fuentes de alimentos no volátiles. Además, a partir de acoplamiento molecular y fluorescencia, se encontró que, DarmCSP2 estrechamente relacionada con DadjCSP2, se une fuertemente a volátiles de hospedero como (-)- α -pineno y (+)-3-careno y feromonas como (-)-trans-verbenol, corroborado mediante ensayos con RNA de interferencia, mientras que DarmCSP4 y DarmCSP6, presentaron una sobre expresión en larvas maduras y pupas, mientras que sus homólogos de DadjCSP4 y DadjCSP6, se encontraron en cabeza-antena. Las funciones de las CSP y OBP se consideraban limitadas a mecanismos de quimiorrecepción, sin embargo, su amplia versatilidad y expresión en tejidos no sensoriales en distintas etapas del desarrollo, han propuesto funciones adicionales a las olfativas y gustativas en diferentes procesos fisiológicos (Pelosi *et al.*, 2018).

Las SNMP son proteínas de membrana de OSN homólogas a la superfamilia de receptores CD36, que en insectos se dividen en tres familias que codifican proteínas que funcionan como secuestradoras de membrana que se unen a una gran variedad de ligandos y funciones de señalización en respuesta a factores ambientales como el estrés, la inmunización innata y la quimiorrecepción (Silverstein y Febbraio, 2010). La familia SNMPs se asocia con neuronas quimiosensoriales y se clasifican en dos subfamilias SNMP1 y SNMP2, sin embargo, en este estudio solo se identificaron dos proteínas en el transcriptoma de *D. adjunctus* homólogas con SNMP1a y SNMP de *D. ponderosae*. En el dendograma las DadjSNMP y sus ortólogos se dividieron en los dos subgrupos y ambas SNMPs de *D. adjunctus* se agruparon en los subclados de SNMP1, agrupamiento que se ha reportado en estudios de diferentes especies de insectos (Nichols y Vogt, 2008; Zhang *et al.*, 2015).

Por otro lado, se ha planteado que eventos de duplicación de genes contribuyeron a la formación de ambos tipos de proteínas, los cuales han sufrido divergencias durante un largo período de evolución (Jiang *et al.*, 2016). Esto coincide con la baja similitud entre las SNMP1 y SNMP2, aun cuando ambos subgrupos tuvieron un patrón de cuatro motivos conservados, que

representan las regiones características de esta familia (dos dominios transmembranales y una gran asa extracelular con varias cisteínas conservadas). La similitud entre proteínas homólogas dentro de ambas subfamilias de SNMP, ha sugerido una selección negativa sobre la estructura primaria y funciones similares (Nichols y Vogt, 2008).

En diversos estudios (Benton et al., 2007; Forstner *et al.*, 2008; Gu *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2019) se ha demostrado la expresión exclusiva o primaria de SNMP1 en antenas de insectos y respaldan el modelo de que esta proteína puede estar involucrada en la detección de feromonas y olores generales como volátiles de hospederos. La identificación de solo dos miembros del subgrupo SNMP1 en el transcriptoma de cabeza de machos y hembras de *D. adjunctus* colectados durante su periodo de vuelo y de mayor incidencia en fustes con brotes activos y su homología a SNMP1 expresados en antenas de *D. ponderosae*, *D. valens* e *I. typographus* podrían sugerir funciones similares que intervienen en comportamientos de búsqueda de escarabajos de la corteza. Además, otros estudios han encontrado que SNMP2 se expresa en diferentes partes del cuerpo (Gu *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2019), lo que respalda la noción de que el origen de las SNMP2 fue por duplicación y adquirieron diferente función, su expresión no se restringe a antenas y podría estar involucrada en diferentes procesos fisiológicos como sensación gustativa y táctil.

Finalmente, en años recientes, existe un creciente interés en el análisis de las estructuras tridimensionales de las proteínas olfativas de insectos, en específico de OBPs y CSPs. Este conocimiento permite comprender los mecanismos moleculares y las relaciones evolutivas involucradas en la comunicación de insectos, además, de brindar información sobre los sitios de unión y las interacciones entre los ligandos, que junto con ensayos biológicos, se aplican para investigar “superligandos”, un concepto de ecología química inversa, que utiliza las proteínas olfativas para la identificación de atrayentes y repelentes, la selección de blancos para el silenciamiento con la tecnología RNAi y la creación de biosensores específicos (Leal, 2005; Jayanthi *et al.*, 2014; Venthur *et al.*, 2014).

La cristalografía de rayos X y la resonancia magnética nuclear (RMN), son las técnicas óptimas para obtener la estructura terciaria de proteínas, sin embargo, son costosas y el procedimiento

es complejo. En ese sentido, los enfoques computacionales contribuyen como herramientas complementarias para la predicción de estructuras tridimensionales, a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína de interés, la cual puede modelarse con proteínas homólogas, cuyas estructuras cristalinas han sido determinadas mediante cristalografía de rayos X o RMN (Paas *et al.*, 2000; Affonso *et al.*, 2013).

Actualmente, en la base de datos de proteínas (PDB) se encuentran 45 estructuras cristalinas de OBPs de seis órdenes de insectos, sin embargo, más del 50% pertenecen a seis especies de Diptera, que tienen importancia médica y agrícola y hasta el momento no se han registrado estructuras para Coleoptera. Por otro lado, solo existen siete estructuras de CSPs en PDB, que pertenecen a proteínas de *Mamestra brassicae* Linnaeus, *Bombyx mori* Linnaeus y *Schistocerca gregaria* Forsskål, mientras que no se cuenta con ninguna estructura para las SNMPs.

La ausencia de estructuras cristalinas de proteínas olfativas para una gama más amplia de especies de insectos e inclusive de Coleoptera, podría sugerir una gran limitante para el modelado de estructuras terciarias, sin embargo, al igual que en otros estudios (Xu *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2018; Venthur *et al.*, 2014; Langeswaran *et al.*, 2018; Younas *et al.*, 2018), para las OBPs, CSPs y SNMP seleccionadas de *D. adjunctus*, mediante modelización comparativa y por homología, se lograron obtener estructuras tridimensionales de alta calidad.

Existe una gran conservación de la estructura terciaria entre OBPs y CSPs de diferentes especies de insectos, sin embargo, la diversidad de sitios clave relacionados con la función ha revelado diferentes mecanismos de unión, liberación y reconocimiento de los receptores de los ligandos (Forêt y Maleszka, 2006; Kulmuni y Havukainen, 2013). Los cambios en las cavidades de unión son críticos para la evolución, algunos de ellos unen una amplia gama de ligandos, mientras que otros son más selectivos dependiendo del tamaño y la forma de la cavidad (Benoit *et al.*, 2004; Ingraham y Redinbo, 2005). Las estructuras obtenidas para DadjOBP21 y DadjOBPJ75 consistieron en 6 α -hélices, de las cuales cuatro (α 1, α 4, α 5 y α 6) convergen para formar una cavidad de unión, mientras que los enlaces disulfuro refuerzan la organización de las hélices. En ambas proteínas, dos enlaces de disulfuro fijan la posición relativa de α 3 uniéndola a las hélices α 1 y α 6 (DadjOCP21:Cys35-Cys67/Cys63-Cys114 y DadjOBPJ75: Cys35-

Cys66/Cys62-Cys114), mientras que las Cys105-Cys123 forman un puente de disulfuro entre las hélices $\alpha 5$ y $\alpha 6$, haciendo aún más rígida la proteína.

Los patrones de estructuras terciarias de las CSPs son diferentes a las OBPs, las estructuras cristalinas que se encuentran en PDB han revelado un novedoso tipo de pliegue α -helicoidal de seis hélices conectadas por bucles α - α y un estrecho canal que se expande sobre la cavidad hidrofóbica, lo anterior es consistente con las estructuras modeladas para DadjCSP2 y DadjCSP3, mientras que para DadjCSP1 se obtuvo una estructura con pliegue en cinco α -hélices, sin embargo, las tres proteínas contienen 4 cisteínas conservadas que forman dos pares de puentes disulfuro no entrelazado (Mosbah et al., 2003; Tomaselli et al., 2006).

Las CSPs se caracterizan por tener una estructura globular funcional cuyas hélices están dispuestas en forma de “prisma”. DadjCSP2 y DadjCSP3 contienen dos motivos en forma de V, que consisten en pares de hélices $\alpha 1$ - $\alpha 2$ y $\alpha 4$ - $\alpha 5$, la tercera pared está cerrada por la hélice α -3, que es perpendicular a las hélices de los motivos en forma de V. La hélice $\alpha 6$ está empaquetada contra la cara formada por las hélices $\alpha 4$ y $\alpha 5$. Las hélices $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 4$ y $\alpha 5$ forman una cavidad interna similar a un prisma cerrada en la parte superior por la α -hélice 3, esta cavidad constituye un sitio de unión para los ligandos hidrofóbicos (Vieira y Rozas, 2011; Kulmuni et al., 2013).

La predicción de la estructura de DadjCSP1, basada en la secuencia, indicó un modelo proteico de 5 α -hélices, sin embargo, las hélices y los bucles conectivos se localizaron casi idénticos a los modelos DadjCSP2 y DadjCSP3, apoyando la arquitectura general de la proteína CSP1. En otros estudios, se han reportado CSPs de cinco hélices (Kulmuni y Havukainen, 2013). Este tipo de proteínas presentan un tamaño pequeño con una superficie más hidrofóbica, además, los residuos de unión son más pequeños comparados con otras CSP, lo que sugiere que estas proteínas podrían unir ligandos más grandes. El aumento de la hidrofobia está conectado con la disminución de la solubilidad, por lo que se ha especulado que la tasa de difusión y/o el entorno tisular podrían ser diferentes para CSPs de cinco hélices en comparación con las CSPs más cargadas, sin embargo, las tres DadjCSP tienen homólogos con proteínas de *D. armandi* que exhiben perfiles de expresión exclusivos de antena (Gitlin et al., 2006).

Este enfoque de predicción estructural se basa en las relaciones evolutivas entre una proteína objetivo y las proteínas que comparten similitud estructural, sin embargo, para determinar una interacción ligando-proteína, el modelaje propuesto, debe tener algunas características que indiquen un diseño tridimensional preciso (Krieger *et al.*, 2003; Venthur *et al.*, 2014). En ese sentido, el análisis en Molprobity de las estructuras modeladas para DadjOBPs y DadjCSPs, muestra que todas las proteínas tienen una alta calidad; con excepción de DadjOBPJ75, todos los modelos se realizaron por un análisis de homología con plantillas de alta resolución con coberturas > 70% y similitud >30%. La identidad de la secuencia porcentual es un indicador importante para establecer la mejor plantilla, se considera que una homología de secuencia del 30% o más es buena para obtener un modelo preciso (Schwede *et al.*, 2007).

Por otro lado, debido a que no se encontró una plantilla para DadjOBPJ75 que tuviera las características necesarias de porcentaje de similitud, resolución, cobertura y GMQE, se realizó una predicción con el protocolo de Rosetta, el cual genera un modelo mediante un modelado comparativo de dominios con secuencias homologas con estructuras conocidas y lo complementa con modelos para los dominios que carecen de homología utilizando el método de predicción de estructura *de novo* (Kim *et al.*, 2004). En cuanto a la evaluación de la calidad del modelo tridimensional de DadjOBPJ75, al igual que las demás proteínas de unión, el análisis de la geometría de la proteína y el contacto de los átomos en Molprobity resultó en modelos de alta calidad, además, todas las estructuras se evaluaron con el plot Ramachandran (Laskowski *et al.*, 2013), el cual fue excelente para todos los modelos con el 100% de los residuos en regiones favorables y permitidas, sin residuos en regiones atípicas.

El modelaje de la proteína DadjSNMP1a se realizó mediante modelización comparativa ya que actualmente no se encuentra ninguna SNMP de insectos con estructura cristalina en PDB. Para la predicción se utilizaron proteínas que pertenecen a la superfamilia CD36 de *S. frugiperda* y *H. sapiens*, y de acuerdo a los resultados del análisis en Molprobity y el plot Ramachandran, el modelo tridimensional tiene una calidad alta, con el 100% de los residuos en regiones favorables y permitidas sin residuos atípicos.

En el modelo estructural del ectodominio de DadjSNMP1a, se observa la formación de un túnel compuesto por láminas- β antiparalelas con varios dominios α -helicoidales cortos y un haz de hélices en el ápice, el túnel interno abarca la mayor parte de la longitud del ectodominio, lo cual ha sugerido que esta región podría canalizar las moléculas de feromonas a sus receptores afines, además, el ectodominio contiene seis cisteínas que al parecer se conservan en la mayoría de los miembros de la familia CD36 y que en mamíferos, forman enlaces de disulfuro intramoleculares (Pepino *et al.*, 2014ab; Neculai *et al.*, 2013). Hace más de dos décadas se demostró que SNMP1 se expresa en las neuronas sensibles a las feromonas y diez años más tarde se reportó que está genéticamente implicado en la transducción de feromonas (Rogers *et al.*, 1997; Benton *et al.*, 2007; Jin *et al.*, 2008).

En el 2016, Gómez-Díaz *et al.* propusieron un nuevo modelo de la función de las SNMP1 en el que fungen como un medio para canalizar las moléculas de feromonas del medio extracelular hacia la cavidad de unión del ligando de los receptores de olor (OR). El túnel del SNMP1 podría facilitar la entrega directa de moléculas de feromonas hidrofóbicas, protegiéndolas de la exposición a la linfa antenal o a las enzimas degradadoras de olores que abundan en este compartimento, al dirigir las moléculas de feromonas hacia la bicapa lipídica, desde donde se desplazan lateralmente hacia la cavidad de unión de ligando de ORs específicos. La SNMP1 de insectos ha mostrado tener un requisito exclusivo de unión a moléculas de feromonas de la linfa en contraste con la SNMP2 y las CD36 de mamíferos que parecen haber conservado la versatilidad funcional por lo que se han descrito implicadas en múltiples funciones de señalización en diferentes tejidos (Silverstein *et al.*, 2009; Pepito *et al.*, 2014b; Shen *et al.*, 2014).

Las estructuras realizadas para las DadjOBPs, DadjCSPs y DadjSNMP1a, proporcionan modelos de homología precisos que, junto con el acoplamiento molecular, pueden servir para la búsqueda de superligandos. Cabe señalar que los modelos de homología, así como las estructuras cristalinas, sólo proporcionan representaciones estáticas de los sistemas olfativos dinámicos y aunque el método de acoplamiento es una herramienta eficiente para predecir las interacciones entre el ligando y la proteína, los resultados deben complementarse con métodos experimentales como los ensayos de unión competitiva de fluorescencia (FBA).

8. CONCLUSIONES

Los genes olfativos no receptores identificados en el transcriptoma de la cabeza de *D. adjunctus* y su análisis con otras especies de Scolytinae y Coleoptera, aumentan la información sobre la base molecular de los sistemas olfativos en los descortezadores. Mediante el análisis del transcriptoma de cabeza de machos y hembras, se identificaron 36 genes que codifican a proteínas olfativas no receptores, de las cuales, 27 transcritos corresponden a OBPs, 7 CSPs y 2 SNMPs, a partir de los cuales, se pueden desarrollar los perfiles específicos de expresión en diferentes tejidos sensoriales.

La inclusión de un análisis comparativo de los motivos secuenciales de los OBP, CSP y SNMP, proporcionó información clara sobre las características distintivas de cada familia y las subclases. Estos resultados apoyan la clasificación de las OBPs y las CSPs, con base en el número de residuos de cisteína conservados en la secuencia primaria y podrían aplicarse como referencia para nombrar y agrupar a los genes no receptores. La integración de patrones de motivos en los árboles filogenéticos, no sólo permitió comprender mejor el proceso de diversificación, la conservación de patrones de motivos entre las tres familias de proteínas no receptoras de diferentes especies de insectos, también puede sugerir agrupamientos de linajes con regiones distintivas que tienen importancia funcional o estructural, por lo cual son más invariables o conservadas.

Las relaciones de DadjCSPs y DadjSNMPs con proteínas cuya expresión y función han sido estudiadas y que intervienen en la solubilización y detección de volátiles de hospederos y feromonas, proporciona un valioso recurso para futuras investigaciones de diferentes especies de *Dendroctonus*.

Las estructuras realizadas para DadjOBP21, DadjOBPJ75, DadjCSP1, DadjCSP2, DadjCSP3 y DadjSNMP1a, proporcionan modelos de homología precisos que, junto con el acoplamiento o simulación molecular, pueden servir para la búsqueda de superligandos que intervienen en la comunicación de estos escarabajos.

9. REFERENCIAS

- Affonso, R. *et al.* Applications of molecular modeling in the design of new insect repellents targeting the odorant binding protein of *Anopheles gambiae*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **24**, 473–482 (2013).
- Ali, J., Najeeb, J., Ali, M. A., Aslam, M. F. & Raza, A. Biosensors: Their Fundamentals, Designs, Types and Most Recent Impactful Applications: A Review. *J Biosens Bioelectron* **8**, 235; 10.4172/2155-6210.1000235 (2017).
- Andersson, M. N., Larsson, C. M, Blaženec, M. & Jakuš, R. Peripheral modulation of pheromone response by inhibitory host compound in a beetle. *J Exp Biol* **213**, 3332–3339 (2010).
- Andersson, N. M. *et al.* Antennal transcriptome analysis of the chemosensory gene families in the tree killing bark beetles, *Ips typographus* and *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *BMC Genomics* **14**, 198 (2013).
- Andrews, S. (2010) FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. Recuperado el 18 de mayo de 2020, de Braham Bioinformatics: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk>
- Angeli, S. *et al.* Purification, structural characterization, cloning and immunocytochemical localization of chemoreception proteins from *Schistocerca gregaria*. *European Journal of Biochemistry* **262**, 745–754 (1999).
- Antony, B., Johnny, J. & Aldosari, S. A. Silencing the odorant binding protein RferOBP1768 reduces the strong preference of palm weevil for the major aggregation pheromone compound ferrugineol. *Front. Physiol.* **9**, 252; 10.3389/fphys.2018.00252 (2018).
- Apps, P. J. ¿Are mammal olfactory signals hiding right under our noses? *Naturwissenschaften* **10**, 487-506 (2013).
- Armendáriz-Toledano, F & Zuñiga, G. Illustrated key to species of genus *Dendroctonus* (Coleoptera: Curculionidae) occurring in Mexico and Central America. *Journal of Insect Science* **17**, 1–15; 10.1093/jisesa/iex009 (2016).
- Ashourian, K. T. 2014. The effects of SNMP-2 gene expression on mating discrimination in male *Drosophila melanogaster*. Recuperado el 18 de mayo de 2020, de University of South: <https://scholarcommons.sc.edu/etd/2655>

- Bailey, T. L., Johnson, J., Grant, C. E., & Noble, W. S. The MEME Suite. *Nucleic Acids Research* **43**, W39–W49; 10.1093/nar/gkv416 (2015).
- Ban, L. P., Scaloni, A., Brandazza, A., Angeli, S., Zhang, L., Yan, Y. H. & Pelosi, P. Chemosensory proteins of *Locusta migratoria*. *Insect Molecular Biology* **12**, 125–134 (2003).
- Bautista, M. A. *et al.* Evidence for trade-offs in detoxification and chemosensation gene signatures in *Plutella xylostella*. *Pest Management Science* **71**, 423–432 (2015).
- Benoit, G., Malewicz, M. & Perlmann, T. Digging deep into the pockets of orphan nuclear receptors: insights from structural studies. *Trends in Cell Biology* **14**, 369–376 (2004).
- Benton, R. Evolution and revolution in odor detection. *Science* **326**, 382–383 (1999).
- Benton, R., Vannice, K. S. & Vosshall, L. B. An essential role for a CD36-related receptor in pheromone detection in *Drosophila*. *Nature* **450**, 289–295 (2007).
- Bentz, B. J. Bark beetles in the genus *Dendroctonus*. In *Encyclopedia of entomology*. (eds Capinera, L. J.) 233–235 (Academic Publishers, 2004).
- Billings, R. F. Direct control of the southern pine beetle: Rationale, effectiveness at the landscape level, and implications for future use of semiochemicals. in *Proceedings of joint IUFRO working Party Conference: Behavior, Population dynamics, and control of forest insects*. (eds Hain, F. P., Salom, S. M., Ravlin, M. F., Payne T. L. and Raffa, K-F.) 313–329 (Maui, 1995).
- Blomquist, J. G. *et al.* Pheromone production in bark beetles. *Insect Biochemistry and molecular Biology* **40**, 699–712 (2010).
- Borden, H. J. Semiochemicals and bark beetle populations: Exploitation of natural phenomena by pest management strategist. *Holarctic Ecology* **12**, 501–510 (1989).
- Briand, L. *et al.* Characterization of a chemosensory protein (ASP3c) from honeybee (*Apis mellifera* L.) as a brood pheromone carrier. *European Journal of Biochemistry* **269**, 4586–4596 (2002).
- Brito, F. N., Moreira, F. M. & Melo, C.A. A. A look inside odorant-binding protein in insect chemoreception. *Journal of Insect Physiology* **95**, 51–65 (2016).
- Byers J. A. & Zhang, Q. Chemical ecology of bark beetles in regard to search and selection of host trees. in *Recent Advances in Entomological Research*. (eds Liu, T. & Kang, L.) 132–150 (Higher Education Press, 2011).

- Byers, A. J. Chemical ecology of bark beetles. *Experientia* **45**, 271-283 (1989).
- Byers, J. Chemical ecology of bark beetles in a complex olfactory landscape. in *Bark and wood boring insects in living trees in Europe, a synthesis* (eds. Lieutier, F., Day, K.R., Battisti, A., Grégoire, J. C. & Evans H. F.) 89-134 (Springer, 2007).
- Carraher, C., Dalziel, J., Jordan, M. D., Christie, D. L., Newcomb, R. D. & Kralicek, A. V. Towards an understanding of the structural basis for insect olfaction by odorant receptors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **66**, 31–41 (2015).
- Cervantes-Martínez, R. *et al.* Historical bark beetle outbreaks in Mexico, Guatemala and Honduras (1895-2015) and their relationship with droughts. *Rev. Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* **25**, 269-290 (2019).
- Chansler, J. F. Biology and life history of *Dendroctonus adjunctus* (Coleoptera: Scolytidae). *Annals of the Entomological Society America* **60**, 760-767 (1967).
- Chen, H., Lin, L., Xie, M., Zhang, G. & Su, W. De novo sequencing, assembly and characterization of antennal transcriptome of *Anomala corpulenta* Motschulsky (Coleoptera: Rutelidae). *PLOS ONE* **10**(4), e0127303; 10.1371/journal.pone.0127303 (2014).
- Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., & Gu, J. Fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics* **34**(17); i884–i890 doi:10.1093/bioinformatics/bty560 (2018).
- Cibrián, T. D., Méndez, T.M. J., Campos, B. R., Yates, O. H. & Flores, L. J. *Forest Insects of Mexico*. (Universidad Autónoma Chapingo, 1995).
- Cognato, A. I. & Sperling, F. A. Phylogeny of *Ips* DeGeer species (Coleoptera: Scolytidae) inferred from mitochondrial cytochrome oxidase I DNA sequence. *Mol. Phylogenet. Evol.* **14**, 445–460 (2000).
- Conesa, A., Gotz, S., Garcia-Gomez, J. M., Terol, J., Talon, M., & Robles, M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* **21**(18), 3674–3676 (2005).
- Coulson, R. & Witter, J., *Entomología Forestal: ecología y control*. (Limusa, 1990).
- Croset, V. *et al.* Ancient protostome origin of chemosensory ionotropic glutamate receptors and the evolution of insect taste and olfaction. *PLoS Genet* **6**(8), e1001064; 10.1371/journal.pgen.1001064 (2010).

- Cullingham, C. I. *et al.* The contribution of genetics and genomics to understanding the ecology of the mountain pine beetle system. *Can. J. For. Res* In press; 10.1139/cjfr-2018-0303 (2019).
- Dani, F. R. *et al.* Odorant-binding proteins and chemosensory proteins in pheromone detection and release in the silkworm *Bombyx mori*. *Chemical Senses* **36**, 335–344 (2011).
- Darriba, D., Posada, D., Kozlov, A. M., Stamatakis, A., Morel, B., & Flouri, T. ModelTest-NG: a new and scalable tool for the selection of DNA and protein evolutionary models. *Molecular Biology and Evolution* **37**, 29-294 (2019).
- Davis, I. W. *et al.* MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Research* **35**, W375–W383; 10.1093/nar/gkm216 (2007).
- De Wit, P. *et al.* The simple fool’s guide to population genomics via RNA-Seq: an introduction to high-throughput sequencing data analysis. *Molecular Ecology Resources* **12**(6), 1058–1067 (2012).
- Depetris-Chauvin, A., Galagovsky, D. & Grosjean, Y. Chemicals and chemoreceptors: ecologically relevant signals driving behavior in *Drosophila*. *Front. Ecol. Evol.* **3**, 41; 10.3389/fevo.2015.00041 (2015).
- Devillers, J. Computational design of chemicals for the control of mosquitoes and their diseases (ed. Devillers, J.) 25-468 (CRC Press, 2018).
- Dimitratos, D. S., Hommel, S. A., Konrad, D. K., Simpson, M. L., Wu-Woods J. J. & Woods, F. D. Biosensors to monitor water quality utilizing insect odorant-binding proteins as detector elements. *Biosensors* **9**(2), 62; 10.3390/bios9020062 (2019).
- Dippel, S. *et al.* Tissue-specific transcriptomics, chromosomal localization, and phylogeny of chemosensory and odorant binding proteins from the red flour beetle *Tribolium castaneum* reveal subgroup specificities for olfaction or more general functions. *BMC Genomic* **15**, 1141; 1186/1471-2164-15-1141 (2014).
- Erbilgin, N., Powell, J. S., & Raffa, K. F. Effect of varying monoterpene concentrations on the response of *Ips pini* (Coleoptera: Scolytidae) to its aggregation pheromone: implications for pest management and ecology of bark beetles. *Agricultural and Forest Entomology* **5**(4), 269–274 (2003).

- Fan, J., Francis, F., Lim, Y., Chen, J. L. & Cheng, D. F. An overview of odorant-binding protein functions in insect peripheral olfactory reception. *Genetics and Molecular Research* **10**, 3056-3069 (2011).
- FAO. 2009. The impacts of climate change on forest health. Recuperado el 18 de mayo de 2020, de FAO: <http://www.fao.org/3/a-k3837s.pdf>
- Field, L. M., Pickett, J. A., & Wadhams, L. J. Molecular studies in insect olfaction. *Insect Molecular Biology* **9**(6), 545–551 (2000).
- Finn, R. D. *et al.* The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research* **38**, D211–D222 doi:10.1093/nar/gkp985 (2009).
- Fonseca G. J., Santos-Posadas, H., Llanderal, C. C., Cibrián-Tovar, D., Rodríguez, T. D., Vargas, H. J. *Ips* e insectos barrenadores en árboles de *Pinus montezumae* dañados por incendios. *Madera y bosques* **14**, 69-80 (2008).
- Forêt, S. & Maleszka, R. Function and evolution of a gene family encoding odorant binding-like proteins in a social insect, the honey bee (*Apis mellifera*). *Genome Res.* **16**, 1404–1413 (2006).
- Forêt, S. & Maleszka, R. Function and evolution of a gene family encoding odorant binding-like proteins in a social insect, the honey bee (*Apis mellifera*). *Genome Research* **16**, 1404–1413 (2006).
- Forstner, M. *et al.* Differential expression of SNMP-1 and SNMP-2 proteins in pheromone-sensitive hairs of moths. *Chem. Senses* **33**, 291–299; 10.1093/chemse/bjm087 (2008).
- Galko, J. *et al.* Effectiveness of pheromone traps for the European spruce bark beetle: a comparative study of four commercial products and two new models. *Lesn. Cas. For. J.* **62**, 207-215 (2016).
- Gitlin, I., Carbeck, J. D. & Whitesides, G. M. Why are proteins charged? Networks of charge-charge interactions in proteins measured by charge ladders and capillary electrophoresis. *Angew Chem Int Ed Engl* **45**, 3022–3060 (2006).
- Goldman-Huertas, B. *et al.* Evolution of herbivory in Drosophilidae linked to loss of behaviors, antennal responses, odorant receptors, and ancestral diet. *Proc Natl Acad Sci USA* **112**, 3026–31 doi: 10.1073/pnas.1424656112 (2015).

- Gomez-Diaz, C. *et al.* A CD36 ectodomain mediates insect pheromone detection via a putative tunneling mechanism. *Nature Communications* **7**, 11866; 10.1038/ncomms11866 (2016).
- Gómez-Díaz, C., Martín, F., García-Fernandez, J. M. & Alcorta, E. The two main olfactory receptor families in *Drosophila*, ORs and IRs: a comparative approach. *Front. Cell. Neurosci.* **12**, 253; 10.3389/fncel.2018.00253 (2018).
- Gong, D. P., Zhang, H. J., Zhao, P., Xia, Q. Y. & Xiang, Z. H. The odorant binding protein gene family from the genome of silkworm *Bombyx mori*. *BMC Genomics* **10**, 332; 10.1186/1471-2164-10-332 (2009).
- González, D. *et al.* The major antennal chemosensory protein of red imported fire ant workers. *Insect Molecular Biology* **18**(3), 395–404 (2009).
- Govindaraju, A. Odorant Binding Proteins: a key player in the sense of smell. *Bioinformatics* **14**(1), 036-037 doi :10.6026/97320630014036 (2018).
- Gu, S.-H. *et al.* Identification and comparative expression analysis of odorant binding protein genes in the tobacco cutworm *Spodoptera litura*. *Sci. Rep.* **5**, 13800; 10.1038/srep13800 (2015).
- Gu, S.-H. *et al.* Identification of genes expressed in the sex pheromone gland of the black cutworm *Agrotis ipsilon* with putative roles in sex pheromone biosynthesis and transport. *BMC Genomics* **14**, 636 (2013).
- Gu, X.-C., Zhang, Y.-N., Kang, K., Dong, S.-L. & Zhang, L.-W. Antennal transcriptome analysis of odorant reception genes in the red turpentine beetle (RTB) *Dendroctonus valens*. *PLoS ONE* **10**, e0125159; 10.1371/journal.pone.0125159 (2015).
- Guo, Z., Cheng, Z. Y., Huang, F., Luttrell, R. & Leonard, R. Microarray analysis of global gene regulation in the Cry1Ab-resistant and Cry1Ab-susceptible strains of *Diatraea saccharalis*. *Pest Manag Sci* **68**, 718–730 (2012).
- Haas, B. J. *et al.* De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature Protocols* **8**(8), 1494–1512 (2013).
- Hallem, E. A. & Carlson, J. R. Coding of odors by a receptor repertoire. *Cell* **125**(1), 143–160 (2006).
- Hansson, S. B. & Stensmyr, M. C. Evolution of insect olfaction. *Neuron* **72**, 698-711 (2011).

- Hekmat-Scafe, D. S., Scafe, R. C., McKinney, J. A. & Tanouye, A. M. Genome-wide analysis of the odorant-binding protein gene family in *Drosophila melanogaster*. *GENome Res.* **12**(9), 1357-1369 (2002).
- Hlásny, T. *et al.* 2019. Living with bark beetles: impacts, outlook and management options. Recuperado el 18 de mayo de 2020, de European Forest Institute: https://www.efi.int/sites/default/files/files/publication-bank/2019/efi_fstp_8_2019.pdf
- Hu, P., Wang, J., Cui, M., Tao, J. & Luo, Y. Antennal transcriptome analysis of the asian longhorned beetle *Anoplophora glabripennis*. *Sci. Rep.* **6**, 26652; 10.1038/srep26652 (2016).
- Huey R. B., Gilchrist, G. W. & Hendry, A. P. Using invasive species to study evolution: Case studies with *Drosophila* and salmon. in *Species Invasions: insights into ecology, evolution, and biogeography.* (eds. Sax, D. F., Stachowicz, J. J., Gaines, S. D.) 139-164 (Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc., 2005).
- Ingham, A. V. 2015. Identification of novel transcripts involved in insecticide resistance in African malaria vectors. Recuperado el 18 de mayo de 2020 de University of Warwick: <https://core.ac.uk/download/pdf/42621909.pdf>
- Ingraham, H. A. & Redinbo, M. R. Orphan nuclear receptors adopted by crystallography. *Current Opinion in Structural Biology* **15**, 708–715 (2005).
- Iovinella, I. *et al.* Differential expression of odorant-binding proteins in the mandibular glands of the honey bee according to caste and age. *Journal of Proteome Research* **10**, 3439–3449 (2011).
- Ishida, Y. & Leal, W. S. Chiral discrimination of the Japanese beetle sex pheromone and a behavioral antagonist by a pheromone-degrading enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 9076–9080 (2008).
- Isono, K., & Morita, H. Molecular and cellular designs of insect taste receptor system. *Front. Cell. Neurosci.* **4**; 10.3389/fncel.2010.00020 (2010).
- Jacquín-Joly, E., Vogt, R. G., François, M.-C. & Nagnan-Le, M. P. Functional and expression pattern analysis of chemosensory proteins expressed in antennae and pheromonal gland of *Mamestra brassicae*. *Chemical senses* **26**, 833–844 (2001)
- Jansen, S. *et al.* Structure of *Bombyx mori* chemosensory protein 1 in solution. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **66**, 135–145 (2007).

- Jayanthi, P. D. K. *et al.* Computational reverse chemical ecology: virtual screening and predicting behaviorally active semiochemicals for *Bactrocera dorsalis*. *BMC Genomics* **15**, 209 doi: 10.1186/1471-2164-15-209 (2014)
- Jiang, X., Pregitzer, P., Grosse-Wilde, E., Breer, H. & Krieger, J. Identification and characterization of two "sensory neuron membrane proteins" (SNMPs) of the desert locust, *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae). *Journal of Insect Science* **16**, 1-10 (2016).
- Jin, X., Ha, S. T. & Smith, P. D. SNMP is a signaling component required for pheromone sensitivity in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 10996–11001 (2008).
- Joint Genome Institute. 2011. Transcriptome or Gene expression, *Dendroctonus frontalis*. Recuperado el 18 de mayo de 2020, de NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/79903>
- Keeling, C. *et al.* Draft genome of the mountain pine beetle, *Dendroctonus ponderosae* Hopkins a major forest pest. *Genome Biology* **14**, R27; 0.1186/gb-2013-14-3-r27 (2013).
- Kelley, S. T. & Farrell, B. D. Is specialization a dead end? The phylogeny of host use in *Dendroctonus* bark beetles (Scolytidae). *Evolution* **52**, 1731–1743 (1998).
- Kim, D. E., Chivian, D., & Baker, D. Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. *Nucleic Acids Research* **32**, W526–W531; 10.1093/nar/gkh468 (2004).
- Kitabayashi, A. N., Arai, T., Kubo, T. & Natori, S. Molecular cloning of cDNA for p10, a novel protein that increases in the regenerating legs of *Periplaneta americana* (American cockroach). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **28**, 785–790 (1998).
- Krieger, J., Klink, O., Mohl, C., Raming, K. & Breer, H. A candidate olfactory receptor subtype highly conserved across different insect orders. *J. Comp. Physiol. A* **189**, 519–526 (2003).
- Kulmuni, J. & Havukainen, H. Insights into the evolution of the CSP gene family through the integration of evolutionary analysis and comparative protein modeling. *PLoS One* **8**, e63688; 10.1371/journal.pone.0063688 (2013).
- Kulmuni, J., Wurm, Y. & Pamilo, P. Comparative genomics of chemosensory protein genes reveals rapid evolution and positive selection in ant-specific duplicates. *Heredity* **110**, 538–547 (2013).

- Lagarde, A., Spinellu, S., Qiao, H., Tegoni, M., Pelosi, P. & Cambillau, C. Crystal structure of a novel type of odorant-binding protein from *Anopheles gambiae*, belonging to the C-pluss class. *Biochem J.* **437**(3), 423-430 (2011).
- Lampson, D. B., Khalilian, A., Greene, K. J., Han, J. H. & Degenhardt, C. D. development of a portable electronic nose for detection of cotton damaged by *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae). *Journal of Insects* **4**, 1-8 (2014).
- Landaverde, T. R. Los escarabajos descortezadores del género *Dendroctonus* Erickson: Plaga de las pináceas en Centro América. Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (2001).
- Langeswaran, K., Jeyaraman, J., Mariadasse, R. & Soorangkattan, S. Insights from the molecular modeling, docking analysis of illicit drugs and bomb compounds with honey bee odorant binding proteins (OBPs). *Bioinformation* **14**(5), 219-231 (2018).
- Larsson, M. C., Domingos, A. I., Jones, W. D., Chiappe, M. E., Amrein, H. & Vosshall, L. B. Or83b encodes a broadly expressed odorant receptor essential for *Drosophila* olfaction. *Neuron* **43**(5):703–714 (2004).
- Laskowski, R. A., Furnham, N. & Thornton, J. M. The ramachandran plot and protein structure validation. *Biomolecular Forms and Functions* **62–75** (2013).
- Laughlin, J. D., Ha, T. S., Jones, D. N. M. & Smith, D. P. Activation of pheromone sensitive neurons is mediated by conformational activation of pheromone binding protein. *Cell* **133**, 1255–1265 (2008).
- Lavagnino, N., Serra, F., Arbiza, L., Dopazo, H. & Hasson, E. Evolutionary genomics of genes involved in olfactory behavior in the *Drosophila melanogaster* species group. *Evol Bioinform.* **8**, 89–104; 10.4137/EBO.S8484 (2012).
- Leal, W. S. Odorant reception in insects: roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes. *Annu. Rev. Entomol.* **58**, 373–391 (2012).
- Leal, W. S. Odorant Reception in insects: roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes. *Annu. Rev. Entomol.* **58**, 373-391 (2013).
- Leal, W. S. Pheromone reception. *Topics in Current Chemistry* **240**, 1-36 (2005)
- Letunic, Ivica & Bork, Peer. Interactive Tree of Life (ITOL) v3: An online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Research* **44**, gkw290 10.1093/nar/gkw290 (2016).

- Li, D.-Z. *et al.* Structure-Based analysis of the ligand-binding mechanism for DhelOBP21, a c-minus odorant binding protein, from *Dastarcus helophoroides* Fairmaire (Coleoptera: Bothrideridae). *Int. J. Biol. Sci.* **11**, 1281-1295 (2015).
- Li, Z. *et al.* Identification, expression patterns, and functional characterization of chemosensory proteins in *Dendroctonus armandi* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Front. Physiol.* **9**, 291; 10.3389/fphys.2018.00291 (2018).
- Li, Z.-Q. *et al.* Two minus-C odorant binding proteins from *Helicoverpa armigera* display higher ligand binding affinity at acidic pH than neutral pH. *Journal of Insect Physiology.* **59**, 263–272 (2013).
- Li, Z.-Q., He, P., Zhang, Y.-N. & Dong, S.-L. Molecular and functional characterization of three odorant-binding protein from *Periplaneta americana*. *PLoS ONE* **12**, e0170072; 10.1371/journal.pone.0170072 (2017).
- Lindgren, B. S., & Miller, R. D. Effect of verbenone on five species of bark beetles (Coleoptera: Scolytidae) in lodgepole pine forests. *Environ. Entomol Environmental Entomology* **31**(5), 759–765 (2002).
- Liu, C., Zhang, J., Liu, Y., Wang, G. & Dong, S. Expression of SNMP1 and SNMP2 genes in antennal sensilla of *Spodoptera exigua* (HÜBNER). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **85**, 114–126 (2014)
- Liu, G. *et al.* Biotype characterization, developmental profiling, insecticide response and binding property of *Bemisia tabaci* chemosensory proteins: role of CSP in insect defense. *PLoS ONE* **11**, e0154706; 10.1371/journal.pone.0154706 (2016).
- Liu, S. *et al.* Identification and characterization of two sensory neuron membrane proteins from *Cnaphalocrocis medinalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **82**, 29–42 (2013).
- Lu, Y. *et al.* Olfactory biosensor for insect semiochemicals analysis by impedance sensing of odorant-binding proteins on interdigitated electrodes. *Biosensors and Bioelectronics* **67**, 662-669; 10.1016/j.bios.2014.09.098 (2014).
- Macías-Sámano J. E. Mediación semioquímica entre insectos descortezadores y árboles de coníferas. in *Interacciones químicas entre organismos, aspectos básicos y perspectivas de aplicación.* (eds. Anaya, L. A., Espinosa-García, J. F. & Cruz-Ortega, R.) 459-503 (Plaza y Valdez, 2001)

- Macías-Sámamo, J. E., Niño Domínguez, A., Cruz-López A. J. Altúzar-Mérida, R. & Maldonado, O. Monitoreo de descortezadores y sus depredadores mediante el uso de semioquímicos. Manual Operativo. (Ecosur, 2004).
- Mameli, M., Tuccini, A., Mazza, M., Petacchi, R. & Pelosi, P. Soluble proteins in chemosensory organs of phasmids. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **26**, 875–882 (1996).
- Marchese, S. *et al.* Soluble proteins from chemosensory organs of *Eurycantha calcarata* (Insecta, Phasmatodea). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **30**, 1091–1098 (2000).
- Mardis, E. R. A decade's perspective on DNA sequencing technology. *Nature* **470**, 198–203 (2011).
- McFarlane, B. L. & Witson, T. O. D. Perceptions of ecological risk associated with mountain pine beetle (*Dendroctonus ponderosae*) infestations in Banff and Kootenay National Parks of Canada. *Risk Anal.* **28**, 203–212 (2008).
- McKenna, M. P., Hekmat-Safe, D. S., Gaines, P. & Carlson, J. R. Putative *Drosophila* pheromone-binding proteins expressed in a subregion of the olfactory system. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 16340–16347 (1994).
- Mei, T., Fu, W.-B., Li, B., He, Z.-B. & Chen, B. Comparative genomics of chemosensory protein genes (CSPs) in twenty-two mosquito species (Diptera: Culicidae): Identification, characterization and evolution. *PLoS ONE* **13**, e0190412; 10.1371/journal. Pone.0190412 (2018).
- Metzker, M. Sequencing technologies, the next generation. *Nat Rev Genet* **11**, 31–46 (2010).
- Mi, H. *et al.* PANTHER version 11: expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and data analysis tool enhancements. *Nucleic Acids Research* **45**, D183–D189 doi:10.1093/nar/gkw1138 (2016).
- Missbach, C. *et al.* Evolution of insect olfactory receptors. *eLife* **3**: e02115; 10.7554/eLife.02115 (2014).
- Mitchell, A. *et al.* The InterPro protein families database: the classification resource after 15 years. *Nucleic Acids Research* **43**, D213–D221; 10.1093/nar/gku1243 (2014).
- Montagné, N., de Fouchier, A., Newcomb, D. R. & Jacquín-Joly, E. Advances in the Identification and Characterization of Olfactory Receptors. in *Insects*. In *Molecular Basis of Olfaction* (eds Glatz, R.) 144p. (Academic Press, 2015).

- Mosbah, A. *et al.* Solution structure of a chemosensory protein from the moth *Mamestra brassicae*. *Biochemical Journal* **369**, 39–44 (2003).
- Mustaoarta, H. Central mechanisms of pheromone information processing. *Chem. Senses* **21**, 269–275 (1996).
- Mutis, A. *et al.* Molecular characterization and in silico analysis of the pheromone-binding protein of the European grapevine moth *Lobesia botrana* (Denis & Schiffermüller) (Lepidoptera, Tortricidae). *Neotropical Entomology* **43**, 266–275 (2014).
- Nagnan-Le, M. P. *et al.* Chemosensory proteins from the proboscis of *Mamestra brassicae*. *Chemical Senses* **25**, 541–553 (2000).
- Neculai, D. *et al.* Structure of LIMP-2 provides functional insights with implications for SR-BI and CD36. *Nature* **504**, 172–176 (2013).
- Nichols, Z. & Vogt, R. G. The SNMP/CD36 gene family in Diptera, Hymenoptera and Coleoptera: *Drosophila melanogaster*, *D. pseudoobscura*, *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti*, *Apis mellifera* and *Tribolium castaneum*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **38**, 398–415 (2008).
- Nikonov, A. A., Peng, G., Tsurupa, G. & Leal, W. S. Unisex pheromone detectors and pheromone-binding proteins in Scarab beetles. *Chem- Senses.* **27**, 495-504 (2002).
- Nomura, A., Kawasaki, K., Kubo, T. & Natori, S. Purification and localization of p10, a novel protein that increases in nymphal regenerating legs of *Periplaneta americana* (American cockroach). *The International Journal of Developmental Biology* **36**, 391–398 (1992).
- Nordlund, D. A. Semiochemicals: a review of the terminology. in Semiochemicals: their role in pest control. (eds Nordlund, D. A., Jones, R. L. and Lewis, W. J.).13-28 (John Wiley and Sons, 1982).
- Oliveira, D. S., Brito, N. F., Franco, T. A., Moreira, M. F., Leal, W. S. & Melo, A. C. A. Functional characterization of odorant binding protein 27 (RproOBP27) from *Rhodnius prolixus* antennae. *Front. Physiol.* **9**, 1175 (2018).
- Oppenheim, J. S., Baker, H. R., Simon, S. & DeSalle, R. We can't all be supermodels: the value of comparative transcriptomics to the study of non-model insects. *Insect Molecular Biology* **24**, 139–15 (2015).
- Ozaki, M. *et al.* Ant nestmate and non-nestmate discrimination by a chemosensory sensillum. *Science* **309**, 311–314 (2005).

- Paas, Y. *et al.* How well can molecular modeling predict the crystal structure: the case of the ligand-binding domain of glutamate receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* **21**, 87–92 (2000).
- Paine, T. D., Raffa, K. F. & Harrington, T. C. Interactions among Scolytid bark beetles, their associated fungi, and live host conifers. *Annual Review of Entomology* **42**, 179–206 (1997).
- Patrick, M. A., & Dezene, P. W. TRIA-Net: 10 years of collaborative research on turning risk into action for the mountain pine beetle epidemic. *Can. J. For. Res* **49**, iii–v; 10.1139/cjfr-2019-0384 (2019).
- Pearl, F. The CATH Domain Structure Database and related resources Gene3D and DHS provide comprehensive domain family information for genome analysis. *Nucleic Acids Research* **33**, D247–D251 doi:10.1093/nar/gki024 (2004).
- Pelletier, J., Guidolin, A., Syed, Z., Cornel, A. J. & Leal, W. S. Knockdown of a mosquito odorant-binding protein involved in the sensitive detection of oviposition attractants. *J. Chem. Ecol.* **36**, 245–248 (2010).
- Pelosi, P. & Maida, R. Odorant-binding proteins in insects. *Comp Biochem Physiol* **111**, 503–514 (1995).
- Pelosi, P., Calvello, M. & Ban, L. Diversity of odorant-binding proteins and chemosensory proteins in insects. *Chem. Senses.* **30**, 291–292 (2005).
- Pelosi, P., Iovinella, I., Felicioli, A. & Dani, F. R. Soluble proteins of chemical communication: an overview across arthropods. *Frontiers in Physiology* **5**, 1–13 (2014).
- Pelosi, P., Iovinella, I., Zhu, J., Wang, G. & Dani, F. R. Beyond chemoreception: diverse tasks of soluble olfactory proteins in insects. *Biological Reviews.* **93**, 184–200 (2018).
- Pelosi, P., Zhou, J.-J., Ban, L. P. & Calvello, M. Soluble proteins in insect chemical communication. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 1658–1676 (2006).
- Pepino, M. Y., Kuda, O., Samovski, D. & Abumrad, N. A. Structure-function of CD36 and importance of fatty acid signal transduction in fat metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* **34**, 281–303 (2014a).
- Pepino, M. Y., Kuda, O., Samovski, D. & Abumrad, N. A. Structure-function of CD36 and importance of fatty acid signal transduction in fat metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* **34**, 281–303 (2014b).

- Pesenti, M. E. *et al.* Structural basis of the honey bee PBP pheromone and pH induced conformational change. *J. Mol. Biol.* **380**, 158-169 (2008).
- Pettersen, E. F. *et al.* UCSF Chimera? A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry* **25**(13), 1605–1612 (2004).
- Pikielny, C. W., Hasan, G., Rouyer, F. & Rosbash, H. Members of a family of *Drosophila* putative odorant-binding proteins are expressed in different subsets of olfactory hairs. *Neuron* **12**, 35–49 (1994).
- Plettner, E. Insect pheromone olfaction: new targets for the design of species-selective pest control agents. *Current Medicinal Chemistry* **9**, 1075-1085 (2002).
- Portilla-Pulido, J. S., Castillo-Morales, M. R., Barón-Rodríguez, A. M., Duque, E. J. & Méndez-Sánchez, C. S. Design of a repellent against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) using in silico simulations with AegOBP1 protein. *Journal of Medical Entomology* **57**(2), 463-476 (2020).
- Qi-Lin, Z. & Ming-Long, Y. Progress in insect transcriptomics based on the next-generation sequencing technique. *Issue* **56**(12), 1489-1508 (2013).
- Raffa, K. F. Mixed messages across multiple trophic levels: The ecology of bark beetle chemical communication systems. *Chemoecology* **11**, 49-65 (2001).
- Raffa, K. F., Andersson M. N. & Schlyter, F. Host selection by bark beetles: playing the odds in a high-stakes game. in *Advances in insect physiology, pine bark beetles* (eds. Tittiger, C. & Bloquist, G. J.) 1-74 (Oxford, 2016)
- Raffa, K. F., Grégoire, J. & Lindgren, B. S. 2015. Natural history and ecology of bark beetles. in *Bark beetles: biology and ecology of native and invasive species*. (eds F. Vega, E. F. & Hofstetter, W. R.) 1–40 (Academic Press, 2015).
- Raffa, K. F., Phillips, W. T. & Salom, M. S. Strategies and mechanisms of host colonization by bark beetles. in *Beetle-pathogen interactions in conifer forests*. (eds Schowalter, D. T. & Filip, M. G.) 103-120 (Academic Press, 1993).
- Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G., & Suchard, M. A. Posterior Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1.7. *Systematic Biology*. doi:10.1093/sysbio/syy032 (2018).
- Rodríguez, O. A., Equihua, M. A., Cibrián, T. J. & Estrada, V. E. G. Fluctuación de *Dendroctonus adjunctus* Blandford (Curculinoidea: Scolytinae) y sus depredadores

- atraídos por frontalina + alfa-pineno, en la estación experimental de Zoquiapan Edo. de México. *Boletín del Museo de Entomología de la Universidad del Valle* 11, 20-27 (2010).
- Rogers, M. E., Krieger, J. & Vogt, R. G. Antennal SNMPs (sensory neuron membrane proteins) of Lepidoptera define a unique family of invertebrate CD36-like proteins. *J. Neurobiol.* **49**, 47–61 (2001).
- Rogers, M. E., Krieger, J., Vogt, R. G. Antennal SNMPs (sensory neuron membrane proteins) of Lepidoptera define a unique family of invertebrate CD36-like proteins. *J. Neurobiol.* **49**, 47–61 (2001a)
- Rogers, M. E., Steinbrecht, R. A., Vogt, R. G. Expression of SNMP-1 in olfactory neurons and sensilla of male and female antennae of the silkworm *Antheraea polyphemus*. *Cell Tissue Res.* **303**, 433–446 (2001b).
- Rogers, M. E., Sun, M., Lerner, R. M. & Vogt, G. R. Snmp-1, a novel membrane protein of olfactory neurons of the silk moth *Antheraea polyphemus* with homology to the CD36 family of membrane proteins. *J. Biol. Chem.* **272**: 14792–14799 (1997).
- Rutzler, M. & Zwiebel, L. Molecular biology of insect olfaction: Recent progress and conceptual models. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Beh Physiol*, 1–14 (2005).
- Rytz, R., Croset, V. & Benton, R. Ionotropic Receptors (IRs): Chemosensory ionotropic glutamate receptors in *Drosophila* and beyond. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **43**(9), 888-97 (2013),
- Sabatier, L. *et al.* Two *Drosophila* molecules related to pheromone/odor-binding proteins induced by viral and bacterial infections. *European Journal of Biochemistry* **270**, 3398–3407 (2003).
- Sachse, S. & Krieger, J. Olfaction in insects: the primary processes of odor recognition and coding. *E-Neuroforum* **2**, 49-60 (2011).
- Salinas–Moreno Y., Vargas, C. F., Zúñiga, G., Víctor, J., Ager, A. & Hayes, J. L. Atlas de distribución geográfica de los descortezadores del género *Dendroctonus* (Curculionidae: Scolytinae) en México. (Instituto Politécnico Nacional–Comisión Nacional Forestal, 2010a).

- Salinas-Moreno, Y. *et al.* Areography of the genus *Dendroctonus* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) in Mexico. *J. Biogeogr.* **31**, 1163–1177 (2004).
- Salinas-Moreno, Y., Ager, A., Vargas, C. F., Hayes, J. L. & Zúñiga, G. Determining the vulnerability of Mexican pine forest to bark beetles of the genus *Dendroctonus* Erichson (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Forest Ecol. Manag.* **260**, 52-61 (2010b).
- Salinas-Moreno, Y., Mendoza, M. G., Barrios, M. A., Cisneros, R., Macías-Sámamo, J., Zúñiga, G. Areography of the genus *Dendroctonus* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) in Mexico. *J. Biogeogr.* **31**, 1163-1177 (2004).
- Sánchez-Gracia, A., Vieira, G. F. & Rozas, J. Molecular evolution of the major chemosensory gene families in insects. *Heredity* **103**, 208-216 (2009).
- Sánchez-Martínez, G. 2018. Plagas en ambientes forestales naturales: El cambio climático y su efecto en la salud forestal. Recuperado el 18 de mayo de 2020, de Red de Salud Forestal: <http://redsaldudforestal.com/temas.php?id=1>
- Sato, K. & Touhara, K. 2009. Insect olfaction: receptors, signal transduction, and behavior. *Results Probl. Cell Differ* **47**, 121–138 (2009).
- Sato, K., Pellegrino, M., Nakagawa, T., Vosshall, L. B. & Touhara, K. Insect olfactory receptors are heteromeric ligand-gated ion channels. *Nature* **452**(7190), 1002–1006 (2008).
- Schwede, T., Kopp, J., Guex, N. & Peitsch, M. C. SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research* **31**(13), 3381–3385 (2003).
- Schwede, T., Sali, A., Eswar, N., & Peitsch, M. C. Protein Structure Modeling. *Computational Structural Biology*, 3-35 (2008).
- Seybold, J. S., Bentz, J. B., Fettig, J. C., Lundquist, E. J. Progar, A. R. & Gillete, E. N. Management of western north American bark beetles with semiochemicals. *Annu. Rev. Entomol.* **63**, 407–32 (2018).
- Seybold, S. J., Bohlmann, J., & Raffa, K. F. Biosynthesis of coniferophagous bark beetle pheromones and conifer isoprenoids: Evolutionary perspective and synthesis. *The Canadian Entomologist* **132**(06), 697–753 (2000).
- Shanbhag, S. R., Muller, B. & Steinbrecht, R. A. Atlas of olfactory organs of *Drosophila melanogaster* 2. Internal organization and cellular architecture of olfactory sensilla. *Arthropod Struct Dev* **29**, 211–229 (2000).

- Shen, W. J., Hu, J., Hu, Z., Kraemer, F. B. & Azhar, S. Scavenger receptor class B type I (SR-BI): a versatile receptor with multiple functions and actions. *Metabolism* **63**, 875–886 (2014).
- Sievers, F., & Higgins, D. G. Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences. *Protein Science* **27**(1), 135–145 (2017).
- Silverstein, R. L. & Febbraio, M. CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Sci. Signal.* **2**, re3 (2009).
- Song, Y.-Q., Sun, H.-Z. & Du, J. Identification and tissue distribution of chemosensory protein and odorant binding protein genes in *Tropidothorax elegans* Distant (Hemiptera: Lygaeidae). *Sci. Rep.* **8**, 7803; 10.1038/s41598-018-26137-6 (2018).
- Soroker, V., Harari, A. & Faleiro, R. J. The role of semiochemicals in date pest management. in Sustainable pest management in date palm: current status and emerging challenges. (eds Wakil, W., Faleiro, R. J. & Miller, T.) 445p (Springer, 2015).
- Spinelli, S. *et al.* Crystal structure of *Apis mellifera* OBP14, a C-minus odorant-binding protein, and its complexes with odorant molecules. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **42**, 41–50 (2012).
- Staton, E. (2018) Sestaton/Hmmer2Go: Hmmer2Go Version 0.17.8. Recuperado el 18 de mayo de 2020, de Zenodo: <https://doi.org/10.5281/zenodo.592436>.
- Steinbrecht, R. A. Odorant-binding proteins: expression and function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **855**, 323–332 (1998).
- Suchard, M. A., Lemey, P., Baele, G., Ayres, D. L., Drummond, A. J., & Rambaut, A. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evolution* **4**; 10.1093/ve/vey016 (2018).
- Suh E, Bohbot, J. D. & Zwiebel, L. J. Peripheral olfactory signaling in insects. *Curr Opin Insect Sci* **6**, 86–92 (2014).
- Sun, Y. *et al.* New Analogues of (E)- β -Farnesene with insecticidal activity and binding affinity to aphid odorant-binding proteins. *J. Agric. Food. Chem.* **59**, 2456-2461 (2011).
- Suwannapong, C. & Benbow, M. E. Sources of insect odors: pheromone glands and odor production. in The biology of odors: sources, olfaction and response. (eds. Logan, E. W. & Atwood, J. M.) 153-184 (Nova Science Publishers, 2011).

- Symonds, M. R. E. & Elgar, M. A. The mode of pheromone evolution: evidence from bark beetles. *Proc. Biol. Sci.* **271**, 839–846 (2004).
- Tagu, D., Colbourne, J. K., & Nègre, N. Genomic data integration for ecological and evolutionary traits in non-model organisms. *BMC Genomics* **15**, 490; 10.1186/1471-2164-15-490 (2014).
- Tanaka, K. *et al.* Highly selective tuning of a silkworm olfactory receptor to a key mulberry leaf volatile. *Curr Biol.* **19**(11), 881–890 (2009).
- Tegoni, M., Campanacci, V. & Cambillau, C. Structural aspects of sexual attraction and chemical communication in insects. *Trends Biochem Sci.* **29**, 257–264 (2004).
- Tillman, J. A. *et al.* Insect pheromones an overview of biosynthesis and endocrine regulation. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* **29**, 481–514 (1999).
- Tomaselli, S. *et al.* Solution structure of a chemosensory protein from the desert locust *Schistocerca gregaria*. *Biochemistry* **45**, 10606–10613 (2006).
- Torres-Espinosa, L. M., Sánchez-Salas, J. A., Cano-Pineda, A. & Martínez-Burdaga, O. U. Uso de feromonas en el manejo integrado del descortezador de pinos *Dendroctonus adjunctus* Blandford. *Folleto Técnico Núm.* **13**, 1-16 (2004).
- Torres E., L. M. & Sánchez S., J. A. Manejo integrado del escarabajo descortezador *Dendroctonus adjunctus* en los bosques de *Pinus rudis* en el estado de Coahuila. *Folleto Técnico Num.* **17**, 1-25 (2005).
- Touhara, K. & Vosshall, B. L. Sensing odorants and pheromones with chemosensory receptors. *Annu. Rev. Physiol.* **71**, 307-332 (2009).
- Tuccini, A., Maida, R., Rovero, P., Mazza, M. & Pelosi, P. Putative odorant-binding proteins in antennae and legs of *Carausius morosus* insecta, Phasmatodea. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **26**, 19–24 (1996).
- Tzotzos, G. T. (2013). Structure-Function prediction of insect odorant binding proteins. Recuperado el 20 de mayo de 2020, de The Open University: <http://oro.open.ac.uk/61671/>
- University of British Columbia. 2013. Development of a comprehensive EST library for the tree-killing southern pine beetle, *Dendroctonus frontalis*. Recuperado el 18 de mayo de 2020, de

- NCBI:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject?term=84059%5btop+bioproject%5d+NOT+79903%5buid%5d>
- van Tol, W. H. M. *et al.* Plants protect their roots by alerting the enemies of grubs. *Ecology Letters* **4**, 292-294 (2001).
- Vargas-Bernal, R., Rodríguez-Miranda, E. & Herrera-Pérez, G. Evolution and expectation of enzymatic biosensors for pesticides. environmental science. in Pesticides-advances in chemical and botanical pesticides. (eds Soundararajan, R. P.) 329-356 (IntechOpen, 2012).
- Venthur, H. & Zhou, J.-J. Odorant receptors and odorant-binding proteins as insect pest control targets: a comparative analysis. *Chemosensory Targets for Insect Control* **9**, 1-16 (2018).
- Venthur, H., Mutis, A., Zhou, J.-J. & Quiroz, A. Ligand binding and homology modelling of insect odorant-binding proteins. *Physiological Entomology* **39**: 183-198 (2014).
- Vieira, F. G. & Rozas, J. Comparative genomics of the odorant-binding and chemosensory protein gene families across the Arthropoda: origin and evolutionary history of the chemosensory system. *Genome Biol Evol.* **3**, 476–490 (2011).
- Vogt, R. G. & Riddiford, L. M. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature* **293**, 161-163 (1981).
- Vogt, R. G. Biochemical diversity of odor detection: OBPs, ODEs and SNMPs. in Insect pheromone biochemistry and molecular biology: The biosynthesis and detection of pheromones and plant volatiles. (eds Blomquist, G. & Vogt, R. G.) 391–445 (Elsevier Academic Press, 2003)
- Vogt, R. G. *et al.* The insect SNMP gene family. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **39**, 448–456 (2009).
- Vogt, R. G., Rybczynski, R. & Lerner, M. R. Molecular cloning and sequencing of general odorant-binding proteins GOBP1 and GOBP2 from the tobacco hawk moth *Manduca sexta*: Comparisons with other insect OBPs and their signal peptides. *J. Neurosci.* **11**, 2972–2984 (1991).
- Wallin, K. F. & Raffa, K. F. Density-mediated responses of bark beetles to host allelochemicals: a link between individual behaviour and population dynamics. *Ecological Entomology* **27**(4), 484–492 (2002).

- Wang, Y., Chen, Q., Zhao, H. & Ren, B. Identification and comparison of candidate olfactory genes in the olfactory and non-olfactory organs of elm pest *Ambrostoma quadriimpressum* (Coleoptera: Chrysomelidae) based on transcriptome analysis. *PLoS ONE* **11**, e0147144; doi: 10.1371/journal. Pone.0147144 (2016).
- Wanner, K., Isman, M., Feng, Q., Plettner, E. & Theilmann, D. Developmental expression patterns of four chemosensory protein genes from the Eastern spruce budworm, *Chroistoneura fumiferana*. *Insect Molecular Biology* **14**: 289–300 (2005).
- Wehrenfennig, C. *et al.* On-site airborne pheromone sensing. *Anal Bioanal Chem* **405**, 6389–6403 (2013).
- Wei, Y., Brandazza, A. & Pelosi, P. Binding of polycyclic aromatic hydrocarbons to mutants of odorant-binding protein: a first step towards biosensors for environmental monitoring. *Biochimica et Biophysica Acta* **1784**, 666–671 (2008).
- Whelan, S. & Goldman, N. A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach. *Molecular Biology and Evolution* **18**, 691–699 (2001).
- Whelan, S., & Goldman, N. A General Empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach. *Molecular Biology and Evolution* **18**(5), 691–699 (2001).
- Wicher, D. Olfactory signaling in insects. in *Molecular Basis of Olfaction, Progress in Molecular Biology and Translational Science* (ed. Glatz, R.) 37–54 (Academic Press, 2015).
- Wilson, D., Madera, M., Vogel, C., Chothia, C., & Gough, J. The SUPERFAMILY database in 2007: families and functions. *Nucleic Acids Research* **35**, D308–D313; 10.1093/nar/gkl910 (2007).
- Wood S. L. The Bark Ambrosia Beetles of North and Central America (Coleoptera: Scolytidae): a taxonomic monograph. *Great Basin Nat.* **6**, 1–1359 (1982).
- Wood, S. L. Aspectos taxonómicos de los Scolytidae. Memoria de los Simposio Nacionales de Parasitología Forestal II y III. Publicación especial No. 46, 170-174 (1985).
- Wu, Z. *et al.* Candidates for chemosensory genes identified in the Chinese citrus fly *Bactrocera minax*, through a transcriptomic analysis. *BMC Genomics* **20**, 646; doi: 10.1186/s12864-019-6022-5 (2019).

- Xu, Y.-L. *et al.* Large-scale identification of odorant-binding proteins and chemosensory proteins from expressed sequence tags in insects. *BMC Genomics* **10**, 632 (2009).
- Yasukochi Y *et al.* Conservation and lineage-specific rearrangements in the GOBP/PBP gene complex of distantly related ditrysian Lepidoptera. *PLOS ONE* **13**(2); e0192762: 10.1371/journal.pone.0192762 (2018)
- Ye, J. *et al.* WEGO 2.0: a web tool for analyzing and plotting GO annotations, 2018 update. *Nucleic Acids Research* **46**, W71–W75 doi:10.1093/nar/gky400 (2018).
- Yi, J.-K. *et al.* Identification of candidate chemosensory receptors in the antennal transcriptome of the large black chafer *Holotrichia parallela* Motschulsky (Coleoptera: Scarabaeidae). *Comparative Biochemistry and Physiology* **28**, 63–71 (2018).
- Yi, X. *et al.* Ligands binding and molecular simulation: The potential investigation of a biosensor based on an insect odorant binding protein. *Int. J. Biol. Sci.* **11**, 75-87; 10.7150/ijbs.9872 (2015).
- Younas, A. *et al.* Functional analysis of the chemosensory protein MsepCSP8 from the oriental armyworm *Mythimna separate*. *Front Physiol* **9**, 872; 10.3389/fphys.2018.00872 (2018).
- Zhang, G., Chen, F. J., Wang, L. G. & Zhang, J. Characterization and levels of expression of sensory neuron membrane proteins in the adult citrus fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Journal of Insect Science* **18**, 1-8; doi:10.1093/jisesa/iey117 (2018).
- Zhang, J., Liu, Y., Walker, W. B., Dong, S.-L. & Wang, G.-R. Identification and localization of two sensory neuron membrane proteins from *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Insect Sci.* **22**, 399–408 (2015).
- Zhang, Q-H. & Schlyter, F. Olfactory recognition and behavioral avoidance of angiosperm nonhost volatiles by conifer-inhabiting bark beetles. *Agricultural and Forest Entomology* **6**, 1-19 (2004).
- Zhang, Y.-N. *et al.* Identification and expression profiles of sex pheromone biosynthesis and transport related genes in *Spodoptera litura*. *PLoS ONE* **10**, e0140019; 10.1371/journal.pone.0140019 (2015).
- Zhang, R. *et al.* Silencing of the olfactory co-receptor gene in *Dendroctonus armandi* leads to EAG response declining to major host volatiles. *Sci. Rep.* **6**, 23136; doi: 10.1038/srep23136 (2016).

- Zheng Z.-C. *et al.* Predicted structure of a minus-C OBP from *Batocera horsfieldi* (Hope) suggests an intermediate structure in evolution of OBPs. *Sci. Rep.* **6**, 33981; doi: 10.1038/srep33981 (2016).
- Zhou, J. J., Kan, Y., Antoniw, J., Pickett, J. A. & Field, L. M. Genome and EST analyses and expression of a gene family with putative functions in insect chemoreception. *Chem Senses* **31**, 453–465 (2006).
- Zhou, J.-J. Odorant-binding proteins in insects. *Pheromones*. **83**, 241–272; 10.1016/s0083-6729(10)83010-9 (2010).
- Zhou, J.-J., Field, L. M. & Li, X. Insect odorant-binding proteins: ¿do they offer an alternative pest control strategy? *Outlooks on Pest Management* **21**, 31-34 (2010).
- Zhou, J.-J., Huang, W., Zhang, G. A., Pickett, J. A., and Field, L. M. ‘‘Plus-C’’ odorant-binding protein genes in two *Drosophila* species and the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Gene* **327**, 117–129 (2004b).
- Zhou, J.-J., Zhang, G.-A., Huang, W., Birkett, M. A., Field, L. M., Pickett, J. A., and Pelosi, P. Revisiting odorant-binding protein LUSH of *Drosophila melanogaster*: Evidence for odour recognition and discrimination. *FEBS Lett.* **558**, 23–26 (2004a).
- Zhou, X. *et al.* Phylogenetic and transcriptomic analysis of chemosensory receptors in a pair of divergent ant species reveals sex-specific signatures of odor coding. *PloS Genet.* **8**, e1002930; 10.1371/journal.pgen.1002930 (2012).
- Zhu, J. *et al.* Conserved chemosensory proteins in the proboscis and eyes of Lepidoptera. *International Journal of Biological Sciences* **11**, 1394–1404 (2016).
- Zhu, J.-Y., Zhao, N. & Yang, B. Global transcriptome profiling of the pine shoot beetle *Tomicus yunnanensis* (Coleoptera: Scolytinae). *PLoS ONE* **7**, e32291; doi: 10.1371/journal.pone.0032291 (2012).

ANEXOS

ANEXO 1

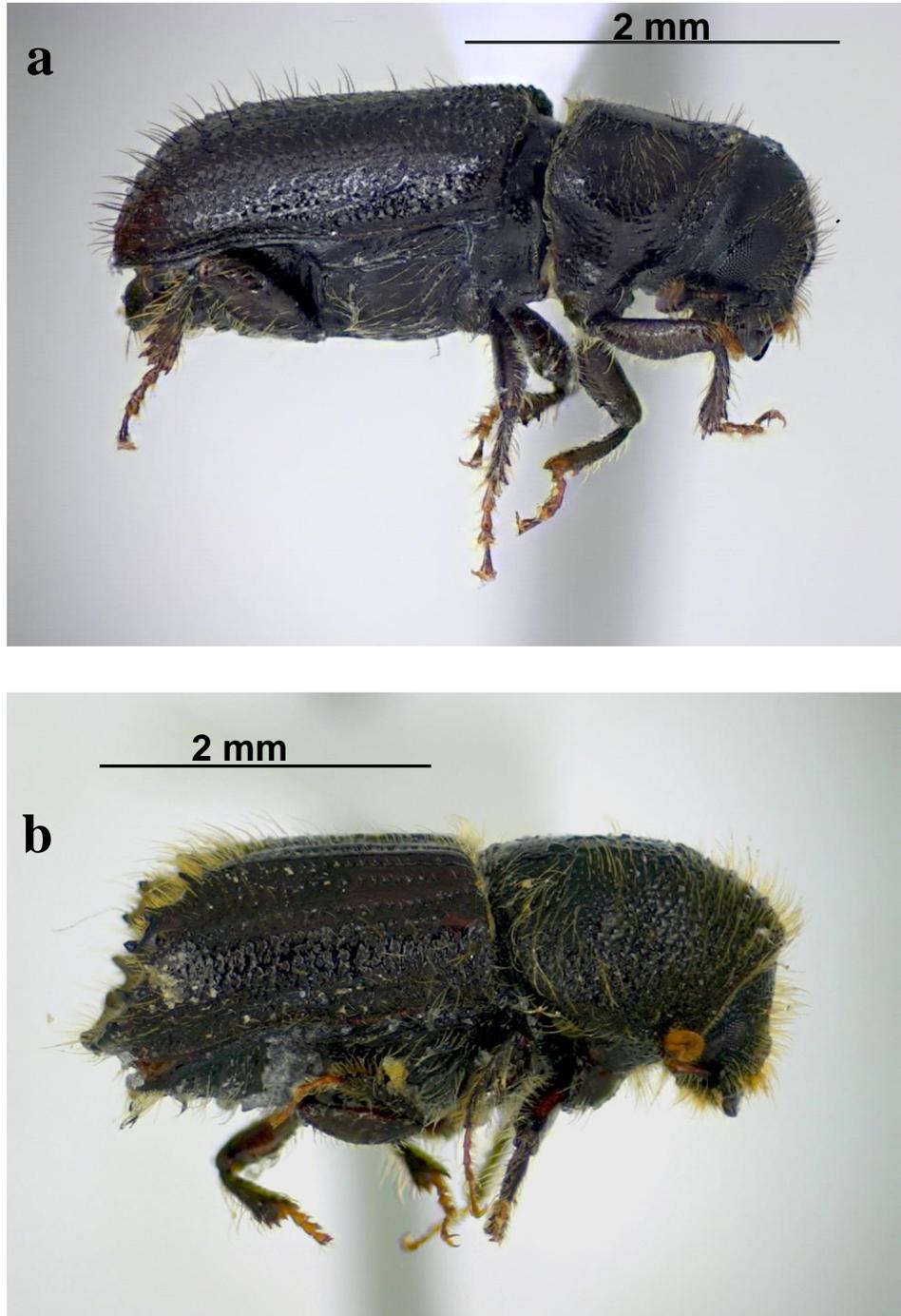


Figura 33. Vista lateral de los descortezadores *Dendroctonus adjunctus* (a) e *Ips* spp. (b) colectados en fustes de *Pinus oocarpa* en la Zona Militar 31, San Cristóbal de las Casas, Chiapas.

ANEXO 2

Cuadro 13. Resultado del análisis de enriquecimientos de ontología de genes GO del transcriptoma de cabezas de machos y hembras de *D. adjunctus*

Término GO	Clasificación	Número de transcritos	Porcentaje	Descripción
GO:0005623	CC	3124	22.5	Célula
GO:0044464	CC	3124	22.5	Parte celular
GO:0044422	CC	1188	8.6	Parte de organelo
GO:0043226	CC	2337	16.8	Organelo
GO:0044425	CC	1849	13.3	Parte de membrana
GO:0016020	CC	2732	19.7	Membrana
GO:0032991	CC	1965	14.2	Complejo de proteínas
GO:0099080	CC	50	0.4	Complejo supramolecular
GO:0031974	CC	350	2.5	Lumen encerrado en la membrana
GO:0044215	CC	27	0.2	Otro organismo
GO:0044217	CC	27	0.2	Parte de otro organismo
GO:0005576	CC	399	2.9	Región extracelular
GO:0044421	CC	122	0.9	Parte de la región extracelular
GO:0019012	CC	209	1.5	Virión
GO:0044423	CC	199	1.4	Parte de virión
GO:0045202	CC	7	0.1	Sinapsis
GO:0009295	CC	8	0.1	Nucleoide
GO:0030054	CC	7	0.1	Unión celular
GO:0003824	MF	5621	40.5	Actividad catalítica
GO:0005488	MF	7389	53.2	Unión
GO:0005215	MF	927	6.7	Actividad de transporte
GO:0060089	MF	290	2.1	Actividad transductor molecular
GO:0140110	MF	392	2.8	Actividad de regulación de la transcripción
GO:0016209	MF	86	0.6	Actividad antioxidante
GO:0045182	MF	1	0.0	Actividad de regulación de la traducción
GO:0098772	MF	346	2.5	Regulador de la función molecular
GO:0005198	MF	742	5.3	Actividad estructural de las moléculas

Término GO	Clasificación	Número de transcritos	Porcentaje	Descripción
GO:0045735	MF	10	0.1	Actividad de reservorio de nutrientes
GO:0140104	MF	9	0.1	Actividad como acarreador molecular
GO:0038024	MF	11	0.1	Actividad de receptores de carga
GO:0051179	BP	1700	12.2	Localización
GO:0065007	BP	1909	13.8	Regulación biológica
GO:0008152	BP	6131	44.2	Procesos metabólicos
GO:0009987	BP	5903	42.5	Proceso celular
GO:0048519	BP	153	1.1	Regulación negativa de procesos biológicos
GO:0050789	BP	1772	12.8	Regulación de procesos biológicos
GO:0050896	BP	1237	8.9	Respuesta al estímulo
GO:0023052	BP	708	5.1	Señalización
GO:0048518	BP	74	0.5	Regulación positiva del proceso biológico
GO:0071840	BP	869	6.3	Organización del componente celular o biogénesis
GO:0032502	BP	205	1.5	Proceso de desarrollo
GO:0032501	BP	327	2.4	Proceso de organismo multicelular
GO:0002376	BP	71	0.5	Proceso del sistema inmunológico
GO:0040011	BP	116	0.8	Locomoción
GO:0051704	BP	423	3.0	Proceso multiorgánico
GO:0022414	BP	110	0.8	Proceso reproductivo
GO:0000003	BP	118	0.8	Reproducción
GO:0001906	BP	11	0.1	Muerte celular
GO:0007610	BP	6	0.0	Comportamiento
GO:0022610	BP	163	1.2	Adhesión biológica
GO:0040007	BP	13	0.1	Crecimiento
GO:0048511	BP	5	0.0	Proceso rítmico
GO:0098754	BP	3	0.0	Desintoxicación
GO:0043473	BP	1	0.0	Pigmentación
GO:0044848	BP	1	0.0	Fase biológica
GO:0008283	BP	5	0.0	Proliferación celular
GO:0098743	BP	1	0.0	Agregación de células

CC: Componente celular; MF: Función molecular; BP: Proceso biológico

ANEXO 3

Cuadro 14. Nombre de la proteína y números de acceso utilizados en los árboles filogenéticos

OBP		CSP		SNMP			
Número	No. Acc.	Número	No. Acc.	Número	No. Acc.	Número	No. Acc.
DponOBP2	N6U2E7	TcasOBPC11	D6X4H4	DponCSP1	M4W9A4	DponSNMP1	M4W9B3
DponOBP2	M4VUV4	TcasOBP12	D2A1G6	DponCSP1	A0A0H3W576	DponSNMP	I1VJ82
DponOBP3	N6TLD8	TcasOBPC12	D6X4H5	DponCSP2	A0A0H3W580	DponSNMP	I1VJ83
DponOBP4	M4VTH5	TcasOBP13	D2A1G5	DponCSP2	M4VTH9	ItypSNMP1	M3V879
DponOBP6	M4VTI4	TcasOBPC13	D6X4H7	DponCSP3	M4VRK2	TcasSNMP1	P86905
DponOBP8	N6T0S9	TcasOBP14	D2A254	DponCSP4	A0A0H3W5L5	TcasSNMP01	D2A0H5
DponOBP8	M4VRL6	TcasOBPC14	D6WPR7	DponCSP6	M4VTH1	TcasSNMP1	Q7QC49
DponOBP11	M4W9C1	TcasOBPC15	D2A053	DponCSP6	A0A0H3W5A7	HparSNMP1	A0A2P1ERN0
DponOBP13	J3JVJ5	TcasOBP15	D7ELE9	DponCSP8	M4VR62	AcorSNMP1	A0A0E3Y6N9
DponOBP16	N6U049	TcasOBPC16	D2A055	DponCSP11	M4VUV8	GdauSNMP1	A0A4Y5UY78
DponOBP17	N6UFK3	TcasOBP16	D2A1T1	DponCSPJ19	I1VJ19	ClapSNMP1	A0A310SBT1
DponOBP17	R9PSQ1	TcasOBP17	D2A1G4	DarmCSP1	A0A345BT13	AgamSNMP1	Q7QC49
DponOBP20	N6TMW0	TcasOBP17	D2A1G3	DarmCSP2	A0A3S7PYZ0	DponSNMP2	M4VR81
DponOBP20	M4VUW2	TcasOBPC17	D2A056	DarmCSP3	A0A345BT14	DponSNMP2	N6TNQ9
DponOBP21	M4VR56	TcasOBP18	D2A1G2	DarmCSP4	A0A345BT15	ItypSNMP2	M3TYZ6
DponOBP22	M4VRM1	TcasOBPC18	D6WAD0	DarmCSP5	A0A345BT16	TcasSNMP2	Q7Q6R1
DponOBP28	M4VUX0	TcasOBPC19	D6X0T3	DarmCSP6	A0A345BT20	TcasSNMP2	D6WGA2
DponOBP30	M4W9B7	TcasOBPC20	D6WDX0	DarmCSP7	A0A345BT17	HparSNMP2	A0A2P1ERQ2
DponOBP31	M4VRK6	TcasOBPC21	D6WRD1	DarmCSP8	A0A345BT18	GdauSNMP2	A0A4Y5UYF4
DponOBP32	R9PUL1	TcasOBP21	D6WU15	DarmCSP9	A0A345BT19	ClapSNMP2	A0A310S638
DponOBPJ73	I1VJ73	TcasOBP22	D6WYL0	DvalCSP1	A0A0H3W576	AgamSNMP2	Q7Q6R1
DponOBPJ74	I1VJ74	TcasOBP23	D6X1W0	DvalCSP2	A0A0H3W580		
DponOBPJ75	I1VJ75	TcasOBP25	D6WNH2	DvalCSP4	A0A0H3W5L5		
DponOBPJ76	I1VJ76	TcasOBP26	D6WNH3	DvalCSP6	A0A0H3W5A7		
DponOBPJ77	I1VJ77	DarmOBP6	A0A0X9DLE1	ItypCSP1	M3UZC9		
DponOBPJ78	I1VJ78	DarmOBP8	A0A0X9F313	ItypCSP4	M3VHB8		

OBP				CSP		SNMP	
Número	No. Acc.	Número	No. Acc.	Número	No. Acc.	Número	No. Acc.
DponOBPJ79	I1VJ79	DarmOBP13	A0A0X9FBE8	ItypCSP5	M3V872		
DponOBP6J9	N6T6J9	DarmOBP14	A0A0X9IHE1	TcasCSP1	Q0MRL2		
DvalOBP1	A0A0H3W5A0	DarmOBP15	A0A0X9H1S6	TcasCSP1	Q0MRM1		
DvalOBP2	A0A0H3W5N4	ItypOBP2	M3VHC2	TcasCSP2	Q3LB62		
DvalOBP3	A0A0H3W572	ItypOBP3	M3V875	TcasCSP10	D6WT15		
DvalOBP4	A0A0H3W574	ItypOBP5	M3UZD2	TcasCSP10	D6WT15		
DvalOBP5	A0A0H3W5L2	ItypOBP6	M3VK48	TcasCSP11	Q0MRL9		
DvalOBP6	A0A0H3W5A2	Ityp_OBP7	M3VHC0	TcasCSP12	Q0MRL1		
DvalOBP9	A0A0H3W5N6	ItypOBP11	M3VK50	TcasCSP12	Q0MRL6		
DvalOBP10	A0A0H3W573	ItypOBP13	M3V877	TcasCSP13	D6WUE8		
DvalOBP12	A0A0H3W577	ItypOBP14	M3TYZ1	TcasCSP13	D6WUE8		
DvalOBP15	A0A0H3W5A3	ItypOBP15	M3UZD6	TcasCSP13	Q0MRL0		
DvalOBP16	A0A0H3W5N8	TcasOBP1	D2A670	TcasCSP14	Q0MRL8		
DvalOBP17	A0A0H3W575	TcasOBPC01	D6WS42	TcasCSP14	Q0MRK9		
DvalOBP18	A0A0H3W579	TcasOBP2	D2A673	TcasCSP15	Q0MRK8		
DvalOBP19	M4VUX7	TcasOBPC02	D6WS43	TcasCSP16	Q0MRK7		
DvalOBP20	A0A0H3W5A6	TcasOBPC03	D6WS44	TcasCSP16	Q0MRL5		
DvalOBP21	A0A0H3W5P0	TcasOBP05	D2A671	TcasCSP17	Q0MRK6		
DarmOBP1	A0A1D6WII5	TcasOBPC05	D6WS39	TcasCSP17	D6WCY4		
DarmOBP2	A0A1D6WII8	TcasOBPC06	D6WS47	TcasCSP18	Q0MRK5		
DarmOBP3	A0A125QVS5	TcasOBP6	D6WM82	TcasCSP18	Q0MRK3		
DarmOBP4	A0A125QVS6	TcasOBPC07	D6WS46	TcasCSP19	Q0MRK4		
DarmOBP5	A0A0X9F729	TcasOBP07	D6WM83				
DarmOBP6	A0A0X9DLE1	TcasOBP08	D6WM81				
DarmOBP8	A0A0X9F313	TcasOBPC08	D6WS45				
DarmOBP13	A0A0X9FBE8	TcasOBPC09	D6WS40				
DarmOBP14	A0A0X9IHE1	TcasOBP09	D6X1W1				
DarmOBP15	A0A0X9H1S6	TcasOBP10	D6WS37				
ItypOBP2	M3VHC2	TcasOBPC10	D6X4H6				
ItypOBP3	M3V875	TcasOBP11	D2A5B1				

OBP		CSP		SNMP	
Número	No. Acc.	Número	No. Acc.	Número	No. Acc.
ItypOBP5	M3UZD2	TcasOBPC11	D6X4H4		
ItypOBP6	M3VK48	TcasOBP12	D2A1G6		
Ityp_OBP7	M3VHC0	TcasOBPC12	D6X4H5		
ItypOBP11	M3VK50	TcasOBP13	D2A1G5		
ItypOBP13	M3V877	TcasOBPC13	D6X4H7		
ItypOBP14	M3TYZ1	TcasOBP14	D2A254		
ItypOBP15	M3UZD6	TcasOBPC14	D6WPR7		
TcasOBP1	D2A670	TcasOBPC15	D2A053		
TcasOBPC01	D6WS42	TcasOBP15	D7ELE9		
TcasOBP2	D2A673	TcasOBPC16	D2A055		
TcasOBPC02	D6WS43	TcasOBP16	D2A1T1		
TcasOBPC03	D6WS44	TcasOBP17	D2A1G4		
TcasOBP05	D2A671	TcasOBP17	D2A1G3		
TcasOBPC05	D6WS39	TcasOBPC17	D2A056		
TcasOBPC06	D6WS47	TcasOBP18	D2A1G2		
TcasOBP6	D6WM82	TcasOBPC18	D6WAD0		
TcasOBPC07	D6WS46	TcasOBPC19	D6X0T3		
TcasOBP07	D6WM83	TcasOBPC20	D6WDX0		
TcasOBP08	D6WM81	TcasOBPC21	D6WRD1		
TcasOBPC08	D6WS45	TcasOBP21	D6WUI5		
TcasOBPC09	D6WS40	TcasOBP22	D6WYL0		
TcasOBP09	D6X1W1	TcasOBP23	D6X1W0		
TcasOBP10	D6WS37	TcasOBP25	D6WNH2		
TcasOBPC10	D6X4H6	TcasOBP26	D6WNH3		
TcasOBP11	D2A5B1				