

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

LICENCIATURA EN AGRONOMÍA

SENASICA

Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF)

Laboratorio de Biología Molecular

SERVICIO SOCIAL: Informe de conclusión

Evaluación de cuatro métodos de extracción de ADN de insectos del Orden Coleoptera (ambrosiales), conocidos como insectos vectores de hongos fitopatógenos para el cultivo de aguacate *Persea americana* Mill (Lauraceae)

PRESTADOR DE SERVICIO SOCIAL:

Santiago Sánchez Uriel (Matrícula: 2193072036)

ASESOR INTERNO:

Rodríguez Navarro Silvia- (No. Económico: 20232)

ASESOR EXTERNO:

Espinosa Mendoza Mario (Cédula profesional: 3717292)

Tecámac, Estado de México, 02 de julio del 2024

INTRODUCCIÓN

La presencia de escarabajos conocidos como "ambrosiales", pertenecientes a la familia Curculionidae (Coleoptera), es de suma importancia en la ecología forestal y la agricultura global. Con aproximadamente 30 géneros y 1,200 especies, estos insectos se distribuyen ampliamente en los bosques del mundo, con una mayor diversidad en las regiones tropicales. En Estados Unidos de Norteamérica, se ha registrado la presencia de numerosas especies invasivas de escarabajos ambrosiales (Cognato *et al.*, 2011).

La relevancia de estos escarabajos radica en su capacidad para dañar varias especies de plantas leñosas de la familia Lauraceae, causando la muerte de ramas, tallos e incluso de todo el hospedero. Este daño está asociado a una simbiosis con hongos fitopatógenos (Crane y Peña, 2008), lo que agrega complejidad a su impacto en los ecosistemas y la agricultura.

En el contexto específico de México, las especies *Xyleborus glabratus* Eichhoff y *Euwallacea* sp. Eichhoff, miembros de la familia Curculionidae, representan un grave riesgo debido a su papel como vectores de hongos fitopatógenos como *Raffaelea lauricola* y *Fusarium euwallaceae*, responsables de la enfermedad de la marchitez. Esta enfermedad, de importancia cuarentenaria, amenaza la producción de aguacate en el país, un cultivo de importancia económica y exportación global (SENASICA, 2020a; SENASICA, 2020b; SIAP, 2021).

En México, para prevenir la introducción y establecimiento de estas especies, es crucial contar con métodos de identificación específicos y efectivos. La biología molecular ofrece herramientas precisas para identificar insectos en diferentes etapas de su ciclo de vida. Por tanto, este Proyecto de Servicio Social se enfocó en comparar cuatro métodos de extracción de ADN para los escarabajos ambrosiales *Euwallacea kuroshio* Eichhoff y *Xylosandrus compactus* Eichhoff (Curculionidae), con la intención de evaluar las metodologías más eficaces. El objetivo principal es garantizar la obtención de ADN con características óptimas para su uso en aplicaciones como la PCR o clonación.

Este proyecto se llevó a cabo en el Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF) del SENASICA, ubicado en Tecámac de Felipe Villanueva, Méx. La misión del CNRF es proteger la agricultura nacional mediante la aplicación de medidas de sanidad, inocuidad y calidad agroalimentaria, contribuyendo así a la seguridad alimentaria y al desarrollo de las cadenas productivas. En consonancia con su visión, el SENASICA busca ser reconocido nacional e internacionalmente como un generador de valor para la sociedad a través de la mejora continua de sus plataformas técnico-científicas y administrativas, facilitando el comercio agroalimentario y el abasto nacional.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Comparar cuatro métodos de extracción de ADN en ejemplares de escarabajos ambrosiales

Objetivos específicos

- Determinar la concentración y la pureza del ADN de las muestras de escarabajos ambrosiales mediante espectrofotometría.
- Seleccionar el mejor método de extracción de ADN para muestras de escarabajos ambrosiales.
- Amplificar el ADN obtenido con primers generales correspondientes a la región mitocondrial COI

Metodología utilizada

Método de extracción: Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico (25:24:1)

Esta metodología permite extraer el ADN con el uso de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1). Su fundamento es obtener dos fases, las cuales son: una fase acuosa y otra orgánica, donde la fase acuosa contiene los ácidos nucleicos y la otra fase contiene residuos orgánicos (Red Biöbancos, 2011).

Este método puede adaptarse para la extracción de ADN de escarabajos ambrosiales, porque se rompen las células utilizando fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, seguido de pasos de precipitación del ADN y lavados con alcohol al 70 %.

Metodología de extracción: Fenol: Cloroformo: Alcohol Isoamílico (25:24:1)

1. Secar a T_{amb} (15 °C- 25 °C) por 5 min en papel absorbente estéril las muestras que se encuentren en alcohol.
2. Colocar un ejemplar (sin alcohol) en una MP Biomedicals™ Matriz de lisis D 11422420 y agregar 300 μ L de H₂O.
3. Macerar a 5 m/s por 60 s en un disruptor mecánico.
4. Centrifugar por 1 min a 5 000 RCF.
5. Transferir 250 μ L a un tubo nuevo de 1.5 mL o 2 mL y agregar 25 μ L de Proteinasa K (20 mg/mL) e incubar a 56 °C por 10 min con una agitación de 700 rpm.
6. Agregar 220 μ L de solución de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), homogenizar por inversión por 5 min y centrifugar por 5 min a 15 000 RCF.
7. Transferir cuidadosamente la fase acuosa a un nuevo microtubo de 1.5 mL o 2 mL.
8. Mezclar con un volumen de cloroformo y dar un vórtex de 10 s.
9. Centrifugar a 10 000 RCF durante 5 min.
10. Tomar la fase acuosa y colocar en un tubo limpio de 1.5 mL o 2 mL, adicionar un volumen de isopropanol frío (-20 °C) y mezclar con vórtex por 10 s.
11. Incubar a -20 °C durante 60 min.
12. Centrifugar a 15 000 RCF durante 5 min y decantar posteriormente.
13. Lavar con 500 μ L de etanol al 70 % y mezclar con vórtex por 10 s.
14. Centrifugar a 15 000 RCF durante 5 min.
15. Decantar el etanol y repetir todo desde el paso 13.
16. Secar la pastilla con un concentrador de ADN por 20 min a 37 °C.
17. Resuspender el ADN en 50 μ L de H₂O grado biología molecular, previamente calentado a 70 °C.
18. Proceder a la verificación de cantidad y calidad de ADN.
19. Guardar a -20 °C o a 4 °C.

Método de extracción: CTAB 2 %

El CTAB (Bromuro de cetiltrimetilamonio) es un detergente catiónico, que se utiliza para la extracción de ADN, es un compuesto antiséptico tóxico cetrimide, que se usa en forma de *buffer* (Probiotek, s.f). Tiene la propiedad de poder precipitar los ácidos nucleicos y los polisacáridos ácidos en soluciones de baja concentración iónica, para obtener grandes cantidades de ADN.

La metodología de CTAB 2 % se puede adaptar a diferentes matrices, donde se pueden agregar o quitar pasos para mejorar la eficiencia de extracción, por lo que es una metodología que se considera para muestras de escarabajos ambrosiales.

Metodología de extracción: CTAB 2%

1. Secar el ejemplar a T_{amb} (15 °C- 25 °C) por 5 min en papel absorbente estéril las muestras que se encuentren en alcohol.
2. Colocar un ejemplar (sin alcohol), en una MP Biomedicals™ Matriz de lisis D 11422420 y agregar 300 μ L de H₂O.
3. Macerar a 5 m/s por 60 s en un disruptor mecánico.
4. Centrifugar por 1 min a 15 000 RCF.
5. Tomar 250 μ L del macerado y depositarlo a un tubo estéril de 1.5 o 2 mL.
6. Agregar 600 μ L de *Buffer* CTAB 2 % y 30 μ L de solución de SDS 10 % al tubo con el ejemplar macerado y realizar un vórtex por 10 s.
7. Incubar los tubos con las muestras a 65 °C durante 30 min.
8. Colocar los tubos en hielo por 2 min y agregar 500 μ L de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y mezclar por inversión por 5 min.
9. Centrifugar a 10 000 RCF por 10 min.
10. Transferir 400-700 μ L del sobrenadante a un tubo limpio estéril de 1.5 o 2 mL.
11. Agregar un volumen de isopropanol del volumen recuperado del paso anterior y realizar un vórtex de 10 s e incubar por 70 min a -20°C.
12. Centrifugar a 13 000 RCF por 15 min.
13. Decantar el sobrenadante.
14. Lavar la pastilla formada con 500 μ L con etanol al 70 % y realizar un vórtex de 10 s.
15. Centrifugar a 13 000 RCF por 5 min y decantar.
16. Repetir el procedimiento desde el paso 14 y decantar.
17. Secar la pastilla con un concentrador de ADN por 20 min a 37 °C.
18. Disolver en 50 μ L de H₂O grado biología molecular, previamente calentada a 70 °C.
19. Proceder a la verificación de cantidad y calidad de ADN.

Qiagen “DNeasy® Blood & Tissue (No. Cat: 69506)”

Es un *kit* comercial que ofrece la extracción de ADN por medio del uso de columnas y en menor tiempo a comparación con las metodologías tradicionales. Los reactivos que se usan son diferentes al fenol y cloroformo, además se usa la proteinasa K, la cual permite degradar las proteínas que se encuentran en la muestra. Qiagen asegura que estos protocolos garantizan una extracción homogénea de ADN y de alta calidad (Qiagen, s.f).

Metodología de extracción: Qiagen “DNeasy® Blood & Tissue (No. Cat: 69506)”

1. Secar a T_{amb} (15 °C- 25 °C) por 5 min en papel absorbente estéril las muestras que se encuentren en alcohol.
2. Colocar un solo ejemplar en una matriz de lisado nueva (MP Biomedicals™ Matriz de lisis D 11422420), agregar 300 μ L de H₂O estéril, cerrar

herméticamente los viales y macerar a 5 m/s por 60 s, en un disruptor mecánico.

3. Centrifugar por 1 min a 5 000 RCF.

4. Tomar 250 μ L del lisado y colocar en un tubo de 1.5 mL o 2 mL, añadir 25 μ L de Proteinasa K (20 mg/mL) y 200 μ L de Buffer AL (sin etanol añadido). Mezclar bien mediante agitación con vórtex por 10 s e incubar a 56 °C durante 10 min en el baño maría y/o termomixer.

Nota: asegúrese de que no se haya agregado etanol al Buffer AL. Es fundamental que la muestra y el Buffer AL se mezcle de forma inmediata y completa mediante agitación con vórtex o pipeteado para obtener una solución homogénea.

5. Agregar 200 μ L de etanol (96 % – 100 %) a la muestra y mezclar en vórtex por 10 s e incubar por 1 min a T_{amb} (15 °C- 25 °C).

Nota: es importante que la muestra y el etanol se mezclen bien para obtener una solución homogénea.

6. Tomar 650 μ L de la mezcla del paso 5 (incluido cualquier precipitado) y depositar en una columna DNeasy Mini Spin junto con su tubo de recolección de 2 mL (incluido), centrifugar a 8 000 RCF durante 1 min. Desechar el sobrenadante y el tubo recolección.

7. Colocar la columna DNeasy Mini Spin en un tubo de recolección nuevo de 2 mL (incluido), agregar 500 μ L de Buffer AW1 y centrifugar durante 1 min a 8 000 RCF. Desechar el sobrenadante y el tubo de recolección.

8. Colocar la columna DNeasy Mini Spin en un nuevo tubo de recolección de 2 mL (incluido), agregar 500 μ L de Buffer AW2 y centrifugar durante 2 min a 14 000 RCF. Desechar el sobrenadante. Colocar la columna en el tubo de recolección y centrifugar durante 1 min a 14 000 RCF para secar completamente la membrana. Desechar el sobrenadante y el tubo de recolección.

Nota: si se produce un arrastre de etanol, vacíe el tubo de recolección, luego reutilícelo en otro paso de centrifugación durante 1 min a 14 000 RCF.

9. Colocar la columna DNeasy Mini Spin en un tubo de microcentrífuga limpio de 1.5 mL o 2 mL (no incluido) y colocar 50 μ L de Buffer AE, a 56 °C, directamente sobre la membrana DNeasy Mini Spin. Incubar a T_{amb} (15 °C- 25 °C) durante 2 min y luego centrifugar durante 2 min a 8 000 RCF para eluir.

10. Repetir la elución una vez como se describe en el paso 9 con el volumen eluido (50 μ L).

11. Proceder a la verificación de cantidad y calidad de ADN.

12. Almacenar el ADN a -20 °C o 4 °C.

E.Z.N.A.® “Tissue DNA (No. Cat: D3396-02)”

Es un *kit* comercial que propone un protocolo de extracción de ADN sencillo y en corto tiempo. La extracción se puede realizar en menos de 30 min donde se realiza la lisis celular y se utilizan columnas (EZNA, s.f).

Metodología de extracción: E.Z.N.A.® “Tissue DNA (No. Cat: D3396-02)”

1. Secar a T_{amb} por 5 min en papel absorbente estéril las muestras que se encuentren en alcohol.
2. Colocar un solo ejemplar (sin alcohol) en una matriz de MP Biomedicals™ Matriz de lisis D 11422420, agregar 300 μ L de TL Buffer, cerrar herméticamente los viales y macerar a 5 m/s por 60 s en un disruptor mecánico.

3. Centrifugar por 1 min a 15 000 RCF.
4. Recuperar toda la muestra (incluyendo burbujas) en un tubo estéril de 2 mL y agregar 25 μ L de OB Protease Solution e incubar a 60 °C por 10 min en un termobloque.
 - a. **Nota:** En este paso, hay que programar el termobloque a 70 °C.
5. Dejar enfriar por 2 min.
6. Agregar 500 μ L de BL *Buffer* y adicionar 2 μ L de RNasa A (100 mg/ml).
7. Mezclar con vórtex durante 10 s.
8. Incubar a 70 °C por 10 min.
9. Dejar enfriar a T_{amb} (15 °C- 25 °C) por 2 min.
10. Agregar 500 μ L de isopropanol frío (-20°C) y mezclar en un vórtex por 10 s.
11. Insertar la HiBind DNA Mini Column en un tubo recolector de 2 mL.
12. Transferir 750 μ L del paso anterior a la HiBind DNA Mini Column.
13. Centrifugar a 8 000 RCF por 1 min.
14. Decantar el filtrado y reusar el tubo recolector. Repetir este paso con el resto de la muestra.
15. Transferir la columna HiBind DNA Mini a un nuevo tubo colector de 2 mL.
16. Agregar 500 μ L de HBC *Buffer*.
17. Centrifugar a 8 000 RCF por 60 s.
18. Decantar el filtrado y reusar el tubo recolector.
19. Agregar 700 μ L de DNA Wash *Buffer*.
20. Centrifugar a 8 000 RCF por 60 s.
21. Decantar el filtrado y reusar el tubo recolector.
22. Repetir del paso 19 al 21 para hacer un segundo lavado con 500 μ L de DNA Wash *Buffer*.
23. Centrifugar la HiBind DNA Mini Column a 12 000 RCF por 2 min para secar.
24. Transferir la HiBind DNA Mini Column en un tubo de microcentrífuga libre de nucleasas de 1.5 mL o 2 mL.
25. Agregar 50 μ L de Elution *Buffer* previamente calentado a 70 °C.
26. Incubar a T_{amb} (15 °C- 25 °C) por 2 min.
27. Centrifugar a 8 000 RCF por 2 min.5
28. Repetir la elución una vez como se describe en los pasos 26 al 27 con el volumen eluido (50 μ L).
29. Proceder a la verificación de cantidad y calidad de ADN.
30. Almacenar el ADN a -20 °C o 4 °C.

ACTIVIDADES REALIZADAS

Noviembre, de 2023

Se realizó una visita al laboratorio de biología molecular, del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF), para reconocer la organización y áreas que integran el Laboratorio. Además, se recibió capacitación para el manejo y uso del equipo con el cual se llevó a cabo la metodología del Proyecto Servicio Social.

Se efectuaron algunas extracciones de ADN de diversas muestras, como: tejido vegetal, semillas e insectos, con el objetivo de determinar la eficacia de distintas metodologías para la extracción de ADN.

De muestras de *Euwallacea kuroshio* Eichhoff (Curculionidae), se extrajo el ADN, utilizando cuatro metodologías diferentes, incluyendo kits comerciales y solventes orgánicos.

Se elaboró una base de datos para el registro de los resultados de la primera evaluación de extracción de ADN de los escarabajos ambrosiales *E. kuroshio*

Se asistió al curso de capacitación en el uso de micropipetas, que incluyó el conocimiento de sus componentes, la técnica adecuada para manipular diferentes líquidos, así como el proceso de calibración.

Diciembre, de 2023

Se concluyó la capacitación sobre la preparación del MIX (mezcla de reacción para la PCR) y la función de cada componente del mismo y se llevó a cabo PCR punto final.

Se finalizó capacitación y asesoría para acceder al área de electroforesis y saber el manejo y el uso del bromuro de etidio, en donde se requiere una precaución adicional; que es necesaria para la preparación de geles de agarosa. Estos geles se utilizaron con muestras extraídas en noviembre del 2023, incluyendo tejido vegetal, semillas y partes del cuerpo de insectos, con el propósito de detectar la amplificación de las muestras.

Enero, de 2024

Se realizó una segunda evaluación utilizando muestras de escarabajo de la especie *E. kuroshio* ajustando volúmenes y tiempos de acuerdo con las metodologías de extracción de ADN.

Recopilación de los resultados en una base de datos, para su posterior comparación.

Se llenaron cajas con puntas de 10 µL, 200 µL y 1000 µL.

Febrero, de 2024

Se analizaron los resultados, con la finalidad de identificar el método más apropiado y la metodología óptima para el siguiente estudio del espécimen *Xylosandrus compactus* Eichhoff (Curculionidae) en sus tres fases de desarrollo: larva, pupa y adulto.

Empleando el método seleccionado para la extracción de ADN de *X. compactus* en los adultos, se llevó a cabo la primera evaluación, siguiendo los procedimientos establecidos en la metodología.

Se documentaron los resultados de la primera evaluación.

Mediante el uso de autoclave se esterilizó el material de laboratorio utilizado para la extracción de ADN.

El 15 de febrero del 2024 se asistió y apoyó en el curso realizado en el Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF) en el SENASCIA sobre *Schitocerca* spp., abordando aspectos generales del insecto hasta la extracción de ADN con CTAB al 2%, concluyendo con una PCR en tiempo real (qPCR)

Se llevó a cabo una evaluación del almacenamiento de ADN de *E. kuroshio* bajo diferentes condiciones de temperatura (-20°C y 4°C).

Se realizó la primera evaluación periódica de la calidad del ADN y se registraron los resultados obtenidos.

Marzo, de 2024

Se hizo un PCR punto final utilizando el ADN extraído de *E. kuroshio* seguido de la visualización de la amplificación mediante un gel de agarosa al 1% utilizando los *primers* generales LCO/HCO.

En la base de datos, se registraron los resultados de las muestras que mostraron amplificación para su evaluación final.

Se verificaron las certificaciones de calibración de las micropipetas utilizadas.

Se realizó una segunda extracción de ADN de muestras de adultos de *X. compactus*, modificando los volúmenes según la metodología.

Extracción de ADN en larvas de *X. compactus*, primera extracción se documentaron los resultados obtenidos.

Se llevó a cabo otra extracción de ADN de pupas de *X. compactus* utilizando la metodología estándar sin modificarla.

Para atender los objetivos del Proyecto de Servicio Social, se realizó la extracción de ADN en todas las etapas del ciclo biológico de *X. compactus*: larvas pupas y adultos; en donde se evaluó la maceración mediante el uso de un taladro y un pistilo en comparación con una matriz D, con el objetivo de observar posibles diferencias en los resultados.

Se realizó la segunda evaluación del almacenamiento de ADN de *E. kuroshio* bajo diferentes condiciones de temperatura (-20°C y 4°C), y se registraron los datos correspondientes.

Abril, de 2024

Una PCR punto final fue realizada utilizando todas las muestras de ADN de *X. compactus*, utilizando los *primers* LCO/HCO.

Se preparó un gel de agarosa al 1% para visualizar las amplificaciones de *X. compactus* en sus diferentes etapas de desarrollo: larva, pupa y adulto.

Los resultados fueron registrados en la base de datos para su posterior comparación. Se llevó a cabo la última evaluación del almacenamiento de ADN bajo diversas condiciones de temperatura (-20°C y 4°C) para *E. kuroshio*, los datos obtenidos fueron registrados.

Se recopilaron los datos para elaborar el informe final del servicio social y se preparó una presentación en PowerPoint para su entrega al Coordinador del Laboratorio de Biología Molecular.

Metas alcanzadas

- Meta: Comparar cuatro métodos de extracción de ADN en ejemplares de escarabajos ambrosiales

Se evaluaron los cuatro métodos de extracción. Meta alcanzada:

Mediante espectrometría, se determinó el método más eficiente para la extracción de ADN de los escarabajos ambrosiales *Euwallacea kuroshio* Eichhoff y *Xylosandrus compactus* Eichhoff, (Curculionidae). Este análisis permitió identificar la técnica óptima para obtener muestras de alta calidad genética de ambas especies, lo que resulta crucial para futuras investigaciones y estudios relacionados con su biología y genética.

Para la extracción de ADN, se optó por el método de E.Z.N.A.® "Tissue DNA (No. Cat: D3396-02)", el cual demostró ser altamente eficiente para ambas especies de escarabajos ambrosiales *Euwallacea kuroshio* Eichhoff y *Xylosandrus compactus* Eichhoff (Curculionidae). Además, en el caso específico de *Xylosandrus compactus* Eichhoff (Curculionidae), se realizaron pruebas con diferentes estadios de la especie, incluyendo larva, pupa y adulto y se evaluó la efectividad del método en cada etapa del ciclo de vida.

Se logró una exitosa amplificación utilizando los *primers* (HCO/LCO) generales correspondientes a la región mitocondrial COI. La visualización de los productos amplificados se llevó a cabo mediante un gel de agarosa al 1% con 2 µL de bromuro de etidio, el cual se sometió a una electroforesis durante 40 minutos a 90 V. Se realizaron tres réplicas de cada muestra, así como del control positivo (+), Non-Template Control (NTC) y un control negativo (-). Es importante destacar que todas las muestras de ambas especies presentaron amplificación exitosa, lo que confirma la eficacia del proceso y la viabilidad de utilizar estos *primers* para futuros análisis y estudios relacionados con la región COI en estas especies de escarabajos ambrosiales.

Resultados y conclusión

Los resultados para Qiagen "DNeasy® Blood & Tissue (No. Cat: 69506)" fueron los siguientes para *Euwallacea kuroshio* Eichhoff (Curculionidae):

No.	Nombre	Clave	Estado	Peso (mg)	[DNA] ng/µL	A _{260/280}	A _{260/230}	Observaciones
1	<i>Euwallacea kuroshio</i>	QEU	Adulto	1.5	9.7	1.63	0.91	
2	<i>Euwallacea kuroshio</i>	QEE	Adulto	1.4	11.7	1.71	0.96	
3	<i>Euwallacea kuroshio</i>	QEI	Adulto	1.4	10.7	1.7	1.14	
4	<i>Euwallacea kuroshio</i>	QEE	Adulto	1.1	8.6	1.73	1.11	
5	<i>Euwallacea kuroshio</i>	QEL	Adulto	1.5	7.8	1.85	0.67	

Cuadro 1 Resultados de concentración y calidad de ADN del escarabajo que se analizó con la metodología de Qiagen, en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro Nacional de Referencia en el SENASICA.

Resultados de E.Z.N.A.® "Tissue DNA (No. Cat: D3396-02)":

No.	Nombre	Clave	Estado	Peso (mg)	[DNA] ng/μL	A _{260/280}	A _{260/230}	Observaciones
1	<i>Euwallacea kuroshio</i>	EE1.4S	Adulto	1.2	12.3	1.69	0.98	
2	<i>Euwallacea kuroshio</i>	EE2.4S	Adulto	1.3	12.9	1.78	1.06	
3	<i>Euwallacea kuroshio</i>	EE3.4S	Adulto	0.6	13.7	1.72	1.01	
4	<i>Euwallacea kuroshio</i>	EE4.4S	Adulto	1.3	18	1.85	1.32	
5	<i>Euwallacea kuroshio</i>	EE5.4S	Adulto	1.5	18.8	1.84	1.24	

Cuadro 2 Resultados de concentración y calidad de ADN del escarabajo que se analizó con la metodología de E.Z.N.A.® "Tissue DNA (No. Cat: D3396-02)", en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro Nacional de Referencia en el SENASICA.

Resultados de Fenol: Cloroformo: Alcohol Isoamílico (25:24:1) (FCI):

No.	Nombre	Clave	Estado	Peso (mg)	[DNA] ng/μL	A _{260/280}	A _{260/230}	Observaciones
1	<i>Euwallacea kuroshio</i>	FEU	Adulto	1.4	4	1.09	4.45	
2	<i>Euwallacea kuroshio</i>	FER	Adulto	1.2	7	1.08	2.07	
3	<i>Euwallacea kuroshio</i>	FEI	Adulto	1.1	9.6	1.19	1.05	
4	<i>Euwallacea kuroshio</i>	FEE	Adulto	1.1	11.1	1.23	2.35	
5	<i>Euwallacea kuroshio</i>	FEL	Adulto	1.3	13.1	1.29	1.26	

Cuadro 3 Resultados de concentración y calidad de ADN del escarabajo que se analizó con la metodología FCI, en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro Nacional de Referencia en el SENASICA.

Resultados de CTAB 2%

No.	Nombre	Clave	Estado	Peso (mg)	[DNA] ng/μL	A _{260/280}	A _{260/230}	Observaciones
1	<i>Euwallacea kuroshio</i>	CEU	Adulto	1	3.3	1.56	0.36	
2	<i>Euwallacea kuroshio</i>	CER	Adulto	1.4	2.2	2.07	0.47	
3	<i>Euwallacea kuroshio</i>	CEI	Adulto	1.3	1.5	1.66	0.28	
4	<i>Euwallacea kuroshio</i>	CEE	Adulto	1.7	4.8	1.93	0.49	
5	<i>Euwallacea kuroshio</i>	CEL	Adulto	2.1	1.8	1.58	0.36	

Cuadro 4 Resultados de concentración y calidad de ADN del escarabajo que se analizó con la metodología de CTAB 2 %, en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro Nacional de Referencia en el SENASICA.

Después de obtener los resultados, se llevó a cabo la PCR punto final utilizando los *primers* generales de la región COI en las especies de escarabajos ambrosiales, con el propósito de verificar la amplificación de las muestras.

Visualización de los productos de PCR por medio de electroforesis en agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio

PCR punto final

Primers: LCO/HCO

Tamaño de amplicón: ~ 700 pb

(+): *Schistocerca* sp

Método de extracción: QIAgen “DNeasy® Blood & Tissue (No. Cat: 69506

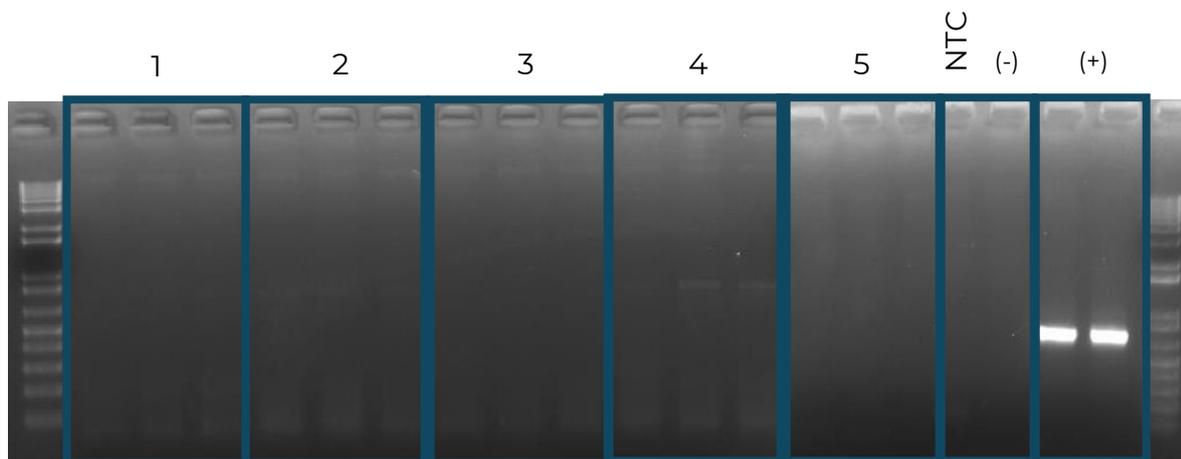


Figura 1 Visualización de los productos de PCR del ADN obtenido con el kit de QIAgen “DNeasy® Blood & Tissue (No. Cat: 69506)”, usando los oligonucleótidos universales LCO/HCO. Para visualizar los productos de PCR se hizo un gel de agarosa al 1 % y se corrió por 40 min a 90 V. Se hicieron tres réplicas de cada muestra y del control positivo, solo se agregó un NTC y un negativo. 1) QE1, 2) QE2, 3) QE3, 4) QE4, 5) QE5, NTC, (-): Negativo y (+): Positivo de *Schistocerca* sp.

Método de extracción de ADN E.Z.N.A.® “Tissue DNA (No. Cat: D3396-02)”

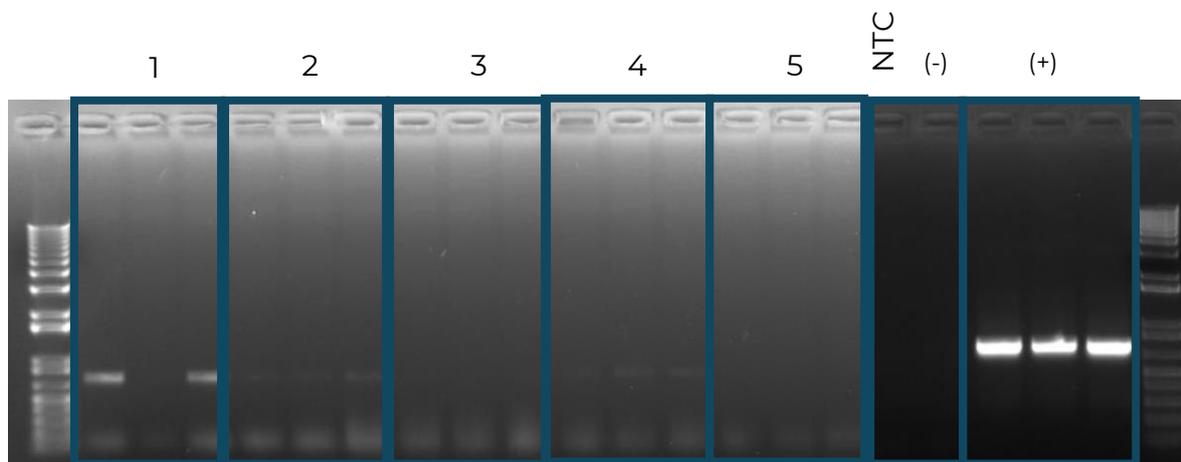


Figura 2 Visualización de los productos de PCR del ADN obtenido con el kit de E.Z.N.A.® Tissue DNA Kit (No. Cat: D3396-02), usando los oligonucleótidos universales LCO/HCO. Para visualizar los productos de PCR se hizo un gel de agarosa al 1 % y se corrió por 40 min a 90 V. Se hicieron tres réplicas de cada muestra y del control positivo, solo se agregó un NTC y un negativo. 1) EE1.4S, 2) EE2.4S, 3) EE3.4S, 4) EE4.4S, 5) EE5.4S, NTC, (-): Negativo y (+): Positivo de *Schistocerca* sp.

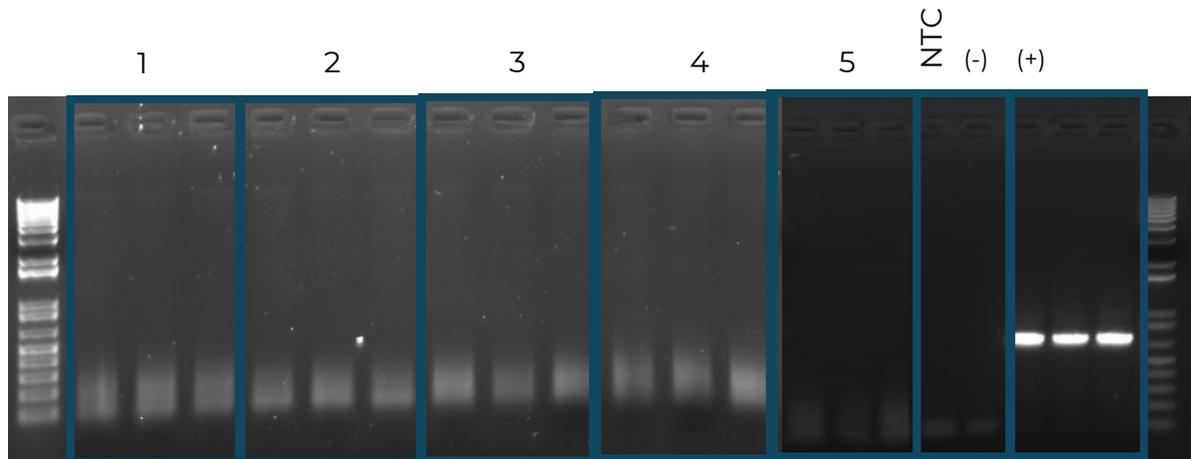


Figura 3 Visualización de los productos de PCR del ADN obtenido con CTAB al 2%, usando los oligonucleótidos universales LCO/HCO. Para visualizar los productos de PCR se hizo un gel de agarosa al 1 % y se corrió por 40 min a 90 V. Se hicieron tres réplicas de cada muestra y del control positivo, solo se agregó un NTC y un negativo. 1) CEU, 2) CER, 3) CEI, 4) CEE, 5) CEL, NTC, (-): Negativo y (+): Positivo de *Schistocerca* sp.

Fenol: Cloroformo: Alcohol Isoamílico (25:24:1)

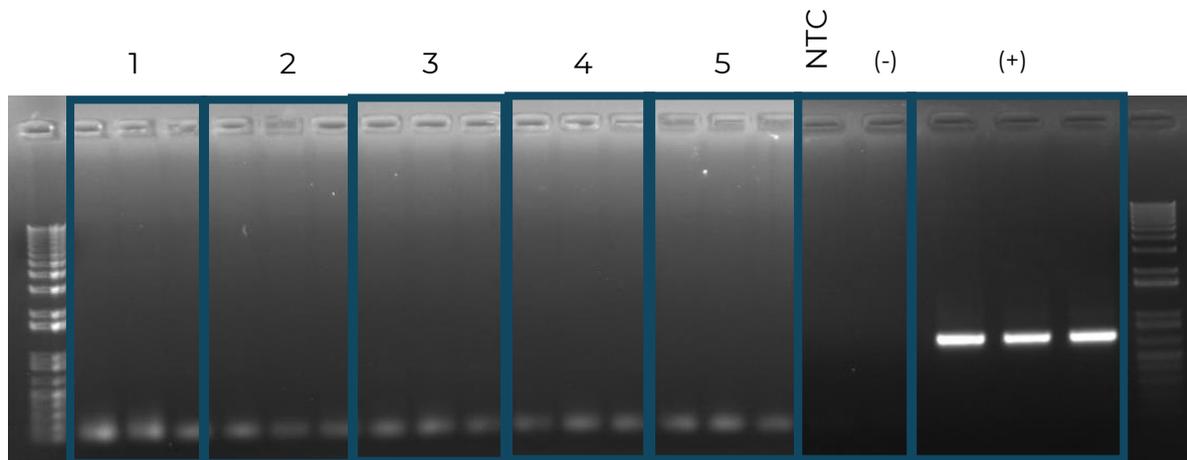


Figura 4 Visualización de los productos de PCR del ADN obtenido con Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico (25:24:1), usando los oligonucleótidos universales LCO/HCO. Para visualizar los productos de PCR se hizo un gel de agarosa al 1 % y se corrió por 40 min a 90 V. Se hicieron tres réplicas de cada muestra y del control positivo, solo se agregó un NTC y un negativo. 1) FEU, 2) FER, 3) FEI, 4) FEE, 5) FEL, NTC, (-): Negativo y (+): Positivo de *Schistocerca* sp.

De acuerdo con los resultados de *Euwallacea kuroshio* Eichhoff, se decidió llevar a cabo la extracción de ADN utilizando el kit E.Z.N.A.® "Tissue DNA (No. Cat: D3396-02)" para *Xylosandrus compactus* Eichhoff. Se tomó esta decisión con la expectativa de obtener resultados similares a los obtenidos con *Euwallacea kuroshio* Eichhoff, lo que permitió realizar experimentos adicionales. Además, se contó con muestras de diferentes estadios de estos escarabajos ambrosiales (larva, pupa y adulto), facilitando así la realización de más experimentos.

***Xylosandrus compactus* (Curculionidae) ADULTO**

No.	Nombre	Clave	Estado	No. De ejemplares	[DNA] ng/ μ L	A _{260/280}	A _{260/230}	Observaciones
1	<i>Xylosandrus compactus</i>	XC1	Adulto	1	13.7	1.78	0.7	
2	<i>Xylosandrus compactus</i>	XA1	Adulto	1	12.5	1.9	0.64	
3	<i>Xylosandrus compactus</i>	XA2	Adulto	1	9.4	1.88	0.65	

Cuadro 5 Resultados de concentración y calidad de ADN del escarabajo en el estadio de adulto que se analizó con la metodología de E.Z.N.A.® "Tissue DNA (No. Cat: D3396-02)", en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro Nacional de Referencia en el SENASICA.

***Xylosandrus compactus* (Curculionidae) PUPA**

No.	Nombre	Clave	Estado	No. De ejemplares	[DNA] ng/ μ L	A _{260/280}	A _{260/230}	Observaciones
1	<i>Xylosandrus compactus</i>	XcP1	Pupa	1	72.7	1.93	7.41	
2	<i>Xylosandrus compactus</i>	XcP2	Pupa	1	59.2	1.98	4.75	
3	<i>Xylosandrus compactus</i>	XcP3	Pupa	1	69.7	1.91	3.36	

Cuadro 6 Resultados de concentración y calidad de ADN del escarabajo en el estadio de pupa que se analizó con la metodología de E.Z.N.A.® "Tissue DNA (No. Cat: D3396-02)", en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro Nacional de Referencia en el SENASICA.

***Xylosandrus compactus* (Curculionidae) LARVA**

No.	Nombre	Clave	Estado	No. De ejemplares	[DNA] ng/ μ L	A _{260/280}	A _{260/230}	Observaciones
1	<i>Xylosandrus compactus</i>	XL1	Larva	1	21.2	2.01	1.49	
2	<i>Xylosandrus compactus</i>	XcL1	Larva	1	66.8	1.92	3.07	
3	<i>Xylosandrus compactus</i>	XcL2	Larva	1	70.9	1.91	3.25	

Cuadro 7 Resultados de concentración y calidad de ADN del escarabajo en el estadio de larva que se analizó con la metodología de E.Z.N.A.® "Tissue DNA (No. Cat: D3396-02)", en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro Nacional de Referencia en el SENASICA.

Como se observa en las tablas, se logró obtener una buena concentración de ADN y una calidad satisfactoria de ADN A(260/280) con el kit de extracción de ADN E.Z.N.A.® "Tissue

DNA (No. Cat: D3396-02)" para *Xylosandrus compactus* en sus diferentes estadios de desarrollo: adulto, larva y pupa.

Visualización de los productos de PCR por medio de electroforesis en agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio

PCR punto final

Primers: LCO/HCO

Tamaño de amplicón: ~ 700 pb

(+): *Schistocerca* sp

Xylosandrus compactus (Curculionidae) ADULTO

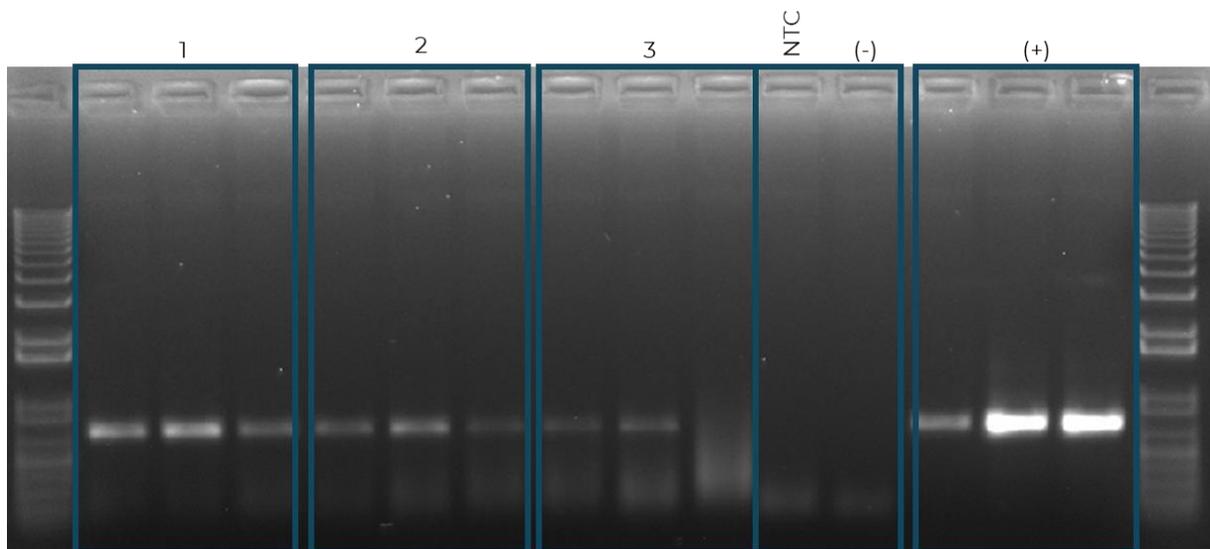


Figura 5 Visualización de los productos de PCR del ADN obtenido el kit de E.Z.N.A.® Tissue DNA Kit (No. Cat: D3396-02), usando los oligonucleótidos universales LCO/HCO. Para visualizar los productos de PCR se hizo un gel de agarosa al 1% y se corrió por 40 min a 90 V. Se hicieron tres réplicas de cada muestra y del control positivo, solo se agregó un NTC y un negativo. 1)XC1, 2) XA1, 3) XA2, NTC, (-): Negativo y (+): Positivo de *Schistocerca* sp.

***Xylosandrus compactus* (Curculionidae) PUPA**

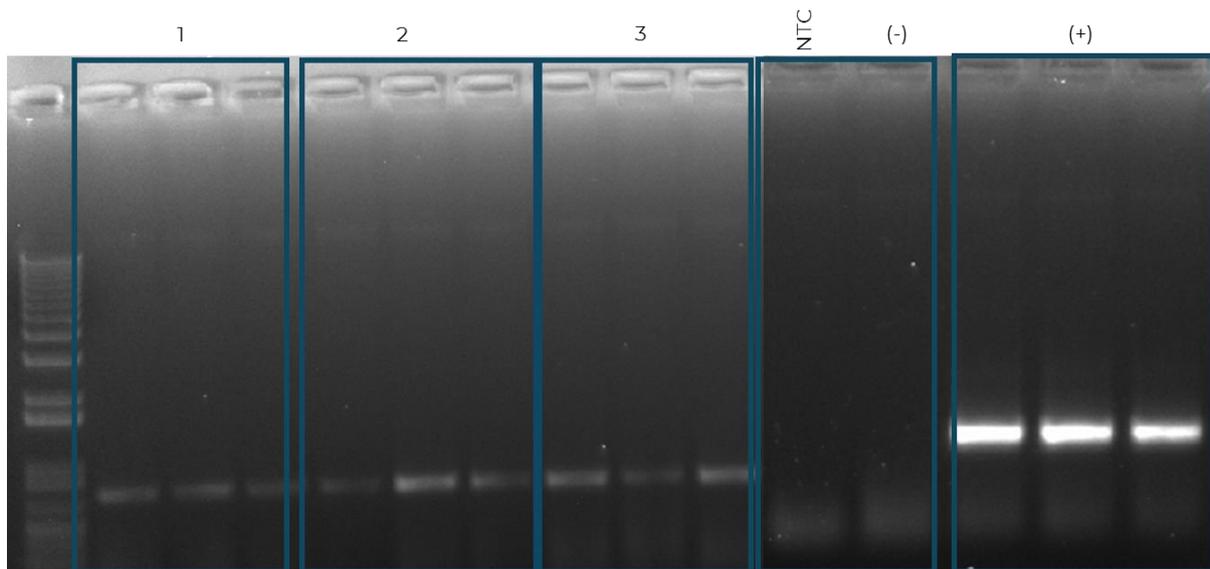


Figura 6 Visualización de los productos de PCR del ADN obtenido el kit de E.Z.N.A.® Tissue DNA Kit (No. Cat: D3396-02), usando los oligonucleótidos universales LCO/HCO. Para visualizar los productos de PCR se hizo un gel de agarosa al 1 % y se corrió por 40 min a 90 V. Se hicieron tres réplicas de cada muestra y del control positivo, solo se agregó un NTC y un negativo. 1)XcP1, 2) XcP2, 3) XcP3, NTC, (-): Negativo y (+): Positivo de *Schistocerca* sp.

***Xylosandrus compactus* (Curculionidae) LARVA**

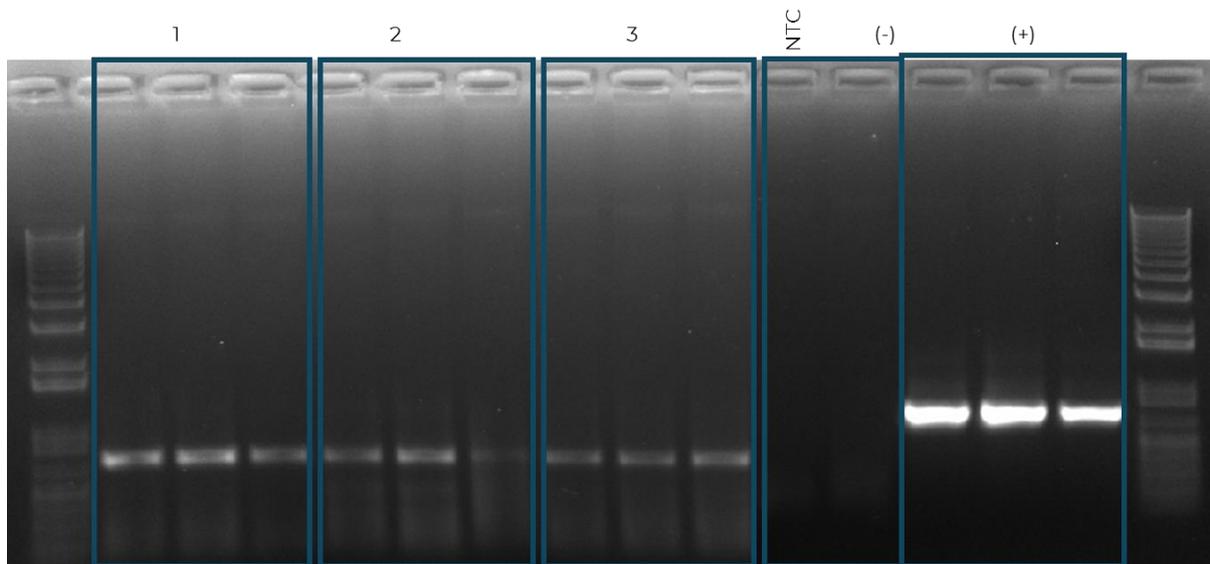


Figura 7 Visualización de los productos de PCR del ADN obtenido el kit de E.Z.N.A.® Tissue DNA Kit (No. Cat: D3396-02), usando los oligonucleótidos universales LCO/HCO. Para visualizar los productos de PCR se hizo un gel de agarosa al 1 % y se corrió por 40 min a 90 V. Se hicieron tres réplicas de cada muestra y del control positivo, solo se agregó un NTC y un negativo. 1)XcL1, 2) XcL2, 3) XcL3, NTC, (-): Negativo y (+): Positivo de *Schistocerca* sp.

Además, se combinó el ADN de todas las muestras extraído de cada método (Qiagen "DNeasy® Blood & Tissue (No. Cat: 69506)", E.Z.N.A.® "Tissue DNA (No. Cat: D3396-02)", Fenol: Cloroformo: Alcohol Isoamílico (25:24:1) y CTAB al 2%) del escarabajo ambrosial *Euwallacea kuroshio* Eichhoff (Curculionidae) para evaluar la concentración de ADN bajo diversas condiciones (4°C y -20°C), con el propósito de determinar su eficacia en el almacenamiento (Cuadro 8).

Qiagen			EZNA			Fenol			CTAB 2%		
Cuanti- ficación n 4°C (ng/μl)	Cuanti- ficación n - 20°C (ng/μl)	Fecha	Cuanti- ficación n 4°C (ng/μl)	Cuanti- ficación n - 20°C (ng/μl)	Fecha	Cuanti- ficación n 4°C (ng/μl)	Cuanti- ficación n - 20°C (ng/μl)	Fecha	Cuanti- ficación n 4°C (ng/μl)	Cuanti- ficación n - 20°C (ng/μl)	Fecha
14.3	13.8	23/0 2/20 24	21.4	21.7	23/0 2/20 24	9.5	9.2	23/0 2/20 24	3.8	2.8	23/0 2/20 24
19	11.8	22/0 3/20 24	21.4	21.2	22/0 3/20 24	8.8	8.3	22/0 3/20 24	3.2	2.8	22/0 3/20 24
20.2	11.4	15/04 /202 4	21.1	20	15/04 /202 4	8.7	8.1	15/04 /202 4	3	3.1	15/04 /202 4

Cuadro 8 Resultados de concentración y calidad de ADN del escarabajo *Euwallacea kuroshio* Eichhoff (Curculionidae) bajo diferentes condiciones de temperatura

Como se observa en el Cuadro 8, el ADN extraído con la metodología de Qiagen "DNeasy® Blood & Tissue (No. Cat: 69506)", a temperatura de 4°C aumento la concentración de ADN mientras a -20°C disminuyó. Por otro lado, el ADN extraído con el kit de E.Z.N.A.® "Tissue DNA (No. Cat: D3396-02)", mantuvo su concentración sin cambios. Sin embargo, la concentración mediante la metodología de Fenol: Cloroformo: Alcohol Isoamílico (25:24:1) disminuyó la concentración de ADN tanto a 4°C como a -20°C. En cuanto al CTAB al 2%, a 4°C se observó una disminución en la concentración de ADN, mientras que a -20°C se registró un aumento de 0.3 ng/μl.

En conclusión, los resultados de este estudio proporcionan una evidencia sólida de que el método de extracción de ADN utilizando el kit E.Z.N.A.® "Tissue DNA (No. Cat: D3396-02)" es altamente efectivo para las especies de escarabajos ambrosiales *Euwallacea kuroshio* Eichhoff (Curculionidae) y *Xylosandrus compactus* Eichhoff (Curculionidae). La concentración satisfactoria y la calidad óptima del ADN extraído, como indicado por la relación A(260/280), respaldan la idoneidad de este método para futuras investigaciones genéticas en estas especies. Además, la confirmación de la amplificación del ADN mediante electroforesis valida la integridad del material extraído. Basándonos en la evaluación de almacenamiento para E.Z.N.A.® "Tissue DNA (No. Cat: D3396-02)", podemos concluir que es seguro dejarlo almacenado ya sea a temperatura de 4°C o a -20°C, ya que no se ve afectado negativamente por estas temperaturas. Estos hallazgos son fundamentales para mejorar nuestra comprensión de la genética y la biología de estos escarabajos, lo que a su vez podría tener implicaciones importantes en áreas como la conservación de la biodiversidad y el control de plagas. Se recomienda ampliar este estudio mediante análisis genéticos más detallados y extender la aplicación de este método a otras especies relacionadas, con el fin de mejorar aún más nuestra comprensión de la biología y la ecología de los escarabajos ambrosiales y su impacto en los ecosistemas.

Además, la implementación de este método de extracción de ADN en estudios de campo podría facilitar la identificación rápida y precisa de las especies, lo que es esencial para monitorear y gestionar las poblaciones de escarabajos ambrosiales, especialmente en áreas afectadas por la invasión de estas plagas. La capacidad de obtener ADN de alta calidad de manera consistente también abre la puerta a la exploración de estudios genómicos y transcriptómicos, que podrían revelar nuevos aspectos de la fisiología y adaptación de estos insectos.

Finalmente, es crucial considerar la viabilidad económica y la accesibilidad del kit E.Z.N.A.® "Tissue DNA (No. Cat: D3396-02)" para laboratorios con diferentes niveles de recursos. La eficiencia y la efectividad demostradas en este estudio sugieren que podría ser una herramienta valiosa no solo en investigaciones académicas, sino también en aplicaciones prácticas de manejo ambiental y agrícola. La colaboración interdisciplinaria y la integración de estos métodos avanzados en estrategias de manejo de plagas podrían ofrecer soluciones más sostenibles y efectivas para proteger la biodiversidad y los ecosistemas afectados por los escarabajos ambrosiales.

Recomendaciones

Se recomienda seguir rigurosamente los parámetros establecidos por la metodología del kit E.Z.N.A.® "Tissue DNA (No. Cat: D3396-02)" durante el proceso de extracción de ADN, con el fin de garantizar la reproducibilidad de los resultados (EZNA, s.f). Es crucial verificar la vigencia de los buffers antes de iniciar la extracción, ya que su caducidad podría afectar negativamente la calidad y la concentración del ADN obtenido. Asimismo, se debe inspeccionar cuidadosamente que la muestra no contenga residuos de alcohol u otros contaminantes, ya que estos podrían interferir con el proceso de extracción y modificar los resultados finales. Es imperativo utilizar exclusivamente los reactivos y materiales suministrados en el kit, evitando cualquier sustitución que pueda comprometer la integridad de los resultados. Adicionalmente, se sugiere llevar a cabo controles de calidad regulares y mantener registros detallados de cada etapa del procedimiento, lo que facilitará la identificación y corrección de posibles errores. Mediante el seguimiento meticuloso de estas recomendaciones, se puede aumentar la fiabilidad y la consistencia de los datos obtenidos, contribuyendo así al avance de la investigación en este campo.

BIBLIOGRAFÍA

- Cognato, A. I., O'Donnel, R. and Rabaglia, R. J. (2011). *An Asian ambrosia beetles, Xylosandrus amputates (Blandford) (Curculionidae: Scolytinae: Xyleborini)*. Discovered in Florida, USA. Coleopterists Bulletin (in press).
- EZNA, (s.f). *Kit para ADN tisular*. [en línea] <https://es.vwr.com/store/product/2103912/kit-para-dna-tisular-e-z-n-a> Consultado el 8 de enero del 2024
- Probioteki (s.f). *CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio)*. Productos y equipos biotecnológicos. [En línea] <https://www.probiotek.com/productos/reactivos/detergentes/ctab/> Consultado el 5 de enero del 2024
- Qiagen, (s.f). *Kits de sangre y tejidos DNeasy*. [en línea] <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dnarna-purification/dna-purification/genomic-dna/dneasy-blood-and-tissue-kit> Consultado el 8 de enero del 2024
- Red Biobancos (2011). *PNT EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS*. Instituto de Salud Carlos III.
- SENASICA, (2014). *Ficha técnica Euwallacea sp.* Dirección General de Sanidad Vegetal, Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria.
- SENASICA, (2019a). *COMPLEJO ESCARABAJO BARRENADOR POLÍFAGO Euwallacea sp. – Fusarium euwallaceae*.
- SENASICA, (2019b). *Guía de síntomas y daños del escarabajo barrenador polífago (Euwallacea sp.)*
- SIAP (2021). *Aguacate Mexicano otro protagonista del Super Bowl*. [En línea]. Disponible en: <https://www.gob.mx/siap/documentos/brochure-aguacate> Consultado el 18 de diciembre del 2023
- SIAP., (2018). *Cierre de producción agrícola por cultivo. Ciclo agrícola 2017*. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. [En línea]: <http://www.siap.gob.mx/cierrede-la-produccion-agricola-por-cultivo/>. Consultado el 3 de enero del 2024
- Tamay de Dios, L, Ibarra C. y Velsasquillo, C. (2013). *Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real*. Tecnología en salud. Universidad en Discapacidad. Vol. 2.
- Tuffen, M., Baker, R., Eyre, D., Korycinska, A., and Parkinson, N. (2014). *Rapid Pest Risk Analysis (PRA) for Polyphagous Shot Hole Borer (Euwallacea sp.) and Fusarium Dieback (Fusarium euwallaceae)*. The Food and Environment Research Agency del Department for Environmental Food and Rural Affairs de Gran Bretaña.
- Vásquez, H. D., Saavedra, R., Marín, E., Guerrero, J., & Sánchez, C. (2022). *Cartilla de Estados Fenológicos-tipo en Aguacate HASS para la localidad de Roldanillo, Valle del Cauca*. (1.a ed.). Universidad Nacional de Colombia. https://ladera.palmira.unal.edu.co/downloads/5.%20Fenologico_Hass_Web.pdf
- Agrios, G. (1998). *Fitopatología*. 3ª edición; Editorial Limusa, México.
- Peña, R. y Páez, J. (s.f.). *Fitopatología*. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia.

Granados, M. (2018). *Identificación morfológica de hongos fitopatógenos*. Taller básico de hongos fitopatógenos. Universidad de Costa Rica.

Rojas, R. y R. Gallardo. (2004). *Manual de Insectos asociados a maderas en la zona sur de Chile*. Servicio Agrícola y Ganadero. Santiago, Chile. 63p

Fierro, F. (s.f) *Electroforesis de ADN*. Departamento de Biotecnología, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa. Ciudad de México