



**Casa abierta al tiempo**

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD  
IZTAPALAPA

---

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Posgrado en Biotecnología

Estudio del microbioma asociado a *Xyleborus affinis* y su  
relación con la resistencia a infecciones por hongos  
entomopatógenos

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE**

Maestra en Biotecnología

**PRESENTA**

IBI Citlaly Cando Narvaez

Matricula: 2192802209

**Comité tutorial**

Director: Dr. Francisco Javier Figueroa Martínez

Codirector: Dr. Octavio Loera Corral

Asesora: Dra. Nohemí García Ortiz

Ciudad de México, 17 de junio del 2021

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa la cual está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465”.

Ciudad de México, 17 de junio 2021

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

Estudio del microbioma asociado a *Xyleborus affinis* y su relación con la resistencia a infecciones por hongos entomopatógenos

Qué presentó:

IBI. Citlaly Cando Narvaez

Comité tutorial:

Director: Dr. Francisco Javier Figueroa Martínez. Universidad Autónoma Metropolitana

Codirector: Dr. Octavio Loera Corral. Universidad Autónoma Metropolitana

Asesora: Dra. Nohemí García Ortiz.

Centro Nacional de Referencia de Control Biológico, CNRF-DGSV, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA)

H. jurado:

Presidente: Dr. Javier Barrios González

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

Secretario: Dr. José Miguel Ángel Castillo Minjárez

Universidad Tecnológica de Tecámac

Vocal: Dra. Nohemí García Ortiz

Centro Nacional de Referencia de Control Biológico, CNRF-DGSV, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA)

Vocal: Dr. Roberto Montesinos Matías

Centro Nacional de Referencia de Control Biológico, CNRF-DGSV, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA)

## ***Dedicatoria***

*A Dios, por iluminar mi camino cada día.*

*A mis padres, mis guías en esta vida. Vicente y Margarita. Papá, gracias porque siempre estás para brindarme el mejor consejo, motivarme, decirme que siempre puedo empezar nuevamente. Mamá eres la mujer más trabajadora que he conocido, mi ejemplo de lucha, trabajo y amor. Gracias a ambos por todo lo bueno que me han brindado, el amor que me transmiten y por hacerme saber que siempre podré volver a casa.*

*Areli. Por tú apoyo, la vida es más fácil sabiendo que tengo una hermana que siempre está dispuesta apoyarme o regañarme, según sea el caso. Sabes que eres mi media sandía. Te quiero sis.*

*A mi abue Hermelinda. Abuela, gracias por orar por mí, por alegrarte de mis logros y por la gran mujer que eres. Te quiero.*

## **Agradecimientos**

*A Conacyt por la beca otorgada, (número de apoyo: 757452).*

*Dr. Octavio Loera.*

*Por brindarme la oportunidad de trabajar en su equipo de investigación, por sus asesorías durante mi proyecto.*

*A mi director de tesis. Dr. Francisco Figueroa.*

*Gracias por brindarme la confianza para realizar este proyecto, por escuchar mis dudas, sus buenos consejos, por las correcciones a mis trabajos lo cual son un reto y me motivan. Esperó algún día poder transmitir el conocimiento como usted lo hace, lo cual admiro mucho.*

*MC. Hugo.*

*Por permitirme realizar mi proyecto de investigación en el Centro Nacional de Referencias de Control Biológico, Colima.*

*Al Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Estado de Colima, especialmente al Ing. Jesús y al Ing. Celerino, por la ayuda brindada para obtener muestras de campo.*

*A mis sinodales, el Dr. Roberto, Dra. Nohemí, Dr. Miguel y Dr. Javier, por tomarse su tiempo para formar parte de mi jurado y revisar mi trabajo.*

*Dra. Nohemí.*

*Por recibirme en el centro, por su experiencia, enseñanzas y sus asesorías durante el desarrollo de mi proyecto. Por permitirme quedar en su casa.*

*Dr. Roberto Montesinos.*

*Por permitirme trabajar en el laboratorio de Colección de Hongos, por ayudarme a conseguir escarabajos de campo, por compartirme su conocimiento. Asimismo, quiero agradecerle por su inmensa amabilidad.*

*Dr. Miguel Castillo*

*Por tomarse su tiempo para explicarme las dudas que tenía y brindarme algunos consejos para mejor mi proyecto. Gracias.*

*M.C. Mellin.*

*Por permitirme trabajar en el laboratorio de Hongos Entomopatógenos, por sus consejos, su experiencia, pero en especial por sus palabras de aliento cuando le decía que no me salían algunos experimentos.*

*Lic. Vero y Dr. Facundo*

*Por el apoyo y sus consejos que me brindaron en el área de biología molecular.*

*Dra. Gis*

*Por todo lo bueno que me transmitió, y su forma tan peculiar de hacerlo.*

*Dra. Betty y Dr. José Manuel*

*Por permitirme trabajar en el laboratorio de Colección de Insectos y el aporte que le brindaron a este proyecto, estoy agradecida por su amabilidad y su buen trato.*

*Jesús, Christian, Kenia y Víctor. Gracias por su apoyo.*

*A mis tíos, vaya que son muchos, así que solo diré a la familia Cando Morales y sus derivados. Por su apoyo incondicional durante toda mi vida, por su amor, y por darme a los mejores primos. Ustedes me han enseñado el verdadero significado de la familia. Los quiero.*

*A Liz.*

*Amiga, gracias por tu apoyo a pesar de la distancia, por escucharme, darme ánimos y por los momentos divertidos que hemos compartido llenos de risas. Te quiero.*

*Lau.*

*Por emocionarte por todo lo bueno que me pasa, ser tan empática conmigo, darme ánimos durante mi proyecto, especialmente por siempre escucharme y brindarme el mejor consejo. Amiga, te quiero.*

*Candy*

*Por las pláticas profundas que puedo tener contigo, tus ánimos, sarcasmo, consejos, y sobre todo porque la vida me sabe a frutas. Te quiero.*

*A mi segunda familia que forme durante la licenciatura, Liz, Lau, Candy, Fany, Mario, Luis, Ahle y Pepe, porque durante todo este tiempo nos hemos brindado el mejor apoyo. Los quiero.*

*A Abi y Mary, porque me motiva y me emociona platicar con ustedes, encontrar a personas que les emocione hacer ciencia como a mí, es increíble.*

*A mis compañeros del laboratorio W-104, por sus observaciones realizadas a mis exposiciones durante los seminarios.*





# Índice

Resumen.....	1
1.    Introducción .....	3
1.2    Aguacate .....	4
1.3    Escarabajos ambrosiales .....	5
1.4    Manejo Integrado de Plagas (MIP) .....	6
1.4.1 <i>Resistencia de los insectos a los plaguicidas</i> .....	6
1.4.2 <i>Bioplaguicidas</i> .....	7
1.4.3 <i>Control biológico</i> .....	8
1.4.3.1 <i>Hongos entomopatógenos</i> .....	8
1.5    Microbioma .....	10
1.6    Metataxonómia .....	11
2.    Antecedentes.....	14
3.    Justificación .....	16
4.    Hipótesis .....	17
5.    Objetivos .....	18
5.2 <i>Objetivos específicos</i> .....	18
6.1 <i>Microorganismos y activación de cepas</i> .....	19
6.2 <i>Cultivo de cepas</i> .....	19
6.3 <i>Producción de conidios en estado sólido</i> .....	19
6.4 <i>Extracción de conidios</i> .....	20
6.5 <i>Control de calidad</i> .....	20
6.5.1 <i>Rendimiento</i> .....	20
6.5.2 <i>Germinación</i> .....	20
6.6 <i>Colonia de X. affinis</i> .....	21
6.7 <i>Colecta de los escarabajos de X. affinis en campo</i> .....	21
6.5 <i>Control de calidad de HE</i> .....	20
6.8 <i>Limpieza de la Torre de Potter</i> .....	23
6.9 <i>Bioensayos</i> .....	24

6.10	<i>Determinación de mortalidad</i> .....	25
6.11	<i>Determinación de Unidades Formadoras de Colonia</i> .....	26
6.12	<i>Extracción de ADN del microbioma cuticular</i> .....	26
6.13	<i>Tratamiento a la Taq polimerasa</i> .....	27
6.14	<i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i> .....	27
7.	Resultados .....	29
7.1	<i>Cultivo y Control de calidad de Hongos entomopatógenos</i> .....	29
7.2	<i>Limpieza de la Torre de Potter</i> .....	29
7.3	<i>Colecta en campo</i> .....	31
7.4	<i>Identificación morfológica de X. affinis</i> .....	32
7.5	<i>Bioensayos con escarabajos de laboratoio usando una cepa contaminada de (B. bassiana - l. javanica)</i> .....	32
7.6	<i>Bioensayos con B. bassiana pura, escarabajos de Laboratorio yescarabajos de Campo</i> .....	34
7.7	<i>Identificación de los escarabajos que presentaron micosis</i> .....	36
7.8	<i>Cuantificacion de ADN cuticular de X. affinis</i> .....	37
7.9	<i>Tratamiento de la Taq polimerasa</i> .....	38
7.10	<i>Amplificación de la región V3-V4 del gen del RNA 16S de microbiomacuticular de X. affinis</i> .....	40
8.	Discusión .....	41
9.	Conclusión .....	46
10	Perspectivas .....	47
11.	Bibliografía .....	48
12.	Anexos.....	54

## Índice de Figuras

Figura1. Productos agroalimentarios mexicanos de exportación. SADER-SIAP. Panorama Agroalimentario 2020 .....	3
Figura 2 Proceso de infección por Hongos Entomopatógenos, en insectos (Wang y Wang; 2017) .....	9
Figura 3 Regiones conservas del RNA 16S. Las regiones conservadas se muestran en color azul, las variables en color anaranjado y las hipervariables en color verde (Shahi et al; 2017).....	12
Figura 4 Árbol infectado por <i>X. affinis</i> .....	22
Figura 5. Escarabajos de <i>X. affinis</i> , en el exterior del tronco, después de 24 h. ....	23
Figura 6 Torre de Potter .....	24
Figura 7 Representación de los experimentos con tres repeticiones .....	25
Figura 8 Representación de la separación de los escarabajos <i>X. affinis</i> , después de los 10 días de bioensayo .....	27
Figura 9 Porcentaje de Germinación y rendimiento de <i>B. bassiana</i> , <i>M. acridum</i> , <i>I. javanica</i> .....	29
Figura 10 Cajas de Petri antes y después de la limpieza de la Torre de Potter.....	30
Figura 11 Colecta en campo. En la sección A se observa los árboles de aguacate marchitos, en la sección B y C se observa las virutas de aserrín y finalmente en la sección D los cortes realizados para la recolección de escarabajos.....	31
Figura 12 Identificación morfológica de <i>X. affinis</i> . Vista dorsal (imagen izquierda): A. crenulado bastante pequeño. B. Declive convexo. C. Denticulos. Vista del escarabajo completo (imagen derecha), (Hulcr et al; 2015).....	32
Figura 13 Cepa de <i>B. bassiana</i> contaminada con <i>I. javanica</i> .....	32
Figura 14 Porcentaje de mortalidad de <i>X. affinis</i> usando un consorcio de <i>B. bassiana</i> y <i>I. javanica</i> . Las letras muestran los grupos obtenidos mediante la prueba de Tukey.....	33
Figura 15 Porcentaje de mortalidad de <i>X. affinis</i> , a una concentración de $1.5 \times 10^7$ con/mL Grupos obtenidos mediante la prueba de Tukey.....	34
Figura 16 Porcentaje de mortalidad de <i>X. affinis</i> , a una concentración de $1 \times 10^8$ con/mL. Grupos obtenidos mediante la prueba de Tukey.....	35
Figura 17 Caracterización de los escarabajos micosados después del bioensayo.....	36
Figura 18 Gel de las muestras amplificadas. Carril 0: marcador; carril 1: control positivo; carriles 2 y 3: controles negativos.....	38
Figura 19 Gel de las muestras amplificadas. Carril 0: marcador; carril 1: control positivo; carriles 2 y 3: controles negativos.....	39
Figura 20 Gel de las muestras amplificadas por PCR, del ADN cuticular de <i>X. affinis</i> . Los carriles de 1-3 son los controles, seguidos de los controles de las muestras de escarabajos (carril 4-5), posteriormente están las muestras de escarabajos infectadas con el HE (carril 7-13).....	40

## Índice de Tablas

Tabla 1 Reactivos y corrida de ciclos utilizados en la PCR.....	28
Tabla 2 Cuantificación del ADN cuticular de <i>X. affinis</i> .....	37

# Resumen

Uno de los mayores problemas a los que se enfrenta el sector agrícola es mantener los cultivos libres de plagas. En busca de tener mayor rentabilidad y disminuir las pérdidas económicas que ocasionan estos organismos, los productores emplean técnicas que permitan disminuir estas poblaciones. La aplicación de plaguicidas químicos o biológicos ha generado buenos resultados, sin embargo, en algunos casos la sustentabilidad de los ecosistemas y la bioseguridad de los cultivos es afectada. Por ejemplo, los plaguicidas tienen efectos nocivos en la salud humana y al medio ambiente, tienen tiempos de vida media prolongados, por lo que pueden permanecer en el ambiente por años, además, los insectos plaga generan resistencia y aumenta la dificultad para controlarlos. Dentro del control biológico de plagas, es común el uso de Hongos entomopatógenos, principalmente los géneros *Metarhizium* y *Beauveria*, estos se caracterizan por infectar a insectos. Los conidios se adhieren a la cutícula de los insectos y los penetran, finalmente producen toxinas que les causan la muerte.

Por otra parte, la mayoría de los organismos eucariotas multicelulares poseen microbiomas, ya sea en el interior o exterior de ellos, estableciendo un tipo de mutualismo, esto quiere decir que se asocian para tener beneficios mutuos, que van desde la producción e intercambio de algún metabolito, hasta proveer protección contra cualquier agente nocivo que lo haga perder su homeostasis. En el campo del control de plagas, esto resulta importante porque el microbioma asociado a algunos insectos plaga puede estar implicado en la generación de resistencia a plaguicidas, pues por un lado pueden generar enzimas para metabolizar los insecticidas químicos y, por otra parte, pueden proteger al insecto de infecciones por entomopatógenos mediante la competencia por sitios de unión, la generación de agentes antimicrobianos o por medio de la estimulación del sistema inmune del insecto.

El papel del microbioma en la resistencia o susceptibilidad de insectos a hongos entomopatógenos no se ha estudiado a profundidad; considerando el papel tan importante de las asociaciones mutualistas entre eucariontes multicelulares y su microbioma, resulta relevante identificar qué tipo de microorganismos están asociados con insectos plaga, para lo cual, en este trabajo se planteó proponer un protocolo que permita la extracción de material genético del microbioma asociado a la cutícula del insecto *Xyleborus affinis* Eichhoff (Coleoptera: Curculionidae), para analizar la influencia de la composición de este microbioma sobre la resistencia o susceptibilidad del insecto, ya sea de campo o de laboratorio, a la infección por hongos entomopatógenos. Para poder llevar a cabo el proyecto, se realizaron bioensayos, infectando escarabajos hembras de *X. affinis* con *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. (Hypocreales: Clavicipitaceae), se encontró que los escarabajos de campo a una concentración de  $1 \times 10^8$  con/mL presentaban un porcentaje de mortalidad de 64.18 %, este porcentaje de mortalidad era menor que los registrados en los escarabajos de laboratorio, el cual fue de 90%, sin embargo, al tratar a los escarabajos a una concentración de  $1.5 \times 10^7$  con/mL, no hubo una diferencia significativa entre el porcentaje de mortalidad de los escarabajos de campo y de laboratorio. Por otro lado, para poder analizar si el microbioma cuticular presente en los escarabajos

tenía una influencia en la susceptibilidad ante la infección por *B. bassiana*, los escarabajos se separaron en tres grupos, “control”, “escarabajos vivos” y “escarabajos muertos”. Posteriormente se les realizó lavados a su cutícula con Buffer Tampón-A, los lavados obtenidos se utilizaron como muestras para la extracción de ADN y finalmente se amplificó por PCR la región V3-V4 del RNA 16S y las muestras obtenidas de la amplificación se corrieron en un gel de agarosa. Se obtuvieron bandas a 500 pb, las cuales corresponden a bacterias presentes de la superficie cuticular de *X. affinis*, pese a que las bandas amplificadas correspondientes a la presencia de bacterias, aún se desconoce el género y la función que tienen en el hospedero, sin embargo, estos resultados pueden ser el punto de partida para conocer la influencia que tiene el microbioma ante la defensa de su hospedero.

# 1. Introducción

## 1.1 La agricultura

La agricultura es una de las principales actividades realizadas por el ser humano, aporta el 4.39 % del PIB y produce un gran número de productos alimenticios, algunos de los cuales se exportan (SAGARPA, 2006). México se encuentra dentro de los principales países de exportación de productos agroalimentarios. En la Figura 1, se observan los principales productos exportados en el 2019 y los millones de dólares obtenidos, siendo el aguacate el de mayor exportación (SADER-SIAP, 2020).

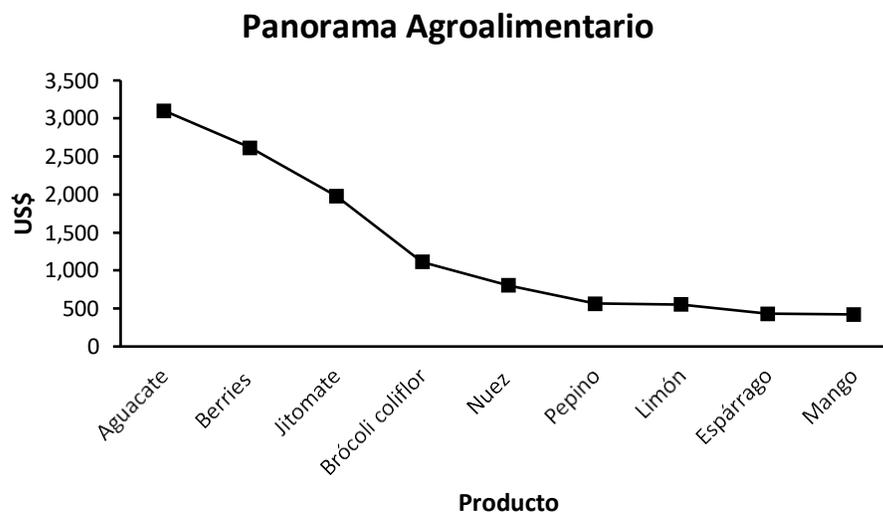


Figura1. Productos agroalimentarios mexicanos de exportación. SADER-SIAP. Panorama Agroalimentario 2020

La producción agrícola es afectada por numerosos factores ambientales derivados del cambio climático (Morton et al; 2007); además, la alteración a los ecosistemas, causada por los humanos al buscar satisfacer la necesidad de un suelo apto para la producción, a lo largo del tiempo, ha provocado un impacto negativo, pues ha favorecido las condiciones idóneas para la creación de hábitats que permiten el crecimiento desmedido de ciertas poblaciones de insectos y con ello la aparición de plagas agrícolas (FAO, 2014).

Una plaga agrícola se define, de acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO por sus siglas en Ingles), como “cualquier especie, raza o biotipo vegetal o animal o agente patógeno dañino para plantas o productos vegetales.” La misma FAO

reportó que en el año 2019 se consideraron pérdidas de hasta un 40% en la producción agrícola mundial causadas por plagas. Tan sólo en México, los productores del sector agrícola reportaron, en la Encuesta Nacional Agrícola (ENA) realizada en el 2017, que el 44.2% de sus pérdidas fueron causadas por factores biológicos, siendo los más recurrentes la presencia de insectos plaga (40.3%) y enfermedades de los cultivos ( 21.6%) (INEGI, 2017).

La presencia de plagas en cultivos de importancia económica, como es el aguacate, disminuye la calidad del producto y merma la producción. Por lo cual tener un control fitosanitario es de gran importancia en este tipo de fruto.

## 1.2 Aguacate

El aguacate (*Persea americana* Mill.), pertenece a la familia *Lauraceae*. Éste se caracteriza por sus hojas perenne, llega a alcanzar alturas de hasta 20 metros, es de tronco grueso y pueden tener una floración de hasta un millón de flores, de las cuales, sólo el 0.1% alcanzan a ser frutos; éstos son de color verde o verde oscuro, pulpa amarilla, cáscara rugosa y tienen un hueso en el centro (SADER-SIAP, 2020). El aguacate tiene un gran impacto económico en el país, México es el primer productor de este fruto ya que cuenta con un gran número de zonas productoras de aguacate, tan solo en el 2019 se registró una producción de 2,300,889 toneladas, siendo Michoacán el estado con mayor aporte con un 79.1% (SADER-SIAP, 2020).

Los cultivos de aguacate son atacados por diversas plagas y enfermedades. Los escarabajos de la corteza como: *Trioza anceps* Tuthill, 1944,(Hemiptera: Psylloidea) *Copturus aguacatae* Kissinger, 1957,( Coleoptera: Curculionoidea), *Conotrachelus perseae* Barber, 1919,( Coleoptera: Curculionoidea), son plagas que se alimentan del floema del árbol, otro tipo de plagas, son los escarabajos ambrosiales, como: *Xyleborus* sp. y *Euwallacea* sp (Coleoptera: Curculionoidea); este tipo de plagas se caracterizan porque están asociadas con hongos simbioses, los cuales provocan la marchitez del árbol (Pérez et al; 2015). Por otro lado, las enfermedades más características causadas por bacterias, provocan la defoliación del árbol del aguacate: *Xylella fastidiosa* es una de las bacterias que pueden causar esta enfermedad. Además, los hongos *Botryosphaeria* sp., *Dothiorella* sp, provocan cáncer en las ramas y en ocasiones llegan a marchitar el árbol (Pérez et al; 2015). Una de las enfermedades que tiene un mayor impacto en los árboles de aguacate, es la marchitez del laurel, la cual es causada por el hongo *Raffaelea lauricola*, (Pérez et al; 2015), otro hongo es *Fusarium* sp., el cual provoca la enfermedad conocida como la muerte regresiva del aguacate, (Lucas et al; 2021). Estos hongos son simbioses de los escarabajos ambrosiales, los insectos transportan las esporas de los hongos en sus mandíbulas en unos sacos llamados micangios y las depositan en las galerías que construyen en los troncos (Mayfield et al., 2008). La invasión de cualquiera de estos hongos en árboles de aguacate tiene un impacto negativo, pues no sólo implica pérdidas económicas, sino la pérdida completa del árbol, por lo tanto, es importante mantener un monitoreo constante para evitar la propagación de los escarabajos ambrosiales.

## 1.3 Escarabajos ambrosiales

Los escarabajos ambrosiales, (*Curculionidae: Scolytinae y Platypodinae*), son insectos barrenadores que atacan árboles de la familia *Lauraceae* (Rabaglia et al; 2006), miden aproximadamente de 1-3 mm de longitud, su color varía de ámbar a negro (dependiendo de la especie), se reproducen entre hermanos (endogamia), y construyen galerías en la corteza de los árboles, donde las hembras ovipocitan y los machos son los encargados de cuidar a la descendencia. Los géneros *Xyleborus* sp., *Xylosandrus* sp. y *Euwallacea* sp. invaden árboles que han sufrido algún tipo de estrés, la atracción de los escarabajos hacia los árboles se da por la presencia de atrayentes volátiles como el alcohol etílico, ocasionado por el estado de estrés del árbol, (Trivelli Dell'Orto et al; 1985).

En México, se tiene el registro de 18 especies de *Xyleborus* (Pérez et al; 2015) de las cuales *Xyleborus affinis*, es una de las especie menos estudiada y es considerada una plaga de impacto económico. Este habita aproximadamente en 100 especies de árboles, entre ellos el del aguacate ( Castrejón et al; 2017); este escarabajo al encontrarse en simbiosis con hongos de los géneros *Raffaelea laurica* y *Fusarium* , ponen en riesgo a los árboles, ya que son estos hongos los causantes de la marchitez del laurel, (Saucedo et al., 2018) , al bloquear los conductos de agua y nutrientes de los árboles, (Iii et al., 2008). El hongo *Raffaelea* ubicado en el orden Ophiostomatales, y *Fusarium* ubicado en el orden Hypocreales se han identificado dentro de los micangios de *X. affinis*,(Saucedo et al; 2018).

Las hembras de *X. affinis* son las responsables de fundar y mantener las nuevas colonias, a diferencia de los machos, pueden volar, lo cual les permite buscar nuevos hospedadores. De la misma forma, las hembras son las encargadas de transferir parte del microbioma benéfico que poseen a la descendencia (Biedermann et al; 2020).

Se desconoce como comenzó la asociación entre los hongos y los escarabajos ambrosiales, sin embargo, existen diferentes hipótesis, por ejemplo, Carrillo et al; (2014), proponen que la adquisición de algunos hongos simbioses de los escarabajos ambrosiales, podía realizarse a partir de una transferencia lateral, esto quiere decir, que se adquieren por medio la alimentación durante el crecimiento de los escarabajos. La simbiosis que realizan este tipo de escarabajos, no sólo está relacionada con hongos, sino con la presencia de otros tipos de microorganismos que les permiten tener un cultivo exitoso de hongos; la presencia de esos otros microorganismos simbioses podría ser importante para la fijación de nitrógeno, para degradar la biomasa vegetal y para inhibir el crecimiento de patógenos a través de la acción de antibióticos (Ibarra et al; 2020). Por ejemplo, Cardoca et al; (2006), reportaron que las secreciones orales de este tipo de escarabajos contienen bacterias que producen cicloheximida, compuesto que inhibe selectivamente el crecimiento de patógenos fúngicos sin afectar a sus hongos simbioses,(Cardoza et al; 2006). Dada la importancia de los microorganismos asociados a los escarabajos ambrosiales para su sobrevivencia, conocer y entender la función del microbioma presente en estos escarabajos, ayudaría a diseñar la implementación de un manejo integrado de plagas (MIP).

## 1.4 Manejo Integrado de Plagas (MIP)

El Manejo Integrado de Plagas (MIP), se define como el conjunto de herramientas que manipuladas de manera adecuada logran controlar las poblaciones plagas, ya sea insectos, maleza o enfermedades, con el fin de reducir pérdidas económicas, (Vivas et al; 2017). Contar entonces con una buena estrategia de MIP, permitiría disminuir el impacto que tienen las distintas plagas sobre el sector agrícola, (FAO, 2014). Actualmente el uso excesivo de plaguicidas ha provocado efectos nocivos en la salud de los agricultores, en sus siembras e incluso en el medio ambiente; el mal manejo de éstos ha generado resistencia por algunas plagas y en ciertos casos el surgimiento de nuevas plagas, (FAO, 2014); el MIP emplea diferentes métodos como: control químico, control biológico, técnicas de monitoreo, para cultivar y proteger los cultivos, minimizando el uso de pesticidas, teniendo como objetivo un enfoque más ecológico e implementando el monitoreo constante de los campos cultivados e impulsando el uso de herramientas naturales de control biológico, (FAO, 2014).

### 1.4.1 Resistencia de los insectos a los plaguicidas

Los plaguicidas son sustancias o mezclas de sustancias resultado de síntesis química, (Karam et al; 2004) que permiten ayudar en control de plagas, sin embargo, el uso desmedido de estos productos ha causado consecuencias severas, tanto en la salud pública como en el medio ambiente. Asimismo, la efectividad de estos productos sobre las plagas ha disminuido en los últimos años, consecuencia de su uso constante, y de la aparición de organismos resistentes (Karam et al; 2004). La resistencia adquirida por estos organismos, deriva de la evolución y adaptación que tienen las especies, haciéndolas menos susceptibles a la aplicación de los plaguicidas y heredando estos rasgos a su descendencia (Vargas et al; 2008). El proceso de generación de resistencia a plaguicidas, por lo general inicia con la aparición de alguna mutación que proporciona cierta resistencia al plaguicida, posteriormente la selección de los organismos con la mutación en presencia del plaguicida, donde algunos individuos sobreviven, seguida de la adaptación y finalmente la reproducción de éstos, que permitirá transmitir el gen de la resistencia a las siguientes generaciones (Vargas et al; 2008). La mutación que confiere la resistencia al plaguicida puede manifestarse en cualquier cambio que impida que la sustancia tóxica llegue al sitio objetivo; estos cambios pueden ser cambios metabólicos, por ejemplo algunas enzimas son capaces de degradar los plaguicidas a partir de cambios en el sitio blanco que disminuyen la afinidad del plaguicida o a la penetración de los plaguicidas al organismo, o simplemente una pérdida de susceptibilidad debido al contacto constante de los productos (Van Leeuwen et al; 2020). Una de las primeras plagas en manifestar la resistencia a plaguicidas fue el mosquito de la fiebre amarilla, *Aedes aegypti*, (Diptera: Culicidae), el cual es capaz de producir enzimas fosfatasa que le ayudan a degradar compuestos organofosforados, (Bisset et al; 2002); se ha reportado también que la producción de quinasa sintasa 1(chs1), confiere resistencia a las plagas *Frankliniella occidentalis* (Trips) y *Tetranychus urticae* (ácaros) contra benzoilurea, (Van Leeuwen et al., 2020).

El uso desmedido de plaguicidas, no sólo ha tenido impacto al conferir resistencia a ciertas plagas, sino que su aplicación excesiva ha repercutido en la salud humana, daños en el medio ambiente y los suelos agrícolas, (del Puerto et al; 2014). Precisamente para disminuir estos efectos adversos y al mismo tiempo controlar las poblaciones de insectos presentes en los cultivos, se han desarrollado estrategias que permitan disminuir el uso de plaguicidas a partir de la implementación de métodos como el uso bioplaguicidas o bien la rotación de cultivos (Keifer et al; 1967).

## 1.4.2 Bioplaguicidas

Los bioplaguicidas son originados a partir de productos naturales como plantas, animales, algunos minerales e incluso microorganismos, que afectan sólo al organismo patógeno, sin afectar el entorno natural que rodea al cultivo, (EPA, 2010), por lo que generalmente no representan un riesgo para el medio ambiente. Los bioplaguicidas se dividen en tres grupos (Seiber et al; 2014):

- Bioplaguicidas bioquímicos: son sustancias naturales o derivados de plantas que tienen como principios activos, atrayentes naturales, hormonas, sustancias que inducen a que la planta active mecanismos de resistencia a plagas, a partir de la producción de metabolitos secundarios. Los fenoles son usados en la producción de bioplaguicidas botánicos ya que estos inhiben el crecimiento fúngico. Los terpenos y flavonoides a partir de la formación de aceites esenciales repelan cierto tipo de organismos. Este tipo de plaguicidas se degradan rápidamente y no son tóxicos al medio ambiente, (Alfonso et al; 2002).
- Bioplaguicidas microbianos: utilizan microorganismos como hongos, bacterias y virus para disminuir el crecimiento de las plagas, cada microorganismo actúa de diferente forma; por ejemplo, los conidios de los hongos, se adhieren a la cutícula de los escarabajos, posteriormente los penetran y finalmente liberan toxinas que les provoca la muerte, las bacterias usualmente son ingeridas por los organismos, estas se multiplican en el aparato digestivo produciendo toxinas que dañan al hospedero y lo vuelven más propenso a septicemias. Los virus también son utilizados como bioplaguicidas y están conformados por los baculovirus, los cuales atacan los tejidos de hospederos, (Federici et al; 1997).
- Protectores incorporados a las plantas (PIP). Los PIP son sustancias que las plantas son capaces de producir como defensa, debido a que éstas han sido modificadas genéticamente, un ejemplo de ellos es la producción de feromonas que produce la pera, ésta repele algunos insectos entre ellos la polilla de manzana, (Seiber et al; 2014).

### 1.4.3 Control biológico

El “control biológico”, es una técnica que tiene como objetivo suprimir el crecimiento de una población de insecto plaga (al cual se le denomina hospedero) a partir del uso de enemigos naturales, por ejemplo, bacterias, hongos, virus y parásitos provocándoles alguna enfermedad, asimismo, también se implementa el uso de algunos insectos depredadores, (Josef et al; 2007). Para tener un buen control biológico, los enemigos naturales deben cumplir con las siguientes características: tener una alta tasa de reproducción lo cual les permitirá duplicar su población sin convertirse en plaga, especificidad con el hospedero para no afectar a microorganismos beneficiosos para el cultivo, resistencia a diferentes condiciones ambientales, (Rodríguez del Bosque y Arredondo Bernal, 2007; Eilenberg et al; 2001).

La aplicación del control biológico se realiza por cuatro métodos: control por conservación, que es la modificación del ambiente cultivable para que beneficie al enemigo natural; control clásico, la introducción intencionada del enemigo natural al hábitat; control aumentativo, la introducción del enemigo natural y modificación del hábitat para que el enemigo natural se conserve; y control por inoculación, es la aplicación del enemigo natural al hábitat solo por cortos periodos de tiempo, una vez que la plaga disminuye, el agente de control biológico desaparece (Eilenberg et al; 2001). Una de las ventajas del uso del control biológico de plagas es que ofrece una alternativa ecológica, al no generar efectos nocivos a la salud humana ni toxicidad a los suelos, (Eilenberg et al; 2001).

#### 1.4.3.1 Hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos (HE) son parte de los enemigos naturales más usados en el control biológico de diversas plagas de artrópodos (arañas, insectos, garrapata y ácaros). Los conidios son utilizados para provocar la infección en los insectos y su éxito depende, de que tienen una mayor resistencia a factores abióticos como los rayos UV, humedad relativa, temperatura (Chandler et al; 2017). Los géneros con mayor importancia, debido a que su producción industrial es más rentable, son los hongos entomopatógenos que pertenecen a la clase de *Hyphomycetes* (orden *Hypocreales*) y *Entomophthorales* (Sinha et al; 2016). Los *Hypocreales* se caracterizan por ser patógenos oportunistas y provocan la muerte del hospedero a partir de la adhesión de los conidios en la cutícula, penetración del insecto y posteriormente por la producción de toxinas con actividad insecticida, que es lo que finalmente le produce la muerte. Como ejemplos de estos hongos entomopatógenos se pueden mencionar *Beauveria* spp, *Metarhizium* spp., y *Lecanicillium* spp., (Sinha et al; 2016) Los hongos entomopatógenos del orden de los *Entomophthorales*, actúan sobre su hospedero en forma parasitaria: únicamente colonizan los tejidos del insecto sin la producción de toxinas; dentro de estos se encuentran los géneros *Entomophaga* y *Zoopthora*, (Chandler et al; 2017). Los hongos *Hypocreales* son los que más se utilizan comercialmente en el control biológico.

Como se observa en la Figura 2, (Wang y Wang, 2017), el proceso de infección por HE, da inicio con la adhesión de los conidios a la cutícula o zonas blandas de los escarabajos (1), proceso en el cual están involucradas proteínas adhesivas, posteriormente los conidios empiezan a germinar en la

cutícula del escarabajo y rompen la primera barrera cuticular mediante la aplicación de presión osmótica y enzimas como las quitinasas (2), a continuación, los hongos ingresan dentro del escarabajo, forman blastosporas y empiezan a absorber sus nutrientes (3), finalmente matan al insecto, a partir de la producción de toxinas las cuales tienen como objetivo inhibir la respuesta inmune de su hospedero (4) (Qu y Wang, 2018).

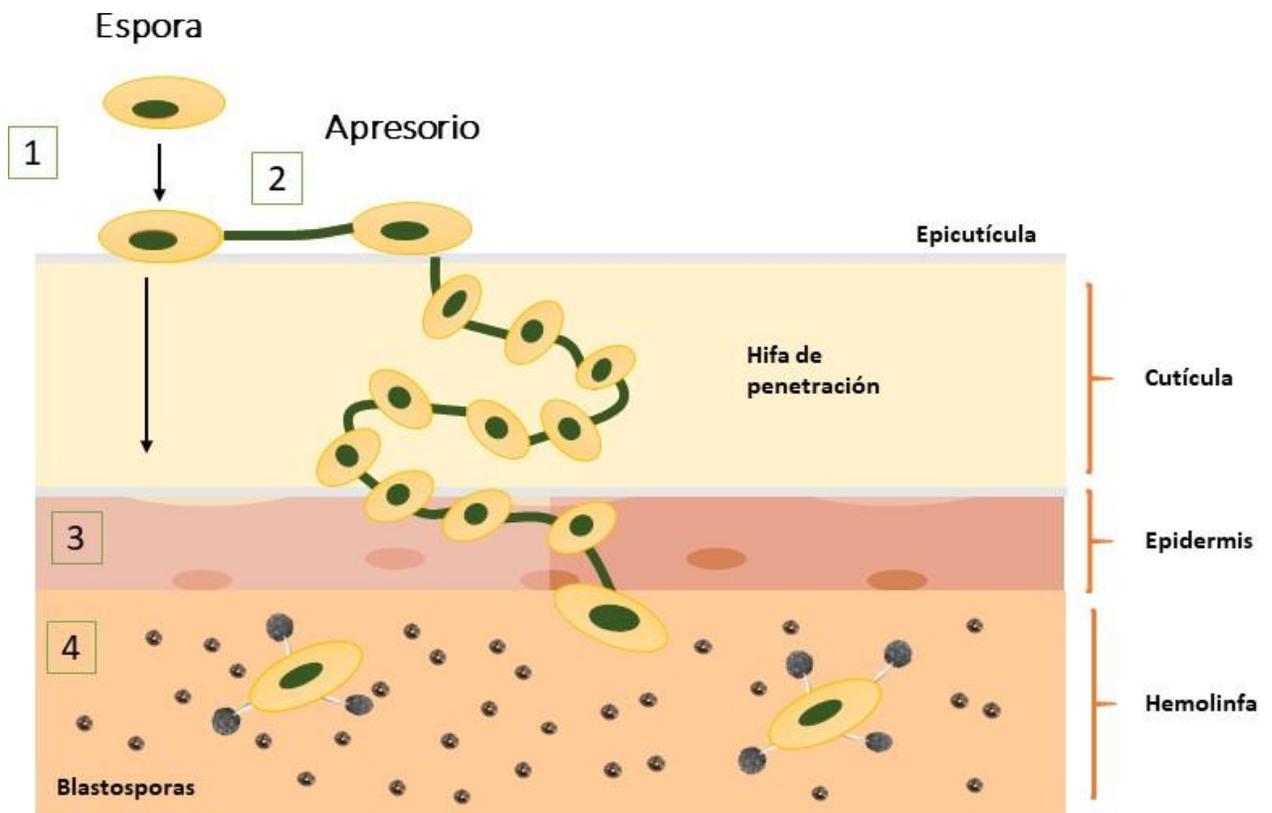


Figura 2 Proceso de infección por Hongos Entomopatógenos, en insectos (Wang y Wang, 2017).

Durante la patogénesis los HE interactúan con distintos microorganismos, principalmente los presentes en la cutícula y/o en el intestino del insecto, algunos de estos microorganismos pueden modificar la respuesta inmune del insecto, causar cambios evolutivos, adaptativos e incluso cambios en el comportamiento del hospedero, que resultan en el aumento de su resistencia a la infección por entomopatógenos, (Boucias et al; 2018). Por ejemplo, la primera barrera a la que se enfrentan algunos HE durante el proceso de infección es la cutícula (Figura 2), una barrera difícil de penetrar, con muy limitada disponibilidad de nutrientes para el HE y baja humedad; además, sobre ella se han encontrado algunos compuestos antimicrobianos y antisépticos, muchos de ellos producidos por microorganismos simbiotes que forman parte del microbioma cuticular del insecto y que actúan como defensa e inhiben el crecimiento de patógenos, (Ortiz et al; 2013). Toledo et al; (2011)

reportaron que bacterias aisladas de la cutícula del salta hojas del maíz, eran capaces de inhibir el crecimiento de *B. bassiana*, ya que éstas producen compuestos antifúngicos y antibióticos.

## 1.5 Microbioma

El microbioma es un conjunto de microorganismos que comparten un mismo hábitat bien definido con propiedades fisicoquímicas distintivas (Lee y Ryu, 2021). Los microbiomas, están formados por bacterias, hongos, virus y arqueas, que están ecológicamente asociados desempeñando diversas funciones en el hábitat en el que se encuentran; el microbioma asociado a organismos superiores (dentro o sobre ellos) desempeña un papel fundamental en la salud y enfermedad de éstos, pues diversos integrantes del microbioma desempeñan funciones asociadas con la inmunidad, la reproducción, nutrición y de especiación; por ejemplo, en el caso de los humanos, la pérdida de homeostasis en el microbioma intestinal puede tener como consecuencia la aparición de trastornos metabólicos o sistémicos, como la esclerosis múltiple, (Shahi et al; 2017).

En el caso de los insectos, se ha demostrado que el microbioma asociado a estos influye en diversos aspectos de su vida. Las interacciones entre insectos y su microflora intestinal o cuticular son de naturaleza mutualista, esto quiere decir que ambos organismos se benefician de dicha asociación, (Engel y Moran, 2013), lo que les ha permitido sobrevivir al ambiente que los rodea. Los simbioses asociados con los insectos se les denomina, simbioses primarios u obligados y simbioses secundarios o accesorio, la función de los simbioses primarios es suministrar de nutrientes o vitaminas a los insectos, la asociación entre los simbioses primarios y los escarabajos está muy arraigada, tanto que la ausencia de alguno de sus simbioses podría matar al escarabajo, (Michalik et al; 2014), en cuanto a los simbioses secundario, sus funciones no se ha estudiado completamente, sin embargo, Michalik et al; (2014), reportaron que podrían estar relacionados con la capacidad reproductiva de algunos insectos.

Por ejemplo, se ha reportado que insectos como las termitas, moscas, avispa, hormigas y escarabajos, hospedan microorganismos simbioses, los cuales son adquiridos en las diferentes etapas de crecimiento del insecto, empezando desde el huevecillo (Boucias; et al; 2018). Los *Coptotermes formosanus* son un tipo de termitas que implantan sus heces en sus nidos, las cuales son ricas en actinobacterias y producen compuestos antimicrobianos, que las protegen de la infección por *Metarhizium anisopliae* desde su fase embrionaria, (Chouvenc et al; 2013). La composición del microbioma cambia según la etapa de desarrollo del insecto, pues cuando los insectos dejan su estado larvario empiezan a relacionarse y alimentarse de diferentes ambientes, lo que les permite estar en contacto con otros microorganismos que alteran la composición de su microbioma; por ejemplo, los *heterópteros*, insectos que comúnmente se alimentan del floema de las plantas, adquieren la bacteria Gram negativa *Burkholderia* a partir del floema de las plantas; la bacteria se adhiere a su intestino y contribuye a la producción de feromonas del insecto (Dillon et al; 2005). En algunos casos, los compuestos generados por los bacterias asociadas al microbioma de diferentes insectos les han permitido ser resistentes a algunos tipos de infecciones que podrían

amenazar su vida: por ejemplo, la presencia de la bacteria Gram positiva *Bacillus pumilus* en el microbioma de las chicharritas (una plaga que causa grandes daños a diferentes cultivos frutales y es vector del virus mosaico de maíz) se ha asociado con una mayor resistencia del insecto a HE como *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, y *Lecanicillium lecanii*; probablemente debido a que la bacteria produce compuestos antifúngicos (Sivakumar et al; 2017).

La diversidad de microorganismos presentes en el microbioma de los insectos plaga puede representar un problema para su control, ya que la presencia de algunos microorganismos puede disminuir la efectividad de los hongos entomopatógenos o cualquier otro tipo de control biológico o químico. La mayoría de los microorganismos presentes como simbioses de insectos no han sido estudiados, ya que la mayoría de ellos son no cultivables, por lo cual es importante caracterizar estas asociaciones utilizando técnicas de secuenciación masiva que permitan conocer qué microbioma está presente y su relación con el hospedero, este conocimiento podría servir para implementar mejores estrategias de manejo integrado de plagas o bien diseñar nuevas estrategias que, tal vez, que no estén diseñadas para atacar a la plaga en sí, sino a alterar su microbioma.

## 1.6 Metataxonómia

Una manera de identificar a los microorganismos ya sean bacterias, hongos, protozoos, etc., presente en cualquier organismo eucarionte, es a partir del uso de herramientas metataxonómicas, ya que éstas, a partir de marcadores moleculares, permiten conocer sus orígenes taxonómicos, (Simon et al; 2011).

La metataxonomía es una herramienta utilizada para caracterizar todo el microbioma de un nicho ecológico, para así poder crear un árbol metataxonómico, que muestra las relaciones entre todas las secuencias obtenidas. Las clasificaciones taxonómicas se pueden agrupar ya sea por la homología de los fragmentos de ADN o por composición en el contenido de Guanina y Citocina, (Simon et al; 2011). El gen 16S rRNA, (Ácido Ribonucleico Ribosómico), cuyo producto génico forma parte de la subunidad pequeña de los ribosomas, es un marcador ideal para estudiar la taxonomía de organismos procariontes presentes en un microbioma, pues está conservado universalmente en todas las bacterias, no está sujeto a la transferencia local de genes y posee nueve regiones hipervariables (Figura 3), libres de restricciones evolutivas, las cuales varían en tamaño en el RNA 16S completo. Son estas regiones hipervariables las que permiten hacer estudios filogenéticos asignando los grupos taxonómicos en procariontes (Shahi et al; 2017).

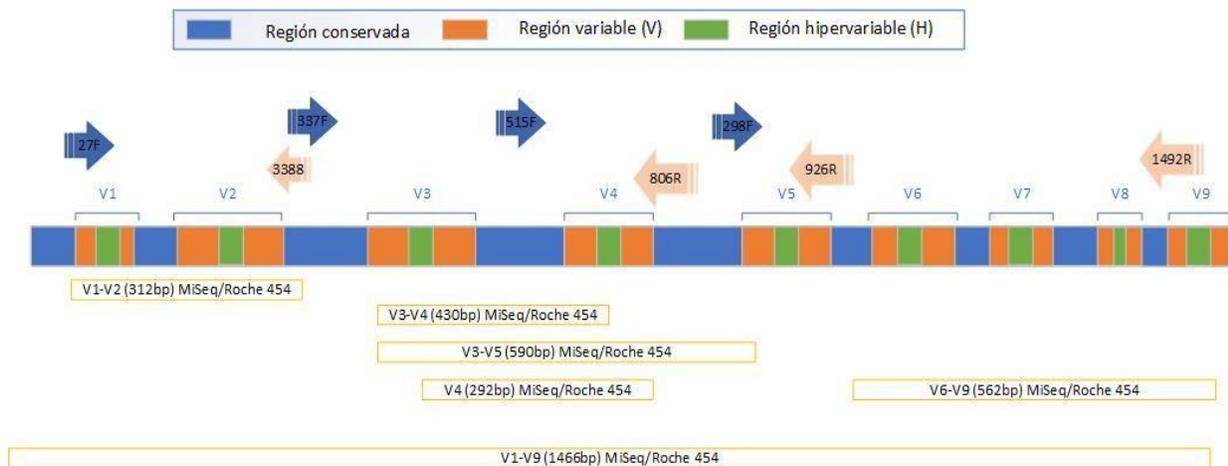


Figura 3 Regiones conservas del RNA 16S. Las regiones conservadas se muestran en color azul, las variables en color anaranjado y las hipervariables en color verde (Shahi et al., 2017).

Obtener las clasificaciones taxonómicas a partir de secuenciación masiva consta de cuatro pasos: 1) Extracción de Ácido Desoxirribonucleico (ADN), 2) Preparación de bibliotecas genómicas, 3) Secuenciación y 4) Análisis bioinformático, (Hernández et al; 2020). Uno de los pasos más importantes para las clasificaciones taxonómicas es la cantidad y calidad de ADN extraído y la cantidad extraíble depende del protocolo de extracción, el tipo de insectos, la parte del cuerpo del insecto donde se pretenda extraer el ADN y la diversidad de microorganismos presentes en el hospedero, (Birer et al; 2017), por ejemplo, Birer et al; (2017), demostraron que pequeñas variaciones en el método de extracción de ADN resulta en cambios sustanciales en el número de las "Unidades Taxonómicas Operacionales" (OTU) identificadas y su abundancia relativa en la misma muestra. Cuando se trabaja con ADN cuticular de insectos, la pureza y la cantidad de ADN que se extrae está por debajo de los umbrales de detención mínimos, (Birer et al; 2017), sin embargo, pese a la cantidad de ADN extraído, las muestras se pueden amplificar con éxito, (Rubin et al; 2014).

Posterior a la extracción de ADN, se amplifica la región 16S del rRNA mediante la técnica de PCR. Los cebadores que se utilizan para amplificar, están dentro de las regiones conservadas, las cuales comprenden más de una región hipervariable, V1-V2, V3-V5 y V6-V9, cada región se inclina más por algunas clasificaciones taxonómicas como lo es la región V1-V2 la cual detecta mayor sesgo por *Clostridium*, por lo cual se recomienda usar las regiones, V3-V4 y V3-V5 ya que sus clasificaciones no tiene inclinación por algún tipo de bacteria, (Shahi et al; 2017).

La secuenciación se realiza a partir de la amplificación del RNA 16S, una de las técnicas más utilizadas es la tecnología Illumina para poblaciones microbianas, que permite la obtención de amplicones pequeños, los cuales cubren del 97 al 99 % del genoma, asimismo, esta tecnología permite secuenciar miles a millones de fragmentos de ADN diferentes al mismo tiempo, el análisis del RNA 16S, por este método ha permitido mejorar y conocer los muestreo de diferentes comunidades bacterianas

(Hernández et al; 2020). El archivo FASTA que se obtiene de la secuenciación, es usada para realizar alineamientos múltiples de secuencias, seguidas de la identificación de las OTUs y la estimación de la población bacteriana presente. La similitud entre un par de secuencias se calcula como el porcentaje de sitios idénticos presentes; estas secuencias comparan las bases con bases de referencia ya registradas para identificar su origen taxonómico. Este tipo de análisis se lleva a cabo a partir de algoritmos bioinformáticos que permiten realizar el control de calidad y el análisis detallado de las secuencias, (Breitwieser et al; 2018). La identificación de los OTU se realiza en sistemas computacionales como Mothur y QIIME, (Batista et al; 2002). El sistema bioinformático QIIME sirve para analizar los microbiomas a partir de datos de secuenciación de ADN, este programa permite la construcción de árboles filogenéticos, mapas de calor, identificación de la diversidad alfa y beta, las cuales son fáciles de interpretar si se carece de conocimiento bioinformático, (Hernández et al; 2020).

## 2. Antecedentes

El uso excesivo de plaguicidas para el control de plagas ha generado, no sólo deterioros ambientales y problemas de salud, sino que los suelos donde son aplicados estos productos sufran afectaciones, ya que pierden su fertilidad o bien, el microbioma presente en el suelo se adapta al constante uso de plaguicidas, (Álvarez et al; 2015). Se ha estudiado a las bacterias *Pseudomonas*, *Flavobacterium* y *Burholderia*, debido a que hidrolizan el fenitrión (insecticida organofosforado), para su posterior metabolización utilizándolo como fuente de carbono, asimismo, se ha encontrado la presencia de *Burholderia* como simbiote en la chinche del frijol, esta plaga afecta a cultivos de leguminosas y se puede ver beneficiada ya que al tener a la bacteria *Burholderia*, le podría conferir resistencia a la aplicación de plaguicidas, haciendo más complicado su control, (Kikuchi et al; 2012). Por otro lado, el uso de HE como control biológico se ha implementado como una alternativa más ecológica, sin embargo, la micosis del hospedero se ha visto interferida debido a que éste, activa respuestas inmunes para inhibir la infección o bien los microorganismos adheridos a la cutícula del hospedero al verse amenazados, activan mecanismos de defensa para protegerlo (Ortiz et al; 2013).

El papel que juega el microbioma es muy importante para la vida de muchos organismos, incluyéndonos, ya que la presencia o ausencia de éste puede alterar nuestra homeostasis, sin embargo, dentro del campo agrícola, la presencia de plagas resistentes a infecciones por HE, no tiene un efecto positivo, sino al contrario, provoca pérdidas económicas, como es el caso de la plaga de *X. affinis*.

Cada vez se reportan más casos de insectos resistentes a distintos plaguicidas químicos o biológicos y en algunos casos se ha demostrado el papel de los microorganismos asociados al insecto en este fenómeno. Tal es el caso de la mosca tse-tsé, este insecto posee una bacteria simbiótica Gram negativa en su intestino llamada *Wigglesworthia*, la cual influye en la fertilidad, inmunidad y nutrición, (Pais et al; 2008). Wang et al; (2017) demostraron que la ausencia de *Wigglesworthia* como simbiote de la mosca la hacía más vulnerable a las infecciones por HE. Algunos simbioses de insectos plaga al verse amenazados generan algún tipo de compuesto como sistema de defensa; porejemplo, *Tribolium castaneum* es capaz de inhibir a *B. bassiana*, a partir de la producción de benzoquinonas (Boucias et al; 2018). Por otro lado, Sivakumar et al; (2017) caracterizaron las bacterias intestinales asociadas con *A. biguttula biguttula* y estudiaron especialmente a la bacteria *B. pumilus* en la nutrición y la defensa contra los hongos entomopatógenos. Esta bacteria está asociada con la inhibición del crecimiento de los hongos entomopatógenos.

Asimismo, es importante mencionar que este tipo de resistencias no sólo se da a la infección de HE, sino, también se ha demostrado que en algunos experimentos los insecticidas se degradan con mayor facilidad, por ejemplo, Ramya et al; (2016) estudiaron la degradación de los insecticidas por la polilla de la espalda del diamante (DBM); e identificaron en el microbioma intestinal *Pseudomonas* sp., *P. aeruginosa* y *Bacillus* sp. El microbioma cultivable lo colocaron con diferentes insecticidas teniendo como resultado que las carboxilesterasas producidas por algunas bacterias degradan completamente el malatión y los insecticidas con compuestos alifáticos, aromáticos y heterocíclicos.

Dada la evidencia que existe de la correlación entre el microbioma de los insectos y su susceptibilidad o resistencia a diferentes estrategias de control de plagas, incluyendo las infecciones por hongos entomopatógenos, en este trabajo buscamos proponer un protocolo para la extracción del ADN cuticular de *Xyleborus affinis* e investigar si existe composición de microbioma bacteriano.

### 3. Justificación

La producción de alimentos es indispensable para nuestra supervivencia, y la demanda de consumo alimentario cada vez es mayor; sin embargo, los rendimientos agrícolas se ven afectados por diversos factores como son la pérdida de cultivos por sequías, enfermedades de los cultivos o bien por infestación de plagas.

Las pérdidas de cultivos por plaga a nivel mundial son de hasta un 40 % (FAO, 2019). Los plaguicidas son el método de control más utilizado, sin embargo, estas sustancias químicas a pesar de su rápida acción tienen efectos negativos que incluyen la infertilidad de los suelos, daños colaterales al medio ambiente, a la salud humana y animal, y el desarrollo de resistencia a los plaguicidas. Para limitar el uso de insecticidas químicos, se ha propuesto el uso de agentes de control biológico como parte de estrategias para el manejo integral de plagas. La efectividad de los agentes de control biológico en campo depende de una gran variedad de factores, incluyendo la temperatura, la humedad, exposición a radiación ultravioleta, el tipo de plaga que se intenta manejar y la técnica de aplicación del agente de control biológico. Además, los organismos que forman parte del microbioma de un insecto pueden influir en la efectividad de un agente de control biológico, incluso en la resistencia de ciertos insectos a plaguicidas químicos.

Aunque hay numerosas investigaciones respecto a la influencia de todos los factores antes mencionados sobre la eficacia de los agentes de control biológico, hay muy poca información respecto a cómo el microbioma asociado a la cutícula de los insectos puede influir en la resistencia o la susceptibilidad del insecto a un agente de control biológico. La identificación de los microorganismos que se encuentran en el microbioma de un organismo permite conocer cómo una población microbiana (presencia o proporción entre las especies) puede ser determinante en la resistencia que presenten los insectos a cualquier tipo de MIP. El uso de escarabajos de campo permitirá analizar mejor la influencia del microbioma con su hospedero ante la susceptibilidad a infecciones causadas por patógenos ya que son extraídos de su ambiente nativo y no han sufrido algún cambio a diferencia del uso de escarabajos modelo, los cuales son criados en laboratorio como es el caso de *Tenebrio molitor*, por lo tanto, este trabajo propone infectar a escarabajos de *Xyleborus affinis* criados en laboratorio y recolectados de campo con *B. bassiana*, para conocer la susceptibilidad que estos tienen ante la infección causada por el hongo, y posteriormente amplificar la región V3-V4 del RNA 16S. Con esta información se podría tener un primer acercamiento para explicar la influencia del microbioma cuticular en la resistencia de insectos ante la infección por hongos entomopatógenos.

## 4. Hipótesis

La susceptibilidad de *Xyleborus affinis* a la infección por hongos entomopatógenos será más alta en insectos cultivados en el laboratorio que en insectos colectados de campo; las diferencias en la susceptibilidad del insecto están relacionadas con una mayor diversidad en el microbioma asociado a la cutícula del insecto.

## 5. Objetivos

### 5.1 Objetivo general

Comparar la susceptibilidad de escarabajos de *Xyleborus affinis* cultivados en el laboratorio y colectados de campo, infectados con hongos entomopatógenos y establecer un protocolo que permita la extracción de material genético del microbioma asociado a la cutícula del insecto.

### 5.2 Objetivos específicos

- Producir conidios en sustrato sólido de las cepas CHE-CNRCB 431 (*Baeuveria bassiana*), CHE-CNRCB 307 (*Isaria javanica*), CHE-CNRCB 213 (*Metarhizium acridum*).
- Determinar los parámetros de calidad de los conidios de cada una de las cepas de HE.
- Establecer colonias de *X. affinis* con dieta artificial, en el laboratorio de bioensayos del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico.
- Recolectar escarabajos de *X. affinis* de campo.
- Comparar la susceptibilidad de los escarabajos cultivados en laboratorio y los colectados de campo mediante bioensayos con hongos entomopatógenos.
- Proponer un protocolo de limpieza de la Torre de Potter, para disminuir el sesgo de microbioma ajeno a los escarabajos, *X. affinis*.
- Probar un protocolo que permita la extracción de ADN cuticular de *X. affinis* con un kit comercial.
- Obtener ADN para amplificar la región V3-V4 del gen del RNA 16S para posteriormente secuenciar el microbioma del insecto.

## 6. Materiales y métodos

### 6.1 Microorganismos y activación de cepas

La cepa utilizada para realizar los bioensayos, fue el hongo *Beauveria bassiana*, el cual se encuentra dentro de la colección de hongos entomopatógenos (CHE), del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB), Colima. Identificada como CHE-CNRCB 431, año de colección 2014, localizada en Comala, Colima, extraída de árboles de café del hospedero *Hypothenemus hampei*, (Serna et al; 2019). Asimismo, se activaron la cepas, 307 (*Isaria javanica*) y 213 (*Metarhizium acridum*) de la colección de CHE del CNRCB, (van Lenteren et al; 2019)

### 6.2 Cultivo de cepas

Para poder producir conidios en sustrato de arroz, primero se activaron los hongos, para lo cual se tomó una muestra de los conidios de cada una de las cepas que se encontraban sobre sílica gel almacenadas a 4°C en la CHE-CNRCB. Posteriormente las muestras se inocularon en cajas Petri las cuales contenían medio sólido (Agar Dextrosa Sabouraud 65 g/L suplementado con extracto de Levadura 2 g/L, el medio fue previamente esterilizado a 120 °C, 15 psi durante 20 min). Finalmente, las cajas se incubaron a 25 ±2 °C durante 15 días.

Después de los 15 días, se tomó una muestra del cultivo anterior y se colocó en 10 mL de Inex-A (0.1%), se agitó durante 3 min en el Vórtex®, posteriormente se tomaron 50 µl de las suspensiones de cada una de las cepas y se vertieron en cajas Petri, las cuales contenían medio sólido de Agar Dextrosa Sabouraud (6 g/L) suplementado con Extracto de Levadura (2 g/L) previamente esterilizado por calor húmedo a 120 °C, 15 psi durante 20 min, los inóculos se distribuyeron homogéneamente con varillas Drigalski y se incubaron a 25 ±2 °C durante 15 días, tiempo en el cual se observó esporulación de cultivos.

### 6.3 Producción de conidios en estado sólido

La producción de conidios se realizó sobre arroz como sustrato, para lo cual, se rasparon 2 cajas Petri con conidios, de cada una de las cepas, con ayuda de una espátula, posteriormente los conidios se colocaron en tubos cónicos con capacidad para 50 mL, el cual contenía 20 mL de una solución de Inex-A 0.1%, se agitó en un vórtex durante 3 min a máxima velocidad y se realizó el conteo de conidios en la cámara de Neubauer, para posteriormente inocular en arroz.

Para llevar a cabo la inoculación en el medio de arroz, se prepararon 15 frascos serológicos con capacidad para 110 mL para cada cepa, los cuales contenían 10 g de arroz precocido (Valle Verde);

los cuales fueron cubiertos con tela quirúrgica, éstos se esterilizaron a 120 °C, 15 psi durante 20 min, posteriormente se determinó el porcentaje de humedad del arroz por medio de una termobalanza (ADN MX-50), la humedad promedio fue de 4.55% y se ajustó a 40 % en cada frasco (Angel et al; 2015).

Después de ajustar el porcentaje de humedad, se inocularon, por grupo de 15 frascos con arroz, las cepas CHE-CNRCB 431, 307 y 213 con una suspensión cuya concentración fue  $1 \times 10^6$  conidios/ gssi. Finalmente se incubaron en una cámara Bioclimática (Binder) por 15 días a 26° C, 60 % de humedad y un fotoperiodo de 12:12 (luz: oscuridad).

Pasados los 15 días, los frascos se colocaron durante tres días en la cámara Bioclimática (Binder) a tres porcentajes de humedad diferentes, 50% por 24 h, 40% por 24 h y 30% por 24 h a una temperatura de 22°C, con el objetivo de retirar humedad, del sustrato y los conidios, obteniéndose un porcentaje de humedad de 4.30%.

## 6.4 Extracción de conidios

Se eligieron al azar sólo cinco frascos serológicos de cada cepa, que contenía arroz y conidios, cada uno de ellos fue tamizado por una malla de acero inoxidable que permitió el paso de los conidios y retuvo el arroz, los conidios se colectaron en tubos cónicos de 50 mL, posteriormente se determinó la humedad de los conidios con una termobalanza (ADN MX-50 MOISTURE ANALYZER), la cual fue de 4.3%, finalmente se conservaron a 4 °C hasta su uso. En esta temperatura los conidios tienen un mayor tiempo de vida útil (Jenkins et al; 1998).

## 6.5 Control de calidad de HE

Para determinar el control de calidad de los conidios producidos, se calculó el rendimiento, se contabilizaron los conidios por gramo y se calculó el porcentaje de germinación, (Angel et al; 2015).

### 6.5.1 Rendimiento

Se determinó individualmente el peso inicial y final (después de la extracción de los conidios), de los tubos cónicos y se calculó la diferencia. Posteriormente se calculó el rendimiento con la siguiente ecuación.

$$y = \frac{\mu}{10gssi}$$

$\mu$ : diferencias de peso  
y: rendimiento

gssi: gramos de sustrato sólido inicial

## 6.5.2 Germinación

Se realizó una suspensión de conidios con aproximadamente 5 mg de polvo de conidios puros de cada cepa en 10 mL de una solución de Inex A 0.1%, previamente esterilizada por calor húmedo, posteriormente, se colocaron 50  $\mu\text{L}$  de cada una de las suspensiones, en cajas Petri, las cuales tenían medio SDA suplementado con extracto de levadura (2 g/L). Los conidios se dejaron germinar durante 20 h a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Posteriormente, cada caja se dividió en cuatro cuadrantes y se contabilizaron 100 conidios por cuadrante, registrándose el número de conidios germinados y no germinados en un microscopio óptico a 40 X. Finalmente, el porcentaje de germinación se calculó con la siguiente ecuación.

$$\% \text{ germinación} = \frac{\# \text{ de conidios germinados}}{\# \text{ conidios totales}} \times 100$$

## 6.6 Colonia de *Xyleborus affinis*

Las hembras de *X. affinis*, fueron criadas con una dieta artificial a base de aserrín de árbol de aguacate, para lo cual, una colonia previa fue diseccionada y se separaron cuatro hembras, estas fueron colocadas en un tubo con dieta, al cual se le colocó un tapón de algodón y se dejó que la colonia se desarrollara durante 4 semanas a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  (Cooperband et al; 2016).

## 6.7 Colecta de los escarabajos *X. affinis* en campo

Los escarabajos fueron colectados, en el Rancho Huerta Valdi Campo, carretera Colima-Naranjal, km 12, Comala, Colima, ubicado en las coordenadas geográficas,  $19^\circ 24' 28.0'' \text{N} 103^\circ 40' 00.0'' \text{W}$ .

Los árboles de los cuales se realizaron las colectas, debían cumplir las siguientes características: marchitez, la corteza debería mostrar secciones rojizas y en la parte inferior del tronco, se debía observar virutas de aserrín como se muestra en la Figura 4 ( Castrejón et al; 2017). Una vez elegido el árbol se cortaron secciones paralelas del tronco con una motosierra.



Figura 4 Árbol infectado por *X. affinis*

Los troncos recolectados se colocaron en una caja de 75 cm de largo, 30 cm de altura y 30 cm de ancho, la cual fue previamente desinfectada con una solución de alcohol al 70% y se expuso a radiación UV-C durante 2 h, ésta se cerró y se mantuvo así por 24 h, tiempo suficiente para que los escarabajos salieran por sí mismos, (Figura 5). Transcurrido las 24 h, se llevó a cabo la colecta con un pincel (esterilizado por calor seco a 160°C por 2 h).

Para reducir la variabilidad en los experimentos se decidió usar sólo escarabajos hembra en los bioensayos, debido a que las hembras de *X. affinis* son las encargadas de fundar nuevas colonias y la proporción dentro de las galerías es mayor en comparación con los machos (Biedermann et al; 2020), por lo que fue necesario realizar la identificación morfológica de cada individuo, asimismo, esta identificación ayudó a seleccionar a que los escarabajos de campo pertenecieran a *X. affinis*.

Por la tanto, los escarabajos colectados de campo se acumularon en una caja Petri estéril de 47 mm, paralelamente se hizo la identificación morfológica de los escarabajos con base a los estándares de Hulcr et al; (2015), quienes indican que *X. affinis* a diferencia de otras especies de *Xyleborus*, se caracteriza por el declive en los élitros (alas anteriores) más convexos, asimismo, presentan las setas (vellos) más gruesos, tiene un color más pálido y en las estrías I y III existen pequeños denticulos,(Rabaglia et al; 2006). La identificación se realizó en el laboratorio de la Colección de Insectos del CNRCB con el equipo Stereo Discovery V2, Axion cam HRC.



Figura 5. Escarabajos de *X. affinis*, en el exterior del tronco, después de 24 h.

## 6.8 Limpieza de la Torre de Potter

Existen diferentes métodos para la inoculación de conidios de hongos entomopatógenos en insectos. Comúnmente se emplea la inmersión del insecto en una suspensión de conidios preparada en una solución de algún detergente (0.05% Tween 20, Tritón al 1.2% X-100 o Inex al 0.1%). Sin embargo, como el objetivo principal de este trabajo es analizar el microbioma presente en la cutícula de insectos, la inmersión del insecto en una solución con detergente podría desprender parte de las bacterias presentes en su cutícula, (Birer et al; 2017).

Como alternativa para la inoculación de los insectos, se decidió utilizar una torre de Potter (Figura 6). La torre de Potter es un equipo automatizado que se utiliza para la inoculación de insectos, esta ópera a partir de una aspersión automatizada, la cual distribuye líquidos uniformemente en un área circular de 9 cm (Nunes et al; 2016).

Asimismo, para eliminar los sesgos de microorganismos contaminantes que podrían estar presentes en la Torre de Potter y en laboratorio, antes de realizar los bioensayos, el área de Bioensayos del Departamento de Hongos Entomopatógenos (DHE) del CNRCB junto con la Torre de Potter, se limpió superficialmente con una solución de etanol al 70% y se expuso toda el área durante 2 h con Luz UV-C, posteriormente, se dejaron pasar 18 h para poder ingresar al área. Finalmente, el interior de la Torre de Potter se limpió con 40 mL de una solución de 5% de hipoclorito de sodio comercial, 40 mL de etanol al 70 % y 40 mL de solución de Inex- A (0.1%).

Para comprobar la disminución de contaminantes, se asperjaron 10 cajas de Petri que contenían medio SDA, antes y después de la limpieza para poder comprobar la disminución de agentes contaminantes, las cuales se monitorearon diariamente por 7 días.



Figura 6 Torre de Potter

## 6.9 Bioensayos

Se diseccionaron los tubos que contenían dieta a base de aserrín de 4 semanas de incubación los cuales contenían la colonia de *X. affinis*. Se seleccionaron 40 hembras, además de 40 hembras que se colectaron de campo, y se formaron unidades experimentales. Cada unidad experimental estuvo compuesta de 10 hembras, y cada experimento contó con tres repeticiones y un control, (Figura 7), el experimento se repitió en dos eventos independientes para dos concentraciones de conidios, ( $1.5 \times 10^7$  y  $1 \times 10^8$  con/mL).

Los insectos control se asperjaron con 2 mL de una solución de Inex 0.1% y el resto de ellos fueron asperjados con 2 mL de una suspensión de conidios de *B. bassiana* CHE-CNRCB 431 que fue estandarizada a una concentración de  $1.5 \times 10^7$  y  $1 \times 10^8$  con/mL, con una torre de Potter (Burkard Scientific, BS00281, Uxbridge, Reino Unido) que se calibró a 125 KPa. Después de la inoculación, los insectos se pasaron a cajas Petri estériles de 90 mm que contenían papel filtro y se monitorearon durante 30 min para asegurar que estaban vivos después del tratamiento; pasado este tiempo se colocaron en tubos cónicos con capacidad para 5 mL que contenían 3 mL de dieta a base de aserrín de árbol de aguacate (Anexo) sin antibiótico. Finalmente, los tubos se incubaron a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 10 días.

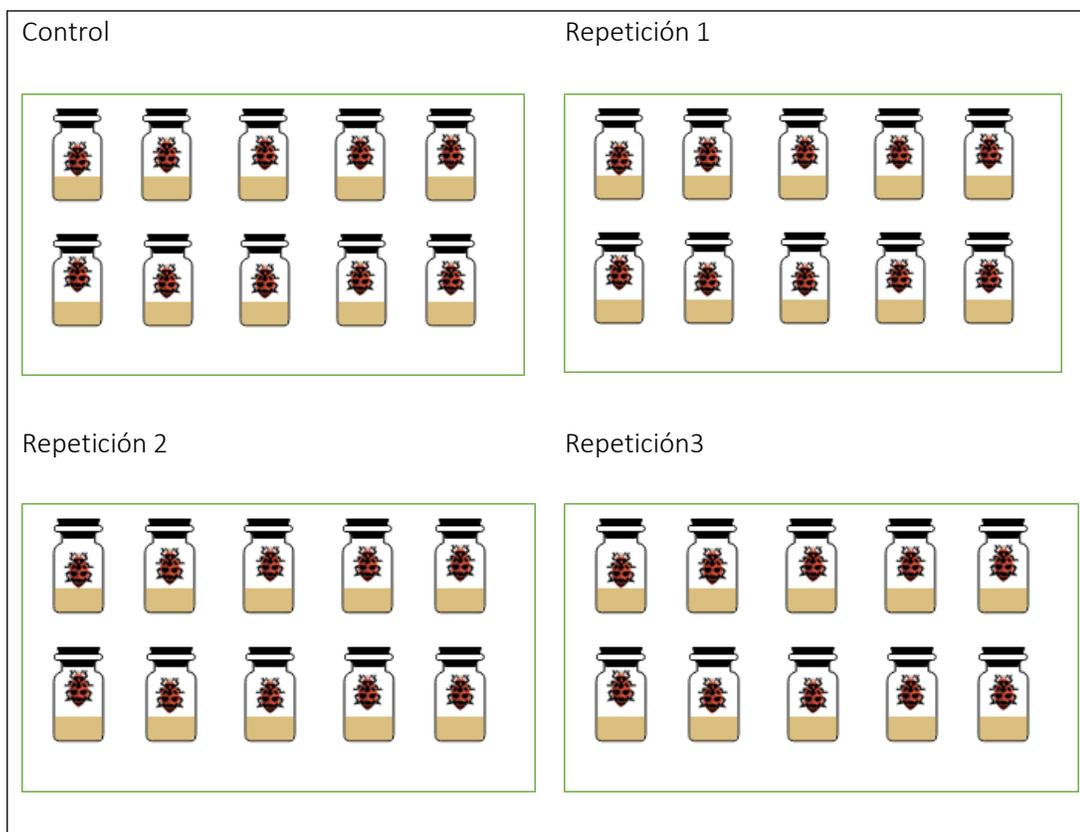


Figura 7 Representación de los experimentos con tres repeticiones.

## 6.10 Determinación de mortalidad

Después de 10 días, los escarabajos se sacaron de la dieta; los insectos muertos fueron colocados de manera individual en cajas Petri con un papel filtro húmedo y se dejaron hasta que presentaron micosis característica de *B. bassiana*; este proceso se realizó con el objetivo de asegurar que la muerte de los escarabajos fue provocada por *B. bassiana*. Se calculó la mortalidad para cada repetición con la siguiente ecuación.

$$\% \text{ mortalidad} = \frac{\# \text{ de insectos muertos}}{10} \times 100$$

Una vez obtenidos los resultados, los datos de porcentaje de mortalidad fueron convertidos mediante transformación angular ( $\arcsen \sqrt{p/100}$ ) para que los datos cumplieran los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza (Malpartida et al; 2013), posteriormente se realizó un análisis de varianza y una separación de medias con la prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).

## 6.11 Determinación de Unidades Formadoras de Colonia

Durante el desarrollo del primer bioensayo de este proyecto, (el cual se corrió con la metodología descrita anteriormente, utilizando únicamente escarabajos de laboratorio y una concentración de inóculo de  $1.5 \times 10^7$  con/mL), se asperjaron cajas que contenían medio SDA con el mismo inóculo (*B. bassiana*), con el que se inocularon los escarabajos de *X. affinis*. Debido a que se llevó a cabo este proceso, nos percatamos que dentro de las cajas estaban creciendo en conjunto la cepa CHE-CNRCB 431 de *B. bassiana* con *I. javanica*. Por lo tanto, se determinó las UFC presentes de *B. bassiana* e *I. javanica*

Para llevar a cabo la determinación de UFC, se preparó una suspensión con el polvo de conidios que se tenía la sospecha que estaba contaminado, y se realizaron las siguientes diluciones 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000, posteriormente se inocularon 50  $\mu$ L de las diluciones en cajas Petri por duplicado, (estas contenían medio SDA y 0.6 g/ L de desoxicolato de sodio) y se distribuyeron homogéneamente con varillas Drigalski, se incubaron a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , durante 10 días y se contabilizaron las colonias

## 6.12 Extracción de ADN del microbioma cuticular

Los escarabajos se sacaron de la dieta, se separaron individualmente y se identificaron los escarabajos que estaban vivos y muertos, se calculó la mortalidad, aplicando la misma metodología antes mencionada, a continuación se separaron en tres grupos, “control”, “escarabajos vivos” y “escarabajos muertos”, estos se colocaron de manera individual (como se observa en la parte superior de la Figura 8) en tubos cónicos con capacidad para 2 mL, los cuales contenían 100 $\mu$ L de Tampón-A, se agitaron por 15 segundos en un Vortex®, el Tampón-A (TA), ayuda a separar las células de la cutícula de los insectos (Bierer et al; 2017). Posteriormente, los escarabajos se sacaron de los tubos cónicos y se colocaron en una caja Petri estéril de 47 mm con un papel filtro, al que se le colocaron 100  $\mu$ L de agua estéril (Figura 8 parte inferior). Finalmente, las placas se incubaron a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 10 días y se observó la aparición de características de micosis.

Los tubos cónicos que contenían la muestra del lavado fueron etiquetados adecuadamente y se mantuvieron a  $-20^\circ\text{C}$  hasta que se confirmó que la muerte de los escarabajos se debida a la infección del hongo. Este procedimiento se realizó con cada una de las repeticiones.

La extracción de ADN de las muestras de lavado, se llevó a cabo siguiendo el protocolo del kit “DNeasy Blood & Tissue Kits” de QIAGEN y la cuantificación de ADN se realizó con el equipo Epoch de BioTek.

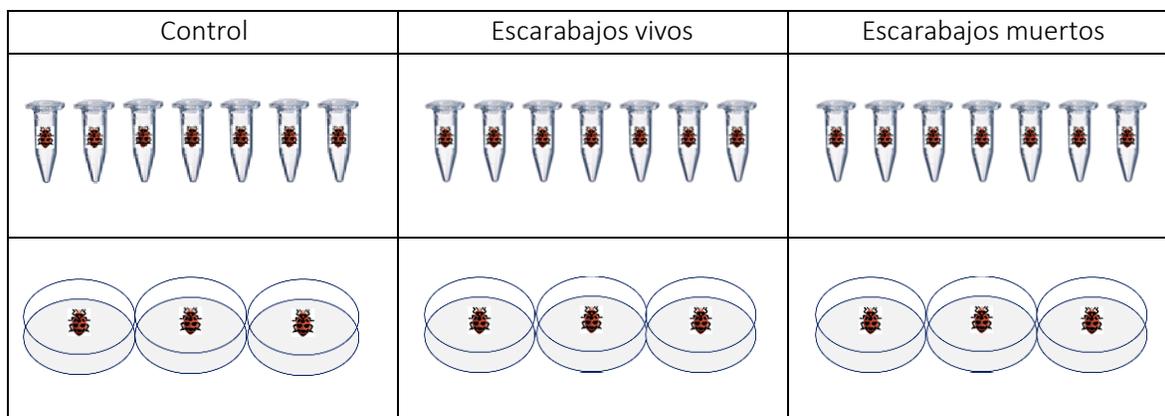


Figura 8 Representación de la separación de los escarabajos *X. affinis*, después de los 10 días de bioensayo

### 6.13 Tratamiento a la Taq polimerasa

Se utilizó una Taq polimerasa de la marca Invitrogen. Se hicieron 10 alícuotas de 10  $\mu\text{L}$  y a una alícuota se le dio un tratamiento previo con luz UV-B, a una intensidad de 0.545  $\text{mW}/\text{cm}^2$  durante 5 min, lo que equivale a 0.163  $\text{J}/\text{cm}^2$ , dentro de una cámara bioclimática (Binder).

El tratamiento se realizó con el objetivo de disminuir los residuos bacterianos que se podrían encontrar en la Taq, ya que, Corless et al., (2000), reportaron que la Taq polimerasa puede contener residuos de ADN contaminantes resultado de su fabricación, ya que comúnmente la enzima se expresa como una proteína recombinante de *E.coli*, y en ocasiones ésta se amplifica cuando se utilizan cebadores universales como es el caso del ARN 16S, por lo cual, han empleado diferentes métodos de tratamiento a la polimerasa, para solucionar este problema, como lo son el uso de luz UV, enzimas de restricción o el uso de DNAsas (Corless et al; 2000). Por lo tanto, se le dio un tratamiento a la polimerasa utilizada en este experimento.

### 6.14 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se amplificó la región V3-V4 del 16S RNA con los siguientes cebadores:

Forward

5'TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG

Reverse

5'GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC

Los cebadores utilizados se mandaron a sintetizar en Uniparts S. A. de C. V., con base a la publicación de (Illumina, 2013).

Se realizó la mezcla de reacción con volumen final de 25  $\mu\text{L}$  por reacción, añadiendo los reactivos descritos en la Tabla 1 y el termociclador se programó según las condiciones descritas en la misma Tabla. La PCR se corrió en un termociclador Applied Biosystems™ Veriti™ de 96 pocillos (Illumina, 2013).

Tabla 1 Reactivos y corrida de ciclos utilizados en la PCR

Reactivos	X1	Ciclo de corrida
<ul style="list-style-type: none"> <li>• H<sub>2</sub>O ultrapura</li> <li>• Amortiguador green (1x)</li> <li>• MgCl<sub>2</sub> (1.5 mM)</li> <li>• dNTPS (0.2 mM)</li> <li>• Cebador 16S F (0.4 mM)</li> <li>• Cebador 16S R (0.4 mM)</li> <li>• Taq polimerasa</li> <li>• Muestras de ADN</li> </ul>	19.25 $\mu\text{l}$ 2.5 $\mu\text{l}$ 0.75 $\mu\text{l}$ 0.5 $\mu\text{l}$ 0.5 $\mu\text{l}$ 0.5 $\mu\text{l}$ 0.4 $\mu\text{l}$ 0.6 $\mu\text{l}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 95°C por 3 min</li> </ul> 25 ciclos <ul style="list-style-type: none"> <li>• 95°C por 30 s</li> <li>• 55°C por 30 s</li> <li>• 72°C por 30 s</li> <li>• Final 72°C por 5 min</li> </ul>

Después de la corrida de la PCR, se realizó un gel de agarosa preparado al 1.5 % (Anexo), al cual se le cargaron 3  $\mu\text{L}$  de cada muestra. Utilizando como marcador de peso molecular +HyperLadder™ 1kb, amortiguador TE de corrida 1X marca QIAGEN. La electroforesis se realizó utilizando un Powerpack de Bio-Rad a 90V por 1 h. Pasando el tiempo de corrida, el gel se colocó en amortiguador TE 1X con 2  $\mu\text{l}$  de colorante GelRed durante 30 min y se reveló utilizando el fotodocumentador Gel Doc™ XT+ de Bio-Rad.

Finalmente se verificará que las bandas obtenidas correspondan a la región V3-V4 del RNA 16S. Las muestras se mandarían a secuenciar al instituto FISABIO (Valencia, España), utilizando la tecnología Illumina. Posterior a la secuenciación, se realizará el análisis de secuencias y la formación de árboles filogenéticos, asimismo, se va a llevar a cabo la comparación del microbioma bacteriano para conocer si hay un cambio entre los escarabajos que se inocularon y presentaron la infección, los que se inocularon y no presentaron infección y el control los cuales no fueron inoculados.

## 7. Resultados

### 7.1 Cultivo y Control de calidad de Hongos entomopatógenos

Las cepas *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *I. javanica* pertenecientes al CHE-CNRCB, que fueron inoculados en 10 gramos de arroz con una concentración de  $1.6 \times 10^6$  conidios/ gssi, después de 15 días de incubación y 3 días de secado, se cosecharon para determinar el rendimiento en conidios/gramos de sustrato seco inicial, y el porcentaje de germinación de los conidios, (Descrito en la sección 6.5). En la Figura 9 se observa el rendimiento y porcentaje de germinación obtenidos de cada una de las cepas cultivadas (*B. bassiana*, *M. acridum* e *I. javanica*) al inicio de este estudio. La cepa con mayor rendimiento y porcentaje de germinación fue *B. bassiana* con una producción de  $2.34 \times 10^9$  con/gssi, y un porcentaje de germinación de 98%; *M. acridum* con una producción de  $1.12 \times 10^8$  con/gssi, y 87.75% de germinación e *I. javanica* con una producción de  $1.44 \times 10^9$  con/gssi, 14.4 mg/gssi y 97% de germinación

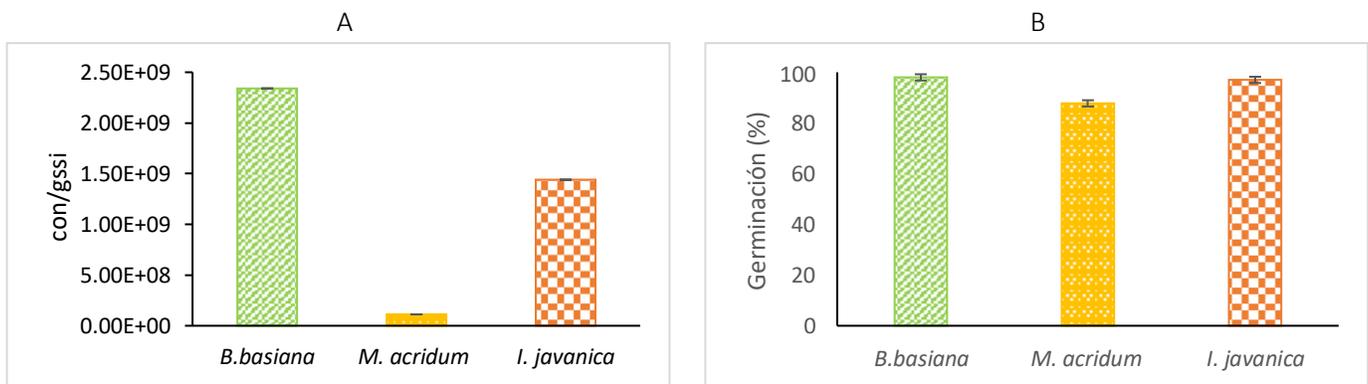


Figura 9 Porcentaje de Germinación y rendimiento de *B. bassiana*, *M. acridum*, *I. javanica*

Con base a los resultados obtenidos, y debido a que *B. bassiana* presentó el mejor rendimiento y porcentaje de germinación en comparación con las otras cepas, *B. bassiana* se selecciona para realizar los bioensayos descartándose el uso de las otras dos cepas.

### 7.2 Limpieza de la Torre de Potter

Para evitar contaminación y que algunas de las bacterias u hongos presentes en la torre de Potter interfirieran en los resultados del microbioma presente en *X. affinis*, se diseñó un protocolo de limpieza (descrito en la sección 6.8). En la Figura 10-A se observan cajas con SDA asperjadas, éstas presentaron crecimiento fúngico no identificado, así como la presencia de bacterias sin identificar. En la misma Figura 10, sección B, se observan las cajas de Petri con SDA, las cuales fueron inoculadas con 2 mL de

Inex-A, después de aplicar el protocolo de limpieza. Es importante mencionar que el protocolo de limpieza se aplicó tanto superficialmente en el área en la que se realizó el bioensayo, como en el interior en la Torre de Potter, estas cajas no presentan el crecimiento de algún tipo de microorganismo a diferencia de la sección A, a las cuales no se les aplicó el tratamiento.

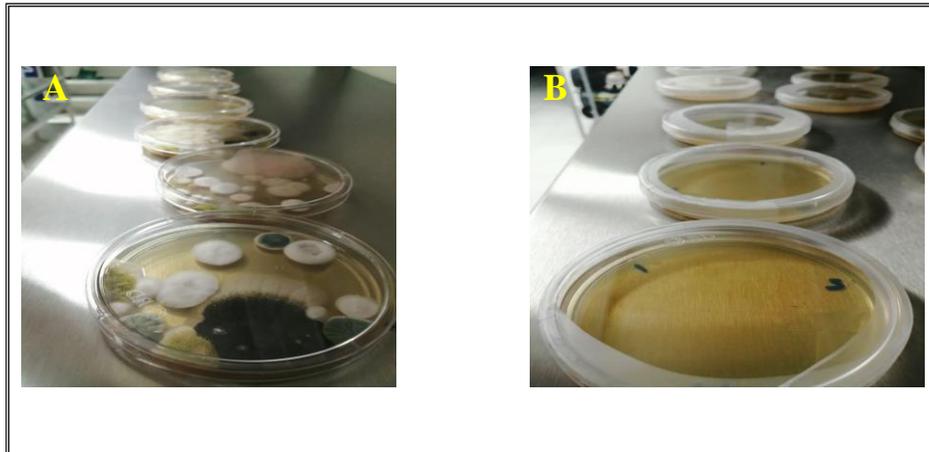


Figura 10 Cajas de Petri antes y después de la limpieza de la Torre de Potter

### 7.3 Colecta en campo

En la Figura 11, se observa que los árboles seleccionados para realizar la colecta cumplieron con las características mencionadas en la metodología sección 6.7, estos presentan marchitez (A), virutas de aserrín (B) y la corteza muestra marchas rojizas (C). Los cortes que se extrajeron del tronco del árbol (D) se llevaron al laboratorio, se seccionaron de forma circular (aproximadamente 15 cm de ancho), con el objetivo de no dañar a los escarabajos que se encontraba en el interior de los troncos.



Figura 11 Colecta en campo. En la sección A se observa los árboles de aguacate marchitos, en la sección B y C se observa las virutas de aserrín y finalmente en la sección D los cortes realizados para la recolección de escarabajos.

## 7.4 Identificación morfológica de *X. affinis*

Todas estas características de identificación descritas en la sección 6.7 se pueden observar en la Figura 12, las cuales se cumplieron para los escarabajos seleccionados que fueron recuperados del campo.



Figura 12 Identificación morfológica de *X. affinis*. Vista dorsal (imagen izquierda): A. crenulado bastante pequeño. B. Declive convexo. C. Dentículos. Vista del escarabajo completo (imagen derecha), (Hulcr et al; 2015)

## 7.5 Bioensayos con escarabajos de Laboratorio usando una cepa contaminada (*B. bassiana* – *I. javanica*)

En la Figura 13 se muestra con una flecha la presencia de *I. javanica* como co-inóculo de *B. bassiana*. El conteo de *B. bassiana* se realizó a una dilución de 1:10000 y se registró el crecimiento de 232 UFC, obteniéndose  $4.7 \times 10^7$  UFC/mL para la suspensión madre. Por otro lado, el conteo de *I. javanica* se realizó en una dilución 1:1000 para la cual se contabilizó 154 UFC, obteniéndose  $3 \times 10^6$  UFC/mL en la suspensión madre. Estos datos obtenidos nos permitieron conocer el porcentaje de contaminación de *I. javanica* dentro del cultivo de *B. bassiana*, el cual corresponde a 6.38% de conidios de *I. javanica*.



Figura 13 Cepa de *B. bassiana* contaminada con *I. javanica*

En la Figura 14, se observa el porcentaje de mortalidad causado por el consorcio de *B. bassiana* – *I. javanica* el cual fue resultado de una contaminación, asimismo, se muestra el porcentaje de mortalidad que se obtuvo cuando se usó una cepa pura de *B. bassiana* libre de contaminante. El consorcio formado por *B. bassiana* – *I. javanica* logró matar el 80.8% de los escarabajos sometidos a este tratamiento, mientras que la cepa pura de *B. bassiana*, únicamente alcanzó un porcentaje de mortalidad del 53.78%.

Por lo tanto, existe una diferencia significativa entre el uso de la cepa pura y el consorcio utilizando escarabajos de laboratorio, por otro lado, no existe diferencia significativa entre los controles de la cepa pura y el consorcio.

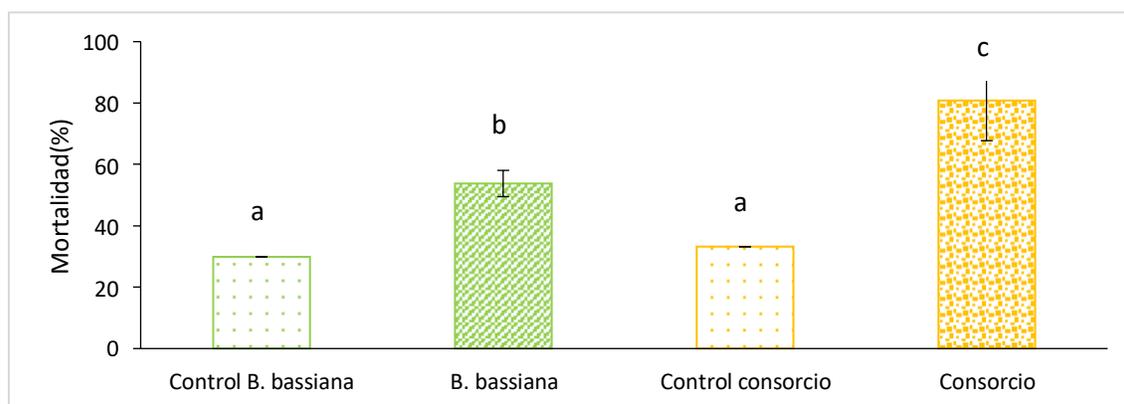


Figura 14 Porcentaje de mortalidad de *X. affinis* usando un consorcio de *B. bassiana* e *I. javanica*. Las letras muestran los grupos obtenidos mediante la prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ )

## 7.6 Bioensayos con *B. bassiana* pura, escarabajos de Laboratorio y escarabajos de Campo

De las tres cepas activadas, se seleccionó *B. bassiana* para realizar los bioensayos, ya que presentó el mejor rendimiento y germinación, esta se aplicó a dos concentraciones  $1.5 \times 10^7$  con/mL y  $1 \times 10^8$  con/mL. Ambas concentraciones están dentro de los intervalos que se han utilizado en estudios previos (Castrejón et al; 2020).

En la Figura 15, se observa que el porcentaje de mortalidad causado por *B. bassiana* (a una concentración de  $1.5 \times 10^7$  con/mL), a los escarabajos de campo y de laboratorio no difiere significativamente, obteniéndose un porcentaje de mortalidad de 55.89% en los escarabajos criados en laboratorio y 51.77% en los escarabajos recolectados en campo. En cuanto a la mortalidad de los controles, esta difiere significativamente, sin embargo, la desviación del control de campo es mayor que el control de laboratorio.

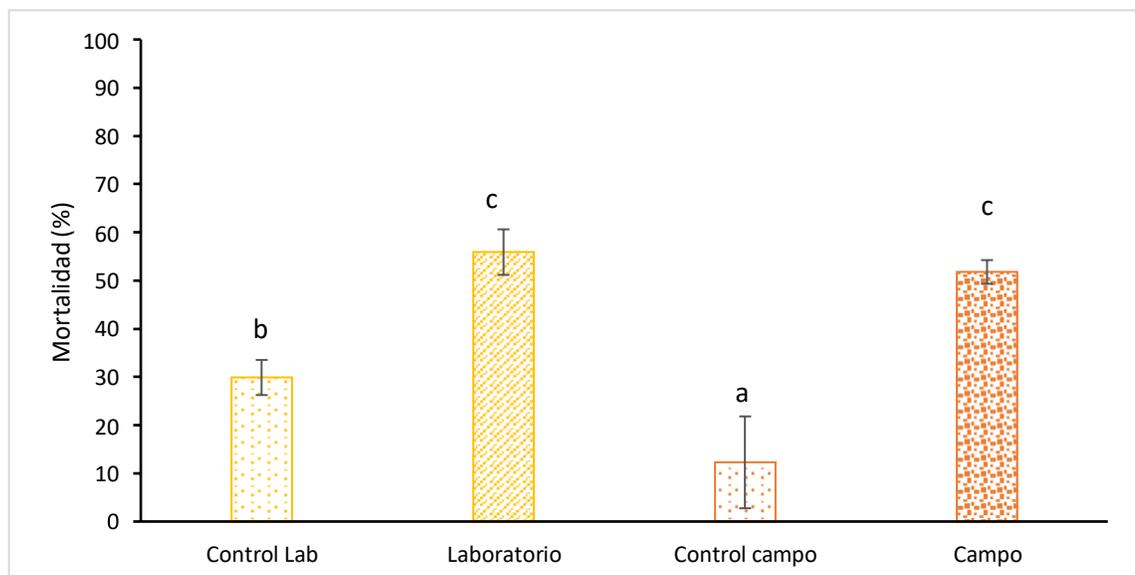


Figura 15 Porcentaje de mortalidad de *X. affinis*, a una concentración de  $1.5 \times 10^7$  con/mL Grupos obtenidos mediante la prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).

Por otro lado, en la Figura 16, se observa el porcentaje de mortalidad de los escarabajos de campo y de laboratorio a una concentración de  $1 \times 10^8$  con/mL, los controles no muestran una diferencia significativa entre ellos, mientras que la mortalidad de los escarabajos infectados difiere significativamente entre los escarabajos criados en laboratorio y aquellos extraídos del campo. Con los escarabajos de laboratorio se obtuvo un porcentaje de mortalidad de 90%, este porcentaje de

mortalidad fue mayor que los escarabajos de campo, de los cuales se alcanzó un porcentaje de mortalidad de 64.18%.

En resumen, no se aprecia una diferencia en la mortalidad de los insectos colectados en campo respecto a los insectos criados en laboratorio cuando se utiliza una suspensión de conidios a una concentración de  $1.5 \times 10^7$  con/mL, pero cuando se incrementó la concentración en un orden de magnitud ( $1 \times 10^8$  con/mL), la mortalidad de los insectos de campo y de laboratorio aumentó.

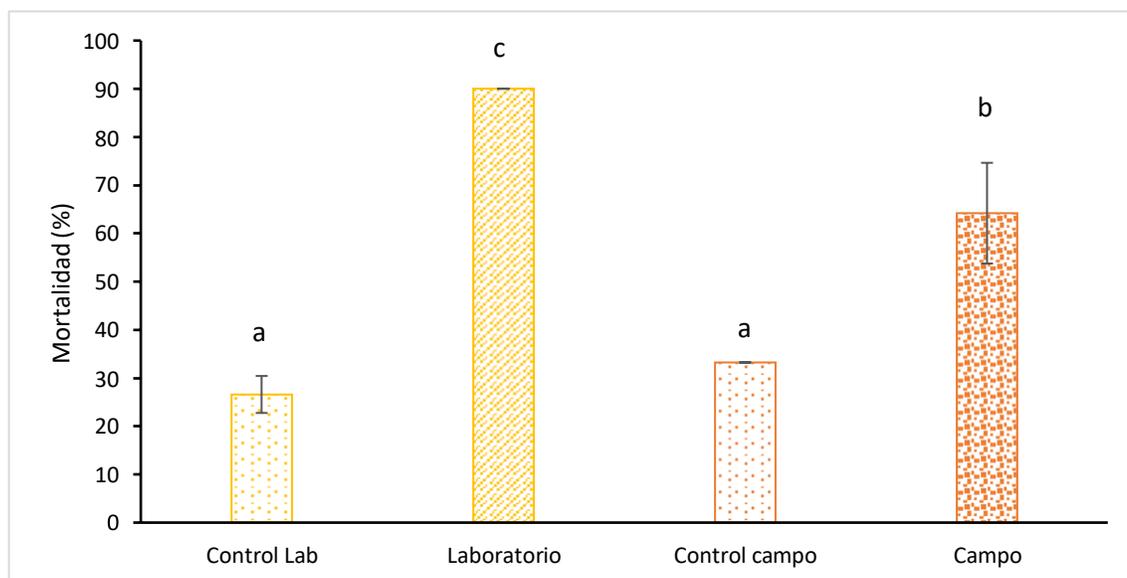


Figura 16 Porcentaje de mortalidad de *X. affinis*, a una concentración de  $1 \times 10^8$  con/mL. Grupos obtenidos mediante la prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).

## 7.7 Identificación de los escarabajos que presentaron micosis

Al término del bioensayo, los cadáveres de los escarabajos que no sobrevivieron se colocaron en una cámara de humedad para verificar que la muerte del insecto se debía a la infección por el HE. Asimismo, los escarabajos se separaron por grupos, con el objetivo de analizar el microbioma en tres estados diferentes del escarabajo, el primero es el control (testigos negativos), donde el microbioma bacteriano no se ha visto alterado por la presencia de alguna infección causado por HE, posteriormente los escarabajos vivos inoculados y los escarabajos muertos inoculados, para evaluar si hay una diferencia en cuanto al microbioma presente y así poder comparar si el microbioma varía en los tres estados, verificando si está influyendo en cuanto a la susceptibilidad a la infección por HE.

En la Figura 17, se observan algunas muestras de insectos que se obtuvieron cuando se inóculo a una concentración de  $1.5 \times 10^7$  con/mL, estos escarabajos se utilizaron para probar el protocolo de extracción de ADN cuticular, pero antes se dividieron en tres grupos, como se muestra en la Figura 17 el grupo “control” (insectos que fueron asperjados con la solución de Inex-A sin conidios), el grupo “sobreviviente inoculado”, el cual es el escarabajo que al momento de sacar el bioensayo estaba vivo y después de colocarlo en papel filtro no presentó infección y finalmente los escarabajos “muertos, infectados con micosis”, son aquellos que se infectaron con la cepa y después de extraerlos de la dieta estaba muerto y presentaron micosis cuando se colocaron en el papel filtro húmedo.

Control	Sobreviviente inoculado, sin micosis	Muerto inoculado, con micosis
		

Figura 17 Caracterización de los escarabajos micosados después del bioensayo

## 7.8 Cuantificación de ADN cuticular de *X. affinis*

La cuantificación del ADN cuticular de las muestras del escarabajo *X. affinis* se presentan en la Tabla 3. La pureza de cada una de las muestras se observan en la cuarta columna, estas están levemente fuera del umbral de una pureza óptima la cual está en intervalos de 1.8-2.2,(Banco ADN, 2020).

Tabla 2 Cuantificación del ADN cuticular de *X. affinis*

Muestra	Abs 260	Abs 280	260/280	ng/ $\mu$ L
Control	0.004	0.001	2.654	3.752
Control	0.001	0	-3.75	0.825
Control	0.002	0.001	2.25	2.474
Repetición1	0.002	0	5.125	2.284
Repetición1	0.001	0.001	1.583	1.044
Repetición 1	0	0	1.5	0.167
Repetición2	0.002	0	5.125	2.235
Repetición2	0.002	0	3.625	1.602
Repetición 2	.003	0.001	1.958	2.542

## 7.9 Tratamiento de la Taq polimerasa

Después de la extracción de ADN, las muestras se utilizaron para amplificar la región V3-V4 del RNA 16S, y así, determinar la presencia de microbioma cuticular. Junto con las muestras se corrieron tres controles: dos negativos, los cuales contenían reactivos para reacción de PCR, sólo que en vez de muestra de ADN se añadió agua ultrapura (QIAGEN); y un control positivo, el cual contenía los reactivos para reacción de PCR más ADN extraído de células de *E. coli*. Durante el desarrollo de los experimentos nos percatamos que todas las muestras, incluyendo los controles negativos, amplificaban en una banda de 500 pb, por lo tanto, este experimento se realizó probando reactivos nuevos y en condiciones de esterilidad (dentro de una campana de flujo laminar) para descartar que la contaminación de los controles se debiera a factores ambientales, reactivos y material contaminados; aun así, los controles negativos, seguían amplificando.

En la Figura 18, se observa que aproximada a 500 pb hay tres bandas amplificadas. En el carril con número 0 se encuentra el marcador molecular en el carril con número 1 se observa el control positivo el cual es DNA de la bacteria *E. coli* y finalmente en el carril 2 y 3 están los controles negativos los cuales no tendrían que amplificar ya que no tenían material genético.

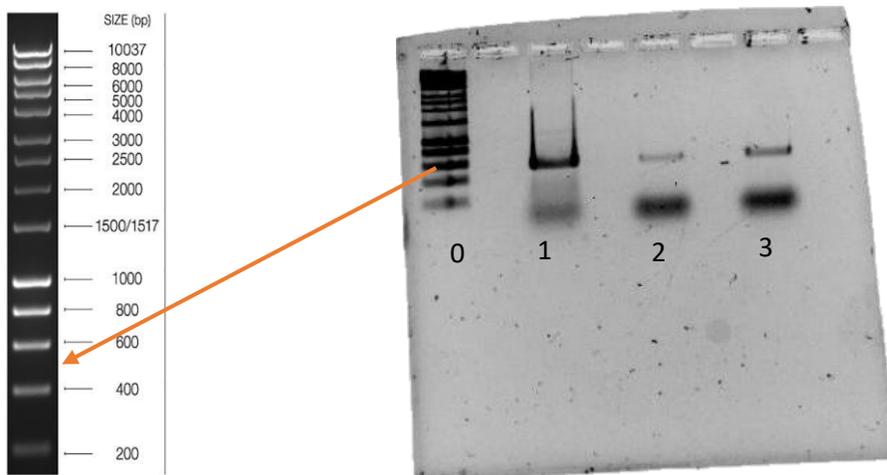


Figura 18 Gel de las muestras amplificadas. Carril 0: marcador; carril 1: control positivo; carriles 2 y 3: controles negativos.

Por lo tanto, se le dio un tratamiento a la polimerasa, aplicando la metodología descrita en la sección de materiales y métodos, sección 6.13.

El uso de esta dosis dio buenos resultados (no aparecían bandas en el control negativo y las bandas de control positivo estaban bien definidas). En la Figura 19, se observa que, en los controles negativos, correspondientes a los carriles 2 y 3, ya no se notó la presencia de una banda y únicamente se observó la banda del control positivo (carril 1) que es ADN de la bacteria *E. coli*.

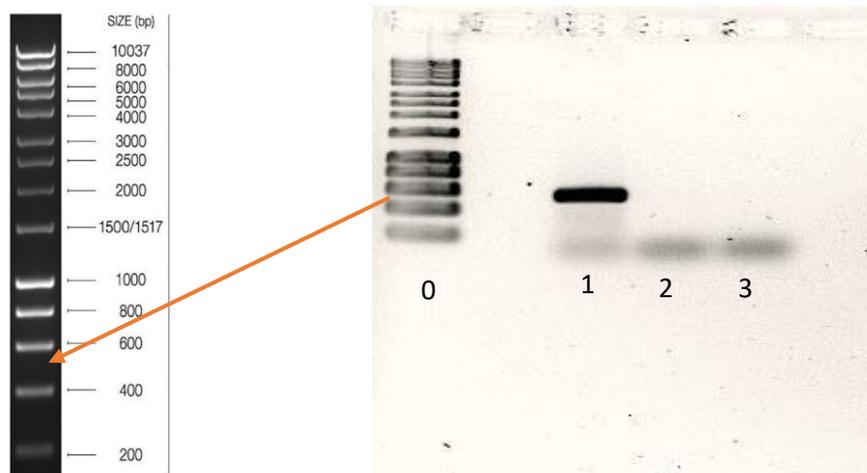


Figura 19 Gel de las muestras amplificadas. Carril 0: marcador; carril 1: control positivo; carriles 2 y 3: controles negativos

## 7.10 Amplificación de la región V3-V4 del gen del RNA 16S de microbioma cuticular de *X. affinis*

Posterior a la cuantificación de las muestras de ADN cuticular de *X. affinis* y del tratamiento a la Taq polimerasa, las muestras se amplificaron por PCR para comprobar la posibilidad de obtener amplificación del RNA 16S, necesaria para la caracterización taxonómica del microbioma. En la Figura 20, en el carril 0 se encuentra el marcador HyperLadder™ 1kb. En los carriles siguientes se encuentran los controles y muestras amplificadas. En el carril 1 y 2, se observan los controles negativos, en el carril 3 se observa una banda alrededor a 500 bp que corresponde al control positivo (DNA genómico de *E. coli*). A partir del carril 4, se encuentran las muestras amplificadas del ADN cuticular de *X. affinis*. Las bandas observadas en los carriles 4-6, corresponden a los controles de los escarabajos de *X. affinis* sin infectar, las bandas observadas en los carriles 7-9, corresponden a muestras de los escarabajos que fueron infectados y no presentaron micosis, a partir del carril 10-13, son las muestras de escarabajos muertos que presentaron infección por el hongo *B. bassiana*.

Por lo tanto, se obtuvo un total de 9 muestras aisladas, las cuales amplificaron alrededor de 500 pb, sin embargo, aún se desconoce el género y especie de las bacterias.

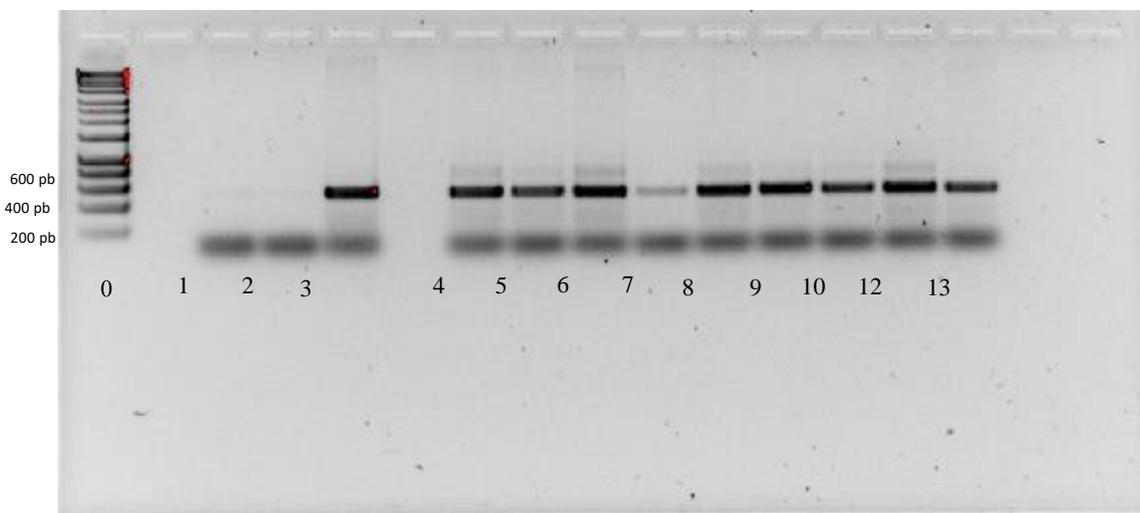


Figura 20 Gel de las muestras amplificadas por PCR, del ADN cuticular de *X. affinis*. Los carriles de 1-3 son los controles, seguidos de los controles de las muestras de escarabajos (carril 4-5), posteriormente están las muestras de escarabajos infectadas con el HE (carril 7-13)

## 8. Discusión

La producción a gran escala de conidios de hongos entomopatógenos en sustrato sólido utilizando arroz, es una técnica frecuente, ya que ésta permite una mejor esporulación, un buen crecimiento micelial y presenta un buen balance nutricional en comparación con la producción en cultivo líquido; además, el rendimiento en la producción de conidios es mejor que el rendimiento obtenido usando sorgo, trigo, maíz y cebada como sustrato (Muñiz et al; 2017).

La producción de conidios en estado sólido ha sido estudiada por diversos investigadores, Pham et al., (2010). reportaron que el rendimiento de *B. bassiana* en condiciones óptimas puede ser 4.05 g de conidios / 100 g de arroz seco, por otro lado, Lopez et al; (2015) han encontrado que el rendimiento de *B. bassiana* está aproximadamente alrededor de  $10^{10}$  conidios por gramos de sustrato seco. Ye et al; (2006) obtuvieron una producción de conidios de *B. bassiana* de  $.2.7 \times 10^9$  conidios/gramo de sustrato seco, la producción obtenida con la cepa CHE-CNRCB 431 *B. bassiana* está dentro de los rangos ya reportados. La producción de HE como *M. acridum* e *I. javanica*, también juegan un papel importante debido a que estos HE son capaces de infectar una variedad de plagas agrícolas, por lo tanto, se buscan algunas técnicas que permitan aumentar el rendimiento utilizando diversos métodos. Angel et al; (2015), reportaron la producción de *I. javanica* en arroz implementando jacinto de agua como texturizador, logrando una producción de  $1 \times 10^9$  con/gss. En la búsqueda de encontrar cepas más virulentas se ha logrado aislar cepas de *M. acridum* de diferentes suelos agrícolas, obteniendo producciones de  $9 \times 10^8$  con/gss, (Alcantara et al; 2020). Pese a que los conidios obtenidos de las cepas *M. acridum* e *I. javanica* obtuvieron una buena calidad, y su porcentaje de germinación de *I. javanica* es mayor al 90 %, la cual es la mínima requerida para uso en campo, se descartó su uso para los bioensayos, ya que su estudio de viabilidad fue menor que *B. bassiana*, (Ramírez et al., 2014).

*B. bassiana* es más utilizada para el control de *X. affinis*. Para poder desarrollar los bioensayos con la cepa seleccionada, se propuso un protocolo de limpieza de la torre de Potter, el cual resultó eficiente para disminuir el sesgo de contaminación externa que pudiera adherirse a la cutícula de los escarabajos e interfiriera en los resultados taxonómicos.

En una primera aproximación, se realizó un bioensayo con una cepa contaminada, la cual se encontraba en consorcio (*B. bassiana* e *I. javanica*), este co-inóculo al ser sometido a bioensayo arrojó que la mortalidad de *X. affinis* después de 10 días fue del 80.8 %.

Los resultados del primer bioensayo llamaban la atención, ya que una mortalidad de insectos del 80.8 % difería de otros estudios reportados previamente usando la misma cepa (CHE-CNRCB 431) contra el mismo insecto (*X. affinis*), la cual oscilaba alrededor de un 50% incluso cuando la concentración de conidios utilizada era más alta (Castrejón et al; 2017), además se había observado conidiación característica de *B. bassiana* e *I. javanica* en cajas Petri con medio SDA que se asperjaban en la torre de Potter, las cuales se usaban para monitorear una posible contaminación por bacterias (un sesgo que no nos podíamos permitir), para comprobar que no se trataba de una contaminación ambiental y que las conidios de *I. javanica* provenían del polvo de conidios puros que se utilizaban para realizar

la suspensión de conidios, se procedió a realizar las diluciones seriadas donde se determinó que el porcentaje de contaminación de *I. javanica* en el cultivo de *B. bassiana* fue de 6.38 %.

Algunos estudios han reportado qué con el objetivo de incrementar el porcentaje de mortalidad de las plagas, no sólo se ha optado por la búsqueda de nuevas cepas, sino, también se ha propuesto implementar el uso de consorcios entre dos especies distintas de hongos entomopatógenos, HE – bacteria, HE - HE, etc. para conocer si esta asociación tiene algún efecto aumentativo en la mortalidad de los insectos plaga. Tal es el caso de Katiski et al; (2020) quienes estudiaron la compatibilidad que generan *Beauveria* sp, *Isaria* sp., y *Purpureocillium* para formar consorcios, reportando que el consorcio entre estos hongos no forma micoparasitismo, por lo tanto, son viables para la formulación de co-cultivos. Pese a que no presenta el rendimiento que llegan a tener estas asociaciones, los autores mencionan que la interacción entre estos hongos aumenta la producción de quitinasas y algunas otras enzimas que ayudan a la degradación cuticular de los escarabajos. Por otro lado, Mantzoukas et al;(2013), han estudiado la sinergia generada al combinar *Bacillus thuringiensis* sp. con *Beauveria bassiana* y *Metarhizium robertsii* evaluando la mortalidad de larvas de *Sesamia nonagrioides*, el porcentaje de mortalidad aumentaba al combinar la bacteria con cada uno de los hongos. Sin embargo, aunque este experimento no estaba dentro del proyecto, nos permitimos reportar los resultados como el punto de partida de estudios futuros, donde no sólo se realicen formulaciones, sino, se evalué el crecimiento de dos o más HE juntos para la formación de consorcios

En un segundo bioensayo utilizando conidios puros de *B. bassiana*, se observó que la mortalidad en los insectos de laboratorio con respecto a su control aumento 0.86 veces, mientras que la mortalidad de los insectos de campo con respecto a su control aumento 3.21 veces, sin embargo, no se observó una diferencia significativa entre la mortalidad de los escarabajos de laboratorio y campo cuando se les aplican los conidios de *B. bassiana* a una concentración de  $1.5 \times 10^7$  conidios/mL, mientras que cuando se aplican los conidios a una concentración de  $1 \times 10^8$  con/mL se observa mayor mortalidad en los insectos de laboratorio. Esta diferencia de mortalidad puede ser causada por factores ambientales como la humedad, el estrés que reciben los escarabajos durante su manipulación, así como, la capacidad que tienen de alertar a sus sistema de defensa ante agentes patógenos, y microorganismos asociados al hospedero que puedan defenderlos ante agentes patógenos (Ortiz- Urquiza y Keyhani, 2013).

Las cepas como *B. bassiana*, *I. javanica* y *M. acridum*, se han utilizado para controlar algunas plagas agrícolas, como es el caso de los escarabajos ambrosiales, en los cuales se han realizado bioensayos con diferentes HE, para conocer su vulnerabilidad a la infección. Avery et al; (2018) probaron 3 tipos diferentes de formulados a partir de *B. bassiana* (BotaniGard®), *I. fumosorosoea* (PFR-97® 20% WDG) y *M. brunneum* (Met52® EC) contra *X. crassiusculus*, *X. volvulus* y *X. bispinatus* con el objetivo de conocer si los hongos que tenían los formulados eran capaces de infectar a los escarabajos y cuantos conidios viables podían conservar, encontrando que los tres productos podían provocar infección en *X. crassiusculus*, *X. volvulus* y *X. bispinatus*. Por otro lado, Tuncer et al; (2019) reportaron estudios más detallados acerca de la mortalidad que causa *B. bassiana* y *M. anisopliae* en *X. germanus* a una concentración de  $1 \times 10^6$  con/mL y  $1 \times 10^8$  con/mL, los cuales alcanzan un porcentaje de mortalidad de 80 y 100% y 40 y 64%, respectivamente, cuando la aplicación es directa al insecto. Estos resultados

son similares a los reportados por Castrejón et al; (2020) quienes trabajaron con la aplicación de *B. bassiana* a concentración de  $1 \times 10^8$  con/mL sobre *X. affinis* y logró obtener un porcentaje de mortalidad del 48%. Pese a que una de las concentraciones del inóculo utilizado en este proyecto, es similar a los reportados por Castrejón, existe diferencia en cuanto a la mortalidad, ya que a una concentración  $1.5 \times 10^7$  con/mL y  $1 \times 10^8$  con/mL, el porcentaje de mortalidad fue mayor al 60%, tanto en escarabajos de campo como en escarabajos en laboratorio. Sin embargo, no siempre la mortalidad de los escarabajos depende al tipo de HE utilizado, sino, también de la capacidad que tienen los insectos en inhibir el crecimiento de agentes patógenos (Ortiz-Urquiza y Keyhani, 2013).

Por otra parte, en este trabajo se planteó estudiar si hay diferencias en el microbioma de *X. affinis* que resisten la infección de los hongos entomopatógenos vs. insectos muertos por micosis. Por lo anterior, decidimos trabajar con el lote de insectos que se expusieron a una concentración de  $1 \times 10^7$  conidios/mL, para tratar de estudiar el microbioma de insectos pertenecientes a cada grupo y para ellos se utilizaron escarabajos de *X. affinis*. El tamaño de las hembras de *X. affinis* es de 3 mm, por lo que la extracción de DNA de los microorganismos asociados a la cutícula del insecto constituye un reto. Después de una revisión bibliográfica se propuso el protocolo descrito en la sección de materiales y métodos en Extracción de ADN cuticular (Bierer et al; 2017).

Después de determinar la concentración de DNA, se observó que la cantidad de ADN que se lograba extraer a partir del lavado de la cutícula de un insecto varía entre 0.1 y 3.7  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Tabla 3), por lo que no era posible visualizarlo en un gel de agarosa. Sin embargo, diferentes autores han reportado que la cantidad de ADN extraído de la cutícula de algunos escarabajos está por debajo de los umbrales de detección mínimos (Rubin et al; 2014);(Bierer et al; 2017). Por lo tanto, se prosiguió a la amplificación por PCR de la región V3-V4 del gen 16S RNA utilizando los cebadores descritos en materiales y métodos.

Los primeros intentos para la amplificación dieron resultados poco concluyentes debido a la aparición de bandas de alrededor de 500 pb en los controles negativos. La presencia de estas bandas podría ser resultado de contaminación con DNA de *E. coli* (que se utilizó como control positivo de PCR) en la mezcla de reacción o en alguno de los reactivos que se utilizaron para el PCR. Después de sustituir todos los reactivos de PCR, la contaminación en el control negativo permaneció, por lo que se sospechó la presencia de residuos de ADN en la Taq polimerasa, resultado de que la enzima que se utilizó se produce por la tecnología del ADN recombinante de *E. coli*, y podría contener DNA traza de la bacteria (Corless et al; 2000).

Para evitar este problema, se procedió a realizar alícuotas de 10  $\mu\text{L}$  de la enzima, y someterlos a tratamiento con luz UV-B, (Corless et al; 2000). Después del tratamiento con luz UV-B, se eliminó por completo la contaminación en el control negativo. Por lo tanto, someter a la Taq polimerasa a radiación UV-B a una intensidad de  $0.545 \text{ mW}/\text{cm}^2$  por 5 min da buenos resultados. Posteriormente, se realizó la reacción de PCR utilizando como templado el ADN extraído del lavado de la cutícula del insecto y se sometió a la reacción de PCR. Como se observó en los resultados (Figura 20), en todos los casos se obtuvo una banda de alrededor de 500 pb, correspondiente a la región V3-V5 del 16S RNA, indicando la presencia de bacterias. Por otra parte, aún se desconoce si la banda es debida a una especie o son varias especies las que la originan, esta incógnita se puede resolver en futuros trabajos, con las

técnicas de secuenciación masiva a partir de marcadores taxonómicos. Con esta información podremos inferir si las variaciones en la diversidad de los microorganismos presentes en la cutícula de los insectos, o las diferencias poblacionales pueden tener alguna influencia en la susceptibilidad o resistencia de *X. affinis* a la infección con *B. bassiana*. En ese sentido, pese que aún no conocemos el microbioma involucrado en los escarabajos de *X. affinis* y las funciones que cumple, en los diferentes grupos que se realizaron (escarabajos sin inocular, escarabajos inoculados que no presentaron infección y escarabajos inoculados que si presentaron infección), aún no se descarta el análisis taxonómico para identificar si hay variabilidad de microbioma, ya que se cuenta con el material genético, el cual está por mandarse a secuenciar.

Continuar con estos estudios resulta importante si consideramos que en trabajos realizados por diversos autores, se ha identificado que el microbioma juega un papel importante de defensa de su hospedero ante agentes patógenos, (Boucias et al; 2018). La presencia de agentes patógenos como lo son los conidios sobre la cutícula de escarabajos, crea una competencia entre patógeno-hospedero, esto quiere decir, cuando los conidios se adhieren a la superficie cuticular secretan enzimas, como quitinasas, proteasas e hidrolasas, además de ácidos orgánicos que les ayudan a penetrar la cutícula de los escarabajos (Ortiz-Urquiza y Keyhani, 2013). Sin embargo, se ha observado que los insectos también son capaces de inhibir el crecimiento de los conidios como acción de defensa a partir de la secreción de lípidos, compuestos hidrofóbicos y antimicrobianos (Ortiz-Urquiza y Keyhani, 2013).

Existen varios trabajos que reportan que algunos insectos secretan metabolitos como defensa ante patógenos, como es el caso de *Tenebrio*, el cual es considerado una plaga mundial y se ha caracterizado por inhibir el crecimiento de *B. bassiana* a partir de la secreción de benzoquinonas, las cuales producen efectos antimicrobianos (Pedrini et al; 2015). También las chinches producen (E)-2-hexenal y (E)-2-octanal, capaces de inhibir el crecimiento de *M. anisopliae* (Ulrich et al; 2015). De hecho los antifúngicos formados por las hormigas y termitas como lo son, el ácido fórmico y la termicina, también inhiben el crecimiento de algunos HE (Dossey et al; 2010). Sin embargo, no todas las secreciones metabólicas son producidas por las glándulas de los escarabajos, algunos investigadores han reportado que los microorganismos simbiotes, también son capaces de producir metabolitos que inhiben el crecimiento de patógenos como es el caso de los HE, con el propósito de defender al hospedero. Las hormigas cultivadoras de hongos están en simbiosis con bacterias del género *Pseudonocardia*, y estas son productoras de antibióticos, estos metabolitos inhiben el crecimiento de patógenos que las puedan afectar (Carr et al; 2012). Las bacterias *Bacillus pumilus*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus amyloliquefaciens* son bacterias Gram positivas, las cuales fueron aisladas de la plaga Salta hoja de maíz y son capaces de inhibir el crecimiento de *B. bassiana*, (Toledo et al; 2011), con base a lo anterior, se sabe que el rol que juegan los microorganismos simbiotes dentro de sus hospederos es de suma importancia, tal es el caso de *Buchnera* una bacteria simbiote del pulgón, la cual es capaz de proporcionarle los aminoácidos esenciales para que el pulgón pueda tener una buena nutrición (Chong et al; 2019). Por lo tanto, conocer la función de los microorganismos asociados a los insectos plaga, permitirá buscar e implementar nuevas técnicas de control biológico, en las que se contemple no sólo el ataque directo al hospedero

, sino también a sus simbiote. como es el caso de los estudios realizado por Chung et al., (2018), quienes han propuesto el uso de ARNi para la inhibición post-trascricional de genes asociados a bacterias simbiotes, las cuales tienen como objetivo la producción de enzimas encargadas de hidrolizar peptidoglicanos (PNG), los cuales al hidrolizarse activan el sistema inmunológico del pulgón. Esta propuesta, es una de las primeras aplicaciones en el control biológico, donde el objetivo es alterar los microorganismos simbiotes de las plagas para que estas pierdan su homeostasis y mueran.

Finalmente, uno de los objetivos de este trabajo era identificar si hay presencia de microbiomas sobre la cutícula de escarabajo *X. affinis*, confirmando la presencia de bacterias cuticulares. En estudios futuros se podrá establecer como objetivo conocer el papel que juegan los microorganismos simbiotes dentro de su hospedero y los mecanismos de defensa que toman los insectos ante infecciones con hongos.

## 9. Conclusión

La susceptibilidad de los escarabajos *X. affinis* ante la infección por hongos entomopatógenos fue más alta en insectos criados en laboratorio, en comparación con la mortalidad de insectos recolectados de campo a una concentración de  $1 \times 10^8$  con/mL utilizando a *B. bassiana*. Asimismo, el protocolo de extracción de ADN cuticular permitió extraer el ADN necesario para poder desarrollar con éxito la PCR, sin embargo, la diferencia de la susceptibilidad aún no se puede asociar a alguna bacteria específica, ya que únicamente se logró amplificar la región V3-V4, del RNA 16S, como primer indicio de la presencia de bacterias cuticulares.

## 10 Perspectivas

Con base a los resultados obtenidos en este proyecto y la literatura consultada, sabemos que el microbioma juega un papel importante ante la defensa de su hospedero a infecciones por patógenos, por lo tanto, estudiar la asociación que existe entre ellos podría contribuir en la implementación de técnicas más sofisticadas para MIP. Entonces, secuenciar las muestras de ADN extraídas y analizarlas, sería un primer indicio para conocer la relación del microbioma bacteriano y el hospedero y si este influye ante la susceptibilidad ante HE.

## 11. Bibliografía

- Alcantara-vargas, E. (2020). Producción y calidad de conidios de cepas de. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 91.
- Alfonso, M. (2002). Los plaguicidas botánicos y su importancia en la agricultura orgánica. *Agricultura Orgánica*, 2, 26–30.
- Álvarez Gil, M. (2015). *0740 Resistencia a Insectos Tomates*. 36(2), 100–110.
- Angel-Cuapio, A., Figueroa-Montero, A., Favela-Torres, E., Viniegra-González, G., Perraud-Gaime, I., & Loera, O. (2015). Critical Values of Porosity in Rice Cultures of *Isaria fumosorosea* by Adding Water Hyacinth: Effect on Conidial Yields and Quality. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 177(2), 446–457. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1754-4>
- Banco ADN. (2020). *Programa Control De Calidad De Muestras De Adn Y Arn Programa De Control De Calidad De Muestras De Adn Y Arn*. 2–10. [https://cit.ligue-cancer.net/CIT\\_Public/images/stories/CIT/pdf/WebSite CIT- QC PF Saint-](https://cit.ligue-cancer.net/CIT_Public/images/stories/CIT/pdf/WebSite%20CIT-QC%20PF%20Saint-)
- Batista, D., Carvalho, A. P., Costa, R., Coutinho, R., Dobretsov, S., Verstraete, W., Burmølle, M., Webb, J. S., Rao, D., Hansen, L. H., Sørensen, S. J., Kjelleberg, S., Donlan, R. M., Huang, S., Hadfield, M. G., Parry, J. D., Verstraete, W., & Sherr, E. B. (2002). Comparative integrated omics: identification of key functionalities in microbial community-wide metabolic networks. *npj Biofilms and Microbiomes*, 57(6), 10–13. <https://doi.org/10.1038/npjbio>
- Biedermann, P. H. W. (2020). Cooperative Breeding in the Ambrosia Beetle *Xyleborus affinis* and Management of Its Fungal Symbionts. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 8(November), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fevo.2020.518954>
- Birer, C., Tysklind, N., Zinger, L., & Duplais, C. (2017). Comparative analysis of DNA extraction methods to study the body surface microbiota of insects: A case study with ant cuticular bacteria. *Molecular Ecology Resources*, 17(6), e34–e45. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12688>
- Bisset, L. J. a. (2002). Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 54(3), 202–219.
- Boucias, D. G., Zhou, Y., Huang, S., & Keyhani, N. O. (2018). Microbiota in insect fungal pathology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(14), 5873–5888. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9089-z>
- Breitwieser, F. P., Lu, J., & Salzberg, S. L. (2018). A review of methods and databases for metagenomic classification and assembly. *Briefings in Bioinformatics*, 20(4), 1125–1139. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx120>
- Cardoza, Y. J., Klepzig, K. D., & Raffa, K. F. (2006). Bacteria in oral secretions of an endophytic insect

- inhibit antagonistic fungi. *Ecological Entomology*, 31(6), 636–645.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.2006.00829.x>
- Carr, G., Derbyshire, E. R., Caldera, E., Currie, C. R., & Clardy, J. (2012). Antibiotic and antimalarial quinones from fungus-growing ant-associated *pseudonocardia* sp. *Journal of Natural Products*, 75(10), 1806–1809. <https://doi.org/10.1021/np300380t>
- Castrejón-Antonio, Jesús E., Tamez-Guerra, P., Montesinos-Matías, R., Ek-Ramos, M. J., Garza-López, P. M., & Arredondo-Bernal, H. C. (2020). Selection of *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae) strains to control *Xyleborus affinis* (Curculionidae: Scolytinae) females. En *PeerJ* (Vol. 2020, Número 7). <https://doi.org/10.7717/peerj.9472>
- Castrejón-Antonio, Jesús Enrique, Montesinos-Matías, R., Acevedo-Reyes, N., Tamez-Guerra, P., Ayala-Zermeño, M. Á., Berlanga-Padilla, A. M., & Arredondo-Bernal, H. C. (2017). Especies de *xyleborus* (coleoptera: curculionidae: scolytinae) asociados a huertos de aguacate en Colima, México. *Acta Zoológica Mexicana (N.S.)*, 33(1). <https://doi.org/10.21829/azm.2017.3311028>
- Chandler, D. (2017). Basic and Applied Research on Entomopathogenic Fungi. *Microbial Control of Insect and Mite Pests: From Theory to Practice*, 69–89. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803527-6.00005-6>
- Chong, R. A., Park, H., & Moran, N. A. (2019). Genome Evolution of the Obligate Endosymbiont *Buchnera aphidicola*. *Molecular Biology and Evolution*, 36(7), 1481–1489. <https://doi.org/10.1093/molbev/msz082>
- Chouvenc, T., Efstathion, C. A., Elliott, M. L., & Su, N. Y. (2013). Extended disease resistance emerging from the faecal nest of a subterranean termite. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 280(1770). <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.1885>
- Chung, S. H., Jing, X., Luo, Y., & Douglas, A. E. (2018). Targeting symbiosis-related insect genes by RNAi in the pea aphid-*Buchnera* symbiosis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 95(March), 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2018.02.004>
- Cooperband, M. F., Stouthamer, R., Carrillo, D., Eskalen, A., Thibault, T., Cossé, A. A., Castrillo, L. A., Vandenberg, J. D., & Rugman-Jones, P. F. (2016). Biology of two members of the *Euwallacea fornicatus* species complex (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), recently invasive in the U.S.A., reared on an ambrosia beetle artificial diet. *Agricultural and Forest Entomology*, 18(3), 223–237. <https://doi.org/10.1111/afe.12155>
- Corless, C. E., Guiver, M., Borrow, R., Edwards-Jones, V., Kaczmarek, E. B., & Fox, A. J. (2000). Contamination and sensitivity issues with a real-time universal 16s rRNA PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(5), 1747–1752. <https://doi.org/10.1128/jcm.38.5.1747-1752.2000>
- del Puerto Rodríguez, A. M., Suárez Tamayo, S., & Palacio Estrada, D. E. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 52(3), 372–387.
- Dillon, R. J., Vennard, C. T., Buckling, A., & Charnley, A. K. (2005). Diversity of locust gut bacteria protects against pathogen invasion. *Ecology Letters*, 8(12), 1291–1298. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2005.00828.x>
- Dossey, A. T. (2010). Insects and their chemical weaponry: New potential for drug discovery. *Natural Product Reports*, 27(12), 1737–1757. <https://doi.org/10.1039/c005319h>
- Eilenberg, J., Hajek, A., & Lomer, C. (2001). Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl*, 46(4), 387–400. <https://doi.org/10.1023/A:1014193329979>

- Engel, P., & Moran, N. A. (2013). The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 699–735. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12025>
- EPA. (2010). *Control de plagas y uso seguro de pesticidas para consumidores*. <https://espanol.epa.gov/espanol/control-de-plagas-y-uso-seguro-de-pesticidas-para-consumidores>
- FAO. (2014). *Código Internacional de conducta para la distribución y utilización de plaguicidas. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación*. <http://www.fao.org/3/i3604s/i3604s.pdf>
- Federici, B. A. (1997). Baculovirus Pathogenesis. *The Baculoviruses*, 33–59. [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1834-5\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1834-5_3)
- Hernández, M., Quijada, N. M., Rodríguez-Lázaro, D., & Eiros, J. M. (2020). Aplicación de la secuenciación masiva y la bioinformática al diagnóstico microbiológico clínico. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(2), 150–161. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.06.003>
- Hulcr, J., Atkinson, T. H., Cognato, A. I., Jordal, B. H., & McKenna, D. D. (2015). Morphology, Taxonomy, and Phylogenetics of Bark Beetles. En *Bark Beetles: Biology and Ecology of Native and Invasive Species* (Número May 2016). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417156-5.00002-2>
- Ibarra-Juarez, L. A., Burton, M. A. J., Biedermann, P. H. W., Cruz, L., Desgarenes, D., Ibarra-Laclette, E., Latorre, A., Alonso-Sánchez, A., Villafan, E., Hanako-Rosas, G., López, L., Vázquez-Rosas-Landa, M., Carrion, G., Carrillo, D., Moya, A., & Lamelas, A. (2020). Evidence for Succession and Putative Metabolic Roles of Fungi and Bacteria in the Farming Mutualism of the Ambrosia Beetle *Xyleborus affinis*. *mSystems*, 5(5), 1–22. <https://doi.org/10.1128/msystems.00541-20>
- Iij, A. E. M., Crane, J. H., & Smith, J. A. (2008). *La Marchitez del Laurel : Una Amenaza para el Laurel Rojo, Aguacate ( Persea americana ) y otros Arboles Relacionados en Patios Urbanos y Rurales*. 1–8. [http://miami-dade.ifas.ufl.edu/pdfs/tropical\\_fruit/La\\_Marchitez\\_del\\_Laurel.pdf](http://miami-dade.ifas.ufl.edu/pdfs/tropical_fruit/La_Marchitez_del_Laurel.pdf)
- Illumina. (2013). 16S Metagenomic Sequencing Library. *Illumina.com*, B, 1–28. [http://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry\\_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf](http://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf)
- INEGI. (2017). *Encuesta Nacional Agropecuaria 2017*. INEGI. <https://www.inegi.org.mx/rnm/index.php/catalog/498>
- Jenkins, N. E., Heviefo, G., Langewald, J., Cherry, A. J., & Lomer, C. J. (1998). Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. *Biocontrol News and Information*, 19(1), 21–32.
- Josef, J. A., Fisk, M. R., & Giovannoni, S. (2007). *in Microbial Enrichment Cultures 1*. 209(January), 89–98.
- Karam Calderón, M., Ramírez, G., Bustamante Montes, L., & Manuel Galván, J. (2004). Plaguicidas y salud de la población. *CIENCIA ergo-sum, Revista Científica Multidisciplinaria de Prospectiva*, 11(3), 246–254.
- Keifer, G., & Effenberger, F. (1967). Control de plagas y enfermedades de los cultivos. *Angewandte Chemie International Edition*, 6(11), 951–952.
- Kikuchi, Y., Hayatsu, M., Hosokawa, T., Nagayama, A., Tago, K., & Fukatsu, T. (2012). Symbiont-mediated insecticide resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

- United States of America*, 109(22), 8618–8622. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200231109>
- Lee, S. M., & Ryu, C. M. (2021). Algae as New Kids in the Beneficial Plant Microbiome. *Frontiers in Plant Science*, 12(February), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.599742>
- Lopez-Perez, M., Rodriguez-Gomez, D., & Loera, O. (2015). Production of conidia of *Beauveria bassiana* in solid-state culture: Current status and future perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology*, 35(3), 334–341. <https://doi.org/10.3109/07388551.2013.857293>
- Lucas Alejandro Fadda, Luis Arturo Ibarra Juárez, A. L.-N. (2021). *Escarabajos ambrosiales: demografía y cambio climático*. <https://www.inecol.mx/inecol/index.php/es/ct-menu-item-25/ct-menu-item-27/17-ciencia-hoy/1117-escarabajos-ambrosiales-demografia-y-cambio-climatico>
- Malpartida-Zevallos, J., Narrea-Cango, M., & Dale-Larraburre, W. (2013). PATOGENICIDAD DE *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill., SOBRE EL GUSANO DEFOLIADOR DEL MARACUYÁ *Dione juno* (Cramer) (Lepidoptera: Nymphalidae) EN LABORATORIO. *Ecología Aplicada*, 12(1–2), 75. <https://doi.org/10.21704/rea.v12i1-2.440>
- Mantzoukas, S., Milonas, P., Kontodimas, D., & Angelopoulos, K. (2013). Interaction between the entomopathogenic bacterium *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and two entomopathogenic fungi in bio-control of *Sesamia nonagrioides* (Lefebvre) (Lepidoptera: Noctuidae). *Annals of Microbiology*, 63(3), 1083–1091. <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0565-x>
- Mayfield, A. E., Peña, J. E., Crane, J. H., Smith, J. A., Branch, C. L., Ottoson, E. D., & Hughes, M. (2008). Ability of the redbay ambrosia beetle (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) to bore into young avocado (Lauraceae) plants and transmit the laurel wilt pathogen (*Raffaelea* sp.). *Florida Entomologist*, 91(3), 485–487. [https://doi.org/10.1653/0015-4040\(2008\)91\[485:AOTRAB\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1653/0015-4040(2008)91[485:AOTRAB]2.0.CO;2)
- Michalik, A., Jankowska, W., Kot, M., Gołas, A., & Szklarzewicz, T. (2014). Symbiosis in the green leafhopper, *Cicadella viridis* (Hemiptera, Cicadellidae): Association in statu nascendi? *Arthropod Structure and Development*, 43(6), 579–587. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2014.07.005>
- Morton, J. F. (2007). The impact of climate change on smallholder and subsistence agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(50), 19680–19685. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701855104>
- Muñiz-Paredes, F., Miranda-Hernández, F., & Loera, O. (2017). Production of conidia by entomopathogenic fungi: from inoculants to final quality tests. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(3), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2229-2>
- NUNES, M., MACHADO, O., PIRES, W., & BOTTON, M. (2016). *Procedimentos para calibração, utilização e manutenção da torre de Potter para experimentação científica*. November. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.26123.90409>
- Ortiz-Urquiza, A., & Keyhani, N. O. (2013). Action on the surface: Entomopathogenic fungi versus the insect cuticle. *Insects*, 4(3), 357–374. <https://doi.org/10.3390/insects4030357>
- Pais, R., Lohs, C., Wu, Y., Wang, J., & Aksoy, S. (2008). The obligate mutualist *Wigglesworthia glossinidia* influences reproduction, digestion, and immunity processes of its host, the tsetse fly. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(19), 5965–5974. <https://doi.org/10.1128/AEM.00741-08>

- Pedrini, N., Ortiz-Urquiza, A., Huarte-Bonnet, C., Fan, Y., Juárez, M. P., & Keyhani, N. O. (2015). Tenebrionid secretions and a fungal benzoquinone oxidoreductase form competing components of an arms race between a host and pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(28), E3651–E3660. <https://doi.org/10.1073/pnas.1504552112>
- Pérez Álvarez, S., Ávila Quezada, G., & Coto Arbelo, O. (2015). Revisión bibliográfica El aguacatero (Persea americana Mill). *Cultivos Tropicales*, *36*(2), 111–123. <http://ediciones.inca.edu.cu>
- Pérez Silva, M., Equihua Martínez, A., & Atkinson, T. (2015). Identificación de las especies mexicanas del género Xyleborus Eichhoff, 1864 (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Insecta mundi : a journal of world insect systematics*, *1864*(January), 1–35.
- Pham, T. A., Kim, J. J., & Kim, K. (2010). Optimization of Solid-State Fermentation for Improved Conidia Production of Beauveria bassiana as a Mycoinsecticide. *Mycobiology*, *38*(2), 137. <https://doi.org/10.4489/myco.2010.38.2.137>
- Qu, S., & Wang, S. (2018). Interaction of entomopathogenic fungi with the host immune system. *Developmental and Comparative Immunology*, *83*, 96–103. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.01.010>
- Rabaglia, R. J., Dole, S. A., & Cognato, A. I. (2006). Review of American Xyleborina (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) occurring north of Mexico, with an illustrated key. *Annals of the Entomological Society of America*, *99*(6), 1034–1056. [https://doi.org/10.1603/0013-8746\(2006\)99\[1034:ROAXCC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2006)99[1034:ROAXCC]2.0.CO;2)
- Ramírez, H. G., Torres, E., & Aguila, D. (2014). *MANUAL DE PRODUCCIÓN Y USO DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS*.
- Ramya, S. L., Venkatesan, T., Srinivasa Murthy, K. S., Jalali, S. K., & Verghese, A. (2016). Detection of carboxylesterase and esterase activity in culturable gut bacterial flora isolated from diamondback moth, *Plutella xylostella* (Linnaeus), from India and its possible role in indoxacarb degradation. *Brazilian Journal of Microbiology*, *47*(2), 327–336. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.01.012>
- Rodríguez del Bosque, L. A., & Arredondo Bernal, H. C. (2007). *Teoría y aplicación del control biológico*. [http://www.ucv.ve/fileadmin/user\\_upload/facultad\\_agronomia/Zoologia\\_Agricola/Manejo\\_Integrado/Material\\_Interes/Libro\\_CB\\_Arredondo-Rodriguez\\_2007\\_Control\\_Biologico.pdf](http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_agronomia/Zoologia_Agricola/Manejo_Integrado/Material_Interes/Libro_CB_Arredondo-Rodriguez_2007_Control_Biologico.pdf)
- Rubin, B. E. R., Sanders, J. G., Hampton-Marcell, J., Owens, S. M., Gilbert, J. A., & Moreau, C. S. (2014). DNA extraction protocols cause differences in 16S rRNA amplicon sequencing efficiency but not in community profile composition or structure. *MicrobiologyOpen*, *3*(6), 910–921. <https://doi.org/10.1002/mbo3.216>
- SADER-SIAP. (2020). *Presentación del Panorama Agroalimentario 2020: Un reconocimiento a los héroes de la alimentación*. <https://www.gob.mx/siap/articulos/presentacion-del-panorama-agroalimentario-2020-un-reconocimiento-a-los-heroes-de-la-alimentacion?idiom=es>
- SAGARPA. (2006). *Proyecto de Evaluación Alianza para el Campo 2006*. <https://www.agricultura.gob.mx/sites/default/files/sagarpa/document/2019/01/28/1608/01022019-analisis-integral-del-gasto-publico-agropecuario-en-mexico.pdf>
- Saucedo-Carabez, J. R., Ploetz, R. C., Konkol, J. L., Carrillo, D., & Gazis, R. (2018). Partnerships Between Ambrosia Beetles and Fungi: Lineage-Specific Promiscuity Among Vectors of the

- Laurel Wilt Pathogen, *Raffaelea lauricola*. *Microbial Ecology*, 76(4), 925–940.  
<https://doi.org/10.1007/s00248-018-1188-y>
- Seiber, J. N., Coats, J., Duke, S. O., & Gross, A. D. (2014). Biopesticides: State of the Art and Future Opportunities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(48), 11613–11619.  
<https://doi.org/10.1021/jf504252n>
- Shahi, S. K., Freedman, S. N., & Mangalam, A. K. (2017). Gut microbiome in multiple sclerosis: The players involved and the roles they play. *Gut Microbes*, 8(6), 607–615.  
<https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1349041>
- Simon, C., & Daniel, R. (2011). Metagenomic analyses: Past and future trends. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(4), 1153–1161. <https://doi.org/10.1128/AEM.02345-10>
- Sinha, K. K., Choudhary, A. K., & Kumari, P. (2016). Entomopathogenic Fungi. En *Ecofriendly Pest Management for Food Security*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803265-7.00015-4>
- Sivakumar, G., Rangeshwaran, R., Yandigeri, M. S., Mohan, M., Venkatesan, T., Ballal, C. R., Ramanujam, B., Yalashetti, S., Kumari, S., & Verghese, A. (2017). Characterization and role of gut bacterium *Bacillus pumilus* on nutrition and defense of leafhopper (*Amrasca biguttula biguttula*) of cotton. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 87(4), 534–539.
- Toledo, A. V., Alippi, A. M., & De Remes Lenicov, A. M. M. (2011). Growth inhibition of *Beauveria bassiana* by bacteria isolated from the cuticular surface of the corn leafhopper, *Dalbulus maidis* and the planthopper, *Delphacodes kuscheli*, two important vectors of maize pathogens. *Journal of Insect Science*, 11, 1–13. <https://doi.org/10.1673/031.011.0129>
- Trivelli Dell’Orto, H., & Arias Velázquez, C. J. (1985). Familia curculionidae. *Insectos que dañan granos productos almacenados*, 146.
- Tuncer, C., Kushiyevev, R., Erper, I., Ozdemir, I. O., & Saruhan, I. (2019). Efficacy of native isolates of *metarhizium anisopliae* and *beauveria bassiana* against the invasive ambrosia beetle, *xylosandrus germanus blandford* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 29(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/s41938-019-0132-x>
- Ulrich, K. R., Feldlaufer, M. F., Kramer, M., & St. Leger, R. J. (2015). Inhibition of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* sensu lato in vitro by the bed bug defensive secretions (E)-2-hexenal and (E)-2-octenal. *BioControl*, 60(4), 517–526.  
<https://doi.org/10.1007/s10526-015-9667-2>
- Van Leeuwen, T., Dermauw, W., Mavridis, K., & Vontas, J. (2020). Significance and interpretation of molecular diagnostics for insecticide resistance management of agricultural pests. *Current Opinion in Insect Science*, 39, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.03.006>
- van Lenteren, J. C., Bueno, V. H., Luna, M. G., & C. (2019). *Biological Control in Latin America and the Caribbean: 308 Its Rich History and Bright Future* (CABI). 2019.
- Vargas, R., Olivares, N., Ubilo, A. (2008). Manejo Integrado de Resistencia ( MIR ) y selectividad de plaguicidas. *Manejo de plagas en paltos y cítricos*, March, 80–91.
- Wang, C., & Wang, S. (2017). Insect Pathogenic Fungi: Genomics, Molecular Interactions, and Genetic Improvements. *Annual Review of Entomology*, 62, 73–90.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-ento-031616-035509>
- Ye, S. D., Ying, S. H., Chen, C., & Feng, M. G. (2006). New solid-state fermentation chamber for bulk production of aerial conidia of fungal biocontrol agents on rice. *Biotechnology Letters*, 28(11), 799–804. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9004-z>

## 12. Anexos

### Dieta artificial de laboratorio (Cooperband et al; 2016)

Dieta con antibiótico para escarabajos de laboratorio para 900 ml de H <sub>2</sub> O		Dieta sin antibiótico para escarabajos de campo para 900 ml de H <sub>2</sub> O	
Tetraciclina	0.65g	Tetraciclina	-
Sales de Wesson	1.8 g	Sales de Wesson	2.8 g
Levadura de cerveza	9 g	Levadura de cerveza	9 g
Fécula de maíz	9 g	Fécula de maíz	9 g
Peptona de caseína	9 g	Peptona de caseína	9 g
Agar	36 g	Agar	36 g
Sacarosa	18 g	Sacarosa	18 g
Aceite de germen de trigo	4.5 ml	Aceite de germen de trigo	4.5 ml
Etanol 96 %	9 ml	Etanol 96 %	9 ml
Aserrín de aguacate	135 g	Aserrín de aguacate	135 g

### Buffer Tampón- A

TrisCl 20 mM pH 8

EDTA sódico 2 mM

Tritón al 1.2% X-100

### Gel de agarosa

El gel de agarosa se preparó con 1.65 g de agarosa y 110 ml buffer TE 10X de QIAGEN, el cual se diluyo a 1X.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00290

Matrícula: 2192802209

Estudio del microbioma asociado a *Xyleborus affinis* y su relación con la resistencia a infecciones por hongos entomopatógenos



Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 16:00 horas del día 17 del mes de junio del año 2021 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

- DR. JAVIER BARRIOS GONZALEZ
- DRA. NOHEMI GARCIA ORTIZ
- DR. ROBERTO MONTESINOS MATIAS
- DR. JOSE MIGUEL ANGEL CASTILLO MINJAREZ

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA

DE: CITLALY CANDO NARVAEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

CITLALY CANDO NARVAEZ

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCÍA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. JAVIER BARRIOS GONZALEZ

VOCAL

DRA. NOHEMI GARCIA ORTIZ

VOCAL

DR. ROBERTO MONTESINOS MATIAS

SECRETARIO

DR. JOSE MIGUEL ANGEL CASTILLO MINJAREZ