



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**



**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA  
EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL  
CIIDIR IPN UNIDAD DURANGO**

Delimitación morfológica y genética de especies de parasitoides de  
*Spodoptera frugiperda* J. E Smith (Lepidoptera: Noctuidae) en la región maicera de  
Durango, México

**TESIS**

Que para obtener el Grado de:  
Doctora en Ciencias en Biotecnología

PRESENTA

María Berenice González Maldonado

Director

Dr. Miguel Mauricio Correa Ramírez

Co-Directora

Dra. Ninfa María Rosas García

Durango, Dgo., diciembre 2019.



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Durango, Dgo siendo las 10:30 horas del día 31 del mes de octubre del 2019 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación del: CIIDIR-IPN Unidad Durango para examinar la tesis titulada

Delimitación morfológica y genética de especies de parasitoides de Spodoptera frugiperda J. E. Smith (Lepidoptera:Noctuidae) en la región maicera de Durango, México

Presentada por la alumna

**GONZÁLEZ**

Apellido paterno

**MALDONADO**

Apellido materno

**MARÍA BERENICE**

Nombre(s)

Con registro: 

A	1	6	0	5	8	2
---	---	---	---	---	---	---

### DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGIA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS** en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes

### LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

  
Dr. Miguel Mauricio Correa Ramirez

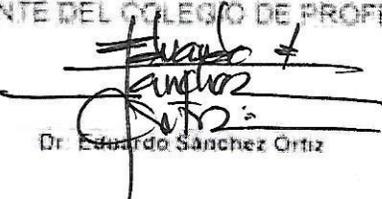
  
Dra. Ninfa Maria Rosas Garcia

  
Dr. Isayas Chairaz Hernandez

  
Dr. Enrique Ruiz Cancino

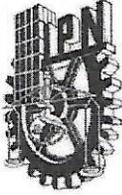
  
Dr. Marco Antonio Garzón Zuñiga

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

  
Dr. Eduardo Sánchez Ortiz



CENTRO INTERDISCIPLINARIO  
DE INVESTIGACIÓN PARA EL  
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL  
C.I.I.D.I.R.  
UNIDAD DURANGO  
I.P.N.



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS

México, D.F. a 25 de octubre del 2019

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-IPN Durango en su sesión Extraordinaria No. 5 celebrada el día 25 del mes de octubre conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

GONZÁLEZ

MALDONADO

MARÍA BERENICE

Apellido paterno

Apellido materno

Nombre (s)

Con registro: 

A	1	6	0	8	5	2
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de: Doctorado en Ciencias en Biotecnología

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:  
Delimitación morfológica y genética de especies de parasitoides de *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera:Noctuidae) en la región maicera de Durango, México

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:

2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:  
Dr. Miguel Mauricio Correa Ramírez y Dra. Ninfa María Rosas García

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesis será elaborado por el alumno en:  
El CIIDIR-IPN Unidad Durango

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

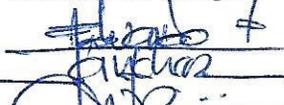
4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Directores de Tesis

  
Dr. Miguel Mauricio Correa Ramírez  
Aspirante

  
Dra. Ninfa María Rosas García

Presidente del Colegio

  
Dr. Eduardo Sánchez Ortiz

  
M. en C. María Berenice González  
Maldonado



CENTRO INTERDISCIPLINARIO  
DE INVESTIGACIÓN PARA EL  
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL  
C.I.I.D.I.R.  
UNIDAD DURANGO  
I.P.N.



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de Durango, Dgo., el día **31** del mes de **octubre** del año **2019** la que suscribe **María Berenice González Maldonado** alumna del Programa de **Doctorado en Ciencias en Biotecnología**, con número de registro **A160852**, adscrita al **Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Durango. CIIDIR-IPN Unidad Durango**, manifiesta que es el autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del **Dr. Miguel Mauricio Correa Ramírez** y de la **Dra. Ninfa María Rosas García** y cede los derechos del trabajo titulado **“Delimitación morfológica y genética de especies de parasitoides de *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera:Noctuidae) en la región maicera de Durango, México**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso de la autora y/o directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones **[bereciidir@hotmail.com](mailto:bereciidir@hotmail.com)**, **[miguel.m.correa.ramirez@gmail.com](mailto:miguel.m.correa.ramirez@gmail.com)** y **[nrosas@ipn.mx](mailto:nrosas@ipn.mx)**. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

  
\_\_\_\_\_  
MARÍA BERENICE GONZÁLEZ MALDONADO

## DEDICATORIA

**A los grandes pilares en mi vida:**

**Mi madre:** *Yolanda Maldonado*

**Mis hijos:** *Paulina, Alejandro, Fernando*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi Comité Tutorial por sus aportaciones y enseñanzas.

A la Dra. Juana María Coronado Blanco por su apoyo en la identificación taxonómica de algunas especies.

Al Director del CIIDIR-IPN Unidad Durango: Dr. Eduardo Sánchez Ortiz, por el apoyo Institucional brindado durante el desarrollo de mi tesis.

A la M en C. Martha Celina González Güereca y a Juanita Villarreal Márquez, por su invaluable amistad.

*Gracias!!*

El presente trabajo se realizó en:

Laboratorio de Entomología y Biología Molecular del CIIDIR Unidad Durango del  
Instituto Politécnico Nacional

## ÍNDICE DE CONTENIDO

GLOSARIO.....	I
LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS.....	IV
RESUMEN.....	V
ABSTRACT.....	VII
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
CAPÍTULO I. Parasitoides ( <i>Diptera: Tachinidae</i> ) del Gusano Cogollero <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. Smith) ( <i>Lepidoptera: noctuidae</i> ) en Maíz en Durango, México.....	2
1.1 Introducción.....	3
1.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	4
1.3.1 <i>Lespesia archippivora</i> , <i>L. aletiae</i> .....	4
1.3.2 <i>Archytas marmoratus</i> .....	5
1.3.3 <i>Winthemia deilephilae</i> .....	5
1.4 Referencias Citadas.....	6
CAPÍTULO II. Nuevos registros de braconidos parasitoides de gusano cogollero <i>Spodoptera frugiperda</i> ( <i>Lepidoptera: Noctuidae</i> ) en Durango, México.....	10
2.1 Introducción.....	11
2.2 Materiales y métodos.....	12
2.2.1 Material Biológico.....	12
2.2.2 Identificación Taxonómica.....	12
2.3 Resultados y discusión.....	13
2.3.1 Identificación Morfológica.....	13
2.3.2 <i>Meteorus laphygmae</i> Viereck, 1913.....	13
2.3.3 <i>Meteorus arizonensis</i> Muesebeck, 1923.....	15
3.1 Introducción.....	22
3.2 Materiales y Métodos.....	23
3.2.1 Material Biológico.....	23
3.2.2 Extracción de ADN.....	24
3.2.3 Amplificación y Secuenciación.....	26
3.2.4 Análisis Moleculares.....	26
3.3 Resultados y Discusión.....	28
3.3.1 Identificación Fenotípica.....	28

3.3.2 Análisis Molecular .....	28
3.4 Referencias Citadas .....	32
4.1 INTRODUCCIÓN .....	39
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
4.2.1 Material biológico .....	40
4.2.2 Aislamiento de ADN .....	41
4.2.3 Amplificación y Secuenciación.....	43
4.2.4 Análisis Molecular .....	43
4.3 Resultados y Discusión .....	44
4.3.1 Identificación Fenotípica .....	44
4.3.2 Análisis Molecular .....	45
CONCLUSIONES GENERALES .....	53

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1. Datos de colecta y número de acceso del GenBank de los ejemplares analizados.....	25
Tabla 4.1. Fechas y sitios de colecta de gusano cogollero, primavera-verano (2015-2017).....	42
Tabla 4.2. Datos de colecta de los individuos analizados taxonómicamente, las especies a las que pertenecen y código de acceso en el GenBank® .....	45
Tabla 4.3. Distancias genéticas dentro de (mitad inferior) y entre especies (diagonales). Las distancias genéticas se calcularon con un modelo de sustitución de parámetros Kimura 2. .	47

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Adulto de <i>Meteorus laphygmae</i> ♀ (vista lateral). .....	14
Figura 2. 2. Variaciones morfológicas en adultos de <i>M. arizonensis</i> (a ♂, b-c ♀) (vista frontal y lateral).....	16
Figura 3.1. Árbol filogenético que muestra la comparación de grupos de <i>Chelonus</i> sp. ....	29
Figura 3.2. Red haplotípica y matriz de distancias entre especies de <i>Chelonus</i> . ....	31
Figure 4.1. Dendrograma del vecino más cercano en morfotipos de <i>Meteorus</i> sp. ....	46

## GLOSARIO

**Análisis molecular de varianza (AMOVA):** método estadístico para probar diferencias genéticas entre grupos o poblaciones que se basa en el análisis de varianza de las frecuencias genotípicas.

**Biotipos:** es el conjunto de fenotipos que corresponden al mismo genotipo. Un biotipo es el grupo de individuos que poseen el mismo genotipo.

**Carácter taxonómico:** es todo atributo, rasgo o característica que hace posible diferenciar a un ser de otro, como también agruparlos por la presencia de atributos comunes. Los caracteres pueden referirse a la forma, la estructura, la función y el comportamiento de los individuos.

**Citocromo c oxidasa I:** es una proteína, que funciona como transportador electrónico mitocondrial entre los complejos respiratorios III y IV. Se trata de una proteína monomérica, es decir con un solo polipéptido; unido a esta estructura hay un grupo prostético constituido por un hemo C, es decir, una protoporfirina IX con un ion de hierro coordinado. El grupo prostético porfirínico está unido a la proteína covalentemente, a través de dos cisteínas. El grupo prostético aparece inmerso en el interior de la estructura, en un entorno hidrofóbico.

**Clado:** es un grupo de organismos que incluye un ancestro y todos sus descendientes. Es una clasificación filogenética, basada en relaciones evolutivas.

**Diversidad genética:** grado de variación genética en una población, especie o entre un grupo de especies medido en heterocigocidad, diversidad alélica o heredabilidad.

**Dimorfismo sexual:** son las variaciones en la fisonomía externa, como forma, coloración o tamaño, entre machos y hembras de una misma especie. Se presenta en la mayoría de las especies, en mayor o menor grado.

**Especie:** es el conjunto o la población natural de individuos (seres humanos, animales, plantas) que tienen características semejantes o en común y son capaces de reproducirse entre sí, creando descendencia fértil.

**Filogenia:** es la historia evolutiva de un grupo de organismos relacionados. Está representada por un árbol filogenético que muestra cómo las especies están relacionadas entre sí a través de ancestros comunes.

**Gen o genoma mitocondrial (ADNmt):** es el material genético de las mitocondrias, los organelos que generan energía para la célula. El ADN mitocondrial se reproduce por sí mismo semi-autónomamente cuando la célula eucariota se divide.

**Koinobionte (cenobiontes):** la hembra del parasitoide no mata al hospedador, y es la larva quien le produce la muerte, en el momento de realizarse la puesta. En muchos casos los koinobiontes no paralizan al hospedero durante la oviposición. Muchos koinobiontes pueden no alimentarse de órganos vitales del hospedero para lograr completar su desarrollo.

**Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):** método utilizado para realizar copias de segmentos específicos de ADN, donde el ADN es desnaturalizado por aumento de temperatura, se añaden regiones flanqueantes u oligonucleótidos y la secuencia es copiada por medio de una enzima termoestable (*Taq*).

**Parasitoide:** es un organismo cuyas larvas se alimentan y desarrollan en el interior (endoparásitos) o en la superficie (ectoparásitos) del cuerpo de otro artrópodo. Cada larva de parasitoide se desarrolla en un solo individuo o huésped al que termina matando. El parasitoide adulto es un insecto de vida libre que puede ser tanto herbívoro como depredador. La mayor parte de los parasitoides descritos son avispas (Hymenoptera), también existen moscas parasitoides (Diptera), unas pocas especies de escarabajos (Coleoptera), polillas (Lepidoptera), neurópteros (Neuroptera), e incluso se ha descrito una especie de tricóptero (Trichoptera) parasitoide.

**Patrones clinales:** clina o cline (o incluso variación clinal) representa el cambio gradual de rasgos fenotípicos de una misma especie por influjos y condiciones medioambientales.

**Variabilidad genética:** se refiere a la diversidad en las frecuencias de los genes. La variabilidad genética puede referirse a las diferencias entre individuos o las diferencias entre poblaciones. Las mutaciones son la causa fundamental de la variabilidad genética, pero mecanismos tales como la reproducción sexual y la deriva genética también contribuyen a la misma.

## LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS

<b>ADNmt</b>	Gen mitocondrial
<b>AMOVA</b>	Análisis molecular de varianza
<b>COI</b>	Gen mitocondrial citocromo c oxidasa I
<b>Cytb</b>	Citocromo b
<b>F<sub>ST</sub></b>	Índice de fijación de FU
<b>GenBank</b>	Base de datos del banco genético
<b>h</b>	haplotipos
<b>Nm</b>	Número de migrantes por generación
<b>P</b>	Haplotipos privados
<b>p</b>	Diversidad de nucleótidos
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>SSD</b>	Suma de los cuadrados de desviación

## RESUMEN

El maíz es uno de los principales cultivos agrícolas en el Estado de Durango, México y es seriamente afectado por el gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* J. E Smith, 1797 (Lepidoptera: Noctuidae). Una alternativa para el control biológico de este insecto es el uso de parasitoides. Estos parasitoides pertenecen a las familias Braconidae y Tachinidae del orden Hymenoptera y si bien son ampliamente utilizados su taxonomía es bastante compleja debido a la falta de información de los caracteres morfológicos completos. Para poder clasificar a estas especies utilizadas es necesario el estudio de caracteres genéticos para estimar la variación dentro de las poblaciones y especies. Los resultados indicaron que los individuos estudiados pertenecen a los géneros *Chelonus*, *Microchelonus*, *Meteorus*, *Homolobus* (Braconidae), *Winthemia*, *Archytas* y *Lespesia* (Tachinidae). Estos fueron identificados morfológicamente mediante claves taxonómicas y por comparación con colecciones de referencia. Para la familia Braconidae se realizó la extracción y amplificación de ADN por PCR así como la secuenciación de un fragmento de la subunidad I del gen de la citocromo oxidasa *c* (COI). En *Chelonus* sp., se observó variabilidad morfológica en *Ch. insularis* y *Ch. sonorensis* (mostraron ocho morfotipos). Las distancias genéticas entre los morfotipos y entre las especies *Ch. insularis* y *Ch. sonorensis* fue de 0.03%, lo que indica que probablemente pertenecen al mismo linaje. La distancia genética entre *Ch. cautus* y las especies antes mencionadas fue de 0.178%, lo que muestra a una especie diferente, reclasificándose como *Microchelonus cautus*. En *Meteorus* se encontraron dos especies que no han sido reportadas para Durango: *M. laphygmae* y *M. arizonensis* (nueve morfotipos), sin embargo, la distancia genética entre los morfotipos encontrados podrían indicar que se trata de una sola especie (0.05%). Estos resultados mostraron la alta variabilidad morfológica y genética en estos braconidos, debido probablemente a cambios evolutivos y climáticos. En la familia Tachinidae

las características morfológicas correspondieron a las encontradas en las claves taxonómicas. Se reportan cuatro nuevas especies para Durango, una de ellas: *Winthemia deilephidae*, es nuevo reporte como parasitoide de gusano cogollero, lo cual contribuye al conocimiento de la biodiversidad de estos parasitoides en el Estado.

## ABSTRACT

Corn is one of the main agricultural crops in the State of Durango, Mexico and is seriously affected by the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* J. E Smith, 1797 (Lepidoptera: Noctuidae). An alternative for the biological control of this insect is the use of parasitoids. These parasitoids belong to the Braconidae and Tachinidae families of the Hymenoptera order and although they are widely used their taxonomy is quite complex due to the lack of information on the complete morphological characters. In order to classify these used species it is necessary to study genetic characters to estimate the variation within populations and species. The results indicated that the individuals studied belong to the genera *Chelonus*, *Microchelonus*, *Meteorus*, *Homolobus* (Braconidae), *Winthemia*, *Archytas* and *Lespesia* (Tachinidae). These were morphologically identified by taxonomic keys and by comparison with reference collections. For the Braconidae family, DNA extraction and amplification was performed by PCR as well as the sequencing of a fragment of the cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene. In *Chelonus* sp., morphological variability was observed in *Ch. insularis* and *Ch. sonorensis* (showed eight morphotypes). The genetic distances among the morphotypes and between *Ch. insularis* and *Ch. sonorensis* species were 0.03%, indicating that they probably belong to the same lineage. The genetic distance between *Ch. cautus* and the previously mentioned species was 0.178%, indicating a different species, reclassified as *Microchelonus cautus*. Two species from *Meteorus* were found not been previously reported for Durango: *M. laphygmae* and *M. arizonensis* (nine morphotypes), however, the genetic distance among the morphotypes found could indicate a single species (0.05%). These results showed the high morphological and genetic variability in these braconids, probably due to evolutionary and climatic changes. In the family Tachinidae the morphological features corresponded to those found in the taxonomic keys. Four new species are reported for Durango, *Winthemia*

*deilephidae*, is reported as a new fall armyworm parasitoid. This finding contributes to the knowledge of the biodiversity of these parasitoids in the State.

## INTRODUCCIÓN GENERAL

En México y otros países de América, así como de África y Asia, el gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith, 1797 (Lepidoptera: Noctuidae) es la plaga que mayores daños causa al cultivo de maíz en sus primeras etapas de desarrollo. Para su control es necesario implementar acciones compatibles con el medio ambiente y que sean eficientes dentro de los programas de control biológico. Entre ellas se encuentran los enemigos naturales como los parasitoides, que pertenecen a las familias Tachinidae y Braconidae. Su distribución se debe a la diversidad de sus huéspedes, a los cambios ambientales y regiones geográficas que habitan, sin embargo su taxonomía es hasta cierto punto incierta. El hallazgo de morfotipos en estas especies podría indicar la presencia de especies clinales o nuevas especies. La complejidad en la identificación de las especies de estos géneros se debe principalmente a los caracteres que comparten con individuos de distintas especies o en las diferencias entre individuos de la misma especie (polimorfismos o patrones de color) y que básicamente las claves taxonómicas disponibles se basan principalmente en patrones de color para separar especies. Los reportes indican que sólo se ha realizado la identificación parcial de parasitoides del gusano cogollero en el estado de Durango, Méx., por lo que el objetivo de este trabajo fue delimitar morfológica y genéticamente diversos individuos de braconidos y taquinidos parasitoides del gusano cogollero en maíz en el estado de Durango México.

**CAPÍTULO I. PARASITOIDES (DIPTERA: TACHINIDAE) DEL GUSANO  
COGOLLERO *SPODOPTERA FRUGIPERDA* (J. E. SMITH) (LEPIDOPTERA:  
NOCTUIDAE) EN MAÍZ EN DURANGO, MÉXICO**

## 1.1 INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L.) es el cultivo agrícola anual más importante en México (FAO 2017). La presencia de plagas es un grave problema fitosanitario en este cultivo, siendo el gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) la especie que causa mayores daños cuando no se realizan medidas de control (Blanco et al. 2014). En el Estado de Durango, en los últimos cinco años se han realizado estudios para conocer la diversidad de himenópteros parasitoides de esta plaga, obteniendo hasta el momento especies de Braconidae, Ichneumonidae, y Eulophidae así como su incidencia en el cultivo, presentándose de forma natural todos los años (García-Gutiérrez et al. 2013, González-Maldonado et al. 2014). Dentro del grupo de parasitoides además se encuentra el Orden Diptera, siendo la familia Tachinidae la segunda familia más diversa. En este trabajo se registra la diversidad de especies de taquínidos parasitoides presentes en la región maicera del Estado de Durango, debido a que son pocos los estudios que se han realizado para su identificación taxonómica y genética, así como para conocer la frecuencia y abundancia de estas especies en el cultivo.

## 1.2. MATERIALES Y MÉTODOS

En el periodo del 16 de junio al 31 de agosto del 2016 se realizaron colectas semanales de larvas de gusano cogollero en maíz durante la etapa fenológica de verticilo con signos de presencia de la plaga, en siete sitios de la Región de los Valles y los Llanos: Francisco I. Madero, Canatlán, Col. Minerva, La Ferrería, Guadalupe Victoria, Dolores Hidalgo, y Villa Montemorelos, Durango, México, cuya superficie cubre 540,000 ha equivalentes al 4.5% de la superficie del estado (González-Elizondo et al. 2007, García-Gutiérrez et al. 2013). Las larvas de gusano cogollero fueron colocadas en vasos de plástico con 8 g de dieta artificial (Ashby

1972) y trasladados al laboratorio de entomología CIIDIR-IPN Unidad Durango en donde se mantuvieron (25-27°C, 60% de HR, fotoperiodo 10:14 L:O) hasta completar su ciclo biológico. Los parasitoides emergidos fueron preservados en alcohol etílico al 70%, después fueron montados en alfileres entomológicos. Se identificaron con apoyo de las claves taxonómicas de Wood (1987), Toma (2006), Ravlin and Stehr (1934), y Guimarães (1960, 1961a,b, 1963a,b, 1972). Las determinaciones fueron corroboradas por la Dra. D. A. Hernández-Zetina, especialista de Tachinidae en México.

### 1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De 2,100 larvas de gusano cogollero colectadas, 202 fueron parasitadas por taquínidos, con 6.8% de parasitismo por *Lespesia aletiae* (Riley 1879) y *L. archippivora* (Riley 1871), el 2.48% como *Archytas marmoratus* (Townsend 1915), y el 0.28% de *Winthemia deilephilae* (Osten Sacken 1887). Resultados similares fueron reportados para el Estado de Tamaulipas por Covarrubias-Dimas et al. (2000), quienes encontraron a *A. marmoratus* y *L. archippivora* con un 10.15% y un 3% de parasitismo máximo, considerando de igual manera el total de larvas de gusano cogollero muestreadas en maíz. En México, los géneros *Archytas* y *Winthemia* han sido reportados parasitando a *S. frugiperda* en maíz y arroz (*Oriza zativa* L.) (Molina-Ochoa 2003).

#### 1.3.1 *Lespesia archippivora*, *L. aletiae*

Constituyen nuevos registros para el Estado de Durango, son pocos los reportes que se tienen de *L. aletiae* parasitando a gusano cogollero (Cardoza et al. 1997, CNRCB 1999). Ceolin et al. 2015 lo encontraron parasitando a *Mythimna unipuncta* (Haworth 1809), lepidóptero similar en hábitos al gusano cogollero pero ubicado en diferente área geográfica (Brasil). La abundancia de *L. aletiae* como de *L. archippivora* fue notable, emergieron hasta cinco moscas por hospedero, se presentaron en seis de los siete sitios muestreados, siendo más abundantes en el

municipio de Gpe. Victoria, donde se encontraron 64 individuos, el pico máximo de población se presentó el 30 de junio en ambas especies, además estuvieron presentes en julio y agosto. *L. archippivora* se ha reportado para México por Molina-Ochoa et al. (2003), en particular para Tamaulipas, Yucatán, Chiapas, Morelos, y Sonora (Covarrubias-Dimas et al. 2000, Delfín-González et al. 2007, Ruíz-Nájera et al. 2008, Bahena-Juárez et al. 2010, Cortez-Mondaca et al. 2010), el género *Lespesia* se ha encontrado en Chiapas, Chihuahua, Sinaloa, y Oaxaca aunque se desconocen las especies presentes (Carrillo-Sánchez 1993, Cortez-Mondaca et al. 2010, Cruz-Sosa et al. 2010, Ordoñez-García et al. 2015).

### **1.3.2 *Archytas marmoratus***

En Durango se ha encontrado en menor abundancia que el género *Lespesia*, pero no se colectó en el municipio de Gpe. Victoria, se presentó en los tres meses muestreados (junio-agosto), en seis de los siete sitios, este parasitoides ya había sido encontrado para Durango por Fregoso-Madueño (2012). En México, *A. marmoratus* se encuentra distribuido en Tamaulipas (Covarrubias-Dimas et al. 2000), Yucatán (Delfín-González et al. 2007), Nayarit (Estrada-Virgen et al. 2013), Coahuila (Ríos-Velasco et al. 2011), Morelos (Bahena-Juárez et al. 2010), y Chiapas (Ruíz-Nájera et al. 2008). De acuerdo a Molina-Ochoa et al. (2003), *A. marmoratus*, *A. incertus* (Macquart 1851), y *A. analis* (Fabricius 1805) son las especies de *Archytas* que predominan como parasitoides del gusano cogollero en México.

### **1.3.3 *Winthemia deilephilae***

Constituye un nuevo registro para Durango y es además un nuevo registro de hospedero para *S. frugiperda*. En Durango, *W. deilephilae* fue la especie menos frecuente y menos abundante, solo seis individuos en tres de los siete sitios muestreados. El CNRCB (1999) reporta otras especies de este género como parasitoides de gusano cogollero: *W. quadrispustulata* (Fabricius, 1794), tentativamente también encontrada en Yucatán (Delfín-González et al. 2007), *W.*

*reliqua* (Cortes & Campos 1971), y *W. rufopicta* (Bigot 1889). El género ha sido reportado para Chiapas y Yucatán (Carillo-Sánchez 1993, Delfín-González et al. 2007, Ruíz-Nájera et al. 2008), así como para México en general (Molina-Ochoa et al. 2003).

#### 1.4 REFERENCIAS CITADAS

- Ashby, G. 1972. The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals, pp. 582-587. *In* A. N. Worden and W. Lane-Petter [eds.], The Universities Federation for Animal Welfare, London.
- Bahena-Juárez, F., E. de Lange, K. Farnier, E. Cortez-Mondaca, R. Sánchez-Martínez, F. García-Pérez, M. Miranda-Salcedo, T. Degen, B. Gaudillat, y R. Aguilar-Romero. 2010. Parasitismo en gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) en el Centro de México, pp. 204-209. *En* Memorias XXXIII Congreso Nacional de Control Biológico. Uruapan, Michoacán, México.
- Blanco, C. A., J. G. Pellegaud, U. Nava-Camberos, D. Lugo-Barrera, P. Vega-Aquino, J. Coello, A. P. Teran-Vargas, and J. Vargas-Camplis. 2014. Maize pests in Mexico and challenges for the adoption of integrated pest management programs. *J. Integr. Pest. Manag.* 5: 1-9.
- Cardoza, J. Y., N. Y. Epsky, and R. R Heath. 1997. Biology and development of *Lespesia aletiae* (Diptera: Tachinidae) in two lepidopteran species in the laboratory. *Fla. Entomol.* 80: 289-300.
- Carrillo-Sánchez, J. L. 1993. Síntesis de control biológico de *Heliothis* spp. y *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae) en México. *Folia Entomol. Mex.* 87: 85-93.
- Ceolin, B., A. Menezes, A. Thibes, and G. Salgado-Neto. 2015. Incidência de parasitismo de *Mythimna sequax* em lavoura de trigo. *Cienc. Rural.* 45: 2121-2124.

- CNRCB. 1999. Sistema de producción del gusano cogollero (Lepidoptera: Noctuidae) y su parasitoide *Chelonus insularis* (Hymenoptera: Braconidae). Ficha Técnica CB-17.
- Cortez-Mondaca, E., I. Armenta-Cárdenas, y F. Bahena-Juárez. 2010. Parasitoides y porcentaje de parasitismo sobre el gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) en el Sur de Sonora, México. *Southwest Entomol.* 35: 199-203.
- Covarrubias-Dimas, C. A., E. Ruíz-Cancino, y S. G. Hernández-Aguilar. 2000. Especies de Tachinidae (Diptera) parasitoides del gusano cogollero en dos municipios de Tamaulipas, México, pp. 702-704. *En Memoria XXXV Congreso Nacional de Entomología*. Acapulco, Guerrero, México.
- Cruz-Sosa, E. 2010. Evaluación del parasitismo natural en *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) en maíz. Tesis de maestría, CIIDIR IPN Unidad Oaxaca.
- Delfín-González, H., M. Bojórquez-Acevedo, and P. Manrique-Saide. 2007. Parasitoids of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) from a traditional maize crop in the Mexican state of Yucatan. *Fla. Entomol.* 90: 759-760.
- Estrada-Virgen, O., J. Cambero-Campos, A. Robles-Bermúdez, C. Ríos-Velasco, C. Carvajal-Cazola, N. Isiordia-Aquino, and E. Ruíz-Cancino. 2013. Parasitoids and entomopathogens of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Nayarit, Mexico. *Southwest Entomol.* 38: 339-344.
- FAO. 2017. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. <http://www.fao.org/in-action/agronoticias/detail/fr/c/1045647/> (Fecha de consulta: 6 Noviembre 2017).
- Fregoso-Madueño, J. E. 2012. Evaluación del porcentaje de parasitismo natural de gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* L. (Smith) en cuatro regiones productoras de maíz en el Estado de Durango. Tesis de maestría, Facultad de Ciencias Forestales, UJED.
- García-Gutiérrez, C., M. B. González-Maldonado, y A. González-Hernández. 2013. Parasitismo natural de Braconidae e Ichneumonidae (Hymenoptera) sobre

- Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Rev. Colomb. Entomol. 39: 211-215.
- González-Elizondo, Y., M. González-Elizondo, y M. Márquez-Linares. 2007. Vegetación y eco regiones de Durango. IPN, México.
- González-Maldonado, M. B., C. García-Gutiérrez, y A. González-Hernández. 2014. Parasitismo y distribución de *Campoletis sonorensis* Cameron (Hymenoptera: Ichneumonidae) y *Chelonus insularis* Cresson (Hymenoptera: Braconidae), parasitoides del gusano cogollero en maíz en Durango. *Vedalia*15: 47-53.
- Guimarães, J. H. 1960. Contribuição ao conhecimento do genero *Archytas* Jaennicke, 1867 (Diptera: Tachinidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz 58: 115-124.
- Guimarães, J. H. 1961a. Segunda contribuição ao conhecimento do genero *Archytas* Jaennicke, 1867 (Diptera: Tachinidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz 59: 163-179.
- Guimarães, J. H. 1961b. Terceira contribuição ao conhecimento do genero *Archytas* Jaennicke, 1867 (Diptera: Tachinidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz 59: 355-396.
- Guimarães, J. H. 1963a. Quarta contribuição ao conhecimento do genero *Archytas* Jaennicke, 1867 (Diptera: Tachinidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz 61: 153-164.
- Guimarães, J. H. 1963b. Fifth contribuição to the knowledge\_of genus *Archytas* Jaennicke, 1867 (Diptera: Tachinidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz 61: 329-340.
- Guimarães, J. H. 1972. A revision of the genus *Winthemia* Robineau-Desvoidy in America North of Mexico (Diptera: Tachinidae). Arq. Zool. 22: 27-112.
- Molina-Ochoa, J., J. E. Carpenter, E. A. Heinrichs, and J. E. Foster. 2003. Parasitoids and parasites of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas and Carribean basin: an inventory. Fla. Entomol. 86: 254-289.

- Ordoñez-García, M., J. C. Bustillos-Rodríguez, J. Loya-Márquez, C. Ríos-Velasco, y J. L. Jacobo-Cuellar. 2015. Parasitoides de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) en Chihuahua, México. MES. 10: 67-78.
- Ravlin, F. W., and F. W. Stehr. 1984. Revision of the genus *Archytas* (Diptera: Tachnidae) of America north of Mexico. Entomol. Soc. Am. 58: 1-59.
- Ríos-Velasco, C., G. Gallegos-Morales, M. C. Del Rincón-Castro, K. A. Ulloa-Rubio, J. Cambero-Campos, y R. D. Valenzuela-García. 2011. Primer registro de *Archytas marmoratus* y *Voria rurales* (Diptera: Tachnidae) y sus niveles de parasitismo en dos lepidópteros plaga en Coahuila, México. Acta Zool. Mex. 27: 577-582.
- Ruíz-Nájera, R. E., J. Molina-Ochoa, J. E. Carpenter, J. A. Espinoza-Moreno, and J. A. Ruíz-Nájera. 2007. Survey for hymenopteran and dipteran parasitoids of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) in Chiapas, Mexico. J. Agric. Urban Entomol. 24: 35-42.
- Toma, R. 2006. Contribuição ao conhecimento de espécies venezuelanas de *Lespesia* Robineau-Desvoidy (Diptera, Tachinidae, Exoristinae), com descrições de novas espécies. Rev. Bras. Entomol. 54: 165-172.
- Wood, D. M. 1987. Tachinidae, pp. 1193-1269. In J. F. McAlpine, B. V. Peterson, G. E. Shewell, H. J. Teskey, J. R. Vockeroth, and D. M. Wood [eds.], Manual of Nearctic Diptera. Agric. Can. Monogr. 28: 675-1332.

**CAPÍTULO II. NUEVOS REGISTROS DE BRACÓNIDOS PARASITOIDES DE  
GUSANO COGOLLERO *SPODOPTERA FRUGIPERDA* (LEPIDOPTERA:  
NOCTUIDAE) EN DURANGO, MÉXICO**

## 2.1 INTRODUCCIÓN

Los parasitoides de la familia Braconidae después de Ichneumonidae representan la familia de mayor riqueza taxonómica del orden Hymenoptera (Coronado y Zaldívar 2014). A nivel mundial se reconocen 45 subfamilias, 1,103 géneros y 21,221 especies válidas de Braconidae (Yu *et al.* 2016). En México aunque se han realizado en los últimos años intentos importantes de clasificar y describir especies de esta familia, se encuentran solo 36 subfamilias, 319 géneros, 707 especies determinadas y 845 morfoespecies (Coronado 2013).

Dentro de esta familia se encuentra el género *Meteorus* Haliday, 1835, parasitoides koinobiontes de coleópteros y lepidópteros, compuesto por 356 especies descritas (Aguirre *et al.* 2015; Yu *et al.* 2016). Para la región Neártica se han reportado 37 especies de *Meteorus*, tres de ellos como parasitoides de gusano cogollero (Gutiérrez *et al.* 2015a; Yu *et al.* 2016), sin embargo, en Durango, hasta el momento se han registrado únicamente dos morfoespecies de *Meteorus* (García *et al.* 2013) y la especie *Meteorus laphygmae* Viereck, 1913 (Bahena 2008).

La complejidad en la identificación de las especies de este género se debe principalmente a los caracteres que comparten entre individuos de distinta especie o en las diferencias entre individuos de la misma especie (polimorfismos o patrones de color). En Durango hasta el momento sólo se ha realizado la identificación parcial de parasitoides del género *Meteorus* que tienen como hospedero a gusano cogollero, por lo que el objetivo de este trabajo fue realizar un estudio más detallado con la finalidad de conocer las especies de braconidos parasitoides del gusano cogollero en maíz en el Estado.

## 2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.2.1 Material Biológico

El estudio se realizó en la región de los Valles, Los Llanos y las Quebradas del estado de Durango a altitudes entre 1,840 y 2,316 msnm (seis municipios: Guadalupe Victoria, Pánuco de Coronado, Santiago Papasquiaro, Mezquital, Canatlán y Durango y ocho localidades: Morcillo, Col. Minerva, Francisco I. Madero, J. Guadalupe Aguilera, Col. Hidalgo, Carr. Mazatlán y La Ferrería, Durango), ubicados entre la latitud-longitud 24.9636N-105.4190 y 23.959N-104.804N. Las recolectas de larvas de los primeros estadios de gusano cogollero se realizaron cada año en los ciclos primavera-verano 2014 a 2017, en cultivos de maíz, donde no se aplicaron insecticidas químicos, éstas se depositaron de forma individual en vasos de plástico con dieta artificial (Ashby 1972) en una cámara de cría (25 a 27 °C, 60 % de H. R., fotoperiodo 10:14 L: O) en el CIIDIR-IPN Unidad Durango, hasta que alcanzaron su desarrollo completo o emergió el parasitoide.

### 2.2.2 Identificación Taxonómica

Se usaron las claves taxonómicas de Wharton *et al.* (1997) y la clasificación taxonómica según Yu *et al.* (2016). La identificación de especies de *Meteorus* fue corroborada a través de la comparación del material preservado con especímenes de referencia de la Colección de insectos del Museo MIFA de la Universidad Autónoma de Tamaulipas y del Colegio de Posgraduados, además se utilizaron las diagnósis publicadas en Aguirre *et al.* (2011, 2015), Muesebeck (1923).

## 2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.3.1 Identificación Morfológica

Se colectaron un total de 7,867 larvas, de las cuales emergieron 929 parasitoides: 669 himenópteros y 260 dípteros, de ellos se analizaron 56 especímenes (29/2014, 12/2015, 2/2016 y 13/2017), cuatro de la subfamilia Homolobinae (resultados no mostrados en este trabajo) y 52 de la subfamilia Euphorinae, 31 presentaron todos los caracteres taxonómicos de pertenecer a *Meteorus arizonensis* Muesebeck, 1923 y 21 parasitoides coincidieron con la diagnosis de *M. laphygmae*. A continuación se presenta su distribución a nivel mundial y en México, así como algunos aspectos de su biología.

### 2.3.2 *Meteorus laphygmae* Viereck, 1913

**Distribución mundial.** Estados Unidos (Louisiana, Nuevo México, Tennessee, Texas; introducida a Florida y Hawaii), México, Costa Rica, Nicaragua, Honduras, Surinam, Brasil, Chile, Colombia, Venezuela, Región Neártica, Neotropical y Oceánica (Yu *et al.* 2016).

**Distribución en México.** Baja California, Chiapas, Chihuahua, Ciudad de México, Coahuila. Colima (ex *S. frugiperda*), Durango (ex *S. frugiperda*), Estado de México, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Michoacán (ex *S. frugiperda*), Morelos, Nayarit (ex *S. frugiperda*), Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Sinaloa [ex *S. exigua* (Hübner)]; Sonora, Puebla, Tamaulipas (ex *S. frugiperda*), Veracruz, Yucatán (Alvarado 1987; Carrillo 1993; Molina *et al.* 2001; 2003; Coronado *et al.* 2004; Hoballah 2004; Bahena 2008; Jourdie *et al.* 2008; González *et al.* 2011; Rodríguez *et al.* 2014; Gutiérrez *et al.* 2015b; Villegas *et al.* 2015).

**Distribución en Durango.** Registrado por Bahena (2008) sin localidad exacta. Se registra para Col. Minerva, Francisco I. Madero, Guadalupe Victoria, La Ferrería y Santiago Papasquiario (nuevos registros) (Fig. 4.1).



Figura 2.1. Adulto de *Meteorus laphygmae* ♀ (vista lateral).

**Material examinado.** 21 parasitoides, todos hembras. México. Durango, colectados en cultivos de maíz, Col. Minerva, 1,881 msnm, 21/VIII/14 (3♀), 23/VI/15 (2♀), 3/VIII/15 (1♀), 22/VIII/16 (1♀); Francisco I. Madero, Pánuco de Coronado, 1.891 msnm, 7/VIII/14 (3♀), 30/VI/15 (1♀); Guadalupe Victoria, 2.018 msnm, 9/VII/14 (1♀), 30/VI/15 (1♀); La Ferrería, Sebastián Lerdo de Tejada, 1,894 msnm, 8/VIII/14 (1♀); Santiago Papasquiario, 1,840 msnm, 12/VIII/14 (2♀), 26/VIII/14 (5♀), coll. M.B. González-Maldonado.

**Comentarios.** El mayor número de parasitoides se colectó de la Col. Minerva y Santiago Papasquiario (7 en cada uno). *M. laphygmae* tuvo un desarrollo similar a *M. arizonensis*, pero sus características morfológicas fueron diferentes, la más representativa fue el color amarillo en todo el cuerpo del espécimen adulto y que no existieron variaciones en los patrones de color tan marcadas en el mesosoma como en *M. arizonensis*.

**Biología.** Las pupas de los parasitoides generalmente emergieron en aproximadamente una semana de larvas de los primeros estadios de desarrollo del

gusano cogollero, *S. frugiperda*. Bahena (2008) cita que la hembra ataca larvas pequeñas del gusano cogollero del maíz. Cuando la larva ha matado a su huésped, emerge formando un capullo separado del cadáver del hospedero; los adultos tienen hábitos nocturnos pero son localizados en los hábitats de las larvas herbívoras de sus hospederos lepidópteros.

### **2.3.3 *Meteorus arizonensis* Muesebeck, 1923**

**Distribución mundial.** Canadá (Alberta), Estados Unidos (Arizona, Nuevo México, Texas), México, Colombia, Honduras, Nicaragua, Región Neártica y Neotropical (Yu *et al.*, 2016).

**Distribución en México.** Chihuahua (Ordoñez *et al.*, 2015 - ex *S. frugiperda*), Nayarit (Gutiérrez *et al.*, 2015a; 2015b - ex *S. frugiperda*) y Durango.

**Distribución en Durango.** Canatlán, Col. Minerva, Francisco I. Madero, Guadalupe Victoria, La Ferrería, Santiago Papasquiario, Morcillo (nuevos registros). Además, nuevo registro en el Estado como parasitoide del gusano cogollero.

**Material examinado.** 31 parasitoides (13♂, 18♀), México. Durango. Canatlán, 1,946 msnm, cultivos de maíz, 9/VII/15 (1♀), 26/VIII/17 (1♀); Col. Minerva, 1,881 msnm, 13/VI/14 (1♀), 12/VII/14 (2♂), 8/VIII/14 (1♂), 21/VIII/14 (1♀,1♂), 7/VII/15 (1♂), 13/VII/17 (1♀); Francisco I. Madero, Pánuco de Coronado, 1,891 msnm, 12/VII/14 (1♀), 30/VI/15 (1♂), 16/VI/17 (2♀,1♂), Guadalupe Victoria, 2,018 msnm, 9/VII/14 (1♂), 30/VI/15 (1♀,1♂), Morcillo, 1,925 msnm, 31/VIII/16 (1♂); La Ferrería, Sebastián Lerdo de Tejada, 1,894 msnm, 8/VIII/14 (1♀, 2♂), 7/VII/15 (1♀); Santiago Papasquiario, 1,840 msnm, 12/VIII/14 (1♀,1♂), 26/VIII/14 (1♀), 9/VII/15 (1♀), 13/VII/17 (4♀), coll. M.B. González-Maldonado.

**Comentarios.** El mayor número de parasitoides se obtuvieron de la Col. Minerva y Santiago Papasquiari (ocho en cada uno). Fue la especie que se presentó en mayor abundancia (31 parasitoides).

Se observaron caracteres distintos entre especímenes de la misma especie: coloración del cuerpo, patrones de coloración en el mesosoma y tamaño del cuerpo. Es posible que debido a estos cambios de coloración anteriormente se haya identificado erróneamente dentro de *M. laphygmae*. Esos cambios en coloración también ocurren en *Meteorus pulchricornis* Wesmael, 1835 (Lepidoptera: Noctuidae) que presenta variaciones en el color del mesonotum, propodeum y tergitos metasomales cuando los cocones son sometidos a distintas temperaturas (15, 20, 25, 30 °C) en laboratorio (Abe *et al.*, 2013), en nuestros individuos estos cambios pudieron ocurrir de forma natural en campo, resultando en un cambio en la coloración en partes del cuerpo, al ganar temperatura, de forma favorable esto puede incrementar su capacidad de vuelo, siendo la misma especie (*M. arizonensis*-en este estudio) (Fig. 2).

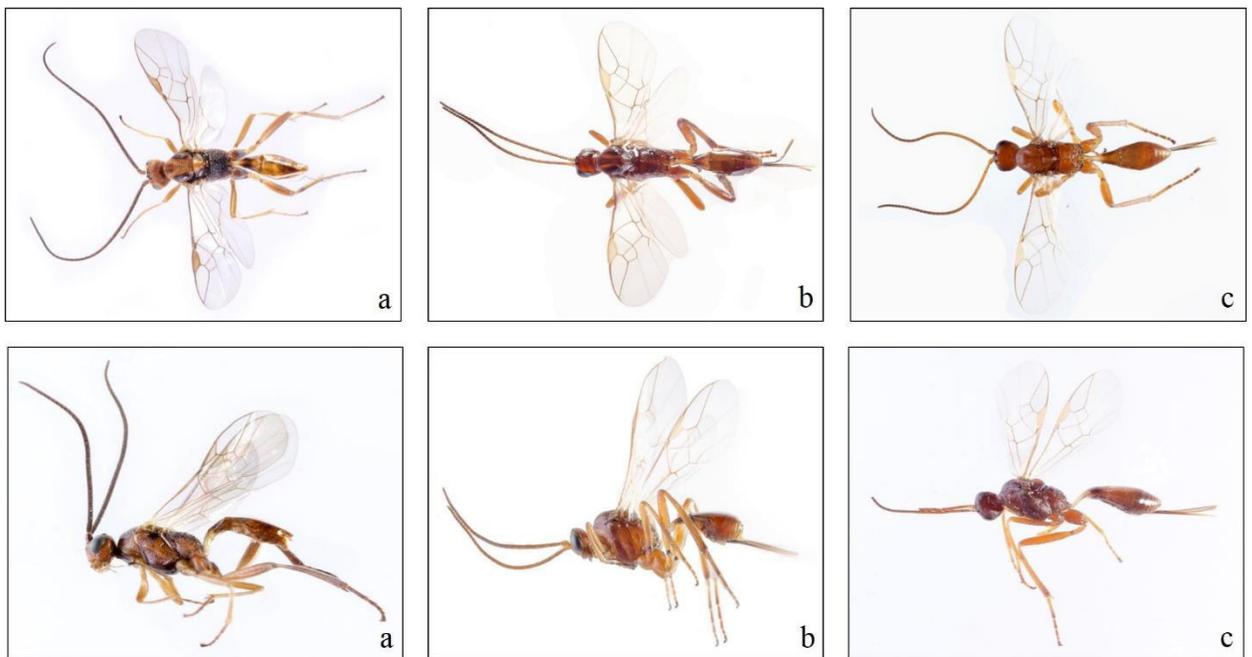


Figura 2. 2. Variaciones morfológicas en adultos de *M. arizonensis* (a ♂, b-c ♀) (vista frontal y lateral).

**Biología.** Se ha reportado como parasitoide solitario de *Helicoverpa zea* Boddie, 1850 (Lepidoptera: Noctuidae) y *S. frugiperda* (Yu *et al.*, 2016).

En México, han sido reportadas ocho especies de *Meteorus*: [*M. arizonensis*, *M. autographae* Muesebeck, 1923, *M. euschausiae* Muesebeck, 1923, *M. hyphantriae* Riley, 1887, *M. kraussi* Muesebeck, 1958, *M. laphygmae*, *M. rubens* (Nees, 1811) y *M. versicolor* (Wesmael, 1835)], de los cuales: *M. arizonensis*, *M. autographae*, *M. laphygmae* y *M. rubens* son parasitoides de gusano cogollero (Yu *et al.*, 2016).

## 2.4 CONCLUSIONES

Santiago Papasquiario ha sido el municipio donde se tiene la mayor abundancia de parasitoides de la familia Braconidae, específicamente del género *Meteorus* reportados en este estudio. *M. arizonensis* es nuevo registro en Durango, México y como parasitoide del gusano cogollero en maíz, siendo una contribución al conocimiento del género *Meteorus* en México.

## 2.5 LITERATURA CITADA

- ABE, Y.; NISHIMURA, T.; MAETO, K. 2013. Causes of polymorphic melanism and its thermoregulatory function in a parasitoid wasp *Meteorus pulchricornis* (Hymenoptera: Braconidae). *European Journal of Entomology* 110(4): 627-632.
- AGUIRRE, F. H.; SARMIENTO, C. E.; SHAW, S. R. 2011. Taxonomic revision and morphometric analysis of *Meteorus* Haliday, 1835 (Hymenoptera: Braconidae: Meteorinae) from Colombia. *Zootaxa* 2938: 1-68.
- AGUIRRE, F. H.; ALMEIDA, L.; SHAW, S.; SARMIENTO, C. 2015. An illustrated key to neotropical species of the genus *Meteorus* Haliday (Hymenoptera, Braconidae, Euphorinae). *ZooKeys* 489: 33-94.

- ALVARADO, R. B. 1987. Parasites and disease associated with larvae of beet armyworm *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae), infesting processing tomatoes in Sinaloa, México. *Florida Entomologist* 70(4): 444-449.
- ASHBY, G. 1972. The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals. pp. 582-587. *In*: Worden, A. N.; Lane-Petter, W. (Eds.). The Universities Federation for Animal Welfare, Londres.
- BAHENA, J. F. 2008. Enemigos naturales de las plagas agrícolas del maíz y otros cultivos. INIFAP. Libro Técnico No. 5. Uruapan, Michoacán. 174 p.
- CARRILLO, S. J. 1993. Síntesis del control biológico de *Heliothis* spp. y *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) en México. *Folia Entomológica Mexicana* 87: 85-93.
- CORONADO, B. J.; E. RUÍZ, C.; E.; VARELA, F. S. 2004. Adenda a Braconidae (Hymenoptera). *In*: Biodiversidad, taxonomía y biogeografía de artrópodos de México: hacia una síntesis de su conocimiento. Vol. IV. Llorente, J.; Morrone, J.J.; Yáñez, O.; Vargas, I. (Eds.). UNAM. México. 713-720 pp.
- CORONADO, B. J. 2013. La familia Braconidae (Hymenoptera) en México. *Entomología Mexicana* 12(1): 31-44.
- CORONADO, B. J.; ZALDÍVAR, R. A. 2014. Biodiversidad de Braconidae (Hymenoptera: Ichneumonoidea) en México Biodiversity of Braconidae (Hymenoptera: Ichneumonoidea) in Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 85: 372-378.
- GARCÍA, G. C.; GONZÁLEZ, M. M.; GONZÁLEZ, H. A. 2013. Parasitismo natural de Braconidae e Ichneumonidae (Hymenoptera) sobre *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista Colombiana de Entomología* 39 (2): 211-215.
- GONZÁLEZ, H. A.; LOMELÍ, F. J.; RUÍZ, C. E. 2011. Avispas Ichneumonoidea (Insecta: Hymenoptera). *In*: CONABIO. La biodiversidad en Veracruz. Estudio de estado. Vol. II. CONABIO. Instituto de Ecología, A.C. México. 441-448 p.
- GUTIÉRREZ, R. A.; ROBLES, B.A.; CAMBERO, C.J.; CORONADO, B. J. 2015a. *Meteorus arizonensis* Muesebeck, 1923 (Hymenoptera: Braconidae): Nuevo registro para México. *Acta Zoológica Mexicana (n.s.)* 31(1): 123-124.

- GUTIÉRREZ, R. A.; ROBLES, B.A.; CAMBERO, C.J.; SANTILLÁN O.C., ORTÍZ C., M., CORONADO, B. J. 2015b. Parasitoids of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) found in Nayarit, Mexico. *Southwestern Entomologist* 40(3): 555-563.
- HOBALLAH, M. E.; DEGEN, T.; BERGVINSON, D.; SAVIDAN, A.; TAMO, C.; TURLINGS, T. 2004. Occurrence and direct control potential of parasitoids and predators of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) on maize in the subtropical lowlands of Mexico. *Agricultural and Forest Entomology* 6: 83-88.
- JOURDIE, V.; ÁLVAREZ, N.; TURLING, T. 2008. Identification of seven species of hymenopteran parasitoids of *Spodoptera frugiperda*, using polymerase chain reaction amplification and restriction enzyme digestion. *Agricultural and Forest Entomology* 10(2): 129-136.
- MOLINA, O. J.; HAMM, J. J.; LEZAMA, G. R.; LÓPEZ, E. M.; GONZÁLEZ, R. M.; PESCADOR, R. A. 2001. A survey of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) parasitoids in the Mexican states of Michoacan, Colima, Jalisco, and Tamaulipas. *Florida Entomologist* 84(1): 31-36.
- MOLINA, O. J.; CARPENTER, J. E.; HEINRICHS, E. A.; FOSTER, J. E. 2003. Parasitoids and parasites of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas and Caribbean basin: an inventory. *Florida Entomologist* 86(3): 254-289.
- MUESEBECK, C. F. 1923. A revision of the North American species of ichneumonflies belonging to the genus *Meteorus* Haliday. *Proceedings of the United States National Museum* 63: 34-35.
- ORDOÑEZ, G. M.; BUSTILLOS, R. J.; LOYA, M. J.; RIOS, V. C.; JACOBO, C. J. 2015. Parasitoides de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) en Chihuahua, México. *Métodos en Ecología y Sistemática* 10(1): 66-72.
- RODRÍGUEZ, M. A.; RUÍZ, C. E.; CORONADO, B. J.; TREVIÑO, C. J.; KHALAIM, A. I. 2014. Avispas Ichneumonoideas que atacan al gusano cogollero en el cultivo de maíz en México. *Revista AgroProductividad* 28-31 pp.

- VILLEGAS, M. J.; SÁNCHEZ, V. A.; ROSAS, G. N. 2015. Caracterización de una especie de *Meteorus* (Hymenoptera: Braconidae) presente en larvas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) en el Norte de Tamaulipas, México. *Southwestern Entomologist* 40(1):161-170.
- WHARTON, R.A.; MARSH, P.M.; SHARKEY M.J.1997. Manual of the new world genera of the family Braconidae (Hymenoptera).Special publication of the International Society of Hymenopterists 1:1-439.
- YU, D. S.; ACHTERBERG, C.V.; HORSTMANN, K. 2016: Taxapad 2016, Ichneumonoidea 2016, Database on flash-drive, Ottawa, Ontario, Canada.

**CAPÍTULO III. ANÁLISIS DE SECUENCIAS DEL GEN DE LA CITOCROMO  
OXIDASA C REGIÓN I SUGIEREN UNA ALTA CERCANÍA GENÉTICA ENTRE  
*CHELONUS INSULARIS* Y *CHELONUS SONORENSIS* (HYMENOPTERA:  
BRACONIDAE)**

### 3.1 INTRODUCCIÓN

Braconidae después de Ichneumonidae, constituyen la familia más numerosa del orden Hymenoptera, con alrededor de 17,605 especies descritas, aunque se estima que sean alrededor de 40,000 (Saavedra-Aguilar 2009, Aguirre-Fernández 2009). Cheloninae es una subfamilia moderadamente grande dentro de la familia Braconidae. La subfamilia comprende más de 1,300 especies descritas en el mundo. Los miembros de esta subfamilia están presentes en todas las regiones geográficas (Edmardash et al. 2011, Kittel and Austin 2014).

Los parasitoides de la subfamilia Cheloninae son conocidos por ser endoparasitoides, koinobiontes de huevo-larva, solitarios de muchas familias de lepidópteros, y pueden ser considerados como potenciales agentes de control biológico (Edmardash et al. 2011, Nascimento and Penteado-Dias 2011, Aydogdu and Beyarslan 2002).

En México, se han reportado parasitoides de gusano cogollero *S. frugiperda* de importancia en la región neártica y neotropical, donde destacan: *Campoletis sonorensis* Cameron 1886 (Hymenoptera: Ichneumonidae) y *Ch. insularis* (Jourdie et al. 2008, 2010, González-Maldonado et al. 2014), debido a su frecuencia, distribución y porcentaje de parasitismo. En Durango, en los últimos cinco años (2012-2017) *Ch. insularis* ha sido el parasitoide encontrado con mayor frecuencia, siendo además la especie más ampliamente distribuida en México (84.4%) (González-Maldonado et al. 2014), sin embargo, las tres especies de *Chelonus* que se han presentado en México: *Ch. cautus*, *Ch. insularis* y *Ch. sonorensis* (CNRCB 1999, Cervantes-Ordoñez 2010, Rodríguez-Mota et al. 2014) y las cuales han sido reportadas por nosotros en la región maicera de Durango, presentan diferencias morfológicas que nos podrían indicar que se trata de especies distintas y

morfológicamente distinguibles o que presentan patrones clinales, es difícil agruparlas en especies, por lo que las limitaciones en la identificación en base a caracteres morfológicos crean la necesidad del reconocimiento de especies por medio de caracteres genéticos, como lo son el empleo de un fragmento del gen citocromo *c* oxidasa I y el Citocromo *b* (*Cytb*) (Tilmon et al. 2000, Erlandson et al. 2003, Zhu et al. 2004, Jourdie et al. 2008, Kieu et al. 2013), estas herramientas son eficaces para estimar la variación dentro de poblaciones y especies, para así probar diferentes hipótesis taxonómicas. Los caracteres genéticos son universales y tienen la ventaja de evidenciar la base genética de la variación (Escobar-Camacho 2013).

El estudio de la variabilidad genética es una medida del potencial evolutivo de las especies para responder a diversos factores asociados a sus hábitats y a la adaptación a lo largo del tiempo, afectando así la estructura genética de las poblaciones (Rodríguez-Romero et al. 2011, Toro and Caballero 2005). Esta variabilidad dentro y entre poblaciones es el producto de diversos factores, entre los que se encuentra la deriva genética, migración, selección natural y la expansión o fragmentación de su hábitat (Jackson et al. 2012, Joly et al. 2009, Kieu et al. 2013). Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue: Determinar la variabilidad genética presente en *Ch. cautus*, *Ch. sonorensis* y *Ch. insularis* colectados en Durango, empleando caracteres genéticos.

## 3.2 Materiales y Métodos

### 3.2.1 Material Biológico

El estudio se realizó en ocho localidades que corresponden a cinco municipios [Santiago Papasquiaro, Pánuco de Coronado, Canatlán, Guadalupe Victoria y Durango, Dgo.] pertenecientes a la parte central, central oeste y sur del Estado de Durango. El área de estudio comprendió la región de los Valles, los Llanos y las Quebradas, con altitudes que van de 1,884 a 2,319 msnm con clima semiseco

templado (García-Gutiérrez et al. 2013, González-Maldonado et al. 2014). Las colectas se realizaron en el ciclo primavera-verano 2015 y 2016, en cultivos de maíz. Se colectaron 150 larvas de gusano cogollero por sitio en plantas en etapa de verticilo, cada 15 días. Las larvas se depositaron en vasos de plástico con dieta artificial (Ashby 1972) en una cámara de cría a una temperatura de 25 a 27 °C, humedad relativa de 60% y un fotoperiodo de 14:10 L:O), hasta que alcanzaron su desarrollo completo o emergió el parasitoide, luego fueron colocados de forma individual en viales de plástico con alcohol al 96% y se almacenaron a -20°C, después se separaron a nivel de género usando las claves taxonómicas de Wharton et al. (1997). La identificación de especies fue realizada por el Dr. Alejandro González-Hernández, a través de la comparación del material preservado con especímenes de referencia de la Colección de Insectos Benéficos Entomófagos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

### **3.2.2 Extracción de ADN**

Se utilizaron 19 individuos, separados de acuerdo a sus características morfológicas (Tabla 3.1), sin embargo, la especie más abundante fue *Ch. insularis* con 14 individuos, seguida por *Ch. sonorensis* con dos ejemplares y *Ch. cautus* con tres. El ADN genómico total se aisló por individuo empleando el kit de extracción de ADN de Promega, siguiendo las indicaciones del fabricante. A partir del ADN aislado se realizó la amplificación de un fragmento del gen mitocondrial citocromo c oxidasa I (COI), en los diferentes individuos.

El gen mitocondrial (mtADN) fue parcialmente amplificado usando los oligonucleótidos HCO-2198 (5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3') (adelante) y LCO-1490 (5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3') (reversa) reportados por Folmer et al. (1994).

Las condiciones de PCR fueron: 1 min 30 s a 94°C, desnaturalización 35 ciclos a 94°C (1 min), alineación 50°C (1 min), extensión 72°C 1 min y una extensión final a

72°C (5 min) en un ciclador térmico 9600 Labnet (Labnet International, Inc., Edison, New Jersey) utilizando de 50 a 150 ng de ADN, 0.40 pmol de cada oligonucleótido, 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de cada dNTPs (Promega, Madison Wisconsin), 1X de solución amortiguadora de reacción en cadena de la polimerasa y 1 unidad de Taq polimerasa (Promega) en un volumen final de 50 µL (Jourdie et al. 2008, 2010). Los productos amplificados de PCR se visualizaron vía electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio y observados en un transiluminador UV a 430 nm. Los productos de doble cadena se purificaron utilizando el sistema de purificación Wizard SV Gel and PCR Clean-up System.

Tabla 3.1. Datos de colecta y número de acceso del GenBank de los ejemplares analizados.

<b>Código</b>	<b>Localidad y/o Municipio</b>	<b>Fecha colecta</b>	<b>Especie <i>Chelonus</i></b>	<b>Latitud</b>	<b>Longitud</b>	<b>Clave acceso GenBank</b>
A1	Col. Minerva, Dgo	08/08/2016	<i>sonorensis</i>	23.932	-104.475	MH890657
A2	Col. Minerva, Dgo	12/07/2016	<i>sonorensis</i>	23.966	-104.437	MH890658
B	Ferrería, Dgo.	14/06/2015	<i>insularis</i>	23.957	-104.632	MH890659
B1	Ferrería, Dgo.	26/06/2016	<i>insularis</i>	23.959	-104.629	MH890660
C1	Canatlán	23/08/2015	<i>insularis</i>	24.448	-104.707	MH890661
C2	Col. Minerva, Dgo	12/07/2016	<i>insularis</i>	23.966	-104.437	MH890662
C3	Canatlán	14/06/2015	<i>insularis</i>	24.476	-104.716	MH890663
D	Canatlán	14/06/2015	<i>insularis</i>	24.476	-104.716	MH890664
D1	Canatlán	23/08/2015	<i>insularis</i>	24.448	-104.707	MH890665
D3	Fco. I Madero, Pánuco	07/08/2016	<i>insularis</i>	24.177	-104.546	MH890666
E	Col. Minerva, Dgo	26/06/2016	<i>insularis</i>	23.965	-104.439	MH890667
E1	Ferrería, Dgo.	30/05/2015	<i>insularis</i>	23.960	-104.628	MH890668
E2	Stgo. Papasquiaro	26/08/2016	<i>insularis</i>	25.140	-105.433	MH890669
E3	Col. Minerva, Dgo.	08/08/2016	<i>insularis</i>	23.932	-104.474	MH890670
E4	Canatlán	14/06/2015	<i>insularis</i>	24.476	-104.716	MH890671
E5	Canatlán	14/06/2015	<i>insularis</i>	24.476	-104.716	MH890672
F2	Carr. Mezquital, Dgo.	24/06/2016	<i>cautus</i>	23.974	-104.575	MH890673
F	Carr. Mezquital, Dgo.	24/06/2016	<i>cautus</i>	23.974	-104.575	MH890674
F1	Carr. Mezquital, Dgo.	24/06/2016	<i>cautus</i>	23.974	-104.575	MH890675

### **3.2.3 Amplificación y Secuenciación**

Los productos amplificados fueron secuenciados en un secuenciador Applied Biosystems 310 Genetic Analyzer utilizando el método Big Dye Terminator (Applied Biosystems Inc., Foster City, California). Los archivos de secuencias fueron editados y alineados utilizando Sequencher 4.1 (Sequencher 2010).

### **3.2.4 Análisis Moleculares**

Las secuencias resultantes se tradujeron a proteínas para confirmar la identidad de los fragmentos (Wernersson and Pedersen 2003). La alineación múltiple se realizó usando Clustal X (Thompson et al. 1997), con costos de apertura (gap opening costs) = 50, extensión de huecos (gap extension) = 6.6, retraso divergente de secuencias (delay divergent sequences) = 30%, y el peso de transición ADN (DNA transition weigh) = 0.5 (Harrison and Langdale 2006).

La diversidad genética dentro de las especies se midió como la diversidad de haplotipos (h), el número de haplotipos privados (P), y la diversidad de nucleótidos (p), estos análisis se realizaron utilizando Arlequin versión 3.5.1.21 (Excoffier and Lischer 2010) y DnaSP versión 5.1 (Librado and Rozas 2009).

La estructura de la población se exploró a través de análisis de varianza molecular (AMOVA) utilizando Arlequin versión 3.5.1.21 (Excoffier and Lischer 2010). Se analizó la estructura genética entre los diferentes individuos. Se calculó la suma de los cuadrados de desviación (SSD) y el índice de Harpending's-Raggedness (Harpending 1994) para evaluar el ajuste de los datos observados se utilizó el modelo de expansión demográfica o modelo de rango geográfico súbita. La distribución de falta de coincidencia se comparó con las distribuciones esperadas bajo modelos de expansión demográfica súbita (Rogers and Harpending 1992) y la expansión espacial súbita (Excoffier 2004, Rozas 2009). Los parámetros del modelo ( $h_0$ ,  $h_1$  y  $s$ ) se estimaron utilizando un modelo no lineal por mínimos cuadrados generalizado, los intervalos de confianza obtenidos mediante bootstrap paramétrico

con 1,000 repeticiones (Schneider and Excoffier 1999). Las SSDs obtenidas mediante las 1,000 réplicas de bootstrap se utilizaron para calcular el desvío del ajuste entre las distribuciones desiguales observadas y esperadas (Slatkin and Hudson 1991, Schneider and Excoffier 1999).

Para la prueba de las desviaciones de la neutralidad, se utilizaron los estadísticos de prueba de Tajima (D) (Tajima 1983, 1989) y el índice de fijación  $F_{ST}$  de Fu (Fu 1997), para la muestra completa. La significancia estadística se evaluó mediante la comparación de los valores estadísticos observados con los valores esperados en base a 1,000 simulaciones coalescentes neutrales. Se estimó el flujo de genes mediante el cálculo del número de migrantes por generación (Nm) en base a los valores de  $F_{ST}$ , utilizando el modelo de Hudson et al. (1992) a partir de la fórmula propuesta por Wright (1951). Todos los parámetros de la población se estimaron utilizando Arlequin versión 3.5.1.21 (Excoffier and Lischer 2010).

Se construyó una red tipo median-joining utilizando Networks versión 4.1.0.3 (Bandelt et al. 1999) para describir los patrones de similitud entre especies y potenciales relaciones ancestro-descendiente. El ancestro fue *Stephanus serrator* Fabricius, 1798 (Hymenoptera: Stephanidae) un parasitoide de barrenadores de árboles (origen Alemán).

Para determinar la fiabilidad de las inferencias, se determinó la saturación en las secuencias obtenidas (Hulsey et al. 2004). Con base en las secuencias, los parámetros de probabilidad más adecuados para determinar el modelo evolutivo se utilizó la prueba del criterio de información de Akaike (AICc) en el programa jModeltest versión 3.7 (Darriba et al. 2012). jModeltest reveló que el modelo más adecuado para el análisis del fragmento COI mtADN fue GTR+G. Por lo que, la búsqueda de máxima verosimilitud se realizó utilizando GTR+G como modelo de evolución de nucleótidos y 10,000 repeticiones de arranque utilizando RAxML versión 7.0.4 (Stamatakis 2006, Stamatakis et al. 2008). El análisis posterior de probabilidad (Rannala and Yang 1996) se realizó utilizando el modelo evolutivo

antes mencionado mediante la versión 3.0b4 programa MrBayes (Ronquist and Huelsenbeck 2003). Los cálculos de probabilidad bayesiano posterior se llevaron a cabo en un intervalo de diez millones de generaciones, las muestras fueron tomadas cada 1,000 generaciones, descartando los primeros 1,000 árboles muestreados (como burn-in o pre-corrida) para reducir sesgos en los cálculos de las probabilidades posteriores. El soporte de los nodos se determinó mediante las probabilidades posteriores de ellos (Huelsenbeck et al. 2002, Ronquist y Huelsenbeck 2003). Para cada método de reconstrucción se realizaron tres ensayos independientes para determinar la solidez de la reconstrucción filogenética.

La información de las secuencias del COI del ADNmt se sometieron a la base de datos del GenBank, los números de acceso son: MH890657 y MH890658 (*Ch. sonorensis*), MH890659 a MH890672 (*Ch. insularis*), y MH890673 a MH890675 (*Ch. cautus*) (Tabla 3.1).

### 3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.3.1 Identificación Fenotípica

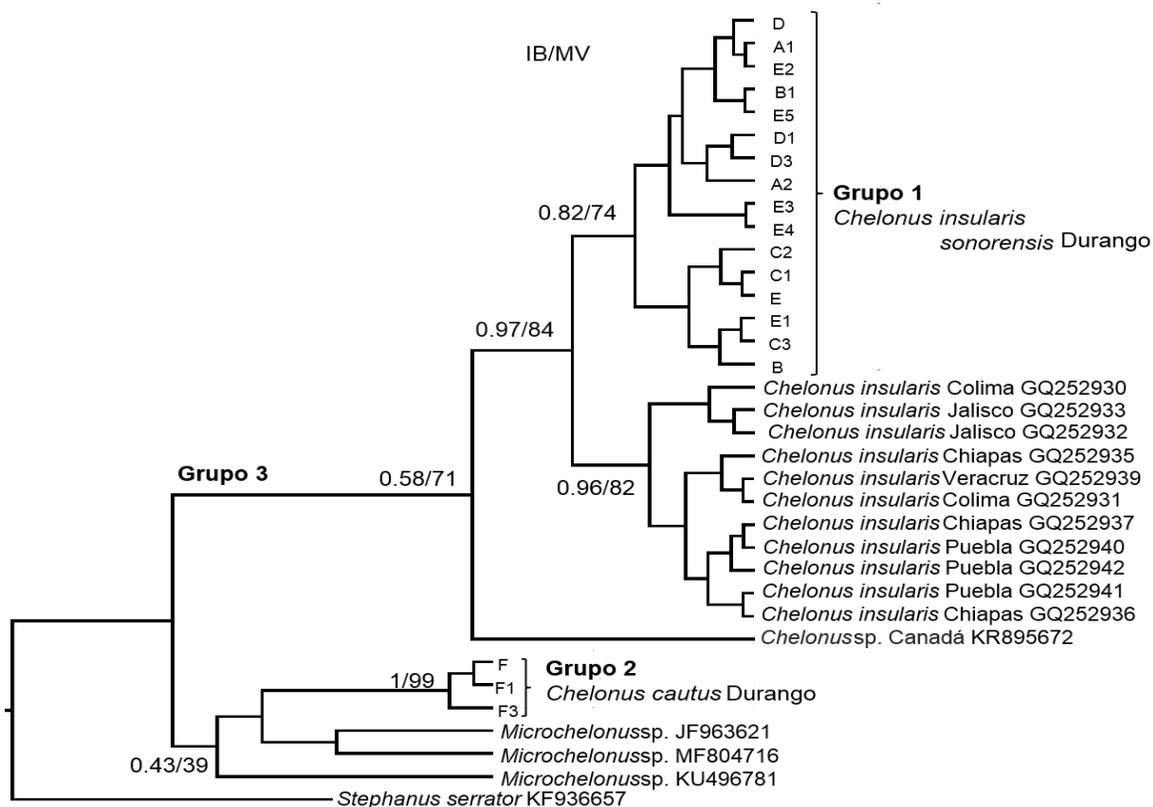
Al revisar la diagnosis de las especies de *Chelonus*, los ejemplares analizados en este trabajo se agruparon en tres especies nominales: *Ch. insularis*, *Ch. sonorensis*, *Ch. cautus*.

#### 3.3.2 Análisis Molecular

Los fragmentos amplificados estuvieron entre 695 y 710 pb, editando las secuencias y ajustándolas a 650 pb. Respecto al AMOVA, se observó la máxima distribución de la varianza al formarse dos grupos grupo 1: *Ch. insularis* + *Ch. sonorensis* y grupo 2: *Ch. cautus* esto indica que los grupos son distintos entre sí ( $F_{SC}=0.02289$ ,  $p=0.011$  al 95% de confianza), no existe diferencia al interior de éstos ( $F_{ST}=0.97679$ ,  $p=0.43$  al 95% de confianza) (Fig. 3.1), estos fueron comparados con el grupo 3: *Ch. insularis* de diferentes estados de la República Mexicana, se indica la clave

asignada en el GenBank (Jourdie et al. 2008). La distribución no pareada del ADN (Mismatch distribution), mostró dos picos que refuerza la existencia de dos grupos correspondientes a los grupos 1 y grupo 2 y cada uno de ellos presentaron un incremento poblacional súbito.

Respecto a las pruebas de neutralidad, estas resultaron ser no diferentes a cero ( $D=0.09354$ ,  $p=0.89450$ ;  $F=-0.39498$ ,  $p=0.0890$ ), por lo se asume la neutralidad evolutiva (no existe selección positiva o negativa). Asimismo, el valor negativo de  $F$  de  $F_u$  es indicativo de una expansión poblacional súbita. El cálculo del número de migrantes por generación para las especies fue de  $N_m=2.2$  individuos efectivos entre las especies del grupo 1, lo que indica un fuerte intercambio de migrantes efectivos entre ellos (migrantes que dejan descendencia a la siguiente generación).



**Figura 3.1.** Árbol filogenético que muestra la comparación de grupos de *Chelonus* sp.

De acuerdo a la red haplotípica y a la matriz de distancias (Fig. 3.2) se puede observar que aun cuando se comparan especies diferentes como *Ch. insularis* y *Ch. sonorensis*, la diferenciación genética entre éstas es de 0.3%, formando un solo grupo, lo que nos indica que son genéticamente cercanos; a excepción de *Ch. cautus*, que se encuentra a una distancia de este grupo compacto del 17.8%, lo cual lo sitúa muy lejos de este grupo, además el tamaño de los individuos del parasitoide *Ch. cautus* es significativamente más pequeño (morfológicamente hablando) que las especies *Ch. insularis* y *Ch. sonorensis* siendo considerado como un *Microchelonus* (Jourdie et al. 2008), si se observa su distancia genética en relación al grupo 1 podría indicarnos que *Ch. cautus* pertenece a otra especie distinguible, por ésta y otras razones genéticas, como el soporte en las ramas de los análisis bayesianos y de máximo similitud (Fig. 3.2), estos resultados son comparables a los reportados por Jourdie et al. (2008), quienes relacionan otras especies de parasitoides de gusano cogollero con *Ch. insularis* y *Ch. cautus*, encontrando distancias genéticas (divergencias inter-específicas) similares a las reportadas en ese trabajo (14.5%), dentro de la misma especie la distancia fue de 2.7% con un promedio de 0.5% con *Ch. cautus*, mientras que *Ch. insularis* presento ausencia en su diferenciación genética (0%), siendo no coincidente con lo reportado en este estudio.

Algo significativo en estas especies es que presentan dimorfismo sexual (grupo 1), lo que indica que ambas (*Ch. insularis* y *Ch. sonorensis*), pertenecen a *Ch. insularis*, siendo el macho *Ch. sonorensis* y la hembra *Ch. insularis* (Cameron, 1887), lo que explica en gran medida los resultados obtenidos.

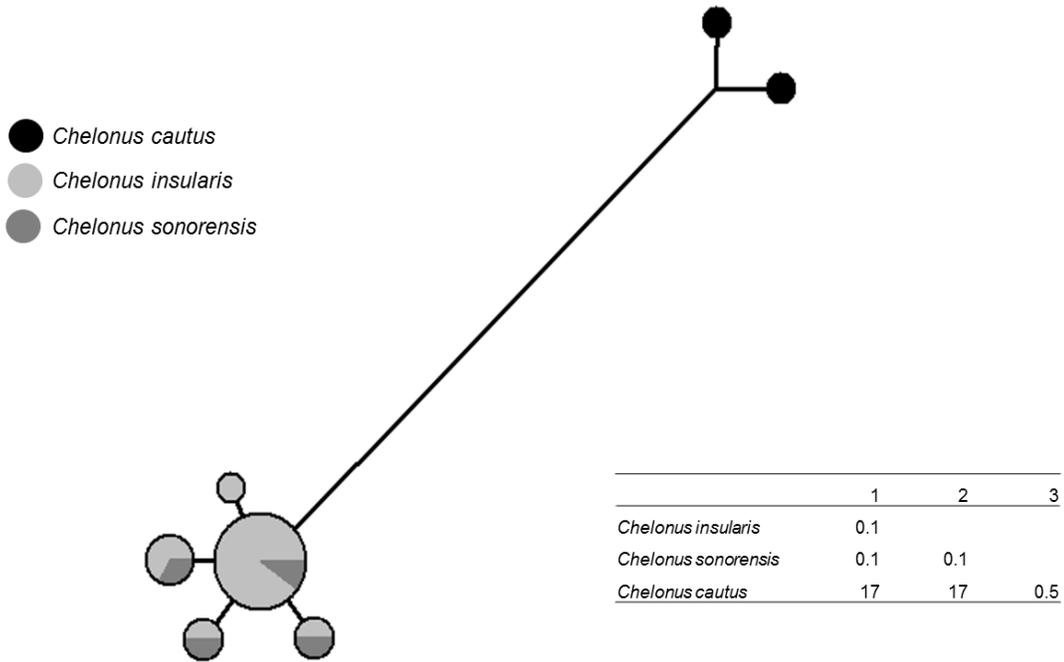


Figura 3.2. Red haplotípica y matriz de distancias entre especies de *Chelonus*.

Kieu et al. (2013) encontraron que varias poblaciones geográficas y poblaciones del parasitoide asociadas al huésped (maíz), exhibieron diferencias en la preferencia del huésped, el rango de huéspedes y en la morfología del adulto, estas diferencias han sido generalmente interpretadas como indicativo de biotipos diferentes, las especies de *Chelonus* reportadas en este estudio provienen de diferentes poblaciones geográficas (Tabla 3.1), atacando a gusano cogollero en maíz, presentaron diferencias en las especies encontradas, tal como lo describen estos autores, sin presentar diferenciación genética evidente al interior del grupo 1.

La reconstrucción de las afinidades filogenéticas mostró que los ejemplares analizados de *Ch. insulares* y *Ch. sonorensis* se encuentran en un solo grupo donde ambos están mezclados (sin formar grupos diferentes), a su vez, este grupo está separado de otro grupo de secuencias pertenecientes a *Ch. insularis* provenientes de otras partes de México. En el caso de *Ch. cautus*, se observa que las secuencias obtenidas en este trabajo tienden a formar un grupo que se aproxima más a las secuencias pertenecientes a *Microchelonus* (Fig. 3.1).

### 3.4 REFERENCIAS CITADAS

- Aguirre-Fernández, H. 2009. Revisión taxonómica del genero *Meteorus* Haliday, 1835 (Hymenoptera: Braconidae) en Colombia. Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia, Posgrado en Biología, línea sistemática. 152 p.
- Ashby, G. 1972. The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals, pp. 582-587, *In* A. N. Worden and W. Lane-Petter [eds.], The Universities Federation for Animal Welfare, London.
- Aydogdu, M., and A. Beyarslan. 2002. Chelonus Jurine (Hymenoptera: Braconidae: Cheloninae) species of the Marmara Region. *Turk. J. Zool.* 26: 1-13.
- Bandelt, H. J., P. Forster, and A. Röhl. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16: 37-48.
- Cameron, P. 1887. Hymenoptera, pp. 395-396, *In* F. D. Godman and O. Salvin [eds.], *Biologia Centrali-Americana; or, Contributions to the knowledge of the fauna and flora of Mexico and Central America.* Zool.
- CNRCB. 1999. Sistema de producción del gusano cogollero (Lepidoptera: Noctuidae) y su parasitoide *Chelonus insularis* (Hymenoptera: Braconidae). Ficha Técnica CB-17. 4 p.  
[https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/172894/Ficha\\_CB\\_17\\_Sistema\\_de\\_produccion\\_del\\_gusano\\_cogollero.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/172894/Ficha_CB_17_Sistema_de_produccion_del_gusano_cogollero.pdf)
- Cervantes-Ordóñez, F. 2010. Enemigos naturales de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) en cultivos de maíz en Buenavista, Saltillo Coahuila, México. Tesis de licenciatura, Universidad Antonio Narro, división Agronomía. 60 p.
- Darriba, D., G. L. Taboada, R. Doallo, and D. Posada. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods.* 9:772.

- Edmardash, Y. A., M. S. Abdel-Dayem, and N. S. Gadallah. 2011. The subfamily Cheloninae (Hymenoptera, Braconidae) from Egypt, with the description of two new species. *Zookeys* 115: 85-102.
- Erlandson, M., L. Braun, D. Baldwin, J. Soroka, M. Ashfaq, and D. Hegedus. 2003. Molecular markers for *Peristenus* spp. (Hymenoptera: Braconidae) parasitoids associated with *Lygus* spp. (Hemiptera: Miridae). *Can. Entomol.* 35: 71-83.
- Escobar-Camacho, D. 2013. Diversidad críptica y relaciones filogenéticas de la familia Characidae (Ostariophysi: Characiformes) en el Yasuní, Ecuador. Tesis de Licenciatura, Escuela de Ciencias Biológicas. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Quito, Ecuador. 91 p.
- Excoffier, L. 2004. Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range expansion: lessons from the infinite-island model. *Mol. Ecol.* 13: 853-864.
- Excoffier, L, and H. L Lischer. 2010. Arlequin suite ver. 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* 10: 564-567.
- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz, and R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3: 294-299.
- García-Gutiérrez, C., M. B. González-Maldonado, y A. González-Hernández. 2013. Parasitismo natural de Braconidae e Ichneumonidae (Hymenoptera) sobre *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Rev. Colomb. Entomol.* 39: 25-29.
- González-Maldonado, M. B., C. García-Gutiérrez, y A. González-Hernández. 2014. Parasitismo y distribución de *Campoletis sonorensis* Cameron (Hymenoptera: Ichneumonidae) y *Chelonus insularis* Cresson (Hymenoptera: Braconidae) parasitoides del gusano cogollero en maíz en Durango, México. *Vedalia* 15: 47-53.

- Harpending, H. C. 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Hum. Biol.* 66: 591-600.
- Harrison, C. J., and J. A. Langdale. 2006. A step by step guide to phylogeny reconstruction. *Plant J.* 45: 561-572.
- Hudson, R. R., M. Slatkin, and W. P. Maddison. 1992. Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics.* 132: 583-589.
- Huelsenbeck, J. P., B. Larget, R. E. Miller, and F. Ronquist. 2002. Potential applications and pitfalls of bayesian inference in phylogeny. *Syst. Biol.* 1: 673-688.
- Hulsey, C. D., F. J. Garcia de Leon, Y. Sanchez-Johnson, D. A. Hendrickson, and T. J. Near. 2004. Temporal diversification of Mesoamerican cichlid fishes across a major biogeographic boundary. *Mol. Phylogenet. Evol.* 31: 754-764.
- Jackson, B., T. Kawakawi, S. Cooper, J. Galindo, and R. Butlin. 2012. A genome scan and linkage disequilibrium analysis among chromosomal races of the Australian grasshopper *Vandiemonella viatica*. *PLoS ONE* 7: e47549. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047549>.
- Jourdie, V., N. Alvarez, and T. C. J. Turlings. 2008. Identification of seven species of hymenopteran parasitoids of *Spodoptera frugiperda*, using polymerase chain reaction amplification and restriction enzyme digestion. *Agric. Forest Entomol.* 10: 129-136.
- Jourdie, V., V. Eduardo, H. Murillo, J. M. Bento, T. C. J. Turlings, and N. Alvarez. 2010. Phylogeography of *Chelonus insularis* (Hymenoptera: Braconidae) and *Campoletis sonorensis* (Hymenoptera: Ichneumonidae), two primary neotropical parasitoids of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 103: 742-749.
- Joly, S., R. L. Snyder, K. H. Frederick-Hudson, and J. Schul. 2009. Molecular phylogenetics of the genus *Neococonocephalus* (Orthoptera, Tettigonidae) and the evolution of temperature life histories. *PLoS One* 4:1-9.
- Kieu, T. T., V. G. Malathi, and D. Dey. 2013. DNA Barcode for identification of *Chelonus blackburni* (Hymenoptera: Braconidae), a biocontrol agent in cotton crop. *Omonrice* 19: 61-68.

- Kittel, R. N, and A. D. Austin. 2014. Synopsis of Australian chelonine wasps (Hymenoptera: Braconidae: Cheloninae) with description of two new genera. *Austral Entomology* 53: 183-202.
- Librado P, and J. Rozas. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Nascimento, A. R, and A. M. Penteado-Dias. 2011. New species of *Chelonus* (Microchelonus) Szépligeti, 1908 (Hymenoptera: Braconidae: Cheloninae) from Brazil. *Braz. J. Biol.* 71: 511-515.
- Rannala, B, and Z. Yang. 1996. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *J. Mol. Evol.* 43: 304-311.
- Rodríguez-Mota, A. J., E. Ruíz-Cancino, J. M. Coronado-Blanco, J. Treviño-Carreón, y I. Khalaim-Andrey. 2014. Avispas Ichneumonoideas que atacan al gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*) en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.) en México. *Agroproductividad.* 28-31.
- Rodríguez-Romero, A., P. Posos-Ponce, B. Peteira, y M. Suris. 2011. Evaluación de tres protocolos de extracción de ADN en insectos del orden Thysanoptera. *Rev. Prot. Veg.* 26: 187-190.
- Rogers, A. R., and H. C. Harpending. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol. Biol. Evol.* 9: 552-569.
- Ronquist, F., and J. P. Huelsenbeck. 2003. Mrbayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Rozas, J. 2009. DNA sequence polymorphism analysis using DnaSP, pp. 337-350, *In* D. Posada [ed.], *Bioinformatics for DNA sequence analysis. Methods in Molecular Biology Series Vol. 537.* Humana Press, Clifton, New Jersey.
- Saavedra-Aguilar, M. 2009. Géneros y especies de avispas de la familia Braconidae (Hymenoptera: Ichneumonidae) del Estado de Hidalgo. Tesis de Doctorado, Colegio de Posgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México. 70 p.
- Sequencher® version 4.10. 2010. DNA sequence analysis software, Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI USA.
- Schneider, S., and L. Excoffier. 1999. Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary

- among sites: application to human mitochondrial DNA. *Genetics* 152: 1079-1089.
- Slatkin, M., and R. R. Hudson. 1991. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics* 129: 555-562.
- Stamatakis, A. 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22: 2688-2690.
- Stamatakis, A., P. Hoover and, J. Rougemont. 2008. A Rapid bootstrap algorithm for the RAxML web servers systematic. *Biology* 57: 758-771.
- Tajima, F. 1983. Evolutionary relationships of DNA sequences in finite populations. *Genetics* 105: 437-460.
- Tajima, F. 1989. The effect of change in population-size on DNA polymorphism. *Genetics* 123: 597-601.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G Higgins. 1997. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25: 4876-4882.
- Tilmon, K. J., B. N Danforth, W. H Day, and M.P. Hoffmann. 2000. Determining parasitoid species composition in a host population: A molecular approach. DNA barcode for identification of *Chelonus blackburni*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 93: 640-647.
- Toro, M., and A. Caballero. 2005. Characterization and conservation of genetic diversity in subdivided populations. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biol. Sci.* 360: 1367-1378.
- Wharton, R. A., P. M. Marsh, and M. J. Sharkey. 1997. Manual of the new world genera of the family Braconidae (Hymenoptera). Special publication of the International Society of Hymenopterists. Vol. I. 439 p.
- Wernersson, R., and A. G. Pedersen. 2003. RevTrans: multiple alignment of coding DNA from aligned amino acid sequences. *Nucleic Acids Res.* 31: 3537-3539.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Ann. Eugen.* 15: 323-354.

Zhu, Y. C., E. W Riddick, L. Williams, D. J. Schotzko, G. A. Logarzo, and C. G. Jackson. 2004. Potential of detection and identification of nymphal parasitoids (Hymenoptera: Braconidae) of *Lygus* bugs (Heteroptera: Miridae) by using polymerase chain reaction and ITS2 sequence analysis techniques. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 97: 743-752.

**CAPÍTULO IV. VARIABILIDAD GENÉTICA DE *METEORUS* HALIDAY, 1835  
(HYMENOPTERA: BRACONIDAE) EN DURANGO, MÉXICO**

## 4.1 INTRODUCCIÓN

El gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* J.E Smith, (Lepidoptera: Noctuidae) económicamente es una de las plagas más importantes que atacan el maíz en el continente americano y más, recientemente en China, África y Europa (Jourdie et al., 2010, Blanco et al., 2014, USDA, 2019). Para su control, se utilizan insecticidas químicos, solo en maíz, la cantidad de insecticida utilizada puede alcanzar las 30,000 toneladas de ingrediente activo por año (Blanco et al. 2010).

Una alternativa es el control biológico que incluye a los enemigos naturales, de los cuales los parasitoides se han utilizado como agentes reguladores de las poblaciones de insectos. Los parasitoides de la familia Braconidae después de Ichneumonidae representan la familia con la mayor riqueza taxonómica del orden Hymenoptera (Coronado y Zaldivar 2014). A nivel mundial, se reconocen 45 subfamilias, 1,103 géneros y 21,221 especies válidas de Braconidae (Yu et al.2016). En México, aunque se han realizado importantes intentos en los últimos años para clasificar y describir especies de esta familia, existen 36 subfamilias, 319 géneros, 707 especies específicas y 845 morfoespecies (Coronado 2013). Dentro de esta familia se encuentra el género *Meteorus* Haliday, 1835, parasitoides koinobiontes de coleópteros y lepidópteros, compuestos por 356 especies descritas (Aguirre et al.2015; Yu et al.2016). Para la región antártica, se han reportado 37 especies de *Meteorus*, tres de ellas como parasitoides de gusano cogollero (Gutiérrez et al. 2015; Yu et al. 2016), sin embargo, en Durango, hasta ahora solo se han registrado dos morfoespecies de *Meteorus* (García et al.2013) y la especie *Meteorus laphygmae* Viereck, 1913 (Bahena 2008).

La identificación taxonómica basada en los caracteres morfológicos combinado con los caracteres moleculares proporciona evidencia que permite una mejor

comprensión de la biodiversidad, así como la filogenia, la genética de poblaciones, la filogeografía y la biogeografía. La genética molecular crea la necesidad del reconocimiento de especies a través de caracteres genéticos como el uso de un fragmento del gen de la citocromo c oxidasa, los genes codificadores de proteínas mitocondriales han jugado un papel importante en muchos intentos de reconstrucción de la filogenia, ya sea solos o en conjunto con otros genes, se amplifican fácilmente debido a su alto número de copias, y a menudo muestran algunos sitios de unión de cebadores altamente conservados (Quicke et al. 2012) y la transcripción interna de ITS (Tilmon et al., 2000; Erlandson et al., 2003; 2004 ; Kieu et al., 2013; Jourdie et al., 2008; Rosero-Galindo et al., 2015). Estas herramientas son efectivas para estimar la variación dentro / entre poblaciones y entre especies para probar diferentes hipótesis taxonómicas. Los caracteres genéticos son universales y tienen la ventaja de evidenciar la base genética de la variación (Escobar-Camacho, 2013). Sobre esto, Jourdie et al. (2008) realizaron la identificación de siete especies de parasitoides himenópteros de *S. frugiperda*, utilizando amplificación en cadena de la polimerasa y digestión por enzimas de restricción donde se incluyó a *M. laphygmae*. Villegas-Mendoza et al. (2015) caracterizaron la secuenciación genética de *M. laphygmae* por COI.

En este trabajo, se analizó la variabilidad genética de las especies de parasitoides *Meteorus* presentes en la región maicera del estado de Durango, debido a que hay pocos estudios que se hayan llevado a cabo para su identificación taxonómica y genética en un género que presenta una gran complejidad taxonómica en relación a la delimitación de especies, utilizando caracteres morfológicos combinados con evidencias genéticas.

## **4.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.2.1 Material biológico**

El estudio se realizó en ocho localidades correspondientes a cinco municipios

[Santiago Papasquiari, Pánuco de Coronado, Canatlán, Guadalupe Victoria y Durango, Dgo.]. El área de estudio corresponde a la Región de los Valles, los Llanos y las Quebradas, con altitudes que van desde 1,884 a 2,319 msnm con un clima templado semiseco (Tabla 4.1). Las colecciones se realizaron en el ciclo primavera-verano 2012 a 2017, en cultivos de maíz. Se recolectaron un total de 150 larvas de gusano cogollero por sitio, cada 15 días. Las larvas se colocaron en vasos de plástico con dieta artificial (Ashby 1972) en una cámara de cría a una temperatura de 25 a 27 °C, humedad relativa del 60% y un fotoperíodo de 10:14 L:O, hasta que llegaron a su emergencia. Los parasitoides que emergieron se colocaron individualmente en viales de plástico con 96% de alcohol y se almacenaron a 20°C. La identificación de especies se realizó utilizando las claves taxonómicas de Wharton *et al.* (1997) para reconocer subfamilias y géneros de los especímenes recolectados. La identificación de las especies de *Meteorus* fue corroborada a través de la comparación del material preservado con especímenes de referencia de la Colección de Insectos del Museo MIFA de la Universidad Autónoma de Tamaulipas y el Colegio de Postgrado, así como con la diagnosis de la especie, publicado en Aguirre *et al.* (2011, 2015), Muesebeck (1923). Los especímenes de referencia de las especies recolectadas se depositaron en el CIIDIR-IPN Unidad Durango.

#### **4.2.2 Aislamiento de ADN**

Se utilizaron 18 individuos, separados según sus características morfológicas (Tabla 4.2), la especie más abundante fue *M. laphygmae* con cinco individuos, seguida de *M. arizonensis* con cuatro especímenes (por duplicado). Se aisló el ADN genómico total por individuo usando el kit de extracción de ADN (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. A partir del ADN aislado se realizó la amplificación de un fragmento del gen mitocondrial de la citocromo c oxidasa I (COI), en los diferentes individuos.

**Tabla 4.1.** Fechas y sitios de colecta de gusano cogollero, primavera-verano (2015-2017).

<b>Localidad</b>	<b>Ubicación</b>	<b>Altitud (msnm)</b>
Sebastián Lerdo de Tejada, La Ferrería, Dgo.	1. 23° 57' 36.3" N 104° 37' 40.8" O	1898
	2. 23° 57' 24.9" N 104° 37' 54.0" O	1889
	3. 23° 57' 33.6" N 104° 37' 43.9" O	1884
	4. 23° 57' 29.1" N 104° 37' 48.5" O	1906
Col. Minerva, Dgo.	1. 23° 57' 54.3" N 104° 26' 19.3" O	1876
	2. 23° 57' 59.3" N 104° 26' 14.4" O	1887
	3. 23° 55' 57.6" N 104° 28' 28.3" O	1882
	4. 23° 56' 22.1" N 104° 27' 37.9" O	1881
Francisco I. Madero, Pánuco de Coronado	1. 24° 11' 46.9" N 104° 31' 47.5" O	1870
	2. 24° 10' 43.4" N 104° 33' 01.7" O	1872
	3. 24° 10' 39.2" N 104° 32' 45.3" O	1870
	4. 24° 23' 20.7" N 104° 20' 06.6" O	1954
J. Gpe. Aguilera, Sta. Lucía, Canatlán	1. 24° 28' 33.2" N 104° 42'56.6" O	1957
	2. 24° 28' 33.2" N 104° 42'56.6" O	1957
	3. 24° 28' 30.3" N 104° 43' 01.3" O	1925
	4. 24° 26' 55.5" N 104° 42' 23.4" O	1948
Mezquital, Dgo.	1. 23° 58' 25.9" N 104° 34' 28.8" O	1868
	2. 23° 57' 36.3" N 104° 37' 40.8" O	1898
	3. 23° 57' 59.3" N 104° 26' 14.4" O	1887
	4. 23° 57' 33.6" N 104° 37' 43.9" O	1884
Guadalupe Victoria	1. 24° 25' 58.0" N 104° 08' 33.7" O	2018
	2. 24° 25' 45.2" N 104° 09' 21.8" O	2008
	3. 24° 25' 58.0" N 104° 08' 33.7" O	2021
	4. 24° 26' 05.1" N 104° 08' 52.1" O	2008
Santiago Papasquiaro	1. 25° 01' 28.4" N 105° 24'20.9" O	1734
	2. 25° 01' 23.0" N 105° 24'06.3" O	1737
	3. 25° 07' 27.4" N 105° 26'24.0" O	1695
	4. 25° 08' 22.1" N 105° 25'57.0" O	1693
Carr. Mazatlán, Dgo.	1. 23° 57' 33.2" N 104° 48' 15.5" O	2316
	2. 23° 57' 39.8" N 104° 48' 04.8" O	2313
	3. 23° 57' 34.8" N 104° 48' 18.3" O	2322
	4. 23° 57' 34.9" N 104° 48' 38.5" O	2319

Datos de colecta: 1. 18-29 Junio, 2. 9-27 Julio, 3. 23-10 Julio-Agosto, 4. 27-7 Agosto-Septiembre.

### **4.2.3 Amplificación y Secuenciación**

El gen mitocondrial (ADNmt) se amplificó parcialmente usando los oligonucleótidos HCO-2198 (5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3 ') (adelante) y LCO-1490 (5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3 ') (inverso) por Folmer et al. (1994). Las condiciones de la PCR fueron: 1 min 30 s a 94 °C, desnaturalización 35 ciclos a 94 °C (1 min), alineación 50 °C (1 min), extensión 72 °C 1 min y extensión final a 72 °C (5 min) en un termociclador Labnet 9600 (Labnet International, Inc., Edison, Nueva Jersey) usando 50 a 150 ng de ADN, 0,40 pmol de cada oligonucleótido, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP (Promega , Madison Wisconsin), 1X de tampón de reacción en cadena de polimerasa y 1 U de polimerasa Taq (Promega) en un volumen final de 50 µL (Jourdie et al., 2008; 2010). Los productos amplificados de PCR se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio y se observaron en un transiluminador UV a 430 nm. Los productos de doble cadena se purificaron utilizando el sistema de purificación Wizard SV Gel y PCR Clean-up System. Los productos amplificados fueron secuenciados en un secuenciador Applied Biosystems 310 Genetic Analyzer utilizando el método Big Dye Terminator (Applied Biosystems Inc., Foster City, California). Los archivos de secuencias fueron editados y alineados utilizando Sequencher 4.1 (Sequencher 2010).

### **4.2.4 Análisis Molecular**

Las secuencias resultantes se tradujeron en proteínas para confirmar la identidad de los fragmentos (Wernersson y Pedersen 2003). La alineación múltiple se realizó usando Clustal X (Thompson et al., 1997), con costos de apertura (costos de apertura de huecos) = 50, extensión de huecos (extensión de huecos) = 6.6, retardo divergente de secuencias (secuencias divergentes de retardo) = 30%, y el peso de transición del ADN = 0.5 (Harrison y Langdale 2006). La diversidad genética dentro de las especies se midió como la diversidad de haplotipos (h), el número de haplotipos privados (P) y la diversidad de nucleótidos (p), estos análisis se realizaron utilizando Arlequin versión 3.5.1.21 (Excoffier y Lischer 2010) y versión

DnaSP 5.1 (Librado y Rozas 2009). La estructura de la población se exploró mediante el análisis de la varianza molecular (AMOVA) con Arlequin versión 3.5.1.21 (Excoffier y Lischer 2010). Se analizaron las diferencias genéticas entre individuos. Calculamos la suma de los cuadrados de desviación (SSD) y el índice de Harpending's-Raggedness (Harpending 1994) para evaluar el ajuste de los datos observados, utilizamos el modelo de expansión demográfica o el modelo de rango geográfico repentino. La distribución del desajuste se comparó con las distribuciones esperadas bajo modelos de expansión repentina de la población (Rogers y Harpending 1992) y expansión espacial repentina (Excoffier 2004, Rozas 2009). Los parámetros del modelo ( $h_0$ ,  $h_1$  y  $s$ ) se estimaron utilizando un análisis no lineal por cuadrados mínimos.

## 4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.3.1 Identificación Fenotípica

De acuerdo a la diagnosis de las especies de *Meteorus*, los especímenes analizados en este trabajo se agruparon en dos especies nominales: *M. arizonensis* y *M. laphygmae* (Tabla 4.2), dentro de estas especies se presentaron nueve morfotipos (ANS568-ANS585) basados en las diferencias en el color del cuerpo y patrones distintivos en el mesosoma de los parasitoides (imágenes que no se muestran en este trabajo porque están relacionadas con aspectos morfológicos). En nuestro estudio los individuos no fueron sometidos a ninguna prueba (cambios de temperatura durante su ciclo biológico), esto indica que aunque se presentaron nuevos morfotipos y aunque las características taxonómicas indican que corresponden a dos especies, de acuerdo a su genética es una sola especie, con más de 98% de identidad (Fig. 4.1).

**Tabla 4.2.** Datos de colecta de los individuos analizados taxonómicamente, las especies a las que pertenecen y código de acceso en el GenBank®

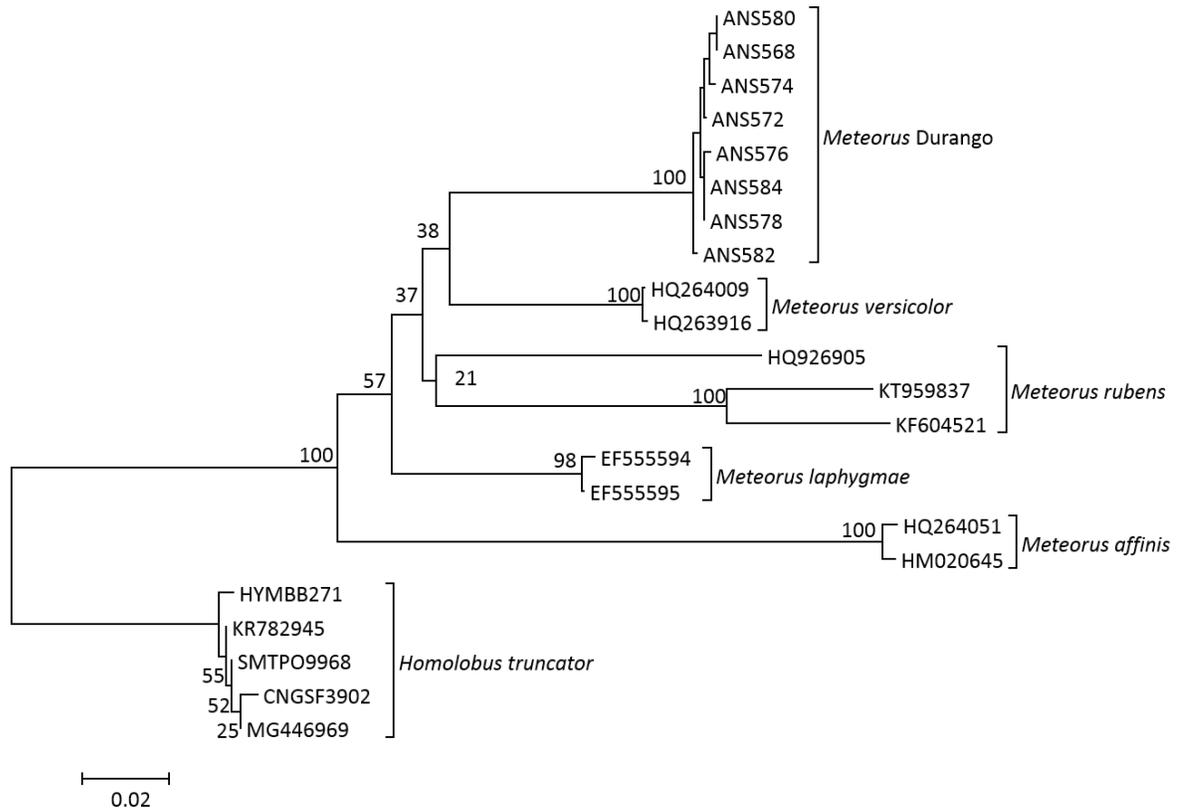
Código morfortipos	Fecha de colecta	Localidad (municipio)	Especies de <i>Meteorus</i>	Código de acceso en el GenBank®
ANS568	30 jun 2017	Gpe. Victoria	<i>arizonensis</i>	MN309821
--	12 agosto 2016	Santiago Papasquiaro	<i>laphygmae</i>	Sin secuencia
ANS572	30 jun 2017	Pánuco de Coronado	<i>arizonensis</i>	MN309820
ANS574	8 agosto 2016	Col. Minerva, Durango	<i>laphygmae</i>	MN309815
ANS576	12 agosto 2016	Santiago Papasquiaro	<i>arizonensis</i>	MN309817
ANS578	8 agosto 2016	Fco. I Madero	<i>arizonensis</i>	MN309819
ANS580	12 agosto 2016	Santiago Papasquiaro	<i>laphygmae</i>	MN309818
ANS582	21 agosto 2016	Col. Minerva, Durango	<i>laphygmae</i>	MN309814
ANS584	21 agosto 2016	Sebastian Lerdo de Tejada. Dgo.	<i>laphygmae</i>	MN309816

De acuerdo con Abe et al. (2013), ellos analizaron cuatro aislamientos monoparentales de *M. pulchricornis* (parasitoide del gusano cogollero), los cuales se sometieron a cuatro temperaturas diferentes, mostrando variaciones de color en el mesonoto, el propodeo y los tergitos metasomales en relación a la temperatura (15, 20, 25 y 30 °C) sin cambios en su genotipo, este fenómeno ha sido observado en diferentes órdenes de insectos: ortópteros [*Tetrix subulata* L. 1758 (Orthoptera: Tetrigidae)], coleópteros [*Adalia bipunctata* L. 1758, Coleoptera: Coccinellidae)] (Valverde y Schielzeth 2015; Muggleton et al. 1975).

#### 4.3.2 Análisis Molecular

Los fragmentos amplificados de COI subunidad I fueron de 650 pb. La máxima distribución de la varianza se observó cuando se formaron dos grupos: el grupo 1: *Meteorus laphygmae* y *M. arizonensis* (nueve morfortipos) de Durango y el grupo 2: *M. laphygmae* (Puebla, Colima, Tamaulipas) (Jourdie et al. 2008, Villegas-Mendoza et al, 2015), especie indicada como predominante en la República Mexicana (Jourdie et al. 2008), debido a que nuestro grupo no se puede comparar con *M. arizonensis*, *M. autographae* (Yu et al., 2016) (otros parasitoides de gusano

cogollero en México), dado que no tienen secuencias genéticas de estas especies en el genbank®, éste análisis indico que los grupos son diferentes entre sí (FSC = 0.02289,  $p = 0.011$  al 95% de confianza), no hay diferencia dentro de ellos (FST = 0.97679,  $p = 0.43$  al 95% de confianza) (Fig. 4.1).



**Figure 4.1.** Dendrograma del vecino más cercano en morfotipos de *Meteorus* sp.

La comparación del grupo *Meteorus* de Durango también se realizó con otros parasitoides del género *Meteorus* en México como: *M. rubens* y *M. versicolor*. La distribución no pareada del ADN (Mismatch distribution), mostró dos picos que refuerza la existencia de dos grupos correspondientes a los grupos 1 y grupo 2 y cada uno de ellos presentaron un incremento poblacional súbito.

Respecto a las pruebas de neutralidad, estas resultaron ser no diferentes a cero ( $D=0.09354$ ,  $p=0.89450$ ;  $F=-0.39498$ ,  $p=0.0890$ ), por lo se asume la neutralidad evolutiva (no existe selección positiva o negativa). Del mismo modo, el valor negativo de  $F$  de  $F_u$  es indicativo de una expansión poblacional súbita. El cálculo

del número de migrantes por generación para las especies fue de  $N_m=2.2$  individuos efectivos entre las especies del grupo 1, lo que indica un fuerte intercambio de migrantes efectivos entre ellos (migrantes que dejan descendencia a la siguiente generación).

Los morfotipos de *Meteorus* sp., encontrados en Durango, se agruparon genéticamente en un solo grupo (distancia genética entre ellos de 0,0005), aunque taxonómicamente pueden pertenecer a dos especies diferentes (*M. arizonensis* y *M. laphygmae*), pero genéticamente se encuentran alejados de *M. laphygmae* hasta con una distancia genética de 0.118 (reportado por otros autores) (Tabla 3.3), con una distancia de 0.163 y 0.105 para *M. rubens* y *M. versicolor* (especies de *Meteorus* registradas en el GenBank® procedentes de México), y *M. ruffis* de otro país (0.212), lo que indica que son especies diferentes, también se compararon con un grupo externo: *Homolobus truncator* (género similar a *Meteorus* encontrado en la región de maíz de Durango, la secuencia analizada fue de otros autores) (0.206) (Jourdie et al., 2008) (Tabla 3). Jourdie et al. (2008) indicaron que las distancias genéticas intraespecíficas presentan números mucho más bajos que las distancias interespecíficas, lo que indica que el fragmento de la subunidad I de citocromo c oxidasa permite una distinción clara entre especies como en este caso. La información de la secuencia de mtDNA COI se envió a la base de datos del GenBank® (códigos de secuencias MN309814-MN309821) (Tabla 4.2).

Tabla 4.3. Distancias genéticas dentro de (mitad inferior) y entre especies (diagonales).

Las distancias genéticas se calcularon con un modelo de sustitución de parámetros Kimura 2.

<b>Species comparables</b>	<b><i>Meterorus</i> sp. Dgo.</b>	<b><i>M. versicolor</i></b>	<b><i>M. laphygmae</i></b>	<b><i>M. rubens</i></b>	<b><i>M. affinis</i></b>
<i>Meterorus</i> sp. Dgo.	0.0005				
<i>M. versicolor</i>	0.105				
<i>M. laphygmae</i>	0.118	0.108			
<i>M. rubens</i>	0.163	0.137	0.150		
<i>M. affinis</i>	0.212	0.211	0.177	0.243	
<i>H. truncator</i>	0.206	0.216	0.194	0.240	0.255

El análisis de un fragmento del gen de la subunidad I de la citocromo c oxidasa se propuso en este trabajo como un sistema de identificación altamente efectivo, ya que los genomas mitocondriales de especies relacionadas tienen una gran diversidad que facilita su discriminación, también ha sido desarrollado para identificar especies y revelar especies morfológicamente crípticas sobre la base de la unicidad genética y la agrupación de secuencias.

*M. laphygmae* (secuencias reportadas en GenBank®) se aleja del grupo de *Meteorus* de Durango (*M. laphygmae* y *arizonensis*) en este estudio genético, aunque taxonómicamente los caracteres coinciden con la diagnosis registrada hasta el momento, por lo que podrían ser redescritos posteriormente, como ha sucedido con otras especies que han sido identificadas erróneamente. Al comparar el grupo 1, de *Meteorus* de Durango (*M. laphygmae* y *arizonensis*), este se aleja del grupo externo con el que fue comparado *H. truncator*, lo cual es correcto porque son géneros distintos, sin embargo, aunque varios de sus caracteres morfológicos coinciden, lo que podría confundir a este grupo incluso con *Zele* sp. (morfológicamente hablando).

La reconstrucción de las afinidades filogenéticas mostró que los especímenes analizados de *Meteorus* sp., estaban en un solo grupo donde sus caracteres basados en patrones de color en el mesosoma están mezclados o son distintivos (no forman grupos diferentes) por lo que representan variaciones morfológicas, no relacionado con la variación genética a nivel de especie, a su vez, este grupo está separado de otro grupo de secuencias que pertenecen a *Meteorus* sp. y a *M. laphygmae* de otras partes de México.

#### 4.4 LITERATURA CITADA

Abe, Y., T. Nishimura, and K. Maeto. 2013. Causes of polymorphic melanism and its thermoregulatory function in a parasitoid wasp *Meteorus pulchricornis* (Hymenoptera: Braconidae). Eur. J. Entomol. 110: 627-632.

- Aguirre, F. H., C. E. Sarmiento, and S. R. Shaw. 2011. Taxonomic revision and morphometric analysis of *Meteorus* Haliday, 1835 (Hymenoptera: Braconidae: Meteorinae) from Colombia. *Zootaxa* 2938: 1-68.
- Aguirre, F. H., L. Almeida, S. Shaw, and C. Sarmiento. 2015. An illustrated key to neotropical species of the genus *Meteorus* Haliday (Hymenoptera, Braconidae, Euphorinae). *ZooKeys* 489: 33-94.
- Ashby, G. 1972. The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals. pp. 582-587. *In* A. N. Worden and W. Lane-Petter. [Eds.], The Universities Federation for Animal Welfare, Londres.
- Bahena-Juárez, F. 2008. Enemigos naturales de las plagas agrícolas del maíz y otros cultivos. INIFAP. Libro Técnico No. 5. Uruapan, Michoacán. 174 p.
- Blanco, A. C., M. Portilla, J. L. Jurat-Fuentes, J. F. Sánchez, D. Viteri, P. Vega-Aquino, A. P. Terán-Vargas, A. Azuara-Domínguez, J. D. López, R. S. Arias. 2010. Susceptibility of isofamilies of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to Cry1Ac and Cry1Fa proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Southwest. Entomol.* 35: 409-415. Brownstein, M. J., J. D. Carpten, and J. R. Smith. 1996.
- Blanco, A. C., J. G. Pellegaud, U. Nava-Camberos, D. Lugo-Barrera, P. Vega-Aquino, J. Coello, A. P. Teran-Vargas, and J. Vargas-Camplis. 2014. Maize pests in Mexico and challenges for the adoption of Integrated Pest Management Programs. *J. Integr. Pest. Manag.* 5(4):1-9.
- Coronado-Blanco, J. 2013. La familia Braconidae (Hymenoptera) en Mexico. *Entomologia Mexicana* 12: 31-44.
- Coronado-Blanco, J., and A. Zaldívar-Riverol. 2014. Biodiversidad de Braconidae (Hymenoptera: Ichneumonoidea) en Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 85: 372-378.
- Erlandson, M., L. Braun, D. Baldwin, J. Soroka, M. Ashfaq, and D. Hegedus. 2003. Molecular markers for *Peristenus* spp. (Hymenoptera: Braconidae) parasitoids associated with *Lygus* spp. (Hemiptera: Miridae). *Can. Entomol.* 35: 71-83.

- Escobar-Camacho, D. 2013. Diversidad criptica y relaciones filogenéticas de la familia Characidae (Ostariophysi: Characiformes) en el Yasuni, Ecuador. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Escuela de Ciencias Biológicas. Tesis de Licenciatura. Quito, Ecuador. 91 p.
- Excoffier, L. 2004. Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range expansion: lessons from the infinite-island model. *Mol. Ecol.* 13: 853-864.
- Excoffier, L., and H. L. Lischer. 2010. Arlequin suite ver. 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* 10: 564-567.
- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz, and R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3: 294-299.
- García-Gutiérrez, C., M. B. González-Maldonado, and A. González-Hernández. 2013. Parasitismo natural de Braconidae e Ichneumonidae (Hymenoptera) sobre *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Rev. Colomb. Entomol.* 39(2): 25-29.
- Gutiérrez-Ramírez, A., A. Robles-Bermúdez, J. Cambero-Campos, and J. M. Coronado-Blanco. 2015. *Meteorus arizonensis* Muesebeck, 1923 (Hymenoptera: Braconidae): new record for México. *Acta Zool. Mex.* (n. s.) 31(1): 123-124.
- Harpending, H. C. 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Hum. Biol.* 66: 591-600.
- Harrison, C. J., and J. A. Langdale. 2006. A step by step guide to phylogeny reconstruction. *Plant J.* 45: 561-572.
- Jourdie, V., N. Alvarez, and T. C. J. Turlings. 2008. Identification of seven species of hymenopteran parasitoids of *Spodoptera frugiperda*, using polymerase chain reaction amplification and restriction enzyme digestion. *Agric. Forest Entomol.* 10: 129-136.

- Jourdie, V., V. Eduardo, H. Murillo, J. M. Bento, T. C. J. Turlings, and N. Alvarez. 2010. Phylogeography of *Chelonus insularis* (Hymenoptera: Braconidae) and *Campoletis sonorensis* (Hymenoptera: Ichneumonidae), two primary neotropical parasitoids of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 103: 742-749.
- Kieu, T. T. T., V. G. Malathi, and D. Dey. 2013. DNA Barcode for identification of *Chelonus blackburni* (Hymenoptera: Braconidae), a biocontrol agent in cotton crop. *Omonrice* 19: 61-68.
- Librado, P., and J. Rozas. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Muesebeck, C. F. 1923. A revision of the North American species of ichneumon-flies belonging to the genus *Meteor* Haliday. *Proceedings of the United States National Museum* 63: 34-35.
- Muggleton, J., D. Lonsdale, and B.R. Benham. 1975. Melanism in *Adalia bipunctata* L. (Col., Coccinellidae) and its relationship to atmospheric pollution. *J. Appl. Ecol.* 12: 451-464.
- Quicke, D. L., M. A. Smith, D. H. Janzen, W. Hallwachs, J. Fernandez-Triana, N. M. Laurenne, A. Z. Var-Rivero'n, M. R. Shaw, G. R. Broad, S. Klopstein, S. R. Shaw, J. Hrcek, P. D. Hebert, S. E. Miller, J. J. Rodriguez, J. B. Whitfield, I. D. Gauld, D. Chesters, and A. P. Vogler. 2012. Utility of the DNA barcoding gene fragment for parasitic wasp phylogeny (Hymenoptera: Ichneumonoidea): data release and new measure of taxonomic congruence. *Mol. Ecol. Resour.* 12: 676-685.
- Rogers, A. R., and H. C. Harpending. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol. Biol. Evol.* 9: 552-569.
- Rosero Galindo, C, Y., and G. I Jaramillo Ramírez, G. I. 2015. Epidemiología molecular de *Anopheles darlingi* en Colombia. En: *Colombia Biomédica: Revista del Instituto Nacional de Salud* ISSN: 0120-4157 Ed: Instituto Nacional de Salud. 35: 186-186.
- Rosero-Galindo, C. Y., J. P. García-López, and F. A. Montenegro-Coral. 2015. Marcadores moleculares como herramienta de identificación genética de

- vectores de Leishmania y Bartonelosis: Una aproximación al Grupo Verrucarum. Rev Univ. salud. 18:138-155.
- Rozas, J. 2009. DNA sequence polymorphism analysis using DnaSP, pp. 337-350, *In* D. Posada [ed.], Bioinformatics for DNA sequence analysis. Methods in Molecular Biology Series Vol. 537. Humana Press, Clifton, NJ.
- Sequencher® version 4.10. 2010. DNA sequence analysis software, Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI.
- Valverde, P., and H. Schielzeth. 2015. What triggers colour change? Effects of background colour and temperature on the development of an alpine. BMC Evol. Biol. 15: 1-12.
- Villegas-Mendoza, J. M., A. Sánchez-Varela, and N. Rosas-García. 2015. Caracterización de una especie de *Meteorus* (Hymenoptera: Braconidae) presente en larvas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) en el Norte de Tamaulipas, México. Southwest. Entomol. 40(1):161-170.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G Higgins. 1997. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. 25: 4876-4882.
- Tilmon, K. J, B. N Danforth, W. H. Day, and M.P. Hoffmann. 2000. Determining parasitoid species composition in a host population: a molecular approach. DNA barcode for identification of *Chelonus blackburni*. Ann. Entomol. Soc. Am. 93: 640-647.
- USDA. 2019. China voracious fall armyworm invades south China. <https://www.fas.usda.gov/data/china-voracious-fall-armyworm-invades-south-china>
- Wharton, R. A., P. M. Marsh, and M. J. Sharkey. 1997. Manual of the new world genera of the family Braconidae (Hymenoptera). Special publication of the International Society of Hymenopterists 1:1-439.
- Wernersson, R., and A. G. Pedersen. 2003. RevTrans: multiple alignment of coding DNA from aligned amino acid sequences. Nucleic Acids Res. 31: 3537-3539.
- Yu, D. S., C. V. Achterberg, K. Horstmann. 2016: Taxapad 2016, Ichneumonoidea 2016, Database on flash-drive, Ottawa, Ontario, Canada.

## CONCLUSIONES GENERALES

Este estudio ha permitido conocer las especies de parasitoides de la familia Braconidae de gusano cogollero, una importante plaga de maíz en Durango, las cuales presentaron variabilidad genética, taxonómicamente sus características coinciden con las diagnósis establecidas desde hace cientos de años, sin embargo genéticamente no, el estudio no contempla su re descripción, pero aporta importantes aspectos de su caracterización genética, principalmente de los géneros *Chelonus* y *Meteorus*, así mismo se presentan las especies de parasitoides de la familia Tachinidae, los cuales son nuevos registros como parasitoides de gusano cogollero en Durango y uno de ellos en México, estos parasitoides contribuyen a la biodiversidad de parasitoides himenópteros y dípteros de esta plaga en la región maicera de Durango, los cuales pueden además ser candidatos dentro del control biológico de la plaga dentro de un contexto de sustentabilidad y buenas prácticas agrícolas, contribuyendo al medio ambiente. La delimitación de especies de parasitoides utilizando herramientas taxonómicas combinadas con el uso de una caracterización molecular permitió esclarecer hipótesis y dudas taxonómicas.