UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



DETERMINACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE GÉNEROS DE TRICHOGRAMMATIDAE Y ESPECIES DE *BURKSIELLA* Y *ZAGELLA*, EN MÉXICO

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS CON ESPECIALIDAD EN ENTOMOLOGÍA

POR

VERÓNICA ÁVILA RODRÍGUEZ

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N. L., MÉXICO

NOVIEMBRE DE 2010

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

DETERMINACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE GÉNEROS DE TRICHOGRAMMATIDAE Y ESPECIES DE *BURKSIELLA* Y *ZAGELLA*, EN MÉXICO

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS CON ESPECIALIDAD EN ENTOMOLOGÍA

Comité de Tesis

| Dr. Alejandro González Hernández | |
|----------------------------------|--|
| Director de tesis | |
| Dr. Omar G. Alvarado Gómez | |
| Co-Director | |
| Dra. Susana Favela Lara | |
| Secretario | |
| Dra. Adriana E. Flores Suárez | |
| Vocal | |
| Dr. Carlos Solís Rojas | |
| Vocal | |
| | |

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N. L., MÉXICO

NOVIEMBRE 2010

TABLA DE CONTENIDO

| | Sección | Página |
|-----|--|--------|
| Ι | RESUMEN Y ABSTRACT | 1 |
| II | INTRODUCCIÓN | 3 |
| III | HIPÓTESIS | 7 |
| IV | OBJETIVOS | 8 |
| V | ANTECEDENTES | 9 |
| | 5.1 Descripción de la familia Trichogrammatidae | 9 |
| | 5.1.1 Descripción morfológica | 9 |
| | 5.1.2 Importancia de la familia Trichogrammatidae | 9 |
| | 5.1.3 Taxonomía de la familia Trichogrammatidae | 10 |
| | 5.1.4 Estudios taxonómicos de la familia Trichogrammatidae | 15 |
| | 5.2 Diagnosis del género Zagella | 16 |
| | 5.2.1 Descripción morfológica | 16 |
| | 5.2.2 Aspectos biológicos de Zagella | 18 |
| | 5.2.3 Diversidad y distribución de Zagella | 18 |
| | 5.2.4 Importancia de Zagella como parasitoide de insectos | 18 |
| | 5.3 Diagnosis del género Burksiella | 20 |
| | 5.3.1 Descripción morfológica | 20 |
| | 5.3.2 Diversidad y distribución de <i>Burksiella</i> | 22 |
| | 5.3.3 Importancia de <i>Burksiella</i> como parasitoide de insectos | 22 |
| | 5.4 Revisión taxonómica de los géneros Burkisiella y Zagella | 22 |
| | 5.5 Marcadores y técnicas moleculares basados en el ADN en la | 24 |
| | determinación de Tricográmatidos | |
| | 5.7 Técnicas y regiones analizadas de los géneros Burksiella y Zagella | 27 |
| VI | MATERIALES Y METODOS | 29 |

| | 6.1 Recolecta de material biológico | 29 |
|-----|--|----|
| | 6.2 Procesamiento de muestras de insectos | 31 |
| | 6.3 Determinación morfológica de especímenes | 31 |
| | 6.4 Revisión de tricográmatidos de la colección CIBE | 31 |
| | 6.5 Determinación molecular de tricográmatidos | 32 |
| | 6.5.1Extracción y amplificación de ADN por PCR | 32 |
| | 6.5.2 Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción | 33 |
| | (RFLP) | |
| | 6.5.3. Secuenciación del ADN | 34 |
| | 6.5.4 Análisis filogenético | 34 |
| VII | RESULTADOS | 35 |
| | 7.1 Identificación morfológica de tricográmatidos | 36 |
| | 7.1.1 Especímenes recolectados mediante red entomológica | 36 |
| | 7.1.2 Especímenes recolectados de huevecillos de insectos huéspedes | 41 |
| | 7.1.3 Especímenes de la colección CIBE | 43 |
| | 7.2 Determinación y caracterización molecular de los géneros más | 43 |
| | frecuentes dentro de la familia Trichogrammatidae | |
| | 7.2.1 Géneros analizados por métodos moleculares | 43 |
| | 7.2.2 Análisis de la región 18S para géneros de Trichogrammatidae | 44 |
| | 7.2.3 Análisis de la región ITS2 para géneros de Trichogrammatidae | 56 |
| | 7.2.4 Comparación de caracteres y filogenias de géneros de | 65 |
| | Trichogrammatidae entre marcadores y técnicas moleculares | |
| | 7.3 Determinación y caracterización molecular de las especies de | 68 |
| | Burksiella y Zagella | |
| | 7.3.1 Análisis de la región 18S para especies de Burksiella y Zagella | 69 |
| | /.3.2 Análisis de la región ITS2 para especies de Burksiella y Zagella | 75 |
| | /.3.3 Análisis de la región COII para especies de Burksiella y Zagella | 81 |
| | 7.3.4 Comparación de caracteres y filogenias de especies de Burksiella | 86 |

| | y Zagella entre marcadores y técnicas moleculares | |
|--|---|-----|
| | | |
| VIII | DISCUSIÓN | 89 |
| | | |
| IX | CONCLUSIONES | 95 |
| | | |
| X | LITERATURA CITADA | 97 |
| | | 21 |
| | | 112 |
| A DÉNIDICE A Manfalacia distinting de la familia Trica grammatidas | | |
| AFLI | VDICE A. Mortologia distilutva de la familia fricogrammatidae | |
| , | | |
| APENDICE B. Protocolo: Aislamiento de ADN genómico de tejido | | 114 |
| | | |
| APÉNDICE C. Preparación de Bufer y tinción para geles de corrida de ADN | | 115 |
| | | |
| | | |
| APENDICE D. Registros de muestras en laminillas de la colección CIBE, claves | | |
| y datos de colecta, determinación a nivel género y morfoespecie de los géneros | | |
| do Di | ukriella v Zacella | 116 |
| ue Bu | irksiellä y Zagella | |

LISTA DE TABLAS

| Tabla | | Página |
|-------|---|--------|
| 1 | Marcadores y técnicas moleculares utilizados en la taxonomía de | |
| | Trichográmatidos | 25 |
| 2 | Número de acceso de GenBank de especies de Burksiella y Zagella | |
| | de la región conservada 18S y 28S | 28 |
| 4 | Estados, épocas de muestreo y plantas hospedantes considerados | |
| | en las colectas de Tricográmatidos | 30 |
| 5 | Géneros y Abundancia Relativa de Trichogrammatidae en Áreas | |
| | Agrícolas y Naturales Aledañas de 10 Estados de México, Durante | |
| | 2006-2008 | 38 |
| 6 | Nuevos reportes de géneros de Trichogrammatidae para el país y los | |
| | estados de México muestreados | 39 |
| 7 | Géneros de Trichogrammatidae en cultivos agrícolas de 10 estados | |
| | de México, durante 2006-2008 | 39 |
| 8 | Géneros de Trichogrammatidae obtenidos de huevecillos de insectos | |
| | plaga en varias plantas hospedantes de cuatro estados de México, | |
| | durante 2007 y 2008 | 42 |
| 9 | Géneros y localidades de Trichogrammatidae analizados en el | |
| | presente estudio | 44 |
| 10 | Comparación y alineamiento de secuencias de la región 18S de | |
| | géneros y especies de Trichogrammatidae | 51 |
| 11 | Porcentajes de las frecuencias de nucleótidos de las secuencias de la | |
| | región 18S de Trichogrammatidae | 52 |

LISTA DE TABLAS CONTINUACIÓN.....

| Tabla | | Página |
|-------|---|--------|
| 12 | Matriz de similitud para estimar la divergencia evolutiva entre | |
| | secuencias de la región 18S de Trichogrammatidae | 52 |
| 13 | Comparación y alineamiento de secuencias de la región ITS2 de | |
| | géneros y especies de Trichogrammatidae | 58 |
| 14 | Porcentajes de las frecuencias de nucleótidos de las secuencias | |
| | ITS2 de especies y géneros de Trichogrammatidae | 61 |
| 15 | Matriz de similitud para estimar la divergencia evolutiva entre | 62 |
| | secuencias de la región ITS2 de Trichogrammatidae | |
| 16 | Comparación de la longitud de los fragmentos amplificados por | 66 |
| | PCR de las regiones 18S e ITS2 del ADNr de géneros de | |
| | tricográmatidos | |
| 17 | Comparación de valores de similitud de las secuencias génicas de | 67 |
| | las regiones 18S e ITS2 del ADNr de géneros de tricográmatidos. | |
| 18 | Comparación de resultados de análisis filogenéticos de las | 68 |
| | secuencias génicas de las regiones ITS2 y 18S de ADNr mediante | |
| | los métodos UPGMA y MP para géneros de tricográmatidos | |
| 19 | Comparación y alineamiento de secuencias de la región 18s de | |
| | especies de Burksiella y Zagella | 70 |
| 20 | Porcentajes de las frecuencias de nucleótidos de las secuencias 18S | |
| | de especies de Burksiella y Zagella | 72 |
| 21 | Matriz de similitud para estimar la divergencia evolutiva entre | |
| | secuencias de la región 18S de especies de Burksiella y Zagella | 73 |
| 22 | Comparación y alineamiento de secuencias de la región ITS2 de | |
| | especies de Burksiella y Zagella | 76 |

LISTA DE TABLAS CONTINUACIÓN.....

| 23 | Porcentajes de las frecuencias de nucleótidos de las secuencias | |
|----|--|----|
| | ITS2 de especies de Burksiella y Zagella | 77 |
| 24 | Matriz de similitud para estimar la divergencia evolutiva entre | |
| | secuencias de la región ITS2 de especies de Burksiella y Zagella | 78 |
| 25 | Comparación y alineamiento de secuencias de la región COII de | |
| | especies de Burksiella y Zagella | 82 |
| 26 | Porcentajes de las frecuencias de nucleótidos de las secuencias | |
| | COII de especies de Burksiella y Zagella | 83 |
| 27 | Matriz de similitud para estimar la divergencia evolutiva entre | |
| | secuencias de la región COII de especies de Burksiella y Zagella | 84 |
| 28 | Comparación de los tamaños de los fragmentos amplificados por | |
| | PCR de las regiones COII, 18S e ITS2 en las especies de | |
| | Burksiella y Zagella | 87 |
| 29 | Comparación de los valores de similitud de las secuencias génicas | |
| | de las regiones 18S e ITS2 del ADNr y COOII del ADNm en | |
| | especies de Burksiella y Zagella | 87 |
| 30 | Comparación de los resultados de los análisis filogenéticos de las | |
| | secuencias génicas de las regiones 18S e ITS2 del ADNr y COII | |
| | del ADNm mediante los métodos UPGMA y MP en especies de | |
| | Burksiella y Zagella | 88 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | | Página | |
|--------|--|--------|--|
| 1 | Taxonomía morfológica de la familia Trichogrammatidae Pinto 2006, | | |
| | muestra los géneros clasificados en subfamilia, tribu y | | |
| | subtribu | 13 | |
| 2 | Taxonomía molecular de la familia Trichogrammatidae Owen et al. | | |
| | 2007 | 14 | |
| 3 | Morfología del género Zagella, A. adulto, B. antena, C. ala anterior y | | |
| | D. genitalia del macho | 17 | |
| 4 | Morfología del género Burksiella, A. adulto, B. antena, C. ala | | |
| | anterior y D. genitalia del macho | 21 | |
| 6 | Productos obtenidos de la amplificación de la región conservada del | | |
| | gen ribosomal 18S para géneros de la familia Trichogrammatidae. 1) | | |
| | marcador de peso molecular, 2) Oligosita, 3) Burksiella, 4) Ittys y 5) | | |
| | Aphelinoidea | 45 | |
| 7 | Productos obtenidos de la amplificación de la región conservada del | | |
| | gen ribosomal 18S para géneros de la familia Trichogrammatidae. 1) | | |
| | marcador de peso molecular, 2) Oligosita, 3) Paracentrobia, 4) | | |
| | Ufens, 5) Trichogramma, 6) Pseudoligosita, 7) Burksiella, 8) Zagella | | |
| | y 9) Ittys | 46 | |
| 8 | Árbol consenso UPGMA para los géneros de Trichogrammatidae, | | |
| | región conservada 18S. Los valores bootstrap para 1000 replicas son | | |
| | mostrados en las ramas | 53 | |

LISTA DE FIGURAS CONTINUACIÓN.....

| Figura | | Página |
|--------|---|--------|
| 9 | Árbol consenso Máxima Parsimonia para los géneros de | |
| | Trichogrammatidae, región conservada 18S. Los valores bootstrap | |
| | para 1000 replicas son mostrados en las ramas | 54 |
| 10 | Productos obtenidos de la amplificación de la región hipervariable | |
| | intergénica ITS2 del ADNr. 1) marcador de peso molecular, 2) | |
| | Oligosita, 3) Pseudoligosita, 4), Paracentrobia, 5) Ittys, 6) Ufens, 7) | |
| | Burksiella, 8) Zagella y 9) Trichogramma | 57 |
| 11 | Productos obtenidos de la amplificación de la región hipervariable | |
| | intergénica ITS2 del ADNr. 1) marcador de peso molecular, 2) | |
| | Oligosita, 3) Burksiella, 4) Ittys y 5) Aphelinoidea | 57 |
| 12 | Árbol consenso UPGMA para los géneros de Trichogrammatidae, | |
| | región hipervariable ITS2. Los valores bootstrap para 1000 replicas | |
| | son mostrados en las ramas | 64 |
| 13 | Árbol consenso Máxima Parsimonia para los géneros de | |
| | Trichogrammatidae región ITS2. Los valores bootstrap para 1000 | |
| | replicas son mostrados en los nodos | 64 |
| 14 | Productos obtenidos de la amplificación de la región conservada 18S | |
| | del ADNr, 1) marcador de peso molecular, 2) Burksiella spirita 3) B. | |
| | dianae, 4) B. mexicana 5) Zagella flavipes | 69 |
| 15 | Árbol consenso UPGMA para especies de Burksiella y Zagella región | |
| | conservada 18S. Los valores bootstrap para 1000 replicas son | |
| | mostrados en las ramas | 74 |

LISTA DE FIGURAS CONTINUACIÓN.....

| Figura | | Página |
|--------|---|--------|
| 16 | Árbol consenso Máxima Parsimonia para especies de Burksiella y | |
| | Zagella región conservada 18S. Los valores bootstrap para 1000 | |
| | replicas son mostrados en las ramas | 74 |
| 17 | Productos obtenidos de la amplificación de la región hipervariable | |
| | intergénica ITS2 del ADNr, 1) marcador de peso molecular, 2) B. | |
| | spirita 3) B. dianae, 4) B. mexicana 5) Z. flavipes, 6) marcador de | |
| | peso molecular | 75 |
| 18 | Árbol consenso UPGMA para especies de Burksiella y Zagella | |
| | región ITS2. Los valores bootstrap para 1000 replicas son mostrados | |
| | en las ramas | 79 |
| 19 | Árbol consenso Máxima Parsimonia para especies de Burksiella y | |
| | Zagella región ITS2. Los valores bootstrap para 1000 replicas son | |
| | mostrados en las ramas | 79 |
| 20 | Fragmentos obtenidos de la digestión con la enzima AluI de la | |
| | amplificación de los productos de PCR de la región ITS2. 1) | |
| | marcador de peso molecular, 2) Z. flavipes, 3) B. spirita, 4) B. | |
| | mexicana y 5) B. dianae | 80 |
| 21 | Productos obtenidos de la amplificación por PCR de la región | |
| | conservada COII del ADNm. 1) marcador de peso molecular, 2) B. | |
| | spirita 3) B. dianae, 4) B. mexicana 5) Z. flavipes, y 6) marcador de | |
| | peso molecular | 81 |
| 22 | Árbol consenso UPGMA para especies de Burksiella y Zagella, | |
| | región COII. Los valores de bootstrap para 1000 replicas son | |
| | mostrados en los nodos | 85 |

LISTA DE FIGURAS CONTINUACIÓN.....

| Figura | | Página |
|--------|---|--------|
| 23 | Árbol consenso de Máxima Parsimonia para especies de Burksiella y | |
| | Zagella, región COII. Los valores de bootstrap para 1000 replicas son | |
| | mostrados en los nodos | 85 |

I. RESUMEN

La taxonomía de microhimenópteros de Trichogrammatidae es difícil por las siguientes razones: miden <1 mm, presentan una alta diversidad interespecífica y su identificación se limita a caracteres morfológicos como la genitalia del macho, haciendo fifícil la determinación de especímenes hembras; además la identificación morfológica no considera las poblaciones de tricogramátidos que se reproducen por partenogénesis. Trichogramma es el género más estudiado por su importancia como agente de control biológico de insectos plaga; sin embargo existen otros géneros que son poco conocidos. La taxonomía de las especies de Burksiella y Zagella no es clara actualmente. Por lo anterior, el presente estudio tuvo como objetivo conocer la taxonomía de Burksiella y Zagella dentro de la familia Trichogrammatidae, así como establecer la filogenia de sus especies, mediante métodos moleculares. El primer paso fue la determinación preliminar de géneros utilizando carateres morfológicos para lo cual se colectaron 1,535 especímenes de tricogramátidos en áreas agrícolas y naturales, se determinaron un total de 20 géneros, de los cuales trece géneros se encontraron en 25 cultivos agrícolas. Además, se determinó una nueva especie Burksiella mexicana, mediante caracteres morfológicos y moleculares. Se caracterizaron los géneros de tricogramátidos más comunes mediante los marcadores moleculares 18S e ITS2; los fragmentos de PCR de la región 18S no mostraron variación en su longitud; mientras que la región ITS2 mostró variabilidad en el tamaño de los fragmentos. Esta región sirvió para inferir la filogenia de los géneros, la cual fue congruente con la taxonomía morfológica de géneros de Trichogrammatidae. La caracterización de especies de Burksiella y Zagella con los genes 18S y COII no arrojó diferencia en los productos de PCR; mientras que la región ITS2 detectó variación significativa en los tamaños de los fragmentos de PCR. Los fragmentos de restricción por PCR de la región ITS2 con la enzima Alu1 mostraron variación significativa entre especies. Por lo tanto, los caracteres moleculares fueron útiles para la clarificación de géneros y especies de Trichogrammatidae; sin embargo, una combinación de taxonomía morfológica y molecular parece ser más recomendada.

ABSTRACT

Taxonomy of microhymenopteran of Trichogrammatidae is difficult for the following reazons: their small size wich is < 1mm, they present a high interspecific diversity and their identification is limit to morphological characters such as male genitalia, which limits determination of female specimens; besides that morphological identification does not consider trichogrammatid populations that reproduce by parthenogenesis. Trichogramma is the most studied genus due to its importance as a biological control agent of insect pests; however, there are other genera less known. Taxonomy of species of Burksiella and Zagella is no clear now. Therefore, present study had as main objective knowing the taxonomy of Burksiella and Zagella within the family Trichogrammatidae, as well as to establish the phylogeny of their species, by using molecular characters. The first step was the preliminar determination of genera by morphological characters, for wich 1535 trichogrammatid specimens were collected from agricultural and adjacent natural areas, which were determined in 20 genera and 13 genera were found in 25 agricultural crops. Moreover, a new species named Buksiella mexicana was determined by morphological and molecular characters. In relation to molecular analysis, more common trichogrammatid genera were characterized by PCR analysis of 18S and ITS2 markers. PCR fragments of the region 18S did not show variation in their length; on the contrary the region ITS2 showed significant variation in fragment length. The ITS2 region was useful to establish phylogeny of trichogrammatid genera, which was congruent with the morphological taxonomy of genera of Trichogrammatidae recently reported. Molecular chracterization of Burksiella and Zagella species and genes 18S and COII did not show variation in PCR products; however, the analysis with the gene ITS2 detected a significant variability in length of PCR fragments. Restriction fragments by PCR with the enzyme AluI of the region ITS2 showed a good grade of interspecific variation. Therefor, molecular characters were useful for the determination of genera and species of Trichogrammatidae; however, a combination of morphological and molecular taxonomy seem to be more recommended.

II. INTRODUCCIÓN

La familia Trichogrammatidae consiste alrededor de 620 especies y 80 géneros son parasitoides de huevecillos de insectos (Pinto y Stouthamer 1994), los cuales tienen un valor considerable en el control biológico de insectos plaga y poseen una amplia variación de huéspedes, ya que se les ha encontrado atacando 150 especies de las familias de Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Homoptera, Hemiptera, Hymenoptera y Neuroptera (Metcalf y Flint 1982).

Un número considerable de géneros de Trichogrammatidae son de importancia en el control biológico de insectos plaga (Pinto y Stouthammer 1994). Sin embargo, el género *Trichogramma* ha recibido mayor atención en estudios de entomología aplicada, debido a que sus especies parasitan numerosas plagas del orden Lepidoptera y pueden ser producidos fácilmente para su utilización en programas de control biológico mediante liberaciones inundativas. Algunas especies del género *Doirania* se han utilizado como agentes de control biológico de insectos plagas de la familia Tettigonidae (Orthoptera) (Pinto 1995).

Con respecto al género Zagella, en un estudio de campo y laboratorio realizado en Argentina se encontró a Zagella delicata parasitando huevecillos de Homaladisca coagulata, la cual es una plaga de la vid nativa del sureste de Estados Unidos y del Norte de México, observándose un parasitismo del 43.8%, lo que sugiere que Z. delicata tiene potencial como agente de control biológico tanto de H. coagulata como de otras especies de chicharritas (Logarzo et al. 2004). Por su parte avispitas Burksiella parasitan huevecillos de distintas familias de Hemiptera y Orthoptera. Burksiella ha sido encontrada en huevecillos de hemípteros de la familia Fulgoridae y de la familia Cicadellidae parasitando a Oncometopia (Similitopia) sp. y Homalodisca liturata Ball, También se ha encontrado parasitando huevecillos de ortópteros de la familia Tettigoniidae (Pinto 2006, Dozier 1932, Viggiani 1985, Pinto 2006, Triapitsyn & Bernal 2009).

La identificación morfológica de estas avispitas es difícil debido a su tamaño diminuto, ya que miden menos de 0.1 mm. La determinación se basa en características morfológicas de la genitalia, antenas y alas de los machos. Sin embargo la plasticidad morfológica de algunas especies así como la dificultad en la identificación por el tamaño de los especímenes pone en duda la veracidad de las especies identificadas. Además, la identificación morfológica es exclusiva de machos y hace imposible identificar algunos biotipos que se reproducen por partenogénesis y como consecuencia no se cuenta con machos para la identificación (España y Alvarado 2005, Moreno y Pérez 2002). Otos problemas relacionados con la identificación correcta de estas avispitas es que al presentar rasgos morfológicos indistinguibles, requiere elaborar preparaciones de laminillas, lo cual consume tiempo y requiere de especialistas taxónomos en microhimenópteros (Nagarkatti y Najaraje 1971 y 1973, Pinto y Stouthamer 1994, Thomson et al. 2003). Además no proporciona una relación exacta entre especies de diferentes poblaciones, ya que la identificación morfológica es afectada por factores ambientales y barreras físicas. Aunado a esto es la pérdida de los ejemplares, ya sea por la forma de recolectarlos, al procesar el material en el laboratorio, así como al momento de su montaje (Moreno y Pérez 2002).

Por el contrario, las técnicas moleculares como: reacción en cadena de la polimerasa (PCR)-polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP) ADN polimorfico amplificado al azar (RAPD) y secuenciación de los productos amplificados, nos ayudan a contribuir en la clarificación de la identidad de las especies (Silva *et al.* 1994), mediante marcadores genéticos como el gen 18S, espaciadores intergénicos ITS del ADNr y genes mitocondriales como COII.

Las regiones 18S y 28S en los insectos es altamente conservada (presenta tasa de cambio muy limitada), esta región es usada como reloj evolutivo, a mayor diferencia entre los genes mayor distancia evolutiva existe, tienen funciones constantes a lo largo de la evolución. Gillespide *et al.* (2005) y Owen (2007) realizaron estudios con base en datos moleculares para establecer la filogenia de la familia Trichogrammatidae basado en la amplificación y secuenciación de la región conservada 18S y 28S.

El espaciador trasncripto interno ITS del ADNnuclear es una de las regiones hipervariables más frecuentemente utilizadas para análisis filogenéticos, reconstruye la relación filogenética entre especies y géneros utilizando las secuencias de nucleótidos. Evolutivamente la subporción ITS2, es necesaria para el procesamiento de la transcripción multimolecular del RNA transcripto. La región ITS2 conserva el material genético para distinguir eventos evolutivos raros, esta región es relativamente corta y fácilmente de secuenciar (Coleman 2003). Esta región ha sido ampliamente explorada para determinar especies de la familia Trichogrammatidae, en particular en la determinación de especies de género *Trichogramma* Westwood (Ciciola Jr. *et al.* 2001, Sappal *et al.* 1995, Stouthamer *et al.* 1999, España *et al.* 2006). Los fragmentos de la región ITS2 han podido ser amplificados en la especie del género Uscana, S. semifumipennis Girault, (Schilthuizen y Stouthamer 1997), así como en especies del género Aphelinoidea (Walker *et al.* 2005).

La molécula de los genes ADN mitocondrial evoluciona más rápido (alrededor de 20 veces más) que el ADN nuclear. Este marcador molecular presenta herencia maternal, estatus haploide y es más abundante que el ADNn (Loxdale y Lushai 1998). El gen citrocomo oxidasa II (COII) de ADNm ha sido poco utilizado con las técnicas de secuenciación y RFLP en estudios taxonómicos de tricogramátidos a nivel de especie (Borghuis *et al.* 2003).

Por lo anterior, el uso de técnicas y marcadores moleculares son de importancia en la determinación y caracterización de géneros y especies de Trichogrammatidae.

III. HIPÓTESIS

Además de Trichogramma, existen otros géneros de Trichogrammatidae en México.

Los géneros de Trichogrammatidae pueden ser determinados y caracterizados mediante marcadores y técnicas moleculares; además es posible inferir su filogenia.

Las especies de los géneros *Burksiella* y *Zagella* pueden ser determinados y caracterizados mediante marcadores y técnicas moleculares, permitiendo su clarificación taxonómica. También es posible inferir su filogenia tomando como base sus secuencias génicas.

IV. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar y caracterizar molecularmente géneros de la Familia Trichogramatidae, así como clarificar el estatus taxonómico de especies de los géneros *Burksiella* y *Zagella* mediante marcadores moleculares.

Objetivos Particulares

- 1. Determinar los géneros y especies de la familia Trichogrammatidae presentes en áreas naturales y cultivos de importancia agrícola en México.
- 2. Realizar una revisión taxonómica de los géneros Burksiella y Zagella.
- Determinar y caracterizar los géneros de Trichogrammatidae y especies de los géneros *Burksiella y Zagella* analizando los genes 18S, ITS2 y COII y utilizando las técnicas moleculares PCR, RFLP y Secuenciación.
- Inferir las relaciones filogenéticas entre géneros de Trichogrammatidae; así como de especies de *Burksiella* y *Zagella*, mediante tres marcadores moleculares y dos métodos de búsqueda de árboles.

V. ANTECEDENTES

5.1 Descripción de la familia Trichogrammatidae

5.1.1 Descripción morfológica

Los parasitoides de la familia Trichogrammatidae son microhimenópteros de menos de 1mm de longitud, promedio de 0.6 mm, los cuales se distinguen de otros grupos de la superfamilia Chalcidoidea por sus tres segmentos tarsales, cuerpo elongado sin una constricción clara entre el mesosoma y el metasoma, alas frecuentemente con líneas radiadas de setas, venación corta y vena posmarginal casi siempre ausente, de forma amplia y ovalada o estrecha y alargada con disco de setas largas o cortas (Pinto 1997); antenas cortas unidas a la parte baja de la cara, segmentos antenales muy variables entre los géneros pero no excediendo el número de siete, con uno o dos anellus, funículo de uno a dos segmentos puede estar presente o ausente, clava de tres a cinco segmentos, antena de los machos y hembra similar, pero algunos géneros presentan dimorfismo sexual, ejemplo de ellos son: *Ufens* Girault, *Trichogramma* Westwood y *Burksiella* De Santis (Doutt y Viggiani 1968), el cuerpo posee cutícula blanda y con marcaciones reticulares, su color varía de café oscuro a amarillo y menos común rojo, los ojos pueden ser de color rojo, café o negro.

5.1.2 Importancia de la familia Trichogrammatidae

Los géneros de Trichogrammatidae son parasitoides de huevecillos de insectos (Pinto 1997). Un número importante de estas avispitas tienen importancia en el control biológico de insectos plaga (Pinto y Stouthammer 1994). Específicamente, el género *Trichogramma* ha recibido mayor atención en estudios de entomología aplicada, debido a que parasitan numerosas plagas del orden Lepidoptera y pueden ser producidos

fácilmente para programas de control biológico mediante liberaciones inundativas (Arredondo-Bernal y Perales-Gutiérrez 2004). Otros géneros de Trichogrammatidae poseen especies de parasitoides de huevecillos de otros insectos fitófagos. En particular las especies del género Paracentrobia Howard, Paracentrobia acuminata (Ashmead) y Paracentrobia americana (Girault), parasitan huevecillos de Homalodisca insolita (Walker) en zacate Johnson, Sorghum halepense (L.) (Tipping et al. 2005). También se reporta que Zagella delicata De Santis parasita huevecillos de Tapajosa rubromarginata (Signoret) (Hemiptera: Cicadellidae) en caña de azúcar, Saccharum officinarum L.; maíz, Zea mays L.; cítricos, Citrus spp.; y zacate Johnson (Logarzo et al. 2004). Por su parte, Luft Albarracin et al. (2005), en un estudio realizado en Argentina, determinaron a los géneros Zagella y Oligosita Walker como parasitoides de Dalbulus maidis (DeLong y Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) en maíz. Además, se ha reportado que las especies del género Ufens, U. niger (Ashmead), Ufens ceratus Owen, y Ufens principalis Owen, parasitan huevecillos de Homalodisca liturata Ball y Homalodisca vitripennis (Germar) (Girault 1918, Triapitsyn 2003, Al-Wahaibi et al. 2005, Ávila et al. 2007). Otros órdenes parasitados por estas avispitas de Trichogrammatidae son: Coleoptera, Diptera, Homoptera, Hymenoptera, y Neuroptera (Grissell y Schauff 1990, Pinto y Stouthammer 1994, Pinto 1997 y 2006).

5.1.3 Taxonomía de la familia Trichogrammatidae

La taxonomía de la familia Trichogrammatidae ha sido ampliamente discutida; las primeras descripciones de Trichogrammatidae fueron realizadas por Girault (1911 y 1912), en las cuales describe alrededor de 35 nuevos géneros y especies y realiza una clasificación a nivel de subfamilia. Otras aportaciones importantes al conocimiento de Trichogrammtidae fueron las realizadas por Kriger (1918) y Nowicki (1935, 1936 y 1940) en las cuales describen nuevos géneros y especies de la fauna de la región Paleártica. Doutt y Viggiani (1968) realizan una revisión de los principales géneros y especies a nivel mundial y describe 63 géneros, de los cuales nueve géneros y once especies son nuevos registros; así como la colocación de 35 géneros en sinonímia. La clasificación propuesta por Viggiani en 1971 y 1984 se basa principalmente en la genitalia del macho, en la cual las siguientes dos subfamilias fueron reconocidas, cada una con dos tribus: 1) Trichogrammatinae: Trichogrammatini y Paracentrobiini, 2) Oligositinae: Chaetostrichini y Oligositini. Pinto y Viggiani (2004) dividieron a la tribu Oligositini en dos subtribus: Oligositina y Eteroligositina, de tal manera que 12 géneros fueron asignados a estas subtribus, considerando 32 caracteres morfológicos del macho y hembra para el análisis filogenético.

Pinto (2006) realizó una revisión de 55 géneros de la familia Trichogrammatidae para el Nuevo Mundo (Fig. 1). La clasificación fue basada en características morfológicas distintivas de las avispitas. Se reconocieron dos subfamilias y cuatro tribus: Trichogrammatinae (Trichogrammatini) y Oligositinae (Paracentrobiini, Chaetostrichini, y Oligositini). Describe cuatro nuevos géneros Adelogramma, Pseuduscana, Thanatogramma y Viggianiella. Cuatro géneros fueron colocados como nuevo estatus renovado: Burksiella, Centrobiopsis, Ceratogramma y Zaga. Cuatro géneros fueron colocados en sinonimia: Gnorimogramma De Santis, Lathrogramma De Santis, Parahispidophila Yousuf y Shafee y Pseudoxenufens Yoshimoto. Se describen nueve especies nuevas: Adelogramma primum Pinto, Burksiella dianae Pinto, Ceratogramma jeffersi Pinto, Lathromeris hesperus Pinto, Lathromeroidea exemplum Pinto, Lathromeroidea gerriphaga Pinto, Pseuduscana sola Pinto, Thanatogramma oweni Pinto y Viggianiella tropica Pinto.

Owen *et al.* (2007) proponen una nueva clasificación de la familia Trichogrammatidae con base en caracteres moleculares, esta incluye la subfamilia Trichogrammatinae y la tribu Trichogrammatini y la subfamilia Oligositinae con tres tribus: Paracentrobiini, Chaestostrichini y Oligositini, estas tribus han sido definidas como cercanas en el análisis molecular y muchos géneros son tratados como *incertae sedis* (géneros no incluidos en la base de datos molecular, inferidos por morfología de genitalia) en cada subfamilia, la posición de estos géneros esta fundamentada en evidencias morfológicas (Fig.2).

La clasificación de Trichogrammatidae ha sido basada principalmente en la estructura de la antena (Fig. 1. Apéndice A), venación del ala (Fig. 2. Apéndice A) y genitalia del macho (Fig. 3. Apéndice A), esta última siendo el caracter morfológico más importante para determinar su taxonomía (Girault 1912, Nowicki 1933, Viggiani 1968 y 1971, Yousuf y Shafee 1987, Pinto y Viggiani 2004, Pinto 2006); sin embargo los tricogramátidos son anatómicamente homogéneos, lo cual potencialmente limita el número de caracteres morfológicos informativos para establecer su filogenia y por consiguiente impide la formación de una robusta clasificación de taxas a niveles taxonómicos superiores. Para la clasificación de Trichogrammatidae se ha utilizado un número reducido de caracteres morfológicos. En algunos géneros donde solo se conocen las hembras por ejemplo el género Thoreauia, no puede ser colocado en la clasificación, esto es una limitante y es insuficiente basarse solo en la variación de la genitalia. Ejemplos como Aphelinoidea, Chaetogramma, Ufens, Xiphogramma, Burksiella y Zagella no presentan apodemas edeagales, dando como resultado una gran variación intergenérica y una gran plasticidad de la genitalia del macho debido a la selección sexual (Owen et al. 2007).

| SUBFAMILIA | Trichogrammatinae | Oligositinae | |
|------------|-----------------------|---------------------------------------|-----------------------|
| TRIBU | Trichogrammatini | Paracentrobiini Chaestostrichini Olig | ositini |
| SUBTRIBU | | Oligositina | Eteroligositina |
| GÉNERO | Apseudograma | Ittys Adelograma Epoligosita | ı Chaetostrichella |
| | Asynacta | Ittysella Adryas Megaphragma I | Doraina |
| | Australufens | Paracentrobia Aphelinoidea Oligosita | Eteroligosita |
| | Brachyia | Paraittys Blodiella Prestwichia | Hayatia |
| | Brachyufens | Brachista Prosoligosit | a Probrachista |
| | Ceratogramma | Brachygrammatella Sinepalpig | zramma Pseudoligosita |
| | Eutrichogramma | Burksiella | |
| | Haeckeliania | Centrobiopsis | |
| | Hispidophila | Chaetogramma | |
| | Hydrophylita | Chaetostrichia | |
| | Japania | Desufens | |
| | Mirufens | Куижіа | |
| | Neobraquista | Lathromeris | |
| | Neobrachistella | Lathromeroidea | |
| | Neocentrobia | Latromeromyia | |
| | Neocentrobiella | Monorthochaeta | |
| | Oligositoides | Nicolavespa | |
| | Ophioneuris | Paruscanoidea | |
| | Pachamama | Pintoa | |
| | Paratrichogramma | Pseudobrachysticha | |
| | Poropoea | Pseudouscana | |
| | Prochaetostricha | Pteranomalogramma | |
| | Pseudogrammina | Pterygogramma | |
| | Pterandrophysalis | Thoreauia | |
| | Pseudomirufens | Tumidiclava | |
| | Soikiella | Tumidifemur | |
| | Thanatogramma | Ufens | |
| | Trichogramma | Ufensia | |
| | Trichogrammatella | Úscana | |
| | Trichogrammatoidea | Uscanella | |
| | Trichogrammatomvia | Uscanoidea | |
| | Urogramma | Uscanopsis | |
| | Viggianiella | Xiphogramma | |
| | Xenufens | Zaga | |
| | Xenufensia | Zagella | |
| - | Zelogramma | | |

FAMILIA TRICHOGRAMMATIDAE

Figura 1. Taxonomía morfológica de la familia Trichogrammatidae Pinto 2006, muestra los géneros clasificados en subfamilia, tribu y subtribu.

| SUBFAMILIA | Trichogrammatinae Trichogrammatini | incertae sedis | Oligositinae | | | incertae sedis |
|------------|---|--|--|--|---|--|
| TRIBU | | | Paracentrobiini | Chaestostrichini | Oligositini | I |
| GÉNERO | Thanatogramma Trichogramma Trichogrammatoidea Xenufens | Apseudograma Asynacta Australufens Brachyia Brachyia Brachyufens Ceratogramma Eutrichogramma Haeckeliania Hispidophila Hydrophylita Japania Mirufens Neobrachista Neobrachista Neobrachistella Neocentrobia Neocentrobiella Oligositoides Ophioneuris Pachamama Paratrichogramma Poropoea Prochaetostricha Pseudogrammina Pterandrophysalis Pseudomirufens Soikiella Trichogrammatella Trichogramma Viggianiella Xenufensia Zelogramma | Ittys Ittysella Paracentrobia Paraittys | Adryas Brachista Burksiella Chaetostrichia Kyuwia Lathromeroidea Pseudouscana Uscana Uscanoidea Zaga Zagella | Chaetostrichella Doraina Epoligosita Eteroligosita Hayatia Megaphragma Oligosita Prestwichia Probrachista Prosoligosita Sinepalpigramma | Adelograma Aphelinoidea Blodiella Brachygrammatella Centrobiopsis Chaetogramma Desufens Lathromeris Lathromeris Latromeromyia Monorthochaeta Nicolavespa Paruscanoidea Pintoa Pseudobrachysticha Pteranomalogramma Thoreauia Tumidiclava Tumidifemur Ufens Ufensia Uscanopsis Uscanella Xiphogramma |

FAMILIA TRICHOGRAMMATIDAE

Figura 2. Taxonomía molecular de la familia Trichogrammatidae Owen et al. 2007.

5.1.4 Estudios taxonómicos de la familia Trichogrammatidae

A nivel mundial se reconocen 800 especies en 87 géneros los cuales se encuentran ampliamente distribuidos en el mundo, encontrándose para la región neártica 35 géneros y 43 especies (Pinto 1997); mientras que para la región neotropical están reportadas 56 especies en 21 géneros (Yoshimoto 1984, Grissell y Schauff 1990). De 55 géneros encontrados en el nuevo mundo se han determinado 232 especies y alrededor del 40% son especies determinadas del género *Trichogramma*, otros grupos relativamente grandes como *Oligosita*, *Pseudoligosita* Girault, *Paracentrobia*, *Ufens*, *Aphelinoidea* Girault, *Mirufens* Girault, y *Chaetostricha* Girault, tienen pocas especies descritas. Los géneros *Burksiella*, *Zagella*, *Lathromeroidea* Girault, *Uscanoidea* Girault, y *Zaga* Girault se encuentran sólo en el hemisferio occidental y la mayoría de sus especies son completamente desconocidas (Pinto 2006).

En México se han realizado diferentes estudios para conocer la diversidad de la fauna parasítica de la familia Trichogrammatidae (González-Hernández 2000). Considerando que en el país convergen dos regiones zoogeográficas bien representadas, la región Neártica y la región Neotropical (González-Hernández 2000), podemos encontrar una gran riqueza y diversidad de estos grupos de Chalcidoidea (González-Hernández 2000). Al respecto, Zambrano (1986) reportó para Nuevo León 10 géneros: *Aphelinoidea, Brachyufens* Viggiani, *Doirania* Waterson, *Mirufens, Oligosita, Paracentrobia, Trichogramma, Tumidiclava* Girault, *Ufens, y Uscana* Girault; siendo el más común *Paracentrobia* y presentando a *Doirania* como nuevo registro para la región Neártica. Reyes (1989), registró 13 géneros para Tamaulipas: *Aphelinoidea, Lathrogramma* De Santis, *Lathromeroidea, Oligosita, Ophioneurus* Ratzeburg, *Paracentrobia, Paratrichogramma* Girault, *Trichogramma, Tumidiclava, Ufens, Uscana, Zaga, y Zagella*, siendo *Ophioneurus* un nuevo reporte para México. Reyes y Flores (1991), en un estudio realizado en el noreste de México y sur de San Luís Potosí, reportaron siete géneros: *Aphelinoidea, Oligosita, Paracentrobia, Trichogramma*,

Soikiella Nowicki, Brachygrammatella Girault, y Ufens en el cual Soikiella y Brachygrammatella son nuevos reportes para la región Holártica. Peña (1995) reportó para el norte de Sinaloa cuatro géneros, Oligosita, Paracentrobia, Trichogramma, y Ufens. Pinto (1997, 1998 y 2006) reporta 35 géneros para México: Aphelinoidea, **Brachista** Burksiella. Walker. Brachygrammatella, *Centrobiopsis* Girault. Chaetogramma Doutt, Chaetostricha, Epoligosita Girault, Haeckeliania Girault, Ittys Girault, Ittysella Pinto, y Viggiani, Lathromeroidea, Lathromeris Förster, Megaphragma Timberlake, Mirufens, Nicolavespa Pinto, Oligosita, Paracentrobia, Paratrichogramma, Pintoa Viggiani, Prestwichia Lubbock, Pseudoligosita, Pseuduscana Pinto, Pterygogramma Perkins, Sinepalpigramma Viggiani, y Pinto, Trichogramma, Trichogrammatomyia Girault, Tumidiclava, Ufens, Uscana, Uscanoidea Girault, Xenufens Girault, Xiphogramma Nowicki, Zaga, y Zagella.

5. 2 Diagnosis del género Zagella

5.2.1 Descripción morfológica

Las avispitas del género *Zagella* se caracterizan por presentar cuerpo relativamente robusto, estas avispitas pueden ser de color amarillo, café o naranja, algunas presentan bandas y manchas de coloración obscura, alas posteriores hialinas, o de color café (Triapitsyn 2003) (Fig. 3A). Las antenas se compone de dos anillos, dos segmentos funiculares (F) y una clava (C) de tres segmentos, el primer segmento funicular (F1) es corto y en forma de anillo, estrechamente unido al segundo segmento funicular (F2), el cual está ligeramente unido al primer segmento de la clava (C1), con una o varias sensilas placoideas (SP); los segmentos de la clava relativamente simétricos, clava sin procesos terminales prominentes, C1 con sensila apoidea tricoidea (Fig. 3B). Ala anterior ovalada, menos de dos veces tan larga como ancha, franja de setas cortas, vena marginal (VM) ancha 1.5x el largo de la vena paraestigmal (VP), VP y base de la VM ligeramente esclerotizada, vena estigmal (VE) no estrecha en la base y no

extendida por abajo del ápice de la VM; proceso radial ausente; el disco moderadamente denso y setoso, con líneas de setas distintivas; Rs1 presente formando una línea recta, dirigido hacia el margen posterior del ala, comúnmente compuesta de pocas setas, usualmente cinco o menos (Fig. 3C). Algunas especies pueden presentar variabilidad en tamaño y forma de la genitalia, pudiendo ser de forma elongada y tamaño de alrededor de 4.5x tan larga como ancha o de forma relativamente compacta y de tamaño corto, de 2.7x tan larga como ancha (Fig. 3D). Ovipositor no extendido más allá del ápice del metasoma (Gibson *et al.* 1997, Triapitsyn 2003, Pinto 2006).



Figura 3. Morfología del género *Zagella*, A. adulto, B. antena, C. ala anterior y D. genitalia del macho.

5.2.2 Aspectos biológicos de Zagella

Logarzo *et al.* (2004) en un estudio realizado en Argentina, en campo y laboratorio para conocer la biología de *Z. delicata*, determinaron que esta avispita produjo un solo adulto por huevecillo en su huésped *T. rubromarginata;* presentó un ciclo de vida de 23 \pm 1.2 días; la longevidad promedio de vida fue de 10.3 \pm 3.7 días; la proporción de sexos en laboratorio fue de 1:2.1 (machos/hembras). Esta especie parece no presentar hiperparasitismo a otros insectos benéficos. *Zagella delicata* ocurre normalmente desde la primavera hasta el otoño.

5.2.3 Diversidad y distribución de Zagella

La diversidad del género Zagella se basa en especies que se han descrito solo en el nuevo mundo. En el continente Americano están descritas cinco especies, de las cuales Z. flavipes (Girault) es una especie de Norteamérica (Pinto, 2006). Las siguientes especies han sido encontradas en Sudamérica: Z. delicata De Santis, Z. mimica De Santis, Z. nanula De Santis y Z. zebrata De Santis. En Norteamérica especialmente en el sureste, se encuentran presentes la mayoría de las especies excepto, Z. mimica y Z. nanula (Logarzo et al. 2004, Noyes 2002, Pinto 2006, Triapitsyn 2003).

El género *Zagella* parece tener una distribución bipolar en el nuevo mundo, ocurriendo en el norte y sur de América. En general su distribución se puede observar de la siguiente forma: Argentina, Brasil, México (Aguascalientes, Baja California Sur, Chihuahua, Chiapas, Durango, Jalisco, Nayarit, Nuevo León, Michoacán, Quintana Roo, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán y Zacatecas), Perú, Uruguay, Venezuela y Estados Unidos (Gibson *et al.* 1997, González y Ávila 2006, Logarzo 2003, Noyes 2002, Pinto 2006, Triapitsyn 2003).

5.2.4 Importancia de Zagella como parasitoide de insectos

Logarzo (2003), en una búsqueda de los principales parasitoides de chicharritas proconiine en Perú, colectó muestras de huevecillos de *Pseudometopia amblardii, P. phalaesia* y *Oncometopia* n. sp. de árboles de mandarina. En las masas de huevecillos de las especies de chicharritas mencionadas se encontraron dos especies del género *Gonatocerus* y una especie de trichogrammátido no descrita cercana a *Zagella*. Triapitsyn (2003) efectuó una revisión de los parasitoides asociados a chicharritas Proconiine de los géneros *Homalodisca, Oncometopia* y *Cuerna*, donde se reporta varias especies de parasitoides en los siguientes cuatro géneros de la familia Trichogrammatidae: *Oligosita, Paracentrobia, Ufens* y *Zagella*.

Logarzo *et al.* (2004), durante el 2000 realizaron un estudio en laboratorio y campo en Argentina. Ellos determinaron el parasitismo por *Z. delicata* en huevecillos de la chicharrita *T. rubromarginata*, utilizando como hospedero plantas de importancia agrícola como caña de azúcar, maíz y cítricos. Del total de los huevecillos (343), expuestos a hembras de *Z. delicada* en laboratorio, el 72.5% fue parasitado y su emergencia fue de 43.8%. En cuanto a la preferencia de parasitismo en plantas huéspedes, se observó un 66.7% de huevecillos parasitados en caña de azúcar, 57.0% en maíz y 4.5% correspondió a plantas de cítricos. En muestras de campo de zacate Johnson, recolectaron 724 huevecillos de *T. rubromarginata*, los cuales fueron parasitados por un complejo de parasitoides de la familia Trichogrammatidae y Mymaridae. La especie más abundante de tricogramátidos emergidos fue *Z. delicata*, la cual emergió de 626 huevecillos, lo que corresponde a 86.5% del total de los huevecillos parasitados. Los resultados de estos estudios de laboratorio y campo sugieren que *Z. delicata* tiene potencial como agente de control biológico de chicharritas proconiinas exóticas, incluyendo a la chicharrita *H. coagulata*.

En un trabajo realizado durante el verano en el condado de Gillespie, Texas, Lauziere y Hassell (2005) determinaron los principales parasitoides de huevecillos de cicadélidos vectores de la bacteria *Xillela fastidiosa* en distintas plantas hospedantes. Se colectaron 11,000 huevecillos, de los cuales el 79% estaba parasitazo. Del total de los huevecillos parasitados, el 87% correspondió a tres especies del género *Gonatocerus* de la familia Mymaridae, mientras que el 13% perteneció a los géneros *Zagella* y *Ufen*s de la familia Trichogrammatidae.

Virla *et al.* (2005) en un estudio para determinar la diversidad y abundancia de los parasitoides oofilos del vector del achaparramiento (CSS), *Dalbulus maidis*, en el cultivo de maíz en Argentina. De un total de 9,483 huevecillos expuestos y parasitados por la chicharrita *D. maidis*, se determinaron las siguientes cuatro especies de tricográmatidos: *Paracentrobia* sp., *Oligosita* sp. grupo "A", *Oligosita* sp. Grupo "B" y *Zagella* sp. El género *Zagella* sp. representó el 4.6% de los parasitoides obtenidos.

5. 3 Diagnosis del género Burksiella

5.3.1 Descripción morfológica

Estas avispitas tienen un cuerpo generalmente robusto, de color amarillo, café o naranja; algunas presentan bandas y manchas de coloración obscura; las alas posteriores son hialinas o de color café, su tamaño es de 0.6 mm (Fig. 4A). La Antena está compuesta de dos anillos, dos segmentos funiculares, tres segmentos en la clava (raramente reducido a dos), solamente una división parcial entre C1 y C2; F1 corto aneliforme, transverso, estrechamente a F2; F2 igual o más ancho que F1 con una o varias SP; clava con segmentos distintamente asimétricos (longitud de C1 y C2 de diferente tamaño, C1 con o sin sensila (SAPB) (grupo benefica) (Fig. 4B). El ala anterior es de forma ovalada, 1.7 a 1.9 veces tan larga como ancha; el margen del ala presenta franja de setas cortas, la venación del ala presenta una constricción entre el estigma y la VM y VE extendiéndose hacia el ápice de la VM (una línea en medio de la VS), el margen del ala se describe como un ángulo oblicuo con VM; la VP y base de VM no

distintiva ni esclerotizada del apice de la vena marginal, con proceso radial presente; disco del ala moderadamente setoso, con líneas de setas distintivas; Rs1 presente, de forman elongada con más de 5 setas ampliamente curveada del ápice del estigma hacia la base del ala, el ápice de RS1 convergiendo sobre Cu (Fig. 4C). El macho presenta antena con los segmentos de la clava usualmente menos simétricos; machos del grupo benéfica con varios APB en C1. La cápsula de la genitalia corta, estrecha, con el margen basal redondeado, con setas ventrales y parámeros (PAR) (Fig. 4D).



Figura 4. Morfología del género *Burksiella*, A. adulto, B. antena, C. ala anterior y D. genitalia del macho.

5.3.2 Diversidad y distribución de Burksiella

Burksiella De Santis, 1957, es uno de los géneros poco conocidos de Trichogrammatidae. Se encuentra presente en Asia y en América. En América *Burksiella* se encuentra en Argentina, Belice, Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Ecuador, Guatemala, México, Nicaragua, Perú, Estados Unidos y Venezuela (Pinto 2006). En México *Burksiella* está presente en 25 de los 32 estados del país (Pinto 2006, Triapitsyn y Bernal 2009).

Se han descrito 11 especies de este género, de las cuales *Burksiella chrysomeliphila* (Lin 1994) y *B. singularis* (Yousuf y Shafee 1988) han sido reportadas para Asia y las siguientes nueve especies han sido encontradas en el nuevo mundo: *B. altagraciae* Velásquez & Viggiani (Venezuela), *B. benefica* (Dozier) (Haití), *B. dianae* Pinto (México y E.U.A.), *B. floridae* (Viggiani) (E.U.A), *B. ormenidis* (Dozier) (Haití), *B. platensis* (De Santis) (Argentina), *B. platysetosa* Viggiani y Velásquez (Venezuela), *B. spirita* (Girault) (E.U.A.) y *B. subannulata* De Santis (Argentina) (Pinto 2006).

5.3.3 Importancia de Burksiella como parasitoide de insectos

Las avispitas *Burksiella* parasitan huevecillos de distintas familias de Hemiptera y Orthoptera. *Burksiella* ha sido encontrada en huevecillos de hemípteros de la familia Fulgoridae sobre sus plantas hospederas *Bunchosia*, *Malphigia* y *Stigmatophyllum* (Malphigiaceae) y de la familia Cicadellidae parasitando a *Oncometopia* (*Similitopia*) sp. y *Homalodisca liturata* Ball, en la planta hospedera *Conyza canadensis* (L.). También se ha encontrado parasitando huevecillos de ortópteros de la familia Tettigoniidae (Pinto 2006). Además, *Burksiella* ha sido colectada en plantas de jazmín (Dozier 1932, Viggiani 1985, Pinto 2006, Triapitsyn y Bernal 2009).

5.4 Revisión taxonómica de los géneros Burksiella y Zagella

A nivel de género Doutt y Viggiani (1968) consideran al género Burksiella un sinónimo de Zagella. Viggiani (1985) asigna al género Burksiella como Zagella en la tribu Paracentrobiini. Pinto (1997) menciona la dificultad de separar morfológicamente a Zagella del género Chaetostrichia. Owen (2004) hace una revisión del género Ufens, en la cual la especie U. spiritus Girault ha sido transferida al género Zagella como Z. spirita (Girault), debido a que comparte importantes características morfológicas con Zagella. Pinto (2006), designa al género Burksiella como un género independiente y las siguientes especies del género Zagella son asignadas al género Burksiella: B. floridae (antes Z. floridae) y B. spirita (antes Z. spirita); así mismo la especie perteneciente al género Ufens, U. beneficus (Dozier) fue transferida a Burksiella como B. benefica. Owen et al. 2007 rectifica la posición de Burksiella en la tribu Chaestostrichini, la cual fue asignada a la tribu Paracentrobiini por Viggiani en 1985; Burksiella no posee sinapomorfia morfológica con los géneros de esta tribu. El género Burksiella puede ser fácilmente confundido con Zagella, se han examinado los paralectotipos elaborados por Triapitsyn y la observación de la genitalia ha sido difícil. Las especies descritas como Brachyia radialis por De Santis (1997) pueden ser atribuidas a Zagella según la descripción original, esto no es claro ya que no existen especies tipo (Pinto 2006). Otro género estrechamente relacionado con Zagella más que con Burksiella es Zaga, las alas anteriores de este género son similares a las alas de los dos taxas anteriores, pero Zaga puede diferenciarse por presentar cinco segmentos en la clava, a diferencia de los otros dos géneros que presentan tres segmentos (Owen 2007).

La clarificación taxonómica de las especies de estos géneros *Burksiella* y *Zagella* no es clara, a nivel de géneros presentan similitud en algunos caracteres, la separación esta basada en la asimetría de los segmentos antenales, números y orientación de setas radiales, tamaño y orientación de la venación del ala anterior, en la genitalia si la cápsula es estrecha o amplia en el ápice y si el margen basal es arqueado ó transverso. El análisis taxonómico coloca a estos géneros muy cercanos y la posición de sus taxas a nivel de especie aún es controversial. Aunado a la realización de una descripción morfológica

correcta, la cual está basada en ejemplares machos y se excluye a las avispitas hembras. Otro problema es la preparación de lamillas en porta objetos, lo cual es sumamente difícil, si consideramos su tamaño diminuto de menos de 1mm y fragilidad del cuerpo, además de que consume demasiado tiempo y se requieren especialistas para su elaboración. Por lo anterior, en este trabajo se ha considerado la utilización de las herramientas de técnicas y marcadores moleculares para esclarecer e inferir la posición taxonómica de estos géneros y sus especies dentro de la familia Trichogrammatidae.

5.5 Marcadores y técnicas moleculares basados en el ADN en la determinación de tricogramátidos.

La Tabla 1 muestra los marcadores y técnicas moleculares utilizadas en estudios de taxomonía y filogenia de Trichogramátidae.

El marcador molecular más utilizado en estudios taxónomicos y filogenéticos de tricogramátidos es la región hipervariable ITS2 del ADNr nuclear. La mayoría de los estudios con este marcador han utilizado las técnicas de PCR y secuenciación seguido de PCR-RFLP a nivel taxónomico de especies (Silva *et al.* 1994, Silva *et al.* 1995, Sappal *et al.* 1995, van Kan *et al.* 1996, van Kan *et al.* 1997, Pinto *et al.* 1997, Schilthuizen y Stouthamer 1997, Stouthamer *et al.* 1999, Silva *et al.* 1999, Stouthamer *et al.* 2000, Ciciola *et al.* 2001, Ciciola *et al.* 2001, Thomson *et al.* 2003, Almeida y Stouthamer 2003, Li *et al.* 2004, Walker *et al.* 2005, España-Luna *et al.* 2006,2008, López 2009, Ávila *et al.* 2009). Este mismo gen ha sido usado con menor frecuencia con la técnica de RAPD para estudios de especie (Silva *et al.* 1994, Silva *et al.* 1995, España-Luna *et al.* 2008).

El gen ITS1 del ADNr nuclear ha sido otro marcador molecular utilizado con las técnicas de secuenciación, RFLP y RAPD en estudios a nivel de especie de
tricogramátidos (Orrego y Silva 1993, Silva *et al.* 1994, Silva *et al.* 1995, Sappal *et al.* 1995).

Otros marcadores moleculares que está siendo utilizados para estudios taxónomicos a niveles de género y especie de triogramátidos son las regiones codificadoras 18S y 28S del ADNr nuclear. Ambas regiones han sido analizadas mediante las técnicas de PCR y secuenciación, principalmente y PCR-RFLP (Gillespie *et al.* 2005, Owen *et al.* 2007, Ávila *et al.* 2009, Sappal *et al.* 1995).

El gen citrocomo oxidasa II (COII) de ADNm se ha utilizado con las técnicas de PCR y secuenciación y PCR y RFLP en pocos estudios taxónomicos de tricogramátidos a nivel de especie (Borghuis *et al.* 2003).

| Nivel | Marcador | Técnica molecular | Referencia |
|-----------------|-------------------------|---------------------|---------------------------|
| taxonómico | molecular | | |
| Géneros (32) | $28S^{1}$ | PCR y Secuenciación | Gillespie et al. 2005 |
| Especies (8) | | | |
| Géneros (57) | 28S y 18S ¹ | PCR y Secuenciación | Owen <i>et al.</i> 2007 |
| Especies (37) | | | |
| Géneros (8) | 18S y ITS2 ¹ | PCR y Secuenciación | Ávila <i>et al</i> . 2009 |
| Especies (4) | | | |
| Especies de | ITS2 | PCR y Secuenciación | Schilthuizen y |
| Uscana (1) | | | Stouthamer 1997 |
| Especies de | ITS2 | PCR y Secuenciación | Walker et al. 2005 |
| Aphelinoidea(4) | | | |

Tabla 1. Marcadores y técnicas moleculares utilizados en la taxonomía de Tricográmatidos.

| Especies de | ITS1 ¹ | PCR y Secuenciación | Orrego y Silva 1993 |
|--------------|------------------------|---------------------|-----------------------------|
| Trichogramma | ITS1 y ITS2 | PCR, RAPD y | Silva <i>et al.</i> 1994 |
| | | Secuenciación | |
| | ITS1 y ITS2 | PCR, RAPD y | Silva <i>et al.</i> 1995 |
| | | Secuenciación | |
| | ITS2 | PCR, RFLP y | Silva <i>et al</i> . 1999 |
| | | Secuenciación | |
| | (ADNm) ² | PCR, RAPD | Vanlerberghe- |
| | | | Masutti,1994 |
| | ITS1 y ITS2 | PCR y RFLP | Sappal et al. 1995 |
| | 18S ² y 28S | | |
| | ITS2 | PCR y RFLP y | van Kan <i>et al</i> . 1996 |
| | | Secuenciación | |
| | ITS2 | PCR y RFLP | van Kan <i>et al.</i> 1997 |
| | ITS2 | PCR, RFLP y | Pinto et al. 1997 |
| | | Secuenciación | |
| | ITS2 | PCR, RFLP y | Stouthamer et al. 1999 |
| | | Secuenciación | |
| | ITS2 | PCR y Secuenciación | Stouthamer et al. 2000 |
| | ITS2 | PCR, RFLP y | Ciciola et al. 2001 |
| | | Secuenciación | |
| | ITS2 | PCR y Secuenciación | Ciciola et al. 2001 |
| | COII ² | PCR, RFLP y | Borghuis et al. 2003 |
| | | Secuenciación | |
| | ITS2 | PCR, RFLP y | Thomson et al. 2003 |
| | | Secuenciación | |

| ITS2 | PCR y Secuenciación | Almeida y Stouthamer |
|------------------------|----------------------|----------------------------|
| | | 2003 |
| ITS2 | PCR y Secuenciación | Li <i>et al</i> . 2004 |
| Locus BO6 ³ | PCR y SSR | Pizzol et al. 2005 |
| ITS2 | PCR, RAPD, RFLP y | España-Luna <i>et al</i> . |
| | Secuenciación | 2006,2008 |
| ITS2 | PCR, y Secuenciación | López 2009 |

¹Regiones codificadoras 18S, 28S, ITS1 e ITS2 del ADN ribosomal nuclear

²Regiones codificadoras COII del ADN mitocondrial

³Región no codificadora del ADN

5.6 Técnicas y regiones analizadas de los géneros Burksiella y Zagella

En la Tabla 2 se muestran las secuencias disponibles en el GenBank, las cuales corresponden a un estudio realizado por Owen *et al.* 2007 y en el cual determinaron la filogenia de la familia Trichogrammatidae, mediante técnicas moleculares como PCR y secuenciación de los genes conservados 18S y 28S del ADNr nuclear, la clave de acceso y las tallas de las secuencias génicas parciales de los géneros *Zagella y Burksiella* son mostradas. Las secuencias con los nombres de las especies *Zagella spirita y Ufens benefica* corresponden a las especies *Burksiella spirita y Burksiella benefica* de acuerdo a la nueva clasificación propuesta por Pinto en el 2006.

| | | Regiones | | | | | | | | | |
|------------------------|----------|------------|----------|------------|--|--|--|--|--|--|--|
| Género/especie | 18 | BS | 288 | | | | | | | | |
| | clave | talla (pb) | clave | talla (pb) | | | | | | | |
| Z. spirita=B.spirita 1 | AY940421 | 770 | AY623597 | 968 | | | | | | | |
| Z. spirita=B.spirita 2 | AY940420 | 770 | AY623595 | 968 | | | | | | | |
| Zagella sp.1 | AY940418 | 769 | AY623593 | 967 | | | | | | | |
| Zagella sp.2 | AY940419 | 769 | AY623594 | 966 | | | | | | | |
| Zagella sp.2 | | | AY623596 | 968 | | | | | | | |
| Ufens benefica= | | | AY623590 | 968 | | | | | | | |
| Burksiella benefica 1 | | | | | | | | | | | |
| Ufens benefica= | AY940415 | 767 | AY623569 | 968 | | | | | | | |
| Burksiella benefica 2 | | | | | | | | | | | |

Tabla 2. Número de acceso de GenBank de especies de Zagella y Burksiella, de la región conservada 18S y 28S.

http://www.nbci.nlm.nih.gov

MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Recolecta de material biológico

Los especímenes de tricogramátidos fueron obtenidos en áreas agrícolas y naturales aledañas en 10 estados de México (Tabla 4). La obtención de avispitas se realizó mediante recolectas con red de golpeo entomológica, efectuando de 50 a 100 golpes de red sobre la vegetación, generalmente durante la mañana, colocando las muestras en frascos (250 y 500 ml) con alcohol al 70%.

Adicionalmente se efectuaron colectas directas de huevecillos individuales y masas de huevecillos de insectos huéspedes. En Coahuila huevecillos de cicadélidos (posiblemente *D. maidis, Erythroneura ziczac* Walsh, y *H. vitripennis*) y lepidópteros (posiblemente *Helicoverpa zea* [Boddie], *Spodoptera frugiperda* [J. E. Smith], *Spodoptera exigua* [Hüber], *Manduca* sp., y *Harrisina brillians* Barnes) en vid, maíz, tomate, cítricos, y trueno, *Ligustrum japonicum* Thunb., de Julio a Noviembre del 2007. En Chihuahua huevecillos de lepidópteros (posiblemente *H. zea*), en maíz en Octubre del 2007, así como masas de huevecillos de cicadélidos (posiblemente *H. iturata* y *H. vitripennis*) en jojoba en Abril del 2007 y en cítricos en Octubre del 2008, en Sonora y Tamaulipas, respectivamente.

| | Épocas de | |
|-----------|---------------|---|
| Estado | muestreo | Plantas hospederas |
| Coahuila | Jul-Nov 2006, | Alfalfa, Medicago sativa L., vid (com.y silvestre), |
| | Jul-Ago 2007, | Vitis vinifera L., maíz, sorgo, Sorghum bicolor (L.) |
| | Sep-Oct 2008 | Moench, tomate, Lycopersicon esculentum Mill., |
| | | algodonero, Gossypium hirsutum L., melón, Cucumis |
| | | <i>melo</i> L., maleza |
| Durango | Jul-Nov 2006, | Alfalfa, maíz, tomate, manzano, Malus domestica |
| | Oct-Nov 2008 | Borkh |
| Sinaloa | Abr-Nov 2007, | Maíz, frijol, Phaseolus vulgaris L., chile, Capsicum |
| | Dic 2008 | annuum L., garbanzo, Cicer arietinum L., tomate, |
| | | alfalfa, algodonero, berenjena, Solanum melongena |
| | | L., caña de azúcar, papa, Solanum tuberosum L., |
| | | pepino, Cucumis sativus L., sorgo, soya, Glycine max |
| | | (L.), mango, Mangifera indica L.ciruelo, Spondias sp. |
| Chihuahua | Oct 2007, Oct | Alfalfa, maíz, algodonero, cacahuate, Arachis |
| | 2008 | hypogea L., nogal, Carya illinoinensis (Wangenh.) K. |
| | | Koch, maleza |
| Guerrero | Abr 2007 | Maíz, tomate, cilantro, Coriandrum sativum L., |
| | | maleza |
| Sonora | Abr 2007 | Frijol, jojoba, Simmondsia chinensis (Link) C. K. |
| | | Schneider, maleza |
| Zacatecas | Oct 2007 | Maíz, frijol, vid, durazno, Prunus persica L., maleza |
| Hidalgo | Oct 2007 | Nogal, C. illinoinensis |
| N. León | Sep 2007 | Naranjo, Citrus sinensis L., vid |
| Jalisco | Abr 2008 | Maíz, cítricos, maleza |

Tabla 4. Estados, épocas de muestreo y plantas hospedantes considerados en lascolectas de Tricogramátidos.

6.2 Procesamiento de muestras de insectos

Las muestras de insectos en alcohol se procesaron para la separación de avispitas tricogramátidos utilizando un estereoscopio Leica MZ1®. Las masas de huevecillos se colocaron en cajas Petri (90 x 15 mm, Plastik de Durango, Durango, México) selladas con papel Parafilm® (Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL). Los huevecillos colectados de forma individual se colocaron en cápsulas de gelatina (tamaño 00, SPI Supplies, West Chester, PA). Las muestras de huevecillos se revisaron diariamente por un período de 20 días para obtener las avispitas emergidas, las cuales se conservaron en alcohol al 70% en tubos de plástico de 1.5 ml.

6.3 Determinación morfológica de especímenes

ejemplares fueron montados en laminillas Las muestras de para reconocimiento a nivel género, para esto se utilizó la técnica de montaje en laminilla de Noyes (1982) para calcidoideos (con algunas modificaciones de Svetlana Nikolaevna Myartseva, com. pers.). Para la identificación morfológica nivel género se utilizaron las claves de Doutt y Viggiani (1968), Gibson et al. (1997), Triapitsyn (2003) y Pinto (2006). La determinación se basó en caracteres morfológicos, principalmente de antenas y alas. Para la corroboración de los especímenes identificados se contó con material de referencia de la colección del museo de insectos de la Universidad de California Riverside, E.U.A. Las muestras de referencia han sido depositadas en el laboratorio de la Colección de Insectos Benéficos Entomófagos (CIBE) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, México.

6.4 Revisión de tricogramátidos de la colección CIBE

Se realizó una revisión de los ejemplares de la colección CIBE, los cuales se encontraban preservados en alcohol al 70%, así como montajes en laminillas. Las muestras en alcohol fueron obtenidas de campo mediante recolectas periódicas en áreas agrícolas, y silvestres desde 1999 al 2005. Se revisaron un total de 1308 especímenes de un total de 146 muestras. Las muestras provenían de distintos estados: Chihuahua, Durango, Nuevo León, Sonora, Tamaulipas, Coahuila, Nayarit, San Luís Potosí Veracruz, Quintana Roo, Yucatán Jalisco, Sinaloa, Chiapas, Guanajuato, Michoacán. Así mismo se revisaron alrededor de 400 laminillas de la colección CIBE, proveniente de 14 estados de México.

6.5 Determinación molecular de tricogramátidos

6.5.1 Extracción y amplificación de ADN por PCR

Extracción de ADN

El ADN genómico fue extraído en forma individual a partir de una avispita, usando el Kit QIAamp® DNA MicroHandbook (Qiagen®) de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Apéndice B). Durante la presente tesis se probaron otros métodos de extracción como: Chelex-100, el método de Cohen *et al.* (1982), método cetiltrimetilamonio bromide (CTAB), método DNAzol; siendo el Kit QIAamp® DNA el que mostró un mejor resultado para los especímenes bajo interés (Apéndice B).

Amplificación de ADN

Los fragmentos fueron amplificados a partir de 25 μ l de acuerdo al procedimiento de Sambrook *et al.* (1989) el cual consistió en utilizar 2.5 μ l de buffer de PCR 10X, 2.0 μ l de MgCl2 2.5 mM, concentración final, 2.0 μ l de dNTPs 2.5 mM, concentración final, 2.0 μ l de cada primer de 10 picomoles/ μ l, concentración final, 0.2 μ l (1.5 U) *Taq* DNA polimerasa, 11.3 μ l agua de grado MiliQ y 3 μ l de plantilla de

ADN. Los fragmentos del gen 18s del RNA ribosomla fueron amplificados cía reacción polimerasa utilizando oligonucleótidos 5'en cadena (PCR) los v TAACGATACGGGACTCATCC-3′ y 18S 5′-GTGTTGAGTCAAATTAAGCC-3′. También se amplificó la región intergénica ITS2 del ADNr con los oligonucleótidos ITS2 5'-TGTGAACTGCAGGACACATG-3' y ITS2 5'-GTCTTGCCTGCTCTGAG-3' (Van Kan et al. 1997, Silva et al. 1999, Ciciola et al. 2001, Pinto et al. 2002); así como la región que codifica para la subunidad II de la citocromo oxidasa mitocondrial (COII), los primers utilizados fueron COII 5'-ATTGGACATCAATGATATTGA-3 y COII 5-CCACAAATTTCTGAA CAT TGACCA-3' descritos por Borghuis et al. (2004). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador PX2 Thermo®. La temperatura de amplificación para la región ITS2 fue de una desnaturalización inicial de 3 min a 94 °C seguida por 33 ciclos de 40 seg a 94 °C, 45 seg a 53 °C, 45 seg a 72 °C y 5 min a 72 °C después del último ciclo (De Almeida y Stouthamer 2003). Para amplificar la región 18S se siguió el mismo programa térmico de la región ITS2 bajo una temperatura de anillamiento de 50 °C.

6.5.2 Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)

Obtención de los productos de restricción

Para la selección de las enzimas se utilizó el paquete DNstrider 1.0 (Christian Marck) con las secuencias de DNA obtenidas del Genbank correspondientes a las especies de *Trichogramma*, así como de la secuenciación realizada durante esta investigación.

Para el análisis de restricción se seleccionaron las enzimas *Alu*I de corte abrupto en la secuencia AG \downarrow CT y *Eco*RI de corte con terminaciones pegajosas en la secuencia G \downarrow AATTC. Se digirieron los productos amplificados de la región ITS2, 18s y COII en una reacción de 20 µl, con 16 µl de ADN, 2 µl de buffer, 1µl de enzima y 1µl de agua de grado MiliQ. La muestra fue incubada a 37 °C por dos horas (Sappal *et al.* 1995, Stouthamer *et al.* 1999).

Visualización de ADN amplificado y digerido

Los productos amplificados de los genes ITS2 y 18s del ADNr nuclear de las muestras fueron separados por electroforesis en geles de agarosa 1.5%, con amortiguador TBE 0.5% (Tris base, Ácido bórico, EDTA al 0.5M pH 8.0). Las muestras fueron cargadas con buffer de corrida 6X y fueron teñidos con Azul de bromofenol 0.25% (W/V), Xylene cyanol 0.25% (W/V), Glycerol en H₂O bidestilada 30% (V/V), de acuerdo al manual de Sambrook 1989 (Apéndice C). Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y se empleó un marcador de peso molecular como referencia. Los geles fueron visualizados y fotografiados en un fotodocumentador Ovitec®.

6.5.3 Secuenciación del ADN

Los productos amplificados por PCR de las regiones ITS2, 18s del ADNr y COII de la región mitocondrial fueron enviados a secuenciar a la compañía Macrogen Corp. en Maryland, E.U.A. La secuenciación fue conducida en condiciones de ciclado y terminador Big Dye.

6.5.4 Análisis filogenético

Alineamiento de secuencias

Para el alineamiento se utilizo el método ClustalW, parámetros como: pairwise, múltiple, peso de matriz y de transición, porcentaje de divergencia fueron considerados para el análisis de las secuencias. Los datos de las secuencias alineadas mostraron los sitios conservados, variables, parsimoniosos y composición estadística de los nucleótidos. Las alineaciones fueron útiles para la inferir la filogenia de las taxas bajo estudio.

Métodos de análisis filogenético

Para el análisis evolutivo filogenético y molecular, se utilizó el método de distancias *UPGMA* (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Means) y el método de caracteres de máxima parsimonia (MP), y fue conducido en el programa MEGA versión 4 (Tamura *et al.* 2007). Se realizó una reducción de las secuencias, en el cual todas las regiones ambiguas fueron excluidas. MP fue conducido usando 1000 búsquedas heurísticas al azar, con árboles con conexiones en ramas, caracteres con igual peso y gaps tratados como missing. El Bootstrap fue realizado con 1000 replicas de las secuencias aleatorias. Para cada nodo se realizó un estricto consenso de la matriz de datos completa. Un grupo externo fue asignado, el taxón fue seleccionada de una categoría de nivel alto, a nivel de géneros el grupo externo fue la secuencia de la región variable ITS2 de *Aphytis melinus* DeBach (Hymenoptera: Aphelinidae), basado sobre trabajos previos filogenéticos (Cheng Z. Y and F. Quetin en imp.); y para el análisis a nivel de especie se seleccionó como grupo externo el género *Uscana semifunipennis* Girault (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Para el análisis de la región conservada 18S el grupo externo fue el parasitoide *Eretmocerus eremicus* (Hymenoptera: Aphelinidae).

VII. RESULTADOS

7.1 Identificación morfológica de tricogramátidos

7.1.1 Especímenes recolectados mediante red entomológica

Del total de las muestras colectadas 139, se obtuvieron 20 géneros de tricogramátidos siendo los más frecuentemente encontrados *Trichogramma* (24.6%), *Paracentrobia* (23.8%), *Oligosita* (19.0%), y *Ufens* (12.5%). Los restantes 16 géneros formaron el 20.1% de los ejemplares colectados (Tabla 5). A pesar del rango amplio de muestras colectadas (dos a 42 muestras) por estado, un número importante de géneros (cuatro a 15 géneros) fueron encontrados en los estados estudiados.

Considerando los géneros de Trichogrammatidae reportados previamente para estados de México por Zambrano 1986; Reyes 1989; Peña 1995; Pinto 1988, 2006; Triapitsyn 2003; García-González et al. 2005; García 2006, 2008; Al-Wahaibi et al. 2005; González-Hernández y Ávila-Rodríguez 2006; Ávila et al. 2008a,b; Fu-Castillo et al. 2008; y Virla et al. 2009a; así como los géneros determinados en el presente estudio, se puede señalar que Paracentrobia, Ufens, Ittys, Zagella, Zaga, Lathromeris, Uscana, y Trichogrammatella se reportan por primera vez para Guerrero; mientras que Trichogramma, Oligosita, Ufens, Pseudoligosita, y Burksiella son nuevos reportes para Hidalgo. También los géneros Pseudoligosita y Lathromeris, Lathromeroidea, y Burksiella; así como Lathromeris y Brachigrammatella constituyen nuevos reportes para Chihuahua, Coahuila, y Jalisco, respectivamente. Los géneros Chaetogramma y Trichogrammatella se reportan por primera vez para Zacatecas y Nuevo León, respectivamente. Trichogrammatella es nuevo registro para México. Por lo anterior, la mayoría de los géneros encontrados en Guerrero (8 de 13 géneros) y todos los de Hidalgo (5 géneros) son nuevos registros para estos estados. Para este último estado, no se conocen estudios previos de identificación de tricogramátidos. Los géneros *Aphelinoidea, Tumidiclava, Brachista, Paratrichogramma, y Haeckeliana* ya habían sido reportados previamente para los estados donde fueron encontrados en este estudio (González-Hernández y Ávila-Rodríguez 2006 y 2010, Pinto 2006, Virla *et al.* 2009a) (Tabla 6).

Trece géneros de tricogramátidos fueron determinados de muestras de insectos colectadas mediante red entomológica en 25 cultivos agrícolas: *Trichogramma*, *Oligosita*, *Paracentrobia*, *Ufens*, *Aphelinoidea*, *Pseudoligosita*, *Ittys*, *Burksiella*, *Tumidiclava*, *Lathromeris*, *Trichogrammatella*, *Zagella*, y *Lathromeroidea*. Particularmente, los géneros *Trichogramma*, *Oligosita*, *Paracentrobia*, y *Ufens* fueron encontrados en el 56, 48, 40, y 36% de los cultivos muestreados, respectivamente. Los cultivos de naranjo, nogal, vid, alfalfa, y maíz, tuvieron el mayor número de géneros de tricogramátidos (seis a ocho géneros) (Tabla 7). Por el contrario, no se encontraron avispitas tricogramátidos en berenjena, chile, ciruelo, garbanzo, papa, y soya de Sinaloa y en melón de Coahuila (Ávila *et al.* 2010).

| | | | | Esta | .do (ta | maño | de m | nuest | ra) | | | |
|-------------------|------|------|------|------|---------|------|------|-------|-----|-----|-------|------|
| | Sin | Coah | Gro | Chih | Dgo | Zac | Son | NL | Jal | Hgo | | |
| Géneros | (42) | (37) | (19) | (11) | (10) | (6) | (5) | (4) | (3) | (2) | Total | % |
| Trichogramma | 136 | 22 | 17 | 56 | 2 | 16 | 12 | 1 | 56 | 59 | 377 | 24.6 |
| Paracentrobia | 26 | 19 | 130 | 22 | 46 | 0 | 67 | 21 | 34 | 0 | 365 | 23.8 |
| Oligosita | 110 | 54 | 48 | 4 | 0 | 4 | 2 | 45 | 20 | 5 | 292 | 19.0 |
| Ufens | 1 | 12 | 6 | 16 | 1 | 11 | 123 | 9 | 11 | 2 | 192 | 12.5 |
| Pseudoligosita | 8 | 1 | 74 | 1 | 0 | 0 | 0 | 3 | 4 | 1 | 92 | 6.0 |
| Burksiella | 1 | 28 | 11 | 0 | 0 | 0 | 0 | 17 | 12 | 12 | 81 | 5.3 |
| Ittys | 4 | 6 | 4 | 0 | 0 | 8 | 1 | 2 | 16 | 0 | 41 | 2.7 |
| Aphelinoidea | 2 | 5 | 8 | 5 | 0 | 2 | 0 | 0 | 8 | 0 | 30 | 2.0 |
| Zagella | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 16 | 4 | 0 | 24 | 1.6 |
| Tumidiclava | 0 | 0 | 0 | 8 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 16 | 1.0 |
| Zaga | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 0 | 0 | 8 | 0.5 |
| Lathromeris | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 4 | 0.3 |
| Trichogrammatella | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0.1 |
| Lathromeroidea | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0.1 |
| Chaetogramma | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0.1 |
| Brachista | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0.1 |
| Paratrichogramma | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0.1 |
| Brachigrammatella | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0.1 |
| Haeckeliana | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0.1 |
| Uscana | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0.1 |

Tabla 5. Géneros de Trichogrammatidae en áreas agrícolas y naturales aledañas en 10Estados de México, durante 2006-2008.

¹Sin = Sinaloa, Coah = Coahuila, Gro = Guerrero, Chih = Chihuahua, Dgo = Durango, Zac = Zacatecas, Son = Sonora, NL = Nuevo León, Jal = Jalisco, Hgo = Hidalgo.

| | | Géneros ¹ | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------|---------|----------------------|--------|-----|--------|--------|--------|-------|------|--------|-------|-------|-------|-----|
| Estados | Par | Ufe | Zge | Zag | Lat | Usc | Tgr | Tri | Oli | Pse | Bur | Ltm | Bgr | Cgr |
| Guerrero | х | Х | х | Х | X | х | х | | | | | | | |
| Hidalgo | | Х | | | | | | Х | X | Х | х | | | |
| Chihuahua | | | | | Х | | | | | Х | х | Х | Х | |
| Coahuila | | | | | Х | | | | | Х | х | Х | Х | |
| Jalisco | | | | | X | | | | | X | Х | Х | Х | |
| Zacatecas | | | | | | | Х | | | | | | | X |
| N. León | | | | | | | | | | | | | | |
| México | | | | | | | X | | | | | | | |
| ¹ Par-Parace | ntrohia | u Ufe | -Ufens | Ζσρ | -7/100 | olla 7 | /aσ-70 | 100] | at-L | athron | ieris | Usc-D | scana | |

Tabla 6. Nuevos reportes de géneros de Trichogrammatidae para el país y los estados de México muestreados.

¹Par=*Paracentrobia*, Ufe=*Ufens*, Zge=*Zagella*, Zag=*Zaga*, Lat=*Lathromeris*, Usc=*Uscana*, Trg=*Trichogrammatella*, Tri=*Trichogramma*, Oli=*Oligosita*, Pse=*Pseudoligosita*, Bur= *Burksiella*, Ltm= *Lathromeroidea*, Bgr= *Brachigrammatella*, Cgr= *Chaetogramma*.

Tabla 7. Géneros de Trichogrammatidae en cultivos agrícolas de 10 estados de México, durante 2006-2008.

| Estado | | Géneros ¹ | | | | | | | | | | | |
|-----------------------------|---|----------------------|-----|---------|--------|----------|--------|---------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Tri | Oli | Ufe | Pse | Par | Aph | Itt | Bur | Tum | Lat | Trg | Zge | Ltr |
| | Naranjo ² , <i>Citrus sinensis</i> L. | | | | | | | | | | | | |
| N. León | Х | Х | Х | Х | | | Х | Х | | | Х | Х | |
| | Nogal ² , Carya illinoinensis (Wangenh.) K. Koch | | | | | | | | | | | | |
| Chihuahua | Х | Х | Х | Х | | | | | Х | | | | |
| Hidalgo | Х | Х | Х | Х | | Х | | Х | | | | | |
| | | | V | vid (co | mercia | l) Vitis | s vini | ifera L | ·• | | | | |
| Zacatecas | Х | Х | | | Х | | | | | | | | |
| Coahuila | Х | | | Х | | | | | | | | | |
| N. León | | Х | Х | | | Х | Х | | | | | | |
| Alfalfa, Medicago sativa L. | | | | | | | | | | | | | |

| Chihuahua | v | v | v | v | v | Y | |
|-----------|--------|--------|----------------|----------|----------------------|-------------------------------|---|
| Coahuila | x x | x | x | Λ | Λ | А | |
| Sinaloa | л v | л v | Λ | v | | | |
| Durango | л v | л | | A V | | | |
| Durango | л | | | л | Maíz | Zea mays L | |
| Chihuahua | x | x | x | x | 101u12, | x | |
| Durango | x | | x | x | | | |
| Guerrero | | х | x | | | | Х |
| Sinaloa | х | х | Х | | | | |
| Coahuila | х | | Х | | | | |
| Jalisco | х | | | | | | |
| Zacatecas | х | | | | | | |
| | | | | Cacah | uate, A | rachis hypogea L. | |
| Chihuahua | Х | Х | Х | Х | Х | | |
| | | | | Dura | zno, P | Prunus persica L. | |
| Zacatecas | Х | Х | | Х | Х | X | |
| | _ | | | Mang | до ² , Ма | ingifera indica L. | |
| Sinaloa | Х | Х | Х | | Х | Х | |
| | _ | Jojol | ba, <i>Sir</i> | nmond | sia chi | inensis (Link) C. K. Schneid. | |
| Sonora | Х | | Х | Х | | Х | |
| | | | So | rgo, So | rghum | <i>bicolor</i> (L.) Moench | |
| Coahuila | Х | Х | Х | | | Х | |
| Sinaloa | Х | Х | Х | | | | |
| | | | Caña | de azú | car, Sa | ccharum officinarum L. | |
| Sinaloa | Х | Х | Х | | | | |
| | | | | Vid si | lvestre | e, Vitis vinifera L. | |
| Coahuila | Х | | | | | | Х |
| | | | (| Cilantro | o, Cori | iandrum sativum L. | |
| Guerrero | | Х | | | | Х | |
| | | | | Fríjo | l, Phas | eolus vulgaris L. | |
| Sinaloa | Х | | | | | | |
| Sonora | | | | Х | | | |
| Zacatecas | Х | | | | | | |
| | | | Al | godon | ero, Ga | ossypium hirsutum L. | |
| Chihuahua | | | | | Х | | |
| Coahuila | | | | | | | |
| Sinaloa | | | | | | | |
| | | | Μ | lanzan | o, Mali | us domestica Borkh. | |
| Durango | | | | _ | | Х | |
| | | | | Pepi | no, <i>Cu</i> | cumis sativus L. | |
| Sinaloa | | Х | | | | | |
| | | | Tom | nate, Ly | vcoper. | sicon esculentum Mill. | |

х

¹Tri = *Trichogramma*, Oli = *Oligosita*, Pse = *Pseudoligosita*, Par = *Paracentrobia*, Ufe = *Ufens*, Aph = *Aphelinoidea*, Itt = *Ittys*, Bur = *Burksiella*, Tum = *Tumidiclava*, Lat = *Lathromeris*, Trg = *Trichogrammatella*, Zge = *Zagella*, y Ltr = *Lathromeroidea*. ²Muestras colectadas en maleza adyacente al cultivo.

7.1.2 Especímenes recolectados de huevecillos de insectos huéspedes

La Tabla 8 muestra los géneros obtenidos de huevecillos de insectos plaga de Coahuila, Chihuahua, Sonora, y Tamaulipas. *Trichogramma* fue el más frecuentemente encontrado parasitando huevecillos de lepidópteros, posiblemente de las especies *Helicoverpa. zea, Spodoptera frugiperda, Spodoptera exigua, y Manduca* sp. Las avispitas emergidas de huevecillos de cicadélidos, probablemente de la especie *D. maidis*, pertenecieron al género *Paracentrobia*, el cuál puede ser considerado como un agente potencial para el control biológico de esta plaga. El género *Ufens* emergió de huevecillos de cicadélidos, probablemente de la especie *H. vitripennis*. También, avispitas del género *Haeckeliana* parasitaron huevecillos de cicadélidos, probablemente de la especie *H. vitripennis*. Por el contrario, no se obtuvieron avispitas tricogramátidos de huevecillos de cicadélidos, probablemente de la especie *Eritroneura ziczac* y de huevecillos de lepidópteros, probablemente de la especie *H. brillians* (Ávila *et al.* 2010).

Especímenes de *Buksiella* fueron recolectados de huevecillo de Tettigonidaae en el Río de San Marcos, Cd. Victoria Tamaulipas, México durante el 2007. El cual se describe como nueva especie del género *Burksiella, B. mexicana* sp. nov. Ávila y Myartseva (Ávila *et al.*) (en prensa).

Tabla 8. Géneros de Trichogrammatidae obtenidos de huevecillos de insectos plaga envarias plantas hospedantes de cuatro estados de México, durante 2007 y 2008.

| Planta hospedante | Insecto huésped putativo | Géneros |
|-------------------------|-------------------------------------|---------------|
| | | |
| Maíz | Dalbulus maidis (Hemiptera: | Paracentrobia |
| Zea mays | Cicadellidae) | |
| | Helicoverpa zea (Lepidoptera: | Trichogramma |
| | Noctuidae) | |
| | Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: | Trichogramma |
| | Noctuidae) | |
| Tomate | Manduca sp. (Lepidoptera: | Trichogramma |
| Lycopersicon esculentum | Sphingidae) | |
| | Helicoverpa zea | Trichogramma |
| | Spodoptera exigua | Trichogramma |
| | (Lepidoptera: Noctuidae) | |
| Algodonero | Helicoverpa zea | Trichogramma |
| Gossypium hirsutum | | |
| Jojoba | Homalodisca liturata (Hemiptera: | Ufens |
| Simmondsia chinensis | Cicadellidae) | |
| Trueno | Homalodisca vitripennis | Ufens |
| Ligustrum japonicum | (Hemiptera: Cicadellidae) | Haeckeliana |
| Cítricos | Homalodisca vitripennis | Ufens |
| Citrus spp. | | |

7.1.3 Especímenes de la colección CIBE

Los géneros de tricogramátidos determinados conservados en muestras en alcohol al 70% fueron: Oligosita, Trichogramma, Paracentrobia, Zagella, Aphelininoidea, Ittys, Tumidiclava, Ufens, Chaetostrichia, Haeckeliana, Uscana, Lathromeris, Lathogramma, Brachista, Xipogramma, Pintoa, Mirufens, Soikiella, Chaetogramma, Brachigrammatella, Brachyufens (González-Hernández y Ávila-Rodríguez, 2006).

Del total del número de muestras recolectadas 146, se obtuvieron 1308 especímenes, La mayor abundancia correspondió al género *Oligosita* 788 (40.1%), mientras que *Trichogramma* presento 588 (29.9%) y *Paracentrobia* 236 (12.0%) organismos respectivamente. Del género *Zagella* se obtuvieron 144 especímenes los cuales fuerons determinados mediante caracteres morfológicos a nivel género (González-Hernández y Ávila-Rodríguez, 2006).

Determinación de *Zagella* y *Burksiella* en montajes en laminillas de la colección CIBE. Se revisaron un total de 61 laminillas correspondientes a ambos géneros, se determinaron un total de 39 hembras y 22 machos, 45 laminillas revisadas correspondieron al género *Burksiella* y nueve al género *Zagella* (Apéndice D).

7.2 Determinación y caracterización molecular de los géneros más frecuentes dentro de la familia Tricogramátidae

7.2.1 Géneros analizados por métodos moleculares

Los géneros utilizados fueron seleccionados de acuerdo a su presencia constante en campo siendo: *Trichogramma*, *Oligosita*, *Paracentrobia*, *Pseudoligosita*, *Ufens*, *Ittys*, *Burksiella*, *Zagella* y *Aphelinoidea* (Tabla 9).

| | | | | | Géneros | | | | |
|-----------|-----|-----|-----|-----|---------|-----|-----|-----|-----|
| Estado | Par | Tri | Oli | Ufe | Pse | Bur | Itt | Aph | Zge |
| Sinaloa | | X | | X | | | | | |
| Coahuila | X | х | х | Х | | | | | Х |
| Chihuahua | | | X | | | | | Х | |
| Durango | X | | | | | х | | | Х |
| Guerrero | | | X | Х | х | X | | | Х |
| Sonora | | | x | Х | | Х | | | Х |
| Zacatecas | | X | | | | х | Х | X | |
| Nuevo | | | х | X | | X | | | Х |
| León | | | | | | | | | |
| Jalisco | | | | Х | х | х | Х | Х | Х |
| Hidalgo | | Х | х | | | х | | | |

Tabla 9. Géneros y localidades de Trichogrammatidae analizados en el presente estudio.

Tri= *Trichogramma*, Oli= *Oligosita*, Par= *Paracentrobia*, Pse= *Pseudoligosita*, Ufe= *Ufens*, Bur= *Burksiella*, Itt= *Ittys*, *Zge*=*Zagella*.

7.2.2 Análisis de la región 18S para géneros de Trichogrammatidae

Productos de PCR del gen 18S para géneros

Las Figuras 6 y 7 muestran los resultados de los análisis de la región 18S mediante PCR realizados en dos fechas diferentes (30 de abril y 9 de junio del 2008,

respectivamente) para la determinación y caracterización molecular de géneros de Trichogrammatidae. El tamaño de los fragmentos amplificados por PCR de la región conservada 18S del RNAr observados en geles de agarosa al 1.5%, fue de alrededor de 790 pb nucleotídicas en los diferentes géneros de tricogramátidos: *Oligosita (Oligosita* sp. y *O. sanguinea), Pseudoligosita (P. marilandia), Trichogramma (T. pretiosum), Paracentrobia (Paracentrobia* sp.), *Ittys (Ittys* sp. e *Ittys* nr. *perditix), Burksiella sp.1* y *sp.2 (B. spirita* y *B. mexicana* sp. nov., respectivamente), *Ufens (Ufens* sp.), *Zagella (Z. flavipes)* y *Aphelinoidea (Aphelinoidea* sp., grupo semifuscipennis). Por lo anterior, no existió variación en el tamaño de los fragmentos entre géneros; de manera que este caracter de la región 18S no es útil para la separación a este nivel taxonómico.



Figura 6. Productos obtenidos de la amplificación de la región conservada del gen ribosomal 18S para géneros de la familia Trichogrammatidae. 1) marcador de peso molecular, 2) *Oligosita*, 3) *Burksiella*, 4) *Ittys* y 5) *Aphelinoidea*.



Figura 7. Productos obtenidos de la amplificación de la región conservada del gen ribosomal 18S para géneros de la familia Trichogrammatidae. 1) marcador de peso molecular, 2) *Oligosita*, 3) *Paracentrobia*, 4) *Ufens*, 5) *Trichogramma*, 6) *Pseudoligosita*, 7) *Burksiella*, 8) *Zagella* y 9) *Ittys*.

Alineamiento de las secuencias

Para el alineamiento de las secuencias de la región 18s del DNAr de los géneros de tricogramátidos bajo estudio se seleccionó como grupo externo al afelinido *Eretmocerus eremicus* (Tabla 10). En este cuadro los datos perdidos ("missing") fueron remplazados con un signo de interrogación (?), los gaps insertados en la alineación de las secuencias múltiples se representanpor un guión (-), las secuencias con identidad cercana se representan por un punto (.) y los números indican la posición en las secuencias. Del total de 1028 sitios, se observaron 67 sitios conservados, 958 sitios variables y 608 sitios parsimoniosos. Los porcentajes de las frecuencias de nucleótidos son mostrados para las secuencias alineadas bajo estudio. Puede observarse que el

nucleótido G fue el menos abundante en la región conservada 18S con un promedio de 22% en Tricográmatidos, esto puede ser atribuido a habilidad de la guanina para hacer par con la citosina y el uracil en las molécula de ARN (Tabla 11).

Las secuencias de la región 18S de tricogramátidos y la secuencia del grupo externo *E. eremicus* fueron útiles para realizar una matriz de similitud y estimar la divergencia entre las secuencias, los resultados fueron basados en el análisis de "pairwise" y fue conducido usando el modelo de Máxima Probabilidad Compuesta, donde todos los "gaps" y datos perdidos fueron eliminados de la base de datos, siendo un total de 382 posiciones. Los valores de similitud entre las secuencias de nucleótidos mostraron variación entre géneros, desde 0.03 hasta 2.13. Los géneros con valores de similitud más bajos y por consecuencia más cercanos genéticamente son: *Ittys y Paracentrobia* (0.03), *Ittys y Trichogramma* (0.03), y *Paracentrobia y Trichogramma* (0.04). Por el contrario, los géneros con valores de similitud más altos y por lo tanto más distantes genéticamente son: *Burksiella y Ufens* (1.70), *Burksiella y Trichogramma* (1.71), *Zagella* y Pseudoligosita (1.85), y *Burksiella y Pseudoligosita* (2.13) (Cuadro 12).

Tabla 10. Comparación y alineamiento de secuencias de la región 18S de géneros de Trichogrammatidae.

| 1 | [| 111111111122222222233333333444444444455555556666666666 |
|----|---------------------------|--|
| 2 | Γ | 1234567890012345678900123456789000000000000000000000000000000000000 |
| 3 | Zagella_flavipes | CCAGTGTACCAACATAAAATCTT-TAACGAGGACCCATTGGAGGG-CAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAA |
| 4 | Oligosita sp. | -TTCAGGCTATC.T.GCGAC.T.T.ATG.GA |
| 5 | Paracentrobia | TTGGGA.C.C.AG.TCCTGATA.TGA.TTTC.CA |
| 6 | Trichogramma_pretiosum | |
| 7 | Burksiella_spirita | |
| 8 | Pseudoligosita_marilandia | TTTT.GCACT.TG.TC.CC.GACCA.T.A |
| 9 | Ufens_sp. | -TTTCAG.TGCTCCGCGCTGA.CTTG.G.CA |
| 10 | Burksiella_mexicana | GCTAAAT.TA.GTTTATGGGAA.GC.GAT.AAGTTA.AA.A.ATGA.GAGCTTTATAAG. |
| 11 | Ittys_sp. | CA.GCA.G |
| 12 | Eretmocerus_eremicus | TGTTG.GGT.AA.AAGCTCGT.GT.GAATCTGT.T.TCA.GC.GTCG.TTCATC.CTC.CGATGTTT.A.T.ACA.G. |
| 13 | | |
| 14 | 1 | 111111111111111111111111111111111111111 |
| 15 | 1 | 78888888889999999999999000000000111111111 |
| 16 | 1 | 90123456789001234567890012345678900123456789000000000000000000000000000000000000 |
| 17 | Zagella_flavipes | TTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTTGCGGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATCTGTGTGCCACGC-TGTCGGT |
| 18 | Oligosita_sp. | |
| 19 | Paracentrobia | |
| 20 | Trichogramma_pretiosum | |
| 21 | Burksiella_spirita | |
| 22 | Pseudoligosita_marilandia | |
| 23 | Ufens_sp. | |
| 24 | Burksiella_mexicana | .CAATAGGAGC.A.AATAGAC.CC.AAAT.TT.AG.T.AT.G.AA.G.AACAAG.A.T-ATCG.A. |
| 25 | Ittys_sp. | |
| 26 | Eretmocerus_eremicus | GTGAGA.GTCCTA.CGG.GGGCTTAGCTCCAAGGGGGCGGT.CAACTAA.A[TCC.ATC.C.GTG.T.T.CATC.A |

| 27 | | |
|----------|---------------------------|--|
| 28 |][| 111111111111111111111111111111111111111 |
| 29 |][| 5556666666666677777777788888888889999999990000000001111111111 |
| 30 | 1 | 789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234 |
| 31 | Zagella_flavipes | TCATCGCTCGCGATGTTTAACTGACATGATTGTGGGAC-GTCCTACCGGTG-GGCTTAGCTCCTTCCCGGGGGGGG |
| 32 | Oligosita_sp. | |
| 33 | Paracentrobia | |
| 34 | Trichogramma_pretiosum | TCTTAC |
| 35 | Burksiella_spirita | CCAGGTG.T.CCA-A.TAAGCA |
| 36 | Pseudoligosita_marilandia | A |
| 37 | Ufens_sp. | |
| 38 | Burksiella_mexicana | AAG.GTGATAAA.AAG.AG.GT.GAA.TC.A-A.TAAGCACCAGGTG.T.CCCT |
| 39 | Ittys_sp. | |
| 40 | Eretmocerus_eremicus | GTGAGGTG.GCCGGCG.TTAC.TTGAACAAATTA.AGTGCT.AAA.CA.GCTG.T.GC.TGAATACT.T.T |
| 41 | | |
| 42 | | 222222222222222222222222222222222222222 |
| 43 | .[| 333334444444444455555555555566666666666 |
| 44 | .[| 567890123456789001234567890012345678900123456789000000000000000000000000000000000000 |
| 45 | Zagella_flavipes | CCCACTTAAATTCCCT-TCCCGGGGGTTCTAAATCAATGGCCAAGGGGGGCCCGG-ACCTTTACCTTGAAACAATTAA |
| 46 | Oligosita_sp. | GTAAGCT.CTCG.GT.T.GTTGTCAG |
| 47 | Paracentrobia | TGCTAAGCT.C.A.TCG.GT.T.GTTGTCA.GT |
| 48 | Trichogramma_pretiosum | GCTAAGCT.CTCG.GT.T.GT |
| 49 | Burksiella_spirita | TGTCA.TTCCTTTA-AGTTTCA.C.T.GC.A.CACTTCCCAACAAA.GGGTCCCGGGCTG |
| 50 | Pseudoligosita_marilandia | |
| 51 | Ufens_sp. | TGCTAAGCT.CTTGC.G.GT.T.GTTGTCAG |
| 52 | Burksiella_mexicana | TGTCA.TTCCTTTA-AGTTTCA.C.T.GC.A.CACTTCCCAACAAA.GGGTCCCGGGCTG |
| 53 | Ittys_sp. | TGCTAAGCT.CTTG.GT.T.GTT.TTGTCAG |
| 54 55 | Eretmocerus eremicus | G.AIGGA.T.A.GGAATAGGACCICGGI.CTTITGITTITTCAACC.AGGTAA.GAT.AAT.GGG.CAG. |
| 56 |][| 333333333333333333333333333333333333333 |
| 57 | _E | 1111111222222222333333334444444445555555555 |
| 58 | _T | 3456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890 |
| 59 | Zagella_flavipes | AATGGTTCAAAGCAGGTTTGGTC-CCCCTAATTATTT-TTGGCTGGAAATATGGAATTAGAACCCCGGTCCAA |
| 60 | Oligosita_sp. | .GCC.ACT.TGG.AAGTATGAT.G.AGTT. |
| 61 | Paracentrobia | .G.TCTAT.ATGG.ACGTATGAT.G.ACGTT.T. |
| 62 | Trichogramma_pretiosum | .GCC.ATTGG.AA.GGTATGAT.G.AGTT. |
| 63 | Burksiella spirita | CCCCCGAGTCATCAGGAACTT.GG.GGCGC.AGCATCGTTGGTAGCGGT. |
| 64 | Pseudoligosita marilandia | .GAAACTC.TGA.CA.AA.AGATAG.ACC.CCG.AA.TATCCATCTACTA.GATTTAATCT. |
| 65 | Ufens sp. | .GCC.ATTGG.AAGTATGAT.G.AGTT. |
| 66 | Burksiella mexicana | CCCCCGAGTCATCAGGAACTT.GG.GGCGC.AGCATCGTTGGTAGCGGT. |
| 67 | Ittys sp. | .G C |
| 68 | Fretmocerus eremicus | TEG GECA GT TTEC ACETTAGAGETEA C GEA C TC CAAG CEGACAG AGC AG ATT G C |
| 69 | | |
| 70 | r | 222222222222222222222222222222222222222 |
| 70 | - | 000000000000000000000000000000000000000 |
| /1 | | 333333333333333333333333333333333333333 |
| 72 | 1 | 1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678 |
| 73 | Zagella_flavipes | TTTGGTGGGTTTCCGAACCCCCAAGGAATGGTTTA-TTAGGAACGAAGGGGGGGCTTCCGTTTGGC |
| 74 | Oligosita_sp. | TTTG.AGT.AT.AAGAG.TA.TA.T |
| 75 | Paracentrobia | TTTG.ATT.AT.AAGA-+G.TA.TA.T |
| 76 | Trichogramma_pretiosum | TTTG.AGT.AT.AAGAG.TA.TA.T |
| 77 | Burksiella_spirita | .CA.CCC.TT.TCTTTC.TTC.T.AA.GAAATTTTTGGCAAATTCCTG |
| 78 | Pseudoligosita marilandia | .GCCA.T.AAAAC.GTAT.GGAA.TGAGGA.ATGGTCG.GA.GATT.TCTCTTAAACA.T.CAG |
| 79 | Ufens_sp. | TTT.AG.AGT.AT.AAGAG.TA.T.A.A.T |
| 80 | Burksiella mexicana | .ca.ccc.tt.tctttc.ttc.t.aa.gaaatttttggcaaattcctg |
| 81 | Ittys sp. | TTTG.AGT.AT.AAGAG.TA.TA.T |
| 82 | Eretmocerus eremicus | AAAATGTTTTCA AATC GAA. G AGTTA . AGG. TCGAAGGCG. TC. GATACCGCCCTA. TTCTAA . A . AAACG |
| | | |

| 83 | | |
|-----|---------------------------|---|
| 84 | 1 | 4444444444444444444444444444444444455555 |
| 85 | ļ[| 67777777778888888888999999999999900000000 |
| 86 | 1 | 90123456789001234567890012345678900123456789001234567890012345678900123456789001234567890012345678900123456789001234567890012345678900123456789001234567890012345678900123456789001234567890012345678900123456789000000000000000000000000000000000000 |
| 87 | Zagella_flavipes | ACCGTTGAAGG-GAAATTCTTGGAACCTCCCCAGAACGAACAAAACCAAAACCTTTGGCCAAAATGGTTTCCTT |
| 88 | Oligosita_sp. | GAAGCATT.GTAGGT.GGATTATT |
| 89 | Paracentrobia | GAA.AGCATT.GT.GAGGGGGGATATT.A. |
| 90 | Trichogramma_pretiosum | GAAGTATT.GT.GAGGG.GGATATT.A. |
| 91 | Burksiella_spirita | TCTTGCACGC.AA.A.TTTCATCTTCGCTA.GTGCCCCCATTCC.TA. |
| 92 | Pseudoligosita_marilandia | GAAACAAGCCCGATCC.CC.TA.TA.CAAC.T.TG.G.GATG.C.TTA.GGC.CCCA.CC |
| 93 | Ufens_sp. | CAAGTATT.GA.AAGG |
| 94 | Burksiella_mexicana | TCTTGCACGC.AA.A.TTTCATCTTCGCTA.GTGCCCCCATTCC.TA. |
| 95 | Ittys_sp. | GAAGTATT.GT.GAGG |
| 96 | Eretmocerus_eremicus | .TGCCA.CTA.CTCCG.CGAAGTT.CTG.TGTCGGCGGG.AGCTTGGGAAACCAAAGCTT.T.GG.T.CG |
| 97 | | |
| 98 | _C | 55555555555555555555555555555555555555 |
| 99 | J. | 44455555555556666666666666777777777788888888 |
| 100 | ,C | 7890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345 |
| 101 | Zagella_flavipes | TATTCAGAACCAAAGGTTGAAGGTCCAAAGGCAACAAAATCCCGCCTTATTCCTAACCTTA-ACCAAGGC-CGCT |
| 102 | Oligosita_sp. | AAG.AAAGTAG.TC.GACG.T |
| 103 | Paracentrobia | AAG.A.GAAGT.GG.TC.GACG.T |
| 104 | Trichogramma_pretiosum | AAG.A.GAAGT.GG.TC.GACG.T |
| 105 | Burksiella_spirita | ATTTCGG.TC.GACAGAAGAGGTT.CATTATT.C.TA.ATG |
| 106 | Pseudoligosita_marilandia | C.AC.CACTAAGCCTAA.ACCTATC.T.C.ATTGTTTC.A-A.AA.GCA.CTTGATAT.TA.AAAAC |
| 107 | Ufens_sp. | ACG.AT.ACTC.GAGTGC.TG.TCTGACG.GTA.TTCC.TAG. |
| 108 | Burksiella_mexicana | ATTTCGG.TC.GACAGAAGAGGTT.CATTATT.C.TA.ATA |
| 109 | Ittys_sp. | AAG.A.GAAGT.GG.TC.GACG.T |
| 110 | Eretmocerus_eremicus | GGGGAT.TGGTT.CAAAGCTGAAA.TTA.GTTG.CGGAA.GGCACCA.AGGAG.GGAGC.TGCTTAA. |
| 111 | | |
| 112 | [t | 666666666666666666666666666666666666666 |
| 113 | t . | 22222333333333444444444445555555556666666666 |
| 114 | C C | 5678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123 |
| 115 | Zagella_flavipes | TAGGATTCCCCCAAATTCCTTCCAATAATT-CGCCGGGAAGTTCCCGGAAAACCAAACTTTTGGGGTTCC |
| 116 | Oligosita_sp. | AC-TGGT.CGC.CAAGTA-TC.TGGA.C.TTAC |
| 117 | Paracentrobia | CC.GTG.TACGG.CGCC.TG. |
| 118 | Trichogramma_pretiosum | CC.GGG.T.CGG.CGCC.TG. |
| 119 | Burksiella_spirita | TTCAGGCGAA.AT.GCCTGC.TTG.GC.C.CTAATTTAAA.TGT.CCGGCCCACCTC.ACA.T |
| 120 | Pseudoligosita_marilandia | CGCTAA.ACTTATAA-T.A.AACTGC.GGAA.T.TAT.CTTGA.GA.TAA.AAC.AA |
| 121 | Ufens_sp. | .C.TTC.T.GGG.T.CCG.C.T.TG.TT.TCTTAC.TTG. |
| 122 | Burksiella_mexicana | TTCAGGCGAA.AT.GCCTGC.TTG.GC.C.CTAATTTAAA.TGT.CCGGCCCATCTC.ACA.T |
| 123 | Ittys_sp. | CC.GGG.T.CGG.CGCC.TG. |
| 124 | Eretmocerus_eremicus | .T.ACTCAA.A |
| 125 | | |
| 126 | [C | ן <i>הרהההההההההההההה</i> הההה <mark>הההההה</mark> ההההההההההה |
| 127 | [L | 00000011111111122222222223333333334444444444 |
| 128 | .[L | 3456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890] |
| 129 | Zagella_flavipes | GGGGAAAGTAGGTTGGCAAAGTGAAACCTTAAAGGAATGAACGAAAGGCACCCCCCAGAATG-GAAGCC |
| 130 | Oligosita_sp. | C.G.A-TTATCCTTTTCGATT.CCTC.T.G-C.GTGATTC.GG.A |
| 131 | Paracentrobia | GTATCAGCCATTGCAGAACTGG |
| 132 | Trichogramma_pretiosum | GTATCAGCA |
| 133 | Burksiella_spirita | CTGA.CACCGCG.TG.G.TAT.AGCTGCCGCCCCGTGAGGCT.AGACCGG.AGC.T. |
| 134 | Pseudoligosita_marilandia | TA.AACACTCTTTCCG.CATGAA.GCACATCTT.TT.GC.TCATATT.CT.ATT.GA.G |
| 135 | Ufens_sp. | AGT.AGTT.T.ACTATTGC.TAGTG.AT.CGGCA.TTTTT.TT.T. |
| 136 | Burksiella_mexicana | CTGA.CACCGCG.TG.G.TAT.AGCTCCGCCCCGAAGCT.AGACCGG.AGC.T. |
| 137 | Ittys_sp. | GTATCAGCAATGG-AGAAGGG |
| 138 | Eretmocerus eremicus | |

| 139 | 1 | | |
|--|--|--|--|
| 140 | 1 | 777777777777777777888888888888888888888 | 888888888888888888888888888888888888888 |
| 141 | | 888888889999999999900000000011111111122222222233333 | 3333344444444445555555555 |
| 142 | ·* | 123456789012345678901234567890123456789012345678901234 | 5678901234567890123456781 |
| 143 | Zagella flavines | TCCGGTTTATTTGACTCAAACCAAC?CCATT?TGCCCCCATTTCTAAATATAT | ACAAGAATACACCTATAAACATTC |
| 144 | Oligosita sp | TTCTC AT CTC TTC CATT GCCG TATA TAAC CTGT AT | |
| 145 | Daracentrobia | G TC A- CT CTC C TATG CCTGT_TAA ACT GAG | |
| 146 | Trichogramma proticgum | G C A- CA- CA- | 11.100.160CO.C.AI |
| 147 | Purkaiella apirita | C ACAN C TO CA TTAN C T COCAC CA CAN CACACCO COCACACA | CATTO CTACCACO TTTT AC |
| 140 | Decideligenite merilendie | ANTTON C A CTC C ATC CATACCALCTATAC ANA CCC A A | GAIICCIACGAGC.IIII.AC. |
| 140 | Pseudoligosita_marilandia | AATICAA.GICC.AIC.GATAGGAAGITTAG.AAA.CGGA.A | II.IC.CAL.IIC.GCI.I.ACA |
| 149 | urens_sp. | .IGIICAAI.CICICCAGAITAGGCI.II.AGI.CIC.GAIG | CIGCIACIIGICIAIC |
| 150 | Burksiella_mexicana | C.ACAA.C.TG.CA.T.AA.CGCGAG.GA.GAA.GACAGCG.GGCACACA | GATTCCTACGAGC.TTTT.AC. |
| 151 | Ittys_sp. | .GCACTCA | |
| 152 | Eretmocerus_eremicus | | |
| 153 | | | |
| 154 | <u>,</u> [| 888888888888888888888888888888888888888 | 9999999999999999999999999999 |
| 155 | ,C | 56666666666777777777888888888889999999999 | 11111112222222223333333] |
| 156 | _C | 901234567890123456789012345678901234567890123456789012 | 345678901234567890123456] |
| 157 | Zagella_flavipes | TACATTTCGTCTCTTCATATATCTTGCTATCCCATCACCCCACCTTCTTACATG | CAGATTCAGTTTACCCTTTTACCC |
| 158 | Oligosita_sp. | T.ACGAA.G.C.GC.TCCTT.CTA.TTGAA.TGT | T.TTA.TCACAC.AATA.G.GA.A |
| 159 | Paracentrobia | .CA.ACAGG.TA.TTGTT-CAA.G.TT.CAT | .CCTA.TCAAACTTGA.C.ATA |
| 160 | Trichogramma_pretiosum | | |
| 161 | Burksiella_spirita | GCA.CAACT.TAATCGCTA.TGG.G.TGGAATTAG.GGCTGCTGGCA | .CAGACTT.CCCTAA.GGGT |
| 162 | Pseudoligosita marilandia | T.AA.ATAATC.CTATACATTAG.T.GAGAATC.CA.GC | A.ACA.T.CC.AGTACACAT |
| 163 | Ufens sp. | .TAGGATGTGCT.CGTTT-CTTTTAT.TAA.GGC.TT | TTATA.TCTCCAT.AGTT. |
| 164 | Burksiella mexicana | GCA.CAACT.TAATCGCTA.TGG.G.TGGAATTAG.GGCTGCTGGCA | .CAGACTTCCTAC.GGGT |
| 165 | Ittvs sp. | | |
| | | | |
| 166 | Eretmocerus eremicus | | |
| 166 167 | Eretmocerus_eremicus | | |
| 166 167 168 | Eretmocerus_eremicus | | 11111111111111111 |
| 166 167 168 169 | Eretmocerus_eremicus [[[| 999999999999999999999999999999999999999 | 111111111111111 99999999990000000000000 |
| 166 167 168 169 170 | Eretmocerus_eremicus [[[| 99999999999999999999999999999999999999 | 111111111111111 99999999900000000000000 |
| 166 167 168 169 170 171 | Eretmocerus_eremicus [[[[[| 99999999999999999999999999999999999999 | 111111111111111 99999999900000000000000 |
| 166 167 168 169 170 171 172 | Eretmocerus_eremicus [[[[Zagella_flavipes | 99999999999999999999999999999999999999 | 111111111111111 99999999900000000000000 |
| 166 167 168 169 170 171 172 173 | Eretmocerus_eremicus [[[[Zagella_flavipes Oligosita_sp. | 99999999999999999999999999999999999999 | 11111111111111 999999999900000000000000 |
| 166 167 168 169 170 171 172 173 174 | Eretmocerus_eremicus [[[Zagella_flavipes Oligosita_sp. Paracentrobia | 99999999999999999999999999999999999999 | 11111111111111 999999999000000000000000 |
| 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 | Eretmocerus_eremicus [[[[Zagella_flavipes Oligosita_sp. Faracentrobia Trichogramma_pretiosum Burkaiella_apirita | 99999999999999999999999999999999999999 | 11111111111111 999999999000000000000000 |
| 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 | Eretmocerus_eremicus [[[Zagella_flavipes Oligosita_sp. Faracentrobia Trichogramma_pretiosum Burksiella_spirita Pseudoligosita_marilandia | 99999999999999999999999999999999999999 | 11111111111111 999999999000000000000000 |
| 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 | Eretmocerus_eremicus [[[Zagella_flavipes Oligosita_sp. Faracentrobia Trichogramma_pretiosum Burksiella_spirita Pseudoligosita_marilandia Ufens sp. | 99999999999999999999999999999999999999 | 11111111111111 999999999000000000000000 |
| 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 | Eretmocerus_eremicus [[[Zagella_flavipes Oligosita_sp. Paracentrobia Trichogramma_pretiosum Burksiella_spirita Pseudoligosita_marilandia Ufens_sp. Burksiella_mexicana | 99999999999999999999999999999999999999 | 11111111111111 999999999000000000000000 |
| 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 | Eretmocerus_eremicus [[[Zagella_flavipes Oligosita_sp. Paracentrobia Trichogramma_pretiosum Burksiella_spirita Pseudoligosita_marilandia Ufens_sp. Burksiella_mexicana Ittys_sp. | 99999999999999999999999999999999999999 | 11111111111111 999999999000000000000000 |
| 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 | Eretmocerus_eremicus [[[Zagella_flavipes Oligosita_sp. Faracentrobia Trichogramma_pretiosum Burksiella_spirita Pseudoligosita_marilandia Ufens_sp. Burksiella_mexicana Ittys_sp. Eretmocerus_eremicus | 99999999999999999999999999999999999999 | 11111111111111 999999999000000000000000 |
| 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 | Eretmocerus_eremicus [[[Zagella_flavipes Oligosita_sp. Paracentrobia Trichogramma_pretiosum Burksiella_spirita Pseudoligosita_marilandia Ufens_sp. Burksiella_mexicana Ittys_sp. Eretmocerus_eremicus | 99999999999999999999999999999999999999 | 11111111111111 999999999000000000000000 |
| 1666 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 | Eretmocerus_eremicus [[[Zagella_flavipes Oligosita_sp. Faracentrobia Trichogramma_pretiosum Burksiella_spirita Pseudoligosita_marilandia Ufens_sp. Burksiella_mexicana Ittys_sp. Eretmocerus_eremicus [| 99999999999999999999999999999999999999 | 11111111111111 999999999900000000000000 |
| 1666 1677 1688 1699 1700 1711 1722 1733 1744 1755 1766 1777 1788 1799 1800 1811 1822 1833 1844 | Eretmocerus_eremicus [[[Zagella_flavipes Oligosita_sp. Faracentrobia Trichogramma_pretiosum Burksiella_spirita Pseudoligosita_marilandia Ufens_sp. Burksiella_mexicana Ittys_sp. Eretmocerus_eremicus [[| 99999999999999999999999999999999999999 | 11111111111111 999999999000000000000000 |
| 1666 1677 168 1699 1700 1711 172 173 174 175 176 1777 178 179 1800 1811 1822 1833 184 | Eretmocerus_eremicus [[[Zagella_flavipes Oligosita_sp. Paracentrobia Trichogramma_pretiosum Burksiella_spirita Pseudoligosita_marilandia Ufens_sp. Burksiella_mexicana Ittys_sp. Eretmocerus_eremicus [[[| 99999999999999999999999999999999999999 | 11111111111111 999999999000000000000000 |
| 1666 1677 168 1699 1700 1711 1722 173 174 1755 1766 1777 178 1799 1800 1811 1822 1833 1844 1855 1866 1877 | Eretmocerus_eremicus [[[[Zagella_flavipes Oligosita_sp. Faracentrobia Trichogramma_pretiosum Burksiella_spirita Pseudoligosita_marilandia Ufens_sp. Burksiella_mexicana Ittys_sp. Eretmocerus_eremicus [[[[Zagella_flavipes | 99999999999999999999999999999999999999 | 11111111111111 999999999000000000000000 |
| 1666 1677 168 1699 1700 1711 1722 1733 174 1755 1766 1777 178 1799 1800 1811 1822 1833 1844 1855 1866 1877 188 | <pre>Fretmocerus_eremicus [[[[Zagella_flavipes Oligosita_sp. Faracentrobia Trichogramma_pretiosum Burksiella_spirita Pseudoligosita_marilandia Ufens_sp. Burksiella_mexicana Ittys_sp. Eretmocerus_eremicus [[[Zagella_flavipes Oligosita_sp.</pre> | 99999999999999999999999999999999999999 | 11111111111111 999999999000000000000000 |
| 1666 1677 168 1699 1700 1711 1722 173 174 1755 1766 1777 178 1799 1800 1811 1822 1833 1844 1855 1866 1877 1888 1899 | Eretmocerus_eremicus [[[[Zagella_flavipes Oligosita_sp. Faracentrobia Trichogramma_pretiosum Burksiella_spirita Pseudoligosita_marilandia Ufens_sp. Burksiella_mexicana Ittys_sp. Eretmocerus_eremicus [[[[[[[[[[[[[[[[[[[| 99999999999999999999999999999999999999 | 11111111111111 999999999000000000000000 |
| 1666 1677 168 1699 1700 1711 1722 1733 174 1755 1766 1777 178 1799 1800 1811 1822 1833 1844 1855 1866 1877 1888 1899 1900 | Eretmocerus_eremicus [[[[Zagella_flavipes Oligosita_sp. Faracentrobia Trichogramma_pretiosum Burksiella_spirita Pseudoligosita_marilandia Ufens_sp. Burksiella_mexicana Ittys_sp. Eretmocerus_eremicus [[[[Zagella_flavipes Oligosita_sp. Paracentrobia Trichogramma_pretiosum | 99999999999999999999999999999999999999 | 11111111111111 999999999000000000000000 |
| 1666 1677 168 1699 1700 1711 1722 173 174 1755 1766 1777 178 1799 1800 1811 1822 1833 1844 1855 1866 1878 1889 1990 1911 | <pre>Fretmocerus_eremicus [[[[Zagella_flavipes Oligosita_sp. Faracentrobia Trichogramma_pretiosum Burksiella_spirita Fseudoligosita_marilandia Ufens_sp. Burksiella_mexicana Ittys_sp. Eretmocerus_eremicus [[[[[[[[[[[[[[[[[[[</pre> | 99999999999999999999999999999999999999 | 11111111111111 999999999900000000000000 |
| 1666 1677 168 1699 1700 1711 1722 1733 174 1755 1766 1777 178 1799 1800 1811 1822 1833 1844 1855 1866 1877 1888 1899 1901 1912 | <pre>Fretmocerus_eremicus [[[[Zagella_flavipes Oligosita_sp. Faracentrobia Trichogramma_pretiosum Burksiella_spirita Pseudoligosita_marilandia Ufens_sp. Burksiella_mexicana Ittys_sp. Eretmocerus_eremicus [[[[[[[[[[[[[[[[[[[</pre> | 99999999999999999999999999999999999999 | 1111111111111 9999999990000000000000000 |
| 1666 1677 168 1699 1700 1711 1722 173 174 1755 1767 1778 1779 1800 1811 1822 1833 1844 1855 1864 1877 1888 1899 1910 1912 1932 | <pre>Fretmocerus_eremicus [[[[Zagella_flavipes Oligosita_sp. Faracentrobia Trichogramma_pretiosum Burksiella_spirita Pseudoligosita_marilandia Ufens_sp. Burksiella_mexicana Ittys_sp. Eretmocerus_eremicus [[[[[[[[[[[[[[[[[[[</pre> | 99999999999999999999999999999999999999 | 11111111111111 999999999000000000000000 |
| 1666 1677 1688 1699 1700 1711 1722 1733 1744 1755 1766 1877 1778 1879 1800 1811 1822 1833 1844 1855 1866 1877 1888 1899 1901 1912 1933 1944 | <pre>Fretmocerus_eremicus [[[[[[[[[[[[[[[[[[[</pre> | 99999999999999999999999999999999999999 | 11111111111111 999999999000000000000000 |
| 1666 1677 168 1699 1700 1711 1722 1733 174 1755 1766 1777 178 1799 1800 1811 1822 1833 1844 1855 1866 1878 1889 1900 1911 1922 1933 1944 | <pre>Fretmocerus_eremicus [[[[[[[[[[[[[[[[[[[</pre> | 99999999999999999999999999999999999999 | 11111111111111 999999999000000000000000 |

| Géneros | | % de ba | ses nucleotídio | cas | |
|-----------------|------|---------|-----------------|------|-------|
| | T/U | С | Α | G | Total |
| Zagella | 27.0 | 25.1 | 27.6 | 20.3 | 929.0 |
| Oligosita | 31.1 | 23.7 | 24.3 | 20.9 | 946.0 |
| Paracentrobia | 30.3 | 21.9 | 26.2 | 21.5 | 957.0 |
| Trichogramma | 25.4 | 20.9 | 25.9 | 27.8 | 717.0 |
| Peudoligosita | 25.4 | 23.4 | 34.2 | 17.1 | 997.0 |
| Ufens | 34.6 | 21.9 | 22.0 | 21.6 | 969.0 |
| Burksiella sp.1 | 25.6 | 27.9 | 24.7 | 21.9 | 718.0 |
| Burksiella sp.2 | 25.1 | 23.8 | 29.1 | 22.0 | 912.0 |
| Ittys | 26.0 | 21.1 | 25.0 | 27.8 | 715.0 |
| Promedio | 28.0 | 23.3 | 26.7 | 22.0 | 873.3 |

Tabla 11. Porcentajes de las frecuencias de nucleótidos de las secuencias de la región18S de géneros de Trichogrammatidae.

Cuaro 12. Matriz de similitud para estimar la divergencia evolutiva entre secuencias de la región 18S de Trichogrammatidae.

| | Zag | Oli | Par | Tri | <i>B. sp1</i> | Pse | Ufe | B.sp2 | Itt | E. ere |
|-----------------|------|------|------|------|---------------|------|------|-------|------|--------|
| Zagella | * | 0.48 | 0.49 | 0.47 | 1.69 | 1.85 | 0.56 | 1.69 | 0.48 | 2.62 |
| Oligosita | 0.48 | * | 0.09 | 0.06 | 1.69 | 1.63 | 0.10 | 1.69 | 0.07 | 2.55 |
| Paracentrobia | 0.49 | 0.09 | * | 0.04 | 1.69 | 1.65 | 0.11 | 1.69 | 0.03 | 2.55 |
| Trichogramma | 0.47 | 0.06 | 0.04 | * | 1.71 | 1.63 | 0.10 | 1.71 | 0.03 | 2.56 |
| Burksiella sp.1 | 1.69 | 1.69 | 1.69 | 1.71 | * | 2.13 | 1.70 | 0.02 | 1.63 | 2.70 |
| Pseudoligosita | 1.85 | 1.63 | 1.65 | 1.63 | 2.13 | * | 1.65 | 2.13 | 1.61 | 2.70 |
| Ufens | 0.56 | 0.10 | 0.11 | 0.10 | 1.70 | 1.65 | * | 1.70 | 0.09 | 2.64 |
| Burksiella sp.2 | 1.69 | 1.69 | 1.69 | 1.71 | 0.02 | 2.13 | 1.70 | * | 1.63 | 2.70 |
| Ittys | 0.48 | 0.07 | 0.03 | 0.03 | 1.63 | 1.61 | 0.09 | 1.63 | * | 2.51 |
| E. eremicus | 2.62 | 2.55 | 2.55 | 2.56 | 2.70 | 2.70 | 2.64 | 2.70 | 2.51 | * |

Análisis filogenético de secuencias

Las secuencias obtenidas de la región 18s fueron comparadas con las secuencias encontradas en el Genbank para esta región. Las secuencias para los géneros bajo estudio Oligosita, Peudoligosita (P. marilandia), Trichogramma, Paracentrobia, Ittys, Ufens, Burksiella (B. spirita vs. Z. spirita y B. mexicana vs. Ufens benefica), Zagella (Z. flavipes) fueron similares en un 98 y 99% a las secuencias reportadas en el Genbank para los mismos géneros. La secuencia del género Burksiella obtenida en el presente estudio fue similar en un 96% con la secuencia reportada en el Genbank para la especie Zagella spirita, la cual actualmente está clasificada como Burksiella spirita. La secuencia del presente estudio fue similar en un 99% a la secuencia fue similar en un 99% a la secuencia fue similar en un 99% a la secuencia here portada en el Genbank para la secuencia reportada en el Genbank para L. benefica, la cual actualmente está clasificada como B. benéfica (Pinto 2006).

El análisis filogenético de las secuencia de géneros se realizó mediante el método UPGMA, basado en distancias, y el método de Máxima Parsimonia (MP), basado en caracteres.

La historia evolutiva inferida por el método de distancias UPGMA (Fig.8) determinó que el árbol óptimo presentó la suma de las longitudes de las ramas (LR) = 4.7. El porcentaje de las replicas de los árboles en el cual se asociaron los taxa fue mediante una prueba de bootstrap (1000 replicas) y se muestran en cada uno de los nodos; así como los valores de la longitud de las ramas. La distancia evolutiva fue llevada a cabo bajo el modelo de Máxima Probabilidad Compuesta, todas las posiciones que contenían gaps y datos pérdidos fueron eliminados de la base de datos. Se tuvieron un total de 382 posiciones de las secuencias. El cladograma generado a partir de análisis UPGMA muestra las relaciones de distancia evolutiva entre géneros de tricogramátidos. La primera rama muestra que evolutivamente el género *Burksiella* fue el primero en divergir con una distancia genética de 0.8743. En la segunda rama se encuenra el taxón

Pseudoligosita con una distancia genética de 0.8357, observándose que tomó una línea evolutiva distinta. En una tercera rama la cual esta subdivida en dos ramas principales teniendo a *Zagella* como el grupo que primero divergió con una distancia de 0.2476, seguido del clado formado por *Ufens*, *Oligosita*, *Paracentrobia*, *Ittys* y *Trichogramma*, siendo dentro de ellos los taxa *Ittys* y *Trichograma* los de más reciente divergencia.

La filogenia inferida mediante el método basado en caracteres de MP (Fig. 9) mostró que el árbol más parsimonioso tuvo una LR de 739, un índice de consistencia (CI) de 0.812, un índice de retención (IR) de 0.766 y un índice compuesto (IC) de 0.655 (0.622) para todos los sitios y sitios parsimoniosos informativo (en paréntesis). Todas las posiciones que contienen gaps y datos perdidos fueron excluidos de la base de datos. Del total de 382 posiciones, 250 fueron sitios informativos parsimoniosos. Los porcentajes de replica de los árboles los cuales asocian a los taxa en una prueba de bootstrap (1000 replicas) son mostradas en las ramas, donde la mayoría de los clados reciben valores de bootstrap arriba del 50%. El cladograma muestra que *Paracentrobia* e *Ittys*, son los taxa más cercanos y de divergencia reciente, con valores de bootstrap de 78%. Estos dos géneros también se encuentran estrechamente relacionados formando un clado con el género *Trichogramma*. El género *Zagella* aunque forma una línea evolutiva separada, se encuentra más relacionado a *Ufens* que al resto de géneros. Los géneros *Burksiella* y *Pseudoligosita* son evolutivamente más antiguos y distantes.



Figura 8. Árbol consenso UPGMA para los géneros de Trichogrammatidae, región conservada 18S. Los valores bootstrap para 1000 replicas son mostrados en las ramas.



Figura 9. Árbol consenso Máxima Parsimonia para los géneros de Trichogrammatidae, región conservada 18S. Los valores bootstrap para 1000 replicas son mostrados en las ramas.

7.2.3 Análisis de la región ITS2 para géneros de Trichogrammatidae

Productos de PCR del gen ITS2 para géneros

La región hipervariable intergénica ITS2 mostró variación en el tamaño de los productos de PCR en los diferentes géneros en dos análisis realizados en fechas diferentes (30 de abril y 9 de junio del 2010). Los tamaños de los fragmentos fueron los siguientes en el primer análisis: *Oligosita* 460pb, *Pseudoligosita* 450pb, *Paracentrobia* 590pb, *Ittys* 680pb, *Ufens* 690pb, *Burksiella* 550pb, *Zagella* 700pb y *Trichogramma* 520pb (Fig. 10). En la Figura 11 se muestran los productos amplificados de la región ITS2 por PCR para géneros de Trichogrammatidae, en el segundo análisis. Los tamaños de los fragmentos fueron los siguientes: *Oligosita* 510pb, *Burksiella* 640pb, *Ittys* 680pb y *Aphelinoidea* 690pb.

Esta región fue de gran utilidad para determinar los principales géneros de Trichogrammatidae presentes en México, ya que la variación mostrada en el tamaño de los fragmentos amplificados por PCR entre los géneros es suficiente para distinguir a los insectos a este nivel taxonómico. Sin embargo, en el caso de *Oligosita* y *Burksiella* se observa un rango significativo en el tamaño de los fragmentos. En el caso de *Burksiella* se observa un traslape en los valores de los tamaños de fragmentos (550 y 640 pb) con el del género *Paracentrobia* (590 pb).



Figura 10. Productos obtenidos de la amplificación de la región hipervariable intergénica ITS2 del ADNr. 1) marcador de peso molecular, 2) *Oligosita*, 3) *Pseudoligosita*, 4), *Paracentrobia*, 5) *Ittys*, 6) *Ufens*, 7) *Burksiella*, 8) *Zagella* y 9) *Trichogramma*.



Figura 11. Productos obtenidos de la amplificación de la región hipervariable intergénica ITS2 del ADNr. 1) marcador de peso molecular, 2) *Oligosita*, 3) *Burksiella*, 4) *Ittys* y 5) *Aphelinoidea*.

Alineamiento de las secuencias

Para el alineamiento de las secuencias de la región ITS2 del DNAr de los géneros de tricogramátidos bajo estudio, se seleccionó como grupo externo al afelínido *Aphelinus varipes* (Tabla 13). Del total de 761 sitios, se observaron 47 sitios conservados, 691 sitios variables y 662 sitios parsimoniosos. Los porcentajes de las frecuencias de nucleótidos se muestran para las secuencias alineadas bajo estudio, observándose que los nucleótidos C y G fueron los menos abundantes en la región ITS2, con un promedio de 23.1 y 23.5%, respectivamente (Tabla 14).

Tabla 13. Comparación y alineamiento de secuencias de la región ITS2 de géneros de Trichogrammatidae.

| 1 | [| 1111111112222222223333333344444444445555555555 |
|----|-------------------|--|
| 2 | [| 12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012 <mark>3456789012345678</mark> 9 |
| 3 | Ittys | cagaactcgcaccacgaaatccgtattca-ttcccggacc-cgc |
| 4 | T. pretiosium | AACGA.TC.GA.GGCGCAGCTCG |
| 5 | 0sanguinea | CTGTTAAT |
| 6 | Ufens | G.CCGAACCCG.GAAAAAG.CCGAA. |
| 7 | B. mexicana | ATAA |
| 8 | Aphelinoidea | AA.GGTGA |
| 9 | Oligosita | A.GAGAGAATACGCGTTAT |
| 10 | Pseudoligosita | GCAGAGA.AACG.A.A.GTAT |
| 11 | Paracentrobia | GGAGA.AGAA.AAGG.CGCTA |
| 12 | Zflavipes | AAGGTTCTCGAACAGATTGCTGTTTGTGGGACATTTCG.ATTGGTCCAGTAA |
| 13 | Aphelinus_varipes | TGTGAACAGCAGGACACATGAACATCGACCGAGTCCCTGAG.T.TTGCG.GCGGACCGG.CGAAA.TATTG.C.TG |
| 14 | | |
| 15 | [| 111111111111111111111111111111111111111 |
| 16 | [| 7888888888999999999990000000001111111111 |
| 17 | [| 9012345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567 |
| 18 | Ittys | CTG-GCTGAGGGTCGTACATAAACACCCCATAAGGGGCTTTTTGATCGAG?CGCTCTTGCAGCGGCCCC |
| 19 | Tpretiosium | |
| 20 | 0sanguinea | |
| 21 | Ufens | |
| 22 | Bmexicana | TTTATA.CCACTGCGTCGAAATATAGAGAACGAA.ACCTGTT.GT |
| 23 | Aphelinoidea | AA.A |
| 24 | Oligosita | |
| 25 | Pseudoligosita | |
| 26 | Paracentrobia | |
| 27 | Zflavipes | |
| 28 | Aphelinus_varipes | TAAC.TCTCA.AATA.A.TCGA.TCGCAA.AGAAAGAGATTAAAAAAAT.CCCAT.GACT.T.CAAATT |
| 29 | | |

| 30 | .[| 111111111111111111111111111111111111111 |
|----|-----------------------|--|
| 31 | 1 | 5556666666666677777777778888888888899999999 |
| 32 | [| 7890123456789012048678901204867890120486789012048678901204867890010000000000000000000000000000000000 |
| 33 | Ittys T protiogium | CLARAGAGCGARIGACIGAGCICICGICGACGGGGGGGGGGGGGGGGG |
| 35 | O sanguinea | G (C C LCT TTTTT C C CTCT TCTTT T = 1 LGGL GG LG C = T L |
| 36 | Ufens | G.T.TGTTCC.TCCTAGTATAA.AAA.AAAC.GT.C.T.TG.CT.TTTCT |
| 37 | B. mexicana | .G.T.TGTTCC.TCCTAGTATAAAAA.AA.ACGT.C.T.TG.CT.TTTCT |
| 38 | Aphelinoidea | TACG.A |
| 39 | Oligosita | .G.GCACGCTT.TA.T.TGA.A.TA.GCGT |
| 40 | Pseudoligosita | .G |
| 41 | Paracentrobia | GCG.TACACTACTTCT |
| 42 | Zflavipes | .G.T.TGTTCCTCCTAGTATAAAAA.AA.ACGT.C.T.TG.CT.TTTCT |
| 43 | Aphelinus_varipes | A.TTT.C.TCTTTAG.T.C.TGTGTGTGCGAAA.AAATT.CATTAT.GCGACGACCACAGGCGAGACTA.CC. |
| 44 | | |
| 40 | - | 222222222222222222222222222222222222222 |
| 47 | - | 56789012345678900123456789000000000000000000000000000000000000 |
| 48 | Ittvs | GTA-GCTTGCAATAACGCAATAACGCAATCA-ATCTTGTATTGAACG-CGTATGTTT-TGCTTGTGTGTGTGAAAGCTA |
| 49 | T. pretiosium | CC.CACG.AA.GCA.GA.AAG.TGAAGCG.TCGTCTG.CTG.CGCGCGCT.ACCGCTTGGAGAG |
| 50 | 0. sanguinea | .GCA |
| 51 | Ufens | .GG-T.GA.TGGCTGT.A.G.CGATAG-GCG.C.CTATAAT.CCGT.GCTCCT.GACAC.GGCTTT.GC. |
| 52 | Bmexicana | .GG-T.GA.TGGCTGT.A.G.CGATAG-GCG.C.CTATAAT.CCGT.GCTCCT.GACAC.GGCTTT.GC. |
| 53 | Aphelinoidea | |
| 54 | Oligosita | |
| 55 | Pseudoligosita | AA.GTCGAGCCG.GACGA.AG.GTGTAGTGTAGGGTC.TC.AGAG.CGC |
| 56 | Paracentrobia | General Control and Control and Control and Control Co |
| 50 | Aphelipus varines | C AAT AAGCAT |
| 59 | Apherinas_varipes | |
| | | |
| 60 | - | 333333333333333333333333333333333333333 |
| 61 | .L | 111111122222222233333333344444444445555555555 |
| 62 | 1 | 345678901234567890012345678900123456789000000000000000000000000000000000000 |
| 63 | Ittys | AA-AGATCGACGTGGGCATCATTGTTATATGGATGAGCCGTTGAAAGAGCAACTTTFGTTGCT |
| 64 | Tpretiosium | T.CTC.CGTGTAAAAGCGCGAAC.TCCCGTT.TGC.TTCTCCCGG.GCCTCGCCTCG.CGAA |
| 65 | <pre>0sanguinea</pre> | CCGA.GCCTTG.A.CCCCCTTG.A.CCCC.A.TC |
| 66 | Ufens | .GTCAAC.AGTC.CGGGGCTC.CTTTT.AAA.T.T.AAGGATATCG-AAAG |
| 67 | B. mexicana | .GTCAAC.AGTC.CGGGGCTC.CTTTT.AAA.T.T.AAGGATATCG-AAAG |
| 68 | Aphelinoidea | C |
| 69 | Oligosita | C.CGAAGT.CCG-AC |
| 70 | Pseudoligosita | TTTTT. TT. AACGCG.AATGCC.T. CGAGCGAGCGCCTTG. ACGCACCGA.AA |
| 71 | Paracentrohia | G_C TGT _ A CT TG TTGGC C C CTC CGAA A TT A TTTTG GAG C CAGTC A |
| 72 | 7 flavines | GTC NA C A C TC CCC CCTTC CAR TA ANTI ANTITA |
| 72 | 2 | .010AAC.AB10.000.00010.01111.AAA.1.1.AABBA1A100-AAAB |
| 73 | Aphelinus_varipes | |
| 74 | | |
| 75 | _[| 333333344444444444444444444444444444444 |
| 76 |][| 999999999000000000111111111222222223333333334444444444 |
| 77 |][| 1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456789 |
| 78 | Ittys | GTCGGTCGTGCATCTAAAGCGTCGCACCTTCT-GCGCGCGACGACCTA-TCGCATACGCGGGTTG-ATTTCGAGTCCC |
| 79 | T. pretiosium | .CG.ACACTGAGT.CACGATGGCGTC.AT.ATTGTAC.C.A.AGC.CGCGCGCCTCTATAT |
| 80 | 0. sanguinea | CCT.AG.TCTAG.T.TTCTTTGTCA.GA.GAAGACG.GC.T.GGCGTC.CGAT.CAGG.T.A.G. |
| 81 | Ufens | CCGT.C.AAAG.GA.G.TAT.CTT.GCTG-TAC.A.TTG.GT.GTCGA.TCCCT.A.CTC.ATTGA.T.TGA |
| 82 | B. mexicana | CCGT. C. AAAG. GA. G. TAT. C TT. GCTG-TAC. A. TTG. GT. GTCCA. TCCCT. A. CTC. ATT GA. T. TGA |
| 83 | Aphelinoidea | |
| 84 | Oligosita | CCA & T T TTGT ANA T GT _ A A C C C GT TT G REAT CC CT TTT |
| 04 | Decide la contra | CUA.A., 1, 1.1101.AAAA, 1.01A. A.AU.U0.01.11.0 BOAL0501.111 |
| 85 | rseudorigosita | ICAA.CIIC.AGC.IGAGC.III.C.C.A.AAG.G.GGACA.GCGCI.ACGCICG.A.T.TCG.T. |
| 86 | Paracentrobia | C.CTG.AGGC.TT.GCT.TCGCGT.CG.AATC.TG.GC |
| 87 | Zflavipes | CCGT.C.AAAG.GA.G.TAT.CTT.GCTG-TAC.A.TTG.GT.GTCGA.TCCCT.A.CTC.ATTGA.T.TGA |
| 88 | Aphelinus_varipes | |
| 89 | | |

| 90 | ſ | 444444444444444444444444444444444555555 |
|---|---|--|
| 91 | 1 | 677777777888888888888999999999999900000000 |
| 92 | .* | 90123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567 |
| 93 | Ittvs | TGATCTTGATATCC-TATTCTTGTGATTGAAA-AGTCGATCGTTCGTATATTTCCTATGTGCTGCTGAACTCAGTTTA |
| 94 | T. pretiosium | ATAA.ATC.GGGATC.CGC.C.ACC.CCAAGAG.TTTT.CGC.CGA.CA.CTCAGA.CG.GAGACAC. |
| 95 | 0. sanguinea | .TT. AAC.C., -G. A.T. G. C. GC.CG.TG A.T ATACAA.TATTT. C. A.TTGAGACGAC |
| 96 | Ufene | COGRECE T GTLC GG GTGTGGRIT GC IT TCG G IL C C C GL CL ITG I GT TTC C |
| 07 | B mevicana | COGRECCITIES CONTRACTOR CONTRACTO |
| 0.0 | Inhelinoidea | G T_ TC T T GANA _ GGA CG CG CC AC T CTG G TC TGG TACCA |
| 00 | Apherinoidea | TT C G CN GCCCG T CCCGTTT T NCG GNNCN GATGN GACCAC |
| 100 | Daoudoligoaita | CONTRACT CALL A T TOTOCICS CONTA CALCAL AND CALCAL |
| 100 | Davagentrobia | COSTARATIONAL, A.T. IGAICGACCICCICA., CA.GCACAGACAMA |
| 101 | 7 flowings | |
| 102 | 2 | GUBBACCI.GIA.C.GB.GIGIGUBA.I.GC.AI.ICG.G.AA.C.C.CGA.CA.AIG.A.GI.IIICC |
| 103 | Aphellinus_varipes | |
| 104 | | |
| 105 | .L. | 333333333333333333333333333333333333333 |
| 106 | | 444555555566666666666666666666666666666 |
| 107 | .[| 7890123456789001234567890012345678900123456789000000000000000000000000000000000000 |
| 108 | Ittys | GTCAAGCGATCCTTGTGATCACATTGGTCTTTCTATGGTCTGTACACTTACGATTGGTGATGTAAT-CTCGACTACCT |
| 109 | Tpretiosium | TT.A-TT.ATCCTCT.CATTTATGAGCCATAA.T.TACAA.TTAT.CA.CCCCAC.CTATTCA.C.TA |
| 110 | 0sanguinea | CGAGAACA |
| 111 | Ufens | C.TCTTT.TTTATT.TTTTTAAAGAAAA.AA.GA.T.TAAAGTTTAAAAGA.CCTC.TT.ATTGA |
| 112 | Bmexicana | C.TTT.TTT.TTTATT.TTTTTAAAAAAAAA.AA.GA.T.TAAA.TTTAAAA.A.CCTC.CTTATTGA |
| 113 | Aphelinoidea | AA.G.AAAGGG.AAT.GGCCAAC.CACGT.A.CTC.GAG.CCCA.AA.ATA |
| 114 | Oligosita | CGACGG.GC.AC.CA.A |
| 115 | Pseudoligosita | |
| 116 | Paracentrobia | CG.TGCGCG.AAG.TGC-ACCGCGAA.GAT.TTCT.A.TC.ACCC |
| 117 | Zflavipes | C.TTT.TTT.TTTATT.TTTTTAAAGAAAA.AA.GA.T.TAAAGTTTAAAAGACCTC.TTTATTGA |
| 118 | Aphelinus_varipes | |
| 119 | | |
| | | |
| 119 | | |
| 119 120 121 | L T | 66666666666666666666666666666666666666 |
| 119 120 121 122 | .C. .C. | 66666666666666666666666666666666666666 |
| 119 120 121 122 123 | [[[Ittvs | 66666666666666666666666666666666666666 |
| 119 120 121 122 123 124 | [[[Ittys T. pretiosium | 66666666666666666666666666666666666666 |
| 119 120 121 122 123 124 125 | [[[T. pretiosium O. sanguinea | 66666666666666666666666666666666666666 |
| 119 120 121 122 123 124 125 126 | [[[Ittys Tpretiosium Osanguinea Ufens | 66666666666666666666666666666666666666 |
| 119 120 121 122 123 124 125 126 127 | [[[Ittys Tpretiosium Osanguinea Ufens Bmexicana | 66666666666666666666666666666666666666 |
| 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 | [[Ittys Tpretiosium Osanguinea Ufens Bmexicana Aphelinoidea | 66666666666666666666666666666666666666 |
| 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 | [[Ittys Tpretiosium Osanguinea Ufens Bmexicana Aphelinoidea Oligosita | 66666666666666666666666666666666666666 |
| 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 | [[Ittys Tpretiosium Osanguinea Ufens Bmexicana Aphelinoidea Oligosita Pseudoligosita | 66666666666666666666666666666666666666 |
| 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 | [[Ittys Tpretiosium Osanguinea Ufens Bmexicana Aphelinoidea Oligosita Pseudoligosita Paracentrobia | 66666666666666666666666666666666666666 |
| 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 | [[[Tpretiosium Osanguinea Ufens Bmexicana Aphelinoidea Oligosita Pseudoligosita Paracentrobia Zflavipes | 66666666666666666666666666666666666666 |
| 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 | [[[[ttys Tpretiosium Osanguinea Ufens Bmexicana Aphelinoidea Oligosita Pseudoligosita Pseudoligosita Paracentrobia Zflavipes Aphelinus_varipes | 666666666666666666666666666666666666 |
| 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 | [[[[tttys Tpretiosium Osanguinea Ufens Bmexicana Aphelinoidea Oligosita Pseudoligosita Pseudoligosita Paracentrobia Zflavipes Aphelinus_varipes | 666666666666666666666666666666666666 |
| 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 | [[[[] T. pretiosium Osanguinea Ufens Bmexicana Aphelinoidea Oligosita Pseudoligosita Pseudoligosita Paracentrobia Zflavipes Aphelinus_varipes [, | 666666666666666666666666666666666666 |
| II9 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 135 | [[[[] Tpretiosium Osanguinea Ufens Bmexicana Aphelinoidea Oligosita Pseudoligosita Paracentrobia Zflavipes Aphelinus_varipes [[[| 666666666666666666666666666666666666 |
| II9 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 | [[[Ittys Tpretiosium Osanguinea Ufens Bmexicana Aphelinoidea Oligosita Pseudoligosita Paracentrobia Zflavipes Aphelinus_varipes [[[[| 666666666666666666666666666666666666 |
| 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 | [[Ittys Tpretiosium Osanguinea Ufens Bmexicana Aphelinoidea Oligosita Pseudoligosita Paracentrobia Zflavipes Aphelinus_varipes [[Ittys T. pretiosium | 666666666666666666666666666666666666 |
| 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 | [[Ittys Tpretiosium Osanguinea Ufens Bmexicana Aphelinoidea Oligosita Paracentrobia 2flavipes Aphelinus_varipes [[Ittys Tpretiosium Osanguinea | 666666666666666666666666666666666666 |
| II9 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 | [[Ittys Tpretiosium Osanguinea Ufens Bmexicana Aphelinoidea Oligosita Paracentrobia Zflavipes Aphelinus_varipes [[Ittys Tpretiosium Osanguinea Ufens | 666666666666666666666666666666666666 |
| II9 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 | [[Ittys Tpretiosium Osanguinea Ufens Bmexicana Aphelinoidea Oligosita Paracentrobia Zflavipes Aphelinus_varipes [[Ittys Tpretiosium Osanguinea Ufens B. mexicana | 666666666666666666666666666666666666 |
| II9 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 | [[Ittys Tpretiosium Osanguinea Ufens Bmexicana Aphelinoidea Oligosita Pseudoligosita Paracentrobia Zflavipes Aphelinus_varipes [Ittys Tpretiosium Osanguinea Ufens Bmexicana Aphelinoidea | 666666666666666666666666666666666666 |
| II9 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 | [[Lttys Tpretiosium Osanguinea Ufens Bmexicana Aphelinoidea Oligosita Pseudoligosita Paracentrobia Zflavipes Aphelinus_varipes [L Lttys Tpretiosium Osanguinea Ufens Bmexicana Aphelinoidea Oligosita | 666666666666666666666666666666666666 |
| II9 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 | [[[[[[]]]]]]]]]]] []]]]]]]]]]]]] | 66666666666666666666666666666666666666 |
| II9 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 | [[[[[[]]]]]]]]]]]]] | 666666666666666666666666666666666666 |
| IIF 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 | [[[[[[[[[[[[[[[[[[[| 666666666666666666666666666666666666 |
| Géneros | % de bases nucleotídicas | | | | | | | | |
|----------------|--------------------------|------|------|------|-------|--|--|--|--|
| | T/U | С | A | G | Total | | | | |
| Ittys | 29.4 | 23.0 | 25.0 | 22.7 | 653.0 | | | | |
| Trichiogramma | 27.9 | 27.5 | 25.0 | 19.7 | 692.0 | | | | |
| Oligosita | 26.8 | 25.0 | 21.2 | 27.0 | 444.0 | | | | |
| Ufens | 32.3 | 20.5 | 26.5 | 20.7 | 702.0 | | | | |
| Burksiella | 32.5 | 20.0 | 26.9 | 20.7 | 610.0 | | | | |
| Aphelinoidea | 24.7 | 23.5 | 26.3 | 25.6 | 571.0 | | | | |
| Oligosita | 26.2 | 23.0 | 26.0 | 24.8 | 439.0 | | | | |
| Pseudoligosita | 22.8 | 23.8 | 26.6 | 26.8 | 421.0 | | | | |
| Paracentrobia | 24.9 | 25.8 | 21.8 | 27.5 | 523.0 | | | | |
| Zagella | 32.4 | 19.9 | 24.3 | 23.5 | 639.0 | | | | |
| Promedio | 28.4 | 23.1 | 25.0 | 23.5 | 569.4 | | | | |

Tabla 14. Porcentajes de las frecuencias de nucleótidos de las secuencias ITS2 de géneros de Trichogrammatidae.

Las secuencias de la región ITS2 de tricogramátidos y la secuencia del grupo externo fueron útiles para realizar una matriz de similitud y estimar la divergencia entre las secuencias. Los resultados fueron basados en el análisis de "pairwise" y fue conducido usando el modelo de Máxima Probabilidad Compuesta, donde todos los "gaps" y datos perdidos fueron eliminados de la base de datos, por lo que se tuvieron un total de 126 posiciones. Los valores de similitud entre las secuencias de nucleótidos de tricogramátidos mostraron una gran variación, desde 0.01 hasta 5.64. Los géneros que presentaron valores más bajos de similitud fueron *Zagella* y *Ufens* (0.01), *Zagella* y *Burksiella* (0.02) y *Burksiella* y *Ufens* (0.03); mientras que los géneros con valores más altos de similitud fueron *Burksiella* e *Ittys* (5.64), *Zagella* e *Ittys* (5.62) y *Ufens* e *Ittys* (5.59) (Tabla15).

| | Itt | Tri | Oli sp1 | Ufe | Bur | Aph | Oli sp2 | Pse | Par | Zag | A. var |
|----------------|--------|--------|---------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|
| Ittys | * | 5.35 | 4.42 | 5.59 | 5.64 | 2.16 | 4.15 | 4.61 | 3.01 | 5.62 | 146.40 |
| Trichogramma | 5.35 | * | 3.60 | 4.82 | 5.04 | 5.17 | 3.85 | 3.38 | 4.98 | 4.84 | 139.80 |
| Oligosita sp1 | 4.42 | 3.60 | * | 3.73 | 3.90 | 3.85 | 0.34 | 1.88 | 3.89 | 3.73 | 151.63 |
| Ufens | 5.59 | 4.82 | 3.73 | * | 0.03 | 5.41 | 3.68 | 3.60 | 5.12 | 0.01 | 151.42 |
| Burksiella | 5.64 | 5.04 | 3.90 | 0.03 | * | 5.22 | 3.86 | 3.77 | 5.34 | 0.02 | 151.20 |
| Aphelinoidea | 2.16 | 5.17 | 3.85 | 5.41 | 5.22 | * | 3.61 | 4.12 | 2.69 | 5.41 | 149.85 |
| Oligosita sp2 | 4.15 | 3.85 | 0.34 | 3.68 | 3.86 | 3.61 | * | 2.14 | 3.47 | 3.68 | 152.35 |
| Pseudoligosita | 4.61 | 3.38 | 1.88 | 3.60 | 3.77 | 4.12 | 2.14 | * | 4.29 | 3.60 | 147.11 |
| Paracentrobia | 3.01 | 4.98 | 3.89 | 5.12 | 5.34 | 2.69 | 3.47 | 4.29 | * | 5.12 | 146.81 |
| Zagella | 5.62 | 4.84 | 3.73 | 0.01 | 0.02 | 5.41 | 3.68 | 3.60 | 5.12 | * | 151.42 |
| A. varipes | 146.40 | 139.80 | 151.63 | 151.42 | 151.20 | 149.85 | 152.35 | 147.11 | 146.81 | 151.42 | * |

Tabla 15. Matriz de similitud para estimar la divergencia evolutiva entre secuencias de la región ITS2 de Trichogrammatidae.

Análisis filogenético de secuencias

Las secuencias obtenidas de la región ITS2 no pudieron ser comparadas con las secuencias en el Genbank para esta región, excepto para la secuencia del género *Aphelinoidea* la cual tuvo un 98% con la secuencia del mismo género reportada en el Genbank. El análisis filogenético se realizó con los métodos UPGMA y de MP.

La historia evolutiva inferida por el método UPGMA (Fig.12), basado en distancias, produjo un árbol óptimo, el cual mostró la suma de longitud de las ramas (LR) = 158.702. El porcentaje de las replicas de los árboles en el cual se asociaron los taxa se basó en una prueba de bootstrap (1000 replicas), cuyos valores obtenidos se

muestran en los nodos; así como la longitud de las ramas. La distancia evolutiva fue llevada a cabo bajo el modelo de Máxima Probabilidad Compuesta. Todas las posiciones que contenían "gaps" y datos pérdidos fueron excluidos de la base de datos. Por lo anterior, se tuvieron un total de 126 posiciones de las secuencias. El cladograma generado a partir del análisis con el método UPGMA muestra las relaciones de distancia evolutiva entre géneros de tricogramátidos. Se observaron dos ramas principales, la primera rama muestra que evolutivamente los clados para los taxa *Aphelinoidea, Ittys* y *Paracentrobia* fueron los segundos en divergir con una distancia genética de 0.8743, sin embargo el clado formado por *Aphelinoidea* e *Ittys* forman un clado de reciente aparición dentro de grupo. La segunda rama principal esta subdividida por dos ramas secundarias, la primera subrama y con una distancia genética más antigua está formada por las taxa *Oligosita, Pseudoligosita* y *Trichogramma*, donde *Oligosita* es el grupo de distancia evolutiva más reciente; la segunda subrama la componen *Burksiella, Zagella* y *Ufens*, siendo los dos últimos taxa los de más reciente divergencia.

La relación evolutiva inferida mediante el método de MP (Fig. 13), basado en caracteres nucleotídicos, mostró que el árbol más parsimonioso tuvo una LR de 264, el CI fue de 0.713, el IR fue de 0.651 y el IC fue de 0.505 (0.464) para todos los sitios y sitios parsimoniosos informativo (en paréntesis). Todas las posiciones que contenían "gaps" y datos perdidos fueron excluidos de la base de datos. Del total de 126 posiciones, 74 fueron sitios informativos parsimoniosos. Los valores de bootstrap (1000 replicas) son mostradas en los nodos, observándose que en la mayoría de los clados estuvieron por arriba del 50%. El cladograma muestra tres ramas principales, la primera está formada por los taxa *Ittys, Aphelinoidea y Paracentrobia*, siendo el clado formado por *Ittys y Aphelinoidea* los de divergencia más reciente con un valor de bootstrap de 82%, la segunda rama la componen el género *Oligosita*, siendo este taxón de reciente aparición con valor de bootstrap de 73%; el taxón *Pseudoligosita* esta relacionado con las dos ramas anteriores descritas, siendo de estas dos el taxón más antiguo evolutivamente. La tercera rama esta integrada por los taxa *Ufens, Burksiella y Zagella*

con un valor de bootstrap de 99%, y finalmente el género *Trichograma* se observó como el grupo evolutivamente más antiguo de todas los taxa bajo estudio.



Figura 12. Árbol consenso UPGMA para los géneros de Trichogrammatidae, región hipervariable ITS2. Los valores de bootstrap para 1000 replicas son mostrados en los nodos y los de distancia genética se muestran en las ramas.



Figura 13. Árbol consenso de MP para los géneros de Trichogrammatidae región ITS2. Los valores de bootstrap para 1000 replicas se muestran en los nodos.

7.2.4 Comparación de caracteres y filogenias de géneros de Trichogrammatidae entre marcadores y técnicas moleculares

La Tabla 16 muestra la comparación de resultados del caracter longitud de fragmentos amplificados por PCR para los marcadores moleculares 18S e ITS2 del ADN ribosomal para diferentes géneros de Trichogrammatidae. Se puede observar que este caracter o criterio de determinación molecular, obtenido mediante el análisis de PCR del gen ITS2, mostró una variación significativa entre géneros y por lo tanto es de gran utilidad a este nivel taxonómico. Por el contrario, dicho caracter, obtenido mediante el análisis de PCR del gen 18S, no mostró variación entre géneros y por lo tanto no es de relevancia para la caracterización de tricogramátidos. De acuerdo con estos resultados, *Zagella* presentó el mayor tamaño de fragmentos del gen ITS2 (700 pb), por lo que se separa claramente del resto de taxa; mientras que *Burksiella* presentó un rango de tamaños de fragmentos (550-640 pb), traslapándose con el género *Paracentrobia* (590 pb), pero separándose del resto de tricogramátidos.

La Tabla 17 muestra la comparación de valores de similitud de secuencias génicas de los genes 18S e ITS2 para géneros de Trichogrammatidae. Puede observarse que existe una importante variación en dichos valores entre géneros para ambos genes; sin embargo, las relaciones de similitud entre pares de géneros no coinciden para los genes 18S e ITS2. Al respecto, las secuencias del gen 18S más similares fueron: *Ittys-Paracentrobia* (0.03), *Ittys-Trichogramma* (0.03) y *Paracentrobia-Trichogramma* (0.04). En el caso del gen ITS2, las secuencias más similares fueron: *Zagella-Ufens* (0.01), *Zagella-Burksiella* (0.02) y *Burksiella-Ufens* (0.03).

La Tabla 18 muestra un resumen de los resultados de los análisis filogenéticos de secuencias génicas para los genes 18S e ITS2 con el método UPGMA, basado en distancias, y el método MP, basado en el alineamiento múltiple de las secuencias. Puede

observarse que las filogenias inferidas son similares entre métodos de búsqueda de árboles, pero significativamente diferentes entre regiones o marcadores moleculares.

| | Regiones | | | | |
|----------------|----------|---------|--|--|--|
| Género | 188 | ITS2 | | | |
| Ittys | 790 | 680 | | | |
| Paracentrobia | 790 | 590 | | | |
| Aphelinoidea | 790 | 690 | | | |
| Burksiella | 790 | 550-640 | | | |
| Zagella | 790 | 700 | | | |
| Ufens | 790 | 690 | | | |
| Oligosita | 790 | 460-510 | | | |
| Pseudoligosita | 790 | 450 | | | |
| Trichogramma | 790 | 520 | | | |

Tabla 16. Comparación de la longitud de los fragmentos amplificados por PCR de las regiones 18S e ITS2 del ADNr de géneros de tricogramátidos.

Tabla 17. Comparación de valores de similitud de las secuencias génicas de las regiones18S e ITS2 del ADNr de géneros de tricogramátidos.

| | Regiones | | | | |
|------------------------------|------------------|-------------------|--|--|--|
| Género | 18S ¹ | ITS2 ² | | | |
| Ittys-Paracentrobia | 0.03 | 3.01 | | | |
| Ittys-Trichogramma | 0.03 | 5.35 | | | |
| Paracentrobia-Trichogramma | 0.04 | 4.98 | | | |
| Oligosita-Trichogramma | 0.06 | 3.60 | | | |
| Ittys-Oligosita | 0.07 | 4.42 | | | |
| Ittys-Ufens | 0.09 | 5.59 | | | |
| Paracentrobia-Oligosita | 0.09 | 3.89 | | | |
| Ufens-Oligosita | 0.10 | 3.73 | | | |
| Ufens-Trichogramma | 0.10 | 4.82 | | | |
| Paracentrobia-Ufens | 0.11 | 5.12 | | | |
| Zagella-Trichogramma | 0.47 | 4.84 | | | |
| Ittys-Zagella | 0.48 | 5.62 | | | |
| Zagella-Oligosita | 0.48 | 3.73 | | | |
| Paracentrobia-Zagella | 0.49 | 5.12 | | | |
| Zagella-Ufens | 0.56 | 0.01 | | | |
| Ittys-Pseudoligosita | 1.61 | 4.61 | | | |
| Ittys-Burksiella | 1.63 | 5.64 | | | |
| Oligosita-Pseudoligosita | 1.63 | 1.88 | | | |
| Pseudoligosita-Trichogramma | 1.63 | 3.38 | | | |
| Paracentrobia-Pseudoligosita | 1.65 | 4.29 | | | |
| Ufens-Pseudoligosita | 1.65 | 3.60 | | | |
| Burksiella-Zagella | 1.69 | 0.02 | | | |
| Paracentrobia-Burksiella | 169 | 5.34 | | | |
| Burksiella-Oligosita | 1.69 | 3.90 | | | |
| Burksiella-Ufens | 1.70 | 0.03 | | | |
| Burksiella-Trichogramma | 1.71 | 5.04 | | | |
| Zagella-Pseudoligosita | 1.85 | 3.60 | | | |
| Burksiella-Pseudoligosita | 2.13 | 3.77 | | | |

¹E. eremicus 2.51-2.70. ²A. varipe 139.8-152.35

Tabla 18. Comparación de resultados de análisis filogenéticos de las secuencias génicas de las regiones ITS2 y 18S de ADNr mediante los métodos UPGMA y MP para géneros de tricogramátidos (Figs. 8, 9, 12 y 13).

| | | | | | | Relaciones filogenéticas |
|--------|----------|-------|------|------|------|-------------------------------------|
| Región | Método | LR | CI | IR | IC | |
| | UPGMA | 4.7 | - | - | - | Géneros más cercanos: Ittys, |
| 18S | (Fig.8) | | | | | Paracentrobia y Trichogramma. |
| | | | | | | Zagella es más cercana a Ufens |
| | | | | | | Burksiella es más cercana a Zagella |
| | | | | | | Burksiella y Zagella son distantes |
| | MP | 739 | 0.81 | 0.76 | 0.65 | Géneros más cercanos: Ittys, |
| | (Fig.9) | | | | | Paracentrobia y Trichogramma |
| | | | | | | Zagella es más cercana a Ufens |
| | | | | | | Burksiella es más cercana a Zagella |
| | | | | | | Burksiella y Zagella son distantes |
| | UPGMA | 158.7 | - | - | - | Géneros más cercanos: Zagella, |
| ITS2 | (Fig.12) | | | | | Ufens y Burksiella |
| | | | | | | Zagella es más cercana a Ufens |
| | | | | | | Burksiella es más cercana a Zagella |
| | | | | | | Burksiella y Zagella son cercanas |
| | MP | 264 | 0.71 | 0.65 | 0.50 | Géneros más cercanos: Zagella, |
| | (Fig.13) | | | | | Burksiella y Ufens |
| | | | | | | Zagella es más cercana a Burksiella |
| | | | | | | Burksiella es más cercana a Zagella |
| | | | | | | Burksiella y Zagella son hermanas |

7.3 Determinación y caracterización molecular de las especies de *Burksiella* y Zagella

Las especies analizadas en fueron *B. spirita, B. dianae, B. mexicana*, y del género *Zagella, Z. flavipes;* los cuales procedían de siete estados del país, *Burksiella*: Coahuila, Guerrero, Tamaulipas, Nuevo León, Jalisco e Hidalgo; *Zagella*: Nuevo León, Jalisco y Guerrero.

7.3.1 Análisis de la región 18S para especies de Burksiella y Zagella

Productos de PCR del gen 18S para especies de Burksiella y Zagella

El tamaño de los fragmentos amplificados por PCR de la región conservada 18S del ADNr de las especies de los géneros de *Zagella* y *Burksiella*, fueron visualizados en geles de agarosa al 1.5%. La longitud de los fragmentos amplificados en todas las especies fue de 700 pares de bases nucleotídicas (Fig. 14). Estos resultados indican que no existió variación en los tamaños de los fragmentos de este gen amplificados por PCR, por lo que no es posible la separación de las especies, de manera que este carácter molecular no es útil para la identificación de especies de *Zagella* y *Burksiella*.



Figura 14. Productos obtenidos de la amplificación de la región conservada 18S del ADNr, 1) marcador de peso molecular, 2) *Burksiella spirita* 3) *B. dianae*, 4) *B. mexicana* 5) *Zagella flavipes*.

Alineamiento de las secuencias

Para el alineamiento de las secuencias de la región 18S del DNAr de especies de *Zagella y Burksiella* bajo estudio se seleccionó como grupo externo al tricogramátido *Paracentrobia* (Tabla 19). Del total de 987 sitios, se observaron 187 sitios conservados, 778 sitios variables y 38 sitios parsimoniosos. Los porcentajes de las frecuencias de nucleótidos son mostrados para las secuencias alineadas bajo estudio, observándose que el nucleótido C fue el menos abundante en la región conservada 18S con un promedio de 22.6 (Tabla 20).

Tabla 19. Comparación y alineamiento de secuencias de la región 18s de especies deZagella y Burksiella.

| 1 | | |
|----|----------------------------|--|
| 2 | ίC | 1111111112222222223333333344444444445555555556666666666 |
| 3 | ίτ – | 12345678900123456789001234567890012345678900123456789001234567890012345678900123456789001234567890012345678900123456789001234567890012345678900123456789001234567890012345678900123456789001234567890012345678900123456789000000000000000000000000000000000000 |
| 4 | Bspirita | Agtctttgcgtggaccagtctaacaatcacaaagtcttttgcgtggacccagtggagg |
| 5 | B. mexicana | TCT.GAAA |
| 6 | B. dianae | TAACGATACGGGACTCATCCGAGGCCCC.T.ATCGGTG.GTCTTTATCAAA |
| 7 | Z. flavipes | AAAA |
| 8 | Paracentrobia | ?TTGGGATCTCCAGATCCAATGATTTA.TGT.GATCACTCG.GGACAAGTCTGG.GCCAACA.CCG.GGTAATTCC |
| 9 | | |
| 10 | ίC | 111111111111111111111111111111111111111 |
| 11 | ίτ – | 7888888888999999999999000000001111111111 |
| 12 | ίτ – | 901234567890012345678900123456789001234567890012345678900123456789000000000000000000000000000000000000 |
| 13 | B. spirita | a-caagtctggtgccagcagccgcgtaattccagctccaatagcgtatattaaagttgttgcggttaaaaagctcgt |
| 14 | B. mexicana | .G |
| 15 | B. dianae | G |
| 16 | flavipes | G |
| 17 | Paracentrobia | .G.TCCAA.A.C.TATATTAAA.TTTGCGGTTAAAAAGC.C.TACT.GAATCTGTGCCAC.C.GTTGGTTCATC |
| 18 | | |
| 19 | ίτ – | 111111111111111111111111111111111111111 |
| 20 | ίτ – | 555666666666677777777788888888889999999999 |
| 21 | ίτ – | 7890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345 |
| 22 | Bspirita | AGTTGAATCTGTGTGCCACGCTGTCGGTTCATCGCTGCGGTGTTTGACTGAC |
| 23 | Bmexicana | |
| 24 | Bdianae | |
| 25 | Zflavipes | |
| 26 | Paracentrobia | GC.C.CGATGT.TAA.TGACAATTGGGATC.TACCGGG.CT.AG.TCCTCACGCG |
| 27 | | |
| 28 | [| 22222222222222222222222222222222222222 |
| 29 | ίτ – | 333334444444444555555555566666666667777777777 |
| 30 | [| 567890123456789001234567890012345678900123456789000000000000000000000000000000000000 |
| 31 | Bspirita | GGCTTAGCTCTTCGGGGCGGTCCAGCTAATATCCCATCGCGGTGCTCTTCACCGAGTGTCGAGATGGGCCGGTAC |
| 32 | Bmexicana | · · · · · · · · · · · · · · · · · · · |
| 33 | Bdianae | · · · · · · · · · · · · · · · · · · · |
| 34 | Zflavipes | |
| 35 | Paracentrobia | TC.CATCGCGG.GCTATTCATC.AGTGT.G.GGTGGG.CGGTACTTATGAAC.AGT.ATTCT.AAAGTA |
| 36 | | |

| 37 | , C | 333333333333333333333333333333333333333 |
|-------|------------------------|---|
| 38 | _E | 1111111222222222333333333344444444444555555556666666666 |
| 39 | 1 | 3456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901 |
| 40 | B. spirita | GTTTACTTTGAACAAATTAGAGTG-CTCAAAGCAGGCTATGTTCGCCTGAATATATGTGCATGGAATAATGGAAT-AG |
| 41 | B. mexicana | |
| 42 | B. dianae | |
| 43 | Z. flavipes | CCACA.AGTT.TGC.CA.TT.TGCATT. |
| 44 | Paracentrobia | .GTGA.CGC.TG.ATTCGTG.ATGG.AT.ATGG.ATACGACGG.TCTAT.TTG.T.GT.TTCCCCC |
| 45 | | |
| 46 | r | 333333333444444444444444444444444444444 |
| 47 | · • | 999999999999000000000000000000000000000 |
| 48 | | 123456780012345678001234567800123456780012345678001234567800123456780012345678001 |
| 40 | L B enivita | |
| 1 20 | B. moviesna | |
| 50 | DMEXICANA | |
| 51 | BGIANAE | |
| 52 | 2IIAVIDES | A |
| 53 | Paracentrobia | I.GG.AAIGAI.A.AG.GACAGA.GG.GCAII.IAI.GCGACGAI.GCGA.AI.CII.AICGICGCAA.AC |
| 54 | | |
| 55 | ,L | 444444444444444444444444444444444444444 |
| 56 | L | 6/////////888888888888999999999999900000000 |
| 57 | , C | 9012345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567 |
| 58 | Bspirita | ACGTTAGAGGTGAAATTCTTGGATCGTCGCAAGA-CGGACAGAAGCGAAAGCATTTGCCAAAAATGTTTTCATTAATC |
| 59 | Bmexicana | ······ |
| 60 | Bdianae | |
| 61 | Zflavipes | CGA |
| 62 | Paracentrobia | GGACAGACGAGCATCCAAAAATGTTTTCATT.ATCAACG.AAGA.AGGTTCGAAGGCGATCAGA |
| 63 | | |
| 64 | _E | 555555555555555555555555555555555555555 |
| 65 | , C | 444555555555666666666667777777778888888888 |
| 66 | [| 7890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345 |
| 67 | Bspirita | AAGAACGAAAGTTAGAGGTTCGAAGGCGATCAGATACCGCCCTAGTTCTAACCATAAACGATGCCAGCTAGCGATCCG |
| 68 | B. mexicana | |
| 69 | B. dianae | |
| 70 | Z. flavipes | .GA.C.AGGAC.AA.CA.ACT.T.CTC.A.GGCTGATC |
| 71 | Paracentrobia | CC.CC.T.GTTCACCA.AAACGATGCCAGCT.GCGATGCCTAAG.TTCCG.TGAC.CGGC.GGCAGCT |
| 72 | | |
| 73 | r | |
| 24 | | |
| 1 1 1 | - <u>-</u> | 222233333333333333333333333333333333333 |
| /5 | L | 20/830153420/830153420/830153420/830153420/830153420/830153420/830153420/830153 |
| 76 | Bspirita | CCGAAGTTCCTCCGATGACTCGGCGGCAGCTTCCGGGAAACCAAAGCTTTTGGGTTCCGGGGGAAGTATGGTTGCAA |
| 77 | Bmexicana | • |
| 78 | Bdianae | |
| 79 | Z. flavipes | |
| 80 | Paracentrobia | GGACCAATG.TTTGG.TCCGG.AG.ATG.TTGC.AAGCT.AACACTTTAAGGAATTCCA.AGCA.C. |
| 81 | | |
| | - | |
| 82 | ,L | 1 |
| 83 | _E | 00000001111111112222222222333333334444444444 |
| 84 | [| 3456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890] |
| 85 | B. spirita | AGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTTCAACACACTCT |
| 86 | B mexicana | |
| 0.7 | B diarco | |
| 01 | Ddianae | |
| 88 | Zflavipes | TGAC |
| 89 | Paracentrobia | CCACTG.TGGAGCCT.CG.CTTAATTT.CTTC.TCCACTATTC.TGTTAATACT.A.GAGT. .ATCATA.G |
| 90 | | |
| 91 | r | 777777777777777777777777777777777777777 |
| 0.0 | 4 | 88888888888888888888888888888888888888 |
| 92 | 4 | |
| 93 | j l | 12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456789 |
| 94 | Bspirita | actititatcacactiatccgatactictigticcgititaccatcaactiaataaactgcticggcgtiatcatta |
| 95 | B. mexicana | |
| 96 | B. dianae | |
| 07 | 7 flavines | 2 GC C T -CTAR TR RCRACERED CROCERED ARC T CT C TTTC TC TT R REPORT C |
| | rravipes | |
| 98 | Faracentrobia | CA.AUUUUIAIIAACT.ATCG.CGTA.CA.TTTA.G.T.A.CACGA.CTT.TCAATCC.TATTCA.A.T.G. |
| 99 | | |
| 100 | 1 | [eeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeee |
| 101 | t | 56666666666777777777888888888889999999999 |
| 102 | r | 9012345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567 |
| 103 | B enirite | TTTTECTCTATGATCACCTTCTATAAACCCCCCATTTCATCATCTTATAACTTCTATCACCATTCCCATTTA |
| 100 | DLLLLLA | |
| 104 | bmexicana | |
| 105 | Bdianae | |
| 106 | Zflavipes | C.A.CC.AT.ACCCC.C.TTACGCATGT.C.CTACC.G.TCA.A |
| 107 | Deve en en en el si el | C ARCTATE T AN CACTE A AC CEATACA CA TE A C ATEAC TOAT TOA TOO A TECCO |

| | 108 | | |
|---|-----|---------------|--|
| | 109 | [| 999999999999999999999999999999999999999 |
| | 110 | [| 33344444444445555555555666666666666677777777 |
| | 111 | [| 789012345678901234567890123456789012345678901234567] |
| | 112 | Bspirita | AACCTATATTTAGCATAACTTAATCTTGTGCACCTTTTTCTATGGATCCTT |
| | 113 | Bmexicana | |
| | 114 | Bdianae | |
| | 115 | Zflavipes | TTC.TCCC.TTG.AAG.GCA-ATA.ACAAA |
| | 116 | Paracentrobia | CT.A.TTTTACAT? |
| J | | | |

Tabla 20. Porcentajes de las frecuencias de nucleótidos de las secuencias 18S de especies de *Burksiella* y *Zagella*.

| Especies | T(U) | С | А | G | Total |
|-------------|------|------|------|------|-------|
| B. spirita | 29.7 | 22.0 | 25.0 | 23.3 | 949.0 |
| B. mexicana | 25.4 | 21.1 | 25.3 | 28.2 | 716.0 |
| B. dianae | 24.9 | 21.6 | 25.7 | 27.8 | 767.0 |
| Z. flavipes | 27.0 | 25.1 | 27.6 | 20.3 | 929.0 |
| Promedio | 27.0 | 22.6 | 25.9 | 24.5 | 840.3 |

Se realizó la matriz similitud para la estimación de divergencia entre las secuencias. Se observaron un total de 711 posiciones. Los valores de similitud entre las secuencias de nucleótidos fueron bajos (0.01) entre las especies de *Burksiella*; mientras que se obtuvieron valores relativamente altos (0.26 y 0.27) entre *Z. flavipes* y las especies de *Burksiella* (Tabla 21).

Con base en estos resultados se puede indicar que el uso de este criterio para la separación de especies dentro de cada género no es adecuado; pero si se pueden diferenciar a nivel de género.

| | B. spirita | B. mexicana | B. dianae | Z. flavipes | Paracentrobia |
|---------------|------------|-------------|-----------|-------------|---------------|
| B. spirita | * | 0.01 | 0.01 | 0.27 | 16.95 |
| B. mexicana | 0.01 | * | 0.01 | 0.27 | 16.62 |
| B. dianae | 0.01 | 0.01 | * | 0.26 | 16.83 |
| Z. flavipes | 0.27 | 0.27 | 0.26 | * | 16.46 |
| Paracentrobia | 16.95 | 16.62 | 16.83 | 16.46 | * |

Cuadro 21. Matriz de similitud para estimar la divergencia evolutiva entre secuencias de la región 18S de especies de *Burksiella* y *Zagella*.

Análisis filogenético de secuencias

Las relaciones filogenéticas fueron inferidas por el método UPGMA (Fig.15), basado en distancias; el cual dió como resultado que el árbol óptimo presentó la suma de longitud de las ramas (LR) = 16.858. El porcentaje de las replicas de los árboles en el cual se asociaron los taxa fue mediante una prueba de bootstrap (1000 replicas). Se obtuvieron un total de 711 posiciones de las secuencias. El cladograma muestra las relaciones de distancia evolutiva entre especies de *Burksiella* y *Zagella*. Se observaron dos ramas principales, la primera rama muestra la relación evolutiva estrecha entre las especies *B. spirita*, *B. mexicana* y *B. dianae*, donde estas dos últimas forman el clado de más reciente divergencia con un valor de distancia genética de 0.0018. La segunda rama está compuesta por la especie *Z. flavipes*, con una distancia genética de 0.1337, siendo este taxon el de mayor antigüedad en divergencia.

Las relaciones evolutivas inferidas mediante el método de MP (Fig. 16) muestran que el árbol más parsimonioso tuvo una LR de 644, un CI de 0.900, un IR de 0.888 y un IC de 0.883 (0.800) para todos los sitios y sitios parsimoniosos informativo (valor entre paréntesis). Todas las posiciones que contienen datos ambiguos ("gaps" y perdidos) fueron excluidos de la base de datos. Del total de 711 posiciones, 36 fueron sitios informativos parsimoniosos. Los porcentajes de replica de los árboles lo cuales asocian a los taxa mediante una prueba de bootstrap (1000 replicas) son mostradas en las ramas, donde el primer clado recibió un valor de bootstrap del 100%. El cladograma muestra dos ramas, la primera compuesta por los taxa *B. spirita, B. dianae* y *B. mexicana* con un bootstrap de 100%. Este análisis de caracteres nucleotídicos mostró que *B. mexcana* y *B. dianae* forman un clado estrechamente relacionado y de reciente formación. Por el contrario, el taxón *Z. flavipes* forma una línea evolutiva separada y más antigua.



Figura 15. Árbol consenso UPGMA para especies de *Burksiella* y *Zagella* región conservada 18S. Los valores bootstrap para 1000 replicas son mostrados en las ramas.



Figura 16. Árbol consenso Máxima Parsimonia para especies de *Burksiella* y *Zagella*, región conservada 18S. Los valores bootstrap para 1000 replicas son mostrados en las ramas.

7.3.2 Análisis de la región ITS2 para especies de Burksiella y Zagella

Productos de PCR del gen ITS2 para especies de Burksiella y Zagella

El tamaño de los fragmentos amplificados por PCR de la región variable ITS2 del ADNr de las especies de *Burksiella* y *Zagella* fueron visualizados en geles de agarosa al 1.5%, encontrándose que la longitud de los fragmentos amplificados fue de 500, 580, 680 y 700 pares de bases nucleotídicas para *B. spirita*, *B. dianae*, *B. mexicana* y *Zagella flavipes*, respectivamente (Fig. 17).



Figura 17. Productos obtenidos de la amplificación de la región hipervariable intergénica ITS2 del ADNr. 1) marcador de peso molecular, 2) *B. spirita* 3) *B. dianae*,
4) *B. mexicana* 5) *Z. flavipes* y 6) marcador de peso molecular.

Alineamiento de las secuencias

Para el alineamiento de las secuencias de la región ITS2 de las especies de *Burksiella y Zagella*, se seleccionó como grupo externo al tricogramátido *Uscana semifumipennis* (Tabla 22). Se obtuvieron un total de 685 sitios, de los cuales 83 fueron sitios conservados, 601 sitios variables y 136 sitios parsimoniosos. Los porcentajes de las frecuencias de nucleótidos son mostrados para las secuencias alineadas bajo estudio, donde el nucleótido G fue el menos abundante en la región ITS2 con un promedio de 20.8 (Tabla 23).

Se realizó la matriz similitud para la estimación de divergencia entre las secuencias. Se observaron un total de 433 posiciones. Los valores de similitud entre las secuencias de nucleótidos para las especies bajo estudio mostró una variación significativa. Las especies con mayor similitud o menos divergentes fueron *B. spirita* y *B. mexicana*, con un valor de 0.29; mientras que las especies con menor similitud o más divergentes fueron *Z. flavipes* y *B. mexicana*, con un valor de 1.01 (Tabla 24).

Tabla 22. Comparación y alineamiento de secuencias de la región ITS2 de especies deZagella y Burksiella.

| 1 | | |
|----|-----------------------|--|
| 2 | , C | 111111111122222222223333333344444444444 |
| 3 | _ C | 12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456789 |
| 4 | Bmexicana | ACGGATICA-TICCCGGACC-CGCCTGGCIGA-GGGTCGTITATIAACAACAAICAGA-CIGC-TITIGTITIICG |
| 5 | Zagella_flavipes | |
| 6 | Bdianae | CAACTC |
| 7 | Bspirita | GAAAA |
| 8 | Uscana_semifumipennis | C.CAGT.TAAA.AAA.A.CA.ACTTTGACCA.AATTATA.T.TCT.TGGTCAAGCGAACGAC.GAGCGT |
| 9 | | |
| 10 | E | 111111111111111111111111111111111111111 |
| 11 | E | 78888888889999999999999000000001111111111 |
| 12 | C . | 901234567890012345678900123456789001234567890012345678900123456789001234567890012345678900123456789001234567890012345678900123456789001234567890012345678900123456789001234589000000000000000000000000000000000000 |
| 13 | Bmexicana | TACA-AAAGCGAACACCTGAGCGTTCGTCGATATTTTGTATCGGCGTCGCTCGAA-ATAATGCCTCCTTGTTCG |
| 14 | Zagella_flavipes | .CG.AC.CA.TGG.GC.AC.TG.GAGCCGAA.TCAAT.GAGTG.ACACGG.A.C.AAAC |
| 15 | Bdianae | G.GT |
| 16 | B. spirita | AGCTG.AAT.CACA.TTTTCGGC.T.G.TCGAAATA |
| 17 | Uscana_semifumipennis | .CGTCG.GATTAGAGATGAG.G.A.GC.CGCCTCTTCTTTCCTGCC.CGGCGTCGAAAT |
| 18 | | |
| 19 | C C | 111111111111111111111111111111111111111 |
| 20 | i c | 5556666666666777777777788888888889999999999 |
| 21 | C . | 78901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345 |
| 22 | Bmexicana | TTTTTTACGAATAAGGGGCAAATGTCGAAAGACGCGAGCGTCGAAAGAGGTGGCAATTCGAGGAA |
| 23 | Zagella_flavipes | AAGC.GT.CCTAAAGTACAGACGCCATGTTTG.A.AG.CATCT.TCGT.AGGA-AC.TTCTGAA |
| 24 | Bdianae | .G.GCGTTTGTGCCTCTTTCTGGGT.G.TGTGAAT.A.TCGC.T.GCTA.AT |
| 25 | Bspirita | A.GCCGTTATTAT.C.TT |
| 26 | Uscana_semifumipennis | AACG.CGTCGGCTAACACCTAGCCCCCG.C.AAGCAATG.CTAAAAAAA.ACGTC.A.T |
| 27 | | |
| 28 | E | 222222222222222222222222222222222222222 |
| 29 | E | 3333344444444444555555555566666666666677777777 |
| 30 | C | 56789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123 |
| 31 | Bmexicana | TAATGAGAAAAAGATTCGAAAGCCACAACGAGAGACGCCGTCGCTGCAATAACTTGGGTCGTCGAGTCCCTG |
| 32 | Zagella_flavipes | AGTACGGCAAACAATG.CT.AAT.T.A.A. STTG.T.CA.ACTTTAT |
| 33 | Bdianae | CCGTT.C.C.TTG.CA.GG.TTT.G.AAGT.G.A.GACGC.AGT.G |
| 34 | Bspirita | |
| 35 | Uscana semifumipennis | G.GAATAC.CTTCGAACC.CA.GTGTAGCCGT.CTGC |

| 37 | L | 222222222222222222222222222222222222222 |
|-----|-----------------------|---|
| 38 | Γ. | 1111111222222222233333333344444444445555555555 |
| 39 | C C | 34567890123456789001234567890012345678900123456789000000000000000000000000000000000000 |
| 40 | Bmexicana | AGCTTCCTTCATTGGCGGCG-GACCGACGTTACTAGCCGAGTTTTTTGCGAATAGCGGCGGCGTCTCTTT |
| 41 | Zagella_flavipes | TIGIGAA.CT.CGATCC.TATGAAACT.CTTTTCCC.AC.AAT.AACAAAT.AACGAGGG |
| 42 | Bdianae | TGGCTCTTAAAATATA.AGTAACTTTTAAGCCGCAAT.ATA.GC.GC |
| 43 | Bspirita | |
| 44 | Uscana_semifumipennis | TTCTC.AA.G.G.TGAAAAA.CG.ACCGACGT.C.TACCT.GTT.A.GCGAATAGCGCTGCTGC.T.ATACAATC.C. |
| 45 | | |
| 46 | _ [| 333333344444444444444444444444444444444 |
| 47 | , C | 9999999990000000000111111111222222222333333334444444444 |
| 48 | , [| 1234567890012345678900123456789000000000000000000000000000000000000 |
| 49 | Bmexicana | TTTTTTTTTTTTTCCAAAAAAAAAAAAATAAATCCTTTTGGGTGGGCCGCCCCCCCTTTGAGGCA |
| 50 | Zagella_flavipes | CGACGGGATGGCATA.AGCCT.CTCC.TC.CT.GC.CT.CACCCTAGACG.CCCTTPA.AAAAACCTT.CAA |
| 51 | Bdianae | CGC.G.ACCACGGGT.GTCG.GTCCC.G.GCTATTTGAA-T.T.AGGAGATAT.T |
| 52 | Bspirita | |
| 53 | Uscana_semifumipennis | C.ACCGTGATTG.ATCCTTCGTTCGTG.C.CTTGTCGT.C.TTGCTG.ATT.GCGTGATTGAAT |
| 54 | | |
| 55 | _C | 444444444444444444444444444444444444445555 |
| 56 | <u>,</u> [| 67777777778888888888899999999999000000001111111112222222 ² 2233333333334444444] |
| 57 | .C | 9012345678900123456789001234567890012345678900123456789000000000000000000000000000000000000 |
| 58 | Bmexicana | -AAAAAACGGGGGGG-GAATTTTTTAAATTTTATCGGCAACCCCCAAGGAGGAGAAAAAAAA |
| 59 | Zagella_flavipes | G.GT.TCTGA.TAT.CAT.CCCA.AATCC.CCATCA.C.TTGAGTTCT.ACCCTGCT.TCCCTCCCTACTGCA |
| 60 | Bdianae | -GGTGTGTGAATA.CTG.CGGGTC.CTCTCCTG.G.A.ATGTATTTTTCTTCCTTTTTT.TTA. |
| 61 | Bspirita | TCAC.T.TTGATTCGA.GT.AGCC.AG.C.? |
| 62 | Uscana_semifumipennis | ATTTTCGATC.AC.ACCTCAGAGC.GCAAAC.ATC.G.TGG |
| 63 | | |
| 64 | .[| 555555555555555555555555555555555555555 |
| 65 | .[| 44555555555666666666666677777777777788888888 |
| 66 | . <u>.</u> | 78901234567890012345678900123456789000000000000000000000000000000000000 |
| 67 | Bmexicana | TATTTTCCCATAGAATATACCCGAGAGACCCCCCCCTCTTTGGAAAAATCTTCTGT-CITACACCATGCTTCAGGATA |
| 68 | Zagella_flavipes | .ICCA.IIGGACCC.ICCACA.A.C.AIIIGA.A.ICICAC.AC.CCICI.II.AAAC.GI.AIA.IC.CACI.C |
| 69 | Bdianae | .1III.AAA. GAIIII.AAAAGIAG.GICCI.CC-IIIGA.AAAA.GCIIIGC |
| 70 | Bspirita | |
| 1/1 | Uscana_semirumipennis | |
| 12 | | |
| 73 | , C | 666666666666666666666666666666666666666 |
| 74 | . C | 222223333333334444444445555555556666666666 |
| 75 | , C | 56789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012 |
| 76 | Bmexicana | ataaaaaaaacaagtcatcagatacattatgtcatagagtgagctctctgcaagattataa |
| 77 | Zagella_flavipes | CACTTCTTTCCA.AA.ACA.A.GAAGA.A.ATTGCCT.A.CTACTCCATCA.CC. |
| 78 | Bdianae | G.GTG.TTT.TTAAA.ATTCGAGACA.CCTCAAATCAGCATC |
| 79 | B. spirita | |
| 80 | Uscana semifumipen | nis |
| _ | | |

Tabla 23. Porcentajes de las frecuencias de nucleótidos de las secuencias ITS2 de especies de *Burksiella* y *Zagella*.

| Especies | T(U) | С | А | G | Total |
|-------------|------|------|------|------|-------|
| B. mexicana | 27.5 | 22.2 | 28.5 | 21.8 | 625.0 |
| Z. flavipes | 24.1 | 28.1 | 30.7 | 17.0 | 675.0 |
| B. dianae | 32.0 | 20.4 | 25.6 | 22.0 | 618.0 |
| B. spirita | 30.9 | 21.8 | 23.9 | 23.3 | 476.0 |
| Promedio | 28.4 | 23.4 | 27.4 | 20.8 | 598.5 |

| | B. mexicana | Z. flavipes | B. dianae | B. spirita | U. semifumipennis |
|-------------------|-------------|-------------|-----------|------------|-------------------|
| B. mexicana | * | 1.01 | 0.86 | 0.29 | 1.61 |
| Z. flavipes | 1.01 | * | 0.93 | 0.85 | 3.14 |
| B. dianae | 0.86 | 0.93 | * | 0.89 | 2.08 |
| B. spirita | 0.29 | 0.85 | 0.89 | * | 1.85 |
| U. semifumipennis | 1.61 | 3.14 | 2.08 | 1.85 | * |

Tabla 24. Matriz de similitud para estimar la divergencia evolutiva entre secuencias de la región ITS2 de especies de *Burksiella* y *Zagella*.

Análisis filogenético de secuencias

Con base en la historia evolutiva inferida por el método UPGMA (Fig. 18), basado en distancias, el árbol óptimo mostró la suma de longitud de las ramas (LR) = 3.222. El porcentaje de las replicas de los árboles en el cual se asociaron los taxa fue mediante una prueba de bootstrap (1000 replicas). Se tuvieron un total de 433 posiciones de las secuencias. El cladograma muestra las relaciones de distancia evolutiva entre especies de *Burksiella y Zagella*. Se observaron dos ramas principales, la primera rama muestra que evolutivamente las especies *B. dianae, B. spirita y B. mexicana* forman un clado con divergencia genética cercana, donde estas dos últimas forman el clado de más reciente divergencia con un valor de distancia genética de 0.2908. La segunda rama está compuesta por la especie *Z. flavipes*, con una distancia genética de 0.4381, siendo este taxón el de mayor antigüedad en divergencia.

La filogenia inferida mediante el método de MP (Fig. 19) muestra que el árbol más parsimonioso tuvo una LR de 808, el IC fue de 0.801, el IR fue de 0.602 y el CI fue de 0.548 (0.482) para todos los sitios y sitios parsimoniosos informativos (valor entre

paréntesis). Todas las posiciones que contienen datos ambiguos ("gaps" y perdidos) fueron excluidos de la base de datos. Del total de 436 posiciones, 181 fueron sitios informativos parsimoniosos. El cladograma muestra dos ramas, la primera compuesta por los taxa *B. spirita*, *B. mexicana* y *B. dianae* con un bootstrap de 100%, observándose que *B. spirita* y *B. mexicana* forman un clado estrechamente relacionado y de reciente formación; mientras que el taxón *Z. flavipes* forma una línea evolutiva separada y más antigua.



Figura 18. Árbol consenso UPGMA para especies de *Burksiella* y *Zagella*, región ITS2. Los valores bootstrap para 1000 replicas son mostrados en las ramas.



Figura 19. Árbol consenso de Máxima Parsimonia para especies de *Burksiella* y *Zagella*, región ITS2. Los valores bootstrap para 1000 replicas son mostrados en las ramas.

Análisis del Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción (PCR-RFLP)

El análisis de los fragmentos de restricción de los productos amplificados de la región ITS2 con la enzima *EcoR*I, mostró ausencia de sitios de corte de los productos amplificados, por lo que no se obtuvieron resultados.

El análisis de los fragmentos de restricción de los productos amplificados por PCR y digeridos con la enzima *Alu*I de la región hipervariable ITS2 produjo fragmentos de diferente longitud. Los tamaños de fragmentos para las especies bajo estudio fueron las siguientes: *Z. flavipes* 420, 250, 30pb; *B. spirita* 280, 190, 30pb; *B. mexicana* 400, 250 y 30pb y *B. dianae* 380, 170, 30pb (Fig. 20).



Figura 20. Fragmentos obtenidos de la digestión con la enzima *Alu*I de la amplificación de los productos de PCR de la región ITS2. 1) marcador de peso molecular, 2) *Z. flavipes*, 3) *B. spirita*, 4) *B. mexicana* y 5) *B. dianae*.

7.3.3 Análisis de la región COII para especies de Burksiella y Zagella

Productos de PCR del gen COII para especies de Burksiella y Zagella

El tamaño de los fragmentos amplificados por PCR de la región conservada COII del ADNm fueron visualizados en geles de agarosa al 1.5%. La longitud de los fragmentos amplificados en todas las especies fue de 300 pares de bases nucleotídicas (Fig. 21). Por lo anterior, no existió variación en el tamaño de los fragmentos entre especies de *Burksiella* y *Zagella*; de manera que este caracter no es útil para la separación a este nivel taxonómico.



Figura 21. Productos obtenidos de la amplificación por PCR de la región conservada COII del ADNm. 1) marcador de peso molecular, 2) *B. spirita* 3) *B. dianae*, 4) *B. mexicana* 5) *Z. flavipes*, y 6) marcador de peso molecular.

Alineamiento de las secuencias

Para el alineamiento de las secuencias de la región COII de especies de *Burksiella* y *Zagella*, se seleccionó como grupo externo al tricográmatido *Trichogrammatoidea bactrae*. Los datos de las secuencias alineadas se muestran en el Tabla 25. Del total de 316 sitios, se observaron 61 sitios conservados, 252 sitios variables y 45 sitios parsimoniosos. Los porcentajes de las frecuencias de nucleótidos son mostradas para las secuencias alineadas bajo estudio, los nucleótidos C y G fueron los menos abundantes en la región COII con un promedio de 9.2 y 16.4, respectivamente (Tabla 26).

Tabla 25. Comparación y alineamiento de secuencias de la región COII de especies de *Burksiella* y *Zagella*.

| 1 | L | | |
|----|------------------------------|---|---|
| 2 | 2 [| 11111111122222222333333333344444444445555 | 555555666666666667777777777 |
| 1 | 3 [| 12345678901234567890123456789012345678901234567890123 | 4567890123456789012345678] |
| 4 | Bspirita | TTATTGGACATCAATGATATTGAAGATATGAATATACAGATTTTTATATGGTC | AATTTTGATTCATTTATATTAAATG |
| 1 | Bmexicana | CTA | A |
| | Bdianae | G.AA | A.T |
| 1 | <pre>Zflavipes</pre> | CC.GAT | GC.TCTTGCCCG |
| 8 | Trichogrammatoidea_bactrae | A.TGGAC.TCAATGATTGAAG.TGAATATG.TTAGTAAA | TTGACTCGTT.ATAA.TGAT |
| 9 | 9 | | |
| 10 | | 111111111111111111111111111111111111111 | 111111111111111111111111111111111111111 |
| 11 | L C | 7888888888999999999999000000001111111112222222233 | 3333333344444444445555555] |
| 12 | 2 [| 90123456789012345678901234567890123456789012345678901 | 2345678901234567890123456] |
| 13 | Bspirita | ATTTATTAATAAATTCTTTTCGTTTATTAGATGTAGATAATCGAGT? | -?ATTGGACATCAATGATATTGAAG |
| 14 | Bmexicana | AAATGAAGATCTAGG | -GTAGTTC.T.TA.CA |
| 15 | Bdianae | GA.GATGATTTC.ATATT | -GTTAC.T.TGC |
| 1(| Zflavipes | GGTAGT.GG.TC.G.TCG.CG.ATAAT | AG.A.AA.TG.TTCGATG. |
| 17 | 7 Trichogrammatoidea_bactrae | T.AATCTCAAAATGTCGTT.A.TAG.TG.TG.T.ATCGAATAGT | TGT.CCT.TTAAT.ATCA.A.TCGT |
| 18 | 3 | | |
| 19 | 9 [| 111111111111111111111111111111111111111 | 222222222222222222222222222222222222222 |
| 20 | | 5556666666666777777777888888888889999999999 | 111111111122222222233333] |
| 21 | L | 78901234567890123456789012345678901234567890123456789 | 0123456789012345678901234] |
| 22 | Bspirita | AT-ATGTAATAATTAATTCTTCTGATGTGATTCATTCTTTTGCTATACCAA | GTTTAGGAATTAAAGTTGGTTCTGT |
| 23 | Bmexicana | T.CG.T | |
| 24 | Bdianae | T.CG.TT | .AATA.G |
| 23 | Zflavipes | T.TA.TGG.CGT.CAGA.AT.TG.GG | A |
| 20 | Trichogrammatoidea_bactrae | AT. AATTA.T.C.TCAGA.G.TTCAT.CT.TTGCTA.ACCAAGGTTAGG | TAAAGT.G.TGCAGTTCCTG |
| 27 | 7 | | |
| 28 | 3 [[| 222222222222222222222222222222222222222 | 222222222222333333333333333333333333333 |
| 29 | 9 [| 333334444444444555555555566666666666666 | 88999999999990000000000111] |
| 30 | | 56789012345678901234567890123456789012345678901234567 | 8901234567890123456789012] |
| 31 | Bspirita | TCCTAGGTCGAATAAATCAAGTTAGAATAAATCG | |
| 32 | Bmexicana | AATGTATAAATCGATATGGTTTATAT | TATGGTCAATGTTCAGAAATTTGTG |
| 33 | Bdianae | A | TATGGTCAATGTTCAGAAATTTGTG |
| 34 | Zflavipes | AA | TATGGTCAATGTTCAGAAATTTGTG |
| 35 | Trichogrammatoidea_bactrae | CGAATTAATCATTA.TAA.CTTGA.TCGACCAGGATTATTTTATGGTCA | ATGTTCAGAAATTTGTGG |
| | | | |

| 36 | | |
|----|----------------------------|-------|
| 27 | - | 00001 |
| 37 | _L | 2222] |
| 38 | ļ[| 1111] |
| 39 | [[| 3456] |
| 40 | Bspirita | |
| 41 | Bmexicana | G |
| 42 | Bdianae | G |
| 43 | Zflavipes | GAAA |
| 44 | Trichogrammatoidea_bactrae | |

Tabla 26. Porcentajes de las frecuencias de nucleótidos de las secuencias COII de especies de *Burksiella* y *Zagella*.

| | T(U) | С | А | G | Total |
|-------------|------|------|------|------|-------|
| B. spirita | 41.4 | 9.0 | 34.0 | 15.6 | 256.0 |
| B. mexicana | 42.1 | 8.6 | 33.8 | 15.4 | 266.0 |
| B. dianae | 44.6 | 8.9 | 31.0 | 15.5 | 258.0 |
| Z. flavipes | 39.3 | 10.3 | 31.3 | 19.1 | 262.0 |
| Avg. | 41.8 | 9.2 | 32.5 | 16.4 | 260.5 |

Se generó la matriz de similitud para la estimación de la divergencia entre las secuencias de las especies bajo estudio. Se observaron un total de 201 posiciones. Los valores de similitud entre las secuencias de nucleótidos presentaron poca variación. Las especies con mayor similitud fueron *B. spirita* y *B. mexicana,* con un valor de 0.25, y las especies con menor similitud fueron *Z. flavipes* y *B. mexicana;* así como *Z. flavipes* y *B. dianae*, con un valor de 0.59 (Tabla 27).

| | B. spirita | B. mexicana | B. dianae | Z. flavipes | T. bactrae |
|-------------|------------|-------------|-----------|-------------|------------|
| B. spirita | * | 0.25 | 0.27 | 0.47 | 13.84 |
| B. mexicana | 0.25 | * | 0.26 | 0.59 | 13.58 |
| B. dianae | 0.27 | 0.26 | * | 0.59 | 14.01 |
| Z. flavipes | 0.47 | 0.59 | 0.59 | * | 13.35 |
| T. bactrae | 13.84 | 13.58 | 14.01 | 13.35 | * |

Tabla 27. Matriz de similitud para estimar la divergencia evolutiva entre secuencias de la región COII de especies de *Burksiella* y *Zagella*.

Análisis filogenético de secuencias

La historia evolutiva inferida por el método UPGMA (Fig. 22), basado en distancias, produjo un árbol óptimo que muestra la suma de longitud de las ramas (LR) = 14.228. El porcentaje de las replicas de los árboles en el cual se asociaron los taxa mediante una prueba de bootstrap (1000 replicas). Se obtuvieron un total de 201 posiciones de las secuencias. El cladograma muestra las relaciones de distancia evolutiva entre especies de *Zagella* y *Burksiella*. Se observeron dos ramas principales, la primera rama está compuesta por el clado formado por *B. spirita* y *B. mexicana*, y la rama evolutiva de *B. dianae*, lo cual está soportado por un valor de bootstrap del 100%, donde *B. dianae* presenta una distancia génetica más antigua (0.1325) en relación a los otros dos taxa. La segunda rama está compuesta por la especie *Z. flavipes*, con una distancia genética de 0.2742, por lo que este taxón es de mayor antigüedad en divergencia.

La filogenia inferida mediante el método de MP (Fig. 23) mostró que el árbol más parsimonioso tuvo una LR de 251, un IC de 0.687, un IR de 0.444 y un CI de 0.400 (0.305) para todos los sitios y sitios parsimoniosos informativo (valor entre paréntesis).

Todas las posiciones que contienen "gaps" y datos perdidos fueron eliminados de la base de datos. Del total de 201 posiciones, 45 fueron sitios informativos parsimoniosos. El cladograma muestra dos ramas, la primera compuesta por los taxa *B. spirita*, *B. mexicana* y *B. dianae* con un bootstrap de 90%, en la cual se observa que que *B. mexicana* y *B. dianae* forman un clado estrechamente relacionado con un bootstrap de 78% y de reciente formación; mientras que el taxón *Z. flavipes* forma una línea evolutiva separada y más antigua.



Figura 22. Árbol consenso UPGMA para especies de *Burksiella* y *Zagella*, región COII. Los valores de bootstrap para 1000 replicas son mostrados en los nodos.



Figura 23. Árbol consenso de Máxima Parsimonia para especies de *Burksiella* y *Zagella*, región COII. Los valores de bootstrap para 1000 replicas son mostrados en los nodos.

7.3.4 Comparación de caracteres y filogenias de especies de *Burksiella* y *Zagella* entre marcadores y técnicas moleculares.

La Tabla 28 muestra la comparación de resultados del caracter tamaño de fragmentos amplificados por PCR para los marcadores moleculares COII, 18S e ITS2 del ADN ribosomal para las especies de *Burksiella* y *Zagella*. Se puede observar que este caracter o criterio de determinación molecular, obtenido mediante el análisis de PCR y PCR-RFLP (enzima de restricción *AluI*) del gen ITS2 del ADN ribosomal, mostró una variación significativa entre especies y por lo tanto es de gran utilidad a este nivel taxonómico. Por el contrario, dicho caracter, obtenido mediante el análisis de PCR de los genes COII del ADN mitocondrial y 18S del ADN ribosomal, no mostró variación entre especies y por lo tanto no es de relevancia para la caracterización y determinación de especies de *Burksiella* y *Zagella*.

La Tabla 29 muestra la comparación de valores de similitud de secuencias génicas de los genes 18S, ITS2 y COII para las especies de *Burksiella* y *Zagella*. Puede observarse que existe una importante variación en dichos valores entre especies para los genes ITS2 y COII; sin embargo, los valores de similitud entre especies de *Burksiella* son bajos e iguales (0.01) y entre especies de Burksiella y Zagella son más altos y similares entre sí (0.26-0.27) para el gen 18S. Las especies más similares fueron *B. spirita* y *B. mexicana* para los genes ITS2 y COII.

La Tabla 30 muestra un resumen de los resultados de los análisis filogenéticos de secuencias génicas para los genes 18S, ITS2 y COII con el método UPGMA, basado en distancias, y el método MP, basado en el alineamiento múltiple de las secuencias. Puede observarse que las filogenias inferidas mediante UPGMA fueron similares entre las regiones ITS2 y COII. En el caso del método de MP las filogenias fueron diferentes para las tres regiones.

| | | | ITS2 | | | | |
|-------------|------|-----|------|---------------|----------------|--|--|
| Especies | COII | 18S | PCR | PCR-RFLP-AluI | PCR-RFLP-EcoRI | | |
| B. spirita | 300 | 700 | 500 | 280,190,30 | ¹ | | |
| B. dianae | 300 | 700 | 580 | 380,170,30 | | | |
| B. mexicana | 300 | 700 | 680 | 400,250,30 | | | |
| Z. flavipes | 300 | 700 | 700 | 420,250,30 | | | |

Tabla 28. Comparación de los tamaños de los fragmentos amplificados por PCR de las regiones COII, 18S e ITS2 en las especies de Burksiella y Zagella.

¹No produjo sitios de corte

Tabla 29. Comparación de los valores de similitud de las secuencias génicas de las regiones 18S e ITS2 del ADNr y COII del ADNm en especies de Burksiella y Zagella.

| | Regiones | | | | |
|--------------------------|------------------|----------|-------------------|--|--|
| Especies | 18S ¹ | $ITS2^2$ | COII ³ | | |
| B. spirita-B. mexicana | 0.01 | 0.29 | 0.25 | | |
| B. spirita-B. dianae | 0.01 | 0.89 | 0.27 | | |
| B. mexicana-B. dianae | 0.01 | 0.86 | 0.26 | | |
| B. dianae-Z. flavipes | 0.26 | 0.93 | 0.59 | | |
| B. spirita-Z. flavipes | 0.27 | 0.85 | 0.47 | | |
| B. mexicana- Z. flavipes | 0.27 | 1.01 | 0.59 | | |

^{*}Valores grupo externo ¹Paracentrobia 16.46-16.95 ²Ufens semifumipennis 1.61-3.14

³Trichogramma bactrae 13.35-14.01

Tabla 30. Comparación de los resultados de los análisis filogenéticos de las secuencias génicas de las regiones 18S e ITS2 del ADNr y COII del ADNm mediante los métodos UPGMA y MP en especies de *Zagella* y *Burksiella*.

| Región | Método | LR | CI | IR | IC | Especies más cercanas |
|--------|--------|------|------|------|------|--------------------------|
| 18S | UPGMA | 16.8 | - | - | - | B. mexicana y B. dianae |
| | MP | 644 | 0.90 | 0.89 | 0.88 | B. dianae y B. spirita |
| ITS2 | UPGMA | 3.2 | - | - | - | B. mexicana y B. spirita |
| | MP | 808 | 0.80 | 0.60 | 0.55 | B. mexicana y B. spirita |
| COII | UPGMA | 14.2 | - | - | - | B. mexicana y B. spirita |
| | MP | 251 | 0.68 | 0.44 | 0.40 | B. mexicana y B. dianae |

VIII. DISCUSIÓN

8.1 Identificación morfológica de tricogramátidos

Los resultados obtenidos muestran que un número importante de géneros de tricogramátidos (hasta 19 géneros), además de *Trichogramma*, se encuentran presentes en los agroecosistemas y áreas naturales de México (Tabla 5); de los cuales 13 géneros (incluyendo a Trichogramma) estuvieron presentes en cultivos agrícolas (Tabla 7). Sin embargo, considerando que la mayoría de las muestras de avispitas se obtuvieron mediante muestreo con red entomológica, en futuros estudios es necesario efectuar recolectas directas de los huevecillos de los insectos plaga presentes en los diferentes cultivos con el propósito de corroborar el parasitismo por dichos géneros de tricogramátidos. Los géneros *Trichogramma*, *Ufens*, y *Paracentrobia* comúnmente encontrados en muestras de red entomológica de cultivos agrícolas y áreas aledañas adyacentes, también se encontraron parasitando huevecillos de insectos plaga, por lo que pueden ser agentes potenciales para el control biológico de plagas; sin embargo, el muestreo de huevecillos de insectos plaga presentó limitantes ya que solo se consideraron cuatro estados del norte de México, nueve especies de insectos huéspedes, la identificación de estas no fue precisa y los niveles de parasitismo no se determinaron.

Con base en los resultados del presente estudio se sugiere continuar con la exploración e identificación a nivel de especie de tricogramátidos de los géneros más comunes y con potencial para el control biológico de plagas agrícolas, tales como *Ufens*, *Paracentrobia, Oligosita, Pseudoligosita, Ittys*, y *Burksiella*, particularmente para los estados de Jalisco, Nuevo León, y Guerrero, los cuales presentaron un mayor número de géneros (Tablas 5 y 7).

Se describe una nueva especie de *Burksiella*, *B. mexicana*, mediante caracteres morfológicos y moleculares. Esta avispa fue encontrada en huevecillos de Tettigoniidae

en el estado de Tamaulipas. De las nueve especies encontradas en América, *B. mexicana* es la cuarta especie reportada para Norte América junto con *B. floridae*, *B, spirita* y *B. dianae*. *Burksiella mexicana* comparte características tanto morfológicas como moleculares muy similares con la especie de Haití *B. benefica*, teniendo una similitud de hasta un 99% entre sus secuencias génicas reportadas en el Genbank (http://www.nbci.nlm.nih.gov), con clave de acceso AY940415.

8.2 Determinación y caracterización molecular de los géneros más frecuentes dentro de la familia Tricogramátidae

Los resultados del presente estudio muestran que no existe variación en los tamaños de los productos de PCR del gen 18S del ADN ribosomal entre géneros de tricogramátidos, por lo que este caracter no es de utilidad a este nivel taxonómico. Valores similares de tamaños de productos de PCR del gen 18S a los encontrados en el presente estudio (790 pb) se han reportado en el Genbank para *Burksiella* (767 pb) y *Zagella* (769-770 pb). El gen 18S es la región más conservada del ADNr, por lo que generalmente se ha utilizado en estudios filogenéticos de organismos distantemente relacionados (Sappal *et al.* 1995, Owen *et al.* 2007, Ávila *et al.* 2009). Los resultados del presente estudio muestran esta característica del gen 18S.

Por el contrario, en el presente estudio se detectó una variación significativa en los tamaños de los fragmentos de PCR del gen ITS2 del ADN ribosomal entre géneros.

Con base en los tamaños de los productos de PCR del gen ITS2 se pudieron diferenciar los siguientes tres grupos de géneros de tricogramátidos:

- 1) *Pseudoligosita* (450 pb), *Oligosita* (460-510 pb) y *Trichogramma* (520 pb).
- 2) Burksiella (550-640 pb) y Paracentrobia (590 pb).

3) Ittys (680 pb), Ufens (690 pb), Aphelinoidea (690 pb) y Zagella (700 pb).

Con respecto al género *Trichogramma* se han reportado tamaños de productos de PCR del gen ITS2 del ADNr de 600-660 pb (Sappal et al. 1995), 485-695 pb (Silva *et al.* 1999) y 493-698 (España-Luna *et al.* 2006, 2008). Puede observarse que el valor obtenido para *Trichogramma* en el presente estudio (520 pb) se ubica dentro del rango de valores reportados por Silva et al. (1999) y España-Luna *et al.* (2006, 2008).

Para el género *Aphelinoidea* se reportaron tamaños de fragmentos de PCR del gen ITS2 del ADNr de 413-594 pb (Walker *et al.* 2005), los cuales son mucho menores que el valor obtenido para este género en el presente estudio (690 pb).

En relación con el resto de géneros los resultados obtenidos en el presente estudio constituyen el primer reporte sobre los tamaños de productos de PCR de la región ITS2.

Las filogenias a nivel de géneros de las secuencias del gen 18S mediante los métodos UPGMA y MP no correspondieron con las clasificaciones propuestas con base en caracteres morfológicos (Pinto 2006) o moleculares (Owen *et al.* 2007). Por el contrario, las filogenias inferidas para las secuencias del gen ITS2 mediante los métodos mencionados fueron más congruentes con la taxonomía de géneros de Trichogrammatidae propuesta por los autores citados.

La taxonomía de los géneros *Burksiella* y *Zagella* ha sido controversial, puesto que se ha basado principalmente en caracteres morfológicos como la genitalia, antenas y alas de especímenes machos. *Burksiella* fue considerado sinónimo de *Zagella* por Viggiani en 1968; a nivel de tribu *Buksiella* ha sido transferida en dos tribus distintas, Paracentrobiini (Viggiani 1985) y Chaestostrichini (Owen 2007). Pinto (2006) colocó a *Burksiella* como género valido y algunas especies de *Zagella* son transferidas a *Burksiella*, así como la especie *Ufens benefica*. En el presente trabajo se observó que estos géneros *Burksiella* y *Zagella* son distintos mediante caracteres moleculares, lo cual soporta la clasificación morfológica actual realizada por Pinto durante el 2006.

8.3 Determinación y caracterización molecular de las especies de *Burksiella* y Zagella

Los resultados del presente estudio muestran que no existe variación en los tamaños de los productos de PCR del gen 18S del ADN ribosomal y del gen COII del ADN mitocondrial entre las especies de *Burksiella* y *Zagella*, por lo que estos caracteres no son de utilidad a este nivel taxonómico. Valores similares de tamaños de productos de PCR del gen 18S a los encontrados en el presente estudio (700 pb) se han reportado en el Genbank para *Burksiella spirita* (= *Zagella spirita*) (770 pb), *Burksiella benefica* (= *Ufens benefica*) (767 pb) y *Zagella* sp. (769 pb). Sappal et al. (1995) no encontraron variación en los tamaños de la región 18S amplificados por PCR mediante los primers NS1 y NS8 entre las especies *Trichogramma brassicae*, *T. minutum* y *T. near sibiricum*, ya que fueron de alrededor de 1800 pb para todas.

Para la región COII no se encontraron reportes en relación a especies de *Burksiella* y *Zagella*. Sin embargo, Borghuis *et al.* (2003) determinaron en especies de *Trichogramma T. minutum* y *T. platneri*, ellos obtuvieron 20 secuencias génicas con una longitud de 305pb en todas las secuencias, lo cual coincide con los fragmentos amplificados por PCR y secuenciados para *Burksiella* y *Zagella* (300pb, 316pb respectivamente) para esta región.

Por el contrario, en el presente estudio se detectó una variación significativa en los tamaños de los fragmentos de PCR del gen ITS2 del ADN ribosomal entre las especies de *Burksiella* y *Zagella*. Los tamaños de los fragmentos de restricción con la enzima *Alu*1 también mostraron una variación significativa entre especies. Por lo

anterior, estos caracteres permitieron diferenciar claramente las especies de *Burksiella* y *Zagella*, por lo que son de gran utilidad para la identificación a nivel de especie. Los resultados obtenidos en el presente estudio constituyen el primer reporte de determinación taxonómica de especies de *Burksiella* y *Zagella* mediante caracteres moleculares derivados de la amplificación y restricción enzimática de la región ITS2.

Las filogenias a nivel de especies de *Burksiella* y *Zagella* de las secuencias de los genes ITS2 y COII mediante el método UPGMA fueron similares, ya que en ambos casos las especies *B. mexicana* y *B. spirita* son cercanas; mientras que con este mismo método la región 18S derivó una filogenia diferente, donde *B. mexicana* y *B. dianae* son las especies más estrechamente relacionadas.

Las filogenias inferidas con el método de MP para las especies bajo estudio fueron diferentes para todas las regiones (18S, ITS2 y COII), ya que las especies más cercanas difirieron en las tres regiones. Los valores de los CI, IR e IC fueron más altos para la región 18S, intermedios para ITS2 y bajos para COII.

Ambos métodos de búsqueda de árboles filogenéticos (UPGMA y MP) con la región ITS2 produjeron filogenias iguales; mientras que las filogenias difirieron entre métodos para las regiones 18S y COII.

Los resultados del presente estudio indican que las especies de *Burksiella* están más asociadas a *Zagella flavipes* que a *Uscana semifumipennis* utilizada como grupo externo; sin embargo, Owen et al. (2007) mediante las regiones 18S y 28S y el método de MP encontraron una mayor relación entre especies de *Burksiella* y especies de *Uscana*; mientras que las especies de *Zagella* se asocian más estrechamente a especies de *Zaga*.

La región ITS2 ha sido ampliamente estudiada para especies de *Trichogramma* (Silva *et al.* 1994, Silva *et al.* 1995, Sappal *et al.* 1995, van Kan *et al.* 1996, van Kan *et al.* 1997, Pinto *et al.* 1997, Schilthuizen y Stouthamer 1997, Stouthamer *et al.* 1999, Silva *et al.* 1999, Stouthamer *et al.* 2000, Ciciola *et al.* 2001, Ciciola *et al.* 2001, Thomson *et al.* 2003, Almeida y Stouthamer 2003, Li *et al.* 2004, Walker *et al.* 2005, España-Luna *et al.* 2006,2008, López 2009, Ávila *et al.* 2009), debido principalmente a que este gen presenta variación suficiente para distinguir especies sibilinas, lo cual podría ser un marcador de fácil uso en estudios de control biológico. Solo dos géneros de Trichogrammatidae han sido estudiados con las técnicas de PCR y secuenciación mediante el marcador ITS2, *Aphelinoidea y Uscana*, pero existen otros géneros tales como *Ufens, Oligosita, Paracentrobia, Pseudoligosita y Burksiella*, los cuales pueden tener potencial como agentes de control biológico, y debieran considerarse en trabajos de caracterización molecular de sus especies mediante el marcador molecular ITS2.

IX. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos se puede concluir lo siguiente:

Un número importante de géneros de tricogramátidos (hasta 19 géneros), además de *Trichogramma*, se encuentran presentes en los agroecosistemas y áreas naturales de México.

Los géneros de Trichogrammatidae fueron determinados y caracterizados adecuadamente mediante el marcador ITS2 el cual mostró una variación significativa en los tamaños de los productos de PCR.

Las filogenias a nivel de géneros de las secuencias del gen 18S mediante los métodos UPGMA y MP no correspondieron con las clasificaciones propuestas actualmente con base en caracteres morfológicos o moleculares. Por el contrario, las filogenias inferidas para las secuencias del gen ITS2 mediante los métodos mencionados fueron más congruentes con la taxonomía de géneros de Trichogrammatidae actualmente aceptada.

Se detectó una variación significativa en los tamaños de los fragmentos de PCR del gen ITS2 del ADN ribosomal entre las especies de *Burksiella* y *Zagella*. Los tamaños de los fragmentos de restricción con la enzima *Alu*1 también mostraron una variación significativa entre especies. Por lo anterior, estos caracteres permitieron diferenciar claramente las especies de *Burksiella* y *Zagella*, por lo que son de gran utilidad para la identificación a nivel de especie.

Las filogenias a nivel de especies de *Burksiella* y *Zagella* de las secuencias génicas difirieron dependiendo de los genes (18S, ITS2 y COII) y métodos de búsqueda de árboles (UPGMA y MP) utilizados. En el caso de la región ITS2, se obtuvieron filogenias iguales mediante ambos métodos de búsqueda de árboles filogenéticos, en las

cuales se observa que *B. mexicana* y *B. spirita* son las especies más estrechamente relacionadas.
X. LITERATURA CITADA

Al-Wahaibi, A.K., A.K. Owen, and J.G. Morse. 2005. Description and behavioural biology of two *Ufens* species (Hymenoptera: Trichogrammatidae), egg parasitoids of *Homalodisca* species (Hemiptera: Cicadellidae) in southern California. Bulletin of Entomological Research 95: 275–288.

Almeida, R.P and R. Stouthamer. 2003. Molecular identification of *Trichogramma cacoeciae* Marchal (Hymenoptera: Trichogrammatidae): A new record for Peru. Neotropical Entomology 32: 269-272.

Almeida, R.P. and R. Stouthamer. 2004. ITS-2 sequences-based identification of Trichogramma species in South America. In: *Trichogramma* and its relationship with Wolbachia: Identification of *Trichogramma* species, phylogeny, transfer and costs of Wolbachia symbionts. Ph.D. Thesis. Chapter 3. Wagenignen University, The Netherlands.

Arredondo-Bernal, H.C y M.A. Perales-Gutiérrez. 2004. Cría masiva de *Trichogramma* spp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae), pp. 151-176. En: Bautista-Martínez, N., H. Bravo-Mojica y C. Chavarín-Palacio (eds.). Cría de Insectos Plaga y Organismos Benéficos. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Edo. de México. DGSV, México.

Ávila-Rodríguez, V., A. González-Hernández, y O.G. Alvarado-Gómez. 2007. Parasitoides asociados a huevecillos de la chicharrita de las alas cristalinas, *Homalodisca coagulata* (Hemiptera: Cicadelidae) en Parras, Coahuila, México. Entomología Mexicana 6: 525-529. Ávila-Rodríguez, V., E. Cortez-Mondaca, U. Nava-Camberos, y A. González-Hernández. 2008a. Determinación de los géneros de Trichogrammatidae (Hymenoptera: Chalcidoidea) asociados a cultivos de importancia agrícola en Sinaloa, pp. 104-107. En Memoria del XXXI Congreso Nacional de Control Biológico. Zacatecas, Zac., México.

Ávila-Rodríguez, V., U. Nava-Camberos, y A. González-Hernández. 2008b. Determinación y abundancia de los géneros de Trichogrammatidae (Hymenoptera: Chalcidoidea) en la Comarca Lagunera, pp. 733-737. En Memoria del XX Semana Internacional de Agronomía. Venecia, Dgo., México.

Ávila-Rodríguez, V., O.G. Alvarado-Gómez y A. González-Hernández. 2009. Comparación molecular de géneros y especies de Tricogramatidos de México, basado en sus espaciadores intergénicos y genes ribosomales. Entomología Mexicana 8: 982-986.

Ávila-Rodríguez, V., A. González-Hernández, O.G. Alvarado-Gómez, U. Nava-Camberos y E. Cortéz-Mondaca. 2010. Géneros de Trichogrammatidae en México Asociados a Cultivos Agrícolas y Áreas Naturales Aledañas. Southwestern Entomologist 35: 177-191.

Ávila-Rodríguez, V., Svetlana N. Myartseva y A. González-Hernández. 2010. Una nueva especie de *Burksiella* de México (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Acta Zoologica Mexicana (N.S). 27(1): (en prensa).

Baldauf, L.S. 2003. Phylogeny for the faint fheart: a tutorial. Trends in Genetics 19: 345-351.

Behura, S.K. 2006. Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. Molecular Ecology 15: 3087-3113.

Borghuis, A., J.D. Pinto, G.R. Platner and R. Stouthamer. 2003. Partial cytochrome oxidase II sequences distinguish the sibling species *Trichogramma minutum* Riley and *Trichogramma platneri* Nagarkatti. Biological Control 30:90-94.

Caterino, M.S., Cho, S. and F.A.H. Sperrling. 2000. The current state of insect molecular systematics: a thriving Tower of babel. Annual Review of Entomology 45:1-54.

Cheng Z. Y. and F. Quetin Q. The Phylogenetic Relationships of introduced *Aphelinus* (Hymenoptera: Aphelinidae). Biological Control Agents of the Russian Wheat Aphid (Homoptera: Aphididae). (En imp).

Ciciola, A.I. Jr., R.B. Querino, R.A. Zuchi and R. Stouthamer. 2001. Systematic, morphology and physiology, molecular tool for identification of closely related species of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae): *T. rojasi* Nagaraja and Nagarkatii and *T. lasallei* Pinto. Neotropical Entomology 30:575-578.

De Santis, L. 1957. Descripción de nuevos géneros y especies de calcidoideos Argentinos. II. (Hymenoptera). Notas del Museo de La Plata, Buenos Aires (Zoología). 19: 33–72.

De Santis, L. 1997. Afelínidos y tricogramátidos de la colección del Dr. Alejandro A. Ogloblin (Insecta: Hymenoptera) II. Segunda Comunicación. Sesion Ordinaria del Academia Nacional de Agronomia y Veterinaria 51 7–17.

Doutt, R.L and G. Viggiani. 1968. The classification of the Trichogrammatidae (Hymenoptera: Chalcidoidea). Proceedings of the California Academy of Sciences, Fourth series 35: 447-586.

Dozier, H.L. 1932. Descriptions of new trichogrammatid (Hymenoptera) egg parasites from the West Indies. Proceedings of the Entomological Society of Washington 34: 29-37.

España-Luna, M.P y O.G Alvarado-Gómez. 2005. Identificación molecular de especies de Trichogrammatidae. En: Taxonomía de insectos benéficos. Memoria del Curso-taller. Congreso Nacional de Control Biologico. San Miguel de Allende, Gto., Mex.

España-Luna, M.P., O.G. Alvarado-Gómez, A. González-Hernández, S. Favela-Lara, J. Lozano-Gutiérrez y F. García-González. 2006. Diferenciación genética de especies crípticas de Trichogramma Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Folia Entomológica Mexicana 45: 283-290.

España-Luna, M.P., A. González-Hernández, O.G. Alvarado-Gómez y J. Lozano-Gutierrez. 2008. Identificación molecular de especies crípticas de *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) de importancia agrícola en México. Acta Zoológica Mexicana (n.s.) 24:1-14.

Flores, O. A., J.P. Martínez S, A.D. Martínez E. 1997. Uso de nuevas tecnologías en la detección y el analisis genético de fitopatogenos. Fitopatología 32:192-207.

Fu-Castillo, A., G. Moya-Raygoza, E. Cortez-Mondaca, R. Rakitov, S. Triapitsyn, y J. Bernal. 2008. Parasitoides de huevos de Proconinni (Hemiptera: Cicadellidae) en el noreste de México, pp. 108-111. En Memorias del XXXI Congreso Nacional de Control Biológico. Zacatecas, Zac., México.

García-González, F., A. González-Hernández y M.P. España-Luna. 2005. Especies de *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) presentes en centros reproductores de México. Acta Zoológica Mexicana 21: 125-135.

García, G.F. 2006. Clarificación por morfometría de especies y calidad de *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) de centros reproductores y áreas agrícolas del norte de México. Tesis. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.

García, G.F. 2008. Especies de *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) que se producen en México: Problemas y Perspectivas, pp. 25-30. En A.M.D. Salas y E.S. Salazar (eds.), Entomógafos en el Control de Plagas Agrícolas en México. Universidad de Guanajuato, Guanajuato, Gto., México.

García de León, F.J. 2001. Los marcadores genéticos en el conocimiento y manejo de recursos bióticos. Biotam 12:57-80.

Gibson, G.A.P. 1997. Morphology and terminology, pp. 16–44. In G.A.P. Gibson, J.T. Huber, and J.B. Woolley (eds.). Annotated Key to the Genera of Nearctic Chalcidoidea (Hymenoptera). NRC Research Press. Ottawa, Canada.

Gillespie, J.J., J.B. Munro, J.M. Heraty, M.J. Yoder, A.K. Owen and A. E. Carmichael. 2005. A secondary structural model of the 28S RNAr expansion segments D2 and D3 for Chalcidoid Wasps (Hymenoptera: Chalcidoidea). Molecular Biology Evolution 22: 1593-1608.

Girault, A.A. 1911. Descriptions of nine new genera of the chalcidoid family Trichogrammatidae. Transactions of the American Entomological Society 37: 1–42.

Girault, A.A. 1912. Australian Hymenoptera Chalcidoidea I. The family Trichogrammatidae with descriptions of new genera and species. Memoirs of the Queensland Museum 1: 66–116.

Girault, A.A. 1918. North American Hymenoptera Trichogrammatidae. Privately printed, Sydney, Australia, pp. 142–152. In: Gordh, G., A.S. Menke, E.C. Dahms and J. C. Hall. (eds.). Memoirs of the American Entomological Institute.

González, D. 1997. El uso de secuencias génicas para estudios taxonómicos. Boletín de la Sociedad de Botánica de México 60: 137-157.

González, D. 1998. Marcadores moleculares para los estudios comparativos de la variación en ecología y sistemática. Revista Mexicana de Micología 14:1-21.

González-Hernández, A. 2000. Chalcidoidea (Hymenoptera), pp. 649-659. En: J. Llorente, A.N. García-Aldrete y E. González-Soriano (eds.). Biodiversidad, Taxonomía y Biogeografía de Artrópodos Mexicanos: Hacia una Síntesis de su Conocimiento. CONABIO/UNAM, México.

González-Hernández, A., y Ávila-Rodríguez, V. 2006. Determinación, abundancia y distribución de los géneros de Trichogrammatidae (Hymenoptera: Chalcidoidea) en México. Entomología Mexicana 5:447-451.

González–Horta, A.C., M.R. Fernández-Montes, A.R. Rumayor-Flores, E. Castaño-Tostado y R.A. Martínez-Peniche. 2005. Diversidad genética en poblaciones de Manzano en Querétaro, México revelada por marcadores RAPD. Revista Fitotecnia Méxicana 28: 83-91.

Grissell, E and E. M. Schauff. 1990. A Handbook of the Families of the Neárctic Chalcidoidea (Hymenoptera). The Entomological Society of Washington. Washington D. C. 71-72 pp.

Gurney, T. Jr., R. Elbel, D, Ratnapradipa and R. Bossard. 2002. Introduction to the molecular phylogeny of insects. Molecular phylogeny of insects 63-79 In: tested studies for laboratory teaching. S.J. Karcher (ed). Prceedings of the 21st Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education.

Holder, M and P.O. Lewis. 2003. Phylogeny estimation: traditional and bayesian approaches. Nature Reviews 4: 275-284.

Kitching, I.J., P.L. Forey, C.J. Humprier and D.M. Willians. 1998. Cladistics. The theory and practice of parsimony analysis. Oxford University.

Kryger, J.P. 1918. The European Trichogramminae. Entomologiske Meddelelser 12: 257–354.

Landry, B.S., L. Dextraze and G. Boivin. 1993. Random amplified polymorphic DNA markers for DNA finferprinting and genetic variability assessment of minute parasitic wasp species (Hymenoptera: Mymaridae and Trichogrammatidae) used in biological control programs of phytophagous insects. Genome 36: 580-587.

Lin, N. Q. 1994. Systematic studies of Chinese Trichogrammatidae. Contributions of the Biological Control. Research Institute, Fujian Agricultural University, Special Publication 4: 123-239.

Li, Z. X., L. Zheng, and Z. R. Shen. 2004. Using internally transcribed spacer sequences to re-examine the taxonomic status of several cryptic species of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). European Journal of Entomology 101: 347-358.

Logarzo, G.A., S.V. Triapitsyn, and W.A. Jones. 2003. New host records for two species of *Gonatocerus* (Hymenoptera: Mimaridae), egg parasitoids of Proconiine sharpshooters (Hemiptera: Clypeorrhyncha: Cicadellidae), in Peru. Florida Entomologist 86: 486–487.

Logarzo, G.A., E.G.Virla, S.V. Triapitsyn and A.J. Walter. 2004. Biology of *Zagella delicata* (Hymnoptera: Chalcidoidea), an egg parasitoid of the sharpshooter *Tapajosa rubromarginata* (Hemiptera: Clypeorrhyncha: Cicadellidae) in Argentina. Florida Entomologist 87:511-516.

López, M.F.J. 2009. Especies de Trichogramma (Hymenoptera: Trichogrammatidae) Presentes en el estado de Tamaulipas. Tesis. Instituto Tecnológico de Ciudad de Victoria. Ciudad Victoria, Tam., México. pp.

Loxdale, H.D and G. Lushai. 1998. Molecular marker in entomology. Bulletin of Entomological Research 88: 577-600.

Luft Albarracin, E., E. Virla, y S.V. Triapitsyn. 2005. Diversidad e incidencia de los parasitoides oofilos del vector del Achaparramiento (CSS), *Dalbulus maidis* (Hemiptea-Cicadellidae), en Tucumán, Argentina, pp 257-261. En Memoria del VII Congreso Nacional de Maíz. Rosario, Argentina.

Nagaraja, H and S. Nagarkatti. 1971. Redescriptions of some known species of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae), showing the importance of the male genitalia as a diagnostic character. Bulletin of Entomological Research 61:13-31.

Nagaraja, H and S. Nagarkatti. 1973. A key to some new world species of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) with descriptions of four new species. Proceedings of the Entomological Society of Washington 75: 288-297.

Nowicki, S. 1935. Descritions of new genera and species of the family Trichogrammidae (Hymenoptera: Chalcidoidea) from the Palearctic Region, with notes I. Zeitschrift für Angewandte Entomologie 21: 566–596.

Nowicki, S. 1936. Descriptions of new genera and species of the family Trichogrammidae (Hymenoptrea: Chalcidoidea) from the Palearctic Region, with notes II. Zeitschrift für Angewandte Entomologie 23: 114–148.

Nowicki, S. 1940. Descriptions of new genera and species of the family Trichogrammidae (Hymenoptera: Chalcidoidea) from the Palearctic Region, with notes supplement. Zeitschrift für Angewandte Entomologie 26: 624–663.

Metcalf, C.F and W.P. Flint. 1982. Insectos destructivos e insectos útiles, sus costumbres y su control. p. 94, México, D.F.

Moreno-Grijalba, F y Pérez-Moreno I. 2002. El empleo de *Trichogramma* en control biológico de plagas: problemas taxonómicos. Aracnet 31: 239-242.

Orrego, C and F. Agudelo-Silva. 1993. Genetic variation in the parasitoid wasp *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) revealed by DNA amplification of a section of the nuclear ribosomal repeat. Florida Entomologist 76:519-524.

Owen, A.K., J. George, J.D. Pinto and J.M. Heraty. 2007. Trichogrammatidae (Hymenoptera: Chalcidoidea), with an evaluation of the utility of their male genitalia for higher level classification. Journal of Systematic Entomology 32: 227-251.

Peña, I.J.M. 1995. Géneros y especies de Trichogrammatidae (Hymenoptera: Chalcidoidea) en el norte de Sinaloa. Tesis. Instituto Tecnológico de Los Mochis, Los Mochis, Sinaloa, México. 98 pp.

Picca, A., M. Helguera, N. Salomón y A. Carrera. 2004. Marcadores moleculares. En:Echenique V. C. R. Bistein y L. Mroginski. (eds), Botecnología y mejoramiento vegetal.Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. pp. 61-68.

Pinto, J.D., and R. Stouthamer 1994. Systematics of the Trichogrammatidae with emphasis on *Trichogramma*. In: Wajnberg E. and S.A.Hassan (eds.), Biological control with egg parasitoids. CAB International, Wallingford. pp. 1-36.

Pinto J. 1995. Trichogrammatidae. En: Hymenoptera of Costa Rica, Hanson D, Gauld D. (eds.). Oxford Univ. Press. New York. pp. 383-387.

Pinto, J.D., R. Stouthamer, and G.R. Platner 1997. A new cryptic species of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) from the Mojave dessert of California as determined by morphological, reproductive and molecular data. Proceedings of the Entomological Society of Washington 99:238-247.

Pinto, J.D. 1998. Systematics of the North American species of *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Memoirs of the Entomological Society of Washington. 22:1-287.

Pinto, J.D., A.B. Koopmanschap, G.R. Platner and R. Stouthamer. 2002. The North American *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) parasitizing certain Tortricidae (Lepidoptera) on apple and pear, with ITS2 DNA characterizations and description of a new species. Biological Control 23:134-142.

Pinto, J.D. and G. Viggiani. 2004. A review of the genera of Oligositini (Hymenoptera: Trichogrammatidae) with a preliminary hypothesis of phylogenetic relationships. Journal of Hymenoptera Research 13: 63–88.

Pinto, J.D. 2006. A review of the New World genera of Trichogrammatidae (Hymenoptera). Journal of Hymenoptera Research 15: 01-04.

Pizool, J., O. Knoualdia, A. Ferran, P. Chavigny and F. Vanlerberghe-Massuti. 2005. A single molecular marker to distinguish between strains of *Trichogramma cacoeciae*.Biocontrol Science and Technology 15: 527-531.

Reyes, H.J. 1989. Biosistemática de Trichogrammatidae (Hymenoptera: Chalcidoidea) con énfasis a *Trichogramma*, en algunas localidades de Tamaulipas, México. Tesis. Instituto Tecnológico de Ciudad de Victoria. Ciudad Victoria, Tam., México. 45 pp.

Reyes, H.J., y M.D. Flores. 1991. Estudio preliminar de géneros de Trichogrammatidae en el Noreste de México y Sur de San Luís Potosí. En: Memoria del XXVI Congreso Nacional de Entomología. Universidad Cristóbal Colon. Veracruz, Ver., México. Sappal, N.P., R.S Jeng, M. Hubbes and F. Liu. 1995. Restriction fragment length polymorphisms in polymerase chain reaction amplified ribosomal DNAs of three *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) species. Genome 38: 419 - 425.

Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning (2nd Edition). A laboratory manual, Cold Spring Harbor Lab Press, Col Spring Harbor, N.Y.

Schilthuizen, M. and R. J. Stouthamer. 1997. Horizontal transmission of parthenogenesis- inducing microbes in *Trichogramma* wasps. J. Proc. R. Soc. Lond. (B) 264: 361–366.

Silva, I.M.M.S., F. J. van Kan. J. C. Van Lenteren, and R. Stouthamer. 1994. Analysis of Portugues *Trichogramma* spp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae) using ITS-rDNA and RAPDS. Cairo Egypt (Les Colloques, No.73).

Silva, I.M.M.S., J. Hu, F.J.P.M.Van Kan, L. Neto, B. Pintureau and R. Stouthamer. 1999. Molecular differentiation of five *Trichogramma* species occurring in Portugal. Biological Control 16:177-184.

Sneath, PHA and R.R Sokal. 1973 Numerical Taxonomy. Freeman, San Francisco.

Stouthamer, R., J. Hu, F.J.P.M Van Kan, G.R. Platner and J.D. Pinto. 1999. The utility of internally transcribe spacer 2 DNA sequences of the nuclear ribosomal gene for distinguishing sibling species of *Trichogramma*. Biological Control 43: 421-440.

Stouthamer, R., Y. Gai, A.B. Koopmanschap, G.R. Platner & J.D. Pinto. 2000. ITS-2

sequences do not differ for the closely related species *Trichogramma minutum* and *T. platneri*. Entomol Experimentalis Applicata 95:105-111.

Sunnucks, P., 2000. Efficient genetic markers for population biology. Tree 15: 199-2003.

Tamura, K., J. Dudley, M. Nei and S. Kumar. (2007). Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution 24:1596-1599.

Thompson, J.L., J.R. Bradley, M.E. Carew, and A.H. Ary. 2003. Identification and characterization of Trichogramma species from south-eastern Australia using the internal transcribed spacer (ITS-2) region of the ribosomal gene complex. Entomología Experimentalis Applicata 106:235-240.

Tipping, C., S.V. Triapitsyn, and R.F. Mizell III. 2005. A new host record for the egg parasitoid *Paracentrobia americana* (Girault) (Hymenoptera: Trichogrammatidae) of the proconiine sharpshooter *Homalodisca insolita* (Walker) (Hemiptera: Clypeorryncha: Cicadellidae). Florida Entomologist 88: 217–218.

Triapitsyn, S.V. 2003. Taxonomic notes on the genera and species of: (Trichogrammatidae: Hymenoptera)-egg proconiine sharpshooters (Hemiptera: Clypeorrhyncha: Cicadellidae: Proconiini) in Southeastern U.S.A. Transactions of the American Entomological Society 129: 245-265.

Triapitsyn, S.V. and J.S. Bernal. 2009. Egg parasitoids of Proconiini (Hemiptera: Cicadellidae) in Northwestern Mexico, with description of a new species of Gonatocerus (Hymenoptera: Mymaridae). Journal of Insect Science 9: 1-9.

van Kan F.J.P.M., I.M.M.S. Silva, M. Schiltuizen, J.D. Pinto, and R. Stouthamer. 1996. Use of DNA-based methods for the identification of minute wasps of the genus *Trichogramma*. Proceedings Experimental and Applied Entomology, NEV. Amsterdam 7:233-237.

van Kan F.J.P.M., J. Honda, J.D. Pinto, and R. Stouthamer. 1997. Molecular based techniques for *Trichogramma* identification. Proceedings Experimental and Applied Entomology NEV. Amsterdam 8:59-62.

Vanlerberghe, M. F. 1994. Molecular identification and phylogeny of parasitic wasp species (Hymenoptera: Trichogrammatidae) by mitochondrial DNA RFLP and RAPD markers. Insect Molecular Biology 3: 229-237.

Virla, E. G., E. Luft Albarracín, and G. Moya-Raygoza. 2009. Egg parasitoids of *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae) in Jalisco State, Mexico. Florida Entomologist 92: 508-510.

Viggiani, G. 1985. A new species of *Zagella* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) from Florida. Bollettino del Laboratorio di Entomologia Agraria 'Filippo Silvestri', di Portici 42: 15-17.

Viggiani, G. 1971. Ricerche sugli Hymenoptera Chalcidoidea XXVIII. Studio morfologico comparativo dell'armatura genitale esterne maschile dei Trichogrammatidae. Bollettino del Laboratorio di Entomologia Agraria 'Filippo Silvestri' di Portici 29: 181–222.

Viggiani, G. 1984. Further contribution to the knowledge of the male genitalia in the Trichogrammatidae (Hymenoptera: Chalcidoidea). Bollettino del Laboratorio di Entomologia Agraria 'Filippo Silvestri' di Portici 41: 173–182.

Walker, G. P., I. M. Bayoun, S. V. Triapitsyn, and Y. J. Honda. 2005. Taxonomy of *Aphelinoidea* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) species attacking eggs of the beet leafhopper, *Circulifer tenellus* (Hemiptera: Cicadellidae), in California. Zootaxa 1068: 1-25.

Whelan, S., P. Lió and N. Golman. 2001. Molecular Phylogenetics: state-of the art methods for looking into the past. Trends in Genetics 17: 262-272.

Wenzel, W.J. 2002. Phylogenetic analysis: the basic method. Pp. 4-30. In: Techniqes in molecular systematics and Evolution. De Salle, R., G. Giribet A.W. Wheeler (eds.), Birkhäuser Verlag. Basel, Switzerland.

White, TJ., T. Bruns, S. Lee y J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322. En: PCR protocols: a guide to the methods and applications. Innis, MA., D.H. Gelfand, J. J. Sninsky, T.J. White (eds.), Academic Press. New York. USA.

Yoshimoto, C. M. 1984. The families and subfamilies of Canadian Chalcidoid wasps, Part12. In: The Insects and Arachnids of Canada. Agric. Can. Publ. 1760. 149 pp.Yousuf, M. and S.A. Shafee. 1988. Taxonomy of Indian Trichogrammatidae (Hymenoptera: Chalcidoidea). Indian Journal of Systematic Entomology 4: 55–200.

Zambrano, Y. C. 1986. Géneros de Trichogrammatidae (Hymenoptera: Chalcidoidea) en Nuevo León. Tesis. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. San Nicolás de los Garza, Nuevo León, Méx. 77 pp.

APÉNDICE A

Morfología distintiva de la familia Tricogrammatidae



Figura 1. Antena. S= escapo; P= pedicelo; A= anelli (a1, a2, a3); F= funículo (f1, f2); C=clava (C1, C2, C3, C4); SPL= sensilas placoideas; SF= setas flagiliformes.



Figura 2. Ala anterior. SC= vena subcostal; CC= celda costal; PM= vena premarginal; MV= vena marginal; SV= vena estigmal; S=estigma; R= rádios; RP= processo radial; B= línea de la vena basal; RS1= sector radial (vena abscisa 1); RS2= sector radial (vena

abscisa2); R-M= vena transversal; M= vena media; Cu1 primer línea de la vena cubital; Cu2= segunda línea de la vena cubital; A= vena anal; Re= retinaculum.



Figura 3. Genitalia del macho *Trichogramma* sp. AAD= apertura anterodorsal basal, APE= apodema edeagal, AV= anillo ventral, PIV= Proceso interovoselar, VS= voselas, PAR= Paramero, EDG= edeago (García 2006, Pinto 2006).

APÉNDICE B Protocolo: Aislamiento de ADN genómico de tejido QIAamp DNA Micro Handbook

QUIAGEN

PROCEDIMIENTO:

- 1. Transferir una muestra de tejido de menos de 10 mg a un tubo de microcentrifuga.
- 2. Agregar 180 ul de buffer ATL, y equilibrar a temperatura ambiente (15-25°C).
- 3. Añadir 20 ul de proteinasa K y mezclar por vortex por 15 segundos.
- Colocar el tubo de 1.5 ml en un termomezclador o incubadora orbital e incubar a 56°C hasta que la muestra este completamente lysada.
- 5. Agregar 200 ul de Buffer AL, cerrar la tapa y mezclar en vortex por 15 segundos.
- Agregar 200 ul de etanol al (96-100%), cerrar la tapa y mezclar completamente por pulsación en vortex por 15 segundos. Incubar a 5 min a temperatura ambiente (15-25°C).
- 7. Centrifugar el tubo de 1.5 ml para remover.
- Transferir la lysis a la columna QIAmp Min Elute, centrifugar a 6000 x g (8000 rpm) por 1 min.
- 9. Agregar 500 ul de buffer AW1, centrígugar a 6000 x g (8000 rpm) por 1 minuto.
- Agregar 500 ul de buffer AW 2, centrígugar a 6000 x g (8000 rpm) por 1 minuto.
 Colocar la columna QIAmp en un tubo de colección de 2 ml.
- 11. Centrífugar a 20,000 x g, ó 14000 rpm por 3 minutos.
- Colocar la columna QIAmp Min Elute en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml.
 Abrir la columna QIAmp Min Elute y agregar 20-100 ul de buffer AE.
- 13. Cerrar e incubar a temperatura ambiente (15-25°C) por 1 min.
- 14. Centrífugar a 20,000 x g o 14000 rpm. por 1 min.

APÉNDICE C

Preparación de Bufer y tinción para geles de corrida de ADN

Azul de bromofenol

Bufer de gel de carga Tipo III (con glicerol)(6 X)(10 ml)

- 1. Pesar 25 mg de azul de bromofenol
- 2. 25 mg xilene de cianol FF
- 3. 3 ml glicerol.
- 4. Aforar a 10 ml de agua bidestilada
- 5. Almacenar a 4°C.

Bromuro de etidio (10 mg/ml)(100 ml)

Precaución: el bromuro de Etidioes altamente mutagénico y tóxico. Utilizar guantes cuando se este trabajando con soluciones que contienen este tinte y mascara al momento de pesarlo.

1. Pesar 1 gr de bromuro de etidio.

2. Preparar 100 ml de agua bidestilada

3. Mover la sustancia mediante un agitar magnético durante varias horas.

4. La sustancia será almacenada en un frasco oscuro envuelto con papel aluminio y será refrigerado a 4°C.

5. Precaución: después de su uso deben de ser desinfectadas siguiendo reglamentos institucionales.

Tris-borato para electroforesis (TBE)(5X)(1 litro)

1. Pesar 54 gr de tris base y 27.5 gr ácido bórico.

2. Aforar en 800 ml de agua bidestilada.

3. Agreagar 20 ml 0.5M EDTA (pH 8.0)

4. Almacenamiento: a temperatura ambiente en frascos de vidrio. Desechar cualquier recipiente que contenga residuos que contienen precipitado.

APÉNDICE D

Cuadro 1. Registros de muestras en laminillas de la colección CIBE, claves y datos de colecta, determinación a nivel género y morfoespecie de los géneros de *Zagella* y *Burksiella*.

| No. Muestra | Estado | Localidad | Fecha | Sexo | género |
|-------------|--------|--|----------|------|----------------------|
| CIB 99-0040 | Sin | Km2 Carretera El Dorado-Culiacán | 16-09-99 | 19 | Burksiella |
| CIB 99-0040 | Sin | Km2 Carretera El Dorado-Culiacán | 16-09-99 | 19 | Bursiella |
| CIB 99-0040 | Sin | Km2 Carretera El Dorado-Culiacán | 16-09-99 | 1♀ | Burksiella |
| CIB 99-0040 | Sin | Km2 Carretera El Dorado-Culiacán | 16-09-99 | 18 | Burksiella |
| CIB 99-0040 | Sin | Km2 Carretera El Dorado-Culiacán | 16-09-99 | 18 | Burksiella |
| CIB 99-0040 | Sin | Km2 Carretera El Dorado-Culiacán | 16-09-99 | 19 | Burksiella |
| CIB 99-0040 | Sin | Km2 Carretera El Dorado-Culiacán | 16-09-99 | 18 | Burksiella |
| CIB 99-0040 | Sin | Km2 Carretera El Dorado-Culiacán | 16-09-99 | 1♀ | Burksiella |
| CIB 99-0040 | Sin | Km2 Carretera El Dorado-Culiacán | 16-09-99 | 19 | Burksiella |
| CIB 99-0040 | Sin | Km2 Carretera El Dorado-Culiacán | 16-09-99 | 18 | Burksiella |
| CIB 99-0040 | Sin | Km2 Carretera El Dorado-Culiacán | 16-09-99 | 18 | Burksiella |
| CIB 99-0040 | Sin | Km2 Carretera El Dorado-Culiacán | 16-09-99 | 1♀ | Burksiella |
| CIB 99-0040 | Sin | Km2 Carretera El Dorado-Culiacán | 16-09-99 | 19 | Burksiella |
| CIB 99-0040 | Sin | Km2 Carretera El Dorado-Culiacán | 16-09-99 | 19 | Burksiella |
| CIB 99-0040 | Sin | Km2 Carretera El Dorado-Culiacán | 16-09-99 | 1♀ | Bursiella |
| | | | | | <i>Burksiella</i> nr |
| CIB 99-0040 | Sin | Km2 Carretera El Dorado-Culiacán | 16-09-99 | 1♀ | spirita? |
| CIB 99-0040 | Sin | Km2 Carretera El Dorado-Culiacán | 16-09-99 | 1₽ | Burksiella |
| | | | | | Burksiella |
| CIB 99-0040 | Sin | Km2 Carretera El Dorado-Culiacán | 16-09-99 | 18 | nr spirita |
| CIB 99-0040 | Sin | Km2 Carretera El Dorado-Culiacán | 16-09-99 | | ? |
| CIB 99-0036 | Sin | El Vergel | 11-09-99 | 1₽ | Burksiella |
| CIB 99-0036 | Sin | El Vergel | 11-09-99 | 18 | Burksiella |
| | | | | | <i>B. nr.</i> |
| CIB 99-0014 | Dgo | Km 20 Carr. El Palmito | 14-08-99 | 1♀ | dianae? |
| | | Entronque de la carretera Campo Victoria | | | Burksiella |
| CIB 99-0023 | Sin | con Costera | 28-08-99 | 18 | nr spirita |
| | | San Francisco, Autlán 10 Km. N. | | | |
| CIB 96-006 | Jal | Mezquitán | 30-07-96 | 18 | Burksiella |

| | | San Francisco, Autlán 10 Km. N. | | | |
|-------------|------|--|----------|------------|--------------------|
| CIB 96-006 | Jal | Mezquitán | 30-07-96 | 18 | Burksiella |
| | | San Francisco, Autlán 10 Km. N. | | | |
| CIB 96-006 | Jal | Mezquitán | 30-07-96 | 18 | Burksiella |
| | | San Francisco, Autlán 10 Km. N. | | | Burksiella |
| CIB 96-006 | Jal | Mezquitán | 30-07-96 | 18 | nr.flavipes? |
| | | San Francisco, Autlán 10 Km. N. | | | Burksiella |
| CIB 96-006 | Jal | Mezquitán | 30-07-96 | 18 | nr flavipes |
| | | San Francisco, Autlán 10 Km. N. | | | |
| CIB 96-006 | Jal | Mezquitán | 30-07-96 | 1♀ | Bursiella |
| | | San Francisco, Autlán 10 Km. N. | | | |
| CIB 96-007 | Jal | Mezquitán | 31-07-96 | 1♀ | ? |
| CIB 97-026 | Tam | Ignacio Zaragoza | | 1♀ | Burksiella? |
| CIB 97-026 | Tam | Ignacio Zaragoza | | 18 | B. nr dianae |
| CIB 96-008 | Jal | Est. Biol. Chamela, Antiguo Camino Norte | 29-07-96 | 1♀ | Burksiella? |
| CIB 96-008 | Jal | Est. Biol. Chamela, Antiguo Camino Norte | 29-07-96 | 1♀ | Z. Flavipes? |
| | | | | | pseudouscan |
| CIB 96-008 | Jal | Est. Biol. Chamela, Antiguo Camino Norte | 29-07-96 | 18 | a? |
| CIB 96-029 | Mich | Morelia | 16-07-96 | 1♀ | Burksiella |
| | | | | | Burksiellla |
| CIB 99-0028 | Sin | Vergel | | 1♀ | nr flavipes |
| 157 | | | | 18 | Burksiella |
| 157 | | | | 1♀ | Burksiella |
| 157 | | | | 1♀ | Burksiella |
| 157 | | | | 1♀ | Burksiella |
| 144 | | | | 18 | Burksiella |
| 222 | | | | 19 | Burksiella |
| 110 | | | | 19 | Burksiella |
| 110 | | | | 19 | Burksiella |
| 110 | | | | 19 | Burksiella |
| 155 | | | | 1♀ | Burksiella |
| 151 | | | | 19 | Burksiella |
| | | Km 21 Carretera Internacional a Presa | | 1 | |
| CIB 99-0046 | Sin | Adolfo Lopez Mateos | 09-10-99 | 1 ♀ | Zagella |
| | | | | | Zagella |
| CIB 99-0036 | Sin | | 11-09-99 | 1¥ | tlavipes? |
| CIB 99-0012 | Dgo | 2 Km W El Palmito | 14-08-99 | 10 | Zagella Zagella |
| CIB 99-0014 | Dgo | KIII 20 Garr. EI Paimito | 14-08-99 | Π¥ | ∠ageiia |

| | | | | | Z. nr. |
|--|--------------------------|---|--|----------------------|-------------------------|
| CIB 97-026 | Tam | Ignacio Zaragoza | | 1 ♀ | flavipes? |
| 123 | | | | 1് | Z. flavipes? |
| 151 | | | | 1 ♀ | Zagella |
| | | Km 21 Carretera Internacional a Presa | | | |
| | | | | | |
| CIB 99-0046 | Sin | Adolfo Lopez Mateos | 09-10-99 | 1 ♀ | Zagella? |
| CIB 99-0046 CIB 99-0041 | Sin Sin | Adolfo Lopez Mateos San Pedro Mpio. Navolato | 09-10-99 16-09-99 | 1♀ 1♀ | Zagella? ? |
| CIB 99-0046 CIB 99-0041 CIB 99-0041 | Sin Sin Sin | Adolfo Lopez Mateos San Pedro Mpio. Navolato San Pedro Mpio. Navolato | 09-10-99 16-09-99 16-09-99 | 1♀ 1♀ 1♀ | Zagella? ? ? |
| CIB 99-0046 CIB 99-0041 CIB 99-0041 CIB 99-0041 | Sin Sin Sin Sin | Adolfo Lopez Mateos San Pedro Mpio. Navolato San Pedro Mpio. Navolato San Pedro Mpio. Navolato | 09-10-99 16-09-99 16-09-99 16-09-99 | 1♀ 1♀ 1♀ 1♀ | Zagella? ? ? ? |