



Tecnológico Nacional de México

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ

INGENIERÍA BIOQUÍMICA

INFORME TÉCNICO DE RESIDENCIA PROFESIONAL

**Biodiversidad de bacterias endosimbióticas de la larva de
Arsenura armida (Zats).**

PRESENTA:

Miriam Díaz Hernández

ASESOR INTERNO:

DR. Reiner Rincón Rosales

TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS

AGOSTO, 2016

ÍNDICE

Contenido

| | |
|---|----|
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| I. JUSTIFICACIÓN | 3 |
| III. OBJETIVOS | 4 |
| 3.1. Objetivo general..... | 4 |
| 3.1.1. Objetivos específicos | 4 |
| IV. HIPÓTESIS | 4 |
| V. PROBLEMAS A RESOLVER | 4 |
| VI. MARCO TEÓRICO | 6 |
| 6.1. Aspectos biológicos de la larva de <i>A. armida</i> | 6 |
| 6.2. Biología asociada a la larva | 6 |
| 6.2.1. Morfología general del orden Lepidóptera..... | 6 |
| 6.2.2. Morfología general del orden Lepidóptera asociado a la larva. | 7 |
| 6.2.3. Huevos | 8 |
| 6.2.4. Pupa | 9 |
| 6.3. Generalidades de la familia Saturniidae | 10 |
| 6.4. Taxonomía | 11 |
| 6.5. Distribución | 12 |
| 6.5.1. Descripción del municipio de colecta (El Bosque) | 12 |
| 6.6. Uso e importancia de la larva | 14 |
| 6.7. Asociación de bacterias al tracto digestivo de la larva | 15 |
| 6.7.1. Sistema digestivo..... | 15 |
| 6.7.2. El tracto digestivo del insecto y la microbiota | 16 |
| 6.7.3. Condiciones físicas | 16 |

| | | |
|--------|--|----|
| 6.8. | Herramientas moleculares para la identificación de las comunidades bacterianas | 17 |
| 6.8.1. | Estudio de la diversidad genética de bacterias endosimbióticas | 17 |
| 6.8.2. | Empleo de genes cromosomales..... | 18 |
| 6.8.3. | Huella genómicas (ERIC-PCR)..... | 19 |
| 6.8.4. | Gen 16S rRNA como marcador universal..... | 20 |
| 6.8.5. | Análisis de restricción de DNA ribosomal amplificado (ARDRA)..... | 21 |
| 6.8.6. | Secuenciamiento y Análisis filogenético..... | 22 |
| VII. | MATERIALES Y MÉTODOS..... | 24 |
| 7.1. | Recolección de la larva de <i>Arsenura armida</i> | 24 |
| 7.2. | Caracterización de la larva de <i>Arsenura armida</i> | 24 |
| 7.3. | Preparación de las muestras, Aislamiento y cultivo de endobacterias de la larva <i>Arsenura armida</i> | 25 |
| 7.4. | Caracterización fenotípica de las endobacterias asociadas a la larva de <i>Arsenura armida</i> | 26 |
| 7.5. | Extracción del ADN genómico de las endobacterias asociadas a la larva de <i>A. armida</i> | 26 |
| 7.5.1. | Corroboración del ADN extraído por electroforesis en gel de agarosa..... | 27 |
| 7.6. | Análisis de Huellas Genómicas ERIC-PCR | 27 |
| 7.6.1. | Corroboración del ERIC-PCR por electroforesis | 28 |
| 7.7. | Amplificación del gen 16S rRNA..... | 28 |
| 7.7.1. | Corroboración del PCR-16S por electroforesis | 29 |
| 7.8. | Análisis de restricción del gen 16S rRNA amplificado (ARDRA) | 29 |
| 7.8.1. | Corroboración por electroforesis de ARDRA | 30 |
| 7.9. | Purificación y secuenciamiento del gen 16S rRNA..... | 30 |
| 7.10. | Análisis filogenético e identificación de especies bacterianas..... | 31 |
| VIII. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 32 |

| | | |
|--------|--|----|
| 8.1. | Morfología (biología) de la larva de <i>Arsenura armida</i> | 32 |
| 8.1.1. | Caracterización morfométrica de la larva..... | 33 |
| 8.2. | Morfología macroscópica y microscópica de las cepas aisladas a partir del tracto digestivo de <i>A. armida</i> | 34 |
| 8.3. | Extracción de ADN..... | 40 |
| 8.4. | Análisis de huellas genómicas ERIC-PCR (<i>genomic fingerprinting</i>) | 41 |
| 8.5. | Amplificación del gen 16S rRNA..... | 44 |
| 8.6. | Análisis de restricción del gen 16S rRNA amplificado (ARDRA) | 46 |
| 8.7. | Purificación del gen 16S rRNA | 47 |
| 8.8. | Análisis filogenético | 49 |
| IX. | CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | 57 |
| X. | COMPETENCIAS DESARROLLADAS..... | 58 |
| XI. | ALCANCES Y LIMITACIONES..... | 59 |
| XII. | REFERENCIAS | 60 |

ÍNDICE DE FIGURAS

CONTENIDO

| | |
|--|----|
| Figura 1. Morfología y aparato bucal en Lepidóptera. Fuente: http://www.asturnatura.com/articulos/lepidopteros-mariposas/morfologia.php | 7 |
| Figura 2. Oruga de una mariposa de Lepidóptero. Fuente: | 8 |
| Figura 3. Estadios de la larva de <i>Arsenura armida</i> . (A) huevos depositados en una gran masa, (B) Larvas pequeñas creciendo en hojas de <i>Guazuma ulmifolia</i> , (C) comportamiento de las larvas en su tercer instar, (D) desplazamiento de la larva por las ramas de su hospedero para alimentarse. Imagen tomada de: http://www.mucubaji.com/guaquira/EEGNoticias48.html 9 | 9 |
| Figura 4. Pupa de Lepidóptera. Fuente: Amarillo & Wolfe (1997) | 10 |
| Figura 5. Ubicación geográfica del sitio de colecta de <i>Arsenura armida</i> . Fuente: Gobierno del Estado de Chiapas..... | 12 |
| Figura 6. Mapa de los tipos de suelos que presenta el municipio del bosque. Disponible en: http://www.ceieg.chiapas.gob.mx/perfiles/Inicio | 14 |
| Figura 7. Sistema digestivo, Sistema digestivo generalizado del insecto (adaptado de Chapman, Los insectos: estructura y función)..... | 16 |
| Figura 8. Secuencia ERIC. La secuencia de 127 pb se muestra como una horquilla; (líneas y dos puntos) conectar bases en las dos ramas complementarias en el ADN (y en el ARN). Las secuencias ERIC son de interés, ya que se han utilizado como la base de una técnica para la toma de huellas de genomas bacterianos (Versalovic et al., 1991). | 20 |
| Figura 9. Método de Sanger. Cuatro reacciones con ddNTPs diferentes permiten la síntesis de distintos fragmentos con una terminación específica. Los fragmentos se pueden separar por electroforesis y comparando los tamaños, se puede determinar la secuencia del templado. | 23 |
| Figura 10. Determinación de parámetros morfométricos de la larva de <i>Arsenura armida</i> . Foto: López, M. G., 2015. | 24 |
| Figura 11. Corte longitudinal y separación del tracto completo de la larva. | 25 |
| Figura 12. Cepas más representativas conservadas en glicerol. | 26 |
| Figura 13. Cámara y gel de electroforesis | 27 |
| Figura 14. Programa utilizado para amplificar ERIC-PCR..... | 28 |
| Figura 15. Programa utilizado para amplificar el gen 16S rRNA | 29 |

| | |
|---|----|
| Figura 16. Protocolo para la purificación de productos de PCR | 31 |
| Figura 17. Fisiología de la larva de <i>Arsenura armida</i> . Foto: López, M.G., 2015..... | 32 |
| Figura 18. Representación gráfica del promedio de los datos obtenidos a partir de las mediciones realizadas a cada larva. | 34 |
| Figura 19. Grafica circular que representa en porcentaje el número de colonias crecidas en cada medio de cultivo sólido. | 38 |
| Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la extracción de ADN total..... | 41 |
| Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa del gen 16S rRNA amplificado para cada cepa representante. | 45 |
| Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % de ARDRA..... | 46 |
| Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % de la corroboración de la eficiencia de purificación del gen 16S rRNA. | 47 |
| Figura 24. Árbol filogenético estimado por el método NJ con la secuencia del gen 16S rRNA del género <i>Bacillus/Lysinibacillus</i> sp. Las cepas aisladas del tracto digestivo de <i>A. armida</i> son señaladas en letras celestes. | 52 |
| Figura 25. Árbol filogenético estimado por el método NJ con la secuencia del gen 16S rRNA del género <i>Pseudomonas</i> sp. Las cepas aisladas del tracto digestivo de <i>A. armida</i> son señaladas en letras celestes. | 53 |
| Figura 26. Árbol filogenético estimado por el método NJ con la secuencia del gen 16S rRNA del género <i>Enterobacter</i> sp. Las cepas aisladas del tracto digestivo de <i>A. armida</i> son señaladas en letras celestes. | 54 |
| Figura 27. Árbol filogenético estimado por el método NJ con la secuencia del gen 16S rRNA del género <i>Enterococcus</i> sp. Las cepas aisladas del tracto digestivo de <i>A. armida</i> son señaladas en letras celestes. | 55 |
| Figura 28. Árbol filogenético estimado por el método NJ con la secuencia del gen 16S rRNA del género <i>Serratia</i> sp. Las cepas aisladas del tracto digestivo de <i>A. armida</i> son señaladas en letras celestes. | 56 |

ÍNDICE DE TABLAS

CONTENIDO

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Taxonomía de la especie <i>Arsenura armida</i> | 11 |
| Tabla 2. Carga de reacción para ERIC-PCR | 28 |
| Tabla 3. Carga de reacción para PCR-16S usando los primer's 27F y 1492R..... | 29 |
| Tabla 4. Carga de reacción para ARDRA | 30 |
| Tabla 5. Morfología de larva de <i>Arsenura armida</i> construida a partir de la biología de la oruga de una mariposa..... | 32 |
| Tabla 6. Morfología colonial de algunas de las cepas más representativas. | 35 |
| Tabla 7. Morfología microscópica de algunas de las cepas más representativas aisladas del tracto digestivo de <i>A. armida</i> | 39 |
| Tabla 8. Grupos con el mismo patrón de huellas genómicas | 42 |
| Tabla 9. Perfiles de huellas genómicas diferentes a partir de ERIC-PCR..... | 43 |
| Tabla 10. Perfiles de huellas genómicas diferentes a partir de ERIC-PCR (Continuación). | 44 |
| Tabla 11. Patrones de restricción formados por ARDRA | 47 |
| Tabla 12. Glosario para identificación de cepas a partir de ERIC-PCR..... | 48 |
| Tabla 13. Características de las bacterias simbióticas aisladas del sistema digestivo de <i>Arsenura armida</i> a partir del análisis filogenético realizado. | 51 |

RESUMEN

Los insectos comúnmente se asocian con una diversidad de microorganismos, comúnmente estos microorganismos están asociados al tracto digestivo y son útiles para adquirir nutrientes que mejoran su crecimiento y desarrollo. Es muy común que las especies bacterianas sean abundantes en el interior de los insectos y comprenden todos o la mayoría de los organismos en los intestinos de la mayoría especies de insectos. Estas comunidades bacterianas varían enormemente en tamaño, composición, ubicación y función dentro del tracto digestivo.

En este proyecto, se presenta información relacionada con la diversidad de bacterias asociadas al tracto digestivo de *Arsenura armida*, que crece en bosques secos tropicales. Las cepas encontradas fueron aisladas del tracto digestivo de larvas que crecen en su ambiente natural y posteriormente cultivadas en medio de sólido de Soya y Trypticaseina. Estas cepas fueron caracterizadas fenotípicamente mediante análisis macroscópico y microscópico. La identificación taxonómica de las cepas aisladas se realizó mediante el empleo del marcador molecular 16S rRNA, así mismo se realizó el estudio de las huellas genómicas ERIC y ARDRA, y análisis filogenético. Un total de 120 cepas fueron aisladas del tracto digestivo de *Arsenura armida*. El análisis microscópico permitió observar una diversidad de formas bacterianas, principalmente predominó la forma de cocos aislados y coco-bacilos.

A partir de las digestiones de los fragmentos amplificados del gen 16S rRNA realizadas con la enzima de restricción HinfI, se obtuvieron 14 patrones diferentes, de los cuales 10 fueron patrones únicos y los 4 restantes agruparon 10 patrones de restricción con bandas similares. Estos patrones en conjunto con el análisis filogenético realizado de las 14 cepas representativas permitieron conocer la diversidad bacteriana presente en el interior de la larva de *Arsenura armida*. El análisis filogenético permitió agrupar las cepas en 5 diferentes géneros: *Serratia*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Enterococcus* y *Pseudomonas*

I. INTRODUCCIÓN

México posee una gran diversidad tanto cultural como biológica existiendo entre los diferentes pobladores un amplio conocimiento integral y empírico de la naturaleza, que incluye nociones de clasificación, observaciones del ambiente local y un sistema de uso, manejo y aprovechamiento de los recursos naturales, dando la continuidad en la explotación de ellos (Ramos-Elorduy, 2000; Laird & Noeovic, 2002). Este conocimiento generado ha permitido difundir información biológica y cultural debido a que los pobladores utilizan estilos de vida tradicionales para conservar sustentablemente la diversidad biológica (Vásquez & Yunta, 2004; Ramos- Elorduy *et al.*, 2007).

Dentro del aprovechamiento de los recursos naturales gran parte de las plantas y algunos insectos son explotados por sus propiedades nutrimentales y medicinales, por aspectos religiosos, artísticos o recreativos, siendo los insectos los recursos naturales aprovechados desde la antigüedad por diferentes grupos étnicos de México (Ramos- Elorduy, 1987, 1996, 2005). El consumo de insectos ha persistido en la dieta porque son parte de un hábito alimenticio tradicional, además de considerarse una actividad culinaria exótica que actualmente ha continuado, principalmente en áreas rurales y el sureste de México (Ramos-Elorduy, 1997).

Los insectos son consumidos en estados inmaduros (huevo, larva o ninfa y pupa) o como adultos y se consumen durante su época de abundancia, de acuerdo a la estacionalidad de cada especie (Ramos & Pino, 2004; Costa, 2004).

Chiapas es uno de los estados que preserva el consumo de insectos como tradición, donde existen 178 especies de insectos identificados como comestibles (Ramos & Pino, 2002) entre estos los lepidópteros están representados por 19 especies, cuyas larvas y pupas se han utilizado como alimento de algunos pueblos étnicos (Chacón, 2007).

La larva de lepidóptero *Arsenura armida* (Cramer, 1779) designada como Zats, es una de la especies mayormente consumidas por diversas etnias en el estado de Chiapas (choles, lacandones, mames, tojolabales, tzeltales, tsotsiles y zoques), así como en otros

estados como Hidalgo, Oaxaca, Veracruz, Yucatán y Puebla (Ramos & Pino, 2002; Ramos, 2009; Ramos *et al.*, 2011; Escamilla *et al.*, 2012).

El Zats se presenta en dos temporadas la primera empieza en el mes de junio hasta los últimos días de agosto y la segunda temporada empieza en el mes de octubre y termina en noviembre. Estas larvas se alimentan de las hojas de los árboles de Anona (*Anona* sp.), Corcho (*Heliocarpus donnell-smithii*) y Caulote (*Guazuma ulmifolia*) ya que estos árboles son utilizados como cercos vivos.

Se estima que el 10 % de la producción vegetal de un bosque es consumido por los insectos cuando se encuentran en ecosistemas silvestres (Scultz, 2002). Particularmente, se estima que las orugas (larvas de mariposas, orden Lepidóptera) son los principales consumidores de follaje en los bosques tropicales, ingiriendo entre 2-5 % de las hojas de las hojas que se producen en ellos (Pinto *et al.*, 2007).

En el tracto digestivo de cada organismo vivo, existe una gran variedad de microorganismos los cuales ayudan a que los alimentos que se ingieren sean degradados para su asimilación. Es por ello que surge la necesidad de estudiar los microorganismos que se encuentran dentro del tracto digestivo de la larva de *Arsenura armida*, considerando que, debido a su alimentación se pudieran encontrar bacterias celulolíticas, las cuales son de gran importancia a nivel industrial, debido que tienen la capacidad de producir enzimas capaces de degradar celulosa y metabolizar carbohidratos.

II. JUSTIFICACIÓN

Los insectos son uno de los recursos naturales que han sido aprovechados desde la antigüedad por los grupos étnicos de México (Ramos-Elorduy, 1987, 1996, 2005), debido a que desempeñan papeles significativos, principalmente en aspectos medicinales, religiosos, artísticos, recreativos y gastronómicos (Costa, N., 2002; Costa & Resende, 2004; Costa, N. & Ramos, E., 2006).

Los insectos viven en casi cualquier lugar habitable en la tierra. Son los mayores consumidores de plantas y depredadores de los consumidores de plantas. Algunos de ellos compiten con el hombre por alimento.

Aunque algunas especies de insectos son consideradas plagas de los cultivos, otras son importantes como organismos beneficiosos, por los productos que el hombre puede obtener de ellos (tintes, seda, cera, miel, etc.) y por las costumbres culturales de algunos grupos humanos que ven a los insectos como un recurso económico y de alimento.

Muchas investigaciones han identificado que en Chiapas se consumen diversos insectos, siendo el más apreciado *Arsenura armida* (Zats) ya que es considerado un manjar, estas larvas se alimentan de los árboles hospederos, las larvas de muchas especies se alimentan de plantas (BRUSCA & BRUSCA, 2005) causando graves daños, e incluso, pérdidas graves en la agricultura. Sin embargo, muchas especies, tienen importancia económica, como es el caso de *A. armida armida*. Muchos son los estudios acerca del contenido proteico de la larva y el alto valor nutrimental, debido a esto en este trabajo se pretende generar conocimiento acerca de las endobacterias de la larva y su posible intervención en la fisiología y de esta manera darle otro valor a larva.

Es necesario preservar a la larva debido a que la explotación de este recurso biótico puede llevar a la extinción de la misma. Cabe señalar que la deforestación y quema de árboles aumenta el riesgo de la pérdida de este insecto que forma parte de nuestra cultura y es necesario generar información y transmitirla para frenar la destrucción de su hábitat. Por lo anterior se requiere realizar investigaciones sobre este insecto, usando las tecnológicas de vanguardia y proporcionar información que contribuya en el rescate y protección de este importante insecto.

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Estudiar la diversidad de endobacterias asociadas a la larva de *Arsenura armida*.

3.1.1. Objetivos específicos

-Obtener información sobre las endobacterias aerobias cultivables del tracto digestivo de la larva de *Arsenura armida*.

-Analizar por métodos moleculares a las bacterias cultivables que habitan el tracto digestivo de la larva de *Arsenura armida*.

-Realizar un análisis filogenético para identificar a las endobacterias asociadas al tracto digestivo de la larva.

IV. HIPÓTESIS

La larva de *Arsenura armida* en el tracto digestivo presenta una gran diversidad de bacterias

V. PROBLEMAS A RESOLVER

Chiapas cuenta con una gran diversidad biológica lo cual se ha aprovechado de forma muy variada ya sea con fines alimentarios, medicinales, religiosos, comerciales, ornamentales y recreativos. Tradicionalmente, los bosques han provisto a las comunidades rurales de Chiapas de una variedad de recursos naturales que las familias aprovechan para su subsistencia y para mantener prácticas tradicionales que dan sentido a la identidad étnica y comunitaria.

Debido al uso inconsciente de los recursos con los que contamos muchas especies con valor alimentario, económico y cultural han sido sobreexplotadas e incluso han perdido su hábitat, es por eso que el aumento de la diversidad de especies útiles conlleva la necesidad de desarrollar técnicas productivas que aseguren su disponibilidad, además es importante generar nueva información que permita dar un valor agregado a las especies vulnerables.

Los insectos juegan un papel central en el funcionamiento de los ecosistemas terrestres. Representan engranes de gran importancia en el reciclaje de nutrientes, como herbívoros, polinizadores, y como parte del alimento de una variedad de organismos, desde vertebrados a invertebrados (Summersville y Crist, 2004; Summersville *et al.*, 2004). Son particularmente

abundantes y muy diversos en bosques tropicales, aunque se requiere mayor investigación para distinguir las funciones de numerosas especies en estos ecosistemas.

Debido a una estrecha relación con la vegetación donde habitan, los insectos herbívoros responden sensiblemente a la deforestación y a la regeneración del bosque. Sus larvas son herbívoras, los adultos pueden ser observados y recolectados en el campo de manera simple.

Por otro lado los insectos en Chiapas han representado un recurso alimenticio importante para el ser humano, de estos insectos el orden lepidóptera incluye por lo menos a 45 especies comestibles, la mayoría consumidas en el estadio de larva. En Chiapas se han registrado 19 especies de lepidópteros de interés culinario. Siendo *Arsenura armida* un ejemplo del consumo de larvas la cual presenta por lo menos dos o tres generaciones al año y durante la etapa larvaria se alimentan del follaje de los árboles de corcho (*Heliocarpus reticulatus* y *H. donellsmithii*).

En Chiapas el conocimiento acerca de la fauna de lepidópteros es escaso, por lo tanto es oportuno estudiar acerca de ellos específicamente sobre las larvas de lepidópteros. Aún falta mucho por hacer en el ámbito de estudio de los lepidópteros de Chiapas. En general, es urgente continuar trabajando en taxonomía, sistemática y ecología de las mismas.

Un reflejo inmediato de esta situación es que, a pesar de que numerosas especies de lepidópteros han sufrido reducciones o pérdidas en sus poblaciones debido a la transformación y fragmentación de los ambientes naturales, ningún representante de este grupo ha sido incluido en la lista oficial de las especies amenazadas o en peligro de extinción en el territorio mexicano (Sedesol, 1994). Por lo anterior, este proyecto es necesario para:

- Generar nuevo conocimiento útil acerca de la larva de *Arsenura armida*, para la base de estudios posteriores.
- Darle un valor agregado a la larva, para recocer su importancia en el funcionamiento del ecosistema.
- Estudiar la microbiota del interior de la larva para conocer el comportamiento de estas en la fisiología de la larva.
- Identificar el potencial biotecnológico de los endosimbiontes encontradas en el interior de la larva de *A. armida*.

VI. MARCO TEÓRICO

6.1. Aspectos biológicos de la larva de *A. armida*

Arsenura armida es una oruga grande, que pertenece al orden lepidóptera y subfamilia *arsenurinae* es común en el bosque seco tropical, esta oruga es muy visible en las coronas de los árboles. La subfamilia *arsenurinae*, constituida en su totalidad por grandes saturnidos neotropicales, se produce desde México hasta el norte de Argentina y contiene aproximadamente 57 especies, muy pocos de los cuales son conocidos desde las primeras etapas. (Lemaire, 1980; Hogue, 1993).

Arsenura armida se produce en México (desde Tamaulipas hasta Chiapas en la vertiente del Golfo de México, hasta la Sierra Madre Oriental), Bolivia y el sureste de Brasil (Lemaire, 1980).

Arsenura armida se produce entre la primera y la última semana de junio, comienza aproximadamente 3 semanas después de las lluvias. Después de la eclosión pasa una larga estación seca en forma de pupa solitaria y en estado latente de 2-10 cm debajo de la superficie del suelo (Costa *et al.*, 2001).

6.2. Biología asociada a la larva

6.2.1. Morfología general del orden Lepidóptera

Las mariposas de este orden son insectos comunes y se reconocen por las escamas de las alas, que se desprenden y adhieren como polvo en los dedos cuando son manipulados. Sus miembros se encuentran en casi todas partes, a menudo en grandes cantidades (Triplehorn y Johnson, 2005). Las piezas bucales de una mariposa están generalmente equipada para succionar. El *labrum* es pequeño y es por lo general en la forma de una banda transversal a través de la parte inferior de la cara, en la base de la probóscide. Las mandíbulas están casi siempre ausentes. La probóscide, cuando está presente, está formada por la fusión de la galea de la maxila longitudinalmente ranurada y suele ser larga y enrollada. Los palpos maxilares son generalmente pequeñas o inexistentes, pero los palpos labiales están casi siempre bien desarrollados y por lo general se extienden hacia delante frente a la cara (fig.

1). Los ojos compuestos de una mariposa son relativamente grandes y consisten en un gran número de facetas.

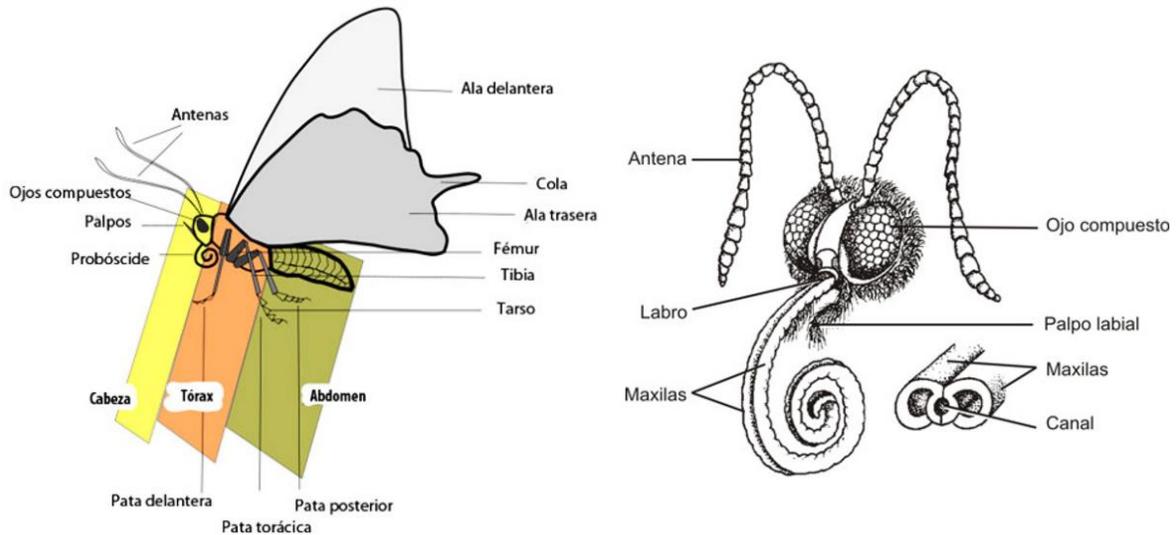
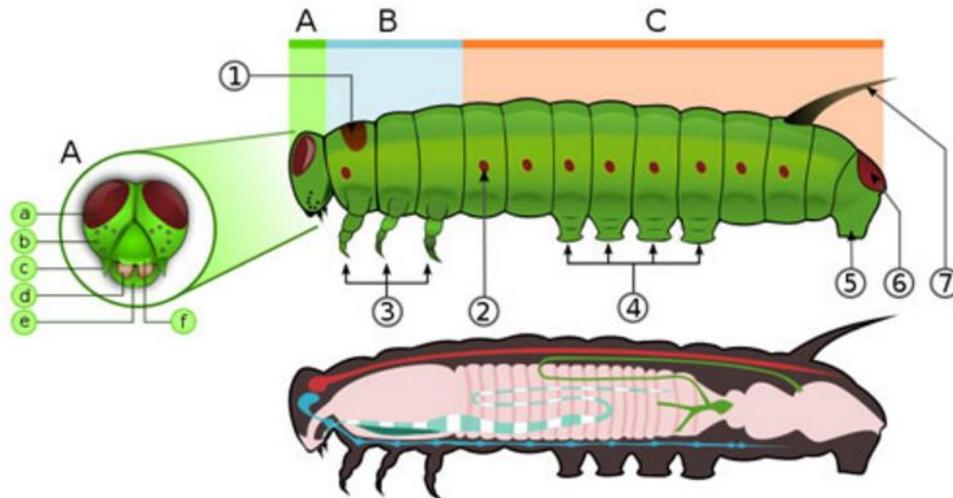


Figura 1. Morfología y aparato bucal en Lepidoptera. Fuente: <http://www.asturnatura.com/articulos/lepidopteros-mariposas/morfologia.php>

6.2.2. Morfología general del orden Lepidoptera asociado a la larva.

Las larvas de los lepidópteros son polípodas, generalmente eruciformes (fig. 2), con 2-5 pares de patas falsas o abdominales y tres pares de patas torácicas o verdaderas. Son cilíndricas y robustas, con una cápsula cefálica bien desarrollada, que presenta en su parte anterior, una estructura triangular denominada frontoclipeo. Con un par de antenas muy cortas, trisegmentadas y se encuentran en la porción inferior de la cabeza, por detrás y a cada lado de las mismas, se disponen en forma semicircular los seis ocelos (stemmata u ojos de las larvas) en cada lado, pudiendo ser menos o incluso estar ausentes, justo por encima de las mandíbulas. El aparato bucal posee mandíbulas y maxilas desarrolladas, el labio posee una estructura distal denominada spinneret, que es el órgano hilador de la seda (Urretabizkaya *et al.*, 2010).

El cuerpo cilíndrico de 13 segmentos, 3 torácicos y 10 abdominales. Cada segmento torácico lleva un par de patas, y los segmentos abdominales, de tres a seis, y 10, por lo general llevan un par de prólogos. Los propatas o pseudopatas difieren de las patas torácicas, ya que son más carnosas y carecen de segmentación, y por lo general llevan en su ápice una serie de minúsculos ganchos llamados crochets (ganchillos).



Oruga de una mariposa. Michal Komorniczak. A: cabeza; B: tórax; C: abdomen. 1: escudo protorácico; 2: espiráculo; 3: patas verdaderas; 4; protopatas medioabdominales; 5: protopata anal; 6: escudo anal; 7: tentáculo. a: triángulo frontal; b: ocelo; c: antena; d: mandíbula; e: labro

Figura 2. Oruga de una mariposa de Lepidóptero. Fuente: <http://www.asturnatura.com/articulos/lepidopteros-mariposas/ciclo-vida-metamorfosis.php>

6.2.3. Huevos

Los huevos son puestos en grandes masas de huevos sobre la superficie de hojas y ramas de los árboles (Fig. 3A), son de color blanco grisáceo. Al eclosionar, se observan grandes cantidades de larvas de comportamiento gregario, apiladas debajo de las hojas, unas al lado de las otras como si fueran vagones en paralelo. Un huevo *Arsenura armida* pesa aproximadamente 0,0012 g eclosiona después de 12-14 días (Costa *et al.*, 2001)

En el primer estadio las larvas son brillantes, poseen anillos amarillos y negros con cabeza roja y permanecen juntos durante la alimentación en grandes masas en las hojas (Fig. 3B). En su 3er instar (antepenúltimo), empiezan a descansar diurnamente en grandes masas visibles en la parte inferior del tronco y de las ramas más grandes (Fig. 3C), continúan haciendo esto hasta dejar el árbol como prepupas para excavar en solitario una cámara de pupación y pupar en el suelo (Costa *et al.*, 2001).



Figura 3. Estadios de la larva de *Arsenura armida*. (A) huevos depositados en una gran masa, (B) Larvas pequeñas creciendo en hojas de *Guazuma ulmifolia*, (C) comportamiento de las larvas en su tercer instar, (D) desplazamiento de la larva por las ramas de su hospedero para alimentarse. Imagen tomada de: <http://www.mucubaji.com/guaquira/EEGNoticias48.html>

6.2.4. Pupa

La pupación ocurre de diferentes formas. Muchas larvas forman un capullo bien elaborado y se transforman dentro de ella. Otras hacen un capullo muy sencillo y algunas otras no lo hacen en absoluto. Muchas larvas pupan en una especie de situación protegida. Las pupas son por lo general obiectas (cubiertas), con los apéndices firmemente adherido al cuerpo. Las pupas de las polillas son generalmente de color café y relativamente suaves, mientras que las pupas de las mariposas son de color variado, y son a menudo tuberculadas

o esculpidas. Algunas larvas de polilla (algunas de Sphingidae, Saturniidae y Pyralidae) pupan bajo la tierra (Ruiz, 2015)

Bricemio (1983) en su investigación reporta que la pupa de *Arsenura armida* es del tipo obtecta (cubiertas) de color marrón rojizo, la cual tiene aproximadamente 50 mm de largo por 20 mm de diámetro. Así mismo reporta que la larva entra en pupa enterrándose en el suelo de 10 cm a 15 cm de profundidad (Bricemio, 1983).



Figura 4. Pupa de Lepidóptera. Fuente: Amarillo & Wolfe (1997)

6.3. Generalidades de la familia Saturniidae

De acuerdo a la recopilación de datos de Amarillo (2000) la familia Saturniidae fue descrita en 1837 por Boisduval. Posteriormente Jordán en 1922 realiza la primera revisión elevando el grupo al rango de superfamilia, incluyendo las familias Saturniidae y Ceratocampidae, con Saturniinae, Agliinae y Ludiinae en la primera familia y Arsenurinae y Ceratocampinae en la segunda.

De 1929-1930, Draudt reubica de nuevo al grupo como una familia y a sus dos familias como subfamilias. En 1931, Bouvier habla de saturnoides «aberrantes», Oxytenidae y Cercophanidae, y «normales» reagrupados en tres familias: Saturniidae, Sysphingidae y Hemileucidae.

Estudios posteriores realizados por Turner en 1947, Bourgogne en 1951 y Michener en 1952 ubican la familia dentro de la superfamilia Bombycoidea dividiéndola en siete

subfamilias: Rhescyntinae, Citheroniinae, Agliinae, Hemileucinae, Ludiinae, Salassinae y Saturniinae, hasta el momento estas revisiones han sido aceptadas, sin embargo han ocurrido algunas modificaciones: Rhescyntinae y Citheroniinae como subfamilias de Arsenurinae y Ceratocampinae respectivamente (Lemaire, 1978).

6.4. Taxonomía

De acuerdo a EOL (Enciclopedia of life)

Tabla 1. Taxonomía de la especie *Arsenura armida*

Taxonomía de la especie Arsenura armida

| | |
|---------------------|----------------|
| <i>Reino</i> | Metazoa |
| <i>Subreino</i> | Eumetazoa |
| <i>Rama</i> | Bilateria |
| <i>Grado</i> | Coelomata |
| <i>Serie</i> | Protostomia |
| <i>Phylum</i> | Arthropoda |
| <i>Clase</i> | Insecta |
| <i>Subclase</i> | Holometabola |
| <i>Orden</i> | Lepidóptera |
| <i>Suborden</i> | Glossata |
| <i>Infraorden</i> | Neolepidóptera |
| <i>Superfamilia</i> | Bombycoidea |
| <i>Familia</i> | Saturniidae |
| <i>Subfamilia</i> | Arsenurinae |
| <i>Género</i> | Arsenura |
| <i>Especie</i> | Armida |

6.5. Distribución

6.5.1. Descripción del municipio de colecta (El Bosque)

6.5.2. Ubicación

Se ubica en la Región Socioeconómica VII DE LOS BOSQUES. Limita al norte con Simojovel, al este con Chalchihuitán, al sur con Larráinzar y al oeste con Bochil y Jitotol. Las coordenadas de la cabecera municipal son: 17°03'42" de latitud norte y 92°43'16" de longitud oeste y se ubica a una altitud de 1227 metros sobre el nivel del mar. Con una superficie territorial de 159.03 km² ocupa el 0.21% del territorio estatal.

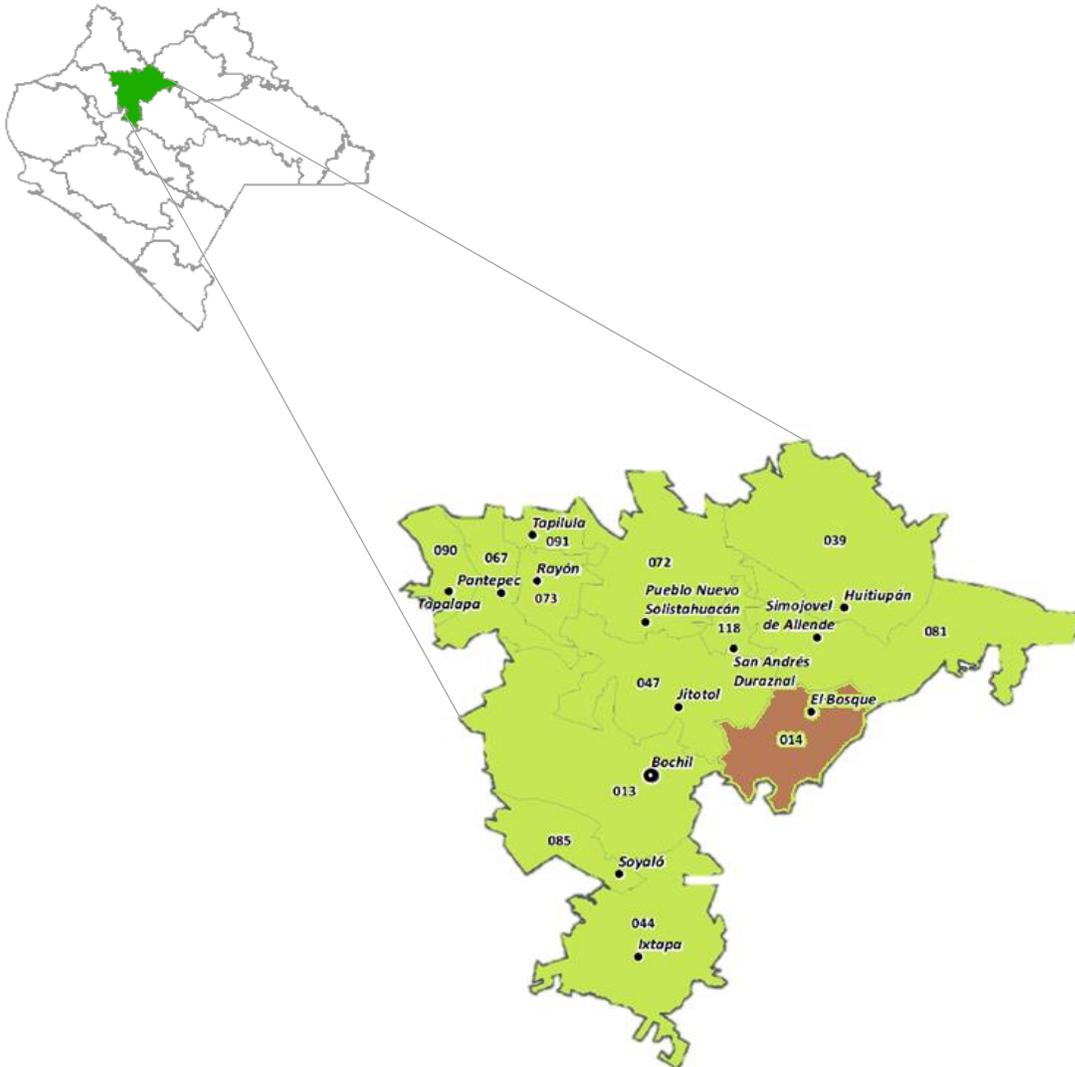


Figura 5. Ubicación geográfica del sitio de colecta de *Arsenura armida*. Fuente: Gobierno del Estado de Chiapas.

Los climas existentes en el municipio son: Cálido húmedo con lluvias abundantes de verano (49.68%), Semicálido húmedo con lluvias abundantes de verano (50.32%) y Semicálido húmedo con lluvias todo el año (0%).

En los meses de mayo a octubre, las temperaturas mínimas promedio se distribuyen porcentualmente de la siguiente manera: de 12 a 15°C (3.23%), de 15 a 18°C (78.44%), y de 18 a 21°C (18.34%). En tanto que las máximas promedio en este periodo son: De 24 a 27°C (50.6%), de 27 a 30°C (40.94%) y de 30 a 33°C (8.47%).

Durante los meses de noviembre a abril, las temperaturas mínimas promedio se distribuyen porcentualmente de la siguiente manera: de 9 a 12°C (21.45%), de 12 a 15°C (70.74%) y de 15 a 18°C (7.81%). Mientras que las máximas promedio en este mismo periodo son: De 18 a 21°C (2.83%), de 21 a 24°C (75.72%) y de 24 a 27°C (21.45%). En los meses de mayo a octubre, la precipitación media es: de 1400 a 1700 mm (100%). En los meses de noviembre a abril, la precipitación media es: de 250 a 300 mm (1.14%), de 300 a 350 mm (11.15%) y de 350 a 400 mm (87.71%) (INEGI. Marco Geoestadístico Nacional 2010).

6.5.3. Vegetación

La cobertura vegetal y el aprovechamiento del suelo en el municipio se distribuye de la siguiente manera: Bosque mesófilo de montaña (secundaria) (55.33%), Agricultura de temporal (19.7%), Pastizal cultivado (13.21%), Bosque mesófilo de montaña (8.23%), Bosque de pino-encino (secundaria) (3.14%), Bosque de pino (secundaria) (0.21%), y Otros (0.18%) (INEGI. Marco Geoestadístico Nacional 2010).

6.5.4. Edafología

Los tipos de suelos presentes en el municipio son: Phaeozem (54.26%), Plintosol (45.59%), y Luvisol (0.15%) (INEGI. Marco Geoestadístico Nacional 2010).

Suelo Plintosol

Del griego plinthos: ladrillo. Suelos con una capa de color blanco o amarillo con manchas rojas muy notables que se endurecen si quedan expuestas permanentemente al aire. Unidades de suelo: Acrisol, Gleysol y Luvisol (Guía para la Interpretación de Cartografía Edafología, INEGI).

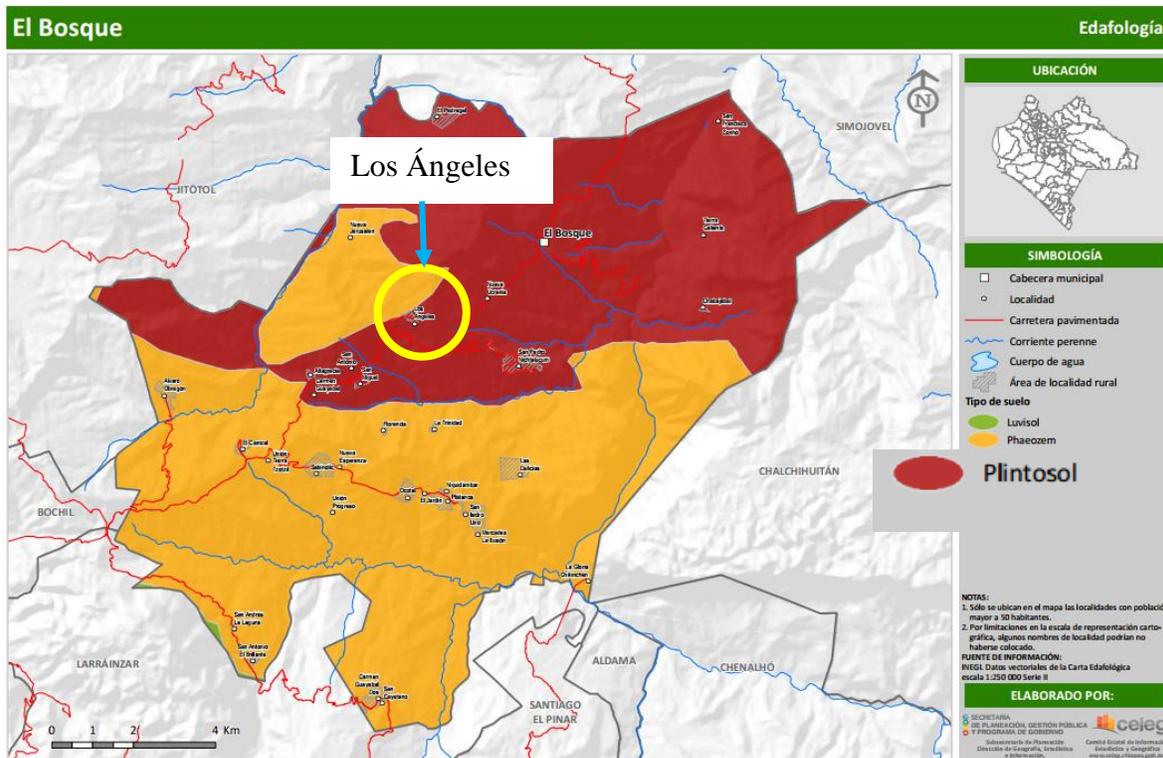


Figura 6. Mapa de los tipos de suelos que presenta el municipio del bosque. Disponible en: <http://www.ceieg.chiapas.gob.mx/perfiles/Inicio>

6.6. Uso e importancia de la larva

Los insectos comestibles forman parte de la alimentación de muchas comunidades rurales en el mundo (Ramos-Elorduy & Conconi, 1994), proveyéndolos de una cantidad importante de nutrientes, sobre todo de proteínas (Ramos-Elorduy *et al.* 1984, Ramos-Elorduy *et al.* 1991, 2005). Se consumen en todos los estados de desarrollo, pero principalmente en los inmaduros (Ramos-Elorduy, 2000).

Mayorga & Sánchez (2000) mencionan que en Chiapas hay platillos elaborados con insectos como: la oruga, el tsim (*Atta cephalotes* Linnaeus, 1758), el “Zats” (*Arsenura armida armida* (Cramer, 1779) y el tusino. Así mismo Flores (2000), reporta seis insectos aprovechados por distintas etnias chiapanecas: (1) el zats’, (2) una especie de oruga, (3) la oruga gorda o blanca, (4) el kiss (*Atta cephalotes* Linnaeus, 1758), (5) el nuti o mazán (spp.), (6) el chapulín o saltamontes (Orthoptera) y (7) el pech’jol (Coleoptera).

Actualmente los insectos siguen siendo explotados debido a que forman parte de una cultura, a lo largo del tiempo las costumbres se han heredado principalmente en las zonas rurales, sin

embargo estas prácticas han permitido que las nuevas generaciones puedan adquirir y desarrollar un conocimiento propio de las especies, de esta forma difundir la importancia de algunos insectos.

Los satúrnidos adultos y sobre todo las hembras, al alimentarse del néctar de flores pueden ser polinizadores para algunas plantas. Por otro lado, aunque las larvas pueden, en algunos casos, considerarse como nocivas o plagas para varias plantas, árboles o cultivos son útiles, en México se consumen como alimento.

Ramos-Elorduy *et al.*, (2011) reportan 67 especies de mariposas que se consumen como alimento en México. La familia Saturniidae es la más abundante de las especies comestibles. Además de su alto valor gastronómico es importante mencionar que las larvas como *A. armida* son las principales consumidoras del follaje de los árboles hospederos. En el tracto digestivo de cada organismo vivo, existe una gran variedad de microorganismos los cuales ayudan a que los alimentos que se ingieren sean degradados para su asimilación. Es por eso que se genera interés por estudiar la microbiota que se encuentra asociada a su tracto.

6.7. Asociación de bacterias al tracto digestivo de la larva

6.7.1. Sistema digestivo

El sistema digestivo (canal) es un sistema de estructuras tubulares que recibe la comida en la boca, almacena los alimentos, promueve la digestión y absorción de nutrientes, y permite la excreción de los residuos desde el recto. Está convenientemente dividido en intestino anterior, intestino medio y el intestino posterior (Fig. 7).

- Tubo digestivo y la digestión
- Intestino anterior
- Intestino medio
- Intestino superior

El diseño básico del tubo digestivo de los insectos presenta muchas modificaciones que reflejan adaptaciones a nichos especializados y a hábitos de alimentación y muchas de estas especializaciones han evolucionado para albergar microorganismos simbiotes (Chapman *et al.*, 2013).

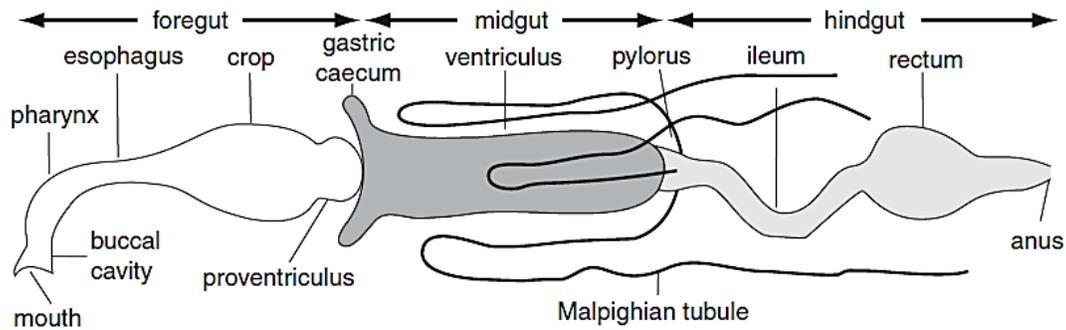


Figura 7. Sistema digestivo, Sistema digestivo generalizado del insecto (adaptado de Chapman, Los insectos: estructura y función).

6.7.2. El tracto digestivo del insecto y la microbiota

Los microorganismos en el tracto digestivo de los insectos pueden incluir protistas, hongos, archaea y bacterias (Hongoh, 2010). Las especies bacterianas comprenden todos o la mayoría de los organismos en los intestinos de la mayoría especies de insectos. Estas comunidades bacterianas varían enormemente en tamaño, composición, ubicación y función dentro del tracto digestivo (Martinson et al., 2012).

Por ejemplo, una abeja adulta contiene aproximadamente 109 células bacterianas, un número similar se encuentra en los adultos de género *Rhodnius* y en adultos *Acheta domestica* (grillo), mientras que en adultos de saltamontes (*Melanoplus sanguinipes*) contiene aproximadamente 106 bacterias, y un adulto de *Drosophila melanogaster* tiene cerca de 105 bacterias (Ryu et al., 2010).

6.7.3. Condiciones físicas

La colonización por microorganismos depende de las condiciones físicoquímicas del lumen de las diferentes regiones del tracto digestivo, las cuales pueden mostrar variación extrema tanto en pH y disponibilidad de oxígeno. El pH del tracto digestivo es de 10-12, pero se regula activamente y a menudo difiere del de la hemolinfa, que es por lo general cerca de 7 (Harrison, 2001).

El pH del canal alimentario es muy variable en diferentes especies de insectos. El pH de un segmento de intestino influye en la acción de enzimas secretados o del efecto de la

comida en el intestino, las influencias de solubilidad y toxicidad de las toxinas y aleloquímicos de plantas, y puede alterar la población de los microorganismos intestinales.

En la mayoría de los insectos, el cultivo tiene poca o ninguna presencia de agentes reguladores y tiende a ser ligeramente ácido, un factor que favorece la digestión de enzimas de hidratos de carbono. Las larvas de Lepidoptera y Trichoptera tienden a tener un alto pH del intestino medio, que varía de aproximadamente 8 a 10, promovido por las células caliciformes que secretan potasio y bicarbonato en el lumen del intestino medio. Ellos tienen enzimas de digestión de proteínas que se ven favorecidas por el alto pH y el pH alto puede proporcionar una cierta protección de los taninos y otros compuestos aleloquímicos que se ingieren con los alimentos de las plantas (Capinera, 2008).

6.8. Herramientas moleculares para la identificación de las comunidades bacterianas

6.8.1. Estudio de la diversidad genética de bacterias endosimbióticas

Las bacterias son microorganismos que tiene la capacidad de adaptarse a diferentes condiciones ambientales. Para comprender la esencia de esta capacidad es importante conocer sus bases genéticas, es decir cómo está organizada la información genética, como realizan y regulan su expresión y que mecanismos de variación génica poseen.

El estudio de la diversidad genética permite clasificar un individuo o población comparada con individuos u otras poblaciones, esta determinación puede basarse en información de tipo bioquímica, morfológica y molecular. Sin embargo, los marcadores moleculares han tomado ventaja sobre las diferencias genéticas en un nivel más detallado y sin interferencias de factores ambientales, Los marcadores moleculares son herramientas que permiten localizar y aislar genes de interés. En la actualidad existen varias técnicas moleculares que nos permiten conocer cómo se encuentran las proporciones de genes en las poblaciones naturales de manera indirecta, como con los análisis de proteínas, o de manera directa con estudios de ADN. Los diferentes tipos de marcadores se distinguen por su capacidad de detectar polimorfismos en loci únicos o múltiples y son de tipo dominante o co-dominante (Simpson, 1997). Por otro lado el descubrimiento de plataformas de alto

rendimiento incrementa el número de datos por corrida y reducen el costo de datos incrementando la resolución del mapa (Caliskan, 2012).

6.8.2. Empleo de genes cromosomales

Los ribosomas fueron vistos por primera vez por Albert Claude a finales de los años 30, en homogenados celulares por microscopía de campo oscuro. Sin embargo, a mediados de los años 50 George Palade los observó en las células mediante microscopía electrónica. En 1955, Paul Zamecnik demostró que los ribosomas son el sitio de síntesis de proteínas (Herrera, 2002).

El ribosoma bacteriano tiene un coeficiente de sedimentación 70s, puede disociarse en dos subunidades, la subunidad grande de 50s y la pequeña de 30s. Cada subunidad constituye un complejo de proteínas ribosomales y moléculas de rRNA específicas. La subunidad 30s contiene rRNA 16S y 21 proteínas ribosomales (Rodicio & Mendoza, 2004).

Los genes bacterianos que codifican los rRNA están organizados en operones. Cada operón ribosómico (*rrs*) incluye genes para el rRNA 16S de la subunidad pequeña y genes para rRNA 23S y 5S de la subunidad grande, separados por regiones íntergénicas (IG) El producto de la transcripción del operón a partir de dos promotores, P1 y P2, situados en la región anterior a *rrs*, será procesado por el enzima ARNasa III mediante cortes en sitios específicos que separan las tres clases de ARNr, el/los ARNt y las dos IG. El gen rRNA 16S Es un polinucleótido de aproximadamente de 1500 nucleótidos. La secuencia del gen rRNA 16S posee regiones variables y conservadas. (Rodicio & Mendoza, 2004).

Woese consideró al gen rRNA 16s como un cronómetro molecular, ya que permite establecer alineamientos y comparaciones entre sus secuencias y relacionarlos a diferentes niveles taxonómicos. El gen es bastante largo, presenta suficiente polimorfismo ínterespecífico de genes rRNA 16S, lo que proporciona diferenciación y mediciones estadísticamente válidas (Clarridge. 2004).

El análisis realizado por Woese consistió solo en la secuenciación parcial de fragmentos de rRNA 16s, este método se denomina catalogación de oligonucleótidos. Esta técnica consiste en el marcaje in vivo de las secuencias de rRNA 16s, posteriormente la molécula de rRNA 16s es purificada para ser tratada con la ribonucleasa T1. A continuación

son separados y secuenciados todos los fragmentos que al menos tengan 6 nucleótidos. Actualmente se ha sustituido catalogación de oligonucleótidos por la secuenciación del gen (DNAr) que codifica los rRNA 16s (Rodicio & Mendoza, 2004).

A pesar de los recientes avances en biología molecular y en el desarrollo de kits de identificación basados en el fenotipo, disponibles en el mercado, la identificación de cepas bacterianas sigue siendo una tarea difícil para muchos laboratorios microbiológicos rutinarios. Entre los varios miles de genes dentro de un genoma bacteriano, el gen 16S rRNA ha servido como la clave principal para la identificación basada en la filogenia cuando se compara contra las secuencias de genes 16S rRNA de las bases de datos (Rosselló-Mora & Amann, 2001; Tindall *et al.*, 2010).

6.8.3. Huellas genómicas (ERIC-PCR)

Secuencia consenso intergénico repetitivo de Enterobacterias (ERIC), también descrito como unidades repetitivas intergénicas, es el método general que utiliza cebadores de oligonucleótidos que alinean secuencias repetidas palindrómicas descritas en las enterobacterias.

Secuencias ERIC se describieron primero en *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, y otros miembros de la familia Enterobacteriaceae, así como *Vibrio cholerae* (Sharples & Lloyd 1990; Hulton *et al.*, 1991). La secuencia de ERIC es un palíndromo imperfecto de 127 pb (Fig. 8). Las secuencias ERIC sólo se han encontrado en las regiones intergénicas, al parecer sólo dentro de las regiones transcritas (Hulton *et al.*, 1991). El número de copias de la secuencia ERIC varía según las especies: se estimó inicialmente por extrapolación que puede haber cerca de 30 copias en *E. coli* K-12 y quizá 150 en *S. enterica* Typhimurium LT2 (Hulton *et al.*, 1991), mientras que la secuencia del genoma de *Photobacterium luminescens* se ha informado que contienen más de 700 copias (Duchaud *et al.* 2003).

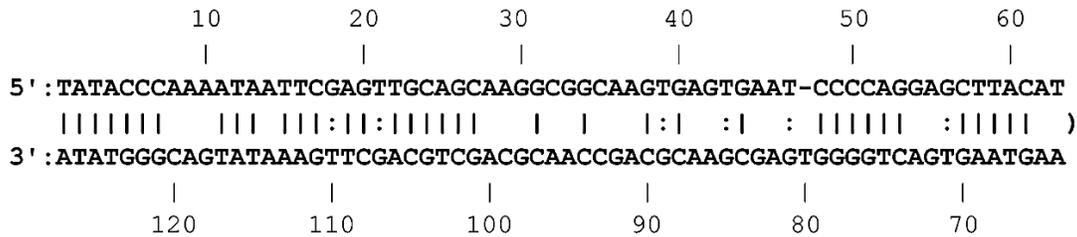


Figura 8. Secuencia ERIC. La secuencia de 127 pb se muestra como una horquilla; (líneas y dos puntos) conectar bases en las dos ramas complementarias en el ADN (y en el ARN). Las secuencias ERIC son de interés, ya que se han utilizado como la base de una técnica para la toma de huellas de genomas bacterianos (Versalovic et al., 1991).

6.8.4. Gen 16S rRNA como marcador universal

La comparación de las secuencias de los 16S rRNA (o de los genes que los codifican) permite establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los organismos procariotas (Rodicio & Mendoza, 2004). Este hecho ha tenido una enorme repercusión en taxonomía bacteriana, dando lugar al sistema de clasificación vigente y permitiendo la identificación rápida y precisa de las bacterias.

Como se ha descrito anteriormente el gen 16S rRNA Es un polirribonucleótido de aproximadamente 1,500 nt codificado por el gen *rrs*, también denominado ADN ribosomal 16S (rDNA 16S). La macromolécula 16S rRNA presenta una serie de características, en base a las cuales fue considerado por Woese como cronómetro molecular es decir para su utilización como herramienta filogenética y taxonómica:

- Se trata de una molécula muy antigua, presente en todas las bacterias actuales. Constituye, por tanto, una diana universal para su identificación.
- Su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado, de modo que las alteraciones en la secuencia reflejan probablemente cambios aleatorios.
- El tamaño relativamente largo de los ARNr 16S (1,500 nt) minimiza las fluctuaciones estadísticas.
- La conservación en estructura secundaria puede servir de ayuda en las comparaciones, aportando una base para el alineamiento preciso.

- Dado que resulta relativamente fácil secuenciar los ADNr 16S existen bases de datos amplios, en continuo crecimiento.

Una vez determinada la secuencia de nucleótidos y establecidas las comparaciones, será el grado de similitud entre las secuencias de los ARNr 16S de dos bacterias lo que indique su relación evolutiva. Además, el análisis comparativo de secuencias permite construir árboles filogenéticos, que reflejan gráficamente la genealogía molecular de la bacteria, mostrando su posición evolutiva en el contexto de los organismos comparados (Rodicio & Mendoza, 2004).

6.8.5. Análisis de restricción de DNA ribosomal amplificado (ARDRA)

El análisis de restricción de DNA ribosomal amplificado (ARDRA: *Amplified Ribosomal rDNA restriction analysis*) es una técnica que se basa en la amplificación por PCR del fragmento de rDNA, y luego seguido por la digestión del amplicón con endonucleasas de restricción. Los fragmentos resultantes se analizan posteriormente mediante electroforesis en gel de agarosa (Thangadurai & Sangeetha, 2005). La comparación de los patrones generados permite la diferenciación de los aislados y permite indicar cuales tienen la secuencia ADNr 16S. Sin la construcción de una base de datos para un amplio rango de *taxa*, este método es de uso limitado para una identificación rutinaria. El poder discriminativo del método de ARDRA depende de la enzima de restricción seleccionada para la digestión del 16s rDNA amplificado por PCR (Stackebrandt, 2006)

La aplicación de ARDRA en la región 16S-23S rDNA del genoma microbiano demostró ser un método rápido, sencillo y fiable para la diferenciación de especies de bacterianas, incluyendo los que están considerados como patógenos oportunistas. ARDRA es capaz de identificar las variaciones entre las comunidades microbianas.

ARDRA primero fue aplicado a la identificación de cepas importantes medicamente, pero ha sido reportado como una herramienta confiable para los estudios taxonómicos y filogenéticos de organismos cultivables y no cultivables provenientes de diferentes hábitats (Martínez *et al.*, 1995).

6.8.6. Secuenciamiento y Análisis filogenético

El secuenciamiento de ADN determina el orden de las bases de un segmento específico de ADN. Las técnicas de secuenciamiento se basan en el método de síntesis enzimática o método de Sanger. La técnica de secuenciamiento de Sanger se basa en la propiedad de la ADN polimerasa de sintetizar una copia complementaria de una cadena simple de ADN molde a partir del uso de 2-3 - dideoxynucleótidos (ddNTPs) como sustratos.

Los ddNTPs son análogos de nucleótidos que carecen de un OH en el Carbono 3 (C3), los cuales una vez incorporados en la nueva cadena de ADN, la polimerasa no puede incorporar bases adicionales al extremo de la cadena, deteniéndose la reacción de síntesis. En esta técnica los dideoxynucleótidos actúan como terminadores de la síntesis de ADN (Hardin, 2001; Wilton, 2002).

El método de Sanger se basa en el uso de la ADN polimerasa para sintetizar cadenas de ADN con una terminación específica. Con este método se generan fragmentos de ADN de todos los tamaños posibles que se puedan distinguir entre sí, por el tipo de marcaje que llevan o por la incorporación de un terminador específico.

Las enzimas del tipo de la ADN polimerasa requieren de un templado de ADN de cadena sencilla, y realizan la síntesis de la hebra complementaria extendiéndola a partir de un iniciador en dirección 5' a 3'. Entre los componentes de la reacción se incluyen nucleótidos que no tienen un grupo hidroxilo en su extremo 3' (ddNTP), para poder obtener una terminación específica en las cadenas. Una vez que el ddNTP se incorpora como el residuo terminal, evita que la cadena de ADN sintetizada continúe extendiéndose. La incorporación de los ddNTPs es al azar, de tal forma que se obtienen fragmentos de todos los tamaños posibles que terminan en un residuo específico (Necochea & Canultec, 2004).

En el método de Sanger (1977), la estrategia es hacer cuatro reacciones diferentes de síntesis de ADN, utilizando un ddNTP distinto en cada tubo. Con la mezcla del nucleótido normal (dNTP) y su terminador (ddNTP), se pueden generar fragmentos complementarios de diferentes tamaños que terminan en el mismo nucleótido. Después, estos fragmentos se pueden separar en un gel de electroforesis con cuatro carriles distintos, para determinar la secuencia del templado (fig. 9).

Las regiones filogenéticamente informativas para la identificación bacteriana se encuentran en las primeras 500 bases del extremo 5' del gen (Tang, 2000; Patel, 2001). Existen bases de datos públicas y privadas, que almacenan información de secuencias del gen 16S ARNr como GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information), EMBL (European Molecular Biology Laboratory), RDP (Ribosomal Database Project), RIDOM (Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms), MicroSeq (Applied Biosystems) y SmartGen e IDNS (Integrated Database Network System), siendo Ribosomal Data Project (RDP) la principal base de datos de secuencias de genes ribosomales (16S, 23S, 18S y 28S) (Patel.2001; Tang, 2000).

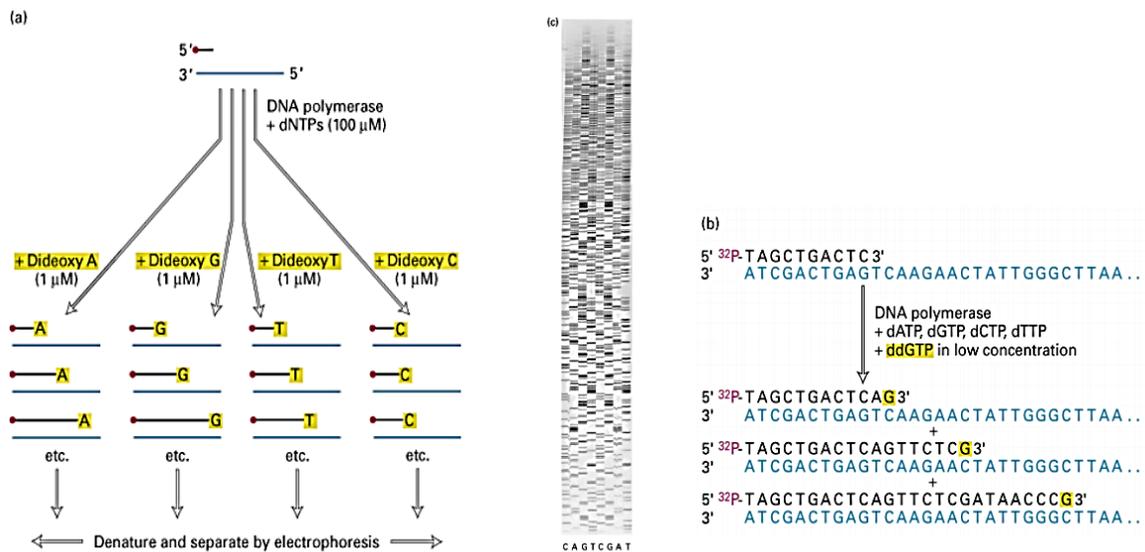


Figura 9. Método de Sanger. Cuatro reacciones con ddNTPs diferentes permiten la síntesis de distintos fragmentos con una terminación específica. Los fragmentos se pueden separar por electroforesis y comparando los tamaños, se puede determinar la secuencia del templado.

Sin embargo, solo la comparación de genomas completos, y no la comparación de fragmentos y/o gen 16S ARNr completo aportan información exacta acerca de las relaciones evolutivas e identificación bacteriana. Taxonómicamente, se define una especie bacteriana como el conjunto de cepas que comparten una similitud del 70% o más, en experimentos de relación ADN-ADN e identidad mayor del 97% (Stackebrandt & Goebel, 1994).

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Recolección de la larva de *Arsenura armida*

Larvas adultas de la mariposa-polilla *Arsenura armida* se recolectaron en los Ángeles, municipio de El Bosque, Chiapas México, que se encuentra ubicado en la Región Centro I (17° 04' 00'' N, 92° 43' 00'' O y 1227 m de altitud).

Las larvas colectadas se depositaron en bolsas de polietileno se etiquetaron y colocaron en hieleras portátiles para su traslado al Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez.

7.2. Caracterización de la larva de *Arsenura armida*

La caracterización morfológica de la larva *A. armida*, medición y selección, así como el registro de imágenes fotográficas sus diferentes partes anatómicas, se realizaron en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. Este laboratorio cuenta con toda la infraestructura y condiciones requeridas para la realización de estas actividades.

Las larvas se limpiaron con toallas de papel para eliminar los residuos que se encontraban sobre la cutícula y se colocaron sobre una superficie plana para determinar los parámetros morfométricos como longitud, diámetro medio y peso, para esto se empleó un escalímetro, un vernier y una balanza analítica (OHAUS).



Figura 10. Determinación de parámetros morfométricos de la larva de *Arsenura armida*.

Foto: López, M. G., 2015.

7.3. Preparación de las muestras, Aislamiento y cultivo de endobacterias de la larva *Arsenura armida*

Se seleccionaron al azar 10 gusanos adultos y se higienizaron con toallas de papel para eliminar residuos orgánicos. Cada larva fue cortada longitudinalmente para remover el tracto completo de su interior, lo que permitió obtener muestras para el aislamiento de endobacterias. Este procedimiento se realizó bajo condiciones asépticas en una campana de flujo laminar y con la ayuda de instrumentos previamente estériles. Las muestras obtenidas de las larvas se colocaron en tubos eppendorf de 1500 μ L que contenían glicerol al 70 % y caldo infusión cerebro al 30 %. Las muestras se conservaron a -20° C.



Figura 11. Corte longitud y separación del tracto completo de la larva.

10 g del intestino de la larva *A. armida* fue colocado en tubos de ensayo de 100 x 12 mm con caldo de soya y tripticaseina (TSA), a partir de esta suspensión se realizaron diluciones seriadas de 10^{-1} hasta 10^{-8} . Enseguida 10 μ L de cada dilución se inocularon en cajas Petri con tres medios de cultivo diferente: Agar Nutritivo (AN- DIBICO®) para el aislamiento de bacterias poco exigentes; Agar Soya Tripticaseina (AST- DIBICO®) para el crecimiento de bacterias aerobias y anaerobias y Agar Infusión Cerebro Corazón (ICC- BIOXON®) agar para el crecimiento de bacterias aerobias y anaerobias de difícil crecimiento (Brito-Vega, 2010), todos los cultivos se incubaron a 28° C por 24 h. Después de haber comprobado que las cepas estaban puras se procedió a conservarlas en tubos eppendorf de 1.5 mL el cual contenía glicerol al 70% y caldo de soya y tripticaseina, cada tubo se saturó con las colonias totalmente puras y se guardaron a -20° C.



Figura 12. Cepas más representativas conservadas en glicerol.

7.4. Caracterización fenotípica de las endobacterias asociadas a la larva de *Arsenura armida*.

Las endobacterias cultivadas en los diferentes medios se caracterizaron mediante análisis microscópico y tinciones diferenciales de Gram. También se registró la morfología y aspecto de las colonias formadas en los medios de acuerdo a la nomenclatura bacteriana.

7.5. Extracción del ADN genómico de las endobacterias asociadas a la larva de *A. armida*.

El ADN total fue extraído de acuerdo al protocolo propuesto del kit ZR FUNGAL/BACTERIAL DNA MiniPrep™ de la marca ZYMO RESEARCH. Se colocaron 300 μ L de suspensión celular de cada cepa pura y 750 μ L de solución de lisis en un tubo ZR BashingBead™ de lisis, las muestras se vortexearon y centrifugaron a 10,000 x g durante 1 min. Posteriormente 400 μ L del sobrenadante fueron transferidos a un filtro Zymo-Spin™ con tubo colector y se centrifugó a 7,000 rpm por 1 minuto, al filtrado obtenido se le adicionaron 1200 μ l de la solución Fungal/Bacterial DNA Binding Buffer, 800 μ L de la mezcla anterior fueron transferidos a un filtro Zymo-Spin™ con tubo colector y se centrifugó a 10,000 x g por 1 minuto, se desechó el filtrado recolectado y se repitió el procedimiento anterior con el resto de la mezcla. El filtro Zymo-Spin™ del paso anterior se transfirió a un nuevo tubo colector y se adicionaron 200 μ L de solución DNA Pre-Wash Buffer y se centrifugó a 10,000 x g por 1 minuto. Se desechó el filtrado recolectado y se adicionó 500 μ L de Fungal/Bacterial DNA Wash Buffer a la columna Zymo-Spin™ con tubo colector, enseguida se centrifugó a 10,000 x g por 1 minuto. La columna Zymo-Spin™ fue transferida a un tubo eppendorf limpio de 1.5 mL y se adicionaron 50 μ L de DNA Elution Buffer

directamente a la columna para diluir el DNA, se centrifugó a 10,000 x g durante 30 s. El ADN genómico se conservó a 4 °C hasta su empleo.

7.5.1. Corroboración del ADN extraído por electroforesis en gel de agarosa

Se preparó un gel de agarosa al 1% con buffer TAE 1X, el gel fue sumergido en buffer TAE 1X en una cámara de electroforesis después de solidificar, los posos del gel fueron cargados con una mezcla de 5.0 µl de ADN extraído de cada una de las cepas analizadas, 2.0 µl de Buffer de carga, 2µl de marcador de peso (1 kb), esto se corrió a 100 volts por 35 minutos, enseguida el gel fue teñido con bromuro de etidio al 1%.

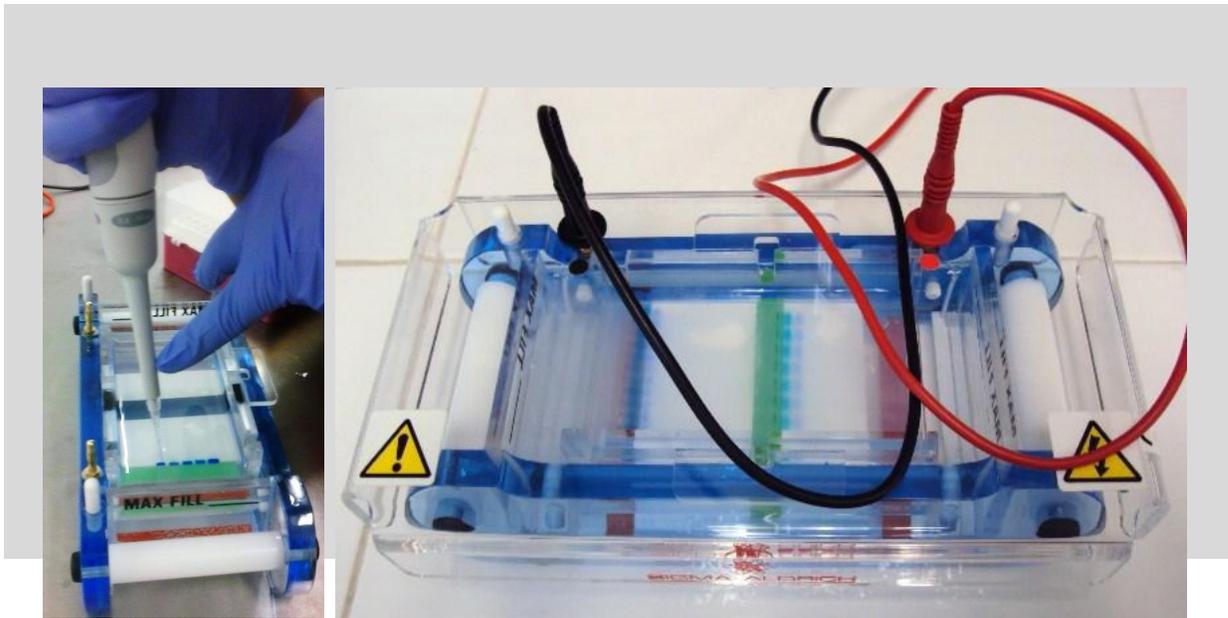


Figura 13. Cámara y gel de electroforesis

7.6. Análisis de Huellas Genómicas ERIC-PCR

Para la amplificación de huellas genómicas de cada cepa aislada, se realizó la técnica de ERIC-PCR, (Versalovic *et al.*, 1994), para agruparlas por similitud entre los patrones de electroforesis obtenidos por cada cepa.

Se realizó el PCR para ERIC utilizando un termociclador modelo 2720 de la marca *Applied Biosystems*, usando los primers ERIC1 y ERIC2 (**ERIC1R**: 5'- ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCAC -3' y **ERIC 2**: 5'AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG- 3') descritos por Versalovic *et al.* (1994), para esto se preparó la mezcla de acuerdo a las cantidades y proporciones de la Tabla 2. Posteriormente la carga de reacción realizada para ERIC se

dividió en tubos de 200 μL , colocando 9.2 μL de la carga, a los cuales se les agregó 0.8 μL de DNA total previamente extraído, para posteriormente ser amplificado.

Tabla 2. Carga de reacción para ERIC-PCR

| Reactivos | 1tubo (10 μL) |
|-------------------|---------------------------|
| Buffer 10x | 1.0 |
| DMSO 10% | 1.0 |
| MgCl ₂ | 1.52 |
| dNTP's | 1.24 |
| ERIC 1 | 0.2 |
| ERIC 2 | 0.2 |
| Taq polimerasa | 0.08 |
| H2O miliQ | 3.96 |
| Total | 10.0 |

La reacción de amplificación mediante PCR se realizó en un termociclador bajo las siguientes condiciones (fig. 14).

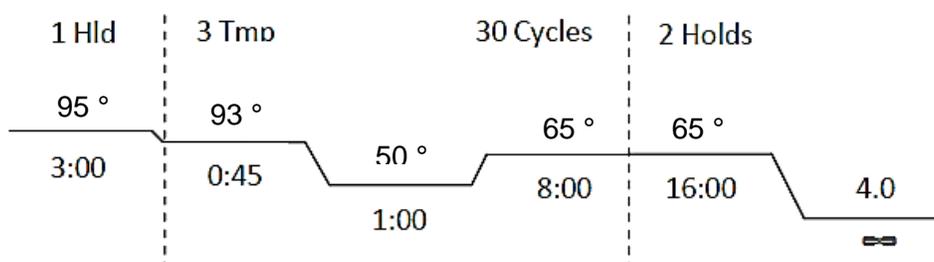


Figura 14. Programa utilizado para amplificar ERIC-PCR.

7.6.1. Corroboración del ERIC-PCR por electroforesis

Los productos de la amplificación se verificaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, colocando 5 μl de producto de PCR de cada muestra, 2.0 μL de buffer de carga y 2.0 μL de marcador de peso molecular (1kb). Las muestras se corrieron a 90 Volts por 45 minutos y se visualizaron bajo un fotodocumentador UPK, usando luz UV-320 nm.

7.7. Amplificación del gen 16S rRNA

A partir del ADN purificado se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar el gen 16S rRNA utilizando los primer's 27F (5'-AGAGTT TGA

TCMTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGTTACCTTGTTA-CGACTT-3') (Shao *et al.*, 2015). Se preparó la siguiente carga de reacción (Tabla 3).

Tabla 3. Carga de reacción para PCR-16S usando los primer's 27F y 1492R

| Reactivos | 1 tubo (100 µL) |
|-------------------|-----------------|
| dNTP's | 0.8 |
| 27F | 1.0 |
| 1492R | 1.0 |
| MgCl ₂ | 3.0 |
| Buffer 10x | 10.0 |
| Taq polimerasa | 0.5 |
| H2O miliQ | 83.7 |
| DNA total | 1.0 |
| Total: | 100.0 |

La amplificación se realizó bajo las siguientes condiciones (fig. 15).

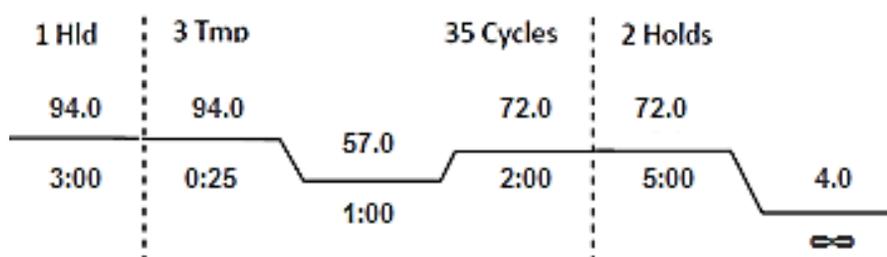


Figura 15. Programa utilizado para amplificar el gen 16S rRNA

7.7.1. Corroboración del PCR-16S por electroforesis

Los productos de la amplificación se verificaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.0 %, colocando 5µl de producto de PCR-16S de cada muestra, 2.0 µL de buffer de carga y 2.0 µL de marcador de peso molecular (1kb). Las muestras se corrieron a 100 Volts por 30 minutos, enseguida se tiñó con bromuro de etidio al 1%, finalmente el gel se visualizó bajo un fotodocumentador UPK, usando luz UV-320 nm.

7.8. Análisis de restricción del gen 16S rRNA amplificado (ARDRA)

Utilizando los productos de PCR del gen 16S rRNA de cada cepa, se realizó una digestión con la enzima de restricción HinfI para agrupar las cepas con el mismo patrón de

corte. Para la digestión se preparó la mezcla de reacción siguiente (Tabla 4) incubando a 37°C por 3 horas.

Tabla 4. Carga de reacción para ARDRA

| Reactivos | 1tubo (10 µL) |
|--|----------------------|
| Enzima HinfI | 0.3 |
| Buffer 10X | 1.0 |
| H₂O libre de endonucleasas | 7.2 |
| Producto de PCR-16S | 1.5 |
| Total: | 10.0 |

7.8.1. Corroboración por electroforesis de ARDRA

Los productos digeridos enzimáticamente se inyectaron en un gel de agarosa al 1.5% y se corrieron en una cámara de electroforesis a 90 V durante 45 minutos. Posteriormente el gel fue teñido con bromuro de etidio al 1%.

7.9. Purificación y secuenciamiento del gen 16S rRNA

Los productos de PCR-16S fueron purificados para liberar al fragmento amplificado de los residuos de la PCR, usando el kit High Pure PCR Product Purification system de la marca RocheTM. Se tomó un volumen de 100 µL de producto de PCR-16S y se mezcló con 500 µL de Binding Buffer, la mezcla se transfirió a un tubo de filtro insertado a un tubo colector, se centrifugó 1 min a 13,000 rpm y se desechó el filtrado; a continuación se adicionó al tubo de filtro 500 µL de Wash Buffer, se centrifugó 1 min a 13,000 rpm y se decantó el filtrado, enseguida se agregaron 200 µL de Wash Buffer, se centrifugo 1 min a 13,000 rpm y se desechó el filtrado, posteriormente se colocó el tubo de filtro en un tubo de Eppendorf de 1.5 mL limpio y se adiciono 50 µL de Elution Buffer, finalmente se centrifugó a 13,000 rpm por 1 min para obtener el producto de PCR-16S rRNA purificado (fig. 16).

Para enviar las muestras a secuenciar se tomó un tubo Eppendorf de 200 μ L al cual se adicionaron 14.0 μ L de agua M.Q., 1 μ L de los primer's 27F y 1492R y 1.0 μ L de producto de PCR-16S rRNA purificado. La mezcla se realizó por cada primer correspondiente, por lo tanto, por cepa se obtuvieron dos tubos para ser secuenciados. Las muestras se enviaron a la “Unidad de síntesis y secuenciación de DNA (USSDNA) del Instituto de Biotecnología de la UNAM”.

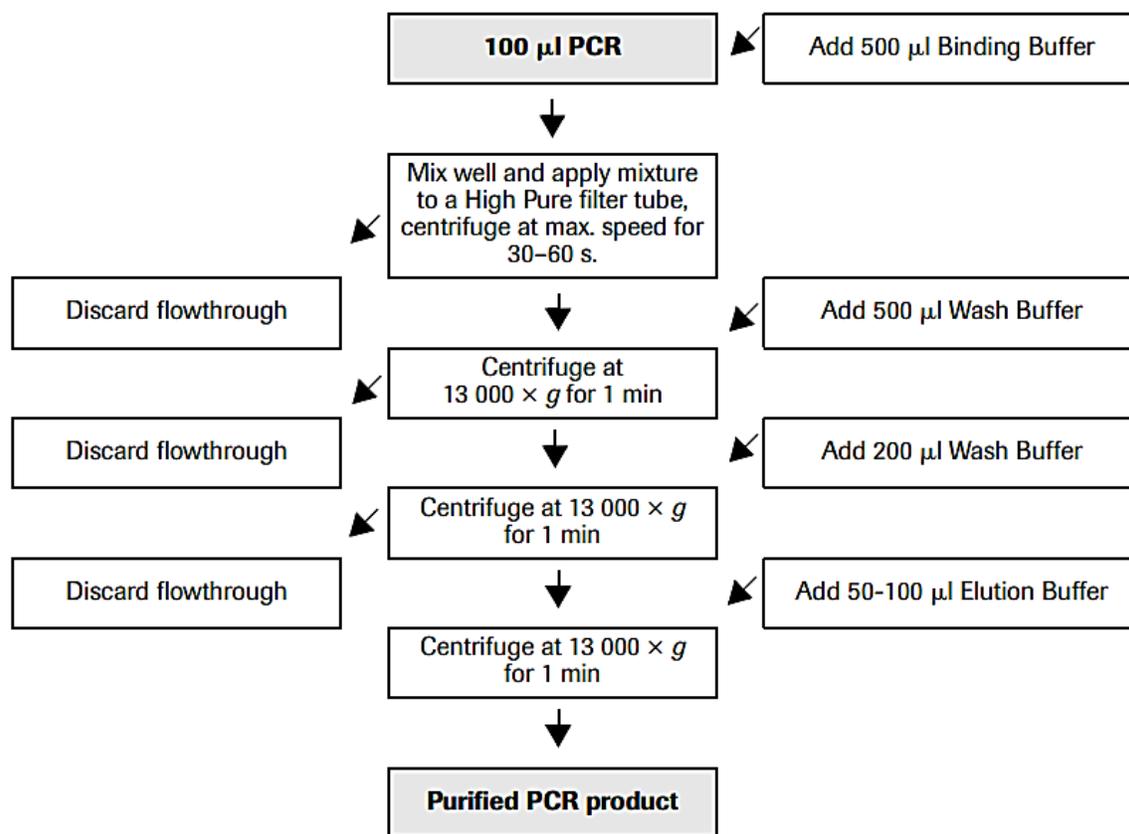


Figura 16. Protocolo para la purificación de productos de PCR

7.10. Análisis filogenético e identificación de especies bacterianas

La secuencia sentido y antisentido (forward y reverse) de cada cepa fue editada con el programa BioEdit Sequence Alignment V.7.1.3.0 (López *et al.*, 2012), posteriormente se utilizó la herramienta básica local de alineación (BLAST) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y se combinó la secuencia de la Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu>) para buscar secuencias similares

conocidas. El análisis evolutivo, filogenético y molecular se realizó con la versión MEGA 5.2.2, por el método Neighbor-Joining (López *et al.*, 2012). Una vez realizado el análisis completo se procedió a crear formatos Sequin para generar los números de acceso del GenBank, para dicho procedimiento se utilizó Sequin V.15.10.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Morfología (biología) de la larva de *Arsenura armida*.

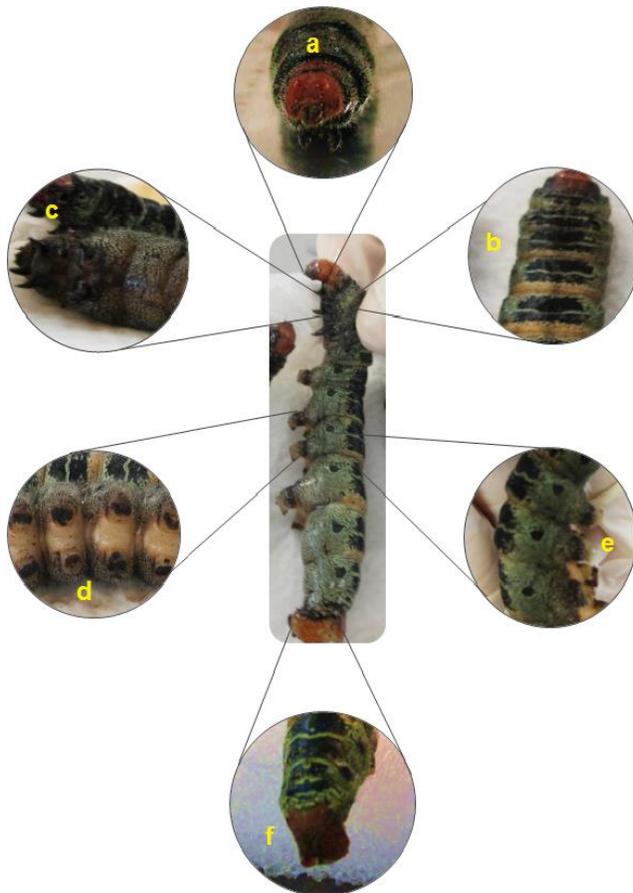


Tabla 5. Morfología de larva de *Arsenura armida* construida a partir de la biología de la oruga de una mariposa.

| Morfología de la larva | | |
|------------------------|---|--|
| Cabeza | a | Triangulo frontal, ocelo, antena, mandíbula, labro |
| Tórax | b | Escudo protorácico |
| | c | Patas verdaderas |
| Abdomen | d | Protopatas medioabdominales |
| | e | Espiráculo |
| | f | Protopata anal, escudo anal |

Figura 17. Fisiología de la larva de *Arsenura armida*. Foto: López, M.G., 2015.

Nuestras observaciones acerca de *A. armida* han permitido que podamos conocer un poco más sobre esta especie y es a partir de ellas que identificamos la biología de la larva. Como se muestra en la figura 17. La larva muestra colores muy llamativos, en la parte superior *A. armida* presenta color verde, amarillo y negro en forma de anillos, lo que nos hace pensar que estas características le permiten ocultarse de sus depredadores, la parte inferior señalada con la letra f es de color café claro y como se indica en la tabla 5. Esta sección corresponde a la Protopata anal y escudo anal.

Estas características se deben a que la larva muda de cutícula por última vez, de acuerdo a la investigación hecha por Morales Franco en su libro Zats (estímulo culinario) las larvas pierden casi en su totalidad el color rojo amarillento que las caracteriza en su etapa joven, conservando el color verde, amarillo y negro.

En la cabeza (letra a) la larva posee piezas bucales en la parte inferior, en la sección del tórax (letras b y c) se encuentran las patas verdaderas y el escudo protorácico. De acuerdo a la tabla 5, en la sección del abdomen podemos observar las protopatas medioabdominales (letra d) las cuales se encuentran un par en cada uno de los segmentos a partir de segmento 3, el espiráculo (letra e) y Protopata anal (letra f).

8.1.1. Caracterización morfométrica de la larva

Para determinar los parámetros de longitud, peso y diámetro medio de la larva se tomaron 50 larvas al azar en buen estado, a cada una se le determinaron los parámetros mencionados anteriormente.

En la figura 18 se muestran los valores obtenidos por cada parámetro medido (longitud, diámetro medio y peso) en las larvas de *A. armida*, de acuerdo a estos resultados el peso correspondiente es de 11.71 g, el valor del diámetro medio es de 0.9542 cm y para la longitud es de 11.50 cm, así mismo Landero *et al.* (2012) reportan una longitud de 10-12 cm.

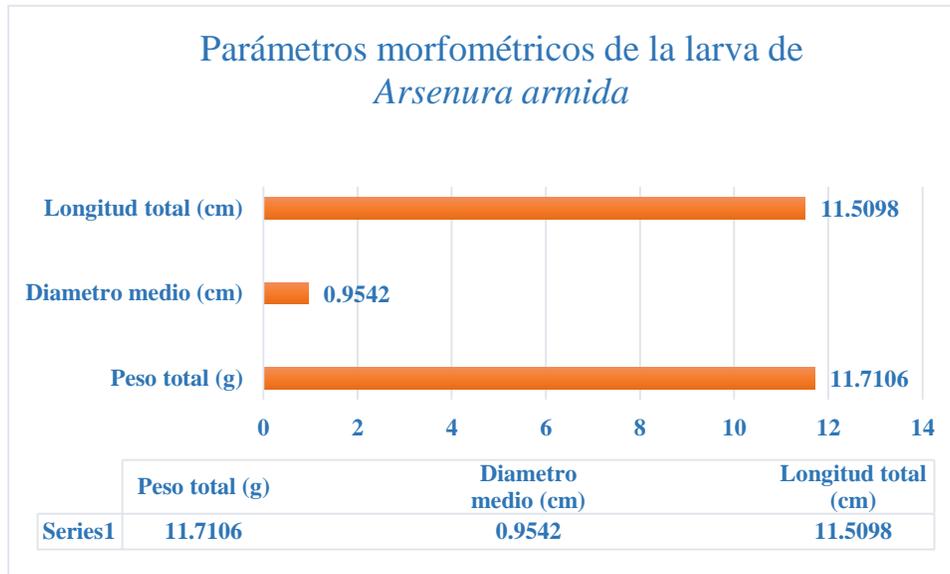


Figura 18. Representación gráfica del promedio de los datos obtenidos a partir de las mediciones realizadas a cada larva.

Estos resultados son cercanos a los reportados por Briceño (1983) quien reporta que la larva de *A. armida* tiene una longitud de 13 cm y 1.8 cm de diámetro medio, respecto al diámetro la guía de campo Forest Pests in Central America reporta que una larva madura puede medir 2 cm de diámetro y hasta 13 cm de longitud.

Es importante recalcar que las características de este insecto pueden variar respecto a la región en donde se encuentren. Los datos mostrados anteriormente son solo parte de la caracterización de la larva, pocas son las investigaciones que generan resultados acerca de la morfometría de *A. armida* es por eso que no se ha encontrado un dato reportado para el peso de este insecto.

8.2. Morfología macroscópica y microscópica de las cepas aisladas a partir del tracto digestivo de *A. armida*.

A partir del tracto digestivo de *Arsenura armida* se obtuvieron 120 cepas puras, las cuales fueron caracterizadas fenotípicamente al ser cultivadas en Agar Soya y Trypticaseina. En la tabla 6, se muestran las características de algunas de ellas.

Tabla 6. Morfología colonial de algunas de las cepas más representativas.

Morfología colonial de algunas de las cepas más representativas.

| No. | Cepa | Color | Características |
|-----|-------|--------------|--|
| 1 | 10 BG | Beige | Forma: circular, Borde: irregular, ondulado, Elevación: convexa, Superficie: lisa, Consistencia: cremosa y opaca. |
| 2 | 4 BG | Perla | Forma: Fusiforme, Borde: ondulado, Elevación: convexa, Superficie: Lisa, Consistencia: cremosa y opaca |
| 3 | 3A | Amarillo | Forma: irregular, Borde: ondulado, Elevación: plana, Superficie: rugosa, Consistencia: cremosa, opaca y de crecimiento abundante |
| 4 | 4 PT | Transparente | Forma: puntiforme, Bordes: entero, Elevación: convexa, Superficie: Lisa, Consistencia: cremosa, translúcida y crecimiento pobre. |
| 5 | 11 AM | Amarillo | Forma: irregular, Borde: lobulado, Elevación: plana, Superficie: rugosa, cremosa, opaca y de crecimiento abundante |
| 6 | 12 | Beige | Forma: irregular, Borde: lobulado, Superficie: lisa, Consistencia: cremosa, opaca y de crecimiento abundante |
| 7 | 7 AP | Beige | Forma: irregular, Borde: ondulado, Elevación: plana, Superficie: lisa, opaca y consistencia cremosa |
| 8 | 7 RB | Beige | Forma: circular, Borde: entero, Elevación: convexa, Superficie: lisa, opaca y de consistencia cremosa |
| 9 | 6CF | Café claro | Forma: circular, Borde: entero, Elevación: plana, Superficie: lisa con halos, translúcida y de consistencia seca |
| 10 | 6CFH | Café claro | Forma: circular, Borde: entero, Elevación: plana, Superficie: lisa con centro, translúcida y de consistencia seca |
| 11 | 6 CP | Café claro | Forma: circular, Borde: entero, Elevación: plana, Superficie: lisa, translúcida y de consistencia seca |

| | | | |
|----|-------|--------------|---|
| 11 | 6RGC | Crema | Forma: circular, Borde: entero, Elevación: plana, Superficie: lisa y de consistencia cremosa |
| 12 | 13GP | Crema | Forma: Irregular, Borde: ondulado, Elevación: plana, Superficie: rugosa, Consistencia: cremosa, opaca y de crecimiento abundante |
| 13 | 1MRCB | Crema | Forma: irregular, Borde: ondulado, Elevación: plana, Superficie: lisa, Consistencia: cremosa, traslucida y de crecimiento abundante |
| 14 | 2BRP | Crema | Forma: Puntiforme, Borde: Entero, Elevación: plana, Superficie: lisa, Consistencia: cremosa, traslucida y de crecimiento abundante |
| 15 | 3PP | Crema | Forma: circular, Borde: Entero, Elevación: convexa, Superficie: lisa, Consistencia: cremosa, opaca y de crecimiento pobre |
| 16 | 4GIPC | Crema | Forma: irregular, Borde: ondulado, Elevación: plana, Superficie: lisa, Consistencia: cremosa, opaca y de crecimiento abundante |
| 17 | 5MCR | Transparente | Forma: circular, Borde: entero, Elevación: convexa, Superficie: lisa, Consistencia: cremosa, transparente y de crecimiento abundante |
| 18 | 6IGF | Blanca | Forma: irregular, Borde: ondulado, Elevación: plana, Superficie: lisa, Consistencia: cremosa, opaca y de crecimiento abundante |
| 19 | 7GPR | Crema | Forma: irregular, Borde: ondulado, Elevación: plana, Superficie: lisa, Consistencia: cremosa, traslucida y de crecimiento abundante |
| 20 | 9IPF | | Forma: Irregular, Borde: ondulado, Elevación: plana, Superficie: rugosa, Consistencia: cremosa, opaca y de crecimiento abundante |
| 21 | 10 GH | Crema | Forma: irregular, Borde: ondulado, Elevación: convexa, Superficie: lisa, Consistencia: cremosa, traslucida y de crecimiento abundante |
| 22 | 15 2H | Crema | Forma: irregular, Borde: ondulado, Elevación: plana, Superficie: Rugosa, Consistencia: cremosa, traslucida y de crecimiento abundante |

| | | | |
|----|---------|--------|---|
| 23 | 12PG | Crema | Forma: irregular, Borde: ondulado, Elevación: convexa, Superficie: lisa, Consistencia: cremosa, traslucida y de crecimiento abundante |
| 24 | 11P | Crema | Forma: circular, Borde: entero, Elevación: plana, Superficie: lisa, Consistencia: cremosa, traslucida y de crecimiento abundante |
| 25 | 18GC | Crema | Forma: circular, Borde: Entero, Elevación: plana, Superficie: lisa, Consistencia: cremosa, traslucida y de crecimiento abundante |
| 26 | 17GA | Crema | Forma: Irregular, Borde: Entero, Elevación: plana, Superficie: lisa, Consistencia: cremosa, opaca y de crecimiento abundante |
| 27 | 16CRM | Crema | Forma: circular, Borde: Entero, Elevación: convexa, Superficie: lisa, Consistencia: cremosa, traslucida y de crecimiento abundante |
| 28 | 20GF | Crema | Forma: Irregular, Borde: ondulado, Elevación: plana, Superficie: rugosa, Consistencia: cremosa, traslucida y de crecimiento pobre |
| 29 | 21PPDGF | Crema | Forma: Irregular, Borde: Ondulado, Elevación: plana, Superficie: Rugosa, Consistencia: cremosa, opaca y de crecimiento abundante |
| 30 | 19PA | Blanca | Forma: Irregular, Borde: Entero, Elevación: convexa, Superficie: Lisa, Consistencia: cremosa, opaca y de crecimiento abundante |
| 31 | 22PPGA | Crema | Forma: circular, Borde: Entero, Elevación: convexa, Superficie: Lisa, Consistencia: cremosa, opaca y de crecimiento abundante |
| 32 | 23GG | Crema | Forma: Irregular, Borde: ondulado, Elevación: plana, Superficie: rugosa, Consistencia: cremosa, opaca y de crecimiento abundante |

La inoculación en medio sólido se realizó por la técnica de estría cruzada, tomando 10.0 μ L de muestra de las tres últimas diluciones de acuerdo a este procedimiento del tracto digestivo de la larva se aislaron 120 cepas, esto indica que en el interior de la larva se encuentra una amplia diversidad de ellas, las cuales cumplen funciones específicas que favorecen el desarrollo de la larva.

Se probaron tres medios solidos diferentes (ICC, TSA, AN) en los cuales apreciamos que el crecimiento de las colonias bacterianas en Agar Nutritivo e Infusión Cerebro Corazón era muy semejante a diferencia de ellos el medio de Soya y tripticaseina presentaba algunas colonias con morfología distinta, este acontecimiento fue benéfico ya que nos permitió obtener una mayor diversidad de colonias. Es por lo anterior que para continuar generando resultados en los que las colonias aisladas no estuviesen muy repetidas se decidió usar el medio TSA exclusivamente, además de que fue el medio con mayor crecimiento por parte de las bacterias (fig. 19).

El agar de soya y tripticaseina tiene en su composición Peptona de caseína 15.0, Peptona de soja 5.0, Cloruro de sodio 5.0 y agar 15.0.

Este medio es considerado de mantenimiento, esto significa que preserva satisfactoriamente la viabilidad de los organismos, además por el contenido de peptona de soja y peptona de caseína resulta una aportación nutritiva que permite el desarrollo adecuado de un gran número de microorganismos, tanto exigentes como no exigentes.

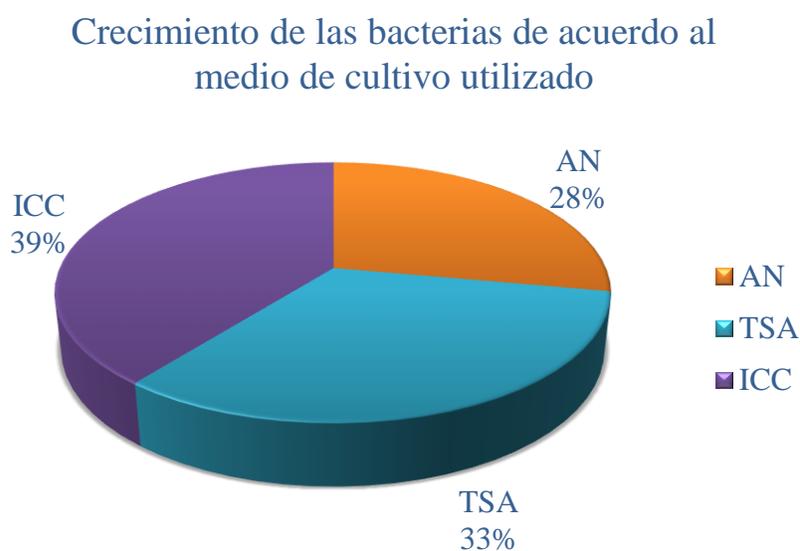


Figura 19. Grafica circular que representa en porcentaje el número de colonias crecidas en cada medio de cultivo sólido.

Es posible que el mayor número de colonias se presentó en el medio TSA porque el preenriquecimiento de la muestra se realizó en caldo de Soya y Tripticaseina, debido a esto la adaptación de las bacterias en medio sólido TSA fue más rápida.

Tabla 7. Morfología microscópica de algunas de las cepas más representativas aisladas del tracto digestivo de *A. armida*

Morfología microscópica de algunas de las cepas aisladas del tracto digestivo de *A. armida*

| <i>Cepa</i> | Morfología | Tinción de Gram |
|--------------|--|-----------------|
| <i>1 T</i> | Cocos pequeños en cadena | Gram negativo |
| <i>1MCRB</i> | Cocobacilos | Gram negativo |
| <i>2BRP</i> | Cocos aislados | Gram negativo |
| <i>3 A</i> | Cocos pequeños en pares | Gram negativo |
| <i>3PP</i> | Bacilos cortos | Gram positivo |
| <i>4 BG</i> | Cocobacilos, en racimos | Gram negativo |
| <i>4 PT</i> | Cocos en racimos, en racimos | Gram positivo |
| <i>4 BG</i> | Cocos pequeños en pares | Gram negativo |
| <i>4GIPC</i> | Cocos aislados | Gram negativo |
| <i>5MCR</i> | Cocos en pares | Gram negativo |
| <i>6IGF</i> | Cocos aislados | Gram negativo |
| <i>7 AP</i> | Bacilos cortos, en pares, semi alargados | Gram negativo |
| <i>7 RB</i> | Cocos tetrados de forma ovalada | Gram negativo |
| <i>7GCR</i> | Cocos en pares | Gram negativo |
| <i>8GPR</i> | Cocos aislados | Gram negativo |
| <i>9IPF</i> | Cocos aislados | Gram negativo |
| <i>10GH</i> | Cocos pequeños | Gram negativo |
| <i>11AM</i> | Cocos tetrados | Gram positivo |
| <i>11P</i> | Cocos en pares | Gram positivo |
| <i>12</i> | Cocos pequeños, en cadena | Gram negativo |

| | | |
|---------------|----------------------------------|---------------|
| 12PG | Cocos aislado | Gram negativo |
| 13 GC | Cocos Pequeños, en pares | Gram positivo |
| 13 GRP | Cocos aislado | Gram negativo |
| 14 GRH | Cocos aislado | Gram negativo |
| 15 2H | Bacilos largos | Gram negativo |
| 16CRM | Cocos aislados | Gram negativo |
| 17GA | Cocos en pares | Gram negativo |
| 18GC | Cocos en pares | Gram negativo |
| 19PA | Cocos en racimos | Gram positivo |
| 20GF | Bacilos con extremos redondeados | Gram positivo |
| 21PPDG | Bacilos largos | Gram positivo |
| 22PPGA | Bacilos largos | Gram positivo |
| 23GG | Bacilos en pares | Gram positivo |

En la tabla 7 se puede observar que la mayor cantidad de las cepas mostradas son Gram negativas.

8.3. Extracción de ADN

En la figura 20, se presentan las electroforesis de ADN total de algunas cepas representativas aisladas del tracto digestivo de *Arsenura armida* en el primer carril se observa el marcador de peso molecular de 1 kb y en los demás carriles el ADN total de las cepas.

La extracción ADN se llevó a cabo para 120 cepas puras y totalmente aisladas, para las extracciones que fueron positivas se obtuvo ADN de aproximadamente 1000 pb en relación al marcador 1 kb. Para algunas cepas la corroboración de la extracción no fue positiva lo que puede ser consecuencia de que la suspensión bacteriana de la que parte el proceso de extracción fue pobre o por la alta producción de exopolisacáridos.

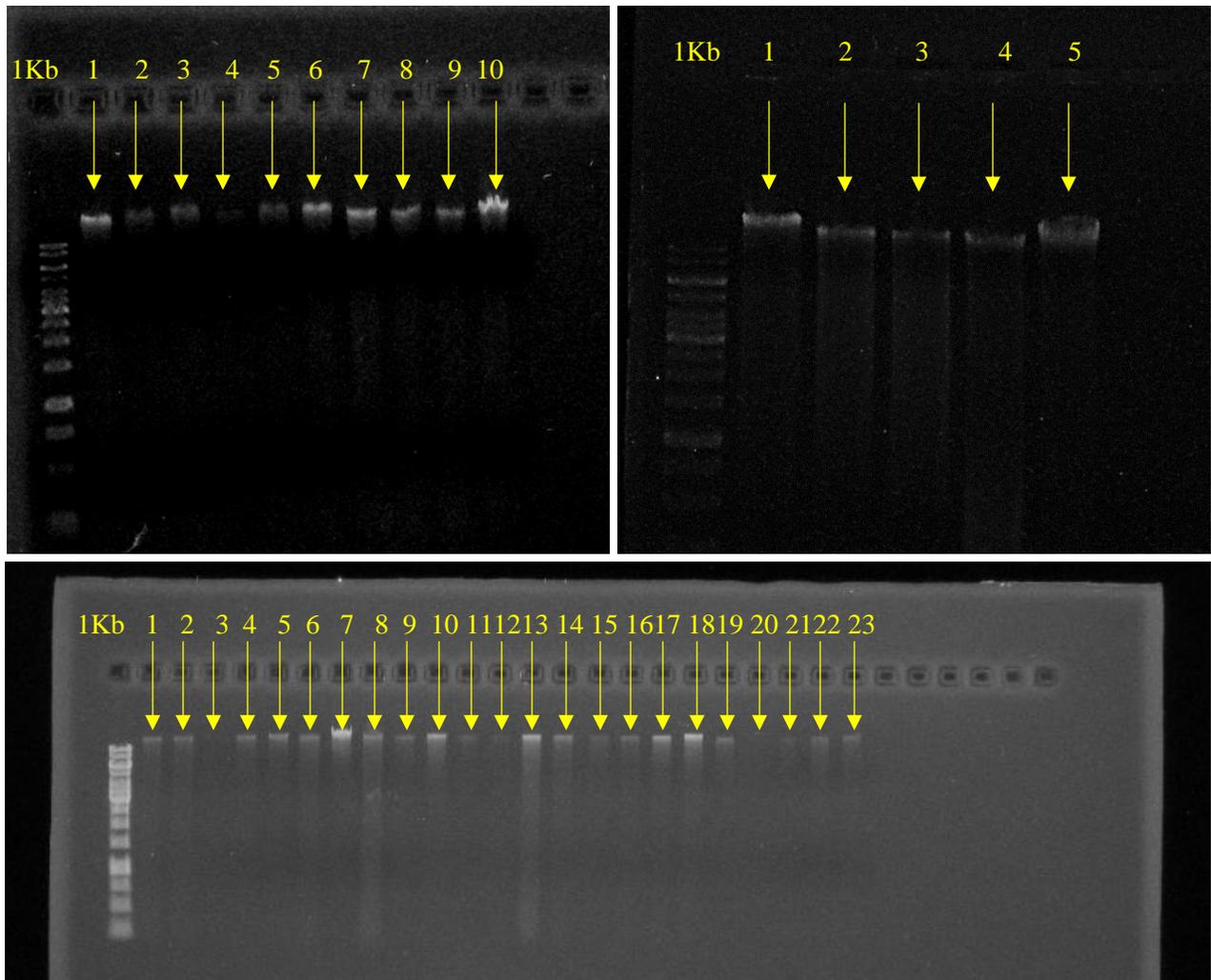


Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la extracción de ADN total.

8.4. Análisis de huellas genómicas ERIC-PCR (*genomic fingerprinting*)

El análisis de huellas genómicas generadas a partir de ERIC-PCR nos permitió observar que a partir de las 120 colonias aisladas del tracto digestivo de *A. armida* se obtuvieron 80 perfiles de huellas genómicas, de los cuales se identificaron 23 grupos de perfiles de huellas genómicas diferentes, de estos 23 grupos 16 correspondían a patrones únicos. Esta prueba nos ayuda a discriminar a nivel de cepa (Rodríguez *et al.* 1995) permitiendo disminuir las cepas de estudio. En la tabla 8 se especifica cómo se distribuyen

las cepas en diferentes patrones comparables, de cada grupo se eligieron las cepas más representativas y se señalan con la letra R.

Tabla 8. Grupos con el mismo patrón de huellas genómicas

| Agrupación de huellas genómicas | | |
|--|---|------------------------|
| Grupos | Cepas con el mismo patrón de huellas genómicas | % de abundancia |
| I | 1R | 0.83 |
| II | 4R,18 | 1.67 |
| III | 5R,37,42,98 | 3.33 |
| IV | 6,7,8R | 1.67 |
| V | 3R,9,38 | 2.50 |
| VI | 2R,46 | 1.67 |
| VII | 10R | 0.83 |
| VIII | 11R,103 | 1.67 |
| IX | 12,13R,35,39 | 3.33 |
| X | 14R,40,49,58,66,100 | 5.00 |
| XI | 15R,59,67 | 2.50 |
| XII | 16R,47,68,69,119 | 4.17 |
| XIII | 17R,54,60,73 | 3.33 |
| XIV | 19R,55,61,62 | 3.33 |
| XV | 20R,41,71 | 2.50 |
| XVI | 21,23R,51,93,111 | 4.17 |
| XVII | 22R | 0.83 |
| XVIII | 24R,27,48,64,74 | 4.17 |
| XIX | 25,32R,33,75,77,90,115 | 5.83 |
| XX | 28R,29,43,45,57 | 4.17 |
| XXI | 30R,52,53,76,78 | 4.17 |
| XXII | 31R,44,50,97 | 3.33 |
| XXIII | 34R,36 | 1.67 |

El grupo más grande es el número 19 en este grupo podemos observar 7 patrones idénticos.

Las cepas tipo (designadas con la letra R) de los grupos formados por ERIC-PCR se eligieron de acuerdo a la calidad de ADN observado en los geles de electroforesis (fig. 20). Dichas cepas se utilizaron para el análisis de ARDRA.

En las tablas 9 y 10, se muestran los diferentes grupos formados de algunos patrones de secuencias consenso amplificadas por ERIC-PCR a partir del revelado en gel de agarosa, a manera de resumen y de mostrar las diferencias entre cada patrón obtenido.

Tabla 9. Perfiles de huellas genómicas diferentes a partir de ERIC-PCR

Perfiles de huellas genómicas a partir de ERIC-PCR

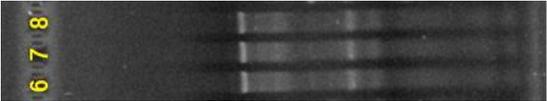
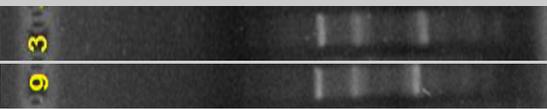
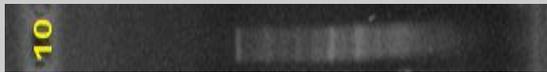
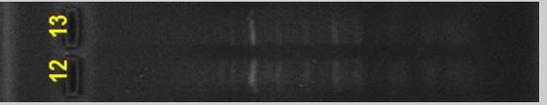
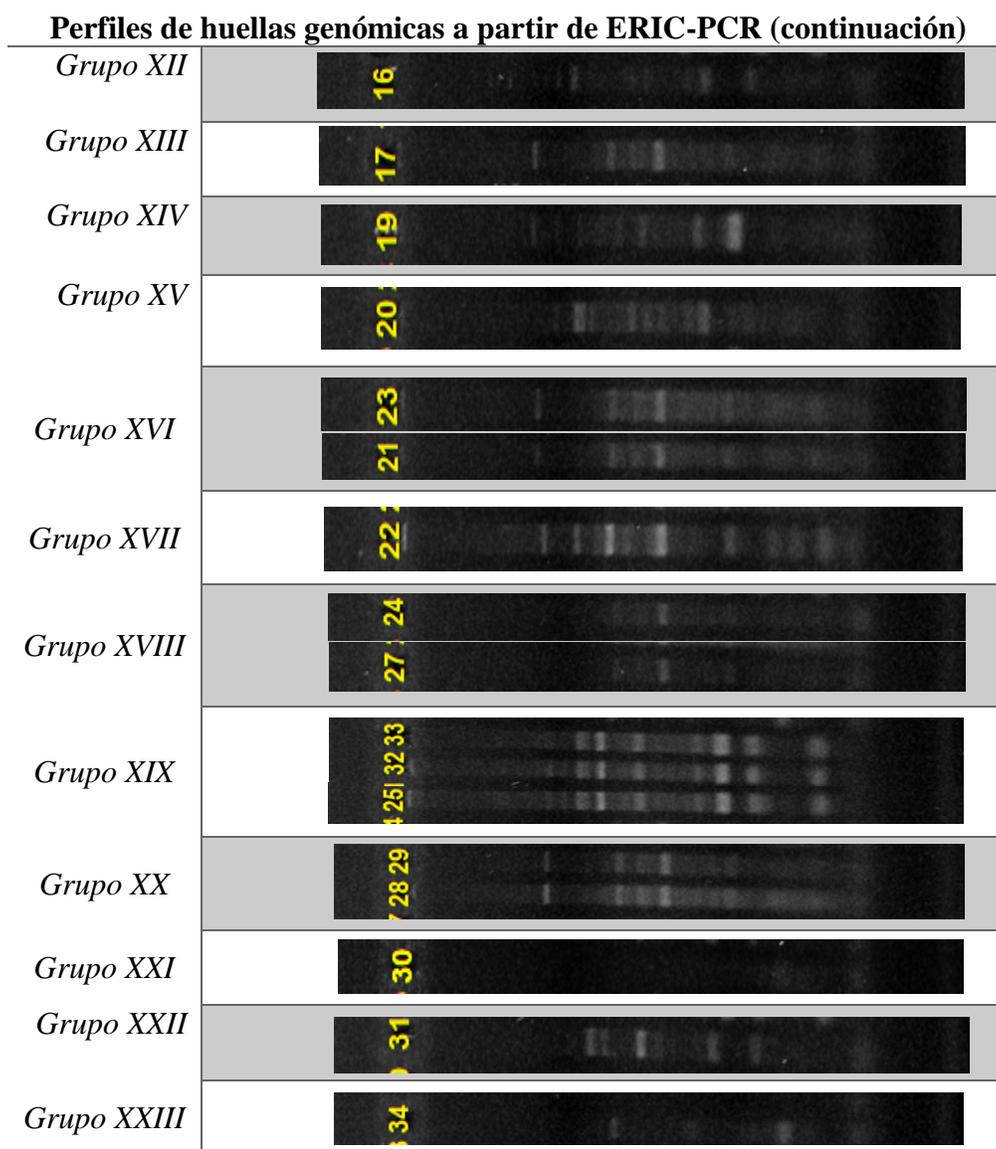
| | |
|-------------------|--|
| <i>Grupo I</i> |  |
| <i>Grupo II</i> |  |
| <i>Grupo III</i> |  |
| <i>Grupo IV</i> |  |
| <i>Grupo V</i> |  |
| <i>Grupo VI</i> |  |
| <i>Grupo VII</i> |  |
| <i>Grupo VIII</i> |  |
| <i>Grupo IX</i> |  |
| <i>Grupo X</i> |  |
| <i>Grupo XI</i> |  |

Tabla 10. Perfiles de huellas genómicas diferentes a partir de ERIC-PCR (Continuación).



8.5. Amplificación del gen 16S rRNA

A las cepas representativas con patrones diferentes de ERIC-PCR seleccionadas anteriormente (cepas marcadas con la letra R) se les realizó la amplificación del gen 16S rRNA, este método nos permitió hacer relaciones taxonómicas, ya que la molécula de 16S rRNA tiene regiones altamente conservadas. Los fragmentos amplificados se muestran en la figura 21, con un tamaño aproximado de 1500 pb.

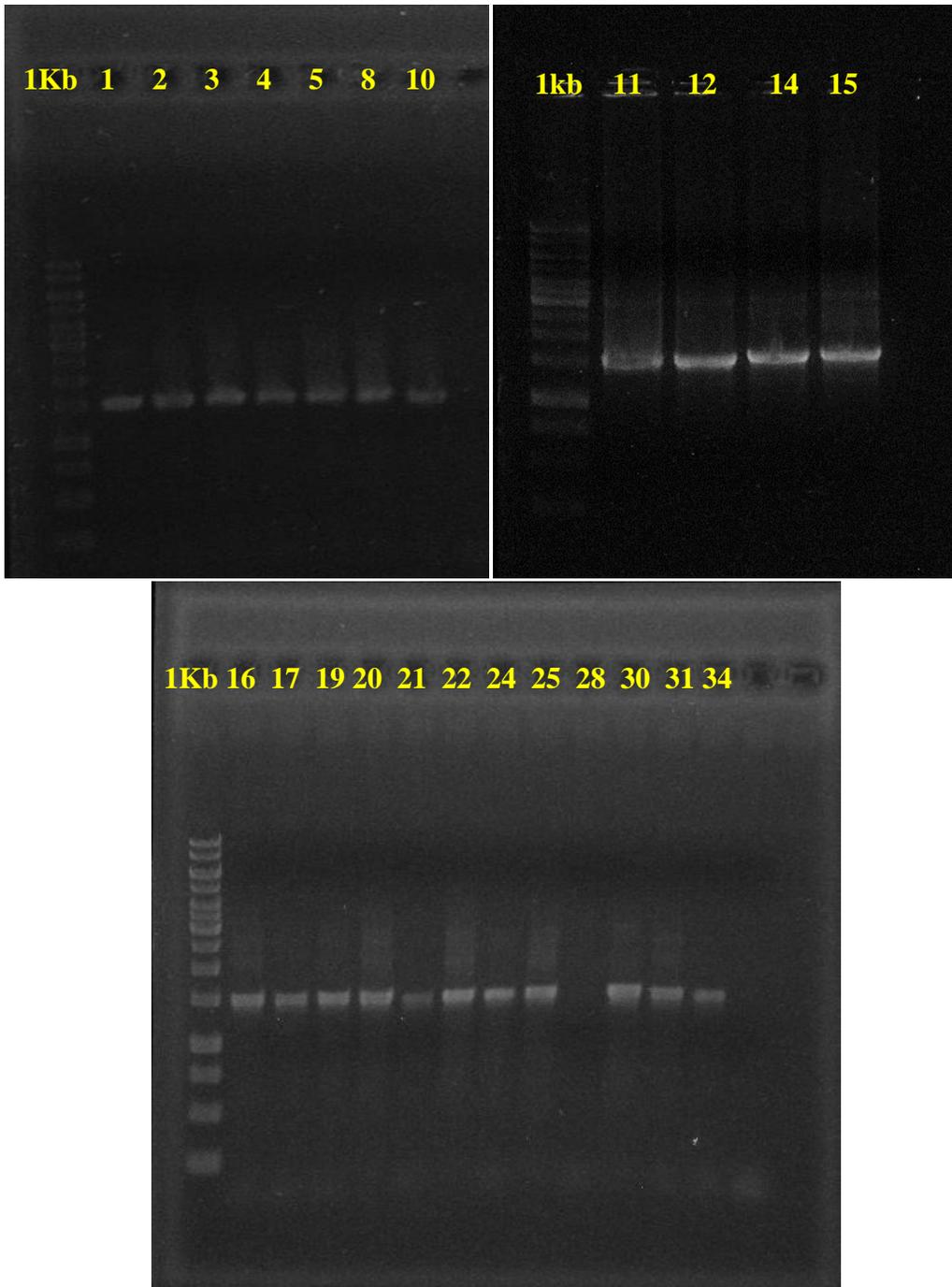


Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa del gen 16S rRNA amplificado para cada cepa representante.

8.6. Análisis de restricción del gen 16S rRNA amplificado (ARDRA)

A partir de las digestiones de los fragmentos amplificados del gen 16S rRNA realizadas con la enzima de restricción HinfI, se obtuvieron 14 patrones diferentes, dichos patrones se pueden apreciar mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (fig. 21), de los cuales 10 fueron patrones únicos y los 4 restantes agruparon 10 patrones de restricción con bandas similares, de los cuales se seleccionó un representante. En la tabla 11, se muestra un resumen de la agrupación de las digestiones realizadas, para el caso de los grupos 1, 3, 8 y 10 se eligieron las cepas más representativas (cepas marcadas con la letra R).

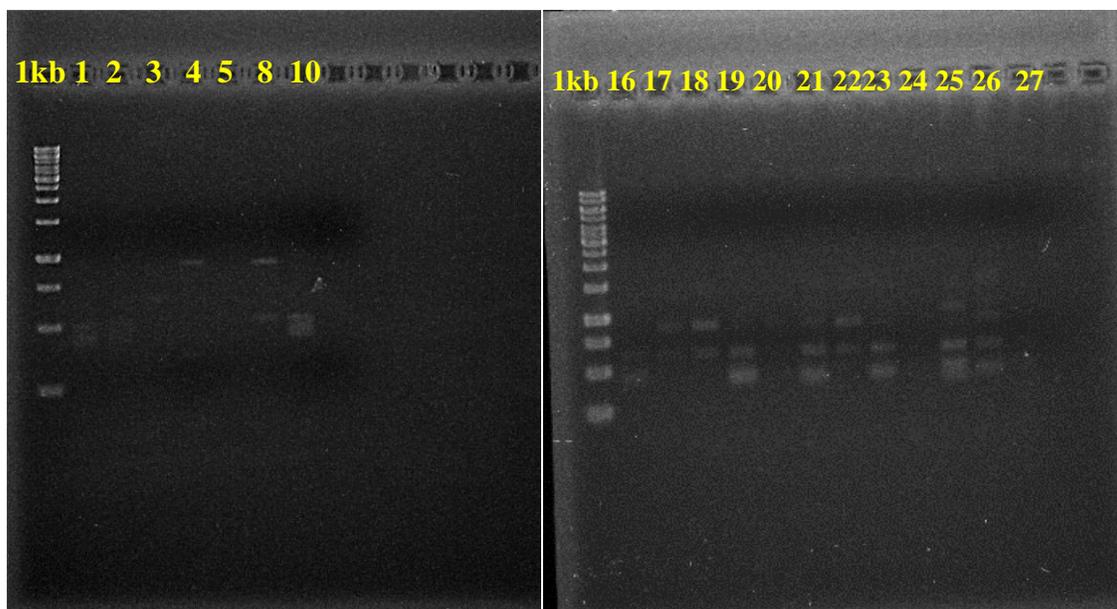


Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % de ARDRA.

En algunos de los carriles no se llevó a cabo correctamente el análisis de restricción enzimática del gen 16S rRNA, cabe destacar que el éxito de la amplificación se ve afectado por numerosos factores, de ellos podemos destacar la cantidad de reactivos añadidos por reacción, las características del sitio a amplificar, los iniciadores usados, la pureza y cantidad de la muestra de ADN.

Tabla 11. Patrones de restricción formados por ARDRA

| Patrones de restricción formados por ARDRA | |
|---|--|
| Patrón de restricción | Agrupación de las digestiones realizadas con la enzima HinfI |
| I | 1, 2, 7R |
| II | 3 |
| III | 4R, 6 |
| IV | 11 |
| V | 12 |
| VI | 14 |
| VII | 15 |
| VIII | 16, 19R, 23 |
| IX | 17 |
| X | 18R, 22 |
| XI | 20 |
| XII | 21 |
| XIII | 25 |
| XIV | 26 |

8.7. Purificación del gen 16S rRNA

A partir de la selección de cepas representativas se realizó la purificación del gen 16S rRNA de cada una de las muestras (Fig. 23), una vez comprobada la eficiencia de purificación de las cepas estas fueron secuenciadas por la Unidad de Síntesis y secuenciación de DNA (USSDNA) del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

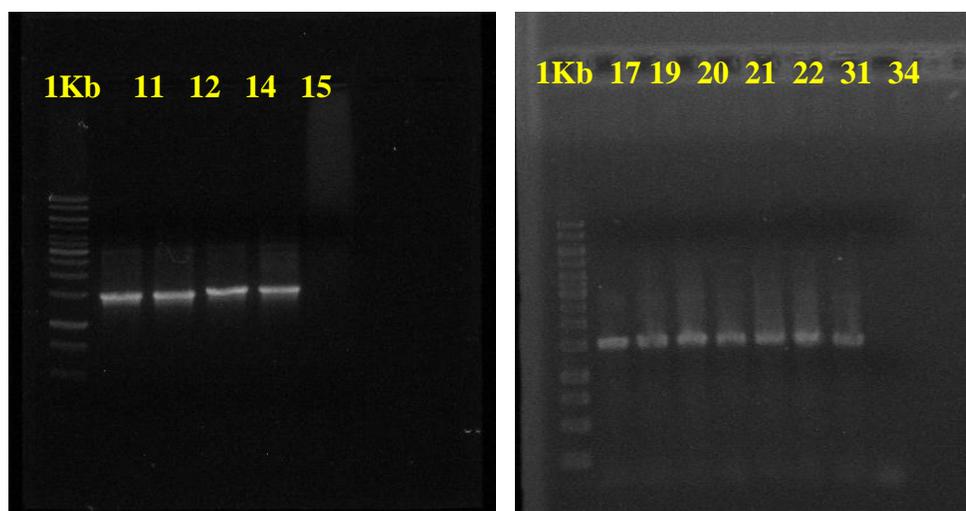


Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % de la corroboración de la eficiencia de purificación del gen 16S rRNA.

Hasta este apartado las cepas se han manipulado con números, es por eso que a continuación en la tabla 12, se presenta a manera de resumen las cepas seleccionadas para ERIC-PCR y ARDRA y en la columna final la simbología adecuada para cada cepa purificada y secuenciada.

Tabla 12. Glosario para identificación de cepas a partir de ERIC-PCR

| Glosario para identificación de cepas a partir de ERIC-PCR | | | | |
|---|--|-----------------------|--|--|
| Grupos | Cepas con el mismo patrón de huellas genómicas | cepas representativas | Cepas representativas de acuerdo a ARDRA | Clave para la identificación de la cepas |
| I | 1R | 1R | | |
| II | 4R,18 | 4R | 4R | AAT01 |
| III | 5R,37,42,98 | 5R | | |
| IV | 6,7,8R | 8R | | |
| V | 3R,9,38 | 3R | 3R | AAT02 |
| VI | 2R,46 | 2R | | |
| VII | 10R | 10R | 10R | AAT03 |
| VIII | 11R,103 | 11R | 11R | AAT04 |
| IX | 12R,13,35,39 | 12R | 12R | AAT05 |
| X | 14R,40,49,58,66,100 | 14R | 14R | AAT06 |
| XI | 15R,59,67 | 15R | 15R | AAT07 |
| XII | 16R,47,68,69,119 | 16R | | |
| XIII | 17R,54,60,73 | 17R | 17R | AAM08 |
| XIV | 19R,55,61,62 | 19R | 19R | AAM09 |
| XV | 20R,41,71 | 20R | 20R | AAM10 |
| XVI | 21,23R,51,93,111 | 23R | | |
| XVII | 22R | 22R | 22R | AAM11 |
| XVIII | 24R,27,48,64,74 | 24R | | |
| XIX | 25,32R,33,75,77,90,115 | 32R | | |
| XX | 28R,29,43,45,57 | 28R | | |
| XXI | 30R,52,53,76,78 | 30R | 30R | AAM12 |
| XXII | 31R,44,50,97 | 31R | 31R | AAM13 |
| XXIII | 34R,36 | 34R | 34R | AAM14 |

8.8. Análisis filogenético

El Análisis de las secuencias del gen 16S rRNA de las 14 cepas representativas mostradas en el anterior apartado reveló que las cepas aisladas pertenecían a 5 géneros bacterianos diferentes para lo cual se construyó un árbol filogenético para cada género (figuras 24-28).

De las 14 cepas aisladas cinco de ellas pertenecían al género *Serratia*. Con un 99% de similitud genética, en este género se agruparon las cepas AAT06, AAM08, AAM09 (con un 97.8% de similitud), AAM11 y AAM12 (tabla 13).

Por otro lado en el género *Bacillus* (fig. 24) se agruparon con un 88.7% de similitud genética la cepa AAT04 quien esta relaciona con *Bacillus odysseyi*, mientras que las cepas AAT05 y AAT13 se relacionan con un 97.6% de similitud genética con *Bacillus subterraneus* respecto al análisis realizado en la base de datos del GenBank.

En el género *Enterobacter* se agruparon las cepas AAT03, AAT07 y AAM10 con 99% de similitud con *E. cloacae*, 98% de similitud a *Enterobacter ludwigii* y con 93% a *Enterobacter asburiae* respectivamente. De acuerdo al árbol filogenético construido (Fig. 25) la cepa AAT01 se agrupó en el género *Pseudmona* la cual tenía similitud del 99% con la especie *Pseudomonas putida* L3 (KT767824.1), mientras que la cepa AAT02 tenía una similitud de su secuencia con un 99.6% con la especie *Enterococcus casseliflavus* (AF039903.1).

Finalmente la cepa AAM14 pertenecía a la familia Enterobacteriaceae y tenía una similitud de 98.7% con *L. adecarboxylata* según la base de datos del GenBank (tabla 13). Los números de acceso otorgados por el GenBank de las catorce secuencias del gen 16S rRNA determinados en este estudio se muestran en la tabla 13.

Los resultados que se encontraron son similares a los que reporta Pinto *et al.* (2007), a partir de aislamientos bacterianos de tractos digestivos de larvas y del contenido de pupas de *Automeris zugana* y *Rothschildia lebeau*. Los aislamientos bacterianos que reporta en su investigación corresponden a las siguientes familias: *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonadaceae*, así mismo reportan Cocos Gram positivos y Bacilos Gram positivos.

Así mismo como se observa en la tabla 13, el análisis de las secuencias nos permitió resumir y agrupar las cepas aisladas del tracto digestivo de *A. armida* en las siguientes familias: *Pseudomonadaceae*, *Bacillus sp.*, *Enterococcaceae* y *Enterobacteriaceae*.

Los ensayos realizados de Pinto *et al.* (2007) con los aislamientos bacterianos, permitieron decir que la presencia de estos organismos en el tracto digestivo podría incrementar la capacidad alimenticia de la oruga, pues se ha demostrado que compuestos intermedios producidos por bacterias a partir de sustratos más complejos pueden servir de alimento al insecto hospedero.

Por otro lado Ibarra (2006) en su recopilación de datos, plantea que insectos como las termitas digieren sustratos lignocelulósicos gracias a microorganismos simbioses como bacterias, protozoos y hongos que habitan en sus intestinos. Lo que sugiere que las cepas identificadas de la larva de *A. armida* pueden presentar estas características, como se ha mencionado con anterioridad las larvas se alimentan solo de las hojas de los árboles hospederos, cabe mencionar que el principal componente de las hojas es la celulosa.

Así mismo Lara & Acosta (2013) aísla bacterias celulolíticas del intestino de termitas, encontrando bacilos Gram negativos, identificados como *Enterobacter aerógenes*. De acuerdo a los resultados obtenidos tres de las 14 cepas fueron identificadas en el género *Enterobacter*. Diferentes investigaciones sugieren que las bacterias aisladas del interior de los insectos tienen aplicaciones muy diversas, es por eso que la identificación de las bacterias de esta investigación constituye un punto de partida para la comprensión de la relación metabólica y fisiológica que estos microorganismos cumplen en su hospedero. Es importante mencionar que la información acerca de las bacterias endosimbióticas de la larva de *Arsenura armida* es casi nula, ya que esta larva es considerado un exquisito platillo cultural y su estudio se basa en su importancia nutricional.

Tabla 13. Características de las bacterias simbióticas aisladas del sistema digestivo de *Arsenura armida* a partir del análisis filogenético realizado.

| Características de las bacterias simbióticas aisladas del sistema digestivo de <i>Arsenura armida</i> a partir del análisis filogenético realizado. | | | | | |
|---|-------------------------------|-------------------------------|---------------------------|-------------------------|--|
| Designación de la cepa | Sección del intestino aislada | Número de registro en GenBank | Alineamiento de secuencia | | Especie filogenética relacionada |
| | | | No. de nucleótidos (Pb) | Porcentaje de identidad | |
| AAT01 | Total | KX389675 | 1310 | 99 % | <i>Pseudomonas putida</i> L3 (KT767824.1) |
| AAT02 | Total | KX389697 | 1435 | 98.4% | <i>Enterococcus casseliflavus</i> (AF039903.1) |
| AAT03 | Total | KX389696 | 1323 | 99% | <i>Enterobacter cloacae</i> RCB970 (KT261182.1) |
| AAT04 | Total | KX389689 | 1278 | 88.7 % | <i>Bacillus odysseyi</i> 34hs1(AF526913.3) |
| AAT05 | Total | KX389692 | 1328 | 97.6 % | <i>Bacillus subterraneus</i> DSM13966T (FR733689.1) |
| AAT06 | Total | KX389674 | 1288 | 99 % | <i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>Sakuensis</i> RK26 (KC790279.2) |
| AAT07 | Total | KX389687 | 1187 | 98 % | <i>Enterobacter ludwigii</i> RCB31 (KT260531.1) |
| AAM08 | Abdominal | KX389672 | 869 | 99.5 % | <i>Serratia marcescens</i> KRED (AB061685.1) |
| AAM09 | Abdominal | KX389698 | 1308 | 97.8% | <i>Serratia marcescens</i> DSM 30121 (AJ233431.1) |
| AAM10 | Abdominal | KX389686 | 1195 | 93% | <i>Enterobacter asburiae</i> R23 (KM019904.1) |
| AAM11 | Abdominal | KX389699 | 1393 | 96.8% | <i>Serratia marcescens</i> (AB061685.1) |
| AAM12 | Abdominal | KX389673 | 1368 | 99 % | <i>Serratia marcescens</i> IARI-UPS 20 (KT441074.1) |
| AAM13 | Abdominal | KX389694 | 1338 | 96.7% | <i>Bacillus subterraneus</i> DSM13966T (FR733689.1) |
| AAM14 | Abdominal | KX389695 | 1399 | 95.3% | <i>Leclercia adecarboxylata</i> LMG 2803 (GQ856082.1) |

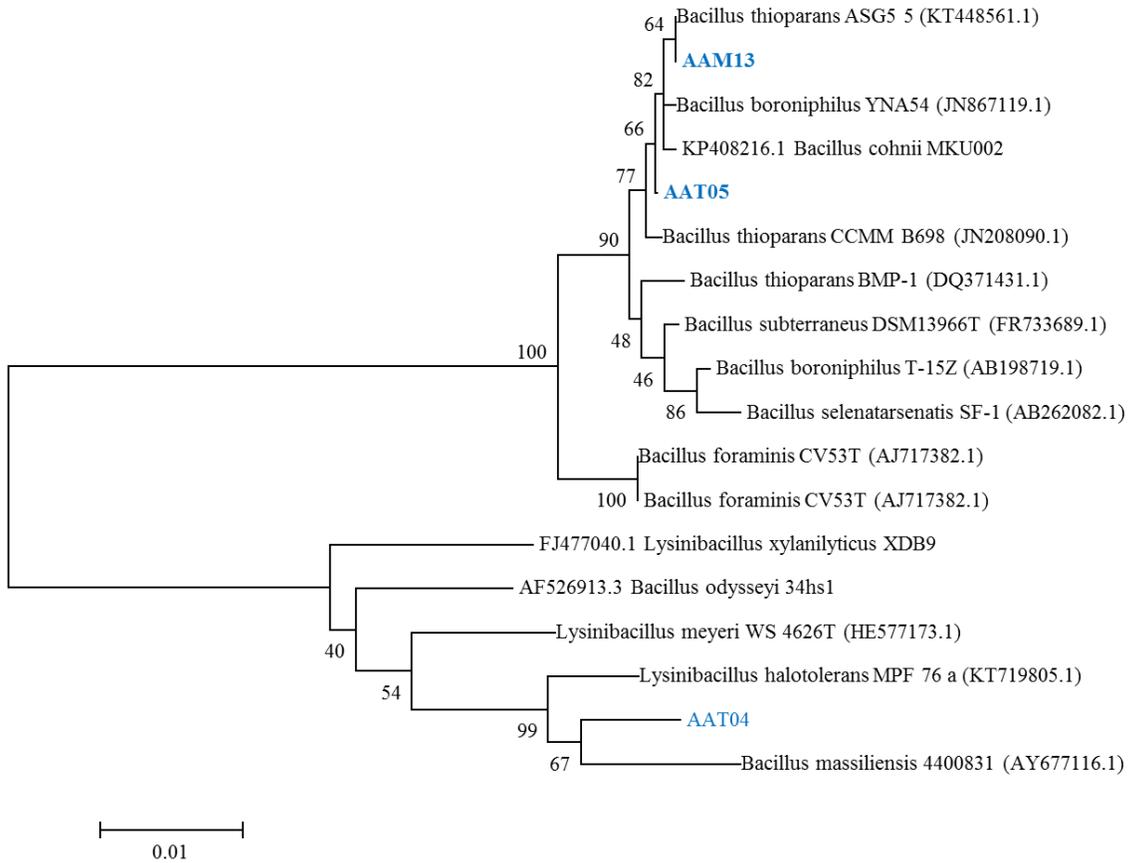


Figura 24. Árbol filogenético estimado por el método NJ con la secuencia del gen 16S rRNA del género *Bacillus/Lysinibacillus* sp. Las cepas aisladas del tracto digestivo de A. armida son señaladas en letras celestes.

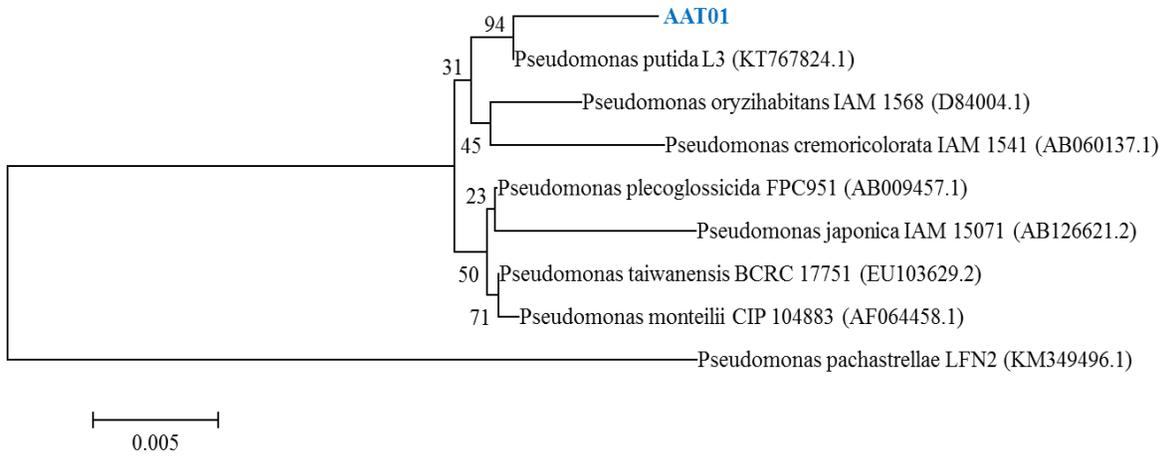


Figura 25. Árbol filogenético estimado por el método NJ con la secuencia del gen 16S rRNA del género *Pseudomonas* sp. Las cepas aisladas del tracto digestivo de *A. armida* son señaladas en letras celestes.

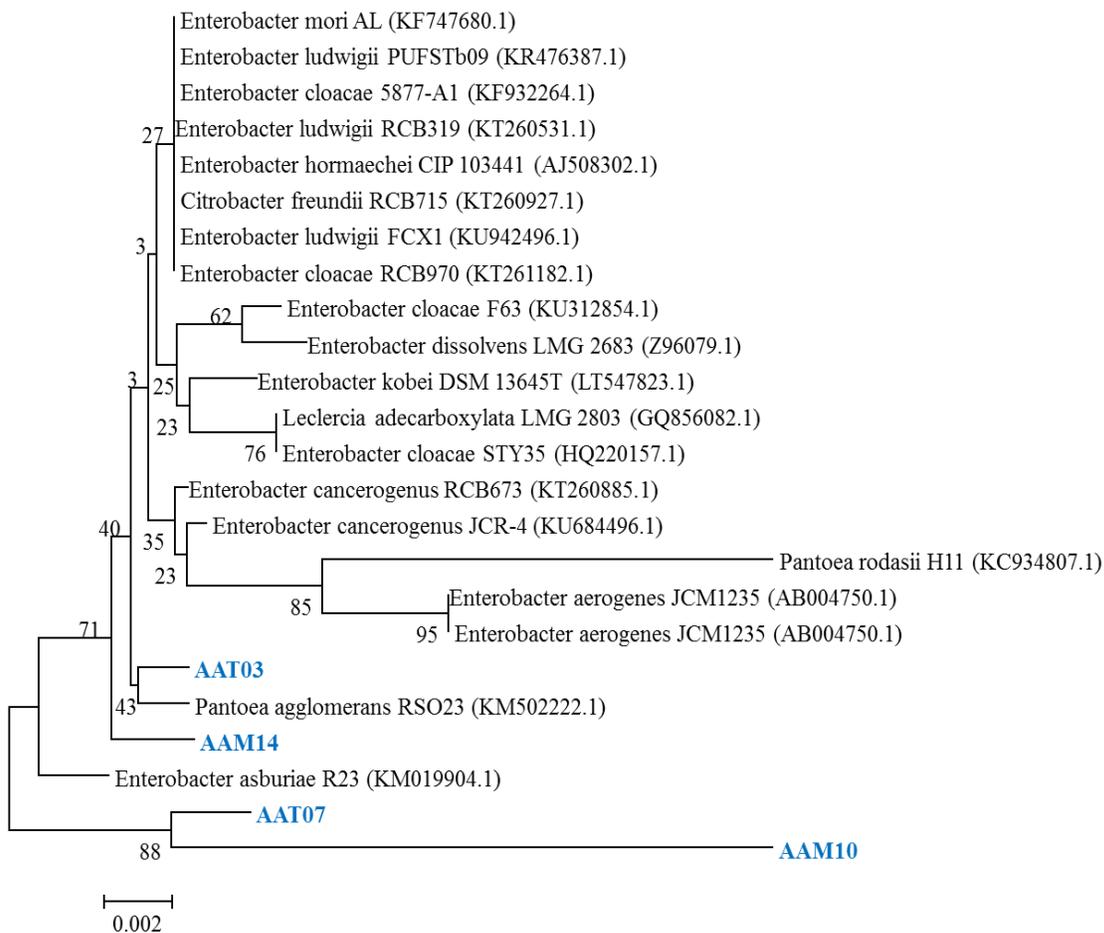


Figura 26. Árbol filogenético estimado por el método NJ con la secuencia del gen 16S rRNA del género *Enterobacter* sp. Las cepas aisladas del tracto digestivo de A. armida son señaladas en letras celestes.

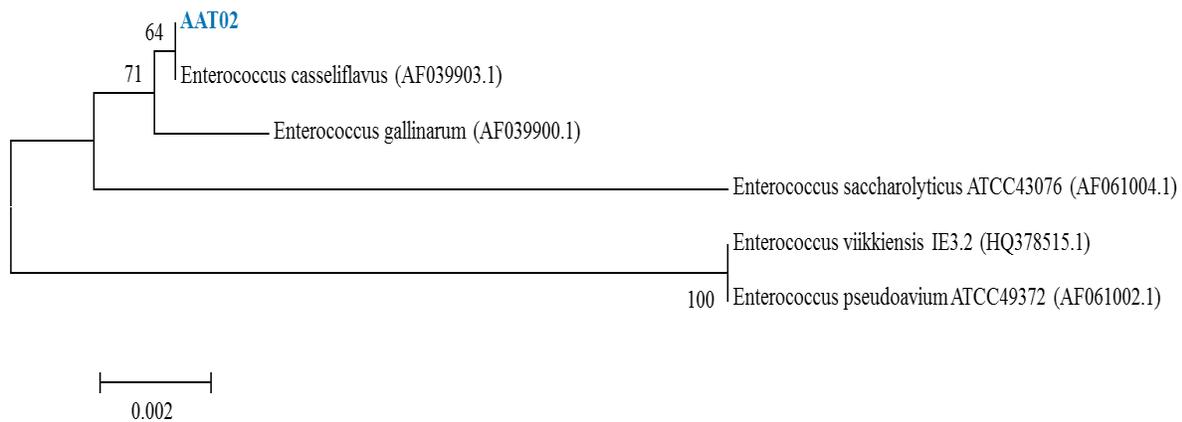


Figura 27. Árbol filogenético estimado por el método NJ con la secuencia del gen 16S rRNA del género *Enterococcus* sp. Las cepas aisladas del tracto digestivo de A. armida son señaladas en letras celestes.

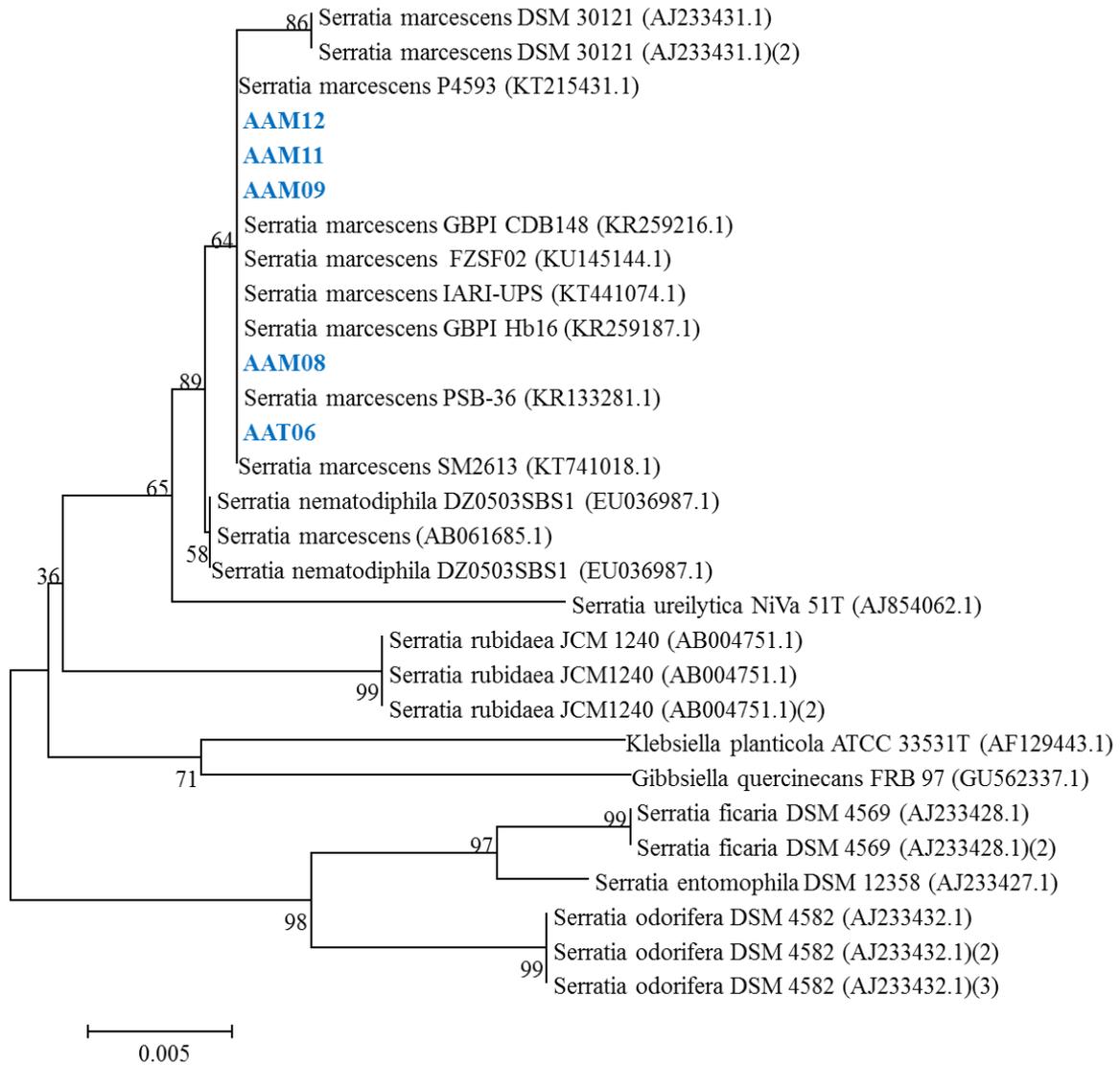


Figura 28. Árbol filogenético estimado por el método NJ con la secuencia del gen 16S rRNA del género *Serratia* sp. Las cepas aisladas del tracto digestivo de *A. armida* son señaladas en letras celestes.

IX. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos existe una gran diversidad de bacterias asociadas a la larva de estudio. A partir de un total de 120 aislados, el análisis de huellas genómicas generadas a partir de ERIC-PCR nos permitió obtener 80 perfiles de huellas genómicas, de las cuales finalmente a partir de las digestiones de los fragmentos amplificados del gen 16S rRNA realizadas con la enzima de restricción *HinfI*, se obtuvieron 14 patrones diferentes. A partir de las digestiones de los fragmentos amplificados del gen 16S rRNA realizadas con la enzima de restricción *HinfI*, se obtuvieron 14 patrones diferentes, de los cuales 10 fueron patrones únicos y los 4 restantes agruparon 10 patrones de restricción con bandas similares. Estos patrones en conjunto con el análisis filogenético realizado de las 14 cepas representativas permitieron conocer la diversidad bacteriana presente en el interior de la larva *A. armida*.

Conocer la biodiversidad del tracto digestivo de *A. armida* resulta interesante porque es poca la información sobre el estudio de los endosimbiontes en larvas, aunque se ha demostrado la presencia de bacterias en el intestino de diversos géneros. Cabe mencionar que algunos de los géneros encontrados son patógenos, las cuales pueden ser causantes de algunas enfermedades, debido a que estas bacterias se alojan en el tracto digestivo de la larva es importante conocer más acerca de ellas.

El desarrollo de este estudio se llevó a cabo considerando solo bacterias cultivables en medios nutritivos para bacterias exigentes y no exigentes, lo que representa una pequeña fracción de la microbiota presente en el material de estudio. Por lo tanto la biodiversidad de las bacterias en el intestino de la larva podría ser mayor. Los métodos utilizados en el aislamiento e identificación de bacterias representan una alternativa para el estudio de las mismas y fueron utilizadas de acuerdo a la infraestructura de nuestro laboratorio de investigación.

Los resultados aquí generados podrían servir de referencia para futuras investigaciones orientadas al aprovechamiento biotecnológico de las bacterias que habitan en el intestino de la larva de *Arsenura armida*, lo cual puede aplicarse en la industria y en la agricultura.

X. COMPETENCIAS DESARROLLADAS

El desarrollo de la residencia profesional me permitió reforzar todos los conocimientos adquiridos que se encontraban latentes así mismo obtuve y desarrolle habilidades relacionadas con el manejo de instrumentos y equipos necesarios para llevar a cabo cada una de las actividades propuestas para este proyecto de investigación.

En esta etapa de mi aprendizaje obtuve habilidades relacionadas con la extracción de ADN a partir del uso de un kit en conjunto con la aplicación de tecnologías moleculares pertinentes para el análisis directo de ADN y conceptos básicos sobre genómica. Toda esta labor permitió profundizar mi capacidad de análisis y consulta de información así como el uso de base de datos y bibliotecas digitales de información de carácter científico actualizado que han reforzado todos los conocimientos adquiridos.

Es muy importante recalcar que todas estas habilidades obtenidas han surgido gracias a la planeación, cooperación, trabajo en equipo, manejo de conflictos, compañerismo y aplicación valores que son requisitos fundamentales y difíciles de obtener, por lo tanto la realización de la residencia profesional ha aportado mucho en mi formación académica y es un pilar importante para mi formación profesional. Debido a que me permitirá culminar satisfactoriamente todos mis objetivos.

Como ya se menciona con anterioridad la diversidad bacteriana del tracto digestivo de *A. armida* es abundante, por lo que es necesario ampliar el estudio de la diversidad, además llevar a cabo una investigación a fondo sobre el potencial que puedan tener las cpas caracterizadas en este proyecto como degradadoras de material celulolítico, inhibidores de patógenos o productores de metabolitos.

XI. ALCANCES Y LIMITACIONES

Alcances

Fue posible conocer la diversidad genética de las bacterias asociadas al tracto digestivo de *Arsenura armida*, utilizando diferentes herramientas moleculares, tales como huellas genómicas por medio de ERIC-PCR, un marcador molecular (gen 16S ADNr) y un análisis de restricción del ADN ribosomal (ARDRA), así como el aislamiento y la purificación de ADN. También fue posible lograr la secuenciación de estas cepas y su análisis filogenético.

Limitaciones

Se considerando la importancia de la evaluación del potencial de degradación de celulosa de las endobacterias aisladas de *A. armida*, pero debido a la falta de tiempo esto no fue posible de realizar por lo tanto se truncó uno de los objetivos.

XII. REFERENCIAS

- Amarillo, A.** (2000). Polillas Satúrnidas (Lepidoptera: *Saturniidae*) de Colombia Biota Colombiana. *Redalyc*, vol. 1, núm. 2, 177-186 pp.
- Amarillo, A. & Wolfe, K.** (1997). Descripción del ciclo de vida y ampliación de ámbito de *Rothschildia zacateca* (Lepidoptera: Saturniidae) *Tropical Lepidoptera* 8(2):71-74
Recuperado de: <http://troplep.org/TLR/8-2/pdf004.pdf> Consultado en 05/2016.
- Bricemo, A.** (1983). Insectos de importancia forestal en Venezuela. El Defoliador del Saquisaqui *Arsenura armida* (Cramer) y el aserrador del cedro: *Oncideres sp.* *Revista de la Facultad de Agronomía*, 6(2), 708-713 pp.
- Brito-Vega, H.** (2010). Diversidad bacteriana en el tracto digestivo de la lombriz de tierra *Pontoscolex corethrurus*. Instituto de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas. 39-40 pp.
- BRUSCA, R. & BRUSCA, G.** (2005). *Invertebrados*. McGraw-Hill, Interamericana. España.
- Caliskan, M.** (2012). DNA Based Techniques for Studying Genetic Diversity. En A. L. Abdel Mawgood, *Genetic Diversity in Microorganisms* (págs. 95-121). Egipto: InTech.
- Capinera, J.** (2008). *Encyclopedia of Entomology*. Florida: Springer.
- Chapman, R., Simpson, S., Douglas. A.** (2013). *The Insects: Structure and Function*, 5th edition. Cambridge University Press, Cambridge.
- Costa, J., Fitzgerald, T., Janzen, D.** (2001). Trail-following behavior and natural history of the social caterpillar of *Arsenura armida* in Costa Rica (lepidoptera: saturniidae: arsenurinae). *Tropical lepidoptera*, Vol. 12 No. 1-2, 17-23 pp.

Costa, N., E. M. (2000). A Etnozoología no Brasil: Un panorama bibliográfico Ethnzoology in Brazil. A bibliographycal view. *Bioikos, PUCCampinas*, 12 (2): 31-45.

Costa, N., E. M. y J. Ramos, E. (2006). Los insectos comestibles de Brasil: Etnicidad, Diversidad e Importancia en la Alimentación. *Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa*, 38: 423 - 442.

Costa, N., Resende, J. (2004). A percepção de animais como “insetos” e sua utilização como recursos medicinais na cidade de Feira de Santana, Estado de Bahia, Brasil. *Maringá*, 26(2): 143-149 pp.

Duchaud, E., Rusniok, C. Frangeul, L., et al. (26 co-authors). (2003). The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photobacterium luminescens*. *Nat. Biotechnol.* 21:1307–1313 pp.

Escamilla, E., Escamilla, S., Gómez, J., Tuxtla, M., Ramos, J. & Pino, J. (2012). Uso tradicional de tres especies de insectos comestibles en agroecosistemas cafetaleros del estado de Veracruz. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 15: 101-109 pp.

Flores, F. (2000). *Cocina exótica de Chiapas. Cocina Indígena y popular.* CONACULTA. México.

Forest Pests in Central America (1992). Costa Rica: CATIE.

Hardin, S. (2001). DNA sequencing. In: *Encyclopedia of life sciences.* Macmillan Publishers Ltd. Nature Publishing Group.

Harrison, J. (2001). Insect acid-base physiology. *Annu Rev Entomol.* 46: 221–250 pp.

Herrera, M. (2002). Filogenia bacteriana mediante el análisis del rRNA 16S. *Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México.*

Hogue, C. L. (1993). *Latin American Insects and Entomology*. Berkeley: Univ. California Pr. 536 pp.

Hongoh Y. (2010). Diversity and genomes of uncultured microbial symbionts in the termite gut. *Biosci Biotech Bioch* 74: 1145–1151 pp.

Hulton, C., Higgins, C. & Sharp, P. (1991). ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol. Microbiol.* 5:825–834 pp.

Ibarra, J. (2006). Aislamiento de bacterias anaerobias hidrogenotropicas en el tracto gastrointestinal del avestruz (*Struthio camelus*). Tesis de maestría, Universidad de Colima. México. 22-24 pp.

INEGI. Datos vectoriales de la Carta Climática escala 1:1 000 000 INEGI. Marco Geoestadístico Nacional (2010). Disponible en: <http://www.ceieg.chiapas.gob.mx/perfiles/Inicio>

INEGI. Datos vectoriales de la Carta Edafológica escala 1:250 000. Serie II INEGI. Marco Geoestadístico Nacional (2010). Disponible en: <http://www.ceieg.chiapas.gob.mx/perfiles/Inicio>.

INEGI. Datos vectoriales de la Carta Uso de Suelo y Vegetación escala 1:250 000. Serie V

INEGI. Integración Territorial del Censo de Población y Vivienda (2010). INEGI. Marco Geoestadístico Nacional 2010. Disponible en: <http://www.ceieg.chiapas.gob.mx/perfiles/Inicio>.

INEGI. Marco Geoestadístico Nacional (2010). Disponible en: <http://www.ceieg.chiapas.gob.mx/perfiles/Inicio>.

Jha, B., Pragash, M., Cletus, J., Raman, J., Sakthivel, N. (2009). Simultaneous phosphate solubilization potential and antifungal activity of new fluorescent pseudomonad strains, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. plecoglossicida* and *P. mosselii*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 573-581, pp.

Landero, I., Oliva, H., Galindo, M., Balcazar, M., Murguía, J., Ramos, J. (2012). Uso de la larva de *Arsenura armida armida* (Cramer, 1779) (Lepidoptera: Saturniidae), “cuecla” en Ixcohuapa, Veracruz, México. *Cuadernos de biodiversidad*, 38, 4-8 pp.

Lara, C. & Acosta, R. (2013). Bacterias ceulolíticas aisladas del intestino de termitas (*Nasutitermes nigriceps*) con características probióticas y potencial en la degradación del pasto. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 15(1), 8-16 pp.

Lemaire, C. (1978). Les Attacidae Americains Attacinae *Édition Neuilly-sur-Seine* 238-78 pp.

Lemaire, C. (1980). Les Attacidae americains/The Attacidae (Satumiidae) of America, Arsenurinae. Neuilly, France. 199 pp.

López, E., Ruíz, V., Martínez, E., Gutiérrez, F., Dendooven, L., Rincón, R. (2012). Bacterial community in the roots and rhizosphere of *Hypericum silenoides* Juss. 1804. *African Journal of Microbiology Research*, 6, 2704-2711 pp.

Martínez, A., Acinas S., Rodriguez, F. (1995). Evaluation of prokaryotic diversity by restrictase digestion of 16S rDNA directly amplified from hypersaline environments. *FEMS Microbiol Ecol* 17:247-256 pp.

Martinson, V., Moy, J. & Moran, N. (2012). Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honeybee worker. *Appl Environ Microb.* 78: 2830–2840 pp.

Mayorga M., Sánchez, A. (2000). *Recetario indígena de Chiapas*. CONACULTA. México.

Necochea, R. & Canultec, J. (2004). SECUENCIACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS. INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA-UNAM. 20 pp.

Patel, J. (2001). 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Mol Diagn.* 6:313-321 pp.

Pinto, A., Uribe, L., Blanco, J., Fontecha, G., Rodríguez, C., Mora, M., Janzen, D., Chavarría, F., Díaz, J., Sittenfeld, A. (2007). Actividades enzimáticas en aislamientos bacterianos de tractos digestivos de larvas y del contenido de pupas de *Automeris zugana* y *Rothschildia lebeau* (Lepidoptera: Saturniidae). *Biología Tropical*, 55(2), 401-415 pp.

Ramos-Elorduy, J. & Conconi, M. (1994). Edible insects of the world. List of species, place of consumption and ethnic groups eaten them, p. 311-325. In Fourth Int. Cong. Ethnobiol., Lucknow, India.

Ramos-Elorduy, J. & Pino, J. (2002). Edible Insects of Chiapas, México. *Ecology of Food and Nutrition* 41: 271-299 pp.

Ramos-Elorduy, J. (1987). *Los insectos como fuente de proteínas en el futuro*. 2 ed. México, D.F., Limusa. 148 pp.

Ramos-Elorduy, J. (1991). Los insectos como fuente de proteínas en el futuro. Limusa, México D.F., México.

Ramos-Elorduy, J. (1996). Insect consumption as a mean

Ramos-Elorduy, J. (2005). Insects: A hopeful food source, In M. Paoletti (ed.). *Ecological Implications of Minilivestock (Role of Rodents, Frogs, Snails, and Insects for Sustainable Development)*. Science, Enfield, New Hampshire, EEUU. 263-291 pp.

Ramos-Elorduy, J. (2009). Anthro-entomophagy: Cultures, evolution and Sustainability. *Entomological Research* 39: 271-288 pp.

Ramos-Elorduy, J., Pino, J., Márquez, C., Rincón, F., Alvarado, M., Escamilla, E. & Bourges, H. (1984). Protein content of some edible insects of Mexico. *J. Ethnobiology* 4: 61-72 pp.

Ramos-Elorduy, J., Pino, J., Vázquez, A., Landero, I., Oliva, H. & Camacho, V. (2011). Edible Lepidoptera in Mexico: Geographic distribution, ethnicity, economic and nutritional importance for rural people. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 7(2): 1-69 pp.

Rodicio, M. & Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin.*; 22(4): 238-45 pp.

Rodriguez, M., Hamill, R., Houston, E., Georghiou, P., Clarridge, J., Regnery, R., Koehler, J. (1995). Genomic Fingerprinting of Bartonella Species by Repetitive Element PCR for Distinguishing Species and Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(5), 1089-1093 pp.

Rosselló, R. & Amann, R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* 25, 39–67 pp.

Ruiz, M. (2015). Evaluación de la diversidad de Saturniidae (Lepidoptera) de cuatro localidades del municipio de Zongolica Ver., México. Córdoba, Veracruz: Universidad Veracruzana.

Ryu, J., Ha, E., Lee, W. (2010). Innate immunity and gut-microbe mutualism in *Drosophila*. *Dev Comp Immunol* 34: 369–376 pp.

Scultz, J. (2002). How plants fight dirty. *Nature* 416: 267.

Secretaría de Desarrollo Social (Sedesol). (1994). Norma oficial mexicana nom-059-ecol-1994, que determina las especies y subespecies de flora y fauna silvestres terrestres y acuáticas en peligro de extinción, amenazadas, raras y las sujetas a protección especial, y que establece especificaciones para su protección. *Diario Oficial* 438: 2-60 pp.

Shao, M., Lu, Y., Miao, S., Zhang, Y., Chen, T., Zhang, Y. (2015). Diversity, Bacterial Symbionts and Antibacterial Potential of Gut-Associated Fungi Isolated from the *Pantala flavescens* Larvae in China. *PLOS ONE* 10(7): e0134542.doi:10.1371/journal.pone.0134542

Sharples, G., Lloyd, R. (1990). A novel repeated sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. *Nucleic Acids Res.* 18:6503–6508 pp.

Simpson, J. (1997). Amplified fragment length polymorphisms. *Bol. Soc. Bot. Méx.* 60:73-76 pp.

Stackebrandt, E. (2006). *Molecular Identification, Systematics, and Population Structure of Prokaryotes*. 1a Edición. Heidelberg, Alemania. Editorial Springer. 63-65 pp.

Stackebrandt, E. & Goebel, B. (1994). Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* 44:846-849 pp.

Summerville, K., Ritter, L. & Crist, T. (2004). Forest moth taxa as indicators of lepidopteran richness and habitat disturbance: a preliminary assessment. *Biological Conservation* 116: 9-18 pp.

Summerville, K. & Crist, T. (2004). Contrasting effects of habitat quantity and quality on moth communities in fragmented landscapes. *Ecography* 27, 3-12 pp.

Tang, M., Pham, P., Shen, X., Taylor, J., O'Donnell, M., Woodgate, R. & Goodman, M. (2000). Roles of *E. coli* DNA polymerases IV and V in lesion-targeted and untargeted SOS mutagenesis. *Nature*. 404: 1014-1018 pp.

Thangadurai, D. & Sangeetha, J. (2005). *Genomics and Proteomics*. Canada: Apple Academic Press, Inc.

Tindall, B., Rosselló, R., Busse, H., Ludwig, W. & Kämpfer, P. (2010). Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *Int J Syst Evol Microbiol* 60, 249–266 pp.

Triplehorn, C. & Johnson, N. (2005). *Borror and DeLong's Introduction to the Study of Insects*. Thomson Brooks/Cole, USA, 864 pp., Seventh Edition, ISBN 003- 096835-6.

Urretabiskaya N., Vasicek A., Saini E. (2010). *Insectos perjudiciales de importancia agropecuaria: 1. Lepidópteros*. Ediciones INTA. 74 pp.

Versalovic, J., Koeuth, T & Lupski, J. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 19: 6823–6831 pp.

Versalovic, J; Schneider, M. & Lupski, J. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol. Cell. Biol.* 5: 25-40 pp.

Wilton, S. (2002). Dideoxy sequencing of DNA. In: *Encyclopedia of life sciences*. Macmillan Publishers Ltd. Nature Publishing Group.

Yang, W., Meng, F., Peng, J., Hana, P., Fang, F., Ma, L., Cao, B. (2014). Isolation and identification of a cellulolytic bacterium from the Tibetan pig's intestine and investigation of its cellulase production. *Electronic Journal of Biotechnology*, 17, 262-267 pp.