

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCION DE POSTGRADO



IDENTIFICACION MOLECULAR DE ESPECIES DE APHELINIDAE DE
TAMAULIPAS Y VERACRUZ

Tesis

Que presenta DANIEL ALFONSO GARCÍA GUERRERO

como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

Saltillo, Coahuila

Diciembre de 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCION DE POSTGRADO



IDENTIFICACION MOLECULAR DE ESPECIES DE APHELINIDAE DE
TAMAULIPAS Y VERACRUZ

Tesis

Que presenta DANIEL ALFONSO GARCÍA GUERRERO
como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

Dr. Oswaldo García Martínez

Dr. Raúl Rodríguez Herrera

Saltillo, Coahuila

Diciembre de 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SUBDIRECCION DE POSTGRADO



IDENTIFICACION MOLECULAR DE ESPECIES DE APHELINIDAE DE
TAMAULIPAS Y VERACRUZ

Tesis

Que presenta DANIEL ALFONSO GARCÍA GUERRERO

como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

Dr. Oswaldo García Martínez

Dra. Svetlana Nikolaevna Myartseva

Saltillo, Coahuila

Diciembre de 2017




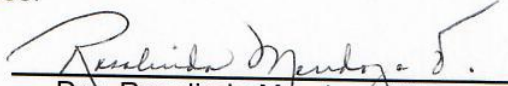
IDENTIFICACION MOLECULAR DE ESPECIES DE APHELINIDAE DE
TAMAULIPAS Y VERACRUZ

Tesis

Elaborada por DANIEL ALFONSO GARCÍA GUERRERO como requisito parcial
para obtener el grado de Doctor en Ciencias en Parasitología con la supervisión
y aprobación del
Comité de Asesoría



Dr. Oswaldo García Martínez
Asesor principal


Dra. Svetlana Nikolaevna Myartseva
Asesor
Dr. Raúl Rodríguez Herrera
Asesor
Dr. Luis Alberto Aguirre Uribe
Asesor
Dr. Mariano Flores Dávila
Asesor
Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal
Subdirector de Postgrado
UAAAN

AGRADECIMIENTOS

Al **CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA**, por el apoyo brindado, parte esencial para la realización de este postgrado.

A la **UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**, que aunque no me forje como un ingeniero agrónomo en tus aulas; aun así siento formar parte de ti.

A mi **DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA AGRICOLA**, y en especial a todos mis maestros, que con su esfuerzo, dedicación y consejos, me brindaron parte de sus conocimientos.

Al Dr. **OSWALDO GARCÍA MARTÍNEZ**, gracias por permitirme una vez más formar parte de su grupo selecto de alumnos investigadores.

A la Dra. **SVETLANA NIKOLAEVNA MYARTSEVA**, por ser mi mentora en este grupo de insectos tan bonito y complicado a la vez.

Al Dr. **RAÚL RODRÍGUEZ HERRERA**, por sus cátedras, consejos y por haberme permitido formar parte del laboratorio de Biología Molecular de la UA de C.

Al Dr. **LUIS ALBERTO AGUIRRE URIBE**, por sus cátedras, sus regaños y consejos.

Al Dr. **MARIANO FLORES DÁVILA**, por sus cátedras y consejos.

Y no menos importante, a todos aquellos buenos **amigos y amigas de la Narro y de la UA de C**, por compartir momentos por demás interesantes y haberlos hecho amenos.

Por todo esto, muchas gracias

Alfonso...

DEDICATORIA

ESTA TESIS ESTA DEDICADA CON TODO MI AMOR, MI CARIÑO Y MI RESPETO

**A mis padres
ROSA LAURA GUERRERO RESENDIZ
JUAN GARCÍA HERNÁNDEZ**

Por todo el apoyo incondicional que me han brindado, sin pedir nada a cambio, a mi madre por todas esas ocasiones en las que por más difícil que fueran los momentos nunca supiste dejarme solo, por ser un ejemplo de amor puro. A mi padre, por ser el sostén de esta hermosa familia en la que he tenido la dicha de haber nacido.

Gracias por haber sembrado en mi la semilla de la responsabilidad, de la tenacidad, del amor por las cosas y por la vida.

GRACIAS

A mis queridos hermanos

**JESÚS ÁNGEL GARCÍA GUERRERO
JOSÉ ANTONIO GARCÍA GUERRERO
JULIÁN GARCÍA GUERRERO**

Apoyos incondicionales de toda la vida, siempre dispuestos a ayudarme en lo que sea necesario.

GRACIAS HERMANOS

Muy especialmente a Nayely Y. Cazares Cruz, mi bióloga favorita, por todo tu apoyo, amor y comprensión.

A toda mi familia:

A todos aquellos parientes cercanos, que siempre han apoyado este proyecto de vida.

A TODOS MUCHAS GRACIAS...



alfonso garcia <ggda28@gmail.com>

SCIENTIFIC NOTE

1 mensaje

alfonso garcia <ggda28@gmail.com>

23 de enero de 2017, 11:59

Para: bpendleton@wtamu.edu

Cc: "drogarcia@yahoo.com.mx" <drogarcia@yahoo.com.mx>,

luisaguirreu@yahoo.com.mx, alfonso garcia <ggda28@gmail.com>, Nikolaevna

Myartseva Svetlana <smyartse@uat.edu.mx>

Dear Editor:

We are pleased to submit the manuscript ***Entedononecremnus funiculatus*** Parasitoid of ***Aleurodicus*** sp. in Tamaulipas and Veracruz, Mexico, to consider for publication as an original scientific note in **Southwestern Entomologist**.

All authors have contributed intellectually to this research and qualify for authorship and have approved the final version. We also warrant that the scientific note is original and has not previously been published or is under review by any other journal.

Correspondence about the manuscript should be addressed to Dr. Oswaldo García Martínez, at the Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, as indicated in the first page of the manuscript.

Truly yours



alfonso garcia <ggda28@gmail.com>

Entomological Science - Manuscript ID ENS-2017-0201 [email ref: SE-6-a]

1 mensaje

Entomological Science <onbehalfof+ent-sci+agr.hokudai.ac.jp@manuscriptcentral.com>

1 de
noviembre de
2017, 14:59

Responder a: ent-sci@agr.hokudai.ac.jp

Para: ggda28@gmail.com

Cc: ggda28@gmail.com, drogarcia@yahoo.com.mx, myartseva@mail.ru, luisaguirreu@yahoo.com.mx, cisef9@hotmail.com, carolinaflores@uadec.edu.mx, raul.rodriguez@uadec.edu.mx

01-Nov-2017

Dear Mr. GARCÍA:

Your manuscript entitled "Identification of Encarsia Förster 1878 (Hymenoptera: Aphelinidae) species from northeastern Mexico by cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) sequencing" by GARCÍA, DANIEL; GARCÍA, OSWALDO; MYARTSEVA, SVETLANA; AGUIRRE, LUIS; FLORES, MARIANO; FLORES, ADRIANA; RODRÍGUEZ, RAÚL, has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Entomological Science.

Co-authors: Please contact the Editorial Office as soon as possible if you disagree with being listed as a co-author for this manuscript.

Your manuscript ID is ENS-2017-0201.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc.manuscriptcentral.com/ens> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/ens>.

Thank you for submitting your manuscript to Entomological Science.

Sincerely,

Entomological Science Editorial Office

INTRODUCCIÓN

La taxonomía tradicional ha permitido la clasificación, determinación y diferenciación de especies por medio de la observación de las características morfológicas de cada espécimen. En el presente sigue siendo la base de la clasificación de todo ser vivo, pero, es bien sabido que taxonómicamente faltan más del 97 % de especies de insectos con una descripción precisa de cada una de las características que permitan la diferenciación unas de otras (Martin-Piera & Lobo, 2000); algunas variaciones comunes que obstaculizan la identificación taxonómica son: el hábitat, la altura del ecosistema donde estos viven, que permiten por ejemplo diferencias en colores muy variados, la selectividad que algunos especímenes han desarrollado, el clima, que permite la subespeciación o incluso la encriptación de especies (Brusca y Brusca, 2002). Tal es el caso por mencionar un ejemplo de la familia Eulophidae en México, donde apenas en años recientes se ha logrado obtener un importante avance en la creación de las primeras claves de eulófidos exclusivos del país, ya que solamente hasta el año 1995 se utilizaban las claves descritas para la región de los Estados Unidos de América, y que traía como consecuencia un importante obstáculo en la identificación, ya que las claves no coincidían en los especímenes mexicanos y que incluso no permitían la identificación a nivel de género; debido a este estudio, se lograron identificar nuevos géneros y especies de Eulophidae para México, dando un paso importante en la taxonomía del grupo (Hansson, 1997); además de que existen métodos y técnicas sofisticadas para la determinación de especies, y que han permitido a los taxónomos facilitar la tarea de la identificación de especímenes por medio del uso de solo pequeños fragmentos de material celular (Hajibabaei *et al.*, 2006). Las técnicas moleculares tienen una amplia aplicación para la determinación de especímenes, pero, sigue siendo un problema el no contar con descripciones taxonómicas de la mayoría de las especies, lo cual entorpece los procedimientos de secuenciación y registro de estos, además de la falta de personal capacitado para operar un laboratorio de índole molecular. La familia Aphelinidae tiene importancia económica, debido a que muchas de sus especies son parasitoides de

Aleyrodidae, Coccidae, Pseudococcidae y Aphididae; además, tienen distribución cosmopolita, e incluyen más de 1120 especies en 40 géneros reconocidos. En México están registrados 13 de estos, siendo *Encarsia* el más representativo con 96 especies (Myartseva *et al.*, 2012). Los códigos de barras de ADN, tienen su fundamento en la identificación de animales a partir del fragmento gen mitocondrial citocromo c oxidasa subunidad 1 (COI) que tiene en promedio 648 pares de bases y presenta alta tasa de sustitución, lo que permite una elevada variación de la secuencia entre especies del mismo género (Hebert *et al.*, 2003). Por todo lo anterior y debido a que en México no se cuentan con secuencias de ADN registradas en la base de datos del GenBank de insectos de la familia Aphelinidae y del género en cuestión, en este trabajo se planteó la identificación de las especies de Aphelinidae presentes en los estados de Tamaulipas y Veracruz, por medio de la taxonomía tradicional y por el método molecular, usando la amplificación y secuenciación del gen COI.

REVISIÓN DE LITERATURA

Orden Hymenoptera

Es uno de los órdenes más numerosos de insectos, junto con Coleoptera, Lepidoptera y Díptera, donde se pueden englobar más de 300,000 especies descritas en el mundo. Para el caso de Hymenoptera se reportan números de aproximadamente 115,000 (Triplehorn y Johnson 2005) especies descritas, con algunas estimaciones que van desde 600,000 a 1,200,000 (Grimaldi y Engel 2005). Para la Región Neotropical se reconocen 76 familias y según Fernández (2000), se han descrito unas 24,000 especies.

Al presente el orden incluye 20 superfamilias y 97 familias (Goulet y Hubert, 1993), en dos subórdenes: Symphyta con cinco superfamilias y 12 familias que representa el 5 % de todas las especies conocidas y Apócrita que constituye el 95 % restante con 15 superfamilias y 85 familias.

Familia Aphelinidae

Aphelinidae es un grupo de Chalcidoidea, que contiene 32 géneros con mil especies y son la principal fuente de agentes de control biológico de plagas de importancia económica, principalmente del orden Hemíptera, donde se incluye a cóccidos, áfidos y aleyrodidos. Aphelinidae es cosmopolita, con 10 géneros descritos en todas las zonas zoogeográficas: *Ablerus* Howard, *Aphelinus* Dalman, *Aphytis* Howard, *Centrodora* Förster, *Coccobius* Ratzeburg, *Coccophagus* Westwood, *Encarsia* Förster, *Eretmocerus* Haldeman, *Marietta* Motschulsky y *Pteroptrix* Westwood (Myartseva *et al.*, 2012). Los géneros parasitoides exclusivos de Aleyrodidos son *Eretmocerus* y *Encarsia*, con muchas especies cada uno de ellos, en el género *Encarsia*, hay más de 300 especies descritas en el mundo y contiene a la mayoría consideradas parasitoides de moscas blancas (Begum *et al.*, 2011). En México se reportan 13

géneros y 188 especies (2014), para la familia (Myartseva *et al.*, 2012; Myartseva *et al.*, 2014).

Reconocimiento de la familia Aphelinidae

Los afelinidos se reconocen por la siguiente combinación de caracteres: cuerpo usualmente no mayor de 1.5 mm de longitud, no fuertemente metálico, usualmente claro o ligeramente esclerotizado; palpos labiales y maxilares de 1 o 2 segmentos; antena de la hembra con 5-8 segmentos, excluyendo la radícula y el anelo; funículo cuando mucho con 4 segmentos; maza antenal de 1 a 4 segmentos; mandíbula generalmente con 2 dientes y una parte truncada o con 3 dientes; mesoescudo con líneas notaulares completas, más o menos rectas y ampliamente separadas; ala anterior con vena marginal larga, vena estigmal corta, vena postmarginal generalmente ausente o corta; fórmula tarsal 5-5-5 o 4-4-4, raramente 5-4-5; tibia anterior con espuela curva hendida; metasoma ampliamente unido al mesosoma; pecíolo transversal o ancho; gáster usualmente con 7 terguitos, ocasionalmente con 8; cercos en el ápice del metasoma o sólo ligeramente adelantados (sólo en *Coccobius*); válvula 3 separada y articulada con el valvifer 2 (Figura 1). Macho similar a la hembra, excepto principalmente en la estructura antenal y en la genitalia (Myartseva *et al.*, 2012).

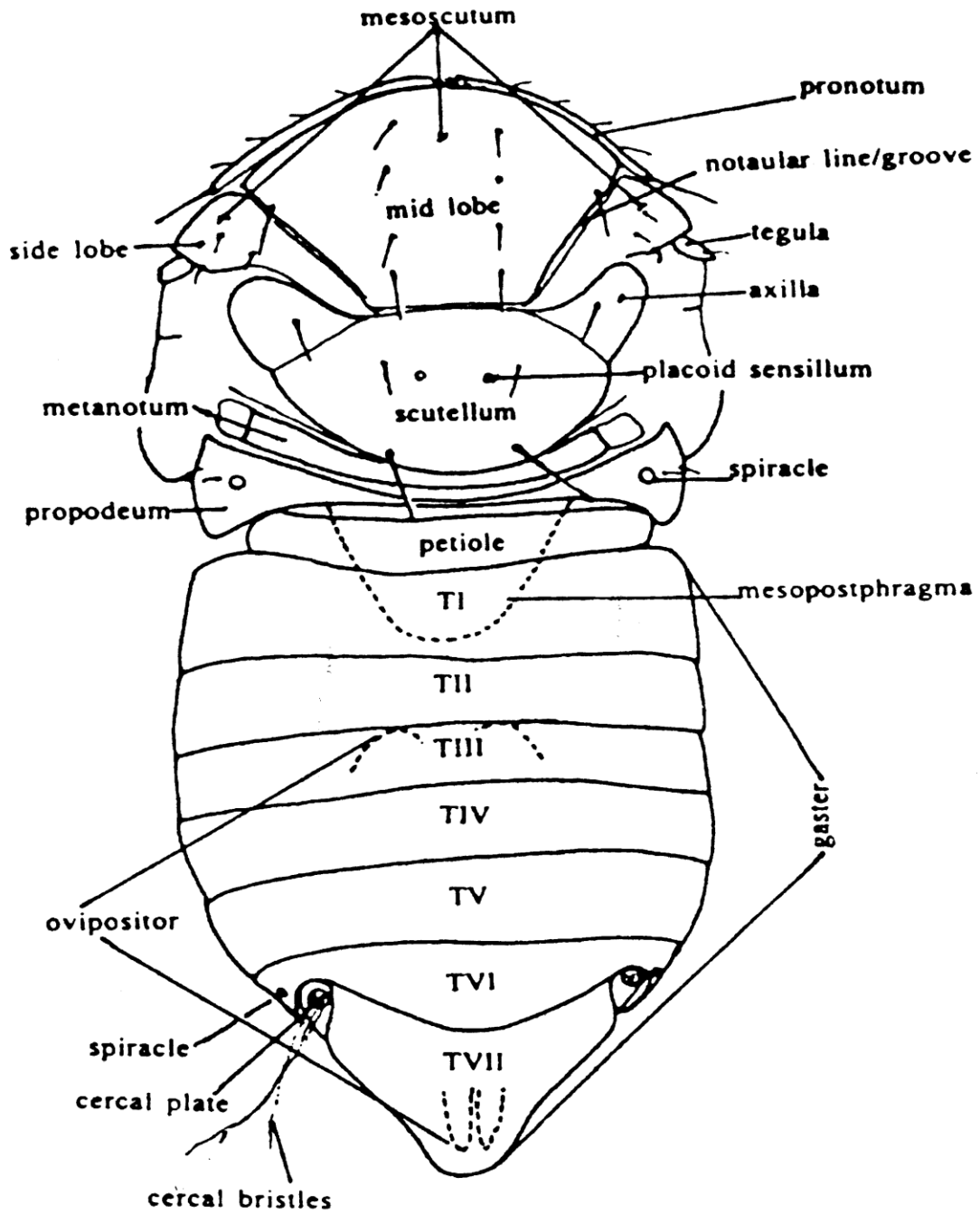


Fig. 1. Estructura del cuerpo de Aphelinidae, vista dorsal (de Hayat, 1998).

Género *Aphytis* Howard, 1900

El género *Aphytis*, pertenece a la familia Aphelinidae (Hymenoptera: Chalcidoidea), presenta distribución cosmopolita. Rosen & DeBach (1979) publicaron una monografía sobre *Aphytis* a del mundo, e incluyeron 90 especies. Actualmente, *Aphytis* incluye cerca de 130 especies. En México se reportan 20 especies de *Aphytis* (Myartseva & Ruíz-Cancino, 2000; Myartseva *et al.*, 2012), de las cuales diez son cosmopolitas; 11 especies son nativas de México y siete fueron introducidas para el control de plagas.

Los *Aphytis* son de cuerpo robusto, aproximadamente de 1 mm de longitud, usualmente amarillento o grisáceo, a veces moteado. Antena usualmente con 6 segmentos, algunos con 5 o 4 segmentos. Escapo cilíndrico; pedicelo más largo que ancho; funículo usualmente de 3 segmentos, los primeros 2 segmentos cortos, el tercero más largo; maza no dividida. Mandíbula usualmente bien desarrollada, con 2 dientes pequeños y una parte truncada. Palpos maxilares de 2 segmentos, palpos labiales de 1 segmento. Ojos relativamente grandes y setosos. Sulco malar distinguible y curvado. Pronoto corto, membranoso en la parte media. Lóbulo medio del mesoescudo con un número reducido de setas, predominantemente 10-12; cada lóbulo lateral con 2 setas, raramente con 1 o más de 2 setas; cada axila con 1 seta; escutelo con 2 pares de setas. Propodeo siempre más largo que el metanoto; su margen posterior casi siempre con crénulas en forma de escama en el tercio mesal. Alas anteriores bien desarrolladas, cerca de 2.5-3.0 veces tan largas, como anchas, hialinas, nubladas o moteadas. Línea calva distinguible, con las setas en el área delta siempre más largas que las del disco; vena submarginal usualmente con 2 setas; vena postmarginal generalmente ausente; vena estigmal corta, con cuello distinguible. Patas normales, no robustas. Fórmula tarsal 5-5-5. Gáster con 7 terguitos. Ovipositor ligeramente expuesto. Setas del cuerpo variables en color, oscuras o claras (Myartseva *et al.*, 2012).

Las especies de *Aphytis* se desarrollan exclusivamente como ectoparasitoides primarios de escamas y son los enemigos naturales más importantes de varias plagas. Las escamas armadas forman la familia más grande y especializada

entre las escamas y constituyen un grupo muy importante de plagas agrícolas, muchas de ellas son altamente destructivas en cultivos de frutales y ornamentales, especialmente en regiones subtropicales y tropicales (Myartseva y Ruiz-Cancino, 2000).

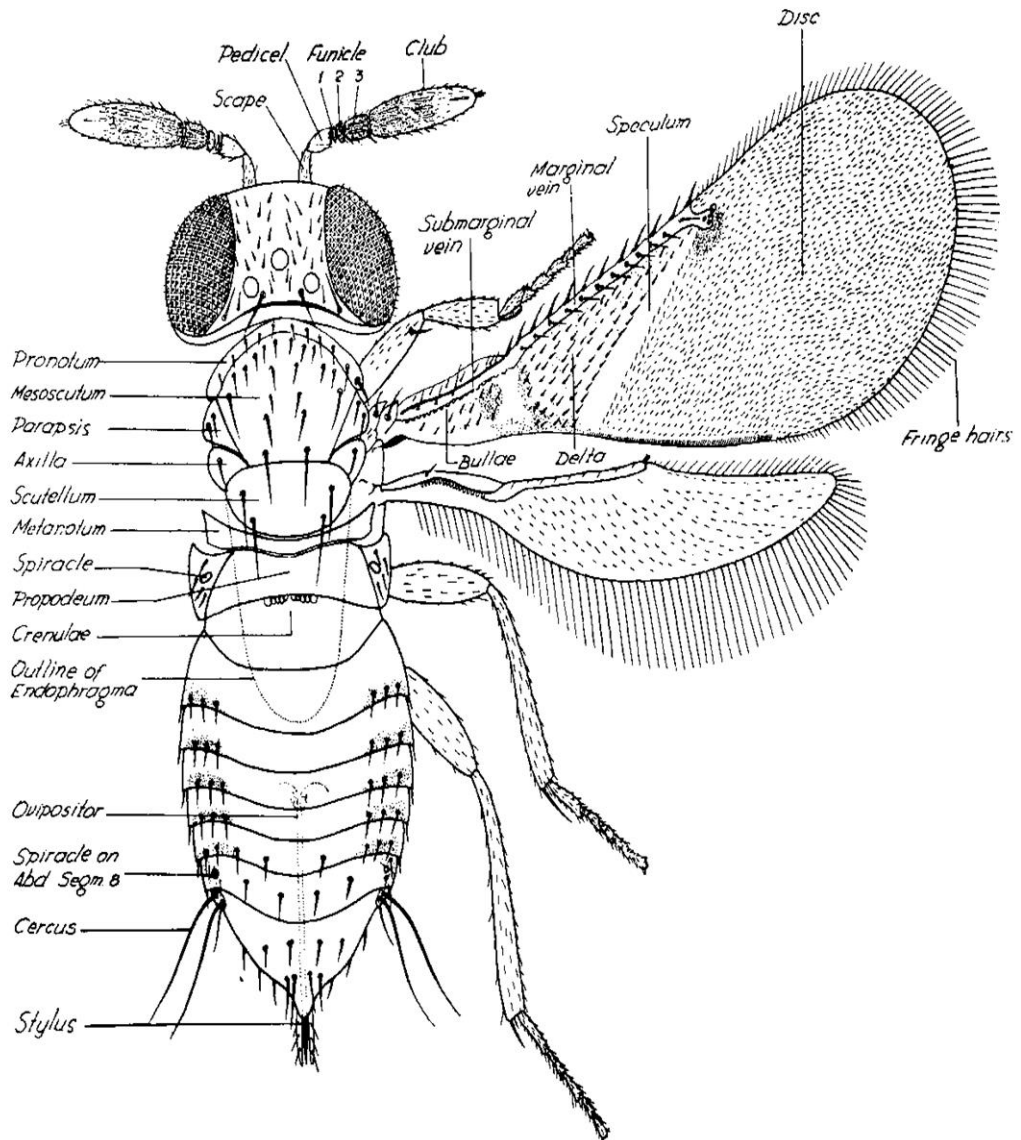


Fig. 2. Estructura general de *Aphytis* (de Rosen, 1964).

Género *Encarsia* Förster, 1878

El género *Encarsia* incluye 343 especies descritas y numerosas especies sin describir. Los inmaduros son parasitoides de varias moscas blancas, escamas armadas, áfidos, lepidópteros e incluso del sexo opuesto de la misma especie. Las especies descritas de *Encarsia* se distribuyen entre los 25 grupos reconocidos de especies, con 60 especies restantes sin colocar. La mayoría de las especies (52%) se incluyen en *aurantii*, *inaron*, *lahorensis*, *luteola*, *opulenta*, *parvella* y especies del grupo *Strenua* (Heraty et al., 2008; García, 2012).

El huevo es himenópteriforme y flota dentro del cuerpo del hospedero. Normalmente depositan un huevo por cada hospedero. Se ha encontrado que las hembras son capaces de discriminar entre hospederos previamente; parasitados y los no parasitados; sin embargo, en condiciones de confinamiento más de un huevo puede ser puesto en un solo hospedero, pero solo una larva se desarrolla completamente. La larva de *Encarsia* pasa por tres instares en su desarrollo, alimentándose de todo el contenido interno del cuerpo del hospedero. Terminado el periodo larval, el parasitoide descarga el meconio a lo largo del margen interior de la piel vacía del hospedero. La pupa se forma llenando toda la cavidad del hospedero, tomando la misma posición ventral de este, pero terminado esto, el nuevo adulto gira a una posición dorsal para perforar un hueco de salida en la parte dorso anterior del mismo. La piel que cubre la pupa del parasitoide en algunas especies es marrón oscura o negra, aunque los adultos sean de color amarillo claro por ejemplo: *E. cibcencis* López-Ávila, pero en otras especies esa cubierta es transparente (López-Ávila, 2004).

Algunas especies como *E. formosa* producen una melanización completa de la piel del hospedero como en *T. vaporariorum* pero no lo hace en otros hospederos como *B. tabaci*. En las especies biparentales, los machos se desarrollan como hiperparasitoides sobre larvas bien desarrolladas o pupas hembras de su propia especie o especies relacionadas (López-Ávila, 1988).

El cuerpo es parcial o completamente pálido, aunque el macho de *Encarsia nigricephala* Dozier son casi totalmente negros. Antenas con 7-8 segmentos; los cuatro o cinco últimos casi de la misma longitud. Fórmula tarsal 5-5-5 o 5-4-5 (Cave, 1996; García, 2012, 2014)

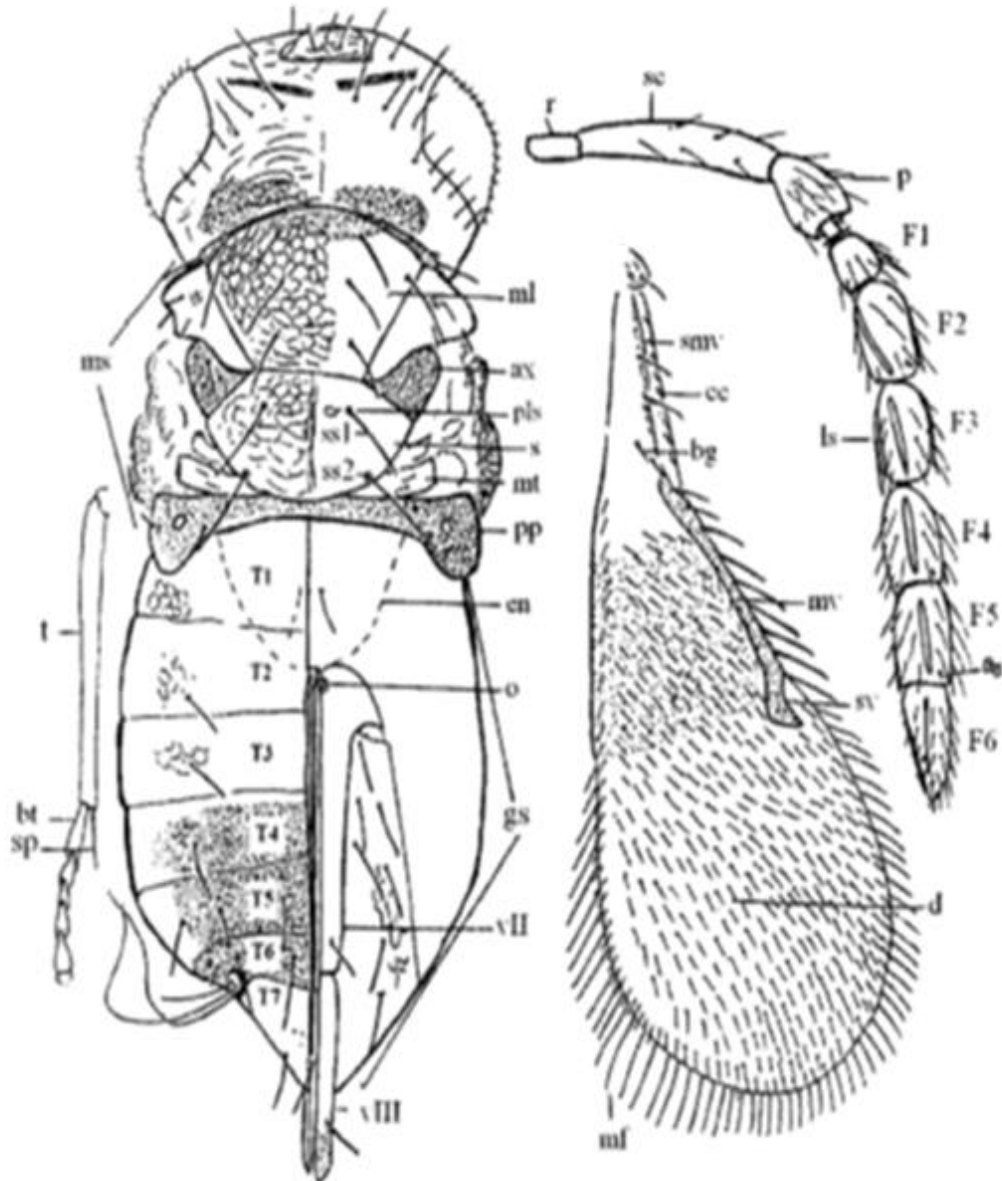


Fig. 3 Estructura general de *Encarsia*.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente, para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células. En la reacción, si se usa como sustrato ADN genómico, entonces típicamente hablamos de una PCR, pero si usamos ADN complementario (ADNc) proveniente del ARNm (ácido ribonucleico mensajero) se le conoce como RT-PCR (*Reverse Transcription-PCR*, por sus siglas en inglés) (Tamay *et al.*, 2013). Su inventor fue Kary Mullis por la cual se le adjudicó el Premio Nobel de Química en 1993. Utilizó la PCR para la amplificación del gen de la b-globina humana (Mullis *et al.*, 1986; Mullis y Faloona., 1987) y el diagnóstico prenatal de la anemia falciforme (Saiki *et al.*, 1985; Saiki *et al.*, 1986; Embury *et al.*, 1987), desde entonces la PCR ha revolucionado todos los campos que estudian y manipulan los ácidos nucleicos.

Mullis se basó en la replicación del ADN en los organismos eucariotas realizada por la DNA polimerasa. Estas enzimas realizan la síntesis de una cadena complementaria de DNA en el sentido 5'→ 3' usando un molde de cadena sencilla, pero a partir de una región de doble cadena. Para crear esta región doble cadena se usan los denominados iniciadores (primers), que son una pareja de oligonucleótidos sintetizados de manera que sean complementarios a cada uno de los extremos 3' del fragmento de DNA que se desea amplificar. Los elementos importantes en la reacción son el templado o molde (ADN o ADNc), la enzima, los oligonucleótidos o primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ión magnesio (Mg⁺), una solución amortiguadora o buffer y H₂O. Partiendo de este principio, la reacción en Cadena de la Polimerasa se basa en la repetición de un ciclo formado por tres etapas (Tamay *et al.*, 2013):

Desnaturalización

En esta etapa, las cadenas de ADN son calentadas y separadas a una temperatura de 95 °C durante 20-30 segundos; el tiempo depende de la secuencia del templete; es decir, si la cantidad de G-C es alta, será necesario más tiempo para romper sus uniones debido a que el apareamiento de estas bases está formado por tres enlaces, uno más que las bases de A-T; además, depende de la velocidad en la que el termociclador aumenta la temperatura, esto varía de acuerdo al modelo del equipo. Al final de esta etapa tendremos las cadenas separadas que servirán como templado para el siguiente paso.

Alineación

En esta etapa, los primers se alinean al extremo 3' del templado previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria. Para que se forme el complejo templado-primers, es importante que la temperatura de hibridación o temperatura melting (T_m) sea la óptima; ésta generalmente oscila entre 50-60 °C. Si el diseño de los primers es el correcto y la temperatura es la adecuada, la estabilidad y especificidad del complejo será eficiente.

Extensión

Del iniciador por actuación de la DNA polimerasa: En esta etapa, la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; agrega dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de ADN. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del ADN, es decir, de 5' a 3'. La temperatura óptima para la reacción es de 72 °C, ya que a esa temperatura la enzima es funcional. Al final del ciclo, se habrán formado los amplicones con un tamaño dictado por el número total de pares de bases (pb) que deberá ser conocido por el investigador.

Código de barras

Hace más de tres décadas, la biología molecular se convirtió en una herramienta valiosa para la identificación de individuos y especies y ha sido ampliamente aplicada para el estudio de las relaciones filogenéticas de organismos, lo cual ha tenido implicaciones importantísimas para la taxonomía (Fig. 4), (Teletchea *et al.*, 2008).

Una ventaja de la información genética es que puede ser obtenida a partir de un pequeño fragmento del organismo sin la necesidad de tener que destruirlo completamente, lo cual es bien visto por los científicos que laboran en museos, donde cuentan con especímenes antiguos y en su peor caso solo un registro en físico de estos, lo cual prohíbe tajantemente la destrucción de este para realizarle su respectiva huella genética. Dentro de las metodologías que en biología molecular permiten aproximarse a la identificación de individuos y/o de especies, los códigos de barras de ADN son un método de identificación y reconocimiento de especies que utiliza una base de datos de secuencias de ADN estandarizadas (Hebert *et al.*, 2003b; Hebert *et al.*, 2004c).

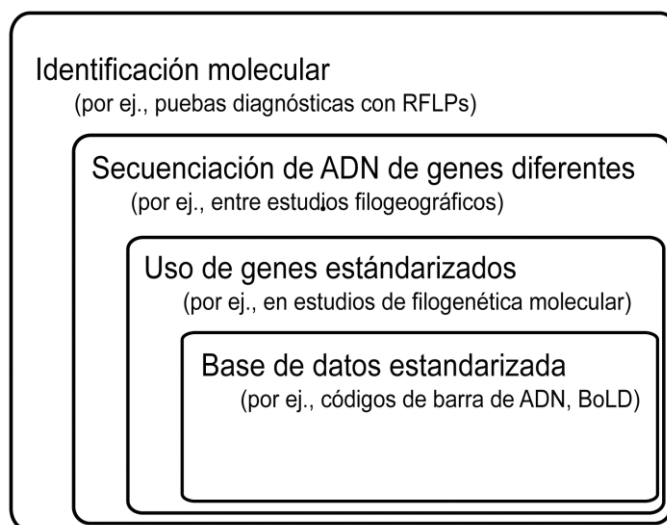


Figura 4. Un esquema jerárquico para las relaciones entre tipos de estudios genéticos relacionados con códigos de barra de ADN.

La idea de utilizar secuencias de ADN para la identificación rápida de especímenes no es nueva (Moritz & Cicero, 2004). Antes de la implementación del código de barras del ADN, diferentes genes o fragmentos de estos y varias técnicas moleculares han sido utilizadas para identificar especies, por ejemplo: PCR específicas para especies invasoras (IAS= Invasive Alien Specie), PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) o secuencias de ADN características de especies plaga (Liu, 2004; Brown *et al.*, 2002; Brunner *et al.*, 2002). Lo innovador de la iniciativa del código de barras (C.B) del ADN es que ha propuesto usar información dentro de una misma región génica, en todos los taxones y con condiciones de secuenciación universalmente aceptadas y estandarizadas.

Otro aspecto positivo es que posibilita la asociación de los distintos estados de desarrollo ontogenético de la misma especie. En insectos holometábolos el hallazgo de huevos, larvas y pupas disociados de los ejemplares adultos difícilmente permite una adecuada identificación, por lo que el código de barras constituye una herramienta útil para interceptar especies invasoras, que pueden transformarse en plagas en diferentes países (Armstrong & Ball, 2005).

La metodología de C.B de ADN se propuso inicialmente para identificar animales a partir de un fragmento del gen mitocondrial citocromo c oxidasa subunidad 1 (COI), de aproximadamente 648 pares de bases (pb). La región COI presenta una alta tasa de sustitución, lo que se manifiesta en alta variación de la secuencia entre especies del mismo género (Hebert *et al.*, 2003a; Hebert *et al.*, 2003b; Luo *et al.*, 2011). En los últimos años, numerosos estudios han mostrado que para varios grupos de aves, peces, mamíferos, lepidópteros y otros insectos, el fragmento COI presenta una variación interespecífica suficientemente amplia, permitiendo buena correspondencia entre la identificación molecular y la identificación basada en caracteres morfológicos de las especies (Hebert *et al.*, 2003c; Hebert *et al.*, 2004a; Ward *et al.*, 2005; Borisenko *et al.*, 2008).

Limitaciones de los Códigos de Barras

Una de las limitantes del C.B de ADN, es que se basa en la información proveniente de un solo marcador o grupo de ligamiento genético (mitocondrial en animales y plastídico en plantas). El uso de uno o varios genes provenientes de un genoma haploide puede afectar la correcta identificación de una especie. Además no se puede identificar un espécimen si este no fue previamente identificado taxonómicamente y posteriormente secuenciado, aun con esto, si la secuencia no se encuentra disponible en la base de datos como GenBank o Boldsystem, no será posible saber con qué especie trata (Paz *et al.*, 2011).

Identificación

Si se logra obtener una base de datos de referencia de los C.B de ADN completa, entonces se debe definir cómo identificar un espécimen a partir de su secuencia (Figura 5). Existen propuestas metodológicas (Goldstein y DeSalle, 2011) para analizar los datos provenientes de un proyecto de códigos de barras de ADN son:

Primera aproximación.

Es la identificación basada en distancia o divergencia genética, la cual está determinada por el porcentaje de sitios nucleotídicos que varían entre una secuencia desconocida y las secuencias que se encuentran en la base de datos de referencia. Diversos trabajos han encontrado valores umbrales de las distancias genéticas en diferentes taxa, para sugerir que la secuencia nueva proviene de una especie distinta (Hebert *et al.*, 2004a). Por ejemplo, en el caso de aves y lepidópteros se propuso que una divergencia entre secuencias de COI mayor a 2% indica la posible presencia de especies distintas (Janzen *et al.*, 2005).

Segunda aproximación

Identificación por medio de árboles filogenéticos; en este caso la identificación es dada por la posición de la secuencia desconocida en una filogenia, basado

en su cercanía evolutiva con las otras secuencias de ese grupo monofilético (Elias *et al.*, 2007).

Tercera aproximación

Consiste en identificar uno o más caracteres moleculares cuyo estado sea de sinapomorfía (carácter nuevo compartido por dos o más individuos), permitiendo un diagnóstico de especies por estados derivados de nucleótidos (Rach *et al.*, 2008). Una ventaja de este método es que estos caracteres usados en la identificación podrían formar también una parte de la descripción primaria de especies nuevas (Goldstein y DeSalle, 2011).

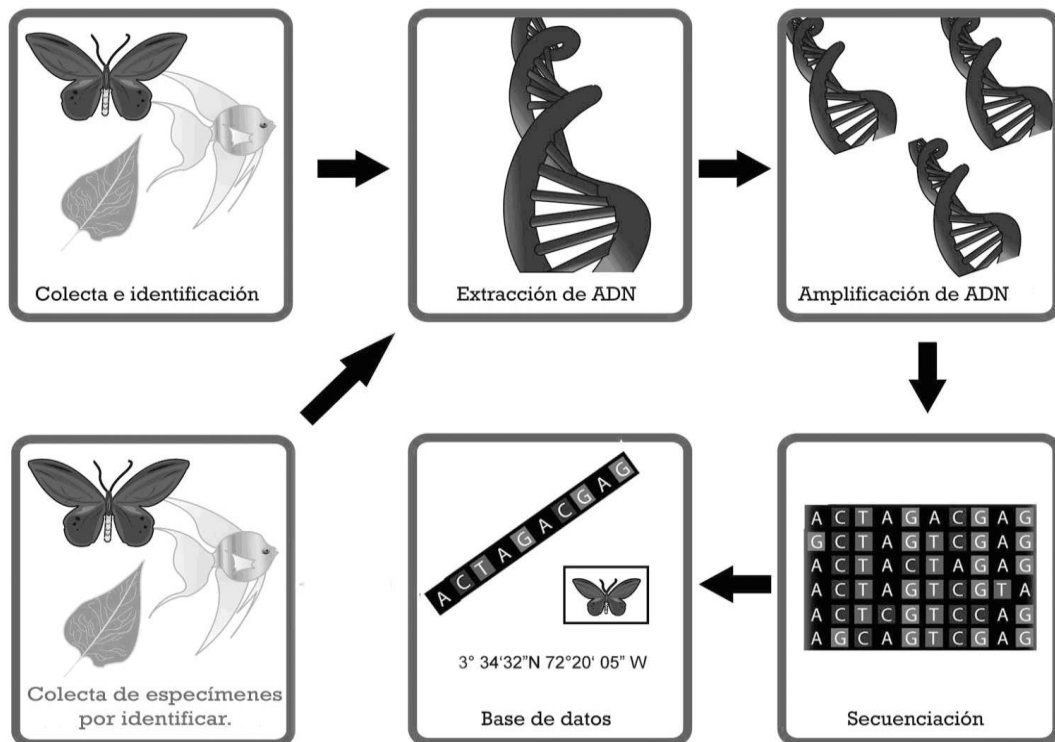


Figura 5. Procedimiento de laboratorio. Para poder usar los códigos de barras el primer paso es construir una base de datos con las secuencias y todos los datos asociados a estas (datos de colecta, imágenes, cromatogramas, primers utilizados). Después de tener una base de datos de referencia se pueden identificar los especímenes o fragmentos desconocidos refiriéndose a esta base de datos.

SCIENTIFIC NOTE

***Entedononecremnus funiculatus*¹: Parasitoid of *Aleurodicus* sp.² at Tamaulipas and Veracruz, Mexico**

Daniel Alfonso García Guerrero³, Oswaldo García Martínez^{3*},
Svetlana Nikolaevna Myartseva⁴, and Luis Alberto Aguirre Uribe³

Abstract. The eulophid *Entedononecremnus funiculatus* Myartseva was found parasitizing whiteflies *Aleurodicus* sp. associated with *Malvaviscus arboreus* L. and *Psidium guajava* L. Herewith, the parasitoid was first recorded for the state of Veracruz, México.

Whiteflies (family Aleyrodidae), with more than 1,200 species in 126 genera, are important pests in all agricultural regions, especially tropical and subtropical regions, of the world (Caballero 1996). In Mexico, 27 genera with 67 species were reported (Carapia 2008). The Eulophidae has 297 genera, with 114 of them reported in the Neotropical region (Noyes 2002), and with 4,472 species grouped into 4 subfamilies: Entedoninae (87 genera and 1,307 species), Euderinae (17 genera and 148 species), Eulophinae (97 genera and 1,316 species), and Tetrastichinae (91 genera and 1,644 species). *Entedononecremnus*, which includes 17 species, belongs to the Entedoninae subfamily.

The objective of this research was to identify parasitoids naturally affecting *Aleurodicus* in southern Tamaulipas and northern Veracruz, Mexico. Aleyrodidae nymphs were collected in 2013 at Tampico Alto and Cuauhtemoc, Veracruz, and at Altamira, Tamaulipas, in 2015. Leaves with nymphs of whiteflies collected from *Malvaviscus arboreus* at Tampico Alto and from *Psidium guajava* at Cd. Cuauhtemoc and Altamira were put into Petri dishes in a laboratory. The 10 parasitoids that emerged were mounted in 10% KOH on slides. Keys by Myartseva (2004) were used to identify specimens. *E. funiculatus* was found parasitizing *Aleurodicus* sp. nymphs; 40 ♂ and 15 ♀ were identified. The Euderomphalini tribe specializes in attacking whiteflies (Hansson and LaSalle 2003). Myartseva and Ruiz Cancino (2001) mentioned that only *Entedononecremnus* was reported in Mexican fauna. Myartseva (2004) reported three new species of *Entedononecremnus* in Mexico: *Entedononecremnus annellus* Myartseva at Tamaulipas, obtained from *Ceraleurodicus altissimus* Quaintance, in *Sapium subiferum* L.; *E. funiculatus* at Tamaulipas, obtained from *Aleurodicus* sp. from *P. guajava*; and

¹Hymenoptera: Eulophidae

²Hemiptera: Aleyrodidae

³Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Calzada Antonio Narro 1923, CP, 25315, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

⁴Facultad de Ingeniería y Ciencias, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Centro Universitario Adolfo López Mateos, CP 87149, Cd. Victoria, Tamaulipas, México.

*E-mail address of corresponding author: drogarcia@yahoo.com.mx

Entedononecremnus guamuchil Myartseva in the state of Guerrero, obtained in *Pitbecellobium* sp. from *Aleurodicinae*. More recently, *E. funiculatus* was reported parasitizing *Aleurodicus coccolobae* Quaintance & Baker in *Myrtus communis* L. at Nayarit (Myartseva et al. 2013). In this research, *E. funiculatus* was obtained from *Aleurodicus* sp. nymphs, coinciding with findings by Myartseva (2004), but in a different host plant -- *M. arboreus* L. The parasitoid *E. funiculatus* is a new record for the state of Veracruz, and reported only in *P. guajava* for Tamaulipas and in *M. communis* at Nayarit; *P. guajava* and *M. arboreus* are new host records for Veracruz.

References Cited

- Caballero, R. 1996. Identificación de moscas blancas. *En* Metodología para el Estudio y Manejo de Moscas Blancas y Geminivirus. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Costa Rica.
- Carapia, R. V. E. 2008. Taxonomía y diagnosis. *En* Moscas Blancas Temas Selectos sobre su Manejo. Colegios de Posgraduados, México.
- Hansson, C., y J. LaSalle. 2003. Revision of the Neotropical species of the tribe Euderomphlini (Hymenoptera: Eulophidae). *J. Nat. Hist.* 37: 697-778.
- Myartseva, S. N. 2004. New species of the genus *Entedononecremnus* Girault, 1915 (Hymenoptera: Eulophidae) - parasitoids of whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae) from Mexico. *Russian Entomol. J.* 13: 77-82.
- Myartseva, S. N., y E. Ruiz Cancino. 2001. Annotated checklist of the Entedoninae (Chalcidoidea: Eulophidae) of México. *Folia Entomológica Mexicana* 40: 189-211.
- Myartseva, S. N., E. Ruíz-Cancino, J. Ma. Coronado Blanco, y J. Cambero-Campos. 2013. Parasitoides de *Aleurodicus* spp. (Hemiptera: Aleyrodidae) en México, con la descripción de una nueva especie de *Encarsia* (Hymenoptera: Aphelinidae). *Acta Zoológica Mexicana (n.s.)* 29: 641-653.
- Noyes, J. S. 2002. Interactive Catalogue of World Chalcidoidea 2001. 2nd ed. CD-ROM. Taxapad and the Natural History Museum, London.

Identification of *Encarsia* Förster 1878 (Hymenoptera: Aphelinidae) species from northeastern Mexico by cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) sequencing

Daniel Alfonso García Guerrero¹; Oswaldo García Martínez^{1*}; Svetlana Nikolaevna Myartseva³; Luis Alberto Aguirre Uribe¹, Mariano Flores Dávila¹, Adriana Carolina Flores Gallegos² and Raúl Rodríguez Herrera^{2*}

1 Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Calzada Antonio Narro # 1923. C.P. 25315. Buenavista, Saltillo; Coahuila, México.

2 Departamento de Alimentos, Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila, Boulevard V. Carranza y José Cárdenas s/n. Colonia Republica Ote. C.P. 25280.

3 Facultad de Ingeniería y Ciencias, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Centro Universitario Adolfo López Mateos, C.P 87149. Cd. Victoria, Tamaulipas, México.

*Corresponding author: raul.rodriguez@uadec.edu.mx; drogarcia@yahoo.com.mx

Abstract

Aphelinidae are economically important parasitoids of Aleyrodidae, Coccidae, Pseudococcidae and Aphididae; they have cosmopolitan distribution and include more than 1120 species in 40 recognized genera; Mexico has 13 of these registered genera, *Encarsia* is the largest genus with 96 species. Sophisticated methods and techniques have facilitated species identification by sequencing DNA from mitochondrial

fragments. The cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) mitochondrial gene with an average of 648 base pairs and high rate of substitution provides useful species level information. Mexico does not have DNA sequences registered in databases such as GenBank of Aphelinidae and the *Encarsia* genus, and traditional taxonomy has its limitations; thus, the objective was to identify species of *Encarsia* by amplifying and sequencing the COI gene. Aleyrodidae and Diaspididae nymphs were collected during 2015 and 2016 in Tampico Alto and Ciudad Cuauhtémoc in Veracruz; Altamira in Tamaulipas and Saltillo in Coahuila. *Encarsia citrina*, *Encarsia perplexa* and *Encarsia tamaulipeca* were identified taxonomically by COI gene sequencing. Species were registered in the GenBank with the access keys MF444685, MF444686 and MF444687, respectively; the results of this research contributed to the registration of the first three species of *Encarsia* for Mexico in GenBank, the last two being new registrations worldwide in GenBank. This new tool is expected to improve taxonomic understanding of this important group by independently validating classical identification, characterizing individual variation within and among species, and, perhaps, revealing putative cryptic species previously unknown to science.

Key words: COI, *Encarsia citrina*, *Encarsia perplexa*, *Encarsia tamaulipeca*, GenBank

INTRODUCTION

Traditional taxonomy has allowed species classification, determination and differentiation taking into account morphological characteristics of each specimen and is currently the basis for classification of all living organisms. Some aspects that can complicate taxonomic identification are morphological variations among individuals that

may be due to climate, habitat, diet or many other environmental factors; the examination of genomic variations in these same individuals combined with correlations to environmental factors can aid in determining whether such variations are simply normal individual differences within a species, the emergence of a subspecies, or even warrant classifying some as belonging to a previously unidentified (and thus cryptic) species Brusca and Brusca (2002). About 97% of insect species lack a precise taxonomic description of characters that allow them to be differentiated from each other Martin-Piera and Lobo (2000). This is exemplified by the Eulophidae in Mexico where studies of the local fauna provided new taxonomic keys for this group and resulted in identification of new genera and species that provide important progress in the taxonomy of the group Hansson (1997). Previously, keys based on fauna found in the United States of America were used but often found not to characterize many Mexican specimens of interest, even at the genus level. These newly available keys provide an opportunity to compare and contrast classical identifications with genomic data also obtained from the Mexican fauna. Methods and techniques have facilitated species identification using small fragments of cellular material Hajibabaei et al. (2006); however, it remains a problem the lack of taxonomic descriptions of most species, which limits the sequencing and registration of these species. DNA barcodes are based on the identification of species from the mitochondrial gene cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) fragment, allowing a high variation among species of the same genus Hebert et al. (2003). Aphelinidae are important parasitoids of Aleyrodidae, Coccidae, Pseudococcidae and Aphididae; they have a cosmopolitan distribution and include more than 1120 species in 40 recognized genera. In Mexico, 13 of these are recorded and *Encarsia* is the best represented with 96 species Myartseva et al. (2012). The keys of Myartseva et al.

(2012) provide a basis for comparing and contrasting these species with genomic data we obtain in research reported here, to further refine our understanding of this genus in Mexico. In this research, the identification of species of *Encarsia* using the amplification and sequencing of the COI gene was performed.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection

Fourth stage nymphs of Aleyrodidae and nymphs of Diaspididae were collected during 2015 (March-October) and 2016 (March-November) in Tampico Alto (22° 06' 47" N, 97° 50' 53" W) and Ciudad Cuauhtémoc (22° 12' 11.46" N, 97° 50' 16.04" W) in Veracruz; Altamira (22° 33' 42.53" N, 98° 09' 12.96" W) in Tamaulipas and Saltillo (25° 26' 34.51" N, 100° 59' 22.93" O) in Coahuila. Leaves of *Psidium guajava* (L), *Citrus sinensis* (L) and *Hedera helix* (L) were collected and placed in Petri dishes labeled and transferred to the laboratory to allow emergence of adult parasitoids. Samples were checked daily. Emerged adults were collected with a fine hair brush wet with 70% ethanol; 90% of samples collected were stored in 2 mL Eppendorf tubes containing 70% ethanol at 4° C (labeled with field data), Noyes (1982), the other 10% was used for taxonomic and molecular identification.

Taxonomic identification

Five percent of the remaining ten percent of specimens were mounted on slides, with Canada balm Noyes (1982) and the key for aphelinids of Mexico by Myartseva et al. (2012) was used for taxonomic identification. Voucher specimens were deposited in the

Insect Museum of Faculty of Agronomy at Autonomous University of at Tamaulipas (MIFA-UAT), in Ciudad Victoria, Tamaulipas, Mexico.

DNA extraction

The remaining specimens (5%) were processed in the Laboratory of Molecular Biology, Department of Food Research (DFR) of the Autonomous University of Coahuila (UA de C). DNA extraction was performed using two techniques, the non-destructive (HotShot) one of Truett et al. (2000) and the Doyle & Doyle (1987) technique (with adaptations). With the first technique, the entire specimen can be preserved for slide mounting unlike the second, which is a completely destructive method to carry out DNA extraction.

*HotShot technique for *Encarsia tamaulipeca* (Myartseva and Coronado-Blanco, 2002)*

The first two lysis buffers, 5 μ L of 100 mM NaOH and 15 μ L of 0.26 mM EDTA disodium were mixed in a 0.2 mL Eppendorf tube; introducing one specimen per tube; if the specimen was in alcohol, it was dried completely on blotting paper for one hour at room temperature prior to amplification; a light vortex shake (Prism mini, C1801) to the tube was done to mix both buffers together with the insect and introduced to the thermocycler (Axygen) for 30 minutes at 95 ° C; after this, 20 μ l of 40 Mm Tris-HCl were added to the tube as a neutralizing solution; and the liquid was then transferred to a new tube (Truett et al., 2000).

Doyle & Doyle technique (with adaptations), for Encarsia citrina (Craw, 1891) and Encarsia perplexa (Huang and Polaszek, 1998)

The A matrix and beads were homogenized in 1.5 ml centrifuge tubes and ten specimens were placed in each tube; lysis buffer (Tris HCl pH 8 (100 mM), EDTA pH 8 (50 mM), NaCl (50 mM), 2% SDS) was included and the tubes were transferred to a tissue disruptor (MP Fast-Prep 24) for 60 seconds. The tubes were then removed and placed in a centrifuge (Spectrofuge 24D) for three minutes at 12,000 rpm to reduce froth, then placed in the disruptor for 60 seconds and again in the centrifuge to obtain the total solution, which was placed in a new 1.5 ml Eppendorf tube; 400 μ l of Phenol-chloroform-isoamyl alcohol solution (25: 24.1 v / v) was added and centrifuged at 12,000 rpm for 15 minutes. After this, the procedure mentioned in the original technique was used, but the centrifugation processes were performed under cold conditions (Doyle & Doyle, 1987).

PCR amplification, HotShot technique

The polymerase chain reaction (PCR) was performed with a final volume of 25 μ L, using an Axygen-type thermocycler and for the Cytochrome Oxidase Subunit 1, gene primers C1-J-1718 (5'-GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCC-3 ') and C1-N-2191 (5'-CCCGGTAAAATTAAAATATAAACTTC-3 '), specific for insects Simón et al. (1994). The PCR mixture consisted of 11.3 μ L of Q-water, 5 μ L of 5X buffer, 2 μ L of Mg Cl₂ (25 mM), 0.5 μ L of dNTPs (10 mM), 2 μ L of BSA (10 mg / ml), 1 μ L of each primer (10 μ M), 0.2 μ L Taq DNA polymerase and 2 μ L DNA. The thermocycler program used was: 2 min at 94° C followed by six cycles of 30 s at 94° C; 90 s at 45° C and 70 s at 72° C; later, 36 cycles of 30 s at 94° C; 90 s at 51° C and 70 s at 72° C with

five min at 72° C at the end of the last cycle Truett et al. (2000). The PCR product was separated by electrophoresis for 30 min on 105 volt agarose gel at 1.5% with the molecular ladder 100 marker (Promega), stained with 3 µl ethidium bromide, the gel was observed and photographed on a UV light transilluminator.

PCR amplification, Doyle & Doyle technique

The same final volume and primers of the previous method was used. The PCR mixture was: 14.5 µL of Mili-Q water; 3.5 µL of 10X buffer (10 mM MgCl₂); 0.5 µl dNTPs (10 mM); 2 µL of each primer (10 mM); 0.5 µl of Taq DNA polymerase (50/ µL) and 2 µL DNA (14.31 ng / µ). The temperature program was: ten min at 94° C, followed by 35 cycles of 1 min at 94° C; 1 min at 55° C; 1 min at 72° C and the final extension of five minutes at 72° C. The PCR product was separated with the same procedure as in the previous method. The PCR product of each species (22 µL) was transferred to a 1.5 ml tube adding 200 µL of 1X TE buffer pH 8, 220 µL of sodium acetate; two volumes of cold 99.9% (440 µL) ethanol were added and allowed to incubate for 60 minutes at -20° C, and centrifuged at 14,000 rpm for ten minutes at 4° C. The pellet was then washed with 300 µL of cold 70% ethanol, centrifuged at 14,000 rpm for five minutes at 4° C; the supernatant was decanted and the pellet was allowed to dry for at least four hours and resuspended in 22 µL of sterile Mili-Q water.

Sequencing and analysis

The amplified products were sequenced on a Perkin Elmer Applied Biosystems Model 3730 by the Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-Based Sequencing method. The sequences obtained were compared to the sequences deposited in the NCBI

database using BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) for highly similar sequences. The sequences were edited and aligned using the BioEdit software. Each sequence was loaded in the PAK2 (version 1.0.0.0) software to obtain the bar code of each species.

RESULTS AND DISCUSSION

The species collected in the field were *E. citrina*, *E. perplexa* and *E. tamaulipeca* as described by Craw, (1891); Huang & Polaszek, (1998); Myartseva and Coronado-Blanco, (2002) respectively, using Myartseva et al. (2012) keys.

E. tamaulipeca

The technique HotShot, worked for *E. tamaulipeca*, obtaining a well-defined amplification of the fragment of 518 bp (Fig. 1), in addition, the specimens spent less than four months preserved in ethanol, which allowed DNA of good quality to be obtained with minimal ethanol degradation.

E. citrina and *E. perplexa*

The Doyle & Doyle technique was better adapted for use with *E. citrina* and *E. perplexa*, which are smaller in size compared to *E. tamaulipeca*, which made them hard to handle in large Eppendorf tubes. Specimens had been preserved for more than five months in ethanol and an amplification of the 518 bp (Figs 2 and 3) was obtained for both species as well as for *E. tamaulipeca* noted earlier.

After fragment amplification, a DNA purification and sequencing of the three species was performed. When comparing the sequence of *E. citrina* in the GenBank, a 98.45% identity was obtained with the registered sequence of *E. citrina* from Japan and the accession key KF778511. The sequence of these species was sent for registration and it is considered the first record in the GenBank database for Mexico with the access code MF444685.

The comparison of *E. perplexa* sequence had 93.39% and *E. tamaulipeca* 92.67% identity with the *E. brimblecombei* (Girault), registered in Japan with access code KF778461 in the GenBank database. Since to date there is no record of the COI gene sequencing of both species in that database, they were sent for registration on the GenBank platform with access codes MF444686 and MF444687 respectively. Both species are new records in the world on the GenBank.

Zhang et al. (2014) carried out adult extractions of the apple aphid *Eriosoma lanigerum* Hausmann 1802, parasitized by *Aphelinus mali* (Haldeman) from which the COI fragment of the DNA was extracted and amplified with primers F (5'-TCTCATATAATTTGTAATGAAAG-3') and R (5'-TGATAACTAGGAGGAAAATTTAT-3'), where they obtained 648 bp fragments, which served to differentiate two parasitoid populations; compared to this research, a difference of 130 bp was obtained, with the difference considered due to our work being with a different genus.

Leon et al., (2010), amplified the COI gene in *Encarsia diaspidicola* (Silvestri) and *Encarsia berlesei* (Howard) with primers suggested by Simón et al., (1994), to determine genetic variation between species, finding a difference of 46 bp between the two species. Although the same primers suggested by Simón et al. (1994); were used in

this research, the same size fragments (518 bp), were obtained even though different DNA polymerase enzyme, DNA extraction technique and amplification programs in the thermocycler were used.

There are works related to amplification and sequencing of species of *Encarsia*; such as the one by Babcock and Heraty (2000), where by amplification and sequencing of the 28S rDNA region of seven races of *Encarsia formosa* (Gahan) and two of *Encarsia luteola* (Howard), they evaluated the amount of genetic variation within and between species at this locus.

Wethersbee et al. (2004) performed PCR amplification of the 18S r DNA gene from three species of parasitoids *Lysiphlebus testaceipes* (Cresson), *Lipolexis scutellaris* (Mackaver) and *Aphelinus gossypii* (Timberlake) from the citrus brown aphid *Toxoptera citricida* (Kirkaldy), for species detection and differentiation by specific primers, which allowed amplification of DNA of each parasitoid even within its host.

In this research, the non-destructive HotShot technique, where DNA flows through mouth, anus, and spiracles, worked for *E. tamaulipeca*, which we believe was due to these specimens being preserved for less than three months of curation in 70% ethanol; the two remaining species, were curated in ethanol for more than five months after being collected from the field. Guzman et al. (2016), obtained bands and fragments that were better defined in different species of Trichogrammatidae, Mymaridae and Eulophidae than ours and we opine this may be due to their being processed after one day to four months preserved in 70 and 100% ethanol.

For *E. citrina* and *E. perplexa*, it was not possible to obtain DNA with the minimally invasive HotShot technique. The completely destructive Doyle & Doyle technique successfully obtained DNA by including the most sclerotized structures of the insect

(legs, antennae and head) by complete maceration despite the specimens having been preserved in ethanol for more than four months.

Species identification through traditional taxonomy is essential, and the use of DNA-based techniques should be considered as a useful and complementary tool in species identification and classification. The barcode initiative that began in Canada (Hebert, 2003) remains as an ambitious project of global importance, which it is intended to identify any species in the world through the sequencing of its DNA (a supermarket way). These sequences are being collected on the different GenBank data platforms and available to make comparisons. The creation of the barcode, allows new species identification and determination of endangered species. Government institutions such as SAGARPA (Mexico) and USDA (USA) have benefited directly by facilitating the identification of quarantined species and by prohibiting their entry into their territories. Each country involved in this initiative has specific commitments and goals; Mexico, in this matter, has contributed in a significant way, with the identification and sequencing of species of birds, fish and insects. Therefore, the results of this research contribute to register the first barcodes of three species of *Encarsia* for Mexico, two of these, new registrations to the world.

ACKNOWLEDGMENTS

To CONACYT, and Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro which financially supported this work. We thank Dr Adriana Guzmán Larralde (postdoctoral student) Universidad Autónoma de Nuevo Leon and M.C. Gerardo Arcos Cavazos, from Centro de Investigación Regional del Noreste, at Campo Experimental Las Huastecas for their technical assistance.

REFERENCES

- Babcock CS & Heraty JM (2000) Molecular markers distinguishing *Encarsia formosa* and *Encarsia luteola* (Hymenoptera: Aphelinidae). *Annals of the Entomological Society of America* **93(4)**, 738-744.
- Brusca RC y Brusca GJ (2002) *Invertebrates*. 2da Edición. Sinauer Associates, Inc., E.U.A. 595-613.
- Craw A (1891) Internal parasites discovered in the San Gabriel Valley: recommendations and notes. *Destructive Insects. Bulletin of the California State Board of Horticulture. Division of Entomology* **57**: 25, 28.
- Doyle JJ & Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* **19**, 11-15.
- Guzmán-Larralde AJ, Suaste-Dzul AP, Gallou A & Peña-Carrillo KI (2016) DNA recovery from microhymenoptera using six non-destructive methodologies with considerations for subsequent preparation of museum slides. *Genome* **60(1)**, 85-91.

Hajibabaei M, Jansen DH, Burns JM, Hallwachs W & Hebert PDN (2006) DNA barcoding distinguishes species of tropical Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 968-971.

Hansson Ch (1997) Survey of *Chrysocharis* Forster and *Neochrysocharis* Kurdjumov (Hymenoptera, Eulophidae) from Mexico, including eight new species. *Miscellanea Zoologica* **20.1**, 81-95.

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **270(1512)**, 313-321.

doi:10.1098/rspb.2002.2218.

Huang J & Polaszek A (1998) A revision of the Chinese species of *Encarsia* Foerster (Hymenoptera: Aphelinidae): parasitoids of whiteflies, scale insects and aphids (Hemiptera: Aphelinidae, Diaspididae, Aphidoidea). *Journal of Natural History* **32**.1825–1966.

León JHD, Neumann G, Follett PA & Hollingsworth RG (2010) Molecular markers discriminate closely related species *Encarsia diaspidicola* and *Encarsia berlesei* (Hymenoptera: Aphelinidae): biocontrol candidate agents for white peach scale in Hawaii. *Journal of economic entomology* **103(3)**, 908-916.

Martín-Piera F. & Lobo JM (2000) Diagnóstico sobre el conocimiento sistemático y biogeográfico de insectos hiperdiversos (Coleoptera, Hymenoptera y Lepidoptera) en España. En: *Hacia un proyecto CYTED para el inventario y estimación de la diversidad entomológica en Iberoamérica: PRIBES 200*. F. Martín-Piera, JJ Morrone & A Melic (eds). *m3m-Monografías Tercer Milenio*, Vol. 1, Sociedad Entomológica Aragonesa (SEA), Zaragoza. pp. 287-308.

Myartseva SN, Ruiz E y Coronado JM (2012) Aphelinidae (Hymenoptera: Chalcidoidea) de Importancia Agrícola en México. Revisión y Claves. Serie Avispas Parasíticas de Plagas y Otros Insectos No. 8. (Ed. Departamento de Fomento Editorial UAT, Cd. Victoria, México.

Myartseva SN & Coronado JM (2002) A new parasitoid of whiteflies from Mexico, with a key to New World species of the genus *Encarsiella* (Hymenoptera: Aphelinidae). *Florida Entomologist* **85(4)**, 620–624.

Noyes JS (1982) Collecting and preserving chalcid wasps (Hymenoptera: Chalcidoidea). *Journal of Natural History* **16**, 315–334.

Simon C, Frati F, Bechenbach A, Crespi B, Liu H and Flook P (1994) Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a

compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America* **87**,651-701.

Truett GE, Heeger P, Mynatt RL, Truett AA, Walker JA, and Warman ML (2000) Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). *Biotechniques* **29(1)**, 52-54.

Weathersbee IAA, Shufran KA, Panchal TD, Dang PM & Evans GA (2004) Detection and differentiation of parasitoids (Hymenoptera: Aphidiidae and Aphelinidae) of the brown citrus aphid (Homoptera: Aphididae): species-specific polymerase chain reaction amplification of 18S rDNA. *Annals of the Entomological Society of America* **97(2)**, 286-292

Zhang RM, Zhou HX, Guo D, Ta, YL, Wan FH, Wu Q & Chu D (2014) Two putative bridgehead populations of *Aphelinus mali* (Hymenoptera: Aphelinidae) introduced in China as revealed by mitochondrial DNA marker. *Florida entomologist* **97(2)**, 401-405.

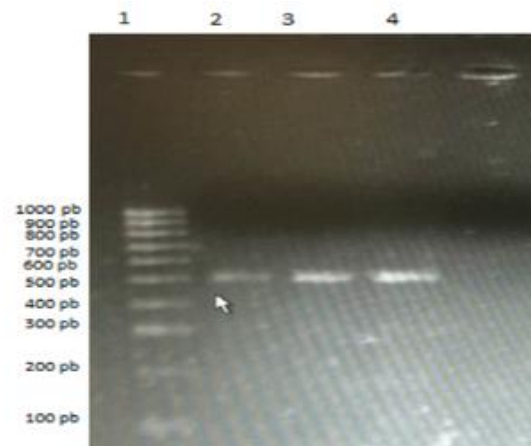


Figure 1. PCR product amplification at the COI DNA region for *E. tamaulipeca*, (1) molecular weight marker, (2, 3 and 4) specie, at agarose gel 1.5%

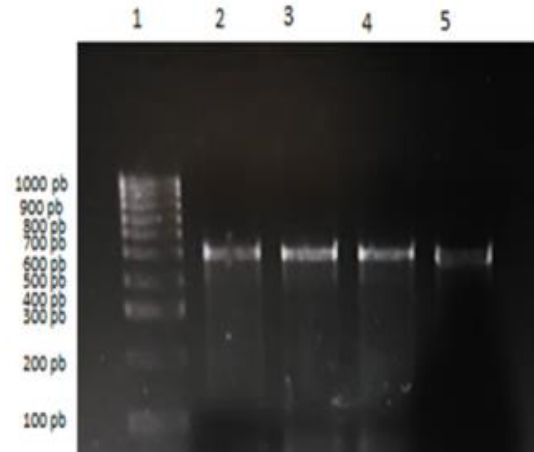


Figure 2. PCR product amplification at the COI DNA region for *E. citrina*, (1) molecular weight marker, (2, 3 and 4) specie, at agarose gel 1.5%

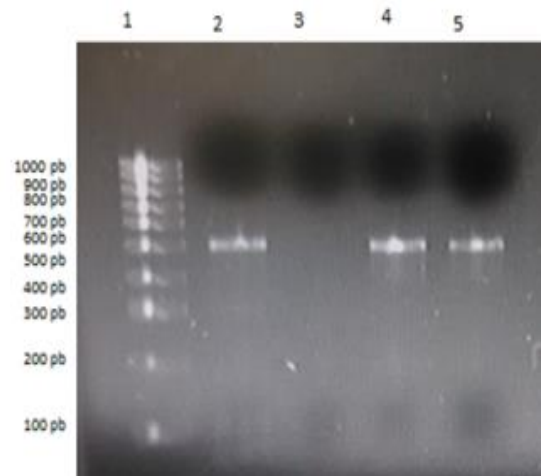


Figure 3. PCR product amplification at the COI DNA region for *E. perplexa*, (1) molecular weight marker, (2, 3 and 4) specie, at agarose gel 1.5%

CONCLUSION GENERAL

Se realizó la identificación taxonómica de ocho especies de parasitoides de moscas blancas para Veracruz, seis especies de parasitoides de aleyrodidos en Tamaulipas y tres especies parasíticas sobre escamas armadas en Coahuila. Las tres especies de afelinidos de Coahuila son nuevos registros para el estado: *Aphytis aonidae*, *Aphytis chilensis* y *Encarsia citrina*. Se obtuvo la amplificación y secuenciación del ADN de *Encarsia citrina*, *Encarsia perplexa* y *Encarsia tamaulipeca*, así como el código de barras de las mismas, se registraron en el GenBank con las claves de acceso MF444685, MF444686 y MF444687 respectivamente, las tres especies son nuevos registros en GenBank a nivel mundial. Es fundamental el reconocimiento de especies por medio de la taxonomía tradicional, y el uso de técnicas moleculares debe ser considerado como una herramienta útil y complementaria en el arduo trabajo de identificación y clasificación de especies.

LITERATURA CITADA

- Armstrong, K. F. & S. L. Ball. 2005. DNA barcodes for biosecurity: invasive species identification. *Phil. Trans. R. Soc. B* 360: 1813-1823.
- Begum, S., Anis, S.B., Farooqui, M.K., Rehmat, T and Fatma, J. 2011. Aphelinid parasitoids (Hymenoptera:Aphelinidae) from India. Department of Zoology. Aligarh Muslim University. pp: 222-231.
- Borisenko AV, Lim BK, Ivanovanv, Hanner RH, Hebert PDN. 2008. DNA Barcoding in Surveys of Small Mammal Communities: A Field Study in Suriname. *Mol Ecol Resour*; 8(3):471-479.
- Brown, S., W. Mclaughlin, I. T. Jerez & J. K. Brown. 2002. Identification and distribution of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae) haplotypes in Jamaica. *Trop. Agric.* 79: 140-149.
- Brunner, P. C., C. Fleming & J. E. Frey. 2002. A molecular identification key for economically important thrips species (Thysanoptera: Thripidae) using direct sequencing and a PCRRFLP-based approach. *Agric. For. Entomol.* 4: 127-136.
- Brusca, R.C. y Brusca, G.J. 2002. Invertebrates. 2da Edición. Sinauer Associates, Inc., E.U.A., pp. 595-613.
- Cave. R. D 1996. Parasitoides y depredadores. En: metodologías para el estudio y manejo de moscas blancas y geminivirus, CATIE. Costa Rica. 133 p.
- Elias M, Hill RI, Willmott KR, Dasmahapatra KK, Brower AVZ, Mallet J, *et al.* 2007. Limited Performance of DNA Barcoding in a Diverse Community of Tropical Butterflies. *Proc R Soc B*; 274(1627):2881-2889.
- Embury, S.H., Scharf, S.J., Saiki, R.K., Golson, M.A., Golbus, M., Arheim, N. y Erlich, H.A. 1987 *New. England.J.Med.* 316:656.
- Fernández, F. 2000. Sistemática y filogenia de los himenópteros de la Región Neotropical: Estado del conocimiento y perspectivas, pp. 211-231, en: Martín-Piera, F., J. J. Morrone y A. Melic (eds.). *Hacia un proyecto CYTED para el Inventario y Estimación de la Diversidad Entomológica en Iberoamérica: PrIBES 2000 m3m*. Vol. 1. Monografías Tercer Milenio, Sociedad Entomológica Aragonesa (SEA), Zaragoza, España.

- Foerster, A. 1878. Kleine Monographien parasitischer Hymenopteren. Verhandlungen der Naturhistorischen Vereins der Preussischen Rheinlande und Westfalens, 35: 42–82.
- García, G. D. A. 2012. Colecta e Identificación de Parasitoides de Mosquita Blanca *Bemisia tabaci* Gennadius en el Sur de Tamaulipas. Tesis de licenciatura. 63 p.
- Goldstein PZ, Desalle R. 2011. Integrating DNA Barcode Data and Taxonomic Practice: Determination, Discovery, and Description. *Bioessays*; 33(2):135-147.
- Goulet, H, y Hubert, J. (Ed.). 1993. Hymenoptera of the world: an identification guide to families. Agriculture Canada. Ontario. 668 p.
- Grimaldi, D. y M. S. Engel. 2005. *Evolution of the insects*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Hajibabaei, M., D. H. Jansen, J. M. Burns, W. Hallwachs & P. D. N. Hebert. 2006. DNA barcoding distinguishes species of tropical Lepidoptera. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 103: 968-971.
- Hansson, Ch. 1997. *Survey of Chrysocharis Forster and Neochrysocharis Kurdjumov (Hymenoptera, Eulophidae) from Mexico, including eight new species. Misc. Zool., 20.1: 81-95.*
- Hayat, M. 1998. Aphelinidae of India (Hymenoptera: Chalcidoidea): a taxonomic revision. *Memoirs on Entomology, International*. Associated Publishers, Gainesville, Florida, U.S.A., 13: 1–416.
- Hebert P, Ratnasingham S, Dewaard J. 2003b. Barcoding Animal Life: Cytochrome c Oxidase Subunit 1 Divergences Among Closely Related Species. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*; 270:S96S99.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes.. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences.* ;270(1512):313-321.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, Dewaard JR. 2003c. Biological Identifications through DNA Barcodes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*; 270(1512):313-321.
- Heraty, J.M., Andrew, P. and Michael. E. S. 2008. Systematics and biology of *Encarsia*. In: J. Gould et al. (eds.), *Classical biological control of Bemisia tabaci in the United States*. pp: 71-84.

- Janzen DH, Hajibabaei, Burns JM, Hallwachs W, Remigio E, Hebert PDN. 2005. Wedding Biodiversity Inventory of a Large and Complex *Lepidoptera fauna* with DNA Barcoding. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*; 360(1462):1835-1845.
- Kimura M. 1980. A Simple Method for Estimating Evolutionary Rate of Base Substitutions Through Comparative Studies of Nucleotide Sequences. *J Mol Evol*;16:111-120.
- Liu, Y. C. 2004. Molecular identification of a plant quarantine pest (*Frankliniella occidentalis*) by one-tube nested PCR targeting ribosomal DNA internal transcribed spacer regions. *Pl. Prot. Bull. Taipei* 46: 27-46.
- López-Ávila, A. 1988. A comparative study of four species of *Encarsia* (Hymenoptera: Aphelinidae) as potential control agents for *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae). Unpublished Ph.D. Thesis. University of London, pp: 1-302.
- López-Ávila. A. 2004. Biología y control biológico de las moscas blancas. En: Manejo integrado de las moscas blancas *Bemisia tabaci* (Gennadius) *Aleurotrachelus sociales* Bondar. Boletín de sanidad vegetal 41. ICA. Bogotá Colombia. pp: 13-19.
- Luo A, Zhang A, Ho S, Xu W, Zhang Y, Shi W, *et al.* 2011. Potential Efficacy of Mitochondrial Genes for Animal DNA Barcoding: A Case Study Using Eutherian Mammals. *BMC Genomics*;12(1):84.
- Martín-Piera, F. & J.M. Lobo. (2000). Diagnóstico sobre el conocimiento sistemático y biogeográfico de insectos hiperdiversos (Coleoptera, Hymenoptera y Lepidoptera) en España. En: *Hacia un proyecto CYTED para el inventario y estimación de la diversidad entomológica en Iberoamérica: PriBES 200*. F. Martín-Piera, J.J. Morrone & A. Melic (eds). *m3m-Monografías Tercer Milenio*, Vol. 1, Sociedad Entomológica Aragonesa (SEA), Zaragoza. pp. 287-308.
- Moritz, C. & C. Cicero. 2004. DNA barcoding: promise and pitfalls. *PloS. Biol.* 2: 1529-1531.
- Mullis, K.B. y Faloona, F. 1987. Specific Synthesis of DNA in vitro via polimerase chain reaction. *Meth. Enzymol.* 155: 335-350.
- Mullis, K.B., Faloona, F., Scharf, S.J., Saiki, R.K., Horn, G.T. y Erlich, H.A. 1986. Cold Spring Harbor. *Symp. Quant. Biol.* 51:263:273.

- Myartseva, S. N y Ruiz-Cancino, E. 2000. Annotated checklist of the Aphelinidae (Hymenoptera: Chalcidoidea) of México. *Folia Entomológica Mexicana*, Vol. 109: 7-33.
- Myartseva, S. N., Coronado-Blanco, J. M., Lomeli-Flores, J. R. & Martínez-Hernández, D. Y. 2014. A new genus for a new species of the family Aphelinidae (Hymenoptera: Chalcidoidea) from Mexico. *Zoosystematica Rossica*, 23: 131-136.
- Myartseva, S.N. E. Ruiz y .J.M. Coronado. 2012. Aphelinidae (Hymenoptera: Chalcidoidea) de Importancia Agrícola en México. Revisión y Claves. Serie Avispas Parasíticas de Plagas y Otros Insectos No. 8. (Ed. Departamento de Fomento Editorial UAT, Cd. Victoria, México. 400 p.
- Myartseva, S.N. & J.M. Coronado-Blanco. 2002. A new parasitoid of whiteflies from Mexico, with a key to New World species of the genus *Encarsiella* (Hymenoptera: Aphelinidae). *Florida Entomologist*, 85(4): 620–624.
- Noyes, J.S. 1982. Collecting and preserving chalcid wasps (Hymenoptera: Chalcidoidea). *Journal of Natural History*, 16: 315–334.
- Paz, A., González, M. & Crawford, A. 2011. Códigos de Barras de la Vida: Introducción y Perspectiva. *Acta Biológica Colombiana*, 16(3): 161-176.
- Rach J, Desalle R, Sarkar IN, Schierwater B, Hadrys H. Characterbased. 2008. DNA Barcoding Allows Discrimination of Genera, Species and Populations in Odonata. *Proc R Soc B*;275(1632):237-247.
- Rosen, D. & DeBach, P. 1979. Species of *Aphytis* of the world (Hymenoptera: Aphelinidae). Dr. W. Junk BV Publishers, London: 1–801.
- Saiki, R.K., Bugawan, T.F., Horn, G.T., Mullis, K.B. y Erlich, H.A. 1986. *Nature* 324:163.
- Tamay, L, C. Ibarra, C Velasquillo. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Laboratorio de Biotecnología del Centro Nacional de Investigación y Atención a Quemados. Instituto Nacional de Rehabilitación (INR), México, D.F., Medigraphic, 2(2), 70-78.
- Teletchea F, Bernillon J, Duffraisse M, Laudet V, Hänni C. 2008. Molecular Identification of Vertebrate Species by Oligonucleotide Microarray in Food and Forensic Samples. *J Appl Ecol*;45(3):967-975.

Triplehorn, C. A. y N. F. Johnson. 2005. *Borror and DeLong's Introduction to the Study of Insects*. 7th ed. Thomson-Brooks/Cole, Belmont, CA

Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN. 2005. DNA Barcoding Australia's Fish Species. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*; 360:1847-1857.