



ARTÍCULO CIENTÍFICO

MICANGIO MESONOTAL DEL ESCARABAJO AMBROSIAL
Xylosandrus curtulus (EICHHOFF, 1869) (CURCULIONIDAE:
SCOLYTINAE) EN ZIRACUARETIRO, MICHOACÁN, MÉXICO.

Francisca De la Cruz-Martínez 

Jesús Romero Nápoles

Armando Equihua Martínez

José Abel López Buenfil

Brenda Torres Huerta

¹Colegio de Postgraduados, Montecillo

iap.francis.delacruz@gmail.com

jnapoles@colpos.mx

equihuaa@colpos.mx

abel.lopez@colpos.mx brendth@gmail.com

 iap.francis.delacruz@gmail.com

Carretera México-Texcoco km 36.5, Montecillo, C. P. 56230 Texcoco, Estado de México, México.

Folia Entomológica Mexicana (nueva serie), 6(2): 19-26, 2020.

Recibido: 14 de noviembre 2019.

Aceptado: 22 de julio 2020.

Publicado en línea: 31 de agosto 2020.

MICANGIO MESONOTAL DEL ESCARABAJO AMBROSIAL *Xylosandrus curtulus* (EICHHOFF, 1869) (CURCULIONIDAE: SCOLYTINAE) EN ZIRACUARETIRO, MICHOACÁN, MÉXICO.

Micangio mesonotal del escarabajo ambrosial *Xylosandrus curtulus* (Eichhoff, 1869) (Curculionidae: Scolytinae) en Ziracuaretiro, Michoacán, México.

Francisca De la Cruz-Martínez^{1*}, Jesús Romero Nápoles¹, Armando Equihua Martínez¹, José Abel López Buenfil¹, Brenda Torres Huerta¹.

¹Posgrado en Fitosanidad-Entomología y Acarología, Colegio de Postgraduados, Montecillo.

²Dirección de Investigación, Colegio de Postgraduados, Montecillo.

*Autor de correspondencia: iap.francis.delacruz@gmail.com

RESUMEN. La relación simbiótica entre escarabajos descortezadores y sus hongos asociados ha sido un tema de importancia mundial ampliamente estudiado en áreas forestales; sin embargo, recientemente ha despertado un interés muy especial el estudio de los escarabajos de los géneros *Xyleborus*, *Xylosandrus*, *Euwallacea* y sus hongos ambrosiales; estos escarabajos han desarrollado una estructura especializada similar a un saco (micangio) para la transmisión del simbionte fúngico y la dispersión en árboles hospedantes, también pueden introducir hongos fitopatógenos en ambientes naturales y áreas cultivadas. Tomando en cuenta esta información, los objetivos del presente trabajo fueron tipificar el micangio mesonotal así como identificación taxonómica y caracterización molecular de *Xylosandrus curtulus*. El estudio se realizó en escarabajos ambrosiales recolectados en 2019 en un huerto comercial de aguacate Hass, mediante trapeo con etanol y agua destilada como medio de recolecta, en Ziracuaretiro, Michoacán. Los escarabajos se preservaron en agua destilada y bajo condiciones de -5 °C para mantener hidratados los tejidos y áreas membranosas. Se recolectaron 76 hembras y la especie se determinó con las claves taxonómicas y mediante un análisis molecular corroborando la identidad de *Xylosandrus curtulus*, además se generó un árbol filogenético que muestra su polifilia, e indica la cercanía con otros géneros de escarabajos ambrosiales de la tribu Xyleborini. El micangio de este escolítido consiste en un par de sacos oblongos, hialinos y membranosos, embebidos en la cavidad del mesotórax y funciona como una estructura de almacenaje de simbiontes fúngicos, los cuales han sido los más estudiados por su impacto en áreas forestales. También se contribuye con cuatro secuencias de ADN de esta especie de escolítido, debido a que no existen registros de ésta en la base de datos del NCBI Genbank.

Palabras clave: aguacate, trapeo, agua destilada, sacos, simbiontes fúngicos, polifileticos.

ABSTRACT. The symbiotic relationship between bark beetles and their associated fungi has been a topic of worldwide importance widely studied in forest areas; however, recently the study of beetles of the genera *Xyleborus*, *Xylosandrus*, *Euwallacea* and their ambrosial fungi has aroused a very special interest. These beetles have developed a specialized structure similar to a sack (mycangium) for the transmission of fungal symbiont and dispersion in host trees; they can also introduce phytopathogenic fungi into natural environments and cultivated areas. Taking this information into account, the objectives of this work were to typify the mesonotal mycangium of *Xylosandrus curtulus* and molecular characterization of the species. The study was carried out with ambrosial beetles collected in 2019 in a commercial Hass avocado orchard, by trapping with ethanol and distilled water as a collection medium, in Ziracuaretiro, Michoacán. The beetles were preserved in distilled water and under conditions of -5 °C to keep the tissues and membrane areas hydrated. In total 76 females were collected and the species was determined with the taxonomic keys and through a molecular analysis corroborating the identity of *Xylosandrus curtulus*, in addition a phylogenetic tree was generated that shows its polyphilia, and indicates the proximity with other genera of ambrosial beetles of the Xyleborini tribe. The mycangium of this scolytid consists of a pair of oblong, hyaline and membranous sacs, embedded in the cavity of the mesothorax and functions as a storage structure of fungal symbionts, which have been the most studied for their impact on forest areas. It will also contribute with four DNA sequences of this scolytid species, because there are not records of it in the NCBI Genbank database.

Keywords: avocado, trapping, distilled water, sacks, fungal symbionts, polyphyletic.

INTRODUCCIÓN

La relación simbiótica entre escarabajos descortezadores y sus hongos asociados presenta una relevancia mundial, por lo que han sido estudiados ampliamente en áreas forestales; sin embargo, recientemente ha despertado un interés muy especial el estudio de los escarabajos de los géneros *Xyleborus*, *Xylosandrus*, *Euwallacea* y sus hongos ambrosiales. En ese sentido, en la Unión Europea se realizó el estado del arte de los escarabajos ambrosiales del género *Xylosandrus*, por considerarlos un riesgo en viveros forestales y en el comercio de plantas; por esta razón, de 2014 a 2017 se incluyeron sitios de inspección en España, Francia e Italia (Vannini *et al.*, 2018). Asimismo, en Estados Unidos las investigaciones están enfocadas a tópicos de evolución ecológica, patogenicidad y manejo, incluyendo a *Xylosandrus amputatus* (Blandorf, 1894), *X. compactus* (Eichhoff, 1876), *X. crassiusculus* (Motschulsky, 1866), *X. discolor* (Blandford, 1898) y *X. germanus* (Blandorf, 1894).

En México, el escarabajo ambrosial *Xylosandrus curtulus* (Eichhoff, 1869) se encuentra distribuido en Campeche, Chiapas, Colima, Hidalgo, Jalisco, Morelos, Nayarit, Oaxaca, San Luis Potosí, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán (Atkinson, 2012); posteriormente Lázaro (2019) cita a *Xylosandrus curtulus*, como primer registro para Michoacán recolectado a trampas en huertas de aguacate.

Estos escarabajos han desarrollado una estructura especializada similar a un saco (micangio) para la transmisión del simbionte fúngico y la dispersión en árboles hospedantes (Batra, 1963), también pueden

introducir hongos fitopatógenos en ambientes naturales y áreas cultivadas, por ejemplo, *Raffaelea lauricola* Harr (2008) (Ascomycota: Ophiostomataceae) asociada a *Xyleborus glabratus* (O'Donnell *et al.*, 2015), ambos amenazando el cultivo de aguacate en la costa este de Estados Unidos de América. Algunos hongos asociados a especies del género *Xylosandrus* son patogénicos, por ende, si se establecieran en áreas naturales los daños podrían ser catastróficos (Vannini *et al.*, 2018).

Tomando en cuenta esta información, los objetivos del presente trabajo fueron tipificar el micangio mesonotal así como la identificación taxonómica y caracterización molecular de *Xylosandrus curtulus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en escarabajos ambrosiales recolectados en cuatro fechas comprendidas entre el 2 y 8 de junio de 2019, en el huerto comercial de aguacate Hass “La Ziranda”, el cual cuenta con una superficie de 3.5 ha, localizado en Ziracuaretiro, Michoacán. Para la captura se utilizaron ocho trampas con etanol como atrayente y agua destilada como medio de recolecta, las cuales se colocaron a una altura de 1.60 m y distancia aproximada de 40 m.

Las trampas fueron similares a las empleadas por Lázaro (2019), se elaboraron a base de botellas de PET con capacidad de 2 L, con una abertura lateral de 11 x 10 cm, microtubos de 50 mL con agua destilada como medio de colecta; el atrayente se colocó por separado en la pared interna de la botella en microtubos de 14 mL; el agua destilada se cambió en cada revisión. Las trampas se sujetaron a los árboles con un gancho de alambre (Fig. 1).



Figura 1. Trampa colocada en el árbol de aguacate.

Para la identificación de la especie de Scolytinae se utilizaron las claves de Wood (1982) y material de referencia depositado en la Colección de Insectos del Colegio de Postgraduados (CEAM).

Descripción el micangio mesonotal. Con respecto a la descripción de esta estructura, se tomaron ocho especímenes almacenados en agua destilada y bajo condiciones de $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$, se descongelaron uno a uno por un lapso de cinco minutos, mediante la disección manual, con ayuda de un microscopio estereoscópico, pinzas entomológicas (núm. 5) y pincel (000), utilizando agua o glicerina como medio de disección. Se eliminaron las partes del cuerpo, quedando sólo la parte dorsal del mesotórax, el cual se limpió con agua destilada o glicerina (Fig. 2). Esta última también se empleó para preservar las disecciones en microviales. Posteriormente, se procedió a colocar el mesotórax limpio en posición ventral, en portaobjetos con glicerina para su observación en microscopio compuesto (Fig. 3).

Caracterización molecular. Con respecto al análisis molecular del escarabajo ambrosial, se seleccionaron cuatro ejemplares, dos conservados en agua destilada y dos en alcohol al 70 %, en lo subsecuente se identificarán éstos como muestra A (1 y 2) y muestra B (3 y 4). La extracción de DNA

se realizó por el Método del CTAB - Bromuro de cetiltrimetilamonio (Doyle & Doyle, 1987) en el laboratorio de Evolución Molecular del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

La región Citocromo C Oxidasa, subunidad I (CO-I) se amplificó con los marcadores LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') y HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3'), conforme a las subunidades moleculares del ADN mitocondrial "mtDNA" (Protocolo de diagnóstico Amplificación de la región mtDNA CO-I, para la identificación de insectos por PCR punto final LC01490/HC02198-SENASICA, 2017).

Las amplificaciones de PCR se realizaron con un termociclador T100 de la marca Biorad bajo las condiciones siguientes: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 60 s, 4 ciclos a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 s, $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 90 s y $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 60 s, seguidos por 35 ciclos a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 s, $51\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 90 s y $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 60 s, finalizando con una extensión a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min.

Las muestras se analizaron en un gel de agarosa al 2.0 % con bromuro de etidio (10 mg/uL) (Sambrook y Russell, 2001) y se visualizaron en un fotodocumentador de luz UV GELDOC EZ, marca Bio Rad®, utilizando el software Image Lab (Biorad®).

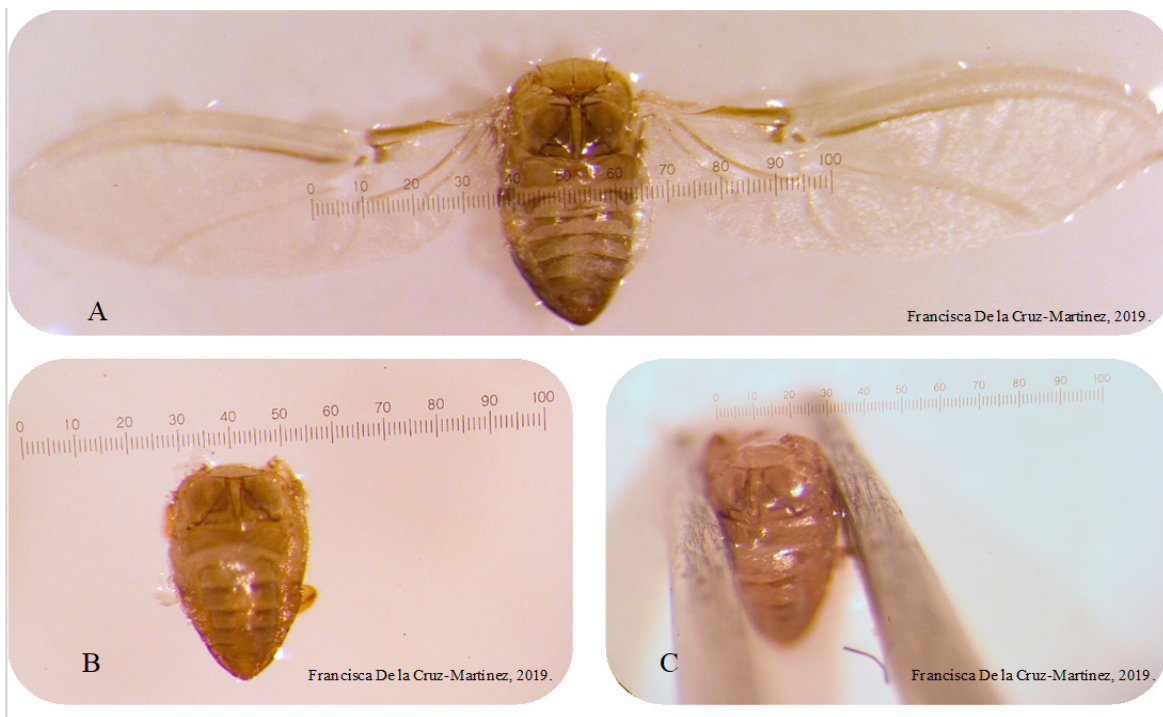


Figura 2. A) Posición dorsal del insecto, B) Eliminación de estructuras, C) Disección del escoltído.

La ampliación obtenida con los iniciadores LCO1490/HCO se purificó (ExoSAP-IT) y se secuenció (Genetic Analyzer 3100, Applied Biosystem Corp®). Las secuencias del COI obtenidas se compararon con las de referencia del GenBank, usando la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) del National Center of Biotechnology Information (NCBI).

El producto de PCR de la muestra 4B se clonó utilizando pGEM® T Easy Vector de Promega. El plásmido portador del fragmento se utilizó para transformar las células competentes One Shot® Mach1™ T1R E. coli de Invitrogen. Se seleccionaron las colonias bacterianas que lograron introducir el plásmido y se realizó extracción de ADN con el método de lisis alcalina (Sambrook y Russell, 2001). A continuación, el DNA clonado se amplificó por PCR y se secuenció en ambos sentidos con el equipo ABI PRISM 3130 de Applied Biosystems® mediante la química BigDye™ Terminator v3.1.

Las secuencias obtenidas de los productos de PCR se limpiaron y ensamblaron en el módulo SeqMan Pro del programa DNASTAR Lasergene Molecular Biology 16. Posteriormente, cada uno de los ensambles se sometieron a un análisis de homología BLAST contra la base de datos de nucleótidos del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Se generó una base de datos con secuencias de referencia obtenidas de GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) en base a los resultados del análisis de homología, todas las secuencias descargadas correspondieron a amplificaciones del gen Citocromo C Oxidasa, subunidad I (COI).

Para el análisis filogenético se incluyeron los ensambles obtenidos a partir de la secuenciación de los ejemplares de las recolectas y las bases de datos de referencia resultado de la búsqueda en el Gen Bank. El alineamiento se realizó con el programa CLUSTAL OMEGA 1.2.2 (Sievers y Higgins, 2014) y la búsqueda del mejor modelo de sustitución de nucleótidos con ModelTest-NG (Darriba *et al.*, 2019). Finalmente, la reconstrucción filogenética se realizó con Inferencia bayesiana mediante Markov Chains Monte Carlo (MCMC), implementado en el programa BEAST v1.10.4 (Suchard *et al.*, 2018) con 1,000.000 generaciones. Para la anotación del mejor árbol, se descartó el 25 % de los árboles producidos y la probabilidad posterior se determinó

con los árboles restantes, y la edición final del árbol se realizó en FigTree. Se utilizó como grupo de partida (outgroup) la secuencia KU911862.1 del GenBank correspondiente a la región del Citocromo C Oxidasa, subunidad I del escarabajo *Chrysomela tremula* Fabricius, 1787 (Coleoptera: Chrysomelidae).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Referente a la recolecta del escolítino en las trampas repartidas en el huerto, se colectó un total de 76 especímenes, por lo que se corrobora la acción del etanol, como atrayente en la captura de *Xylosandrus curtulus*, la cual fue reportada previamente por Lázaro (2019). Sólo se colectaron hembras, acorde a Wood (1982), ya que la presencia de machos es extremadamente rara (ya que no vuelan).

El agua destilada utilizada como medio de recolecta y de preservación fue de suma importancia para la conservación del micangio, tal como lo señaló Li *et al.* (2018), ya que la disección de insectos muertos, principalmente de especímenes deshidratados por su almacenamiento en alcohol, influye en la observación de micangios en *Xylosandrus*.

Con respecto a la identidad de la especie, mediante las claves y por comparación con material determinado en la colección CEAM, ésta se identificó como *Xylosandrus curtulus* (Eichhoff, 1869) (Fig. 3).

Descripción el micangio mesonotal. Se logró aislar el micangio de *Xylosandrus curtulus* y éste se puede caracterizar como un par de sacos oblongos, hialinos y membranosos, con medidas de 0.19 mm de largo por 0.19 de ancho, embebidos en la cavidad del mesotórax y adheridos a éste por un extremo (Fig. 4). De acuerdo a Li *et al.* (2018) que realizaron una revisión del micangio en varias especies asiáticas del género *Xylosandrus*, y que algunas de ellas ahora se encuentran en Estados Unidos de América, el autor encontró una alta similitud de esta estructura en las siguientes especies analizadas: *X. amputatus*, *X. compactus*, *X. crassiusculus*, *X. discolor* y *X. germanus*; en todas, la ubicación se localizó en el mesotórax, con una alta similitud en su conformación. Es importante indicar que la caracterización del micangio de *X. curtulus* no se había realizado, por lo que existe una alta probabilidad de la generalización de esta estructura en las especies del género *Xylosandrus*.

Por otro lado, Li *et al.* (2018) señalan que el micangio en los Xyleborini es un órgano que está relacionado particularmente con las hembras, que son las colonizadoras y dado que los machos son endogámicos haplo-diploides y no vuelan, probablemente no participan en la transmisión de hongos. Esta estructura abre un abanico de oportunidades, tanto sistemáticamente como biológicamente por los cambios morfológicos considerables y variabilidad intraespecífica dependiendo de las fases de la simbiosis y de la especie en cuestión.

Caracterización molecular. Los resultados de homología del BLAST indican que las cuatro secuencias de DNA obtenidas de *X. curtulus* no se encuentran en las bases de datos de la NBCI;

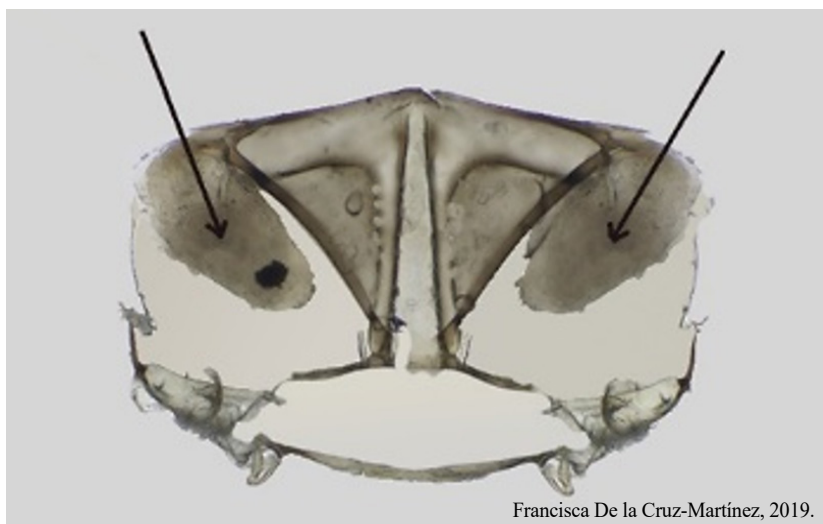
sin embargo, este escolítido está estrechamente relacionado con otros escarabajos ambrosiales, formando clados heterogéneos a nivel genérico, por lo que el CO-I no es un buen marcador para su identificación (Fig. 5).

Las ligas a las secuencias de DNA en el NBCI son:

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT316831.1?report=GenBank>
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT316832.1?report=GenBank>
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT316833.1?report=GenBank>
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT316834.1?report=GenBank>



Francisca De la Cruz-Martínez, 2019.
Figura 3. Mechón de setas en la base del protórax y declive elitoral característicos de la especie *Xylosandrus curtulus* (Eichhoff).



Francisca De la Cruz-Martínez, 2019.
Figura 4. Micangio mesonotal de *Xylosandrus curtulus* (Eichhoff).

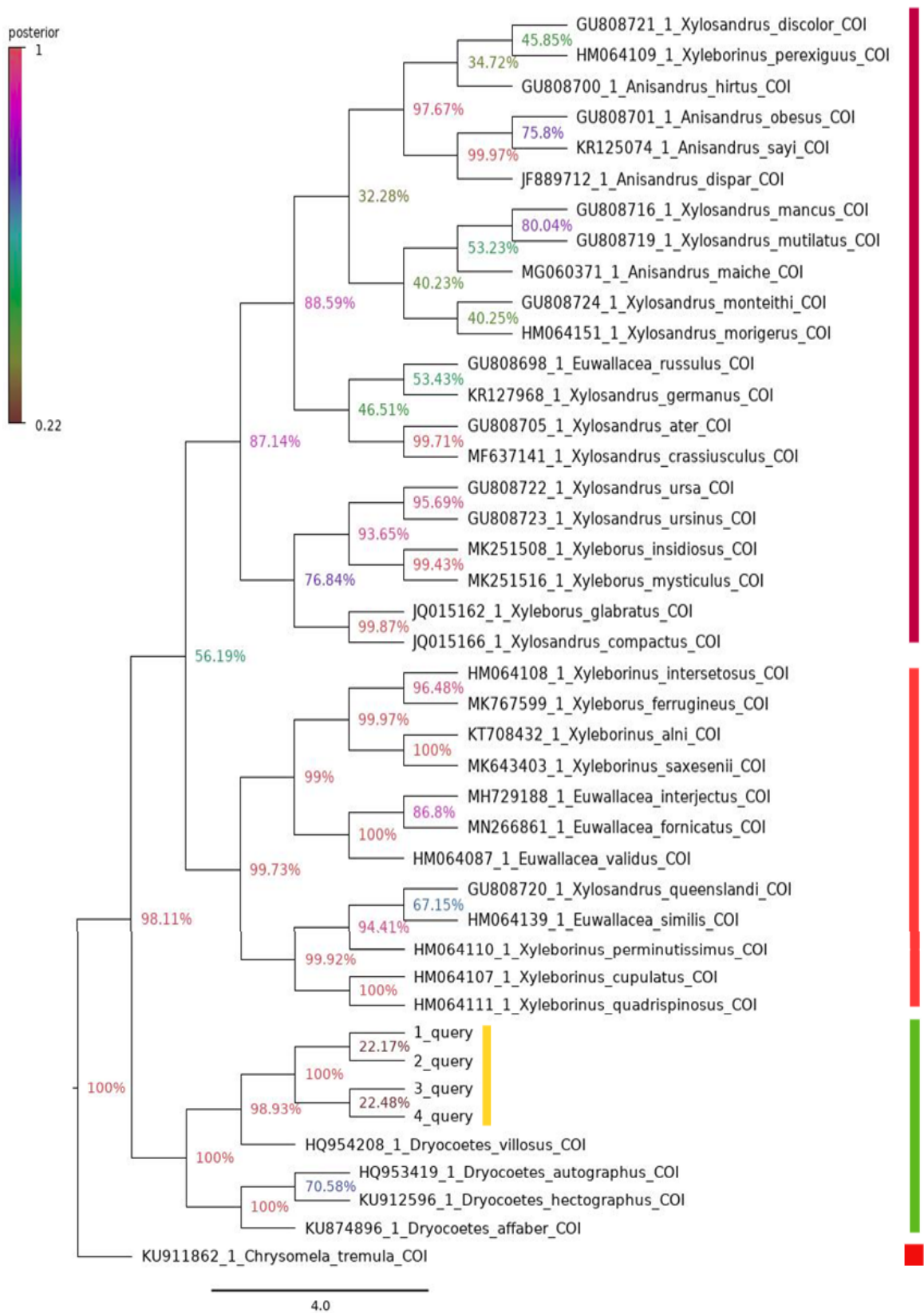


Figura 5. Árbol filogenético de consenso basado en inferencia bayesiana que ilustra la relación de especies de ambrosiales con relación a cuatro secuencias (1_query, 2_query, 3_query, 4_query) obtenidas a partir de la amplificación de la región COI de *Xylosandrus curtulus*. Los números son probabilidades posteriores.

En ese sentido, Dole *et al.* (2010) estudiaron la monofilía de *Xylosandrus*, considerando 43 especies, de las cuales 15 fueron de *Xylosandrus* y 20 de *Amasa*, *Anisandrus*, *Cnestus*, *Euwallacea* y *Xyleborus*, así como dos especies de *Coccotrypes*; se utilizaron cinco marcadores moleculares: 28S rDNA; Citocromo C Oxidasa, subunidad I (CO-I); arginina quinasa (ArgK), genes nucleares “rudimentarios” (CAD) y el Factor de Elongation 1 α (EF - 1 α). En sus resultados no obtuvieron clados limpios, a pesar de haber manejado esta diversidad de marcadores. Concluyeron que *Xylosandrus* es un grupo polifilético, por lo que requiere una revisión completa que combine datos moleculares y caracteres morfológicos claros, incluyendo una clave para las especies a nivel mundial.

Cognato *et al.* (2011) estudiaron 155 xyleborinos representados por 23 géneros, usando los mismos marcadores empleados por Dole *et al.* (2010) así como 39 caracteres morfológicos adicionales; confirmando la polifilía de *Xylosandrus*, que está dividido en cuatro clados distintos morfológicamente. Los caracteres más correlacionados con la filogenia en Xyleborini son la cluba antenal, la forma del pronoto, los micangios y el escutelo; pero, el carácter más conservado en la tribu es el micangio.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México) por la beca otorgada en la maestría para el primer autor; al Colegio de Postgraduados, campus Montecillo por el equipo, materiales y las instalaciones donde se realizaron los experimentos; a los integrantes del Comité por su apoyo, asesoría y enseñanzas en el desarrollo de la investigación; al Sr. Israel Solís Velázquez, propietario del huerto “La Ziranda” por las facilidades brindadas durante las actividades de colecta. Finalmente, a todos los amigos y colegas que me apoyaron incondicionalmente para concluir con éxito esta investigación.

LITERATURA CITADA

ATKINSON, T. H. (26-28 de octubre de 2011). *Estado de conocimiento de la taxonomía de los escarabajos*

- descortezadores y ambrosiales de México (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae)*. Pp. 13–27 (Ponencia Magistral). In: J. Villa-Castillo, A. Equihua-Martínez, D. Cibrián-Tovar, A. Burgos Solorio, E. Estrada-Venegas, R. Cerros-Tlatilpa, C. T. Cuevas-Arias y O. Burgos-Dueñas (Eds.). *Memorias del XVI Simposio Nacional de Parasitología Forestal*, Cuernavaca, Morelos, México.
- BATRA, L. R. 1963. Ecology of ambrosia fungi and their dissemination by beetles. *Transactions of the Kansas Academy of Science*, 66(2): 213-236. <https://doi.org/10.2307/3626562>
- COGNATO, A. I., J. HULCR, S. A. DOLE AND B. H. JORDAL. 2011. Phylogeny of haplo-diploid, fungus-growing ambrosia beetles (Curculionidae: Scolytinae: Xyleborini) inferred from molecular and morphological data. *Zoologica Scripta*, 40: 174–186. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6409.2010.00466.x>
- DARRIBA, D., D. POSADA, A. KOZLOV, A. STAMATAKIS, B. MOREL AND FLOURI, T. 2019. Model Test-NG: a new and scalable tool for the selection of DNA and protein evolutionary models. *Molecular biology and evolution*. 2020;37(1):291-294. <https://doi.org/10.1093/molbev/msz189>.
- DOLE, S. A., B. H. JORDAL AND ANTHONY I. COGNATO. 2010. Polyphyly of *Xylosandrus* Reitter inferred from nuclear and mitochondrial genes (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54: 773–782. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.11.011>
- DOYLE, J. J. AND DOYLE, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11-15. Disponible en: https://webpages.uncc.edu/~jweller2/pages/BINF8350f2011/BINF8350_Readings/Doyle_plantDNAextractCTAB_1987.pdf
- LÁZARO, D. M. O. 2019. *Monitoreo de Scolytinae (Coleoptera: Curculionidae) con atrayentes químicos en huertos de aguacate en Michoacán*. Tesis Doctoral, Colegio de Postgraduados, Campus, Montecillo, Texcoco estado de México. 76, 28-31.
- LI, Y., RUAN, Y. Y., L. STANLEY, E., SKELTON, J. AND HULCR, J. 2018. Plasticity of mycangia in *Xylo-*

- sandrus* ambrosia beetles. *Insect Science*, 26(4): 732 - 742.
<https://doi.org/10.1111/1744-7917.12590>
- O'DONNELL, K., S. SINK, R. LIBESKIND-HADAS, R. C. PLOETZ, KONKOL, J. N. PLOETZ, D. CARRILLO, A. CAMPBELL, R.E. DUNCAN, M.T. KASSON, P. N. H. LIYANAGE, A. ESKALEN, D. M. GEISER, J. HULCR, J., C. BATEMAN, S. FREEMAN, Z. MENDEL, P. R. CAMPBELL, A. D. W. GEERING, T. AOKI, A. A. COSSÉ AND A. P. ROONEY. 2015. Discordant phylogenies suggest repeated host shifts in the *Fusarium*-*Euwallacea* ambrosia beetle mutualism. *Fungal Genetics and Biology*, 82: 277–290.
<https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.10.014>
- SAMBROOK, J. AND D.W. RUSSELL. 2001. *Molecular cloning a laboratory manual*. Vol. 2, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2100.
- SENASICA. 2017. Protocolo de diagnóstico fitosanitario “Amplificación de la región mtDNA CO-I, para la identificación de insectos por PCR punto final LC01490/HC02198-SENASICA”. Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, Dirección General de Sanidad Vegetal, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/327462/AMPLIFICACION_DE_LA_REGION_mtDNA_COI.PDF (Fecha de consulta: 17-VI-19).
- SIEVERS, F. AND D. G. HIGGINS. 2014. Clustal omega, accurate alignment of very large numbers of sequences. *Methods in Molecular Biology*, 1079:105-116.
https://doi.org/10.1007/978-1-62703-646-7_6
- SUCHARD, M., P. LEMEY, G. BAELE, D. AYRES, A. DRUMMOND AND A. RAMBAUT. 2018. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evolution*, 4(1): 1-5.
<https://doi.org/10.1093/ve/vey016>
- VANNINI, A., S. SPERANZA, M. CONTARINI, I. SFERRAZZA, F. MICHELANGELI AND CARMEN MORALES RODRÍGUEZ. 2018. State of the Art: The Ambrosia beetle *Xylosandrus compactus* and the symbiotic fungi: a new risk for European native flora associated to nurseries and trading of living plants. Diseases and insect forest nurseries working party meeting. International Union of Forest Research Organizations (IUFRO). Kuşadası, Turquía. Disponible en: <https://www.life-samfix.eu/wp-content/uploads/2018/11/Prezentazione-IUFRO-IzmirComp.pdf> (Fecha de consulta: 04-I-19).
- WOOD, S. L. 1982. *The Bark and Ambrosia Beetles of North and Central America (Coleoptera: Scolytidae), a taxonomic monograph* (pp. 1-1359). Great Basin Naturalist Memoirs, No. 6. Utah, EE. UU., Brigham Young University. Disponible en: <https://scholarsarchive.byu.edu/gbnm/vol6/iss1/>