



Dirección de Investigación

Subdirección de Programación y Evaluación

Proyecto de Investigación 2018

Unidad:	Saltillo	División:	Agronomía	Departamento:	Parasitología
Tema estratégico (ANA/PEP):	Agricultura Protegida - Producción				
Línea de investigación:	Entomología				
Título del proyecto:	Diversidad de la familia Braconidae (Hymenoptera: Ichneumonoidea) asociada al cultivo del Limón (<i>Citrus aurantifolia</i> Swingle) en el Estado de Colima México.				
Presupuesto solicitado (Máximo \$75,000):	130,000	El proyecto es:	Nuevo	X	Continuación
Tipo de investigación:	Básica	X	Aplicada	Tecnológica	e-mail del responsable
Vinculación:	Si	No	Fondos concurrentes:		
Cooperante(s):	Centro Nacional de Referencia de Control Biológico – Tecomán (CNRCB)				
Entidad (es):	Coahuila-Colima	Municipio (s):	Saltillo-Tecomán		
Localidades:	Saltillo-Tecomán				
A realizar durante el(los) año(s):	2018-2020				

Participantes		Adscripción (Clave Depto.)	Expediente No.	Firma
Responsable	Dr. Mariano Flores Dávila	Parasitología	1920	
Colaborador:	Dr. Oswaldo García Martínez	Parasitología	957	
Colaborador:	Dr. Luis Alberto Aguirre Uribe	Parasitología	899	
Colaborador:	Dra. Beatriz Rodríguez Vélez	CNRCB-Tecomán	Externo	
Colaborador:	Dra. Juana María Coronado Blanco	UAT- Cd. Victoria	Externo	
Colaborador:				
		Grado por obtener	Matrícula	Firma
Tesista:	Roxana Guadalupe Malacara Patiño	Doctorado en Ciencias	41071337	
Programa Docente:	Doctorado en Ciencias en Parasitología Agrícola			
Tesista:				
Programa Docente:				
Tesista:				
Programa Docente:				

Vo. Bo. Autoriza

Firma y sello	
---------------	------

Nombre: Dr. Ernesto Cerna Chávez Jefe de Departamento	Nombre: Dr. Armando Robledo Olivo Subdirector de Programación y Evaluación
--	---

• Cada Jefe de Departamento deberá dejar copia para su archivo

Protocolo para Proyecto de Investigación 2018

1.-Título del proyecto

Presupuesto solicitado:

Diversidad de la familia Braconidae (Hymenoptera: Ichneumonoidea) asociada al cultivo del Limón (<i>Citrus aurantifolia</i> Swingle) en el Estado de Colima México.	130,000
--	---------

2.- Introducción

El limón forma parte del grupo de frutas denominado cítricos, al cual también pertenecen las naranjas, toronja y mandarina entre otros. Este grupo representa la quinta parte de la producción mundial de frutas. En México los cítricos aportan de manera general el 2.78% del PIB agrícola, y el limón representa el 1.5% del PIB agrícola seguido de la naranja con el 1.15% (SIAP, 2016).

México se posiciona como líder mundial de exportación del limón mexicano (*Citrus aurantifolia* Swingle), participando con el 12.29% de las exportaciones y un total de 667.2 mil toneladas, seguido de España, Turquía y Argentina con 545.5, 449.3, 279.3 mil ton respectivamente (SIAP, 2016). A nivel nacional la superficie sembrada es de 176,045.70 hectáreas, tan solo en la región costera del Pacífico de México se cultivan 79,456 hectáreas distribuidas en los estados de Michoacán, Colima, Oaxaca y Guerrero (SAGARPA, 2015). Actualmente se satisface el 100% de la demanda nacional con producción interna, siendo el estado de Colima uno de los principales productores con 24 385 hectáreas sembradas, alcanzando una producción de 306 514.00 T (INEGI, 2016). En Colima, el limón es uno de los productos más importantes el cual genera empleo para 20 mil familias (Magaña et al., 2010), el principal municipio productor es Tecomán con el 91.95% de la superficie de cultivo en 17,767.65 hectáreas con una producción de 191, 890.94 toneladas (SIAP, 2015).

En México se espera que el cultivo del limón tenga en los próximos años y hasta el 2030 un crecimiento promedio anual de 3.34% y 13.36% en producción y exportación respectivamente. Para que los objetivos planteados en el Plan Nacional de Desarrollo 2016-2030 sean alcanzados, deben considerarse todas las estrategias que contribuyan al desarrollo exitoso del cultivo. Dentro de los principales problemas que limitan tanto su producción como exportación se encuentra la incidencia de plagas como la mosca prieta *Aleurocantus woglumi*; la mosca blanca, *Dialeurodes citrifolii* (Morgan), *Aleurothrixus floccosus*, *Dialeurodes citrifolii*, *Paraleyrodes minei* y *Trialeurodes spp*; pulgones, *Aphis spiraecola*, *A. gossypii*, *A. citricola*, *Myzus persicae* y *Toxoptera aurantii* Boyer; acaros, *Panonychus citri* (McGregor) y *Aceria sheldoni*; la escama de nieve, *Unaspis citri*; trips, *Scirtothrips citri* Moulton; el minador de los cítricos, *Phyllocnistis citrella*; la polilla de los cítricos, *Prays citri*; el nematodo de los cítricos, *Tylenchulus semipenetrans*; y el Psílido Asiático, *Diaphorina citrii* (Colima, 2018; SAGARPA, 2015)

El principal manejo que se realiza es el control químico utilizando productos como Abamectina, Cipermetrina, Naled, Oxydemeton-meth, Imidacloprid y Evisec. Los costos por aplicación de insecticidas representan el 20% de los costos de producción en una huerta establecida (SAGARPA 2015). El control biológico, está siendo considerado dentro del manejo integrado de plagas (MIP) como alternativa al control químico, este propone dentro de sus estrategias el uso de uno o más organismos vivos para reducir la población de plagas. Dentro de estos organismos se encuentran los del orden Hymenoptera los cuales presentan diversas estrategias de parasitismo sobre sus hospederos. A este grupo pertenece la familia Braconidae la cual ha sido a nivel mundial una de las familias más utilizadas en control biológico debido a su alta especificidad, amplio rango de hospederos fitófagos y distribución cosmopolita.

Dada la importancia del cultivo del limón, deben tomarse en cuenta todas las medidas que contribuyan al correcto desarrollo del cultivo, para asegurar su producción y exportación. En el cultivo del limón aún no se han realizado estudios faunísticos de la familia Braconidae. La identificación morfológica y molecular de los

especímenes es la base para establecer un plan de control biológico dentro de un manejo integrado de plagas (MIP), el cual puede disminuir el uso de agroquímicos y restablecer el equilibrio ecológico. Por lo cual se han establecido los siguientes objetivos.

Objetivos

GENERAL:

Realizar un estudio de diversidad de la familia Braconidae presente en el cultivo de limón (*Citrus aurantifolia* Swingle) en el municipio de Tecomán, Colima, México, a fin de contribuir en el conocimiento de la fauna benéfica, la cual podría ser útil en proyectos futuros de control biológico.

ESPECÍFICOS:

1. Realizar recolectas sistemáticas de las principales plagas del cultivo del limón, para determinar si están siendo parasitadas por algún integrante de la familia Braconidae.
2. Identificar morfológica y molecularmente las especies de la familia Braconidae.
3. Estimar la riqueza de la familia Braconidae asociada al cultivo del limón.
4. Generar una base de datos de la familia Braconidae asociada al cultivo del limón en el Estado de Colima, México.

Hipótesis

Especímenes de la familia Braconidae identificados molecularmente serán encontrados parasitando insectos fitófagos presentes en el cultivo del limón en el estado de Colima.

3.-Revisión de Literatura

La familia Braconidae representa la segunda más grande del orden Hymenoptera (Briceño et al., 2009; Ruiz-Guerra et al., 2015). Es uno de los grupos más diversos de insectos (Sharkey, 2006), integrado por especies de importancia económica debido al potencial como reguladores de insectos fitófagos (Delfin y Burgos, 2000; Jiménez-Peydró y Peris-Felipo, 2011). Dentro de sus hospederos se encuentran estados larvales de Coleoptera, Diptera y Lepidoptera, así como ninfas y adultos de Hemiptera, ninfas de Orthoptera y Psocoptera (Cauich-Kumul et al., 2012; Kavallieratos et al., 2008; Valenzuela Escoboza et al., 2015). Ha sido utilizada exitosamente en casos de control biológico debido a su alta especificidad pudiéndose mencionar a *Diachasmimorpha* como parasitoide de la mosca de la fruta *Anastrepha ludens* (Díptera: Tephritidae) en Florida, Estados Unidos y en Veracruz, México (Society, 2016) y a *Apanteles opuntiarum* como agente de control de *Cactoblastis cactorum* (Lepidoptera: Pyralidae) en el sur de Estados Unidos y Norte de México (Varone et al., 2015).

A nivel mundial gran parte del conocimiento que se tiene de la fauna de Braconidae proviene de regiones montañosas o selváticas (Briceño et al., 2009). Coronado-Blanco y Zaldívar-Riverón, 2014 mencionan que en México la mayoría de los trabajos taxonómicos para la familia han sido descripciones de nuevos taxones siendo muy escasos los estudios faunísticos regionales.

4.- Procedimiento Experimental

Sitio de estudio

El Estado de Colima está ubicado en la región oeste del país, limita al norte con Jalisco, al sur con Michoacán y al oeste con el océano Pacífico. El municipio de Tecomán se encuentra localizado en las coordenadas 18°54'37"N 103°52'24"O, en altitud de 33msnm. Predomina el clima semiseco muy cálido con temperatura media anual 26.3°C y precipitación media anual 810.6 milímetros.

El trabajo de campo se realizará en un huerto de limón, ubicado en Tecolapa, Tecomán, Colima a $18^{\circ}58'45.98''\text{N}$ $103^{\circ}50'27.14''\text{O}$ con una elevación de 79 msnm. El huerto tiene una superficie de 10ha, consta de 2000 árboles, distribuidos en 5° hileras de 40 árboles, sembrados a una distancia de 5m entre planta y 10m entre hileras.

La identificación molecular se llevará a cabo en el Laboratorio de Parasitología Molecular del Departamento de parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Obtención de material biológico

Recolectas

Se realizará un total de 12 recolectas en el periodo de enero- diciembre 2018. Se recolectarán manualmente partes infestadas o que muestren la presencia de un insecto plaga, los cuales serán colocados en cajas de Petri y se transportaran a la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro donde se esperara la posible emergencia de parasitoides.

Material biológico proporcionado

El Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB) proporcionara los Braconidos obtenidos de recolectas que se realizaron mensualmente durante un año y dos meses (mayo de 2013 a junio de 2014) en la huerta antes mencionada, utilizando diferentes técnicas de muestreo como redeo, trampas Malaise, barrido y platos amarillos.

Identificación morfológica

Los Braconidos emergidos de plagas del limón obtenidos de las 12 recolectas realizadas, así como los proporcionados por CNRCB, se montaran en alfiler y triángulos entomológicos y se observaran bajo estereoscopio (Carl Zeiss dv4 32x). Se seguirán claves taxonómicas especializadas principalmente las de Wharton et al., 1998.

Identificación molecular

Extracción de ADN

La extracción de ADN genómico se realizará de acuerdo a la metodología propuesta por Villegas-Mendoza et al., 2015. Se colocará un parasitoide adulto completo en un tubo de 1.5 ml, y macerar con nitrógeno líquido con un pistilo hasta la homogenización completa del material. Se agregará un buffer de extracción (Tris-HCl 200 μL , pH 8.5, NaCl 250 μL , EDTA 25 μL , y SDS 0.5%), seguido de varios lavados con octanol-cloroformo (24:1) para eliminar proteínas. El ADN se precipitará con 1 ml de isopropanol y se resuspenderá en TE 1X.

PCR- Amplificación

Para la amplificación del gen COI se utilizaran primer universales, siguiendo la metodología citada por Gupta et al., 2011 con modificaciones hasta conseguir estandarizar el protocolo. El PCR se realizara en un total de 50 μl mix de 10x taq Buffer, 10 μl dNTP mix (Genei), primer Universal HCO1-2198 (20pm/ μl), LCO1-1490(20 pm/ μl), DNA objetivo (50ng/ μl), Taq ADN polimerasa (Genei 1U/ μl) y agua esteril.

La amplificación se realizara en las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C por 5 minutos. Seguido de 30 ciclos de desnaturalización (94° C for 1 min), anillamiento a 45°C por 1 minuto, extensión a 72°C por minutos, extensión final a 72°C por 10 minutos.

Análisis estadístico

Se estimará la diversidad Alfa, la cual refleja la riqueza en especies en una comunidad homogénea. Este tipo de diversidad se medirá con la riqueza de taxones, la abundancia y la dominancia.

La riqueza de taxones se utilizará para evaluar la riqueza del área muestreada. Se utilizara el Índice de Margalef (1958), es una medida de riqueza especifica que establece una relación funcional entre el número de especies y el número total de especímenes (MORENO, 2001).

La abundancia valora la estructura faunística de un área determinada. Se determinará con el Índice de Shannon-Weaver (1949), mide la equidad, indicando el grado de uniformidad en la representación de las especies al considerar todas las muestras.

La dominancia se refiere a la aparición de variación de taxones. Se medirá con el Índice de Simpson el cual mide la representatividad de las especies más importantes sin considerar las otras especies presentes.

Para el proceso de los datos se utilizara el Software PAST (Hammer et al., 2001).

Además, se estimará la riqueza específica utilizando los estimadores no paramétricos ICE y Jackknife de primer y segundo orden (Jack1 y Jack2). ICE se basa en el número de especies raras (especies observadas en menos de 10 unidades de muestreo); Jack 1 es una función del número de especies presentes en sólo una unidad de muestreo, Jack 2 considera también a las especies presentes en dos unidades de muestreo. El análisis de las estimaciones se realizará mediante el programa EstimateS ver. 9.1.0.

Base de datos

Se realizará una base de datos utilizando el programa Paradox. Permite ordenar la información indicando el lugar y fecha de recolecta, subfamilia, género y especie, número de especies determinadas, altura sobre el nivel del mar, y recolector.

Cronograma de Actividades para el 2018.

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Recolectas	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Identificación Morfológica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Identificación Molecular			X	X	X	X	X	X	X	X		X
Congresos						X					X	
Estancia											X	

Cronograma de distribución de presupuesto para el 2018.

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Recolectas	30,000 pesos (23.07%)											
Identificación Molecular	75,000 pesos (57.69%)											
Congresos						7,000(5.38%)					7,000(5.38%)	
Estancia											11,000(8.46%)	

Duración total del proyecto

Año de Inicio	2018	Año estimado de conclusión	2020
---------------	------	----------------------------	------

5.-Productos Esperados

- Dos artículos científicos en revistas indexadas
- Dos presentaciones en congresos nacionales e internacionales
- Base de datos de las especies presentes en el cultivo del limón

6.-Literatura Citada

Briceño, R., Torres, D., Zaldívar-Riveron, A., 2009. Primer reporte de la familia Braconidae (Hymenoptera: Ichneumonidae) en los parques cerro Saroche y Terepaima, estado Lara, Venezuela. Bioagro 21, 223-226.

- Cauich-Kumul, R., Delfin-Gonzalez, H., Lopez-Martinez, V., Sharkey, M., 2012. Braconid Wasps (Hymenoptera: Braconidae) of Northern Yucatan, Mexico: Subfamilies Agathidinae and Doryctinae (excluding *Heterospilus* Haliday). *J. Kansas Entomol. Soc.* 85, 186–205. doi:10.2317/JKES120212.1
- Colima, M.D.E., 2018. PLAN RECTOR 2013-2018 SISTEMA PRODUCTO LIMÓN.
- Coronado-Blanco, J.M., Zaldívar-Riverón, A., 2014. Biodiversidad de Braconidae (Hymenoptera: Ichneumonoidea) en México. *Rev. Mex. Biodivers.* 85, 372–378. doi:10.7550/rmb.32000
- Delfín, H., Burgos, D., 2000. Los Bráconidos (Hymenoptera: Braconidae) Como Grupo Parámetro De Biodiversidad En Las Selvas Deciduas Del Trópico: Una Discusión Acerca De Su Posible Uso. *Acta Zoológica Mex. (nueva Ser.)*
- Gupta, A., Ghosh, A., Baby, N.L., Jalali, S.K., 2011. Morphological and Molecular Characterization of *Apanteles Mohandasi* Sumodan & Narendran (Hymenoptera: Braconidae), a Solitary Endoparasitoid of *Pammene Critica* Meyrick (Lepidoptera: Tortricidae), With Notes on Biology From India. *Entomol. News* 122, 354–365. doi:10.3157/021.122.0409
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T. a. T., Ryan, P.D., 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontol. Electron.* 4(1), 1–9. doi:10.1016/j.bcp.2008.05.025
- INEGI, 2016. Anuario estadístico y geográfico de Colima 2016.
- Jesús Manuel Villegas-Mendoza, A.S.-V. y N.M.R.-G., 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, 161–170. doi:10.3958/059.040.0114
- Jiménez-Peydró, R., Peris-Felipo, F.J., 2011. Diversity and Community Structure of Opiinae (Hymenoptera: Braconidae) in the Forest Estate of Artikutza (Spain). *Florida Entomol.* 94, 472–479. doi:10.1653/024.094.0311
- Kavallieratos, N.G., Tomanović, Ž., Starý, P., Bogdanović, A.M., 2008. Parasitoids (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) attacking aphids feeding on Prunoideae and Maloideae crops in Southeast Europe: aphidiine-aphid-plant associations and key. *Zootaxa* 47–64. doi:10.1603/AN09004
- Magaña, P., Padilla, L., Vargas, J., 2010. Competitividad De Las Agroindustrias Del Limón Pertenecientes Al Clúster Del Limón Mexicano En Colima, México. *Ciencias Económicas* 125–136.
- MORENO, C.E., 2001. Métodos para medir la biodiversidad. *M&T - Manuales Tesis SEA vol.1*, 84. doi:10.1371/journal.pone.0103709
- Ruiz-Guerra, B., López-Acosta, J.C., Zaldivar-Riverón, A., Velázquez-Rosas, N., 2015. Braconidae (Hymenoptera: Ichneumonoidea) abundance and richness in four types of land use and preserved rain forest in Southern Mexico. *Rev. Mex. Biodivers.* 86, 164–171. doi:10.7550/rmb.43865
- SAGARPA, 2015. Agenda Técnica Agrícola de Colima 978-607-76, 293.
- Sharkey, M.J., 2006. Introducción a los Hymenoptera de la Región Neotropical.
- Society, F.E., 2016. Presence of *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera : Braconidae) in a Guild of Parasitoids Attacking *Anastrepha fraterculus* (Diptera : Tephritidae) in Northwestern Argentina Author (s): Luis E . Oroño and Sergio M . Ovruski Source : The Florida E 90, 410–412.
- Valenzuela Escoboza, F.A., Reyes Olivas, Á., Cortez Mondaca, E., Bautista Martínez, N., Lomelí Flores, J.R., Palacios Torres, R.E., Palacios Mondaca, C.A., 2015. Identification of Leaf Miner 1 and Its Parasitoids in Tomato Crops in Northern Sinaloa, Mexico. *Southwest. Entomol.* 40, 487–492. doi:10.3958/059.040.0305
- Varone, L., Logarzo, G., Martínez, J.J., Navarro, F., Carpenter, J.E., Hight, S.D., 2015. Field Host Range of *Apanteles opuntiarum* (Hymenoptera: Braconidae) in Argentina, a Potential Biocontrol Agent of *Cactoblastis cactorum* (Lepidoptera: Pyralidae) in North America. *Florida Entomol.* 98, 803–806.