



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

**POSTGRADO EN FITOSANIDAD
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA**

**ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE LA
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA
(PCR) PARA EL DIAGNÓSTICO DE ESPECIES
DEL GÉNERO *Xyleborus***

MARIA ELENA SOSA CASTILLO

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2016

La presente tesis titulada: **ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PARA EL DIAGNÓSTICO DE ESPECIES DEL GÉNERO Xyleborus** realizada por la alumna: **María Elena Sosa Castillo** 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

CONSEJERO



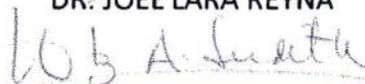
DRA. LAURA DELIA ORTEGA ARENAS

ASESOR



DR. JOEL LARA REYNA

ASESOR



M.C. ALFONSINA JUDITH HERNÁNDEZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Febrero 2016

Estandarización y Validación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para el Diagnóstico de Especies del Género *Xyleborus*

María Elena Sosa Castillo
Colegio de Posgraduados, 2016

RESUMEN

La apertura de México al libre comercio ha incrementado el riesgo de introducción de plagas exóticas, entre los que se encuentran el complejo *Xyleborus glabratus-Raffaella lauricola* que de llegar a México podría impactar la producción de aguacate *Persea americana*, en el país. Por tal motivo el objetivo de este estudio fue estandarizar y validar la técnica de PCR-anidada para la detección rápida, sensible y confiable de especies del género *Xyleborus*, utilizando los “primers” externos CI-J-2183 y TL2-N-3014; e internos J2210 y N2739 que amplifican una banda de ~1 300 y 500 pb respectivamente, de una región del gen mitocondrial citocromo oxidasa subunidad 1 (CO1). Asimismo, se realizó la extracción de ADN de 26 ejemplares de *Xyleborus* con el kit Qiagen DNeasy® mericom Food (DMF), no reportado previamente su uso para su aplicación en insectos, que resultó en ADN suficiente y de alta calidad para reacciones de amplificación por PCR. El método permitió procesar un solo insecto por extracción, y obtener material genético de muestras conservadas en alcohol de hasta ocho años de antigüedad. El límite de detección se definió hasta una concentración de 780 pg/μl. Se optimizó la PCR en un volumen final de 15 μL sin comprometer calidad de la amplificación. La técnica estandarizada permitió la obtención de ADN de calidad, lo que aseguró alta reproducibilidad y sensibilidad en la detección de especies de *Xyleborus* y la secuenciación parcial del gen CO1 para las siete especies estudiadas; las secuencias consenso fueron analizadas por homología y sometidas al GenBank para su publicación.

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

ABSTRACT

The opening of Mexico to free trade has increased the risk of the introduction of exotic pests, among which is the complex *Xyleborus glabratus-Raffaella lauricola* that reach Mexico, could impact the production of avocado *Persea americana*, in the country. For this reason, the objective of this study was to standardize and to validate the nested PCR test for rapid, sensitive and reliable detection of species of the genus *Xyleborus* using external "primers" CI-J-2183 and TL2-N-3014 and internal primers J2210 and N2739 that amplify a band of between 1300 and 500 pb in the region of the mitochondrial Cytochrome Oxidase subunit I gene (CO1). Also, ADN extraction from 26 specimens of *Xyleborus* was realized with kit Qiagen DNeasy ® mericom Food (DMF), not previously reported its use for their application in insects, which resulted in enough ADN and high-quality for amplification by PCR reactions. The method allowed to process a single insect by extraction, and obtain genetic material from specimens preserved in alcohol of up to eight years old. The detection limit was defined up to a concentration of 780 pg/μL. The PCR was optimized in a final volume of 15 μL without compromising quality of amplification. The standardized test allowed quality ADN, which ensured high reproducibility and sensitivity in the detection of species of *Xyleborus* and partial sequencing of the CO1 gene to the seven species studied; consensus sequences were analyzed by homology and deposited in the GenBank for their publication.

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

AGRADECIMIENTOS

Al **Colegio de Postgraduados** por darme la oportunidad de continuar con mi formación profesional.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por el subsidio brindado para la realización de mis estudios de maestría.

A la **Dra. Laura Delia Ortega Arenas**, por la dirección y acertadas observaciones en la realización de este proyecto.

A mi consejo Particular **Dra. Laura Delia Ortega Arenas, M. en C. Alfonsina Judith Hernández y al Dr. Joel Lara Reyna**, por sus valiosas contribuciones y asesorías a lo largo de esta investigación.

Al **Dr. Armando Equihua Martínez**, por su participación como sinodal, por haber proporcionar algunos ejemplares.

Al **M. en C. Mauricio Pérez Silva**, por la corroboración morfológica de los ejemplares y el apoyo en la toma de fotografías.

A todo el **personal de Fitosanidad** por su trato amable durante mi estancia.

DEDICATORIAS

A mis padres **Martha Castillo Moreno y Fidel Sosa Jiménez**, que me han apoyado en todos los aspectos de vida, y me enseñado a valorar cada momento de alegría y tristeza. Gracias por darme la dicha de ser su hija los amo.

A mi esposo **Adrian Gloria Trujillo**, por apoyarme en los momentos difíciles de esta etapa y no dejarme caer, gracias amor.

A mis hermanos: **Alfredo, Justo, Eulalia Rosario, Gloria y Bere**, por brindarme su apoyo, consejos y tantos momentos de alegrías, los tengo siempre presentes en mi corazón.

A las Familias **Sosa Castillo, Sosa Lorea, Sosa Rodríguez, Vergara Sosa, Villanueva Sosa, Pérez Castillo, Gloria Trujillo, Balderrama Gloria, Gloria Alonzo**, por todos los momentos que pasamos juntos.

A mi gran amiga **Rosario Flores Sotero y a su familia**, que aunque estamos lejos los tengo siempre presentes en mis pensamientos y corazón

CONTENIDO

	Pagina
CONTENIDO.....	vi
INDICE DE CUADROS	viii
INDICE DE FIGURAS	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVO.....	4
2.1. General.....	4
2.2. Específicos	4
3. REVISION DE LITERATURA.....	5
3.1. Plagas Reglamentadas en México.....	5
3.1.1. Tribu Xyleborini	6
3.1.2. Género <i>Xyleborus</i>	7
3.1.3. Especies de importancia económica para México.....	8
3.2. Diagnóstico Fitosanitario.....	10
3.2.1. Biología molecular	11
3.2.2. Técnicas moleculares en el diagnóstico fitosanitario	12
3.2.3. Extracción de ADN	13
3.2.4. Cuantificación y calidad de los ácidos nucleicos	14
3.2.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	15
3.3. Validación y Estandarización	16
3.3.1. Validación de los métodos analíticos	17
4. MATERIALES Y METODOS	18
4.1. Ubicación.....	18
4.2. Material biológico.....	18
4.3. Identificación Morfológica y Documentación Fotográficas de las Características Distintivas de las Especies del Género <i>Xyleborus</i>	18
4.4. Identificación Genética	19
4.4.1. Extracción de ADN a partir de especímenes de <i>Xyleborus</i>	19
4.4.2. Estandarización y Validación de la PCR-anidada para la Identificación de <i>Xyleborus</i> spp	21

4.4.3.	Validación.....	23
4.4.4.	Análisis molecular	24
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
5.1.	Identificación Morfológica y Documentación Fotográfica de las Características Distintivas de las Especies del Género <i>Xyleborus</i> Estudiadas.....	25
5.2.	Identificación Genética	34
5.2.1.	Extracción de ADN	34
5.2.2.	Estandarización y Validación de la PCR-anidada Dirigido a dos Regiones Específicas del Gen CO1mt para la Identificación de Especies de <i>Xyleborus</i>	36
5.3.	Análisis molecular	44
6.	CONCLUSIONES	45
7.	LITERATURA CITADA.....	47
8.	Anexo 1	58
	CLAVE PARA HEMBRAS DE ESPECIES DEL GÉNERO XYLEBORUS EICHHOFF EN MÉXICO (TOMADA DE PÉREZ-SILVA, 2015)	58

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Pág.
1	Especies del género <i>Xyleborus</i> registradas para México de acuerdo con la literatura y colecciones científicas. (Tomado de Pérez- Silva <i>et al.</i> 2015)	9
2	Individuos del género <i>Xyleborus</i> , utilizados para la extracción de ADN y amplificación de mtCOI.	19
3	Reacción de amplificación para dos regiones específicas del gen COI en dos pasos (Chang <i>et al.</i> , 2013).	22
4	Reacción de amplificación de PCR de acuerdo al proveedor (Promega, 2015).	23
5	Programa para la amplificación de la región COI de <i>Xyleborus</i> sp., citado por Chang <i>et al.</i> , (2013) (utilizado en el PCR simple y anidada)	26
6	Características morfológicas de <i>Xyleborus</i> spp	26
7	Cuantificación de ADN obtenido mediante el kit DFM Qiagen ®.	35
8	Optimización de la reacción de PCR en volumen de 15 y 10 µL para especies de <i>Xyleborus</i>	43

INDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
1	<i>Xyleborus affinis</i> : vista lateral, dorsal, frontal y posterolateral.	27
2	<i>Xyleborus ferrugineus</i> : vista lateral, dorsal, frontal y posterolateral	28
3	<i>Xyleborus glabratus</i> : vista lateral, dorsal, frontal y posterolateral	29
4	<i>Xyleborus horridus</i> : vista lateral, dorsal, frontal y posterolateral.	30
5	<i>Xyleborus intrusus</i> : vista lateral, dorsal, frontal y posterolateral	31
6	<i>Xyleborus spinulosus</i> : vista lateral, dorsal, frontal y posterolateral	32
7	<i>Xyleborus volvulus</i> : vista lateral, dorsal, frontal y posterolateral	33
8	Amplificación del ADN extraído de diferentes muestras de <i>Xyleborus</i> con el Kit DMF Qiagen® dirigido al gen CO1.	36
9	Gel de agarosa al 1.5% que muestra los gradientes de la temperatura de alineamiento.	37
10	Gradientes en la concentración de MgCl ₂ .	38
11a	Gel de agarosa al 1.5% que muestra los gradientes de dNTP's.	39
11b	Gel de agarosa al 1.5% que muestra los gradientes de oligos	39
12	Gel de agarosa al 1.5% que muestra los gradientes de Taq polimerasa	40
13	Gel de agarosa al 1.5% que muestra el límite de detección.	41
14	Reproducibilidad de la PCR-anidada de acuerdo a las condiciones estandarizadas y validadas	42
15	Optimización de la reacción de PCR, para especies del género <i>Xyleborus</i>	43

1. INTRODUCCIÓN

La globalización y apertura en 1994 de México al Mercado del Libre Comercio Internacional, ha traído en consecuencia el constante riesgo de la introducción de plagas agrícolas exóticas que por la magnitud de las pérdidas económicas, de salud y ambientales que ocasionan en su país de origen, hace indeseable su presencia en el campo mexicano (Follet y Vick, 2002; FAO, 2007).

Actualmente, se tienen bajo vigilancia 31 plagas reglamentadas que están identificadas como de alto riesgo y que afectan a distintos sistemas de producción agrícola, atacando cultivos como: aguacate, cítricos, plátano, caña de azúcar, soya, cocotero, frutales, frutillas, café, trigo, nopal, arboles forestales, entre otros (SENASICA, 2015). Entre estos se encuentra el complejo de escarabajos ambrosiales. Los ambrosiales son coleópteros clasificados dentro de la familia Scolytidae la cual está dividida en las subfamilias Hylesininae y Scolytinae (Wood, 1986). Los escarabajos ambrosiales son insectos pequeños, aproximadamente 2 mm de largo, alargados y cilíndricos que cultivan hongos. Estos escarabajos tienen una simbiosis obligada con hongos, los cuales crecen en galerías o túneles que ellos mismos perforan en el xilema del árbol que los hospeda. En su estado larval, los escarabajos se alimentan de hongos y emergen cargando hongos. Varias especies de escarabajos ambrosia nativos o exóticos, entre ellos el escarabajo ambrosía del laurel rojo (*Xyleborus glabratus*) es el principal vector del hongo (*Raffaelea lauricola*) que causa la enfermedad llamada marchitez del laurel (Brar y Capinera, 2013). El género *Xyleborus* contiene más de 1,200 especies y son comúnmente conocidos como ambrosiales debido a su forma de alimentación (Wood y Bright, 1992). *Xyleborus* fue descrito en 1864 por Eichhoff.

La información relativa a especies de *Xyleborus* en México ha ido en aumento debido a que algunas especies representan riesgo para algunos árboles de importancia económica, tal es el caso de *Xyleborus affinis*, *X. ferrugineus*, *X. volvulus* y *X. glabratus*; esta última aunque no se encuentra reportada en México, es considerada plaga potencial para las plantaciones de aguacate *Persea americana*, en el país, por lo que se encuentra en calidad de plaga cuarentenaria (Bocanegra, 2012; Rangel *et al.*, 2012; Baños *et al.*, 2012).

El escarabajo ambrosial del laurel rojo, *X. glabratus*, se ha convertido en una plaga invasiva seria, tanto en la agricultura como en los ecosistemas forestales de los Estados Unidos de Norteamérica (EUA). Las hembras de *X. glabratus* actúan como vectores primarios del hongo patógeno *Raffaelea lauricola*, una enfermedad letal de árboles de la familia Lauraceae. La especie *X. glabratus* fue detectada por primera vez en 2002 cerca de Savannah, Georgia, y desde entonces se ha extendido y establecido en seis estados del sureste de EUA, provocando grandes pérdidas económicas (Rabaglia *et al.*, 2006).

Actualmente, el cultivo de aguacate comercial (*P. americana*) está bajo amenaza en el sur de Florida, y en caso de continuar con la propagación de la enfermedad, la marchitez del laurel podría impactar la producción de aguacate en México y en California. Adicionalmente, las especies nativas mexicanas de la familia Lauraceae se encuentran en riesgo potencial (Lorea, 2014).

En México, aunque no está presente la especie *X. glabratus*, se ejecutan actividades de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria para la detección oportuna de esta plaga, a través de las acciones de exploración y trampeo en los estados de Guerrero, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit y Puebla. Derivado de estas acciones, a la fecha no

se ha reportado presencia de la plaga, por lo que con base en lo anterior, el estatus del escarabajo ambrosial del laurel se mantiene como ausente (SENASICA, 2015).

La rápida dispersión de la plaga en EUA, aunado a la amplia disposición de hospederos susceptibles en varias entidades de México (Loera, 2014), permiten prever que esta especie puede representar a corto plazo una importante amenaza fitosanitaria (SENASICA, 2015). A razón de lo anterior, el diagnóstico preciso y oportuno, será una herramienta importante en la toma de decisiones.

La detección e identificación de especies de *Xyleborus* generalmente se lleva a cabo mediante el uso de claves taxonómicas, algunas veces la identificación se hace muy difícil debido a que los especímenes no siempre vienen completos o con la calidad requerida para su determinación o por la similitud morfológica entre diferentes especies. Debido a estos inconvenientes para la correcta identificación se han desarrollado técnicas moleculares que permiten detectar con rapidez y sensibilidad al organismo de interés, ya que la detección oportuna y confiable de la plaga en cualquier etapa de desarrollo es importante para su control, monitoreo y prevención. En este sentido la implementación estandarización y validación de la técnica de PCR para el diagnóstico de especies de *Xyleborus* se convierte en una herramienta confiable y rápida que coadyuve a tomar decisiones oportunas. Chang *et al.*, (2013), realizaron códigos de barras para 32 especies del genero *Xyleborus* mediante el uso de la técnica de PCR dirigida a dos regiones del gen mitocondrial citocromo oxidasa subunidad I (CO1), siendo estas especies las más comunes en madera sólida y embalajes interceptados en los puertos y aeropuertos de China.

La técnica de PCR ha ganado aceptación debido a su rapidez, sensibilidad y reproducibilidad generando una nueva línea determinada taxonomía molecular para una determinación específica por lo que este estudio se propuso como objetivo estandarizar, optimizar y validar la utilidad de esta herramienta como elemento de diagnóstico de especies del género *Xyleborus*.

2. OBJETIVO

2.1. General

- Estandarizar, optimizar y validar un protocolo de PCR-anidado como elemento de diagnóstico para la identificación específica del género *Xyleborus*

2.2. Específicos

- Estandarizar un protocolo de extracción de ADN a partir de especímenes de insectos preservados en medio de conservación.
- Estandarizar y optimizar un protocolo de PCR anidado para el diagnóstico e identificación de especies del género *Xyleborus* y validarlo con especímenes preservados.

3. REVISION DE LITERATURA

3.1. Plagas Reglamentadas en México

En el ámbito de protección vegetal, se define plaga a cualquier especie, raza o biotipo vegetal, animal o agente patógeno que involucre un daño económico para los cultivos, productos y subproductos, y como plaga cuarentenaria a aquellos organismos que tienen un impacto económico para un área, aun cuando no esté presente o si lo está no esté extendida y se encuentre bajo control oficial (FAO, 2016).

En México el control oficial de plagas involucra acciones estructurales en campañas oficiales para controlar, suprimir o erradicar las plagas que pongan en riesgo el estatus fitosanitarios de los cultivos. El órgano encargado de la vigilancia, cumplimiento de la normatividad, así como para, dar la alerta en caso de emergencia fitosanitaria es la Dirección General de Sanidad Vegetal en conjunto con el Centro Nacional de Referencia Fitosanitario (DGSV-CNRF) (Velázquez, 2013).

Las plagas cuarentenarias para México están representadas por 387 plagas insectiles de diferentes géneros y en diversos cultivos, 352 géneros de hongos, 159 virus pertenecientes a diferentes familias patógenas, 100 malezas y 89 especies de bacterias, entre otras (SINAVEF, 2015). Las plagas cuarentenarias no presentes en México son alrededor de 927, entre las que destacan 3 moluscos, 5 viroides, 14 fitoplasmas, 18 de ácaros, 20 cromistas (omicetos), 25 nematodos, 68 bacterias, 80 malezas, 129 virus, 303 hongos y 300 especies de insectos (SINAVEF, 2015). Entre los insectos destacan los coleópteros o escolítidos clasificados dentro de la familia Scolytidae, la cual está dividida en las subfamilias Hylesininae y Scolytinae, 25 tribus, 181 géneros y aproximadamente 6 000 especies alrededor del mundo (Wood, 1982; Romero *et al.*, 1997). Estos coleópteros son pequeños, cilíndricos, de color café oscuro o negro, generalmente miden de 1 a 10 mm, con antenas

cortas y geniculadas terminadas en maza (Wood *et al.*, 1982). La familia Scolytidae contiene dos grupos: los descortezadores (Scolytinae) que se alimentan de la corteza de los árboles y los ambrosianos (Hylesininae) que realizan galerías y cultivan un hongo ambrosial (*Raffaella* sp.) que les sirve de alimento. Esta familia se distingue por presentar una espina larga en el ápice de la tibia anterior. Algunas especies son plagas importantes en plantaciones forestales, árboles de la familia Lauraceae, frutales, cacao o café (Atkinson *et al.*, 1986a).

La mayoría de los miembros de la familia Scolytidae limitan su ataque a una parte del hospedero, algunas especies se restringen a conos o frutos, ramas, troncos, corteza, raíz o troncos recién caídos. Otras especies son más agresivas y pueden afectar arboles vivos o tejido saludable, los árboles que crecen en condiciones desfavorables, usualmente son los más susceptibles al ataque de estos coleópteros (Wood, 1982).

3.1.1. Tribu Xyleborini

La tribu Xyleborini está representada por 30 géneros y aproximadamente 1200 especies, distribuidas en el mundo, con mayor diversidad en los trópicos (Cognato *et al.*, 2011). Los Xyleborini generalmente son partenogénéticos o practican la poligamia consanguínea (los machos copulan con sus progenitoras y hermanas) y se caracterizan por presentar dimorfismo sexual. El macho es de menor tamaño que la hembra, son ápteros con ojos reducidos y el exoesqueleto decolorado, no suelen salir al exterior. En las hembras los dos pares de alas son perfectamente desarrolladas y funcionales, el escapo de la antena es alargado y con cinco segmentos en el funículo, con excepción de algunas especies orientales que pueden tener 3 o 4, la clava es oblicuamente truncada. El declive del pronoto está adornado con espínulas, salvo algunas excepciones en algunos machos; escutelo

variable, desde ancho y plano hasta ausente; la ornamentación de los élitros es variable; las coxas anteriores pueden ser contiguas o ampliamente separadas, las tibias son aplanadas, anchas y terminan en punta en el tercio distal, presentan una fila de numerosos dentículos en el borde lateral, usualmente alternando sedas marginales o submarginales en las formas más evolucionadas (Lombardero, 1996).

3.1.2. Género *Xyleborus*

El género *Xyleborus* es originario de Asia, cuenta aproximadamente con 500 especies distribuidas en el mundo (Rabaglia, 2003). La relación entre machos y hembras es de 1:30 respectivamente, esta condición se presenta debido a que los machos solo se requieren para fecundar a la hembra. Dentro de este género los machos se caracterizan por presentar poligamia y endogamia, característica que es de suma importancia para la diversificación del grupo, ya que las hembras mutantes son potencialmente fundadoras de una nueva raza morfológica o incluso de nuevas especies; sumando a ésta, se encuentra la haplodiploidia, es decir, la capacidad de producir hembras diploides y machos haploides, lo cual confiere un valor único a Xyleborina entre los escolitinos (Wood, 1982; Rabaglia, 2003; Hulcr *et al.*, 2007; Mann *et al.*, 2012).

La mayoría de las especies de este género atacan plantas debilitadas, sin embargo, en los últimos años se han reportado ataques en plantas sanas, debido a su condición xilomicetófaga (se alimentan de hongos del género *Ambrosia*), condición que les permite tener un amplio rango de hospederos (Wood, 1982; Atkinson, 2013).

Todas las especies del género *Xyleborus* son vectores del hongo pertenecientes al género *Ambrosia*, algunas especies de este hongo son fitopatógenas de plantas (Rabaglia,

2003), por esta razón, se les considera como vectores; por ejemplo, *Xyleborus glabratus* es vector de *Raffaella lauricola*, agente causal de la marchitez del laurel rojo (CABI, 2010).

3.1.3. Especies de importancia económica para México

En años recientes se ha incrementado la información acerca de especies del género *Xyleborus* en México, debido a que algunas especies representan riesgo para algunos cultivos de importancia económica, tal es el caso de *Xyleborus affinis*, *X. ferrugineus* y *X. volvulus*, las cuales afectan especies de cedro americano (*Cedrela odorata*), así como, árboles de cacao y vegetación asociada a este cultivo (Pérez-De La Cruz, *et al.*, 2009; Camacho, 2012; Rangel *et al.*, 2012). Por esta razón, Rangel *et al.*, (2012), tomaron la iniciativa de analizar la dinámica poblacional y comportamiento (de acuerdo a la humedad y temperatura) de *X. affinis* y *X. ferrugineus*, en plantaciones de cacao del estado de Tabasco. Por su parte, Pérez-Silva *et al.*, (2015) realizaron una revisión en la literatura y colecciones científicas de las especies registradas para México (Cuadro 1) reportaron 19 especies de las cuales cuatro fueron nuevos registros para México.

La especie *X. glabratus*, no se encuentra presente en México, por lo que se considera una plaga exótica, con alto potencial de afectar plantaciones de aguacate (Pérez-Silva *et al.*, 2015), por esta razón Bocanegra en 2012 realizó un análisis de riesgo para esta especie. Por la misma causa, la Dirección General de Sanidad Vegetal (2014), la categorizó como plaga cuarentenaria. De acuerdo a la información existente de *X. glabratus* en México, esta especie se incluye dentro de la NOM-016-SEMARNAT-2013, que regula fitosanitariamente la importación de madera aserrada, la cual indica que la madera debe

Cuadro 1. Especies del género *Xyleborus* registradas para México de acuerdo con la literatura y colecciones científicas. (Tomado de Pérez- Silva *et al.* 2015)

Especies mexicanas del género <i>Xyleborus</i> Eichhoff	
1. <i>Xyleborus affinis</i> Eichhoff 1868	11. <i>Xyleborus palatus</i> Wood 1974
2. <i>Xyleborus bispinatus</i> Eichhoff 1868 [§]	12. <i>Xyleborus posticus</i> Eichhoff 1869
3. <i>Xyleborus declivis</i> Eichhoff 1869	13. <i>Xyleborus spathipennis</i> Eichhoff 1868
4. <i>Xyleborus discretus</i> Eggers 1933	14. <i>Xyleborus spinulosus</i> Blandford 1898
5. <i>Xyleborus horridus</i> Eichhoff 1869	15. <i>Xyleborus squamulatus</i> Eichhoff 1869
6. <i>Xyleborus ferrugineus</i> (Fabricius) 1801	16. <i>Xyleborus subductus</i> Schedl 1976 [§]
7. <i>Xyleborus imbellis</i> Blandford 1898	17. <i>Xyleborus titubanter</i> Schedl 1976 [§]
8. <i>Xyleborus intrusus</i> Blandford 1898	18. <i>Xyleborus vismiae</i> Wood 1974 [§]
9. <i>Xyleborus macer</i> Blandford 1898	19. <i>Xyleborus volvulus</i> (Fabricius) 1775
10. <i>Xyleborus morulus</i> Blandford 1898	

§ Especies registradas por primera vez para México

estar libre de plagas cuarentenarias, incluidas las especies de *Xyleborus* no presentes en México, esto con la finalidad de evitar la introducción de especies exóticas (Bocanegra, 2012).

Existen campañas fitosanitarias para evitar la entrada, distribución y establecimientos de plagas en México, el establecimiento de estas impacta en varios ámbitos principalmente agricultura, economía, comercio, aspectos políticos etc., por ello la importancia de la implementación de un diagnóstico rápido y certero (SENASICA, 2015).

3.2. Diagnóstico Fitosanitario

El incremento de la población a nivel mundial y la demanda de alimentos inocuos, así como, la importancia de salvaguardar la inocuidad de los campos Mexicanos ha obligado a buscar nuevas alternativas para el diagnóstico fitosanitario y zoonosanitario; la aplicación de estas tecnologías debe dirigirse a la correcta identificación de las plagas y/o agentes causales de las enfermedades (Bautista, 2006).

El diagnóstico es una de las actividades determinantes para evitar la introducción de plagas exóticas a un país, salvaguardando su soberanía alimentaria, la salud de sus habitantes, animales y plantas, así como su diversidad biológica. Esta actividad está en constante cambio y modernización por lo que cada vez se generan nuevas técnicas más eficientes (Sosa-Moss *et al.*, 1997).

La alta diversidad y similitud morfológica entre organismos ha sido una problemática para una identificación rápida y expedita. Esta confusión taxonómica ha provocado el aumento de la utilización de las técnicas moleculares para la identificación de diversidad interespecífica e intraespecífica dentro de un grupo complejo de especies (Guerber *et al.*, 2003).

En las últimas décadas el uso de técnicas moleculares en el diagnóstico ha permitido contar con nuevas herramientas para la investigación de la variabilidad genética (Martin *et al.*, 2000). Las técnicas moleculares han revolucionado cada vez más, y están siendo aplicadas a la investigación, de modo que se genere información genética y filogenética de manera veraz, rápida, económica, escalable, sensible y específica. Estos aspectos contribuyen a aumentar la productividad, eficiencia y rentabilidad de un diagnóstico, ya que posibilita la ubicación en breve de focos de infección asociados a un agente transmisor para

aplicar selectivamente estrategias de manejo, disminuyendo costos directos (Eguarte *et al.*, 2007).

En general, la adopción de una u otra técnica está dada por la complejidad y características del organismo, reflejados en los nuevos conocimientos aportados por los científicos, principalmente en otras áreas que también se han revisado y enriquecido (Cornejo *et al.*, 2014).

3.2.1. Biología molecular

La biología molecular es una de las ramas de la biología que se encarga del estudio molecular de los procesos que tienen lugar en los seres vivos (Lodish *et al.*, 2005). Su principal objetivo es determinar el flujo global de información, del ADN al ARN y de este a las proteínas, como lo indica el dogma central de la biología molecular (Luque y Herraéz, 2008; Madigan *et al.*, 2009).

El ácido desoxirribonucleico (ADN) es una macromolécula que contiene las instrucciones genéticas del desarrollo y funcionamiento de todos los organismos vivos; asimismo, es la molécula responsable de transmitir la herencia que tiene como fin almacenar, a largo plazo, la información genética (Heritier, 1984).

Una vez que se reconoció la importancia del ADN en los procesos genéticos, se intensificó la investigación y se enfatizó en el análisis del ADN poseía un alto potencial para llevar a cabo una gran cantidad de estudios biológicos tales como la identificación molecular, inferencia filogenética, genética, y genómica (Das *et al.*, 2012). Para todos estos procesos es necesario aislar ADN de alto peso molecular, intacto y con el menor número de contaminantes para la aplicación de varias técnicas moleculares como RFLP, hibridización, PCR, PFGE (electroforesis en gel de campo pulsante), Southernblot, microarreglos de

ADN y construcción de bibliotecas genómicas. Inclusive, en el área médico-legal, Del Valle *et al.* (2004) indican que el descubrimiento de regiones hipervariables del ADN en el genoma ha permitido generar perfiles genéticos útiles para identificar individuos o indicios biológicos de cualquier índole. Además, con frecuencia el ADN es utilizado en revisiones médicas, diagnósticos e investigaciones forenses.

3.2.2. Técnicas moleculares en el diagnóstico fitosanitario

El uso de técnicas moleculares para diagnóstico de plagas insectiles es una opción relativamente novedosa, para aplicar métodos complementarios en el diagnóstico. La implementación de las técnicas moleculares involucra la interacción del conocimiento detallado en diversas ramas de la biología, química, informática y tecnología de procesamiento, por tal motivo todos los procedimientos de diagnóstico molecular deben de ser estandarizados y validados antes de su implementación en el diagnóstico de insectos (ISO, 2016).

Sin embargo, estos avances científicos en ensayos moleculares no serían confiables si la extracción de ADN fuera incorrecta (la calidad y la pureza son importantes), por lo que se ha deducido que la extracción es un procedimiento crucial para la obtención de resultados con validez y de alta resolución (Das *et al.*, 2012). A la fecha existen una gran cantidad de protocolos o métodos que han sido establecidos para aislar moléculas de ADN de materiales biológicos; cada método tiene un efecto distinto en la extracción de ADN y depende de la fuente (tejido animal, vegetal, corteza de árboles, escamas, cabellos, etc.), edad, y tamaño de las muestras (Molina *et al.*, 2006; Reddy, 2009); no obstante, se ha definido que una técnica de extracción ideal debe optimizar el rendimiento de ADN, minimizar la degradación y ser eficiente en términos de costo, tiempo, trabajo e insumos;

asimismo, debe ser adecuada para extraer múltiples muestras y generar un mínimo desperdicio de reactivos peligrosos (Zambrano *et al.*, 2002; Valadez y Kahl, 2005).

3.2.3. Extracción de ADN

Los pasos necesarios para una correcta extracción y purificación de ADN de forma general pueden resumirse en: *Lisis de las células*: Las sales caotrópicas ayudan a romper la estructura tridimensional de las macromoléculas como las proteínas o los ácidos nucleicos consiguiendo su desnaturalización. La adición de un detergente como el SDS es necesaria para eliminar las membranas. *Extracción de la fracción proteica asociada al ADN*: se consigue mediante la adición de una proteasa. La fracción proteica puede precipitarse mejor con la ayuda de sales (acetato de amonio o de sodio). *Purificación*: consta generalmente de tres fases que involucran a la *precipitación* en donde el ADN, al ser insoluble en alcohol, se puede precipitar con algún alcohol (generalmente etanol, metanol o isopropanol absoluto) y recuperar mediante una centrifugación. El alcohol del sobrenadante se llevará las sales añadidas previamente. Una vez precipitado se realiza el *lavado de la pastilla de ADN*, que consiste en agregar alcohol frío al 70% con un paso de centrifugación y secado al ambiente. Finalmente se realiza la *recuperación* resuspendiendo la pastilla de ácidos nucleicos comprimida en agua grado biología molecular o buffer Tris (Rådström *et al.*, 2004; Microbial-Systems, 2009; Reddy, 2009; Knebelsberger y Stöger, 2012).

En el caso específico de insectos, al presentar un exoesqueleto, se requiere un método eficiente de extracción donde se recupere ADN de alta calidad, libre de compuestos secundarios, proteínas y polifenoles que se precipitan junto con el ADN, los cuales pueden afectar cualquier técnica molecular aplicada sobre el ADN (Zambrano *et al.*, 2002).

3.2.4. Cuantificación y calidad de los ácidos nucleicos

La calidad del ADN se confirma mediante electroforesis en un gel de agarosa o poliacrilamida, el cual es teñido con bromuro de etidio, nitrato de plata o gel red, y es observado con luz UV, o bien, se corrobora de forma directa utilizando un espectrofotómetro en el que se realizan lecturas a 260 y 280 nm (Microbial-Systems, 2009).

3.2.4.1. Determinación espectrofotométrica

La cuantificación de ADN, debe hacerse a longitudes de onda de 260 nm, lo cual permite el cálculo de la concentración de los ácidos nucleicos en la muestra. La relación de absorbancia a 260 y 280 nm ($DO_{260/280}$) aporta una estimación de la pureza de los ácidos nucleicos. Las preparaciones puras del ADN tienen valores que van desde 1.8 a 2.0 a $DO_{260/280}$ respectivamente. Si hay contaminación con proteínas o fenoles, el valor obtenido en esta relación, es significativamente diferente para los valores $DO_{260/280}$ y no será posible la cuantificación de las moléculas (Valadez y Kahl, 2005). Además de estimar esta relación es conveniente la medición a 230 nm ya que esta proporciona información valiosa acerca de la pureza de la muestra debido a que a 230 nm se localiza la absorbencia mínima de ácidos nucleicos y nucleótidos, se localiza la absorbencia máxima de enlaces peptídicos, lectura que es indicativo de contaminación (tris, EDTA o SDS) y presencia de compuestos orgánicos (solventes y antibióticos) (Valadez y Kahl, 2005).

3.2.4.2. Determinación de la calidad del ADN en geles de agarosa

Valadez y Kahl, (2005) anotan que el grado de degradación del ADN puede ser estimado por electroforesis en geles de agarosa. El ADN de peso molecular alto se aprecia como una banda bien definida en la parte superior del gel a poca distancia del pozo, mientras que el

material degradado forma un barrido a lo largo del carril, haciendo que la definición de la banda pierda su nitidez y en algunos casos no se observe. La presencia de otros compuestos que también absorben la radiación como fenoles y polisacáridos principalmente, conducen a una incorrecta interpretación. Una forma rápida de estimar la pureza es a través de la fluorescencia que emite el bromuro de etidio o gel red al ser excitado con luz UV, debido a que este compuesto tiene la afinidad por moléculas de ADN en las cuales se intercala, de manera que al irradiar el gen puede apreciarse la ubicación, calidad y cantidad de la molécula. La estimación puede llevarse a cabo debido a que la fluorescencia emitida es proporcional al total de la masa del ADN.

3.2.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR es una de las tecnologías más empleadas en la actualidad en el área de diagnóstico. Usando la técnica de PCR (la cual implica la utilizar oligos específicos para el gen de interés, polimerasa termoestable y ciclos térmicos) es posible que secuencias específicas de ADN o cADN (ADN complementario) puedan ser “amplificadas” miles o millones de veces (www.lifetechnologies.com, 2013).

La PCR puede ser utilizada para detectar cantidades muy bajas de ADN del organismo de interés presente en tejido, suelo, savia, entre otros. La PCR fue aplicada inicialmente para la detección e identificación de fitoplasmas, virus y viroides. Sin embargo, hongos, bacterias, nematodos e insectos pueden ser detectados e identificados a través de la misma. La aplicación de la PCR en el diagnóstico fitosanitario se ha centrado principalmente en aquellos organismos que no son fácilmente identificables o en las cuales existen similitud con sus parientes más cercanos (Trujillo *et al.*, 2009).

Una de las variantes de la PCR es la *Nested-PCR* o PCR- anidada, la cual consiste en dos procesos de amplificación sucesivos. En esta técnica el producto de amplificación de la primera PCR (PCR simple) sirve como molde para la segunda PCR, donde se emplea un juego de oligonucleótidos que hibridan internamente a este molde. La PCR anidada aumenta la sensibilidad y especificidad. Esta técnica se utiliza principalmente cuando las muestras son muy pequeñas o de baja calidad. Dado que la PCR amplifica, de forma exponencial, al fragmento de interés, la cantidad del amplicon producido será proporcional al número de moléculas de ADN iniciales (Batista *et al.*, 2008). Sin embargo, existen factores como la temperatura de alineamiento, concentración de los reactivos, tipo de muestra, tamaño, entre otros que pueden afectar o dar resultados incorrectos, de aquí la importancia de utilizar técnicas previamente estandarizadas y validas en el diagnóstico fitosanitario.

3.3. Validación y Estandarización

Hollingsworth *et al.* (2011) anotan, que los dos principios centrales en el diagnóstico molecular son la estandarización y validación de los protocolos de PCR y extracción de ácidos nucleicos. La estandarización de los protocolos garantiza la calidad en los procesos de diagnóstico, ya que las técnicas son ejecutadas con precisión y uniformidad asegurando la confiabilidad de los resultados.

Los primeros estudios de estandarización y validación de PCR se realizaron en el campo de la medicina e inocuidad de alimentos con el objetivo de obtener resultados rápidos, precisos y confiables. En este marco teórico, la estandarización y validación consiste en emplear recursos científicos, técnicos, disciplinarios y argumentativos con el objetivo de

evaluar la eficacia y eficiencia de las metodologías de diagnósticos molecular (Falsetti *et al.*, 2004).

3.3.1. Validación de los métodos analíticos

Los métodos analíticos son validados con el objetivo de confirmar los resultados obtenidos, mediante evidencias objetivas, donde se cumplen los requisitos para un uso específico, según la rigurosidad del objetivo. La validación de métodos analíticos se clasifica en: a) métodos del propio laboratorio, b) métodos de revistas científicas, c) métodos oficiales y d) métodos estándar (Trullols *et al.*, 2004).

Se entiende como método analítico aquel cuya respuesta se basa en la presencia o ausencia del analito (ADN molde) detectado, directa o indirectamente en n número de muestras (Feldsine *et al.*, 2002). Trullols *et al.* (2004) enlistan, los siguientes parámetros para la validación de un método cualitativo: a) *Rango de trabajo*: es el intervalo de concentración donde el analito tiene un adecuado nivel de confianza y precisión, con este concepto se incluyen los términos límite de detección y límite de corte; el *límite de detección*: define la menor concentración de ácido nucléico que pueda ser detectada en un 95%; *límite de corte*: es la cantidad óptima de analito detectable. b) *Selectividad o especificidad*, está dada por el diseño de oligonucleótidos y sondas que reconocen específicamente al gen de interés, para su detección y la rigurosidad de las condiciones en las que se lleva a cabo la reacción de amplificación y detección de los productos de la misma. c) *Robustez*, la cual se demuestra introduciendo variaciones en las concentraciones de los reactivos o en las etapas del método; por último la *reproducibilidad*: consiste en realizar n número de repeticiones del ensayo bajo las condiciones ya estandarizadas y

validadas (Ponce *et al.*, 2003; Poutou *et al.*, 2005; Santamaría *et al.*, 2005; Ferrer *et al.*, 2008; Villarreal *et al.*, 2008).

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Ubicación

La estandarización, validación y optimización de la técnica de detección molecular para especies de *Xyleborus* se realizaron en el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo en el “Laboratorio de Diagnóstico Integral Fitosanitario (LADIFIT)”, ubicado en la Carretera México-Texcoco Km. 36.5 Montecillo, Texcoco, Estado de México.

4.2. Material biológico

Se utilizaron individuos donados a partir de la colección entomológica del Centro Nacional de Referencia Fitosanitario (CNRF) y del Colegio de Postgraduados, previamente identificados mediante caracteres taxonómicos por el personal del CNRF, Dr. Armando Equihua Martínez y M.C. Mauricio Pérez Silva. Las muestras incluían individuos pertenecientes al género *Xyleborus*, colectados en diferentes trampas instaladas en plantaciones de cacao y aguacate en Tabasco y Michoacán, México y Florida, EUA (Cuadro 2) y preservados en seco o etanol al 70%.

4.3. Identificación Morfológica y Documentación Fotográficas de las Características Distintivas de las Especies del Género *Xyleborus*

La identificación de los ejemplares, se realizó mediante clave específica propuesta por Pérez-Silva *et al.* (2015) y la identidad de los ejemplares fue corroborada por el M.C. Pérez Silva, especialista en el grupo. En todos los individuos se documentaron las características

Cuadro 2. Individuos del género *Xyleborus*, utilizados para la extracción de ADN y amplificación del gen CO1, colectados en trampas de luz instaladas en plantaciones de cacao y aguacate en Tabasco, Michoacán, México y Florida, USA.

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

morfológicas distintivas de cada ejemplar utilizando un fotomicroscopio Tesovar (Carl Zeiss). Se realizaron tomas fotográficas de cada ejemplar en posición lateral, dorsal, frontal y del declive elitral de cada una de las especies estudiadas. Para obtener un enfoque óptimo en las fotografías se utilizó el software Combine ZP y para el procesamiento de imágenes se editaron con GIMP 2.8.4.

4.4. Identificación Genética

4.4.1. Extracción de ADN a partir de especímenes de *Xyleborus*

Previo a la extracción de ADN, los especímenes se lavaron, tres veces con 500 µL de TAE 1X (4.68g de Tris Base 1M pH 8.0; 1.14 mL de ácido acético glacial y 2g de EDTA 0.5M) durante 5 min, para eliminar el etanol. Cada espécimen se colocó en una sanita

estéril, y se dejó secar por 48 horas. El ADN se extrajo individualmente de hembras adultas del género *Xyleborus*, empleando el kit de Qiagen DNeasy® mericom Food [69514] (DMF) siguiendo las instrucciones marcadas por el fabricante, con las ligeras modificaciones.

Protocolo de extracción de ADN para el género *Xyleborus* con el kit DNeasy ® mericom Food (DMF) con ligeras modificaciones

Se colocó un individuo en un tubo de 1.5 mL. Se maceró en 100 µL de buffer de lisis (Food Lysis Buffer) con la ayuda de un micropistilo. Posteriormente, se añadió 0.3 µL de proteinasa K, se incubó por media hora a 60°C (se mezcló por intervalos de 30s cada 5 minutos). Terminada la incubación, se centrifugó por cinco minutos a 2 500 g, se recuperó el sobrenadante en un tubo limpio de 1.5 mL, se le agregaron 100 µL de cloroformo, se agitó vigorosamente en vortex, y se centrifugó durante 15 minutos a 13 300 g. La fase superior se recuperó y a ésta se le agregó un volumen de buffer PB igual al recuperado. La mezcla se homogeneizó con la micropipeta, y transfirió a la columna QIAquick® Spin y centrifugó un minuto a 13 300 g. Se lavó la columna con 100 µL de buffer AW2 y se centrifugó nuevamente por un min a 13 300 g. El secado de la columna, se efectuó mediante la eliminación del sobrenadante del tubo de colección y colocando la columna en el tubo de colección y centrifugando durante un minuto a 13 300 g. Enseguida se transfirió la columna a un tubo nuevo de 1.5 mL para agregarle en el centro 20 µL de buffer EB y centrifugar un minuto a 13 300 g. El producto se almacenó a -20°C hasta su uso.

Posteriormente se realizó la cuantificación del ADN mediante espectrofotometría con un Nanodrop2000 (Thermoscientific), con una longitud de onda de 260 y 230 nm. Para estimar

la pureza del ADN se consideró la relación de absorbencia 260/280 nm ($DO_{260/280}$) y 260/230 ($DO_{260/230}$) (Valadez y Kahl, 2005).

4.4.2. Estandarización y Validación de la PCR-anidada para la Identificación de *Xyleborus* spp

4.4.2.1. Estandarización

Para realizar la amplificación de ADN mitocondrial (ADNmt) de especies de *Xyleborus* se tomaron como referencia los oligos reportados por Cognato y Sperling (2000) y Chang *et al.*, (2013). Se amplificaron dos regiones específicas del gen mitocondrial de la citocroma oxidasa subunidad I (CO1mt) en dos pasos. Se utilizaron como oligos externos CI-J-2183 (forward 5'-CAACATTTATTTTGGATTTTGG-3') y TL2-N-3014 (reverse 5'-TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA-3'), que amplifican un fragmento de ~1 300 pb de la región mtCO1, y los oligos internos J2210 (forward 5'-TCGCATATTATTAGGCAAGAAAGAG-3') y N2739 (reverse 5'-AGAAATGTTGTGGGAAGAAAG-3'), que reconocen un fragmento de ~500 pb del gen CO1.

Para la estandarización se realizaron ensayos de amplificación modificando los componentes de la mezcla (concentración de: MgCl₂, dNTP's, oligonucleótidos, Taq polimerasa) (Cuadro 3 y 4) y el programa de amplificación (temperatura de alineamiento) (Cuadro 5) (Bolívar *et al.*, 2014). Los componentes de la reacción y programa de amplificación fueron tomados de la investigación de Chang *et al.*, (2013). Adicionalmente se evaluaron las condiciones de PCR recomendadas por Pormega (2015) (Cuadro 4) así mismo, se evaluaron dos enzimas 1) Go Taq® Flexi DNA polymerase (M8295) y 2) Go Taq® DNA Polymerase (M3005).

Para la estandarización de la PCR, se realizaron ensayos de gradientes por duplicado, con dos ejemplares de *Xyleborus affinis* y dos de *X. volvulus* esto con el objetivo de determinar la mejor temperatura de alineamiento. Se probó un rango de entre 44° a 52.5°C con intervalos de $\pm 1^\circ\text{C}$ (Bolivar *et al.*, 2014).

Cuadro 3. Reacción de amplificación para dos regiones específicas del gen mtCO1 en dos pasos, empleando como oligos externos CI-J-2183 y TL2-N-3014; y como oligos internos J2210 y N2739, reportados por Chang *et al.*, (2013).

Reactivos	*Ci	**Cf	***Vr(μL)
Agua HPLC			16.25
Buffer PCR	5 X	0.5X	2.5
MgCl ₂	25 mM	2 mM	2.0
dNTP's	10 mM	0.8 mM	2.0
Oligo forward	10 mM	0.2mM	0.5
Oligo reverse	10 mM	0.2mM	0.5
Taq polimerasa	5U/ μL	1.25 U	0.25
Muestra ADN		20ng/ μL	1.0
		Volumen final	25.0

*concentración inicial; **concentración final; ***volumen por reacción

Cuadro 4. Reacción de amplificación de PCR de acuerdo con Promega (2015), para la amplificación de dos regiones específicas del gen mtCO1 en dos pasos. Se utilizaron oligonucleótidos externos CI-J-2183 y TL2-N-3014; y oligonucleótidos internos J2210 y N2739 (Chang *et al.*, 2013).

Reactivos	*Ci	**Cf	***Vr (μL)
Agua HPLC			13.2
Buffer PCR	5X	1X	5.0
dNTP's	10mM	0.2 mM	0.5
Oligo Forward	10mM	0.2 mM	0.5
Oligo reverse	10mM	0.2 mM	0.5
Taq polimerasa	5U/ μL	1.5U	0.3
Muestra ADN		20ng/ μL	5.0
		Volumen final	25.0

*concentración inicial; **concentración final; ***volumen por reacción

Para verificar la robustez del protocolo se realizaron los ensayos por duplicado de 1) *concentración del MgCl₂*: se realizaron gradientes en la concentración de MgCl₂, desde 0.5 a 4 mM con incrementos de 0.5 mM; 2) *concentración de los oligonucleótidos*: se

Cuadro 5. Programa para la amplificación de la región mtCO1 de *Xyleborus* sp., citado por Chang *et al.*, (2013) (utilizado en la PCR simple y anidada)

	Pasos de amplificación	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1	Desnaturalización inicial	94°C	5 min	1
2	Desnaturalización del ADN molde	94°C	30 s	
3	Hibridación de los oligonucleótidos	47°C	45 s	35
4	Extensión de la copia	72°C	45 s	
5	Extensión final	72°C	10 min	1

incremento (50µM) la concentración de oligos desde 100µM hasta 300µM; 3) *concentración de los dNTP's*: se realizaron gradientes de 100µM a 300 µM con incrementos de 50 µM, 4) *concentración de la Taq polimerasa*: en un rango de 0.5 U a 2.5 U con incrementos de 0.5 U (Promega Technical Bulletin, 2005; Bolivar *et al.*, 2014 y Promega protocolos, 2015). Finalmente, la *optimización de la mezcla de PCR*: se realizaron pruebas por duplicado con un volumen de 25 µL (Chang *et al.*, 2013), y en un volumen de 15 y 10 µL por reacción.

4.4.3. Validación

Una vez establecidos los parámetros ideales en la concentración de los componentes de la PCR (MgCl₂, dNTP's, oligonucleótidos, Taq *polimerasa*) y programa de amplificación (temperatura de alineamiento) para la detección de especies de *Xyleborus*, se determinó el límite de detección (LD), reproducibilidad, sensibilidad y especificidad. Todos los ensayos

se realizaron por duplicado con dos ejemplares de *Xyleborus affinis*, *X. volvulus* y un ejemplar de *Prostephanus truncatus*.

El límite de detección se determinó realizando diluciones seriales con base en 10 (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) del producto de la PCR simple (obtenido a partir de la primera amplificación). *Especificidad* se corroboró utilizando ADN genómico de otros individuos pertenecientes al orden Coleoptera (*Prostephanus truncatus*). Finalmente la *reproducibilidad* se realizó con las sugerencias de Villarreal *et al.*, (2008). Esta prueba consistió en realizar repeticiones del ensayo de detección con cinco repeticiones, bajo las condiciones ya estandarizadas y validadas

La estandarización y validación de esta técnica, se realizó en un termociclador Bio-rad (My Cycler™ Thermal cycler 580BR4018) con reactivos de la marca promega (M8295 y M3005). Todas las pruebas se visualizaron mediante electroforesis en una cámara Cleaverscientific Ltd a 89 V por 40 minutos con buffer TAE 1X (4.68g de Tris Base 1M pH 8.0; 1.14 mL de ácido acético glacial y 2g de EDTA 0.5M) en geles de agarosa al 1.5 % (Agarosa, LE, grado analítico) teñidos con bromuro de etidio (10mg/μL). Los productos de PCR se visualizaron en un transiluminador (Gel Doc XR, BIO-RAD®) con luz UV.

4.4.4. Análisis molecular

El análisis molecular incluyó las secuencias obtenidas a partir de la extracción y amplificación del ADN de 26 ejemplares del género *Xyleborus*. Para la secuenciación se limpiaron los productos de la PCR-anidada con columnas Wizard®SV Gel & PCR Clean Up System (Promega® Cat: a9282) de acuerdo a las recomendaciones del proveedor. Este producto fue enviado a secuenciar al Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBT UNAM), con los oligos internos (J2210 y N2739). Los electroferogramas se editaron y analizaron

mediante un alineamiento por homología utilizado el programa *Clustal W* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) implementado en la versión 6.0 del programa Mega (Tamura *et al.*, 2013).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Identificación Morfológica y Documentación Fotográfica de las Características Distintivas de las Especies del Género *Xyleborus* Estudiadas

Se corroboró la identidad de los ejemplares de acuerdo a la clave propuesta por Pérez-Silva *et al.*, (2015). La diferenciación de especies del género se hizo con base en caracteres morfológicos como las crenulaciones del pronoto, forma del mazo antenal, forma y ornamentaciones del margen anterior del pronoto, dientes en la protibia y declive elitral, entre otros (Cuadro 6) (Wood 1986; Rabaglia *et al.* 2006; Pérez-Silva *et al.*, 2015). Además, las características distintivas de *Xyleborus affinis* (Figura 1), *X. ferrugineus* (Figura 2), *X. glabratus* (Figura 3), *X. horridus* (Figura 4), *X. intrusus* (Figura 5), *X. spinulosus* (Figura 6) y *X. volvulus* (Figura 7) fueron validadas por el M. en C. Pérez, especialista en el grupo, y que coincidieron con las reportadas en la literatura (Pérez-De La Cruz *et al.*, 2009; Atkinson *et al.*, 2013 y Pérez-Silva *et al.*, 2015).

Cuadro 6 Características morfológicas distintivas de especies de *Xyleborus* estudiadas
(Tomado de Pérez-Silva, 2014)

Especie	Tamaño (mm)	Declive elítral	Estrías	Interestrías	Otras
<i>X. affinis</i>	1.9 a 2.7	Empinado (moderado), convexo y opaco	No impresas	Uno y tres armadas por dos a cuatro tubérculos pequeños	
<i>X. ferrugineus</i>	2.4 a 2.9	Empinado y aplanado	Débilmente definidas; puntuaciones moderadamente gruesas y poco profundas	Uno: con tubérculo moderadamente grande. Dos: desarmada y Tres: con un denticulo moderadamente grade en la base y uno más grande en medio del declive o cerca del ápice	
<i>X. glabratus</i>	2.0	Convexo (ligeramente) con caída abrupta y brillante	No impresas Puntuaciones pequeñas y superficiales; más profundas y grandes que en el disco.	Lisas y brillantes más anchas que las estrías, puntuaciones pequeñas, con carina desde el ápice a la interestría siete	
<i>X. horridus</i>	3.8 a 4.2	Empinado cerca del ápice	No definidas	No definidas	Cuerpo ampliamente pubescente. Puntuaciones elitrales pequeñas densas impresas y confusas
<i>X. intrusus</i>	2.2 a 2.7	Empinado y fuertemente convexo	Impresas y puntuaciones pequeñas y poco profundas	Definidas uno y tres armadas de tres a seis tubérculos grandes; dos desarmada o con pequeños gránulos cerca de la base	
<i>X. spinulosus</i>	1.8 a 2.6	Granulado	Uno y dos definidas	Uno y dos armadas por pequeños gránulos; tres armada por dos o tres gránulos más grandes y una espina muy larga en medio del declive	Margen posterolateral con seis denticulos, los últimos dos más grandes
<i>X. volvulus</i>	2.1 a 2.8	Empinado, convexo y brillante	No impresas con puntuaciones gruesas y profundas ordenadas en filas; uno y tres con puntuaciones más grandes que las del disco	Uno armada por tres a cinco tubérculos medianos; dos armada por dos o tres tubérculos pequeños cerca de la base y uno o dos en el ápice y tres armada con tres tubérculos pequeños en la base y tres más grades	



Figura 1. *Xyleborus affinis*: vista lateral, dorsal, frontal y posterolateral.

Xyleborus ferrugineus

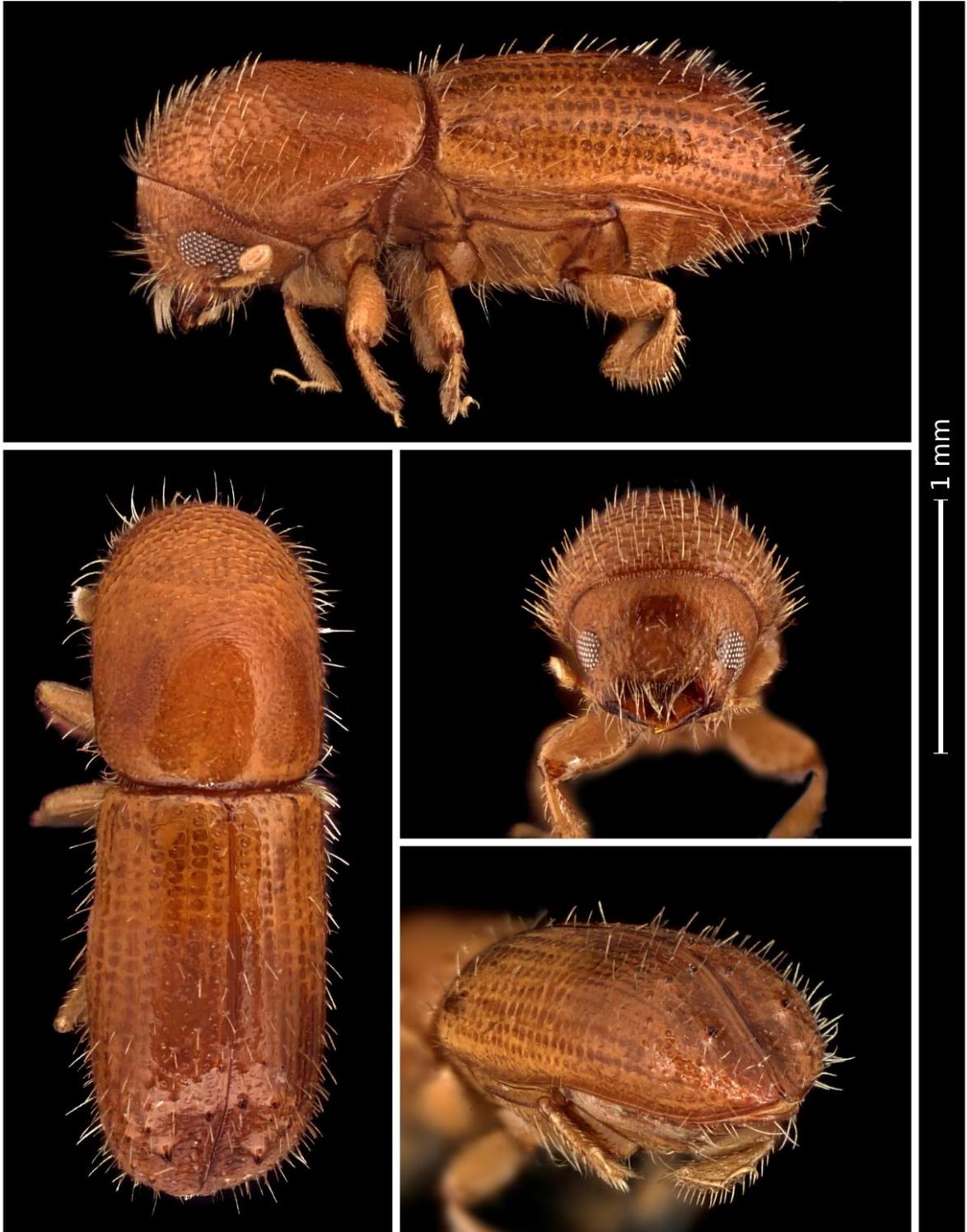


Figura 2. *Xyleborus ferrugineus*: vista lateral, dorsal, frontal y posterolateral (Imagen J.M. Valdez Carrasco y L.D. Ortega Arenas).



Figura. 3. *Xyleborus glabratus*: vista lateral, dorsal, frontal y posterolateral (Imagen J.M. Valdez Carrasco y L.D. Ortega Arenas).



Figura 4. *Xyleborus horridus*: vista lateral, dorsal, frontal y posterolateral.



Figura 5. *Xyleborus intrusus*: vista lateral, dorsal, frontal y posterolateral



Figura 6. *Xyleborus spinulosus*: vista lateral, dorsal, frontal y posterolateral



Figura 7. *Xyleborus volvulus*: vista lateral, dorsal, frontal y posterolateral

5.2. Identificación Genética

5.2.1. Extracción de ADN

El kit DMF de Qiagen®, resultó adecuado en la extracción de ADN a partir de un individuo de *Xyleborus*, sencilla, rápida, reproducible y con cantidad suficiente para realizar amplificación del ADN por PCR. El total de las extracciones amplificaron un fragmento de ~500 pb correspondientes a una sección del gen mitocondrial CO1 (Figura 8). Una utilidad práctica del kit DMF Qiagen® fue el hecho de que la mayoría de las muestras procesadas tenían una antigüedad de ocho años de conservación en etanol al 70% o en seco, por lo que su aplicación en material almacenado es evidente, sin embargo, al cuantificar el ADN se observó mejor rendimiento en muestras con ejemplares grandes, frescos y con menor tiempo de almacenamiento (Cuadro 7). Debido a la baja cantidad de ADN recuperado no se realizó gel de calidad. En este sentido, el uso del kit DFM empleado en este estudio, sin duda, mejoró la calidad y pureza del ADN extraído, lo cual coincide con lo reportado por varios autores (Schwerer *et al.*, 2015 y Kušec *et al.*, 2015) quienes resaltan alta sensibilidad del kit en la extracción de ADN, con cierto grado de degradación, lo que asegura la amplificación mediante PCR, características que lo hacen adecuado para su uso en la identificación de especies de *Xyleborus*. Contrario a ello Volk *et al.* (2014) señalan que el bajo rendimiento de ADN (cantidad y calidad) obtenido con el kit DMF, junto con el alto costo, en comparación con otras metodologías, pone en duda el uso práctico del kit. No obstante, se debe considerar que el éxito en la identificación de especies mediante técnicas moleculares depende directamente de la metodología y calidad del organismo (Barrio-Caballero, 2012 y Martínez de la Puente *et al.*, 2013), en particular, lo referente al tamaño, tipo y tiempo de conservación de la muestras, debido a que generalmente se obtienen

mejores resultados con ejemplares frescos y correctamente preservados (Cornejo *et al.*, 2014).

Cuadro 7. Cuantificación de ADN obtenido mediante el kit DFM Qiagen®, considerando individuos conservados en alcohol 70% (2007-2014) y sacrificados en frío (2015).

Especie	Año de colecta y tipo de conservación	Repetición	Concentración ADN (ng/μL)	260/280	260/230
<i>Xyleborus affinis</i>	2014 Alcohol 70%	Xa.1	43.9	2.02	2.12
		Xa.2	58	2.04	2.01
		Xa.3	45.2	2.05	2.78
		Xa.4	54.8	1.73	1.02
		Xa.5	104	1.95	1.81
		Xf1	25.2	2.17	1.42
<i>Xyleborus ferrugineus</i>	2007 Alcohol 70%	Xf2	3.4	2.23	0.14
		Xf3	3.4	2.08	0.18
		Xf4	3.0	1.86	0.17
		Xf5	3.0	1.60	0.13
		Xf6	3.5	1.72	0.17
		Xg	3.1	2.26	0.20
<i>Xyleborus glabratus</i>	2007 Alcohol 70%	Xh1	13.3	1.78	0.64
		Xh2c	6.1	1.78	0.36
		Xh3p	2.6	2.15	0.18
		Xh4a	5.8	1.85	0.27
		Xh5	10.0	1.71	0.43
<i>Xyleborus introsus</i>	2007 Alcohol 70%	Xi1	7.7	1.58	0.38
		Xi2	4.4	1.98	0.25
		Xi3	12.6	1.77	0.48
<i>Xyleborus spinulosus</i>	2007 Alcohol 70%	Xs1	1.7	8.62	0.12
		Xs2	4.5	1.65	0.18
		Xs3	3.2	2.08	0.18
<i>Xyleborus volvulus</i>	2012 Alcohol 70%	Xv.1	64.6	2.01	2.05
		Xv.2	54.7	2.08	2.14
		Xv.3	26.4	2.11	1.9
		Xv.4	39.9	1.99	2.19
		Xv.5	57.2	2.2	1.19
<i>Prostephanus truncatus</i>	2015 -20°C	R1	267.7	2.02	2.12
		R2	180.6	2.04	2.09

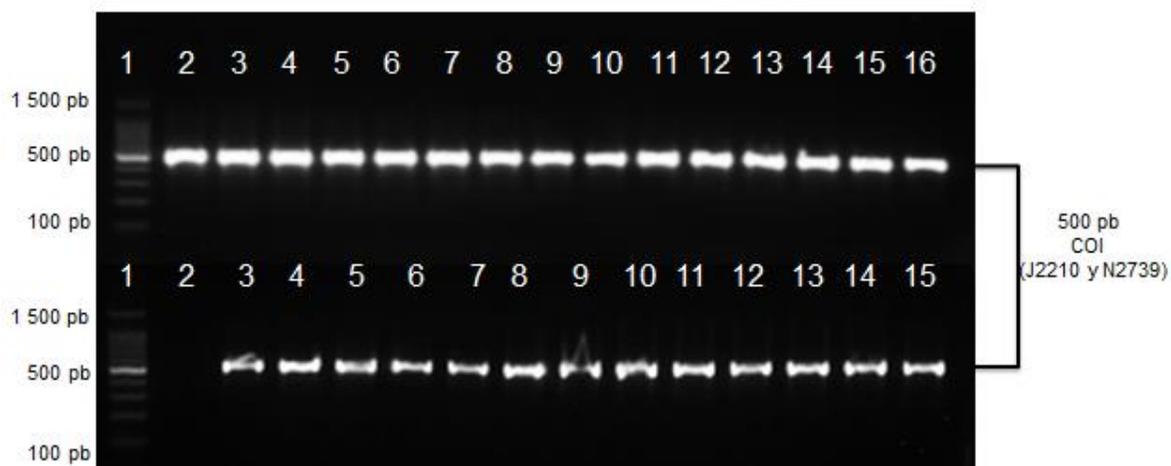


Figura 8. Amplificación del ADN extraído de diferentes muestras de *Xyleborus* con el Kit DMF Qiagen® dirigido al gen COI. **Arriba:** 1) Marcador de peso molecular MPM (100pb Ladder); 2-7) *X. affinis*; 8-13) *X. ferrugineus*; 14-16) *X. horridus*. **Abajo:** 1) MPM; 2) control negativo; 3) *X. glabratus*;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

5.2.2. Estandarización y Validación de la PCR-anidada Dirigido a dos Regiones

Específicas del Gen CO1mt para la Identificación de Especies de *Xyleborus*

5.2.2.1. Estandarización

La estandarización de la PCR se inició con las condiciones propuestas por Chang *et al.*, (2013) utilizando la enzima “a” (Go Taq® Flexi DNA polymerase [M8295]). Debido a que no se logró reproducibilidad con esa enzima fue necesario utilizar la enzima “b” (Go Taq® DNA Polymerase [M3005], con las recomendaciones del proveedor (Promega, 2015).

En los ensayos para determinar la temperatura de alineamiento (T_m) se observó amplificación de calidad en las temperaturas de 49.1, 50.7 y 52.5°C (Figura 9), valores cercanos a la T_m (47°C) utilizada por Chang *et al.*, (2013) en la PCR para el diagnóstico de

Xyleborus. No obstante, y como recomiendan algunos autores (Bolívar *et al.*, 2014 y Cornejo *et al.*, 2014) se incrementó la T_m (2 a 3°C) a fin de favorecer la especificidad de la alineación estableciendo que la T_m de 52.5°C generó un amplicon de mejor calidad en comparación con el resto de las temperaturas evaluadas.

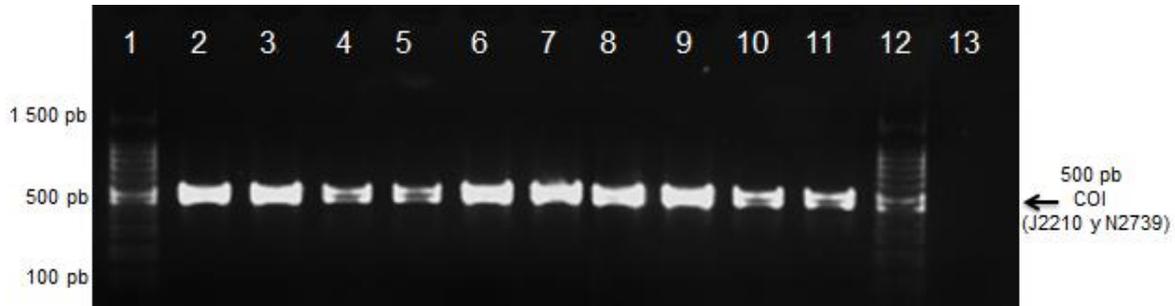


Figura 9. Amplificación del ADN de *Xyleborus affinis* y *X. volvulus* a diferentes gradientes de temperatura (T_m), visualizado en un gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio. Carril: 1 y 12) Marcador de peso molecular (MPM de 100pb Ladder); gradientes de T_m : 2-3) 52.5°C; 4-5) 51.8°C; 6-7) 50.7°C; 8-9) 49.1°C; 10-11) 47.1°C; 13) Control negativo.

Para mejorar la sensibilidad y comprobar la robustez se realizaron pruebas de gradientes en la concentración de $MgCl_2$. En donde no se observó amplificación en ningún gradiente (Figura 10), por tal motivo se descartó el uso de esta mezcla (Chang *et al.*, 2013) en los siguientes ensayos, debido a que perdió reproducibilidad.

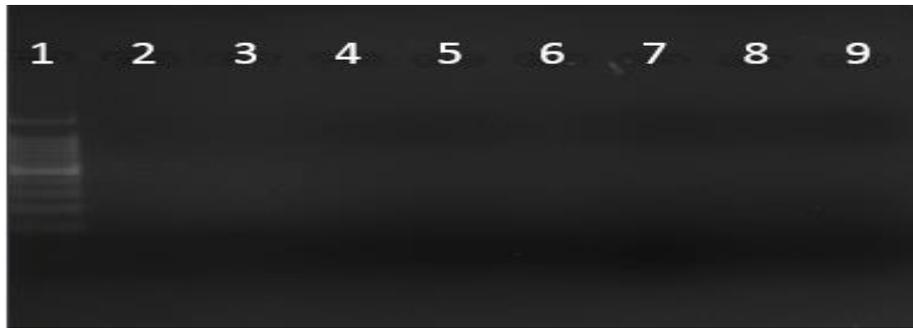


Figura 10. Gradientes en la concentración de $MgCl_2$, visualizados en un gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio. 1) Marcador de peso molecular (MPM 100 pb 100 Ladder); 2) 0.5 mM; 3) 1.0 mM; 3) 1.5 mM; 4) 2.0 mM; 5) 2.5 mM; 6) 3.0 mM; 7) 3.5 mM; 8) 4.0 mM y 9) control negativo.

Asimismo, los ensayos realizados, para determinar, la concentración de los dNTP's y oligos (Figura 11a (dNTP's) carril 6 y 7 y Figura 11b (oligos) carril 6 y 7), indicaron que la amplificación de mejor calidad se logró con la concentración de 200 μM . Estos valores coinciden con Suzuki & Yao, (2014) y Bolívar *et al.*, (2014) quienes señalan que la concentración tanto de dNTP's y oligos debe usarse con precisión debido a que un exceso o déficit puede ocasionar errores en la PCR. Al respecto Cornejo *et al.*, (2014) y Bolívar *et al.* (2014) reportan que la presencia de dímeros ocasionados por exceso de reactivos ($MgCl_2$, dNTP's y oligos), compromete el éxito en la amplificación del ADN molde

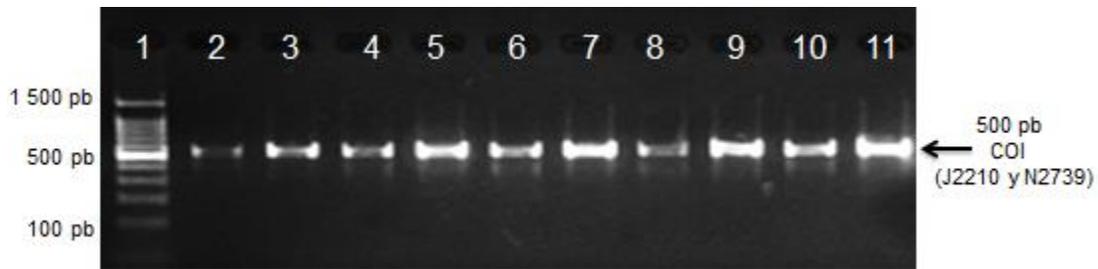


Figura 11a. Amplificación del ADN extraído de ejemplares de *Xyleborus*, empleando diferentes concentraciones de dNTP's, visualizados en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. 1) MM 100pb; gradientes 2-3) 100 μ M; 4-5) 150 μ M; 6-7) 200 μ M; 8-9) 250 μ M; 10-11) 300 μ M.

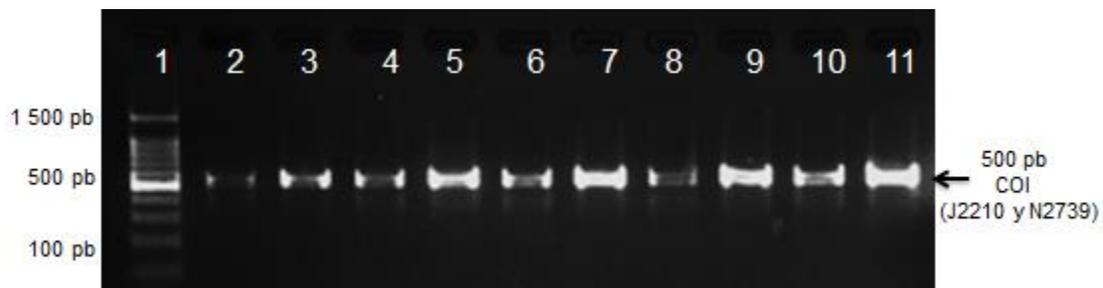


Figura 11b. Amplificación del ADN extraído de ejemplares de *Xyleborus*, empleando diferentes concentraciones de oligos, visualizados en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. 1) MM 100pb; gradientes 2-3) 100 μ M; 4-5) 150 μ M; 6-7) 200 μ M; 8-9) 250 μ M; 10-11) 300 μ M.

Los amplicones obtenidos al emplear diferentes concentraciones de Taq *polimerasa*, fueron nítidos (Figura 12, carril 5), sin embargo, la mayor resolución se logró al utilizar 2 U/ μ L, cantidad que coincide con la utilizada por otros autores (Quiñonez, 2011; y Suzuki & Yao, 2014). Este hallazgo, se contrapone a lo especificado en los Protocolos de Promega (2015) y por autores como Pulido *et al.*, (2006) y Beltrán-Torres *et al.*, (2013), quienes

emplean una cantidad menor de 2 U/ μ L, sin embargo, y como fue evidente en este estudio el utilizar una menor concentración de Taq *polimerasa* conduce a perder nitidez en los amplicones lo que puede llevar a una incorrecta interpretación de resultados.

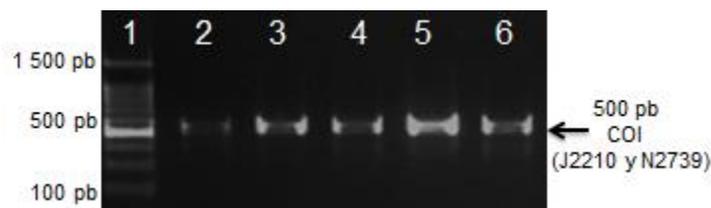


Figura 12. Amplificación del ADN extraído de diferentes especies de *Xyleborus*, empleando diferentes concentraciones de Taq *polimerasa*, visualizados en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. 1) marcador de peso molecular (MPM 100 pb Ladder); 2) 0.5 U/ μ L; 3) 1 U/ μ L; 4) 1.5 U/ μ L; 5) 2 U/ μ L; 6) 2.5 U/ μ L.

La técnica estandarizada presentó un buen desempeño en la mayoría de las diluciones evaluadas (Figura 13), excepto en la dilución 10^{-5} en donde no se aprecia amplificación (carril 12 y 13), también es evidente que entre mayor es la dilución se presenta una reducción en el tamaño del amplicon. Lo anterior significa que la PCR empleada fue sensible para detectar amplicones de buena calidad en las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} . En el máximo sin dilución (10^0) donde se aprecia el amplicon más grueso (carril 1 y 2) que sin una correcta T_m y concentración de los componentes del PCR puede llegar a formar bandas inespecíficas (Cornejo *et al.*, 2014). Estos hallazgos coinciden con diversos investigadores quienes anotan que generalmente la PCR-anidada es más sensible que la PCR simple, y que regularmente se obtienen resultados favorables al realizar diluciones, aunque en la primera PCR no se aprecie la presencia de amplicones (Mendoza *et al.*, 2006;

Freitas *et al.* 2014). En contraste, se han reportado límites de detección hasta la dilución 10^{-5} con PCR anidada sin el uso de estabilizadores de la Taq *polimerasa* en muestras bacterianas procesadas con calor y proteinasa K (Pulido *et al.* 2006).

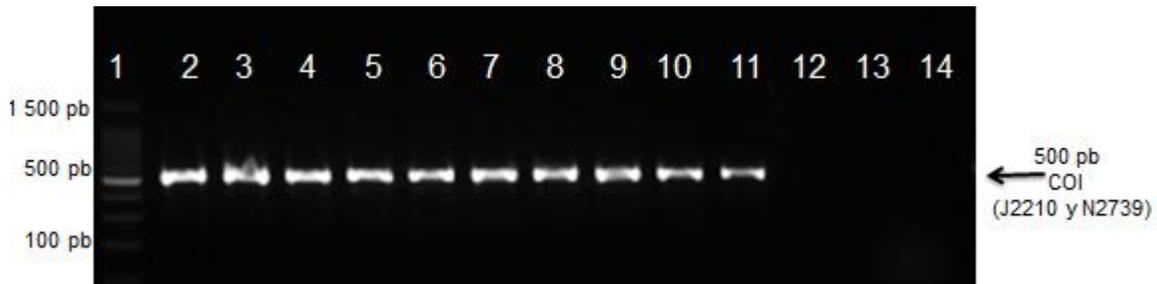


Figura 13. Límite de detección (LD) del producto de PCR extraído de *Xyleborus*, visualizado en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. 1) Marcador de peso molecular (MPM 100 pb Ladder); 2-3) 10^0 (sin dilución); 4-5) dilución 10^{-1} ; 6-7) dilución 10^{-2} ; 8-9) dilución 10^{-3} ; 10-11) dilución 10^{-4} ; 12-13) dilución 10^{-5} y 14) control negativo.

Los ensayos realizados revelaron la estandarización y validación de la técnica al observarse una alta reproducibilidad en la amplificación de las repeticiones del PCR (Figura 14); es decir, la existencia de un 100 % de probabilidad de encontrar el mismo resultado entre las muestras. Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores quienes refieren la alta reproducibilidad de la técnica de PCR y sus variantes como una herramienta confiable en la detección de diferentes organismos, además de su alta sensibilidad y rapidez, características que le confieren gran ventaja frente a los métodos convencionales (Villarreal *et al.*, 2008; Cornejo *et al.* 2014 y Hernández-Guzmán *et al.* 2014).

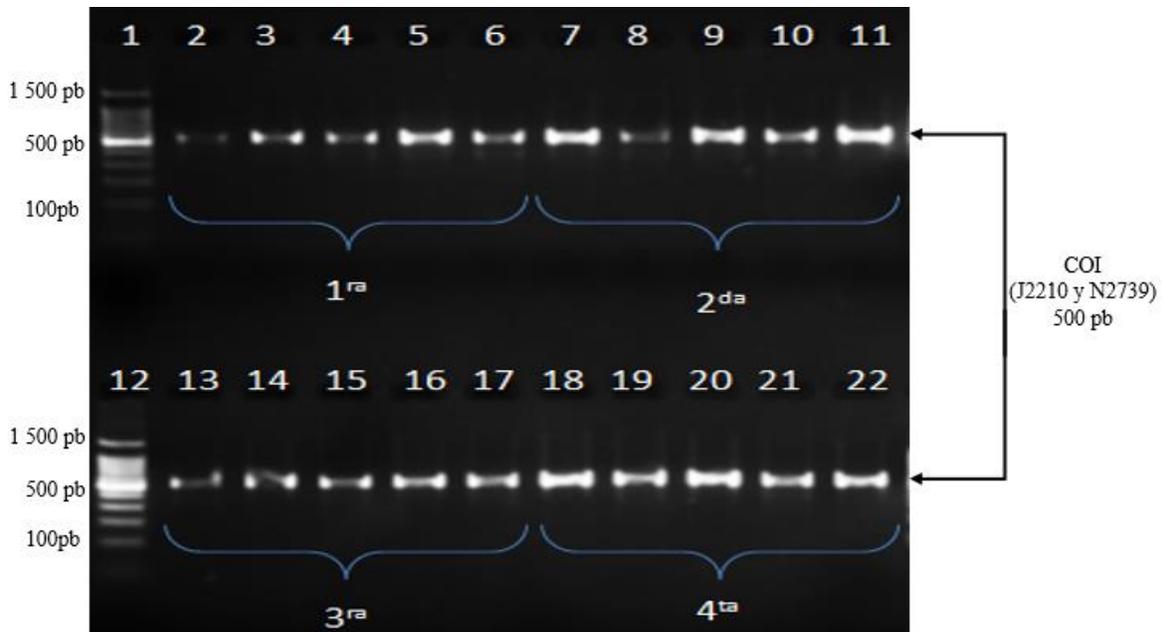


Figura 14. Reproducibilidad del PCR-anidado, para especies de *Xyleborus affinis* y *X. volvulus* de acuerdo a las condiciones previamente estandarizadas y validadas. **Arriba** 1) Marcador de peso molecular (MPM 100pb Ladder); 2-6) 1^{er} ensayo del PCR con cinco repeticiones; 7-11) 2^{do} ensayo del PCR con cinco repeticiones; **Abajo** 12) MPM; 13-17) 3^{er} ensayo del PCR con cinco repeticiones; 18-22) 4^{to} ensayo del PCR con cinco repeticiones.

En los ensayos de optimización se observaron resultados favorables tanto en la reacción de 15 μ L como en 10 μ L de volumen final (Cuadro 8) (Figura 15), con esta alternativa se optimiza el uso de reactivos (Taq polimerasa, dNTP's y Oligos) y material genético, además de reducir los costos del diagnóstico molecular. En este estudio, el reducir el volumen no comprometió la calidad del producto amplificado (Figura 15) aun cuando diferentes proveedores (Invitrogen, 2015; Thermo scientific, 2015 y Promega, 2015) recomiendan emplear un volumen final de 25 y 50 μ L para asegurar la amplificación. Sin

embargo, Cornejo *et al.* (2014) enfatizan que el volumen final depende del objetivo del investigador y del tamaño del gen (número de pb) a amplificar.

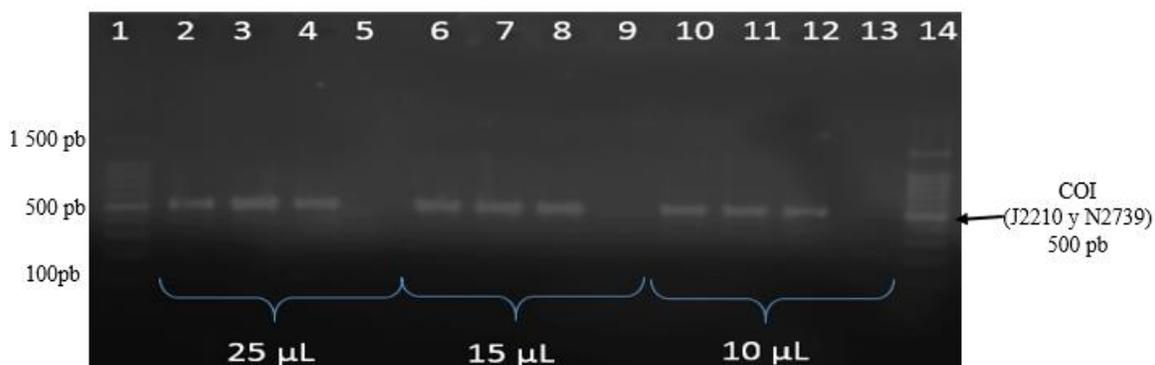


Figura 15. Optimización de la reacción de PCR, para especies de *Xyleborus* visualizada en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio, 1 y 14) marcados de peso molecular (MPM 100 pb Ladder); 2-5) reacción en 25 µL con tres repeticiones (2-4) y control negativo (5); 6-9) reacción en 15 µL con tres repeticiones (6-8) y control negativo (9); 10-13) reacción en 10 µL con tres repeticiones (10-12) y control negativo (13).

Cuadro 8. Optimización de la reacción de PCR en volumen de 15 y 10 µL para especies de *Xyleborus*

Reactivos	**Cf	1X (µL)	1X (µL)	1X(µL)
Agua HPLC		13.2	6.3	5.28
Buffer PCR 5X	1X	5.0	3	2
dNTP's 10mM	200 µM	0.5	0.3	0.2
Oligo Forward 10mM	200 µM	0.5	0.3	0.2
Oligo reverse 10mM	200 µM	0.5	0.3	0.2
Taqpolimerasa 5U/µL	2 U	0.4	0.24	0.16
Muestra ADN	20ng/µL	5.0	3	2
	Volumen final	25 µL	15 µL	10 µL

5.3. Análisis molecular

El segmento amplificado incluyó ~500 pb correspondientes al gen CO1 (J2210 y N2739). Se observó un 100% de homología entre las secuencias de la misma especie, asimismo, se corroboraron los especímenes en base a las características morfológicas distintivas. Las secuencias obtenidas se depositaron en el Genbank (Cuadro 9). La identificación taxonómica de las especies en este estudio, dieron certidumbre a las secuencias obtenidas, ya que se realizaron al menos tres corridas de secuenciación para cada especie. Con la secuencias consenso obtenidas de las tres secuencias, el análisis BLAST indicó que para *X. affinis* se obtuvo una homología del 92% con una de las secuencias para *X. affinis* presentes en el GenBank (AF187138.1); las secuencias generadas para *X. spinulosus*, *X. horridus* e *X. intrusus*, presentaron baja homología contra otras especies por no haber secuencias para CO1 disponibles para estas especies. Por tanto, estas son las primeras secuencias del gen CO1 depositadas en el GenBank para estas tres especies. La secuencia generada para *X. ferrugineus* presentó una identidad del 79% contra la secuencia JX424246.1 de la misma especie.

Algunas inconsistencias y bajo porcentaje de homología respecto a la información reportada en el GenBank. Por ejemplo, las secuencias de este estudio correspondientes a *X. ferrugineus* presentaron homología con *X. schaufussi* (Blandford, 1894) (AB588939.1) con una identidad y cobertura del 83% y 99%, respectivamente, especie que de acuerdo con Pérez-Silva *et al.*, (2015) no está reportada para el país. Por otro lado, en la base de datos solo esta reportada una secuencia para *X. ferrugineus* (JX424246.1) para el gen CO, sin embargo, la información no es homóloga a la secuencia obtenida para esta especie en el presente estudio. La no coincidencia en secuencias quizás se deba a una determinación errónea de origen, de la especie y secuencia disponible en el GenBank, puesto que los

especímenes que se trabajaron en este estudio fueron determinados con base en clave específica para especies mexicanas, las características distintivas de la especie fueron corroboradas por los especialistas y se revisaron varios especímenes. Las secuencias obtenidas para las especies *X. affinis*, *X. volvulus* y *X. glabratus* reportadas por Cognato *et al.*, (2011), no presentaron homología alta con ninguna secuencia depositada en el GenBank, por ser secuencias reportadas por vez primera para el gen CO1 para estas especies, de modo que las secuencias derivadas de este estudio se constituyen en los primeros registros fiables para dichas especies. Las secuencias se sometieron en el GenBank para su publicación.

6. CONCLUSIONES

Con base en el objetivo establecido en este estudio se puede concluir que la implementación del kit DMF fue apto para la obtención de material genético de especies del género *Xyleborus* en un menor tiempo y con la calidad adecuada, lo que permite su amplificación mediante PCR-anidado.

El método permitió procesar un solo insecto por extracción, y obtener material genético de muestras de varios años de preservación. Se estandarizó, validó y optimizó la técnica de PCR-anidado con alta reproducibilidad, aportando resultados de mayor confiabilidad permitiendo la correcta identificación molecular de las especies evaluadas. Se obtuvo la secuenciación parcial del gen CO1 para *Xyleborus affinis*, *X. ferrugineus*, *X. glabratus*, *X. horridus*, *X. intrusus*, *X. spinulosus* y *X. volvulus*.

Aun cuando se tiene un avance en el conocimiento y se cuenta con la técnica de PCR anidado para la detección rápida, sensible y confiable de especies del género *Xyleborus* es

necesario ampliar las pruebas a otras especies para conocer con precisión los alcances de la herramienta y obtener información que permita la identificación veraz y oportuna de especies del género *Xyleborus* en cualquier estadio de su ciclo de vida.

7. LITERATURA CITADA

- Atkinson, T. H., Carrillo, D., Duncan, R. E. & Peña J. E. 2013. Occurrence of *Xyleborus bispinatus* (Coleoptera: Scolytinae) Eichhoff in southern Florida. *Zootaxa*, 3669(1):96-100.
- Atkinson, T. H., Matínez-Fernández, E., Saucedo-Céspedes, E. & Burgos-Solorio, A. 1986a. Scolytidae y Platypodidae (Coleoptera) asociados a selva baja y comunidades derivadas en el estado de Morelos, México. *Folia Entomológica Mexicana*, 69: 41-82.
- Baños, J. A., Pérez de la Cruz, M., Sánchez Soto, S. & Capello G. S. 2012. Fluctuación poblacional de *Xyleborus volvulus* (F.) (Coleoptera: Curculionidae), en localidades de Tabasco, México. *Acta Zoológica Mexicana* (n. s.), 28(3): 540-549.
- Barrio-Caballero, P. A. 2012. Revisión de métodos de extracción de ADN a partir de restos óseos en el laboratorio forense. *Revista Española Médico Legal*, 39(2):54-62.
- Batista, L., Peña, I., López, D., Pérez, J. & Llauger, R. 2008. Técnicas de diagnóstico de enfermedades que afectan a los cítricos. Instituto de Investigación en Fruticultura Tropical, de la Habana, Cuba. (Consulta: 2014).
- Bautista, M. N. 2006. Insectos plaga una guía ilustrada para la identificación. Bayer Crop Science. 119p
- Beltrán-Torres, G., Otálora, K., Daza, L. A. & Hernández-Fernández, J. 2013. Estandarización de la técnica de PCR para amplificar el genoma mitocondrial de las tortugas cabezona (*Caretta caretta*) y carey (*Eretmochelys imbricata*) anidantes del Caribe Colombiano. *Revista Mutis*, 3(2): 21-30.
- Bocanegra, F. D.A. 2012. Análisis de riesgo del escarabajo ambrosia del laurel (*Xyleborus glabratus* Eichhoff) como una plaga potencial para el cultivo de aguacate (*Persea americana* Mill.). Tesis. Colegio de Posgraduados, Montecillo. México. 97p.

- Bolívar, A. M., Rojas, A. & García-Lugo, P. 2014. PCR y PCR-Múltiple: Parámetros Críticos y Protocolo de Estandarización. Avances en Biomedicina. Publicación Oficial del Instituto de Inmunología Clínica, 3(1):25-33.
- CABI. 2010. *Xyleborus similis*. Crop Protection Compendium. Disponible en: <http://www.cabi.org/cpc>. (Consultado en 2015).
- Camacho, P. A. 2012. El género *Ips* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) en México. Tesis de Doctorado. Colegio de Posgraduados, Montecillo. México. 73p.
- Chang, H., Liu, Q., Hao, D., Liu, Y., An, Y., Qian, L. & Yang, X. 2013. DNA barcodes and molecular diagnostics for distinguishing introduced *Xyleborus* (Coleoptera: Scolytinae) species in China. Mitochondrial AND, Early Online 1-7.
- Cognato, A.I. & Sperling, F.A. 2000. Phylogeny of *Ips* DeGeer species (Coleoptera: Scolytidae) inferred from mitochondrial cytochrome oxidase I DNA sequence. Mol Phylogenet Evol, 14:445–460.
- Cognato, A. I., Hulcr, J., Dole, S. A. & Jordal, B. H. 2011. Phylogeny of haplo-diploid, fungus-growing ambrosia beetles (Curculionidae: Scolytinae: Xyleborini) inferred from molecular and morphological data. Zoologica Scripta, doi:10.1111/j.1463/6409.2010.00466.x
- Cornejo, R. A., Serrato, A., Rendón, D. B. A. & Rocha, M. G. M. 2014. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC), Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-I). 255p.

- Das, S., Tiwari, K. L., Sen, S. & Singh, A. 2012. Rapid one step DNA extraction method from (*Gastrimargus musicus*) through formaldehyde. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences, 20(20):1-3.
- Del Valle, C., Rodríguez, A. & Espinoza, M. 2004. Comparación de tres métodos de extracción de ADN a partir de restos óseos. Revista de Biología Tropical, 52(3): 717-725.
- Dirección General de Sanidad Vegetal. 2014. Escarabajo del Laurel rojo *Xyleborus glabratus*, Eichhoff. (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México. 11p.
- Eguiarte, L. E., Souza, V., & Aguirre, X. 2007. Ecología Molecular. Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT. 592 p.
- Falsetti, M., Rodríguez, M. & Marino, T. 2004. Validación en Matemática en situación de aprendizaje. Memorias del VI Simposio de Educación Matemática. Sagula, Ed..Univ. Nac. de Luján - Edumat.
- FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (en línea). Glosario de Términos Fitosanitarios. Dirección URL www.fao.org/docrep/w3587e/w3587e03.htm (Consultado 2016).
- Feldsine, P., Abeyta, C. & Andrews, W. 2002. AOAC International Methods Committee Guidelines for Validation of Qualitative and Quantitative Food Microbiological Official Methods of Analysis. J. AOAC Internat., 85:1187:1200.
- Ferrer, E., Da, F. C., Campioli, P., Lares, M., López, M., Rivera, M. G., Viettri, M., Medina, M., Salcedo, M., Morocoima, A. & Herrera, L. 2008. Validación de protocolos

- de PCR para el diagnóstico molecular de la Enfermedad de Chagas. *Salus online*, 12(1): 163-175.
- FOA-IPPC. 2007. NIMF n. °2. Marco para el análisis de riesgo de Plagas. Normas Internacionales para Medidas Fitosanitarias. Secretaría de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria. Consultado 2015 Disponible en: <http://www.cosave.org/sites/default/files/nimfs/cfd338f5bbd3cf63500f97fbca940633.pdf>
- Follet, A. P. & Vick, K. W. 2002. Desarrollo de estrategias de manejo integrado de plagas para eliminar las barreras sanitarias que restringen la exportación de productos agrícolas. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, 65: 43-49.
- Freitas, D. R. C., Teixeira, L. G., Fontes, C. J. F., Tauil, P. L., Pang, L. W. & Durate, E. C. 2014. Sensitivity nested-PCR for plasmodium detection in pooled whole blood samples and its usefulness to blood donor screening in endemic areas. *Transfusion and Apheresis Science*, 50: 242-246.
- Guerber, J.C., Lui, J. & Correl, C. 2003. Characterization of diversity in *Colletotricum acutatum* sensu lato by sequence analysis of two gene introns, mtADN and intron RFLPs, and mating compatibility. *Mycologia*, 95: 872 – 895.
- Heritier, L. P. 1984. *La Gran Aventura de la Genética*. Ed. Castell Mexicana, S. A. México. 269 p.
- Hernández-Guzmán A. K. & Guzmán-Barney, M. M. 2014. Detección del virus del amarillamiento de los nervaduras de la hoja de la papa en diferentes órganos de *Solanum tuberosum* grupo Phureja cv Criolla Colombia utilizando RT-PCR convencional y en tiempo real. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 16: 74-85.
- Hollingsworth, P. M., Graham, S.W. & Little, D. P. 2011. Choosing and using a plant DNA barcodes. *PloS ONE*, 6(5):e19254.dio:10.1371/journal.pone.0019254

- Hulcr, J., Dole, S.A., Beaver, R. A. & Cognato, A. I. 2007. Cladistic review of generic taxonomic characters in Xyleborina (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Systematic Entomology*, 32: 568-584.
- Invitrogen. 2015. Taq DNA polymerase, recombinante (Protocol Pub. No. MAN0000814 rev. A.0) Disponible en: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/0814_Taq_DNA_Polymerase_recombinant.pdf (Consulta Noviembre 2015).
- ISO. The International Organization for Standardization. [en línea]. We develop and publish International Standards. Dirección URL <http://www.iso.org/iso/home.html> . (Consultado 2016).
- Klug, S. W., Cummings, M. R. & Spencer, C. A. 2006. *Conceptos de Genética*. Ed. Pearson-Prentice Hall. España. 884 p
- Knebelsberger, T. & Stöger, I. 2012. DNA extraction, preservation and amplification. In: *ADN Barcodes: Methods and Protocols*. Kress, W. J. and D. L. Erickson (eds.). *Methods in Molecular Biology*, 858: 311-338.
- Kušec, I. D., Radišić, Ž., Komlenić, M. & Kušec, G. 2015. Comparison of commercial ADN Kits and traditional DNA extraction procedure in PCR detection of pork in dry/fermented sausages. ISSN 1330-7142. UDK: 637.52:636.082. Disponible en: http://bib.irb.hr/datoteka/779345.47_Djurkin_Kusec_ENGEDIT_20_07_2015.pdf (Consulta Noviembre 2015).
- Lodish, B., Kaiser, M., Scott, K. & Zipursky, D. 2005. *Biología Celular y Molecular*. Editorial Medica Panamericana, 5:932.
- Loera, F. 2014. The family Lauraceae in Mexico. In: memoria del simposio internacional sobre manejo y control de plagas cuarentenarias (Caso: escarabajos ambrosiales,

- Xyleborus glabratus* y *Euwallacea* sp.) en el aguacatero. 3 al 7 de noviembre 2014. Xalapa, Veracruz, México. 62 p
- Lombardero, M. J. 1996. Representantes de la tribu Xyleborini Le Conte, 1876 (Coleoptera:Scolytidae) en la Península Ibérica. Boletín de la Asociación Española de Entomología, 20:173-191.
- Luque, J. & Herraéz, A. 2008. Texto ilustrado de biología molecular e ingeniería genética: 6 Conceptos, técnica y aplicaciones en ciencias de la salud. Elsevier. Barcelona. 469 p.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V. & Clark, D. P. 2009. Brock. Biología de los microorganismos. Pearson Addison Wesley. Madrid, España. 1259p.
- Mann, R., Hulcr, J., Peña, J. & Stelinski, L. 2012. Redbay Ambrosia Beetle *Xyleborus glabratus* Eichhoff (Insecta:Coleoptera: Curculionidae:Scolytinae). University of Florida, IFAS Extensión. 7. EENY491.
- Martin, R. R., James, D. & Levesque, C. A. 2000. Impacts of molecular diagnostic technologies of plant disease management. Annu. Rev. Phytopathol., 38: 207-239.
- Martínez-de la Puente, J., Ruiz, S., Soriguer, R. & Figuerola, J. 2013. Effect of blood meal digestion and DNA extraction protocol on the success of blood meal source determination in the malaria vector *Anopheles atroparvus*. Malaria Journal, 12:109.
- Mendoza, N. M., Jaramillo, C. A. & Guhl, F. 2006. Diagnóstico por el método de la PCR anidada. Biomedica. 21:230-237.
- Microbial-Systems. 2009. La extracción y purificación de DNA para el análisis por PCR. Mitos y Realidades. (http://www.microbial-systems.com/web/docs/Newsletter_Microbial_03.pdf). (Consultado: 2013).

- Molina, B. N., Polverino, D., Minvielle, M. C., Apezteguía, M., Aguilar, M. & Basulado, J. 2006. Comparación de lisis y extracción de ADN de trofozoítos de *Giardia lamblia*. *Parasitología Latinoamericana*, 61:133-137.
- NOM-016-SEMARNAT-2013. Que regula fitosanitariamente la importación de madera aserrada nueva. 4 de Marzo de 2013. Diario Oficial de la Federación.
- Pérez, S. M., Equihua, A. M. & Atkinson, T. H. 2015. Identificación de las especies mexicanas del género *Xyleborus* Eichhoff, 1864 (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Insecta Mundi*, 440:1-35.
- Pérez-De La Cruz, M., Equihua-Martínez, A., Romero-Napoles, J., Valdez-Carrasco, J. & De La Cruz-Pérez, A. 2009. Claves para la identificación de escolítino (Coleoptera: Curculionidae: Scolitinae) asociados al agroecosistema del cacao en el sur de México. *Boletín del Museo de Entomología de la Universidad del Valle*, 10:14-29.
- Ponce Z. N. & Gómez, M. J. E. 2003. Estandarización y validación clínica de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el diagnóstico de toxoplasmosis cerebral en pacientes infectados por el VIH. *Infectio. Asociación Colombiana de Infectología*, 7(1):8-14.
- Poutou, R., Burbano, M., Sierra, S., Torres, K., Carrascal, A. & Mercado, M. 2005. Estandarización de la extracción de ADN y validación de la PCR múltiple para detectar *Listeria monocytogenes* en queso, leche, carne de res y pollo. *Universitas Scientiarum*, 10(2):61-78.
- Promega. 2015. Certificate of analysis GoTaq DNA polimerasa (M3005). Disponible en: <https://worldwide.promega.com/~media/files/resources/protocols/product%20information%20sheets/g/gotaq%20ADN%20polymerase%20m300.pdf> (Consulta: Agosto 2015).

- Pulido, A., Mogollón, J. D., Morales, H. J. & Rincón, M. A. 2006. Estandarización y aplicación de la técnica de PCR-anidado para la detección de *Mycoplasmas hyopneumoniae*. *Revista Medico Veterinario Zootecnista*, 53: 22-32.
- Qiagen. 2010. DNeasy® mericon TM Food Handbook. for extraction of total nucleic acids from a range of food simple types. Disponible en: <https://www.qiagen.com/hk/resources/resourcedetail?id=d0e372d7-6f6a-415e-9d72-297a53d95854&lang=en> (Consulta: 2015).
- Quiñonez, S. A. M. 2011. Estandarización de las condiciones de PCR para la amplificación de Citocromo Oxidasa C, Subunidad I (COI) y evaluación de su contenida informático en dos poblaciones de *Urotrygon aspidura* del Pacífico Vallecaucana. Universidad del Valle. Santiago de Cali. 51p.
- Rabaglia, R. 2003. *Xyleborus similis* (onile). National Information Center for Estate and forestry, Washinton, D.C. available from <http://spfnic.fs.fed.us/exfor/data/pestreports.cfm?pestidval=146&langdisplay=English>.
- Rabaglia, R. J., Dole, S. A. & Cognato, A. I. 2006. Review of American Xyleborina (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) Occurring North of México, With an Illustrated Key. *Annals of the Entomological Society of America*, 99:1034-1056.
- Rådström, P., Knutsson, R., Wolffs, P., Lövenklev, M. & Löfström, C. 2004. Pre-PCR processing: Strategies to generate PCR-compatible samples. *Mol. Biotechnol.*, 26: 133-146.
- Rangel, R., Pérez, M., Sanchez, S. & Capello, S. 2012. Flutacion poblacional de *Xyleborus ferrugineus* y *X. affinis* (Coleoptera: Curculionidae) en ecosistemas de Tabasco, México. *Revista. Tropical*, 60(4):1577-1588.

- Reddy, J. 2009. A comprehensive method to isolate high quality DNA from the cultivars of Hibiscus. *International Journal of Biotechnology Applications*, 1(2): 1-9.
- Romero, N. J., Anaya, S. R., Equihua, A. M. & Mejia, H. G. 1997. Lista de Scolytidae y Platypodidae de México (Insecta: Coleoptera) *Acta Zoológica Mexicana*, 70: 36-53.
- Santamaria, E., Ponce, N., Puerta, C. & Ferro, C. 2005. Validation of PCR as a tool for the detection of *Leishmania* (Vianna) spp. parasites in the *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) vector. *Biomédica online*, 25(2): 271-279.
- Schwerer, M. J., Vogl, S. & Graw, M. 2015. Extraction of DNA from gastric content in different stages of digestion. *Forense Science International: Genetics Supplement Series*. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigss.2015.10.004> (Consulta: Noviembre 2015).
- SENASICA. 2015. Escarabajo ambrosial del Laurel Rojo *Xyleborus glabratus*, Eichhoff (Coleoptera:Curculionidae:Scolytinae). Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México. 11 pp.
- SINAVEF-SENASICA. Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria (en línea) Plagas bajo vigilancia activa. Dirección URL <http://sinavef.senasica.gob.mx/SIIVEF/> (Consulta 2015)
- Sosa-Moss, C., F. Perdomo, R., Brathwaite, C. W. D. & Salazar, C. J. J. 1997. Técnicas para el Diagnóstico de las Enfermedades de las Plantas. *Diagnostico Fitosanitario II*. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. Agencia de Cooperación Técnica. México. 223 p.

- Suzuki, S. & Yao, I. 2014. Isolation of nine polymorphic microsatellite loci from the burying beetle, *Nicrophorus quadripunctatus* (Coleoptera: Silphidae). *Appl Entomol.*, 49:493-497.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D. & Kumar, S. 2013. Mega 6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, 30:2725-2729.
- Thermo scientific. 2015. Taq DNA polymerase (recombinant) #EP0402. Disponible en: www.thermoscientific.com/onebio (Consulta: Noviembre 2015).
- Trujillo, M., Bracamonte, M., Castro, M., Obando, C., Hidalgo, M., Brett, M., Medina, G. & Conde, F. 2009. Avances de técnicas moleculares para el diagnóstico de enfermedades virales de los animales aplicadas en el INIA Instituto Nacional de Investigación Agrícolas. INIA CENIAP. Sanidad Animal.
- Trullols, E., Ruisánchez, I. & Ruis X. 2004. Validation of qualitative analytical methods. *Trends Analyt. Chem.*, 23:137-145.
- Valadez, M. E. & Kahl, G. 2005. Huellas de ADN en Genomas de Plantas (Teoría y Protocolos de Laboratorio. Ed. Mundi-Prensa. México. 147 p.
- Velázquez, G. J. C. 2013. Manual operativo para la implementación en el dispositivo nacional de emergencia contra *Tuta absoluta* (Lepidoptera Gelechiidae) en México. SENASICA. México. 23 p
- Villarreal, J., Soto, Z., Pereira, N., Varela, L., Jaramillo, R., Villanueva, D. & Mendoza, E. 2008. Reacción en Cadena de la Polimerasa para la Detección de *Salmonella* sp. en leche en polvo. Optimización del método en 12 horas. *Salud Uninorte. Redalyc*, 2:216-225.
- Volk, H., Piskernik, S., Kurinčič, M., Klančnik, A. & Jeršek, B. 2014. Evaluation of different methods for DNA extraction from milk. *Journal of Food and Nutrition*

Research. 2:1-10. Disponible en:

http://www.researchgate.net/publication/259564066_Evaluation_of_different_methods_for_DNA_extraction_from_milk (Consulta: Noviembre de 2015).

Wood, S. L. 1982. The bark and ambrosia beetles of North and Central America (Coleoptera:Scolytinae), A taxonomic monograph. Great Basin Naturalis Memoirs, 6:1356.

Wood, S. L. & Bright, D. E. 1992. A catalog of Scolytidae and Platipodidae (Coleoptera), Part 2. Taxonomic Index Volume A. Great Basin Naturalist Memoirs. 13:833.

Wood, S. L. 1982. The bark and ambrosia beetles of North and Central American (Coleoptera: Scolytinae), A taxonomic monograph. Great Basin Naturalis Memoirs 6:1356.

Wood, S. L. 1986. A reclassification of the genera of Scolytidae (Coleoptera). Great Basin Naturalis Memoirs. 10:126

Zambrano, Y. A., Demey, J. R., Martínez, G., Fuenmayor, F., Gutiérrez, Z., Saldaña, G. & Torrealba, M. 2002. Método rápido, económico y confiable de, mini preparación de DNA para amplificaciones por RAPD en bancos de germoplasma. Agronomía Tropical, 52(2): 235-243.

8. Anexo 1

CLAVE PARA HEMBRAS DE ESPECIES DEL GÉNERO XYLEBORUS EICHHOFF EN MÉXICO (TOMADA DE PÉREZ-SILVA, 2015)

1. Margen anterior del pronoto procurvado y armado por dientes gruesos; margen posterolateral del declive elitral generalmente redondeado y frecuentemente armado por tubérculos o espinas, si es subagudamente angulado entonces la costa se extiende desde la sutura a interestría 3-5, o con una costa circumdeclivital en no más de la mitad superior; setas estriales usualmente presentes..... 2

- Margen anterior del pronoto plano o procurvado, desarmado o débilmente armado por algunos dientes (subdentado en *spathipennis*); margen posterolateral del declive elitral redondeada o angulado, costa nunca dentada, cuando se presenta, se extiende desde la sutura media a la interestría 7; setas estriales casi nunca presentes cuando el pronoto es cuadrado.....4

2 (1). Declive pronunciado, ocupa el 30% posterior de la longitud de los élitros, moderadamente aplanado y tubérculos diminutos u obsoletos, excepto de uno a tres moderadamente más grandes en la base de la interestría 1 y 2, en 3-9 diminutos cerca del ápice de cada interestría y más grandes en la base de la 3-5; margen anterior del pronoto armado por 2-4 pequeñas dientes; 1.8 a 2.1 mm..... *palatus* Wood

- Declive gradual, ocupa al menos el 40% de la longitud de los élitros, fuertemente excavado; interestría declivital 1 desarmada con excepción de uno o dos pequeños dentículos en la base; vestidura declivital de esbelta a escalas muy gruesas..... 3

3 (2). Puntuaciones en el declive elitral muy pequeñas y fuertemente confusas, cada una lleva una escama ancha; estrías ausentes, cara del declive ampliamente cóncava, desprovista de espinas, algunos pequeños dentículos en la base y áreas laterales; 1.7 a 2.3 mm..... *squamulatus* Eichhoff

- Puntuaciones en el declive elitral en hileras; declive poco excavado, armado con espinas, de dos a cinco pares, aunque regularmente dos son los que predominan, y varios dentículos más pequeños; longitud de la espina más grande del margen lateral del declive elitral menos

de dos veces su anchura basal, casi igual al ancho de una interestría discal; 1.8 a 2.6 m..... *spinulosus* Blandford

4 (1). Puntuaciones declivales confusas, grandes, cercanas entre sí y distintivas, sin indicación de estría; declive elitral plano, ocupa aproximadamente un tercio de la longitud de los élitros; interestría declivital 1 armada con dos o cuatro tubérculos moderadamente grandes; declive elitral impreso, comenzando a la mitad de los élitros; pubescencia elitral abundante, particularmente en el declive; dentículos en la interestría 2 grandes; 3.8-4.2 mm..... *horridus* Eichhoff

- Estrías distintivas, puntuaciones en filas definidas; interestría declivital 1 con diminutos gránulos, de igual tamaño a los de otras interestrías.....5

5 (4). Margen anterior del pronoto dentado; disco del pronoto con puntuaciones distintivamente grandes; declive elitral gradual, ocupa aproximadamente el 40% de la longitud elitral; estrías en el disco elitral de moderada a fuertemente impresas y con puntuaciones pequeñas; estrías en el declive débilmente impresas, puntuaciones pequeñas y fuertemente impresas; tubérculos interestriales en declive numerosos; espinas del declive elitral igualmente desarrolladas; 4.4 a 5.3 mm..... *spathipennis* Eichhoff

- Margen anterior del pronoto desarmado; interestrías frecuentemente armadas por tubérculos desiguales, de pequeños a moderadamente gruesos.....6

6 (5). Pronoto subcuadrado o si el margen anterior del pronoto es fuertemente procurvado entonces el pronoto es menos de 1.15 veces más largo que ancho; interestría 1-3 esculpida de manera similar o 2 con tubérculos; declive elitral gradual, generalmente, ocupa al menos el 50% de la longitud del élitro, a menudo ampliamente convexa, con margen posterolateral conspicuo; pequeñas setas estriales, comúnmente presentes en adición a las de la interestría; la mayoría de especies grandes y robustas, coloración de café oscuro a negro.....7

- Pronoto nunca subcuadrado, al menos 1.2 veces más largo que ancho, sus lados por lo general casi rectos y paralelos en la mitad posterior; interestría 1 del declive

(frecuentemente) y 3 armada por tubérculos, 2 desarmada (excepto en *titubanter*); declive pronunciado menos del 35% posterior de la longitud del élitro; setas estriales ausentes (excepto en algunos *volvulus*); en su mayoría especies pequeñas, esbeltas, color amarillento o café rojizo (excepto para unas pocas especies que son negras).....9

7 (6). Margen anterior del pronoto fuertemente procurvado; declive gradual, a menudocomenzando en la mitad delantera del élitro, transversalmente impreso en la mitad inferior; lados de los élitros generalmente puntiagudos en la parte media, más estrechamente redondeados en la parte final; setas interestriales delgadas, la mayoría con forma de pelo; 3.3-3-7 mm..... *vismiae* Wood

- Margen anterior del pronoto subcuadrado o plano, declive elitral usualmente pronunciado, ampliamente redondeado en la parte posterior; los lados del élitro en general subparalelos en al menos dos tercios basales.....8

8 (7). Declive abrupto, ocupa el cuarto posterior de la longitud elitral, superficie usualmente opaca; gránulos en el declive elitral usualmente conspicuos e irregulares en tamaño y espaciamiento (espaciados por distancias mucho más grandes que el diámetro de una puntuación estrial adyacente); setas interestriales del declive hasta dos veces más largas que la distancia entre las filas; 2.2-2.5 mm. *posticus* Eichhoff

- Declive pronunciado; gránulos interestriales variables, muy pequeños intercalados con más grandes; longitud de las setas interestriales del declive (en su mayoría) menos de un tercio la distancia entre las filas; impresión transversal en la mitad inferior del declive, no tan fuerte; 2.9-3.3 mm..... *discretus* Eggers

9 (6). Elevación pronotal en o cerca del centro, la inclinación anterior del pronoto ocupa evidentemente más del tercio anterior; pronoto ensanchado, aproximadamente 1.2 veces más largo que ancho; interestría discal con puntuaciones (casi obsoletas en *titubanter*); estrías del declive claramente indicadas (excepto en *imbellis*), puntos como los del disco.....10

- Elevación pronotal en la mitad frontal, inclinación anterior pronunciada, confinada a menos del tercio anterior; pronoto al menos 1.3 veces más largo que ancho; interestría

discal desprovista de puntuaciones; estrías del declive obsoletas, puntuaciones del declive confusas, mucho más pequeñas que las del disco elitral.....18

10 (9). Declive empinado, convexo, ocupa el 25% de la longitud del élitro, el margen posterolateral en general obtusamente redondeado. Interestría discal al menos dos veces más ancha que la estría; algunos tubérculos del declive con la altura y anchura basal más grande que el diámetro de las puntuaciones estriales; 2.2-2.7 mm..... *intrusus* Blandford

- Declive no tan empinado, ocupa 33-38% de la longitud de los élitros, más ampliamente convexo que aplanado; margen posterolateral estrecho, de subanguladamente redondeado a subagudamente elevado.....11

11 (10). Interestría 2 del declive con gránulos punteados extendiéndose ligeramente debajo de la mitad, tamaño igual a las de la interestría 1 y 3; puntuaciones interestriales sobre el disco en su mayoría obsoletas o excesivamente pequeñas, insectos maduros de color negro. 3.0-3.2 mm..... *titubanter* Schedl

- Interestría del declive 2 desarmada excepto por dos o tres pequeños gránulos en la base, en todos menos en imbellis; puntuaciones interestriales en disco distintas.....12

12 (11). Puntuaciones estriales sobre el disco pequeñas, en filas de semidefinidas a moderadamente confusas, puntuaciones interestriales abundantes y confusas; puntuaciones del declive pequeñas, profundas y confusas, estrías no evidentes; vestidura elitral corta, fina y abundante; declive desarmado; 4.4-4.7 mm..... *imbellis* Blandford

- Puntuaciones en estría discal e interestría en filas uniseriadas; declive elitral armado por varios dientes.....13

13 (12). Interestría discal tan ancha como la estría; puntuaciones estriales en declive grandes y profundas; tubérculos evidentes en la base del declive; vestidura claramente corta; mitad posterior del pronoto con puntuaciones y asperidades evidentes; 2.8 a 2.9 mm..... *subductus* Schedl

- Tubérculos en las interestrías 1 y 3 evidentes de varios tamaños; mitad posterior del pronoto lisa o puntuaciones poco evidentes.....14

14 (13). Interestría 1 del declive armada por un pequeño dentículo en la base, interestría 3 con dos o más dentículos: dentículo(s) pequeño cerca de la base y dentículo cerca del centro del declive evidentemente más grande que otros; declive aplanado, interestría 2 no impresa, puntuaciones estriales evidentes, declive brillante.....15

- Interestría 1 armada por uno o varios tubérculos pequeños en dos tercios de la parte baja; declive evidentemente convexo; setas interestriales cortas y largas, comúnmente alternadas en una fila en el disco del declive.....16

15 (14). Dentículo más grande en la interestría 3 más cerca del ápice del declive que de la base; elevación pronotal poco marcada, inclinación anterior redondeado en el margen; transición entre el disco del élitro y declive redondeado en el margen; setas interestriales escasas o ausentes en el disco elitral..... *ferrugineus* (Fabricius)

- Dentículo más grande en la interestría 3 más cerca de la base del declive que del ápice; elevación pronotal pronunciada, inclinación anterior abrupta en el margen; transición entre el disco elitral y declive abruptamente aplanado en el margen; setas interestriales erectas abundantes en el disco elitral, la mayoría en la base..... *bispinatus* Eichhoff

16 (14). Superficie del declive elitral áspera (opaca); declive no tan empinado, ligeramente convexo, dentículos en promedio pequeños; color amarillento a café rojizo; 2.0-2.7 mm..... *affinis* Eichhoff

- Superficie del declive elitral brillante; declive un poco más empinado, convexo, dentículos en promedio ligeramente más largos...17

17 (16). Puntuaciones en las interestrías discales pequeñas, por lo regular estrechamente espaciadas; protibias armadas por siete dientes acampanados, diente basal (séptimo) no notablemente espaciado como otros; Color del cuerpo muy marrón oscuro a casi negro; 2.7 a 2.9 mm..... *morulus* Blandford

- Puntuaciones grandes en la estría discal del élitro, dentro de una fila casi tocándose; declive aplanado a ligeramente convexo, interestría 2 moderadamente impresa, interestría 1 cerca de la parte posterior menos elevada; protibias armadas con seis o siete dientes acampanados, uno basal y más lejos que los demás; Cuerpo de color marrón rojizo; 2.1 a 2.8 mm..... *volvulus* (Fabricius)

18 (9). Insectos grandes; puntuaciones estriales en el disco muy pequeñas, superficiales; interestría cerca de cuatro veces más ancha que la estría, declive evidentemente aplanado en la mitad central; 4.0-4.4 mm..... *declivis* Eichhoff

- Insectos pequeños; puntuaciones estriales grandes, profundas, interestría alrededor de dos veces más ancha que la estría; declive ligeramente aplanado en la pequeña área central; 2.9-3.3 mm..... *macer* Blandford