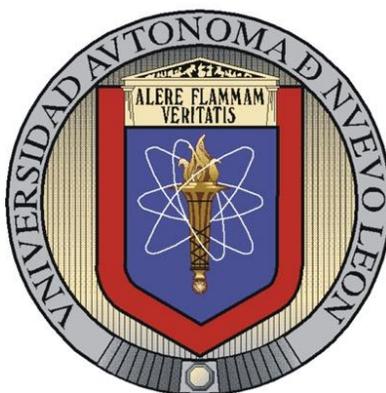


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



**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
I	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 Diagnósis del género <i>Zagella</i>	16
	5.2.1 Descripción morfológica.....	16
	5.2.2 Aspectos biológicos de <i>Zagella</i>	18
	5.2.3 Diversidad y distribución de <i>Zagella</i>	18
	5.2.4 Importancia de <i>Zagella</i> como parasitoide de insectos.....	18
	5.3 Diagnósis del género <i>Burksiella</i>	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 <i>Burksiella</i> y <i>Zagella</i>	22
	5.5 Marcadores y técnicas moleculares basados en el ADN en la determinación de Tricográmatidos.....	24
	5.7 Técnicas y regiones analizadas de los géneros <i>Burksiella</i> y <i>Zagella</i> ...	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 tricogramátidos de la colección CIBE.....	31
	6.5 Determinación molecular de tricogramátidos.....	32
	6.5.1 Extracción y amplificación de ADN por PCR.....	32
	6.5.2 Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP).....	33
	6.5.3. Secuenciación del ADN.....	34
	6.5.4 Análisis filogenético.....	34
VII	RESULTADOS.....	35
	7.1 Identificación morfológica de tricogramátidos.....	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 frecuentes dentro de la familia Trichogrammatidae.....	43
	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 Trichogrammatidae entre marcadores y técnicas moleculares.....	65
	7.3 Determinación y caracterización molecular de las especies de <i>Burksiella</i> y <i>Zagella</i>	68
	7.3.1 Análisis de la región 18S para especies de <i>Burksiella</i> y <i>Zagella</i>	69
	7.3.2 Análisis de la región ITS2 para especies de <i>Burksiella</i> y <i>Zagella</i> ...	75
	7.3.3 Análisis de la región COII para especies de <i>Burksiella</i> y <i>Zagella</i> ...	81
	7.3.4 Comparación de caracteres y filogenias de especies de <i>Burksiella</i>	86

	y <i>Zagella</i> entre marcadores y técnicas moleculares.....	
VIII	DISCUSIÓN.....	89
IX	CONCLUSIONES.....	95
X	LITERATURA CITADA.....	97
APÉNDICE A. Morfología distintiva de la familia Tricogrammatidae.....		112
APÉNDICE B. Protocolo: Aislamiento de ADN genómico de tejido.....		114
APÉNDICE C. Preparación de Bufer y tinción para geles de corrida de ADN.....		115
APÉNDICE D. Registros de muestras en laminillas de la colección CIBE, claves y datos de colecta, determinación a nivel género y morfoespecie de los géneros de <i>Burksiella</i> y <i>Zagella</i>		116

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Marcadores y técnicas moleculares utilizados en la taxonomía de Trichogrammatidos.....	25
2	Número de acceso de GenBank de especies de <i>Burksiella</i> y <i>Zagella</i> de la región conservada 18S y 28S.....	28
4	Estados, épocas de muestreo y plantas hospedantes considerados en las colectas de Tricogrammatidos.....	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 secuencias de la región ITS2 de Trichogrammatidae.....	62
16	Comparación de la longitud de los fragmentos amplificados por PCR de las regiones 18S e ITS2 del ADNr de géneros de tricogramátidos.....	66
17	Comparación de valores de similitud de las secuencias génicas de las regiones 18S e ITS2 del ADNr de géneros de tricogramátidos.	67
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.....	68
19	Comparación y alineamiento de secuencias de la región 18s de especies de <i>Burksiella</i> y <i>Zagella</i>	70
20	Porcentajes de las frecuencias de nucleótidos de las secuencias 18S de especies de <i>Burksiella</i> y <i>Zagella</i>	72
21	Matriz de similitud para estimar la divergencia evolutiva entre secuencias de la región 18S de especies de <i>Burksiella</i> y <i>Zagella</i>	73
22	Comparación y alineamiento de secuencias de la región ITS2 de especies de <i>Burksiella</i> y <i>Zagella</i>	76

LISTA DE TABLAS CONTINUACIÓN.....

23	Porcentajes de las frecuencias de nucleótidos de las secuencias ITS2 de especies de <i>Burksiella</i> y <i>Zagella</i>	77
24	Matriz de similitud para estimar la divergencia evolutiva entre secuencias de la región ITS2 de especies de <i>Burksiella</i> y <i>Zagella</i> ...	78
25	Comparación y alineamiento de secuencias de la región COII de especies de <i>Burksiella</i> y <i>Zagella</i>	82
26	Porcentajes de las frecuencias de nucleótidos de las secuencias COII de especies de <i>Burksiella</i> y <i>Zagella</i>	83
27	Matriz de similitud para estimar la divergencia evolutiva entre secuencias de la región COII de especies de <i>Burksiella</i> y <i>Zagella</i> ...	84
28	Comparación de los tamaños de los fragmentos amplificados por PCR de las regiones COII, 18S e ITS2 en las especies de <i>Burksiella</i> y <i>Zagella</i>	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 <i>Burksiella</i> y <i>Zagella</i>	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 <i>Burksiella</i> y <i>Zagella</i>	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 <i>et al.</i> 2007.....	14
3	Morfología del género <i>Zagella</i> , A. adulto, B. antena, C. ala anterior y D. genitalia del macho.....	17
4	Morfología del género <i>Burksiella</i> , 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) <i>Oligosita</i> , 3) <i>Burksiella</i> , 4) <i>Ittys</i> y 5) <i>Aphelinoidea</i>	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) <i>Oligosita</i> , 3) <i>Paracentrobia</i> , 4) <i>Ufens</i> , 5) <i>Trichogramma</i> , 6) <i>Pseudoligosita</i> , 7) <i>Burksiella</i> , 8) <i>Zagella</i> y 9) <i>Ittys</i>	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) <i>Oligosita</i> , 3) <i>Pseudoligosita</i> , 4), <i>Paracentrobia</i> , 5) <i>Ittys</i> , 6) <i>Ufens</i> , 7) <i>Burksiella</i> , 8) <i>Zagella</i> y 9) <i>Trichogramma</i>	57
11	Productos obtenidos de la amplificación de la región hipervariable intergénica ITS2 del ADNr. 1) marcador de peso molecular, 2) <i>Oligosita</i> , 3) <i>Burksiella</i> , 4) <i>Ittys</i> y 5) <i>Aphelinoidea</i>	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) <i>Burksiella spirita</i> 3) <i>B. diana</i> , 4) <i>B. mexicana</i> 5) <i>Zagella flavipes</i>	69
15	Árbol consenso UPGMA para especies de <i>Burksiella</i> y <i>Zagella</i> 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 <i>Burksiella</i> y <i>Zagella</i> 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) <i>B. spirita</i> 3) <i>B. diana</i> , 4) <i>B. mexicana</i> 5) <i>Z. flavipes</i> , 6) marcador de peso molecular.....	75
18	Árbol consenso UPGMA para especies de <i>Burksiella</i> y <i>Zagella</i> región ITS2. Los valores bootstrap para 1000 replicas son mostrados en las ramas.....	79
19	Árbol consenso Máxima Parsimonia para especies de <i>Burksiella</i> y <i>Zagella</i> región ITS2. Los valores bootstrap para 1000 replicas son mostrados en las ramas.....	79
20	Fragmentos obtenidos de la digestión con la enzima <i>AluI</i> de la amplificación de los productos de PCR de la región ITS2. 1) marcador de peso molecular, 2) <i>Z. flavipes</i> , 3) <i>B. spirita</i> , 4) <i>B. mexicana</i> y 5) <i>B. diana</i>	80
21	Productos obtenidos de la amplificación por PCR de la región conservada COII del ADNm. 1) marcador de peso molecular, 2) <i>B. spirita</i> 3) <i>B. diana</i> , 4) <i>B. mexicana</i> 5) <i>Z. flavipes</i> , y 6) marcador de peso molecular.....	81
22	Árbol consenso UPGMA para especies de <i>Burksiella</i> y <i>Zagella</i> , 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 <i>Burksiella</i> y <i>Zagella</i> , 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 difícil 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 caracteres 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 reasons: their small size which is < 1mm, they present a high interspecific diversity and their identification is limited 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 not 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 preliminary determination of genera by morphological characters, for which 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 *Burksiella 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 characterization 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. Therefore, 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 Stouthamer 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 avispidas *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 avispidas 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). Otros problemas relacionados con la identificación correcta de estas avispidas 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 polimorfo 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 transcrito interno ITS del ADN nuclear 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 transcrito. 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 citocromo 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 Trichogrammatidae, 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*.
3. 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.
4. 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 1 mm 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 avispidas 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 Trichogrammatidae 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 sinonimia. 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 avispidas. 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 diana* 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, Chaetostrichini 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).

FAMILIA TRICHOGRAMMATIDAE

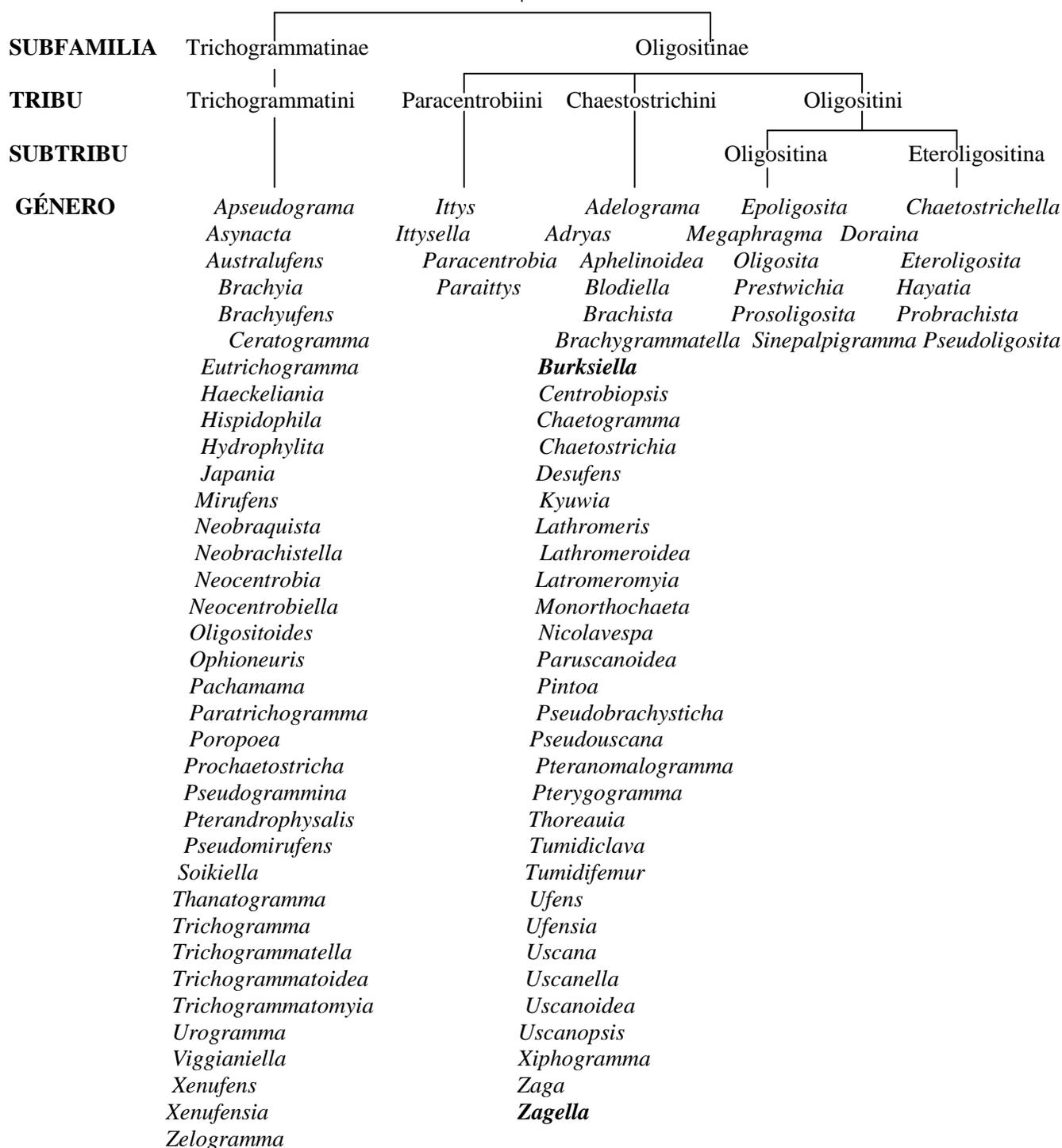


Figura 1. Taxonomía morfológica de la familia Trichogrammatidae Pinto 2006, muestra los géneros clasificados en subfamilia, tribu y subtribu.

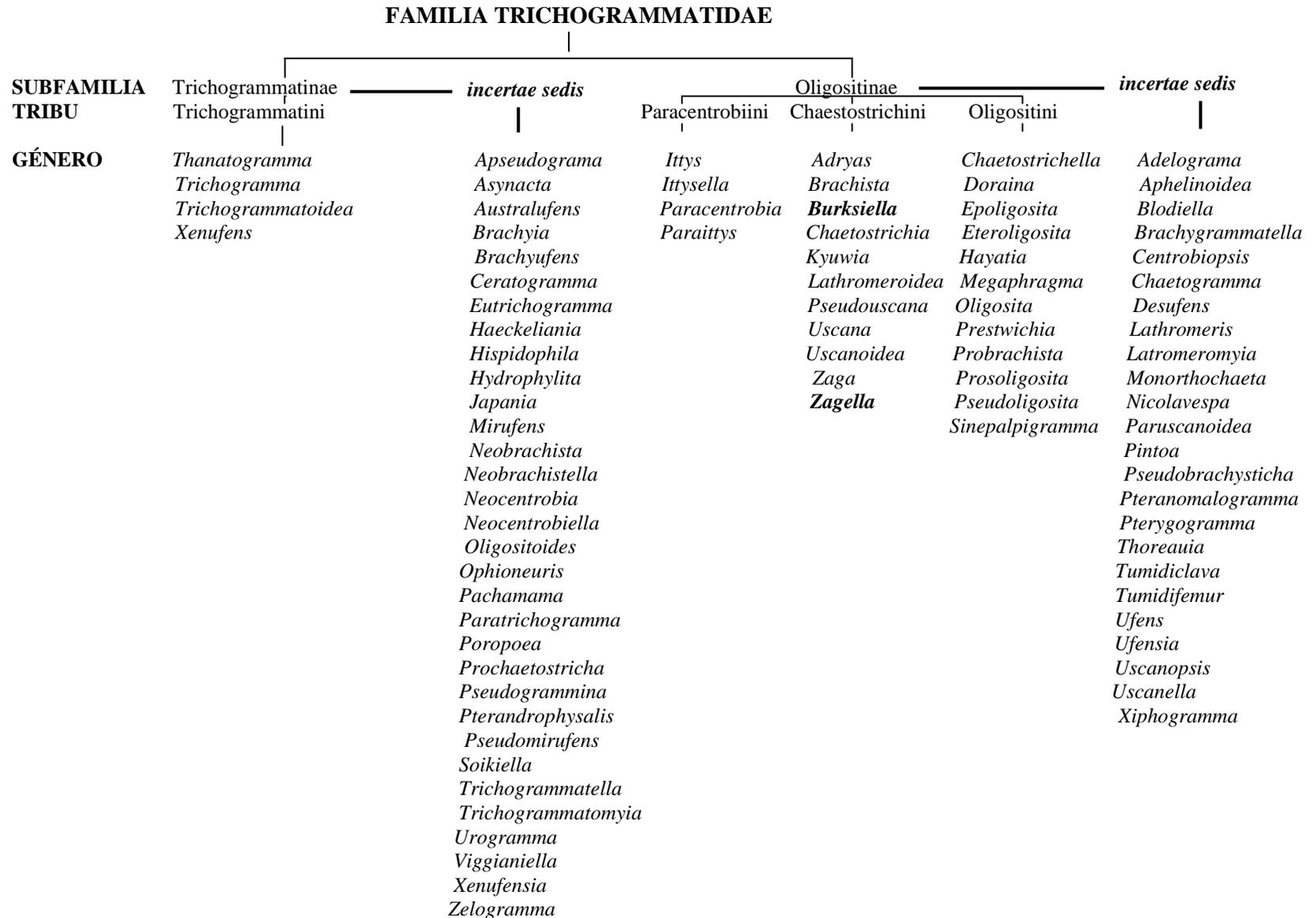


Figura 2. Taxonomía molecular de la familia Trichogrammatidae Owen *et al.* 2007.

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*, *Paratrachogramma* 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 Luis 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* Walker, *Brachygrammatella*, *Burksiella*, *Centrobiopsis* Girault, *Chaetogramma* Doult, *Chaetotracha*, *Epoligosita* Girault, *Haeckeliana* Girault, *Ittys* Girault, *Ittysella* Pinto, y Viggiani, *Lathromeroidea*, *Lathromeris* Förster, *Megaphragma* Timberlake, *Mirufens*, *Nicolavespa* Pinto, *Oligosita*, *Paracentrobia*, *Paratrachogramma*, *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 Diagnósis del género *Zagella*

5.2.1 Descripción morfológica

Las avispidas del género *Zagella* se caracterizan por presentar cuerpo relativamente robusto, estas avispidas pueden ser de color amarillo, café o naranja, algunas presentan bandas y manchas de coloración oscura, alas posteriores hialinas, o de color café (Triapitsyn 2003) (Fig. 3A). Las antenas se componen 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 placoides (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).

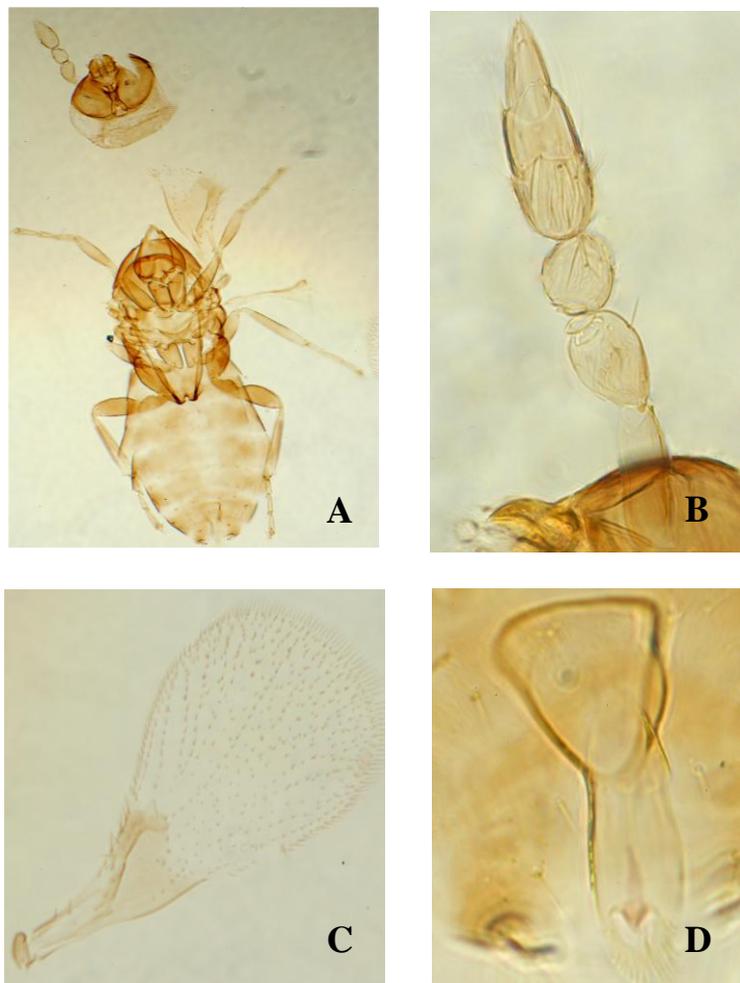


Figura 3. Morfología del género *Zagella*, A. adulto, B. antena, C. ala anterior y D. genitalia del macho.

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 avispa produjo un solo adulto por huevecillo en su huésped *T. rubromarginata*; presentó un ciclo de vida de 23 ± 1.2 días; la longevidad promedio de vida fue de 10.3 ± 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. zebra* 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 trichogramátido 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. delicata* 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 *Xylella fastidiosa* en distintas plantas hospedantes. Se colectaron 11,000 huevecillos, de los cuales el 79% estaba parasitado. 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 *Ufens* 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 tricogramátidos: *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 Diagnósis 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 oscura; 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, transversal, 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 beneficiosa) (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 distintas; Rs1 presente, de forma elongada con más de 5 setas ampliamente curvada 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 parámetros (PAR) (Fig. 4D).

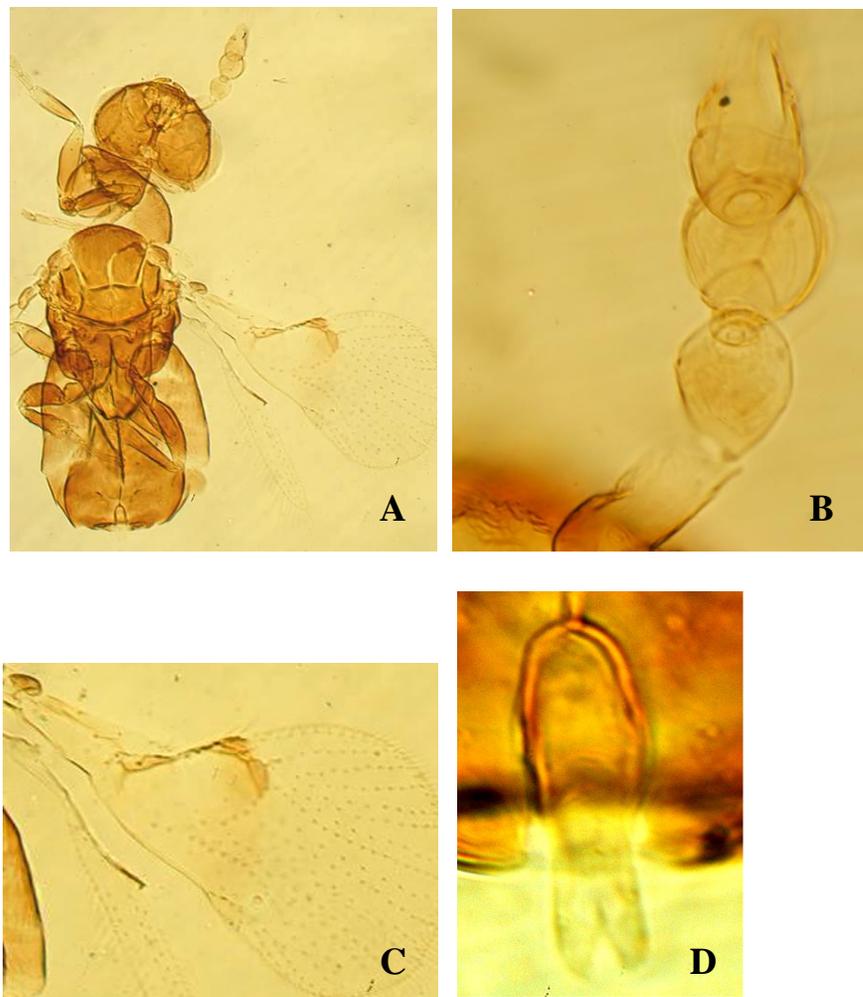


Figura 4. Morfología del género *Burksiella*, A. adulto, B. antena, C. ala anterior y D. genitalia del macho.

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. diana* 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 avispidas *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 Doult 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 Chaetostrichini, 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 taxos 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 taxos 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 avispidas 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 taxonomía y filogenia de Trichogrammatidae.

El marcador molecular más utilizado en estudios taxonómicos 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 taxonómico 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.* 2006 y 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).

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

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

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

	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 <i>et al.</i> 2005
	ITS2	PCR, RAPD, RFLP y Secuenciación	España-Luna <i>et al.</i> 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.

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

Género/especie	Regiones			
	18S		28S	
	clave	talla (pb)	clave	talla (pb)
<i>Z. spirita</i> = <i>B. spirita</i> 1	AY940421	770	AY623597	968
<i>Z. spirita</i> = <i>B. spirita</i> 2	AY940420	770	AY623595	968
<i>Zagella</i> sp.1	AY940418	769	AY623593	967
<i>Zagella</i> sp.2	AY940419	769	AY623594	966
<i>Zagella</i> sp.2	---	---	AY623596	968
<i>Ufens benefica</i> = <i>Burksiella benefica</i> 1	---	---	AY623590	968
<i>Ufens benefica</i> = <i>Burksiella benefica</i> 2	AY940415	767	AY623569	968

<http://www.ncbi.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 avispidas 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. liturata* y *H. vitripennis*) en jojoba en Abril del 2007 y en cítricos en Octubre del 2008, en Sonora y Tamaulipas, respectivamente.

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

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

6.2 Procesamiento de muestras de insectos

Las muestras de insectos en alcohol se procesaron para la separación de avispidas 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 avispidas emergidas, las cuales se conservaron en alcohol al 70% en tubos de plástico de 1.5 ml.

6.3 Determinación morfológica de especímenes

Las muestras de ejemplares fueron montados en laminillas 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 Douth 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 avispa, 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 µl de acuerdo al procedimiento de Sambrook *et al.* (1989) el cual consistió en utilizar 2.5 µl de buffer de PCR 10X, 2.0 µl de MgCl₂ 2.5 mM, concentración final, 2.0 µl de dNTPs 2.5 mM, concentración final, 2.0 µl de cada primer de 10 picomoles/µl, concentración final, 0.2 µl (1.5 U) *Taq* DNA polimerasa, 11.3 µl agua de grado MiliQ y 3 µl de plantilla de

ADN. Los fragmentos del gen 18s del RNA ribosomla fueron amplificados cía reacción en cadena polimerasa (PCR) y utilizando los oligonucleótidos 5'-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, 45seg a 53 °C, 45seg 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 *AluI* de corte abrupto en la secuencia AG↓CT y *EcoRI* de corte con terminaciones pegajosas en la secuencia G↓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 semifumipennis* 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 avispidas tricogramátidos en berenjena, chile, ciruelo, garbanzo, papa, y soya de Sinaloa y en melón de Coahuila (Ávila *et al.* 2010).

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

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

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

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

Estados	Géneros ¹													
	Par	Ufe	Zge	Zag	Lat	Usc	Tgr	Tri	Oli	Pse	Bur	Ltm	Bgr	Cgr
Guerrero	x	x	x	x	x	x	x							
Hidalgo		x							x	x	x	x		
Chihuahua					x					x	x		x	x
Coahuila					x					x	x		x	x
Jalisco					x					x	x		x	x
Zacatecas								x						
N. León														
México								x						

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
	Naranja ² , <i>Citrus sinensis</i> L.												
N. León	x	x	x	x				x	x			x	x
	Nogal ² , <i>Carya illinoensis</i> (Wangenh.) K. Koch												
Chihuahua	x	x	x	x						x			
Hidalgo	x	x	x	x				x			x		
	Vid (comercial) <i>Vitis vinifera</i> L.												
Zacatecas	x	x								x			
Coahuila	x				x								
N. León			x	x					x		x		
	Alfalfa, <i>Medicago sativa</i> L.												

Sinaloa x
Coahuila
Durango
Guerrero

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 avispidas 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 las especies *H. liturata* y *H. vitripennis*. También, avispidas del género *Haeckeliana* parasitaron huevecillos de cicadélidos, probablemente de la especie *H. vitripennis*. Por el contrario, no se obtuvieron avispidas 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 Tettigonidae 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 en varias plantas hospedantes de cuatro estados de México, durante 2007 y 2008.

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

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 fueron 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).

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

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

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.

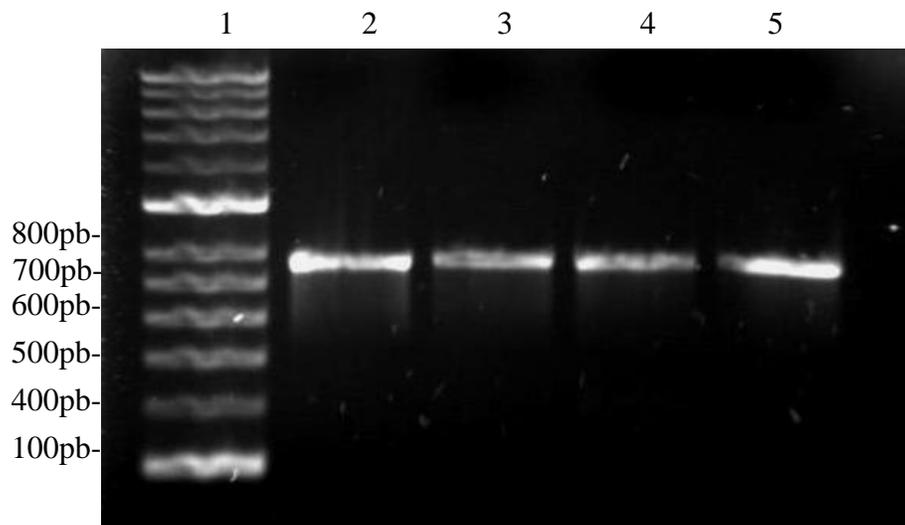


Figura 6. Productos obtenidos de la amplificación de la región conservada del gen ribosomal 18S para géneros de la familia Trichogrammatidae. 1) marcador de peso molecular, 2) *Oligosita*, 3) *Burksiella*, 4) *Ittys* y 5) *Aphelinoidea*.

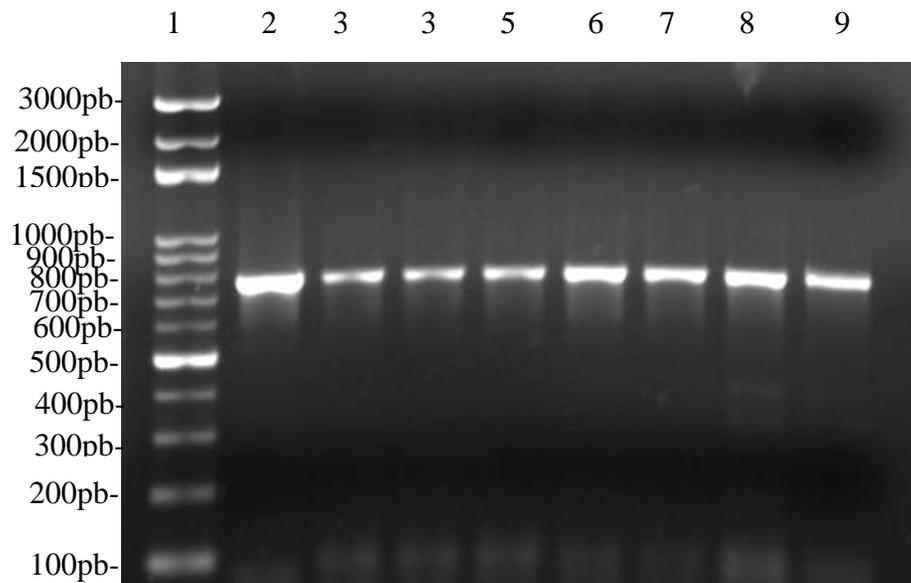


Figura 7. Productos obtenidos de la amplificación de la región conservada del gen ribosomal 18S para géneros de la familia Trichogrammatidae. 1) marcador de peso molecular, 2) *Oligosita*, 3) *Paracentrobia*, 4) *Ufens*, 5) *Trichogramma*, 6) *Pseudoligosita*, 7) *Burksiella*, 8) *Zagella* y 9) *Ittys*.

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 representan por 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 Tricogramátidos, 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 11. Porcentajes de las frecuencias de nucleótidos de las secuencias de la región 18S de géneros de Trichogrammatidae.

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

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

	<i>Zag</i>	<i>Oli</i>	<i>Par</i>	<i>Tri</i>	<i>B. sp1</i>	<i>Pse</i>	<i>Ufe</i>	<i>B.sp2</i>	<i>Itt</i>	<i>E. ere</i>
<i>Zagella</i>	*	0.48	0.49	0.47	1.69	1.85	0.56	1.69	0.48	2.62
<i>Oligosita</i>	0.48	*	0.09	0.06	1.69	1.63	0.10	1.69	0.07	2.55
<i>Paracentrobia</i>	0.49	0.09	*	0.04	1.69	1.65	0.11	1.69	0.03	2.55
<i>Trichogramma</i>	0.47	0.06	0.04	*	1.71	1.63	0.10	1.71	0.03	2.56
<i>Burksiella sp.1</i>	1.69	1.69	1.69	1.71	*	2.13	1.70	0.02	1.63	2.70
<i>Pseudoligosita</i>	1.85	1.63	1.65	1.63	2.13	*	1.65	2.13	1.61	2.70
<i>Ufens</i>	0.56	0.10	0.11	0.10	1.70	1.65	*	1.70	0.09	2.64
<i>Burksiella sp.2</i>	1.69	1.69	1.69	1.71	0.02	2.13	1.70	*	1.63	2.70
<i>Ittys</i>	0.48	0.07	0.03	0.03	1.63	1.61	0.09	1.63	*	2.51
<i>E. eremicus</i>	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 de *B. mexicana* del presente estudio fue similar en un 99% a la secuencia reportada en el Genbank para *U. 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 perdidos 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 encuentra 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 *Trichogramma* 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.

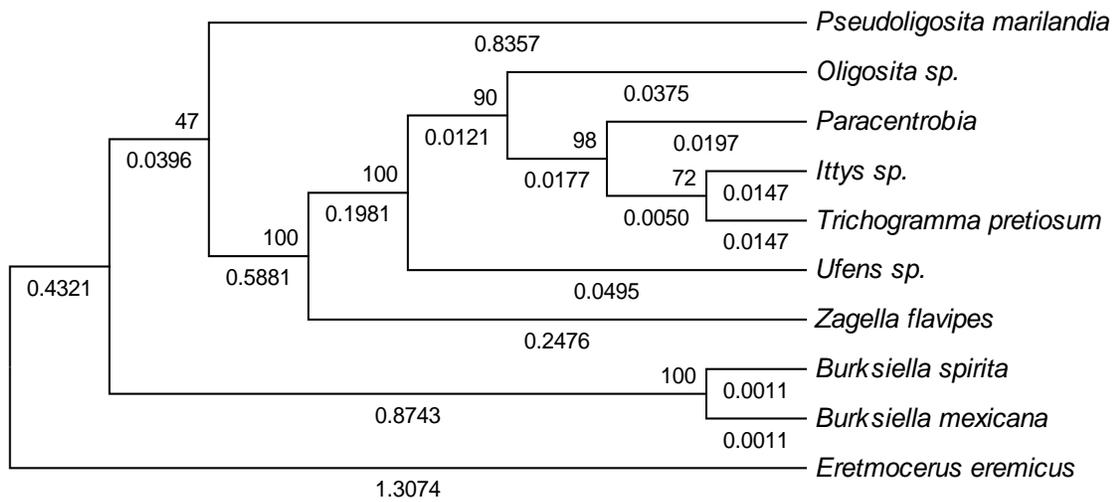


Figura 8. Árbol consenso UPGMA para los géneros de Trichogrammatidae, región conservada 18S. Los valores bootstrap para 1000 replicas son mostrados en las ramas.

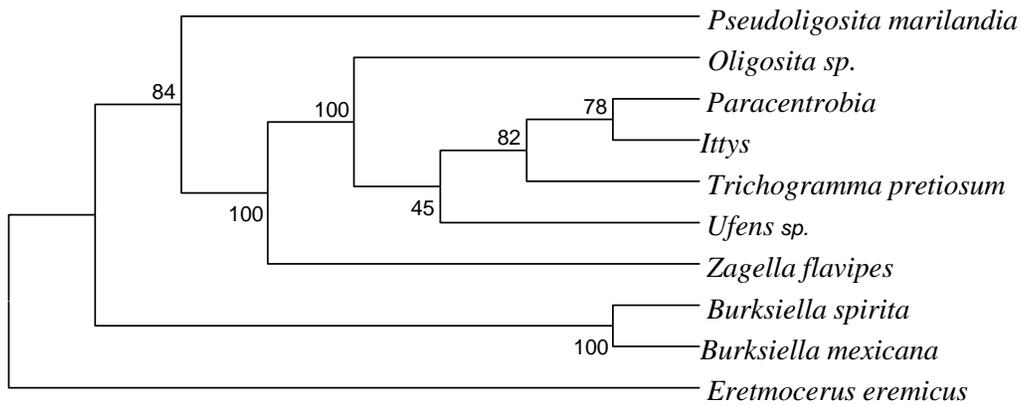


Figura 9. Árbol consenso Máxima Parsimonia para los géneros de Trichogrammatidae, región conservada 18S. Los valores bootstrap para 1000 replicas son mostrados en las ramas.

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).

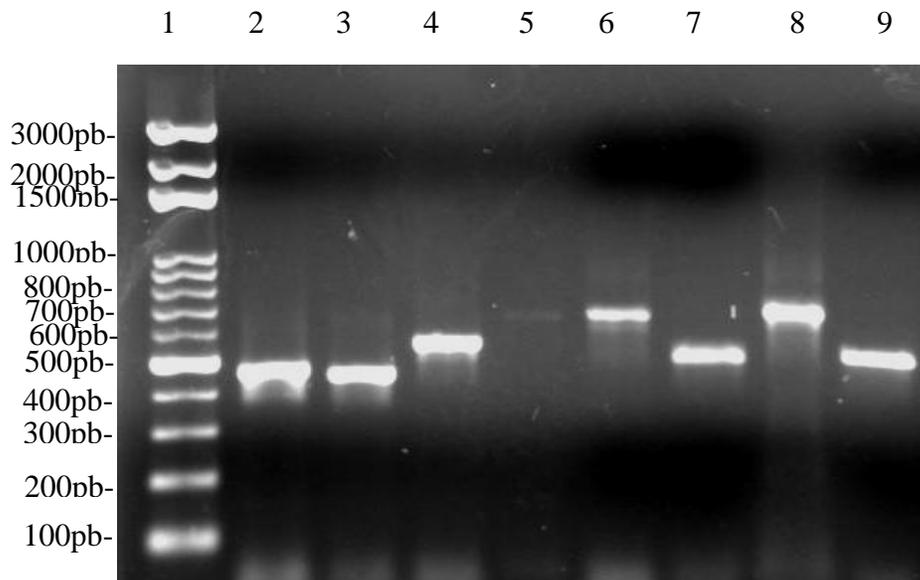


Figura 10. Productos obtenidos de la amplificación de la región hipervariable intergénica ITS2 del ADNr. 1) marcador de peso molecular, 2) *Oligosita*, 3) *Pseudoligosita*, 4), *Paracentrobia*, 5) *Ittys*, 6) *Ufens*, 7) *Burksiella*, 8) *Zagella* y 9) *Trichogramma*.

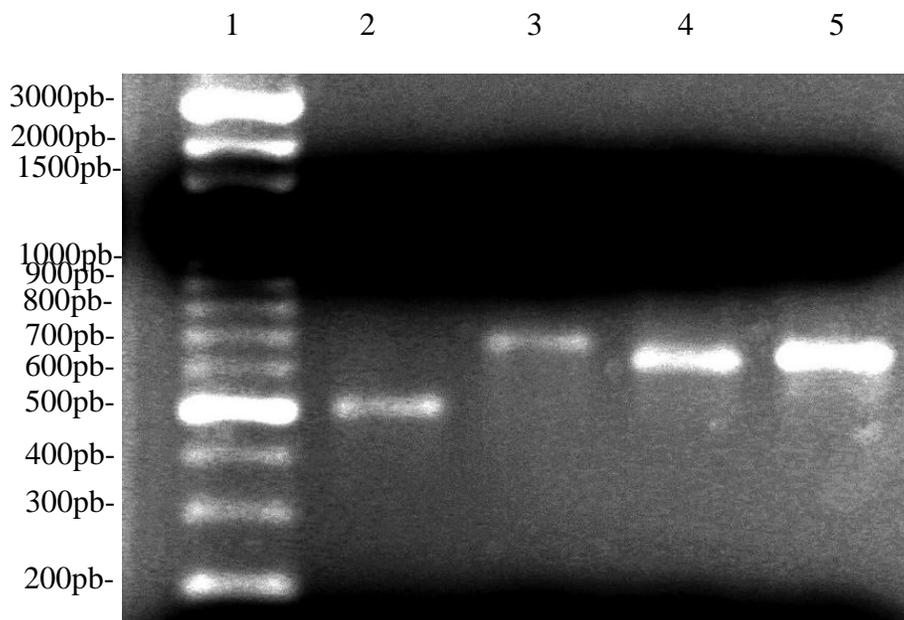


Figura 11. Productos obtenidos de la amplificación de la región hipervariable intergénica ITS2 del ADNr. 1) marcador de peso molecular, 2) *Oligosita*, 3) *Burksiella*, 4) *Ittys* y 5) *Aphelinoidea*.

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

Géneros	% de bases nucleotídicas				
	T/U	C	A	G	Total
<i>Ittys</i>	29.4	23.0	25.0	22.7	653.0
<i>Trichiogramma</i>	27.9	27.5	25.0	19.7	692.0
<i>Oligosita</i>	26.8	25.0	21.2	27.0	444.0
<i>Ufens</i>	32.3	20.5	26.5	20.7	702.0
<i>Burksiella</i>	32.5	20.0	26.9	20.7	610.0
<i>Aphelinoidea</i>	24.7	23.5	26.3	25.6	571.0
<i>Oligosita</i>	26.2	23.0	26.0	24.8	439.0
<i>Pseudoligosita</i>	22.8	23.8	26.6	26.8	421.0
<i>Paracentrobia</i>	24.9	25.8	21.8	27.5	523.0
<i>Zagella</i>	32.4	19.9	24.3	23.5	639.0
<i>Promedio</i>	28.4	23.1	25.0	23.5	569.4

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).

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

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

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 perdidos 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 *Trichogramma* se observó como el grupo evolutivamente más antiguo de todas los taxa bajo estudio.

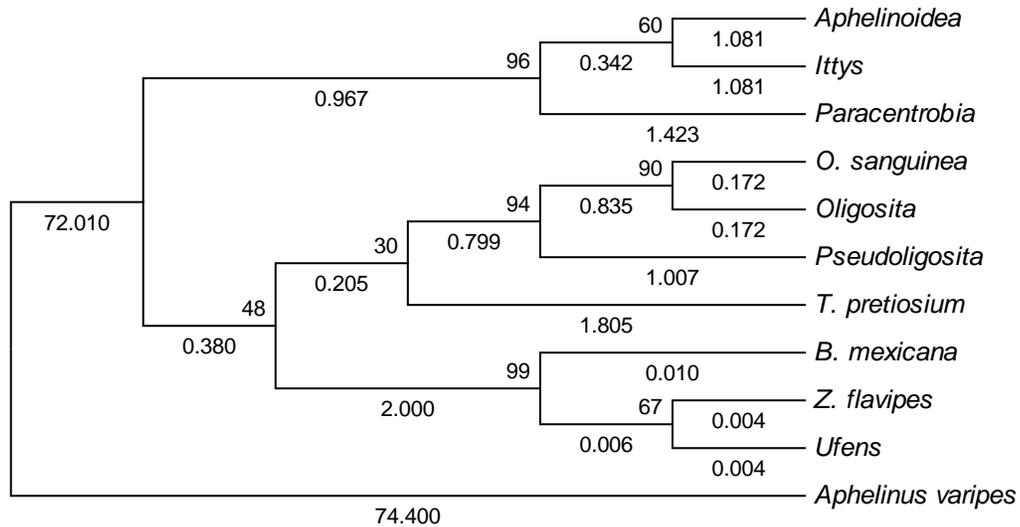


Figura 12. Árbol consenso UPGMA para los géneros de Trichogrammatidae, región hipervariable ITS2. Los valores de bootstrap para 1000 repeticiones son mostrados en los nodos y los de distancia genética se muestran en las ramas.

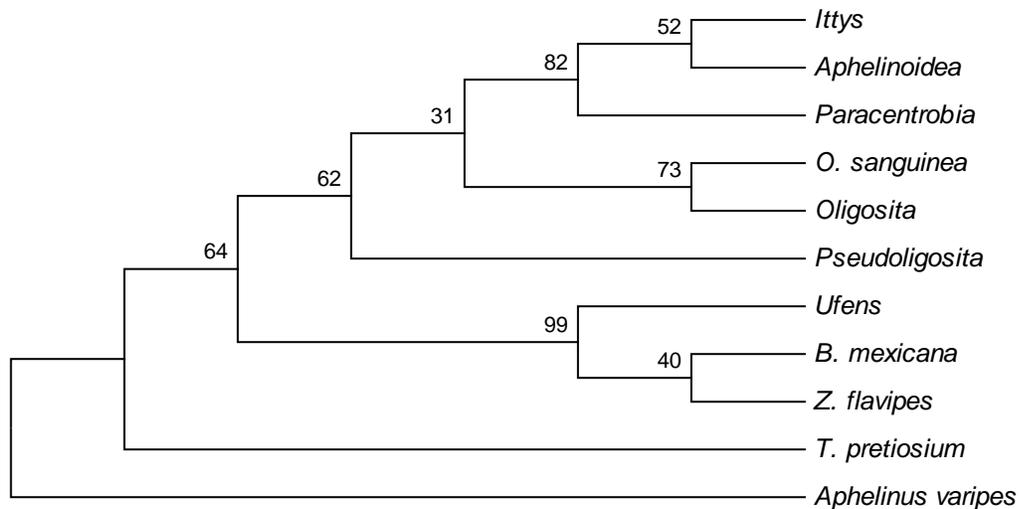


Figura 13. Árbol consenso de MP para los géneros de Trichogrammatidae región ITS2. Los valores de bootstrap para 1000 repeticiones se muestran en los nodos.

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.

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

Género	Regiones	
	18S	ITS2
<i>Ittys</i>	790	680
<i>Paracentrobia</i>	790	590
<i>Aphelinoidea</i>	790	690
<i>Burksiella</i>	790	550-640
<i>Zagella</i>	790	700
<i>Ufens</i>	790	690
<i>Oligosita</i>	790	460-510
<i>Pseudoligosita</i>	790	450
<i>Trichogramma</i>	790	520

Tabla 17. Comparación de valores de similitud de las secuencias génicas de las regiones 18S e ITS2 del ADNr de géneros de tricogramátidos.

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

¹*E. eremicus* 2.51-2.70. ²*A. 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).

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

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

Las especies analizadas en fueron *B. spirita*, *B. diana*, *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*.

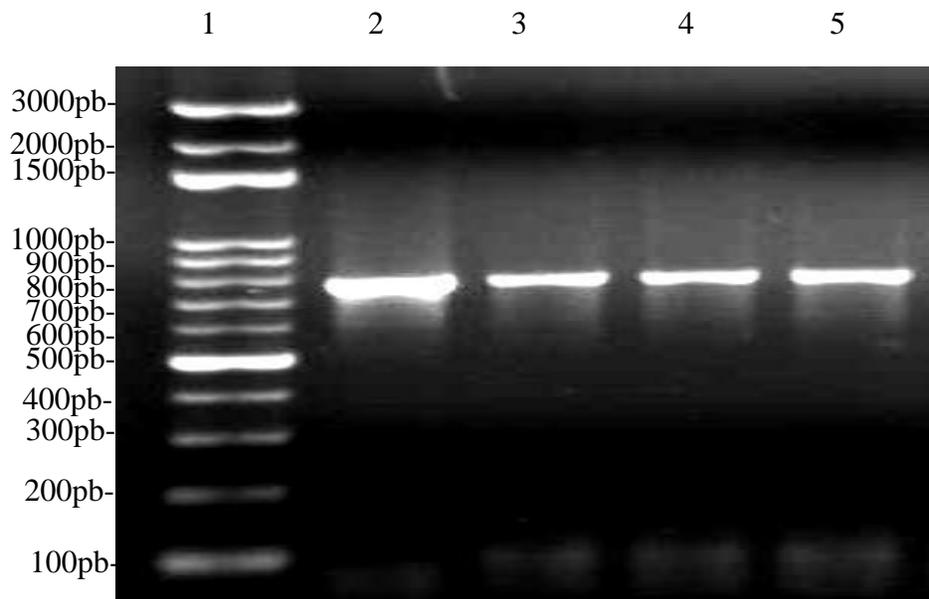


Figura 14. Productos obtenidos de la amplificación de la región conservada 18S del ADNr, 1) marcador de peso molecular, 2) *Burksiella spirita* 3) *B. diana*, 4) *B. mexicana* 5) *Zagella flavipes*.

Alineamiento de las secuencias

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

	<i>B. spirita</i>	<i>B. mexicana</i>	<i>B. diana</i>	<i>Z. flavipes</i>	<i>Paracentrobia</i>
<i>B. spirita</i>	*	0.01	0.01	0.27	16.95
<i>B. mexicana</i>	0.01	*	0.01	0.27	16.62
<i>B. diana</i>	0.01	0.01	*	0.26	16.83
<i>Z. flavipes</i>	0.27	0.27	0.26	*	16.46
<i>Paracentrobia</i>	16.95	16.62	16.83	16.46	*

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. diana*, 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. diana* y *B. mexicana* con un bootstrap de 100%. Este análisis de caracteres nucleotídicos mostró que *B. mexicana* y *B. diana* forman un clado estrechamente relacionado y de reciente formación. Por el contrario, el taxón *Z. flavipes* forma una línea evolutiva separada y más antigua.

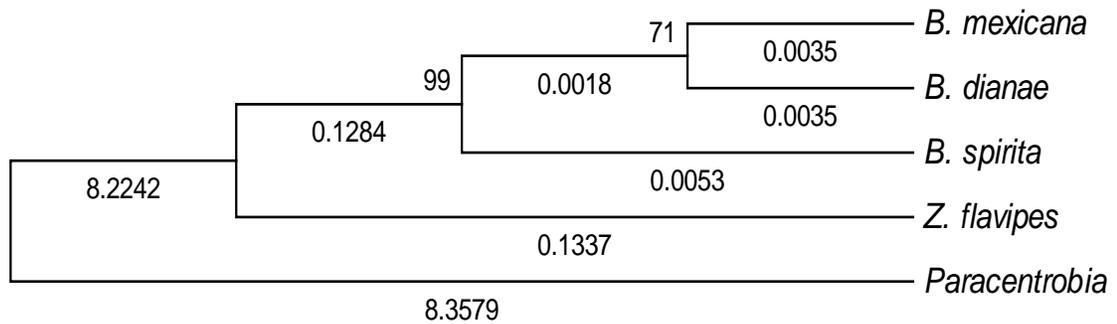


Figura 15. Árbol consenso UPGMA para especies de *Burksiella* y *Zagella* región conservada 18S. Los valores bootstrap para 1000 replicas son mostrados en las ramas.

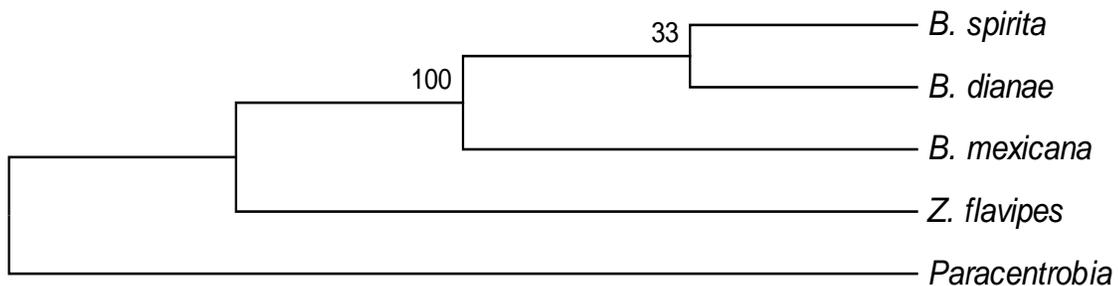


Figura 16. Árbol consenso Máxima Parsimonia para especies de *Burksiella* y *Zagella*, región conservada 18S. Los valores bootstrap para 1000 replicas son mostrados en las ramas.

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. diana*, *B. mexicana* y *Zagella flavipes*, respectivamente (Fig. 17).

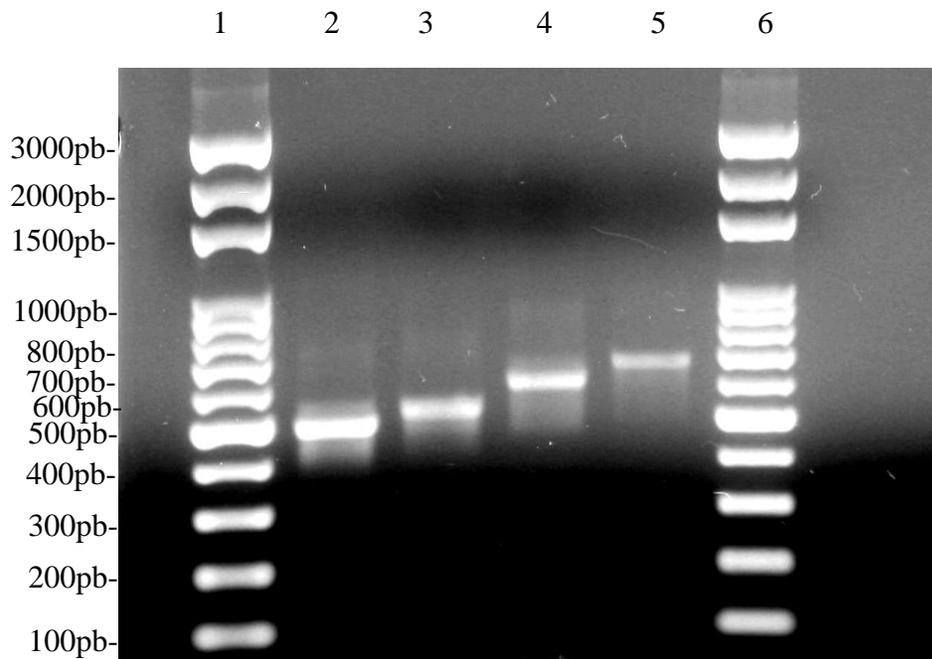


Figura 17. Productos obtenidos de la amplificación de la región hipervariable intergénica ITS2 del ADNr. 1) marcador de peso molecular, 2) *B. spirita* 3) *B. diana*, 4) *B. mexicana* 5) *Z. flavipes* y 6) marcador de peso molecular.

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

	<i>B. mexicana</i>	<i>Z. flavipes</i>	<i>B. diana</i>	<i>B. spirita</i>	<i>U. semifumipennis</i>
<i>B. mexicana</i>	*	1.01	0.86	0.29	1.61
<i>Z. flavipes</i>	1.01	*	0.93	0.85	3.14
<i>B. diana</i>	0.86	0.93	*	0.89	2.08
<i>B. spirita</i>	0.29	0.85	0.89	*	1.85
<i>U. semifumipennis</i>	1.61	3.14	2.08	1.85	*

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. diana*, *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.

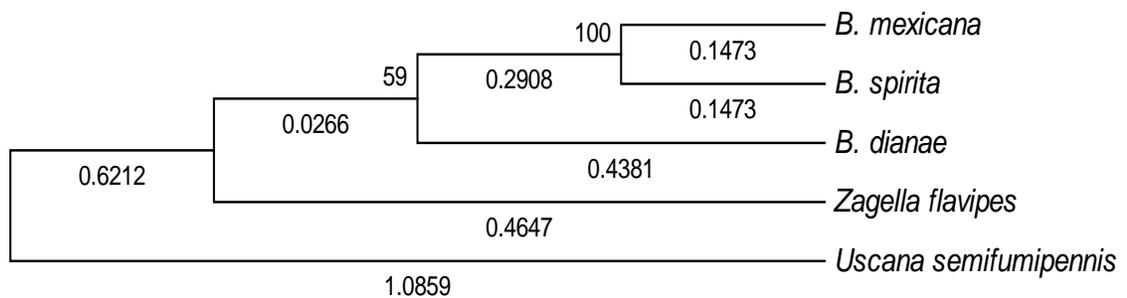


Figura 18. Árbol consenso UPGMA para especies de *Burksiella* y *Zagella*, región ITS2. Los valores bootstrap para 1000 replicas son mostrados en las ramas.

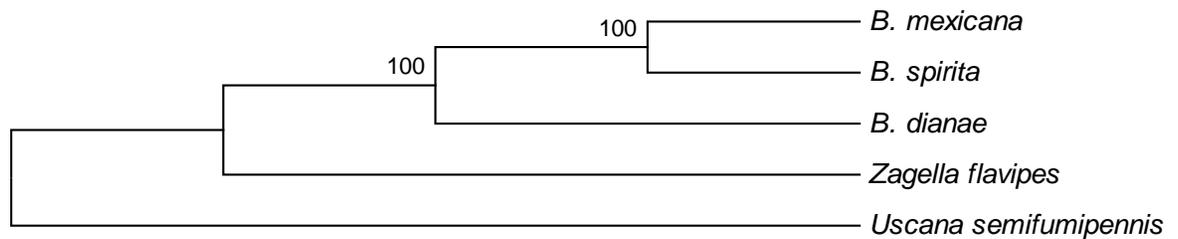


Figura 19. Árbol consenso de Máxima Parsimonia para especies de *Burksiella* y *Zagella*, región ITS2. Los valores bootstrap para 1000 replicas son mostrados en las ramas.

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 *EcoRI*, 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 *AluI* 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. diana* 380, 170, 30pb (Fig. 20).

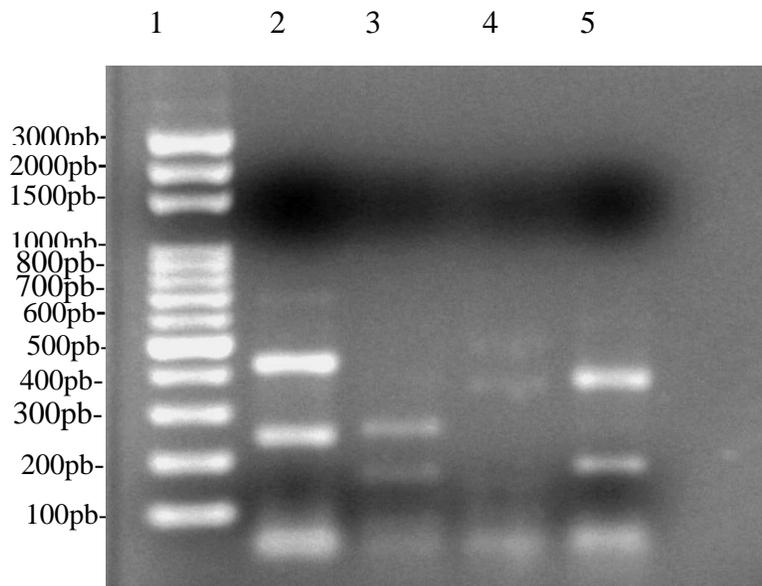


Figura 20. Fragmentos obtenidos de la digestión con la enzima *AluI* de la amplificación de los productos de PCR de la región ITS2. 1) marcador de peso molecular, 2) *Z. flavipes*, 3) *B. spirita*, 4) *B. mexicana* y 5) *B. diana*.

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.

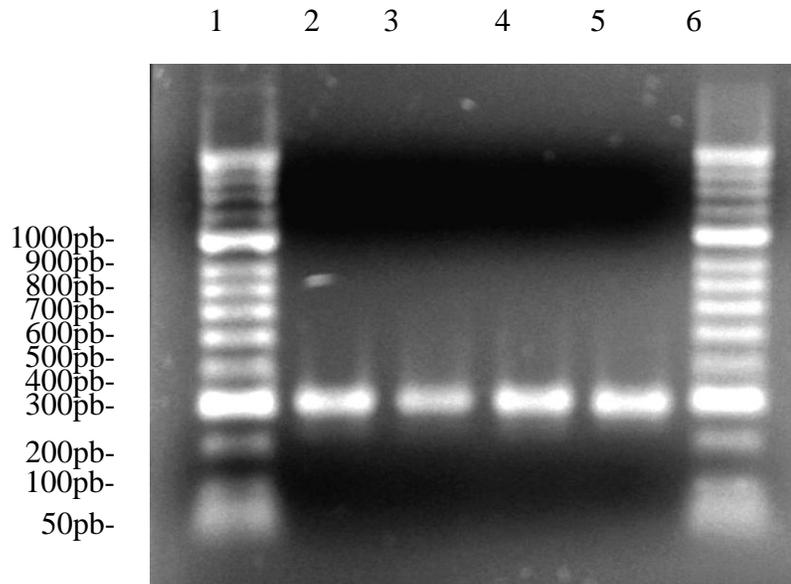


Figura 21. Productos obtenidos de la amplificación por PCR de la región conservada COII del ADNm. 1) marcador de peso molecular, 2) *B. spirita* 3) *B. diana*, 4) *B. mexicana* 5) *Z. flavipes*, y 6) marcador de peso molecular.

Alineamiento de las secuencias


```

36 |
37 | [ 3333]
38 | [ 1111]
39 | [ 3456]
40 | B._spirita ----
41 | B._mexicana G---
42 | B._dianae G---
43 | Z._flavipes GAAA
44 | Trichogrammatoidea_bactrae ----

```

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

	T(U)	C	A	G	Total
<i>B. spirita</i>	41.4	9.0	34.0	15.6	256.0
<i>B. mexicana</i>	42.1	8.6	33.8	15.4	266.0
<i>B. dianae</i>	44.6	8.9	31.0	15.5	258.0
<i>Z. flavipes</i>	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).

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

	<i>B. spirita</i>	<i>B. mexicana</i>	<i>B. diana</i>	<i>Z. flavipes</i>	<i>T. bactrae</i>
<i>B. spirita</i>	*	0.25	0.27	0.47	13.84
<i>B. mexicana</i>	0.25	*	0.26	0.59	13.58
<i>B. diana</i>	0.27	0.26	*	0.59	14.01
<i>Z. flavipes</i>	0.47	0.59	0.59	*	13.35
<i>T. bactrae</i>	13.84	13.58	14.01	13.35	*

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 observaron dos ramas principales, la primera rama está compuesta por el clado formado por *B. spirita* y *B. mexicana*, y la rama evolutiva de *B. diana*, lo cual está soportado por un valor de bootstrap del 100%, donde *B. diana* presenta una distancia genética 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. diana* con un bootstrap de 90%, en la cual se observa que que *B. mexicana* y *B. diana* 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.

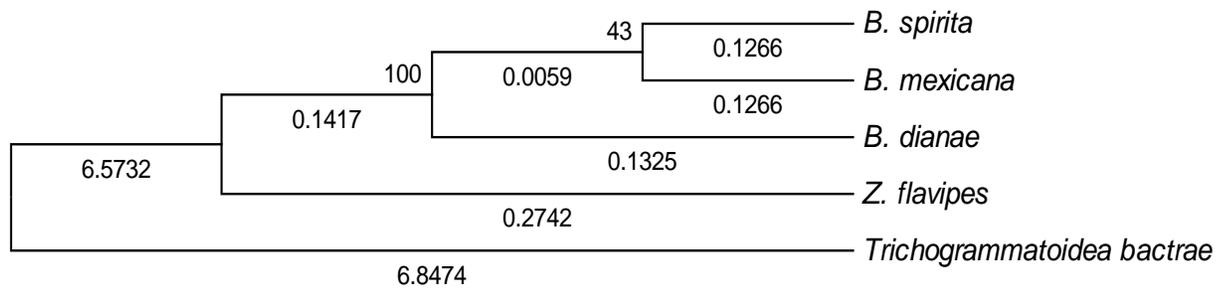


Figura 22. Árbol consenso UPGMA para especies de *Burksiella* y *Zagella*, región COII. Los valores de bootstrap para 1000 replicas son mostrados en los nodos.

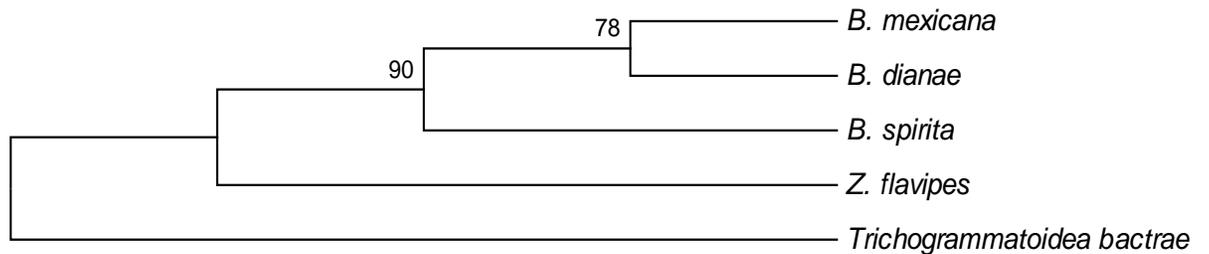


Figura 23. Árbol consenso de Máxima Parsimonia para especies de *Burksiella* y *Zagella*, región COII. Los valores de bootstrap para 1000 replicas son mostrados en los nodos.

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.

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*.

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

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*.

Especies	Regiones		
	18S ¹	ITS2 ²	COII ³
<i>B. spirita</i> - <i>B. mexicana</i>	0.01	0.29	0.25
<i>B. spirita</i> - <i>B. diana</i>	0.01	0.89	0.27
<i>B. mexicana</i> - <i>B. diana</i>	0.01	0.86	0.26
<i>B. diana</i> - <i>Z. flavipes</i>	0.26	0.93	0.59
<i>B. spirita</i> - <i>Z. flavipes</i>	0.27	0.85	0.47
<i>B. mexicana</i> - <i>Z. flavipes</i>	0.27	1.01	0.59

*Valores grupo externo

¹*Paracentrobia* 16.46-16.95

²*Ufens semifumipennis* 1.61-3.14

³*Trichogramma 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	-	-	-	<i>B. mexicana</i> y <i>B. diana</i>
	MP	644	0.90	0.89	0.88	<i>B. diana</i> y <i>B. spirita</i>
ITS2	UPGMA	3.2	-	-	-	<i>B. mexicana</i> y <i>B. spirita</i>
	MP	808	0.80	0.60	0.55	<i>B. mexicana</i> y <i>B. spirita</i>
COII	UPGMA	14.2	-	-	-	<i>B. mexicana</i> y <i>B. spirita</i>
	MP	251	0.68	0.44	0.40	<i>B. mexicana</i> y <i>B. diana</i>

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. diana*. *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.ncbi.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 carácter 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 válido 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 amplificadas 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 amplificadas por PCR y secuenciadas 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 *Alu1* 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. diana*e 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 *Alu1* 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 cacociae* 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. Wageningen 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: Cicadellidae) 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 faintof heart: 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. Sesión Ordinaria del Academia Nacional de Agronomía 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 Biológico. 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 análisis genético de fitopatógenos. *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 expansión 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 Mexicana* 28: 83-91.

Grissell, E and E. M. Schauff. 1990. *A Handbook of the Families of the Nearctic 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). *Proceedings 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: Mymaridae), 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* (Hymenoptera: 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* (Hemiptera-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. Descriptions 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 (Hymenoptera: 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 desert 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: Clypeorrhyncha: 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: Techniques in molecular systematics and Evolution. De Salle, R., G. Giribet A.W. Wheeler (eds.), Birkhäuser Verlag. Basel, Switzerland.

White, T.J., 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, Part 12. 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

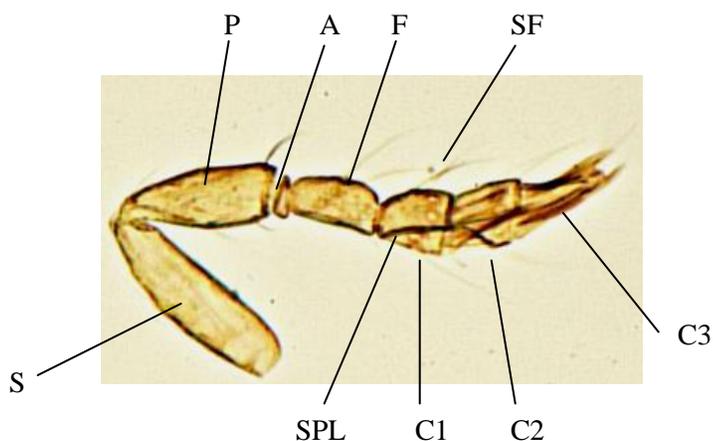


Figura 1. Antena. S= escapo; P= pedicelo; A= anelli (a1, a2, a3); F= funículo (f1, f2); C=clava (C1, C2, C3, C4); SPL= sensilas placoideas; SF= setas flagiliformes.

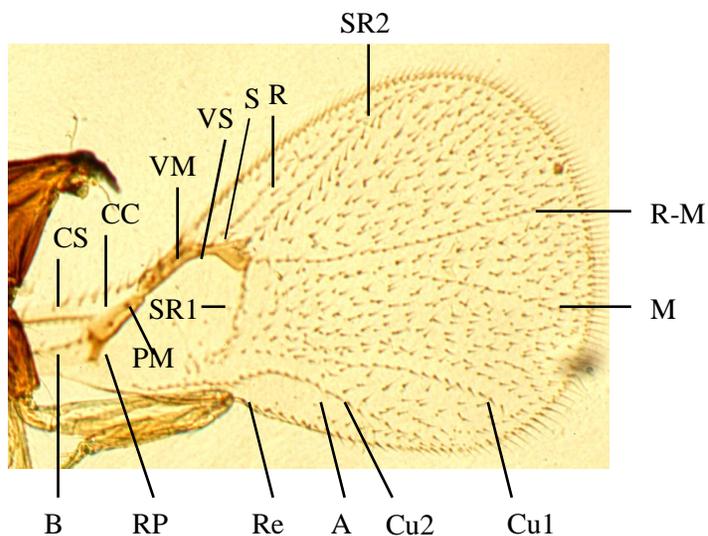


Figura 2. Ala anterior. SC= vena subcostal; CC= celda costal; PM= vena pre-marginal; MV= vena marginal; SV= vena estigmal; S=estigma; R= rádios; RP= proceso radial; B= línea de la veena basal; RS1= sector radial (vena abscisa 1); RS2= sector radial (vena

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.

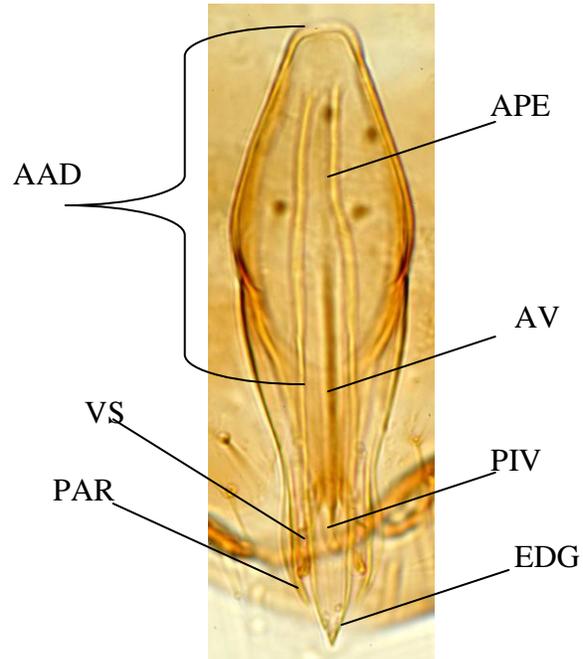


Figura 3. Genitalia del macho *Trichogramma* sp. AAD= apertura anterodorsal basal, APE= apodema edeagal, AV= anillo ventral, PIV= Proceso intervoselar, VS= voselas, PAR= Paramero, EDG= edeago (García 2006, Pinto 2006).

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.
4. 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.
6. 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.
8. 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, centríugar a 6000 x g (8000 rpm) por 1 minuto.
10. Agregar 500 ul de buffer AW 2, centríugar 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.
12. 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. Agregar 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	1♀	<i>Burksiella</i>
CIB 99-0040	Sin	Km2 Carretera El Dorado-Culiacán	16-09-99	1♀	<i>Burksiella</i>
CIB 99-0040	Sin	Km2 Carretera El Dorado-Culiacán	16-09-99	1♀	<i>Burksiella</i>
CIB 99-0040	Sin	Km2 Carretera El Dorado-Culiacán	16-09-99	1♂	<i>Burksiella</i>
CIB 99-0040	Sin	Km2 Carretera El Dorado-Culiacán	16-09-99	1♂	<i>Burksiella</i>
CIB 99-0040	Sin	Km2 Carretera El Dorado-Culiacán	16-09-99	1♀	<i>Burksiella</i>
CIB 99-0040	Sin	Km2 Carretera El Dorado-Culiacán	16-09-99	1♂	<i>Burksiella</i>
CIB 99-0040	Sin	Km2 Carretera El Dorado-Culiacán	16-09-99	1♀	<i>Burksiella</i>
CIB 99-0040	Sin	Km2 Carretera El Dorado-Culiacán	16-09-99	1♀	<i>Burksiella</i>
CIB 99-0040	Sin	Km2 Carretera El Dorado-Culiacán	16-09-99	1♂	<i>Burksiella</i>
CIB 99-0040	Sin	Km2 Carretera El Dorado-Culiacán	16-09-99	1♂	<i>Burksiella</i>
CIB 99-0040	Sin	Km2 Carretera El Dorado-Culiacán	16-09-99	1♀	<i>Burksiella</i>
CIB 99-0040	Sin	Km2 Carretera El Dorado-Culiacán	16-09-99	1♀	<i>Burksiella</i>
CIB 99-0040	Sin	Km2 Carretera El Dorado-Culiacán	16-09-99	1♀	<i>Burksiella</i>
CIB 99-0040	Sin	Km2 Carretera El Dorado-Culiacán	16-09-99	1♀	<i>Burksiella</i>
CIB 99-0040	Sin	Km2 Carretera El Dorado-Culiacán	16-09-99	1♀	<i>Burksiella</i> nr <i>spirita?</i>
CIB 99-0040	Sin	Km2 Carretera El Dorado-Culiacán	16-09-99	1♀	<i>Burksiella</i>
CIB 99-0040	Sin	Km2 Carretera El Dorado-Culiacán	16-09-99	1♂	<i>Burksiella</i> <i>nr spirita</i>
CIB 99-0040	Sin	Km2 Carretera El Dorado-Culiacán	16-09-99		?
CIB 99-0036	Sin	El Vergel	11-09-99	1♀	<i>Burksiella</i>
CIB 99-0036	Sin	El Vergel	11-09-99	1♂	<i>Burksiella</i>
CIB 99-0014	Dgo	Km 20 Carr. El Palmito	14-08-99	1♀	<i>B. nr.</i> <i>dianae?</i>
CIB 99-0023	Sin	Entronque de la carretera Campo Victoria con Costera	28-08-99	1♂	<i>Burksiella</i> <i>nr spirita</i>
CIB 96-006	Jal	San Francisco, Autlán 10 Km. N. Mezquitán	30-07-96	1♂	<i>Burksiella</i>

CIB 96-006	Jal	San Francisco, Autlán 10 Km. N. Mezquitán	30-07-96	1♂	<i>Burksiella</i>
CIB 96-006	Jal	San Francisco, Autlán 10 Km. N. Mezquitán	30-07-96	1♂	<i>Burksiella</i>
CIB 96-006	Jal	San Francisco, Autlán 10 Km. N. Mezquitán	30-07-96	1♂	<i>Burksiella</i> <i>nr.flavipes?</i>
CIB 96-006	Jal	San Francisco, Autlán 10 Km. N. Mezquitán	30-07-96	1♂	<i>Burksiella</i> <i>nr flavipes</i>
CIB 96-006	Jal	San Francisco, Autlán 10 Km. N. Mezquitán	30-07-96	1♀	<i>Bursiella</i>
CIB 96-007	Jal	San Francisco, Autlán 10 Km. N. Mezquitán	31-07-96	1♀	?
CIB 97-026	Tam	Ignacio Zaragoza		1♀	<i>Burksiella?</i>
CIB 97-026	Tam	Ignacio Zaragoza		1♂	<i>B. nr diana</i>
CIB 96-008	Jal	Est. Biol. Chamela, Antiguo Camino Norte	29-07-96	1♀	<i>Burksiella?</i>
CIB 96-008	Jal	Est. Biol. Chamela, Antiguo Camino Norte	29-07-96	1♀	<i>Z. Flavipes?</i>
CIB 96-008	Jal	Est. Biol. Chamela, Antiguo Camino Norte	29-07-96	1♂	<i>pseudouscan</i> <i>a?</i>
CIB 96-029	Mich	Morelia	16-07-96	1♀	<i>Burksiella</i>
CIB 99-0028	Sin	Vergel		1♀	<i>Burksiella</i> <i>nr flavipes</i>
157				1♂	<i>Burksiella</i>
157				1♀	<i>Burksiella</i>
157				1♀	<i>Burksiella</i>
157				1♀	<i>Burksiella</i>
144				1♂	<i>Burksiella</i>
222				1♀	<i>Burksiella</i>
110				1♀	<i>Burksiella</i>
110				1♀	<i>Burksiella</i>
110				1♀	<i>Burksiella</i>
155				1♀	<i>Burksiella</i>
151				1♀	<i>Burksiella</i>
CIB 99-0046	Sin	Km 21 Carretera Internacional a Presa Adolfo Lopez Mateos	09-10-99	1♀	<i>Zagella</i>
CIB 99-0036	Sin	El Vergel	11-09-99	1♀	<i>Zagella</i> <i>flavipes?</i>
CIB 99-0012	Dgo	2 Km W El Palmito	14-08-99	1♂	<i>Zagella</i>
CIB 99-0014	Dgo	Km 20 Carr. El Palmito	14-08-99	1♀	<i>Zagella</i>

CIB 97-026	Tam	Ignacio Zaragoza		1♀	Z. nr. flavipes?
123				1♂	Z. flavipes?
151				1♀	Zagella
CIB 99-0046	Sin	Km 21 Carretera Internacional a Presa Adolfo Lopez Mateos	09-10-99	1♀	Zagella?
CIB 99-0041	Sin	San Pedro Mpio. Navolato	16-09-99	1♀	?
CIB 99-0041	Sin	San Pedro Mpio. Navolato	16-09-99	1♀	?
CIB 99-0041	Sin	San Pedro Mpio. Navolato	16-09-99	1♀	?
CIB 96-008	Jal	Est. Biol. Chamela, Antiguo Camino Norte	29-07-96	1♀	Z. Flavipes?