



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS  
DE HIDALGO**

**Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales**

**“Identificación de dos míridos depredadores y  
determinación de la fecundidad, longevidad y fitofagia de  
uno de ellos”**

TESIS

Que presenta:

**Biol. Blanca Alicia Esquivel Ayala**

Como requisito para obtener el grado de:

**Maestro en Ciencias Biológicas**

**En el área: Interacción planta-microorganismo-insecto**

Director

Dr. Samuel Pineda Guillermo

Morelia, Michoacán. México. Mayo 2018



**INSTITUTO DE  
INVESTIGACIONES  
AGROPECUARIAS  
Y FORESTALES**

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por brindarme el sustento económico para llevar a cabo esta investigación.

A la Coordinación de la Investigación Científica por el financiamiento aportado para este proyecto.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por otorgarme una formación integra profesional.

Al Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales donde desarrollé la vocación científica.

A mi asesor, Dr. Samuel Pineda Guillermo, que me ha guiado durante la investigación. En él he encontrado una enorme oportunidad para mi crecimiento personal, profesional y en el saber científico.

A mis sinodales:

Dr. Omar Chassin Noria, por sus enseñanzas y abrirme las puertas de su laboratorio, al Dr. Ángel Rebollar Alviter, por todos los comentarios enriquecedores, al Dr. José Isaac Figueroa de la Rosa, por el tiempo, las charlas y los valiosos consejos, al Dr. Luciano Morales García, por brindarme tiempo y su gran labor administrativa. A todos ellos, mi gratitud y profundo respeto.

Al Colegio de Posgraduados Campus Montecillos y a la Dra. Hilda Silva Rojas, quien me permitió trabajar en su laboratorio y conocer sus valiosas técnicas.

Al Doctor Thomas Henry (Department of Agriculture, National Museum of Natural History, Washington, D. C) por las determinaciones morfológicas de las especies.

Al CDT-FIRA, Morelia; por brindarme la oportunidad de realizar esta investigación en sus invernaderos. Al Ing. Noé Gómez Avendaño por darme la confianza y bienvenida a su centro. A Hugo, Gustavo, Faby, Alán, Manuel, Jesús y Lido, por todo el apoyo técnico requerido y en quienes encontré invaluable amistad.

A la empresa Koppert de México S.A de C.V. (Querétaro, México), por los especímenes proporcionados de *Engytatus modestus*.

Al Dr. Héctor Rodríguez Rodríguez, por todo el apoyo, los consejos, la asesoría y el material otorgado.

Al M.C en P.A Sinue Isabel Morales Alonso por el apoyo brindado en el análisis de datos.

A todos los integrantes del laboratorio de Entomología Agrícola del IIAF; sin su amistad y compañerismo, mi travesía estaría incompleta, gracias por todo.

## DEDICATORIA

*“Con todo el amor para mis padres y hermano; por ser y por estar. Alentaron siempre en mí una fuerte curiosidad que se transformó en vocación por estudiar la naturaleza.*

*Gracias por acompañarme en cada meta.”*

*“A mi abuela Pilar, con toda la admiración a su ejemplo de entereza”.*

*En memoria de:*

*Mis abuelos, Roberto Ayala H. (Abril, 2017) y Elvira Sánchez B. (Septiembre, 2017), que me arroparon en cuerpo y alma. Por cada sonrisa y alegría a su lado, espero firmemente que mi esfuerzo en este trabajo sea de profundo orgullo y gratitud en donde quiera que se encuentren.*

*Para mi amigo Carlos Ponce L. (2016), cuya difícil ausencia solo es llevadera por las cálidas memorias y este logro compartido.*

*....Su trascendencia me ha enseñado que viviendo enteramente,*

*honramos a aquellos que nos amaron.*

## INDICE

INDICE DE FIGURAS .....	7
INDICE DE CUADROS .....	8
RESUMEN .....	9
ABSTRACT .....	10
1. INTRODUCCIÓN .....	11
2. ANTECEDENTES GENERALES .....	14
2.1. Panorama mundial del cultivo de tomate.....	14
2.1.1. El cultivo de tomate en México .....	14
2.2. Producción protegida .....	15
2.3. Problemas fitosanitarios frecuentes bajo condiciones de invernadero .....	16
2.3.1. Control de plagas en invernadero .....	18
2.3.2. Control biológico en invernadero .....	18
2.3.3. El Control biológico y la investigación en invernadero.....	19
2.4 Orden Hemiptera .....	20
2.4.1 Suborden Heteroptera.....	20
2.5 Familia Miridae .....	21
2.5.1. Taxonomía .....	21
2.5.2. Hábito zoofitófago en Miridae.....	22
2.5.3. Zoofitofagía, ¿ventaja o desventaja?.....	23
2.5.4. Biología de míridos zoofitófagos .....	25
2.5.5. Importancia en el control biológico .....	26
2.6 Identificación molecular .....	27
2.6.1. Marcadores moleculares y técnicas moleculares .....	27
2.6.2. Genes mitocondriales .....	28
2.6.3. Gen citocromo oxidasa subunidad I (COI) para la identificación de insectos ...	29
2.6.4. Identificación molecular en Heteroptera .....	30
2.6.5. Identificación molecular de Miridae .....	31
2.6.4. Secuenciación .....	32
3. JUSTIFICACIÓN .....	33
4. OBJETIVOS.....	34

4.1. General.....	34
4.2. Específicos .....	34
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
5.1. Obtención y cría de los móridos.....	35
5.2. Identificación morfológica.....	36
5.3. Identificación molecular .....	36
5.3.1. Extracción de ADN genómico .....	36
5.3.2. Descripción de las técnicas de extracción de ADN .....	38
5.3.3. Cuantificación del ADN genómico .....	39
5.3.4. Amplificaciones del gen Citocromo oxidasa.....	40
5.3.5. Condiciones de amplificación.....	40
5.3.6. Secuenciación de productos de la PCR y análisis.....	41
5.4. Fecundidad y longevidad de <i>E. varians</i> en condiciones de laboratorio .....	42
5.5. Evaluación de la fitofagia .....	43
5.5.1. Condiciones experimentales y prácticas del cultivo de tomate .....	43
5.5.2. Descripción del experimento .....	44
5.7. Evaluaciones.....	49
5.8. Análisis de datos.....	53
6. RESULTADOS .....	54
6.1. Identificación morfológica.....	54
6.2. Identificación molecular .....	54
6.2.1. Extracción y Amplificación .....	54
6.2.2. Secuencias de COI .....	55
6.3. Longevidad y fecundidad en laboratorio .....	59
6.3.1. Longevidad .....	59
6.3.2. Fecundidad.....	59
6.4. Evaluación de la fitofagia .....	60
6.4.1. Longevidad y descendencia en invernadero .....	60
6.4.2. Daños sobre tallos y frutos .....	62
6.4.3. Categorías .....	64
6.4.4. Rendimiento.....	66
6.4.5. Grados Brix y diámetro de los tallos.....	69
7. DISCUSIÓN.....	70
7.1 Identificación morfológica y molecular.....	70
7.2 Longevidad y fecundidad en laboratorio .....	73

7.3 Evaluación de la fitofagia .....	74
8. CONCLUSIONES .....	78
9. LITERATURA CITADA.....	79
10. ANEXO.....	91

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Enfermedades y plagas más comunes del tomate rojo.....	17
Figura 2. Daños provocados por <i>Nesidiocoris tenuis</i> .....	24
Figura 3. Jaula instalada alrededor del tercer racimo de la planta de tomate .....	45
Figura 4. Tira de huevos de <i>Sitotroga cerealella</i> y hembra de <i>Engytatus varians</i> alimentándose .....	46
Figura 5. Distribución de los tratamientos utilizados. ....	47
Figura 6. Clasificación de las categorías comerciales propuesta por el CDT-FIRA. ....	51
Figura 7. Medición del diámetro del tallo de la planta de tomate.. ....	52
Figura 8. Bandas de ADN por electroforesis.....	55
Figura 9. Amplificaciones a partir de ADN por protocolo de Fitzsimmons (1997).....	55
Figura 10. Amplificaciones de ADN con la técnica de Doyle (1991). ....	55
Figura 11. Árbol de distancias tipo Neighbor Joining.....	58
Figura 12. Número de ninfas/hembra de <i>Engytatus varians</i> en diferentes exposiciones....	60
Figura 13. Daños en tallo inducidas por <i>Nesidiocoris tenuis</i> .....	62
Figura 14. Punturas sobre frutos de tomate causadas por móridos zoofitófagos y fruto sin daño.....	63
Figura 15. Conformación promedio de un racimo de frutos de tomate.. ....	64
Figura 16. Frutos de tomate de dos categorías colectados en la segunda cosecha. ....	68

## INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Procedencia de adultos de la familia Miridae y técnica de extracción de ADN...37	
Cuadro 2. Secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación parcial del gen COI. .....	40
Cuadro 3. Relación de las especies de la tribu Dicyphini ..... 42	
Cuadro 4. Etiqueta correspondiente a la identificación morfológica..... 56	
Cuadro 5. Longevidad de hembras y machos de <i>Engytatus varians</i> . ..... 61	
Cuadro 6. Número de frutos de tomate promedio por categoría y racimo. .... 65	
Cuadro 7. Peso promedio de los frutos de tomate de las cuatro cosechas diferentes. .... 67	
Cuadro 8. Grados Brix de los frutos y diámetro de los tallos. .... 69	

## RESUMEN

En la familia Miridae (Hemiptera: Heteroptera) existen especies con hábito alimenticio zoofitófago y su determinación taxonómica es muy complicada. En este estudio, se determinó, a través de caracteres morfológicos, a dos especies de míridos colectados en el campo experimental de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Sinaloa (Km. 17.5 carretera Culiacán-El Dorado). Una de estas especies corresponde al género *Engytatus* y la otra a *Nesidiocoris tenuis* (Reuter). Esta identificación se corroboró con el marcador molecular citocromo oxidasa subunidad I (COI) y, para esta última especie existió 98% de similitud con las secuencias disponibles en la base de datos del GenBank. Para el género *Engytatus* no existieron secuencias depositadas en el GenBank y, al compararla con individuos de tres poblaciones de *Engytatus varians* (Distant) y *Engytatus modestus* (Distant), la topología del árbol de distancias Neighbor Joining posiciona a la especie como *E. varians*. Por otro lado, también se evaluó la longevidad y fecundidad (= descendencia), en laboratorio, de los adultos de *E. varians*. Los machos y hembras vivieron  $33.04 \pm 2.75$  y  $26.95 \pm 3.02$  días, respectivamente, sin diferencias significativas entre sexos. El promedio acumulado de ninfas/hembra durante toda su vida fue  $47.2 \pm 2.4$ . Finalmente, se evaluó el establecimiento, con base en la longevidad y descendencia, y el efecto del hábito fitófago de *E. varians* en el cultivo de tomate bajo condiciones de invernadero cuando hembras y machos se alimentaron con huevos de *Sitotroga cerealella* (Oliver) y cuando no tuvieron disponibilidad de presa. La longevidad de hembras de *E. varians* con alimento fue significativamente mayor (19 días), comparada con el resto de los tratamientos (entre 12 y 14 días). Similarmente, las hembras de este depredador que se alimentaron con huevos de *S. cerealella*, tuvieron una descendencia de 9 ninfas/hembra, mientras que en el tratamiento de hembras sin alimento fue de 1 ninfa/hembra. No se registraron daños en tallos y frutos causados por *E. varians*. El número promedio de frutos de tomate/racimo fue 7 en todos los tratamientos. No hubo diferencias significativas en los grados Brix (~4%) de los frutos de tomate ni en el diámetro (~2 cm) del tallo de las plantas entre tratamientos. Se concluye que las técnicas moleculares son de gran importancia para la corroboración de la identificación de míridos zoofitófagos y que la especie *E. varians* no causó daños en los frutos de tomate y por ello se puede considerar un potencial agente de control biológico en condiciones de invernadero.

**Palabras clave:** Miridae, COI, zoofitofagia, control biológico, invernadero.

## ABSTRACT

In the Miridae family there are species zoophytophagous that its taxonomic determination is very complicated. In this study, two species of mirids, collected at the campo experimental de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Sinaloa (Km. 17.5 carretera Culiacán-El Dorado), were determined through morphological characters. One of these species corresponds to *Engytatus* genus and the another one to *Nesidiocoris tenuis* (Reuter). This identification was corroborated by using the cytochrome oxidase subunit I (COI) marker and, for the latter species 98% of similarity was found with available sequences into the GenBank database. For the *Engytatus* genus there are not sequences in the GenBank, and when compared with individuals from three populations of *Engytatus varians* (Distant) and *Engytatus modestus* (Distant), the topology of the Neighbor Joining distance tree positions the specie as *E. varians*. On the other hand, the longevity and fecundity (= offspring) of *E. varians* adults grown under laboratory conditions were also evaluated. The males and females lived  $33.04 \pm 2.75$  y  $26.95 \pm 3.02$  days respectively, without significant differences between sexes. The cumulative average number of nymphs/female over a lifetime was  $47.2 \pm 2.4$ . Finally, the longevity and offspring, and the effect of the phytophagous habit of *E. varians* was evaluated on tomato crop under greenhouse conditions when females and males were fed *Sitotroga cerealella* eggs (Oliver) and when they did not have prey availability. The longevity of *E. varians* females with food was significantly higher (19 days), compared with the remaining treatments (between 12 and 14 days). Similarly, the females of this predator that were fed with *S. cerealella* eggs had an offspring of 9 nymphs/female, while in the treatment of females without food was 1 nymph/female. There were no damage to stems and fruits caused for *E. varians*. The mean fruits of tomato/cluster was 7 in all treatments. There were no significant differences in the Brix degrees (~ 4%) of the tomato fruits or in the diameter (~ 2 cm) of the stem of the plants between treatments. In conclusion, the molecular techniques are of great importance for the corroboration of the identification of zoophytophagous mirids and that the species *E. varians* did not cause damage in tomato fruits and, therefore, it can be considered as a potential agent of biological control in greenhouse conditions.

**Key words:** Miridae, COI, zoophytophagy, biological control, greenhouse.

## 1. INTRODUCCIÓN

El tomate, *Lycopersicon esculentum* Mill., es una de las hortalizas con mayor extensión de cultivo en el mundo (Navarro-Urbina, 2011; USDA-FAS, 2016). En México, se le considera el segundo vegetal más consumido y el quinto cultivo de importancia económica (FIRA, 2017). Para abastecer la demanda en el mercado, cada vez más, la producción de esta hortaliza aumenta y con ello los requerimientos fitosanitarios (SAGARPA, 2011; FIRA, 2017). Con el fin de optimizar los rendimientos, la superficie destinada al cultivo de tomate se ha incrementado en los últimos años y, bajo condiciones de invernadero, se ha convertido en el vegetal más producido en el país (Navarro-Urbina, 2011). Este escenario también ha favorecido la presencia de plagas pero, a su vez, proporciona las condiciones óptimas para implementar programas de control biológico (Fravel, 2005; Guédez *et al.*, 2008).

Entre las plagas más importantes del cultivo de tomate se encuentran diversos artrópodos de cuerpo blando tales como moscas blancas, áfidos, trips, psílido del tomate y ácaros (Franco-Villamizar, 2010; Bayer CropScience, 2012; Calvo *et al.*, 2009; Arnó *et al.*, 2010). Estos artrópodos, tienen diversos enemigos naturales dentro de los sistemas agrícolas, entre ellos destacan los miembros de la tribu Dicyphini de la familia Miridae (Hemiptera: Heteroptera) (Muñoz *et al.*, 2012). Estos insectos presentan un hábito de alimentación mixto o zoofitófago (Goula y Alomar, 1994), el cual puede cambiar en función de sus requerimientos nutricionales y abundancia de sus presas (Urbaneja *et al.*, 2005). Sin embargo, los Dicyphini se consideran importantes reguladores de poblaciones de diferentes insectos plaga (Arnó *et al.*, 2010) y, generalmente, se pueden encontrar sobre plantas de las familias Solanaceae, Asteraceae, Cucurbitaceae y Geraniaceae debido a que prefieren plantas hospederas pilosas (Logarzo *et al.*, 2005).

Debido a sus características crípticas y a su tamaño pequeño (menos de 12 mm); los míridos son insectos difíciles de identificar (Yarita, 2010) y el número de taxónomos especialistas en esta familia es muy reducido. En este sentido, la clasificación taxonómica mediante caracteres morfológicos ha sido durante muchos años la herramienta principal para la identificación de los insectos, pero en ciertos casos, especialmente en especies crípticas, no ha permitido la identificación precisa (Ortega-Ramírez *et al.*, 2014).

Por lo anterior, las metodologías de identificación de insectos basadas en ADN (Ácido desoxirribonucleico) son una alternativa y complemento a los métodos morfológicos tradicionales. Los marcadores moleculares más utilizados para la identificación de organismos son el ADN genómico, también conocido como marcador nuclear, y la secuencia del gen citocromo oxidasa subunidad I (COI) del ADN mitocondrial. Ambos marcadores moleculares emplean la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) acoplada a la secuenciación para la identificación de regiones que permitan, lo más exacto posible, la identificación del organismo en estudio (Wang *et al.*, 2016). En insectos, estas técnicas se han usado exitosamente para la identificación de especies del orden Hemiptera (Jung y Lee *et al.*, 2011; Souza *et al.*, 2015), demostrando que el análisis de secuencias provee suficiente información para separar familias de este orden (Souza *et al.*, 2015), así como diferenciar entre géneros y especies (Jung y Lee *et al.*, 2011).

La mayoría de los estudios sobre los míridos depredadores se ha realizado en el continente Europeo (Urbaneja *et al.*, 2005). En México, sólo se conoce la presencia de las especies *Engytatus modestus* (Distant), a partir de ejemplares colectados en Chihuahua, Nayarit, Oaxaca, Veracruz, Coahuila y Durango, entre 1952 y 1984 (Discover live, 2013) y *Engytatus varians* (Distant) reportado a partir de individuos colectados en un invernadero del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH) (Martínez *et al.*, 2014). Sin embargo, estos trabajos no son suficientes para conocer la diversidad de la familia Miridae en el país. Es en este contexto, que en el Valle de Culiacán, Sinaloa, se encontró ninfas y adultos de dos especies de míridos en cultivos de tomate. Las observaciones pertinentes, sugirieron que estos individuos se alimentan de insectos plaga, pero al desconocerse la especie, no se sabe con certeza su tendencia de alimentación. Por lo tanto, es necesario realizar la identificación de estos individuos provenientes de este Valle, así como establecerlas en condiciones de cría de laboratorio con el fin de conocer su fecundidad y el potencial como agentes de control biológico para futuros programas fitosanitarios.

Cabe resaltar, que *E. varians*, se ha estudiado intensivamente, desde su reporte en 2014. Se ha documentado su preferencia y capacidad de depredación, biología, influencia alimenticia en parámetros demográficos, reproducción y recientemente el potencial para

controlar poblaciones del psílido del tomate *Bactericera cockerelli* (Sulc.) (Hemiptera: Triozidae), pero se desconoce su efecto fitófago sobre el cultivo de tomate bajo condiciones de invernadero.

## 2. ANTECEDENTES GENERALES

### 2.1 Panorama mundial del cultivo de tomate

El tomate (*L. esculentum*) es una de las hortalizas más populares y de mayor extensión en el mundo (Navarro-Urbina, 2011). China es el primer productor y consumidor mundial, Estados Unidos es el principal importador, y México el principal exportador de esta hortaliza (FIRA, 2017). La superficie mundial destinada para el cultivo de tomate creció a una tasa promedio anual de 1.7 % entre el 2004 y 2014, ocupando 5 millones de hectáreas, desde entonces, se estima que ha incrementado en un 2.5% (USDA, 2014).

El 54.5 % de la superficie cosechada de tomate, se concentra en cuatro países: China (19.8 %), India (18.8%), Nigeria (10.8%) y Turquía (6.4 %). México ocupa la décima posición mundial, con el 2.1% de la superficie cosechada de esta hortaliza (USDA, 2017). En 2014, la producción de tomate alcanzó su máximo histórico con 170.8 millones de toneladas cosechadas, incrementando 2.9% en 2015 y 2016 (USDA, 2014, 2017).

#### 2.1.1 El cultivo de tomate en México

Es el quinto cultivo de importancia económica en el país (FIRA, 2017). México, es calificado como uno de los centros más importantes de domesticación de este cultivo, aquí se encuentra la mayor variabilidad genética y abundancia de tipos silvestres (Navarro-Urbina, 2011). Es la segunda hortaliza más popular, el primero es el cultivo de chile *Capsicum annuum* L. (SAGARPA, 2011). Es usual en los huertos familiares, y dada su amplia extensión, y presencia nacional, también es conocido como *jitomate*, derivado de la lengua náhuatl (xictli, "ombbligo", y tomtl, "tomate") (Navarro-Urbina, 2011).

En México, los estados con mayor producción son Sinaloa, Baja California Norte, Michoacán, Zacatecas y Jalisco, con el 56.3% del total de la producción nacional (SAGARPA, 2011, FIRA, 2017). El estado de Michoacán aporta el 7% de la producción nacional (FIRA, 2017). En 2015, México fue el principal exportador de tomate en términos de volumen y valor de las ventas al exterior. En ese año, abasteció el 90.8 % del volumen importado por Estados Unidos (FIRA, 2017).

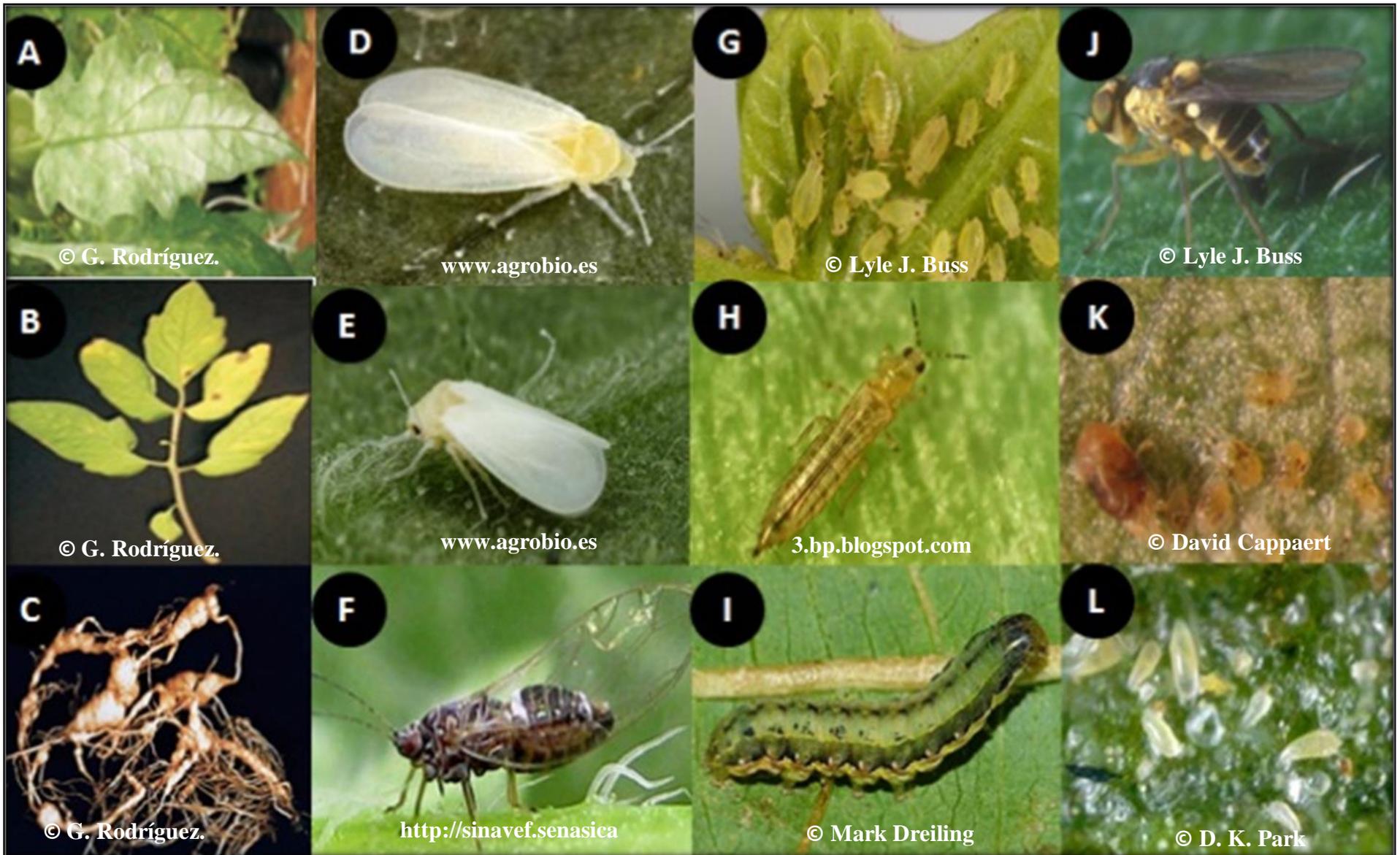
Dada su rentabilidad y demanda en mercados nacionales e internacionales, el tomate en México se coloca como uno de los productos agrícolas mejor posicionados, siguiendo muy de cerca al aguacate *Persea americana* Mill (SAGARPA, 2011; FIRA, 2017). Su producción crece y se proyectan aumentos importantes en los años siguientes; con esto, también incrementa la necesidad de investigar e invertir en tecnologías de optimización de rendimientos, desarrollo de variedades resistentes, y manejo fitosanitario asertivo (tradicional y alternativo) que le permita competir mundialmente (Navarro-Urbina, 2011, SAGARPA, 2011; FIRA, 2017).

## **2.2 Producción protegida**

Actualmente, además de la producción a campo abierto, la agricultura se practica en una amplia variedad de ambientes modificados (Navarro-Urbina, 2011). Los diferentes materiales y estructuras permiten condiciones idóneas para la agricultura intensiva, destacando el elevado uso de invernaderos con distintitos niveles de tecnificación; este sistema productivo se conoce como *agricultura protegida* (Moreno-Reséndez, *et al.*, 2011). El sistema productivo de agricultura protegida, permite el desarrollo de cultivos agrícolas fuera de su ciclo natural y en menor tiempo, se enfrenta con éxito plagas y enfermedades, con mejores rendimientos en menor espacio, sanos y con un precio superior en los mercados; generando un mejor ingreso para los productores (Navarro-Urbina, 2011; SAGARPA, 2011). En México, este tipo de agricultura ha presentado un alto grado de desarrollo, evolucionado a una Tasa Media de Crecimiento Anual (TMCA) de 34.5% (Navarro-Urbina, 2011, SAGARPA, 2011). La agricultura protegida registra superficies considerables, concentrándose en su mayoría en cuatro estados, Sinaloa como principal productor, seguido de Baja California Norte, Estado de México y Jalisco, que en conjunto cuentan con el 65% de la superficie establecida a nivel nacional bajo esta modalidad (Navarro-Urbina, 2011; FIRA, 2017). El tomate es el principal cultivo que se produce bajo condiciones de invernadero, representa una importante derrama económica en el país tanto por la superficie que se le dedica a su producción como por los empleos e ingresos que genera; sin embargo, los problemas fitosanitarios que este cultivo enfrenta debido principalmente a la presencia de enfermedades causadas por hongos, bacterias, virus y distintas especies de insectos plaga, merma en muchos sentidos su producción, es por eso que a través de la investigación es indispensable buscar e implementar alternativas y soluciones a dichos problemas (SAGARPA, 2011; FIRA, 2017).

### 2.3 Problemas fitosanitarios frecuentes del cultivo de tomate bajo condiciones de invernadero

Para garantizar la mayor ganancia económica en la producción de tomate, se debe mantener a las plantas libres de enfermedades causadas por patógenos y reducir la presencia de plagas (Figura 1), además de controlar de forma eficiente los requerimientos fisiológicos y nutrimentales. Entre las enfermedades más comunes que se han reportado durante el proceso de producción se encuentran la cenicilla causada por el ascomiceto *Oidium neolycopersici* Link (1824), pudrición de fruto ocasionada por el oomiceto *Phytophthora infestans* Leonian, 1922 y agallamiento de la raíz producido por el nematodo (Heteroderidae) *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White). En cuanto a plagas, dentro de las más importantes destacan algunos hemípteros como las moscas blancas *Bemisia tabaci* (Gennadius) y *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Hemiptera: Aleyrodidae), el psílido del tomate *B. cockerelli*, algunos áfidos como *Myzus persicae* (Sulzer), *Aphis gossypii* (Glover) (Hemiptera: Aphididae), el trips *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae), lepidópteros como el gusano del fruto, *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae), y el gusano soldado, *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), dípteros como el minador de la hoja, *Liriomyza sativae* (Blanchard), *Liriomyza trifolii* (Burgess) (Diptera: Agromyzidae) y los ácaros como la araña roja, *Tetranychus urticae* (Koch) (Acari: Tetranychidae), y *Aculops lycopersici* (Masse) (Acari: Eriophyidae) (Bayer CropScience, 2012).



**Figura 1.** Enfermedades y plagas más comunes del tomate rojo A) *Oidium neolycopersici*. B) *Phytophthora infestans*, C) *Meloidogyne incognita*, D) *Bemisia tabaci*, E) *Trialeurodes vaporariorum*, F) *Bactericera cockerelli*, G) *Myzus persicae*, H) *Frankliniella occidentalis*, I) *Spodoptera exigua*, J) *Liriomyza trifolii*, K) *Tetranychus urticae*, L) *Aculops lycopersici*.

### **2.3.1 Control de plagas en invernadero**

La protección a cultivos bajo invernadero está orientada al control químico (van Lenteren, 2000); sin embargo, el sistema de agricultura protegida es idóneo para la acelerada reproducción y mantenimiento de insectos plaga, ocasionando el incremento en la frecuencia de aplicación de agroquímicos (Paulitz y Bélanger, 2001). El relativo bajo costo de los agroquímicos y su aparente acción inmediata, inclinan a los productores a utilizarlos (van Lenteren y Woets, 1988; van Lenteren, 2000), pero, su uso inconsciente, provoca serios daños al medio ambiente y la salud, además de propiciar la resistencia de insectos perjudiciales (Paulitz y Bélanger, 2001; Guédez *et al.*, 2008). La cuestionable eficacia de los productos químicos y el constante incremento poblacional promueven la búsqueda de formas de producción sustentables, que disminuyan nuestra competencia con los insectos plaga y se garantice la seguridad ambiental y alimentaria de las futuras generaciones (Paulitz y Bélanger, 2001; Guédez *et al.*, 2008).

### **2.3.2 Control biológico en invernadero**

El uso de enemigos naturales (parasitoides, depredadores y patógenos) para reducir y mantener a las poblaciones de organismos perjudiciales por debajo del umbral económico, se le conoce como *control biológico* (van Lenteren y Woets, 1988; van Lenteren, 2000; Paulitz y Bélanger, 2001; Fravel, 2005; Guédez *et al.*, 2008). Este modelo de control tiene como base la dinámica denso-dependiente de las poblaciones; es decir, cuando los enemigos naturales se incrementan, destruyen gran porcentaje de la población plaga cuando su densidad incrementa (Fravel, 2005; Guédez *et al.*, 2008). El desarrollo del control biológico ha comenzado recientemente con los "primeros éxitos prácticos" (van Lenteren, 2000; Fravel, 2005). Actualmente, los productores en todo el mundo están introduciendo millones de enemigos naturales para el control de plagas en sus invernaderos (Guédez *et al.*, 2008). El listado de insectos benéficos y las empresas que los ofrecen comercialmente crece anualmente; por lo cual, la vinculación investigación-empresa tiene un fuerte potencial (Paulitz y Bélanger, 2001; Fravel, 2005; Guédez *et al.*, 2008).

### **2.3.3 El Control biológico y la investigación en invernadero**

Las condiciones de temperatura, luz, humedad y fertilización están optimizados para un crecimiento máximo de la plantas, pero estas condiciones, también crean nichos ecológicos que pueden favorecer la colonización de organismos plaga (Paulitz y Bélanger, 2001). El sistema cerrado de la producción agrícola bajo plástico, facilita la investigación del control biológico, sin embargo, provoca también que los organismos perjudiciales introducidos, sean difícilmente excluidos del medio, y que el vacío biológico de sus antagonistas naturales acelere e intensifique su daño (van Lenteren, 2000; Paulitz y Bélanger, 2001; Fravel, 2005), por lo cual el control biológico se convierte en la mejor alternativa para el sistema (van Lenteren, 2000).

Algunas de las razones por las cuales el estudio del control biológico en invernaderos es digno de atención son: a) se usa un nuevo sistema de introducción de enemigos naturales; b) la investigación sobre plagas en invernaderos ha resultado en desarrollos teóricos extensos para comprender cómo funciona; y c) una relación cercana entre investigadores, trabajadores, y productores ha decantado en una rápida transferencia y uso de información (Paulitz y Bélanger, 2001; Fravel, 2005).

El potencial de investigación y éxito que confiere el control biológico en invernadero es mayor que en los sistemas abiertos (van Lenteren, 2000). Dentro de la enorme gama de nuevas posibilidades de investigación se apuntan el fitomejoramiento, al combinar aspectos de la resistencia de la planta con control biológico, seleccionar cultivares que puedan atraer enemigos naturales y que produzcan mejor ambiente para los agentes de control (Paulitz y Bélanger, 2001). La meta de la investigación es proveer herramientas conjuntas al uso de enemigos naturales que promuevan su uso; al mismo tiempo, esto se traduce en un entorno más limpio, en la satisfacción de la demanda de los consumidores de alimentos libres de pesticidas y en la protección sostenible de los cultivos (Fravel, 2005).

## 2.4 Orden Hemiptera

Dentro de los insectos con metamorfosis incompleta, el orden Hemiptera es el más numeroso (Li *et al.*, 2017). Se estima que las más de 100,000 especies descritas en este grupo, integran el 7% de la diversidad de metazoos (Weirauch y Such, 2011). Dada su amplitud y compleja evolución, han logrado colonizar distintos hábitats, incluyendo el medio acuático, derivando en distintos recursos alimenticios como savia de plantas, artrópodos, hongos y sangre de vertebrados (Wheeler, 2001). Su diversificación es producto de la sinapomorfia del grupo, que converge en un aparato bucal en forma de *pico* brindado un sistema de alimentación del tipo perforador-succionador (Such, 2011; Li, *et al.*, 2017). La clasificación básicamente se centra en la ausencia o presencia de gula, la posición del rostro y la forma de las alas (Goula y Mata, 2011). Típicamente el orden se divide en dos subórdenes: Homoptera y Heteroptera, en este último se encuentran las chinches verdaderas (Wheeler, 2001).

### 2.4.1 Suborden Heteroptera

Es el taxón más amplio en Hemiptera, las características de clasificación son: 1) gula presente con aparato bucal en forma de estilete, 2) glándulas odoríferas, 3) antenas de cuatro segmentos, a veces con dos escleritos intercalados y 4) alas anteriores con una región basal esclerosada y una zona membranosa distal llamadas hemiélitros (Goula y Mata, 2011). Se han descrito alrededor de 42 000 especies en todo el mundo, con morfología diversa y especializaciones variadas (Raupach *et. al.*, 2014). Este grupo es conocido por tener especies plaga importantes y a su vez, presentar organismos depredadores usados en el control biológico o control integrado de plagas (Goula y Mata, 2011, Raupach *et. al.*, 2014). Estos heterópteros benéficos pertenecen sobre todo a las familias: Reduviidae (*Coranus* sp. Curtis), Anthocoridae (*Orius* sp. Wolff), Miridae (*Macrolophus* sp. [Wagner], *Dicyphus* sp. Knight, *Nesidiocoris tenuis* [Reuter]), Nabidae (*Nabis* sp. Latreille) y Geocoridae (*Geocoris* sp. Fallén) (Alomar y Widenmann, 1999; Goula y Mata, 2011, Raupach *et al.*, 2014).

## **2.5 Familia Miridae**

A los individuos que integran a la familia Miridae se les conoce comúnmente como “chinchas de las plantas” (Wheeler, 2001); esta familia cuenta con la mayor riqueza de especies dentro del orden Heteroptera (Goula y Mata, 2011; Raupach *et al.*, 2014) ya que incluye por lo menos 10,500 especies en 1,200 géneros para todo el mundo (Schuh, 2008). Los míridos han sido muy estudiados por la importancia que tienen en los sistemas agrícolas (Wheeler, 2001). Dentro de la familia Miridae se encuentran especies fitófagas y depredadoras, además de un grupo particular que presenta ambos hábitos alimenticios, lo que se conoce como zoofitofagia (Goula y Alomar 1994; Wheeler, 2001; Schuh, 2008; Jung y Lee, 2011).

A pesar de ser morfológicamente diversos, los míridos se diferencian de otras familias por poseer el cúneo claramente separado del resto del hemiélitro y carecer de ocelos. Son de tamaño pequeño (2-12 mm), la membrana de las alas presenta una o dos celdas en la base sin nerviaciones longitudinales; las antenas tienen cuatro artejos al igual que el pico y su inserción es siempre visible dorsalmente y en reposo se une sobre la cara ventral del cuerpo (Goula y Alomar 1994; Wheeler, 2001).

### **2.5.1 Taxonomía**

Con base en la morfología y hábitos, Suchh (1976, 1995) dividió a la familia Miridae en seis subfamilias y ocho tribus: Isometopinae, Psallopinae, Phylinae (Orthotylini, Pilophorini y Phylini), Cylapinae, Mirinae (Mirini y Deraeocorini), Bryocorinae (Eccritotarsini, Dicyphini y Bryocorini) (Jung y Lee, 2011). Es en la tribu Dicyphini se encuentran diversas especies con potencial agrícola para disminuir las poblaciones de distintas plagas (Wheeler y Krimmel 2015). Las especies de esta tribu se asocian generalmente con plantas que poseen tricomas glandulares y/o tricomas no glandulares, por lo que es fácil encontrarlos sobre plantas de las familias Solanaceae, Asteraceae, Cucurbitaceae y Geraniaceae (Logarzo *et al.*, 2005; Wheeler y Krimmel 2015).

Los miembros de la tribu Dicyphini son chinchas pequeñas de entre 2 y 5.5 mm; de cuerpo frágil y apéndices alargados. El color y la presencia de setas, usualmente se utiliza

para diferenciar géneros. Los ojos se encuentran alejados del pronoto, con forma trapezoidal y presenta un grueso collar. La base del escutelo es descubierta, los hemiélitros son translúcidos, uñas con diente grueso en la base y amplios pulvilos (Goula y Alomar 1994). Poseen una forma de alimentación omnívora, es decir, pueden alimentarse tanto de partes vegetales como de presas, esta dualidad alimentaria se conoce como zoofitofagia y ha promovido diversos estudios donde se contrasta la polémica de su posible desventaja con su desempeño efectivo en sistemas agrícolas (Sánchez, 2009; Bueno *et al.*, 2013).

Para la implementación de programas de manejo integrado de plagas (MIP) que involucren a especies de míridos zoofitófagos, el conocimiento de sus parámetros biológicos es fundamental. El establecimiento de estos insectos está influenciado por la planta hospedera. Wheeler (2001) encontró que la especie *Lygus hesperus* (Knight) presenta un mayor grado de oviposición en hojas pilosas que en hojas glabras, mismo que considera que se debe a que los tricomas protegen sus huevos; *Tupiocoris cucurbitaceus* (Spinola) posee baja fecundidad en chile dulce *C. annuum* y una alta fecundidad en tomate *L. esculentum* y tabaco *Nicotiana tabacum* L. (Orozco *et al.*, 2012).

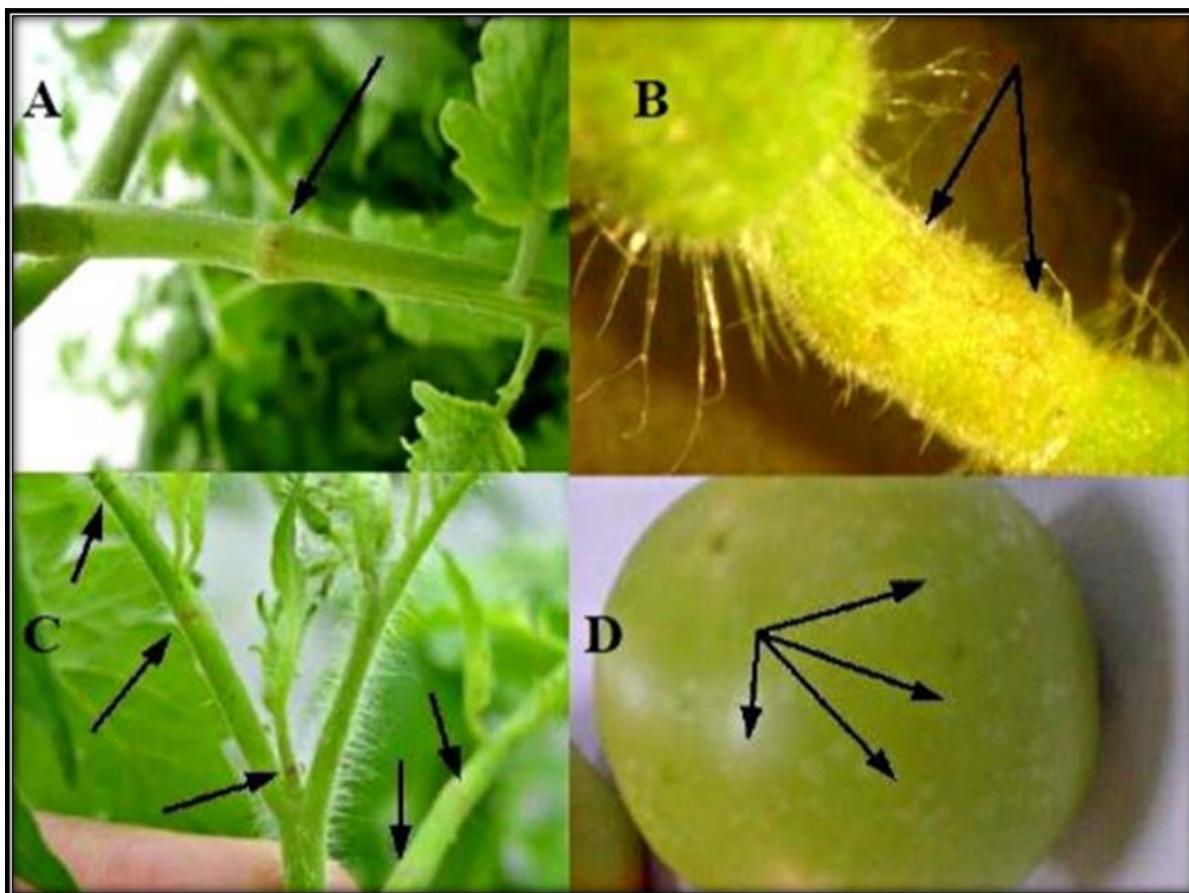
### **2.5.2 Hábito zoofitófago en Miridae**

Se han propuesto tres modelos para comprender la relación entre la cantidad de planta y presa consumida por depredadores zoofitófagos (Gillespie y Mc Gregor 2000; Albajes *et al.* 2006; Mollá, 2013). Para el primer modelo, la fitofagia está en relación a la presencia o ausencia de presas; es decir, cuando disminuye la disponibilidad de presa los míridos tienden a alimentarse de las plantas y se invierte cuando la población de la presa aumenta. En el segundo modelo, la alimentación de presas y de plantas es independiente, ya que los requerimientos fisiológicos y nutrimentales que le brinda la planta no los sustituye la presa. En el tercer modelo se manifiesta de que si aumenta el consumo de presas, también aumenta el de las plantas, lo cual podría deberse a la necesidad de recursos como el agua. Las especies de hábitos zoofitófagos, pueden ajustarse a cualquier modelo, por lo tanto, se recomienda su evaluación por separado en relación a las presas presentes y cultivo (Goula y Alomar 1994).

### 2.5.3 Zoofitofagía, ¿ventaja o desventaja?

La zoofitofagía es considerada como una desventaja en el control biológico. Al no alimentarse exclusivamente de presas, se espera que los insectos plaga mantengan densidades perjudiciales (Castañé *et al.*, 2011), aunque en Europa y Norteamérica se han usado varias especies zoofitófagas como depredadores potenciales de mosquitos blancos, áfidos, ácaros, minadores de hojas y trips (Urbaneja *et al.*, 2005; Castañé *et al.*, 2011; De Puyseleir *et al.*, 2013). Por otro lado, los estudios sobre míridos zoófagos se han centrado en su mayoría en la depredación, descuidando la alimentación vegetal y con ello la interacción insecto-planta (Pappas *et al.*, 2015). Estudios recientes han demostrado la inducción de mecanismos de defensas en plantas de tomate cuando son expuestas a herbivoría por míridos zoofitófagos, expresando mayor resistencia a insectos plaga (Maselou *et al.*, 2015; Pappas *et al.*, 2015).

La perspectiva más controversial sobre el uso de míridos zoofitófagos en sistemas agrícolas, recae en la posibilidad de que, dada la alimentación fitófaga, puedan causar daños a los cultivos (Figura 2) (Calvo y Urbaneja, 2003). Los daños causados a las plantas por míridos zoofitófagos son raros (Albajes y Alomar, 2008); sin embargo, cuando estos insectos se alimentan de la savia de las plantas, pueden causar lesiones con su aparato bucal (Arnó *et al.*, 2010; Castañé *et al.*, 2011), además de provocar abortos florales, que, bajo determinadas condiciones conducen a la disminución de rendimiento (Sánchez, 2009; Arnó *et al.*, 2010). A pesar de la posible reducción en la producción de tomate por incidencia de míridos, Sánchez y Lacasa (2008) demostraron, a través de modelos matemáticos predictivos, que aún con la pérdida de flores por alimentación del mírido *Nesidiocoris tenuis* (Reuter), los frutos finales compensan, incluso en exceso el rendimiento esperado.



**Figura 2.** Daños provocados por *Nesidiocoris tenuis* en A) tallos, B) peciolo, C) hojas y D) frutos de tomate. Tomado de Calvo y Urbaneja (2003).

En otro caso, la presencia de *Macrolophus pygmaeus* Rambur en tomate, activa, a través de inhibidores de proteinasas (IP), mecanismos de defensa que disminuyen la colonización de *T. urticae*, pero no de *T. vaporariorum*; además, su presencia no provoca pérdidas en el rendimiento (Pappaset *et al.*, 2015).

Los posibles efectos de móridos zoofitófagos son consecuencia de complejas interacciones entre, morfología, fisiología, características del comportamiento del depredador, variedad de planta, tipo de cultivo, factores ambientales y disponibilidad de presa (Gessé 1992; Sánchez y Lacasa 2008; Calvo *et al.*, 2009; Castañé *et al.*, 2011); además, debe considerarse el comportamiento antagónico o sinérgico entre especies (Pappaset *et al.*, 2015; Maselou *et al.*, 2015).

#### 2.5.4 Biología de míridos zoofitófagos

Las hembras de los míridos insertan los huevos dentro del tejido vegetal, lo que dificulta visualizarlos (Silva *et al.*, 2016), únicamente se reconocen por una estructura sobresaliente (opérculo) (Franco, 2010). El desarrollo postembrionario se conforma por cuatro o cinco estadios ninfales (Calvo y Urbaneja 2004; Mohd *et al.*, 2009, Pineda *et al.*, 2016). Durante los instares tempranos las ninfas son muy parecidas a hormigas (Wheeler, 2001; Schuh, 2008), los instares solo son distinguibles por su tamaño y la presencia de esbozos alares en los últimos instares (Goula y Alomar, 1994; Goula y Mata, 2011). Diversos estudios, demuestran que los parámetros biológicos (duración de los instares, fecundidad, longevidad, entre otros) dependen de las condiciones ambientales, tiempo de alimentación y planta hospedera (Mena, 2016; Palma-Castillo, 2016; Dimas, 2017).

Mohd *et al.* (2009) demostraron que la duración del ciclo de vida de *Macrolophus caliginosus* (Wagner) es de 27.6 días a 24 °C, pero a una temperatura más baja (22 °C) fue de 40 días. La capacidad que tienen las ninfas para sobrevivir en ausencia de presas representa una ventaja para su establecimiento en los agrosistemas (Perdikis y Lykouressis, 2004). El aumento de presas permite su desarrollo e incrementa su fecundidad, esto también ocurre con alimentos sustitutos en experimentos de laboratorio (Perdikis y Lykouressis, 1999, 2000, 2004; Agustí y Gabarra 2008; Urbaneja *et al.*, 2005; Palma-Castillo, 2016; Dimas, 2017). La literatura menciona algunos casos, como el *T. cucurbitaceus*, donde se registró el promedio de 62 ninfas/hembras; sin embargo, en ausencia de presas pocos individuos logran completar el ciclo y los sobrevivientes tienen un desarrollo más lento y prolongado, comparado con adultos emergidos de plantas con presas (entre  $23.7 \pm 0.6$  a  $24.3 \pm 1.5$  días) (Orozco *et al.*, 2012). En *M. caliginosus* se observó que el tipo de alimentación prolonga o reduce su ciclo de vida: la dieta artificial a base de carne de res prolongó el desarrollo de las ninfas ( $27.5 \pm 0.33$  días) hasta llegar al estado adulto y disminuyó ( $18.3 \pm 0.28$  días) cuando se alimentaron de huevos de *Ephestia kuehniella* Zeller (Castañé y Zapata, 2005). Estos factores, igualmente, influyeron la descendencia de esta especie (51 ninfas/hembra) (Mohd *et al.* 2009), documentado también en *N. tenuis* donde, según Calvo y Urbaneja (2004) la falta de presa disminuyó su fecundidad, aunque estos autores no proporcionaron datos al respecto.

### 2.5.5 Importancia en el control biológico

Los míridos muestran gran capacidad depredadora contra artrópodos de cuerpo blando tales como moscas blancas, áfidos, psílidos, trips y ácaros. Entre los principales géneros con relevancia en el control biológico destacan *Nesidiocoris*, *Macrolophus* y *Dicyphus* (Urbaneja *et al.*, 2003; Agustí y Gabarra, 2009; Franco-Villamizar, 2010). Son diversas las investigaciones acerca del uso de míridos con potencial depredador en sistemas agrícolas y actualmente se comercializan y utilizan alrededor de doce especies en programas de MIP para cultivos hortícolas en invernadero (Muñoz *et al.*, 2012).

La mayoría de los estudios sobre míridos zoófagos, se han realizado en Europa, donde se han usado en programas de control biológico por conservación y aumento, como las especies *M. pygmaeus*, *Dicyphus tamaninii* Wagner y *N. tenuis*, que han demostrado alto potencial como depredadores, reduciendo las poblaciones de mosca blanca (Albajes *et al.*, 2003; Castañé *et al.*, 2004; Calvo *et al.*, 2009; Arnó *et al.*, 2010). En Cataluña, se han usado con frecuencia las especies *M. pygmaeus*, *M. caliginosus* y *D. tamaninii* en invernaderos de tomate para contrarrestar moscas blancas (Goula y Alomar, 1994).

En el continente americano son pocos los trabajos sobre liberaciones masivas o inoculativas de míridos zoofitófagos para control de plagas. Sin embargo, existe información sobre registros de algunos depredadores. En Texcoco, Estado de México, se ha evaluado en condiciones de invernadero el potencial de *Dicyphus hesperus* Knight como depredador de *B. tabaci* y *B. cockerelli*, cuando las poblaciones de ambos insectos plaga están relacionadas o separadas (Calvo *et al.*, 2016), además, se estudió el posible daño sobre frutos en ausencia de presas (Calvo *et al.*, 2018). En Estados Unidos de América, Purcell *et al.*, (1993) e Illingworth (1936) observaron a *Engytatus varians* (Distant) y *Engytatus modestus* (Distant) depredando a minadores de hojas, larvas de palomillas y pulgones. En Cuba se ha registrado también a *E. varians* depredando a mosquitas blancas en varias plantas cultivadas (Castiñeiras 1995). En Brasil se menciona a las especies *Campyloneuropsis infumatus* (Carvalho), *E. varians* y *Macrolophus basicornis* (Stal) depredando a *T. absoluta* en tabaco (Bueno *et al.*, 2013). El caso más reciente de un mírido depredador documentado para México, es el de *E. varians* reportado por Martínez *et al.*

(2014). Esta especie se colectó sobre plantas de tomate alimentándose de ninfas de *B. cockerelli* en un invernadero del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (IIAF-UMSNH) y, desde entonces, se ha investigado sobre su biología (Medina, 2014), capacidad de depredación sobre *B. cockerelli*, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) y *S. exigua* (Velázquez-Rodríguez, 2015; Hernández-Quintero, 2015). En invernadero, este depredador redujo hasta en 90% las poblaciones de *B. cockerelli* (Pérez-Aguilar, 2016), asimismo, se estudia el mantenimiento en laboratorio de este depredador con el fin de producción al mejor costo para liberaciones de índole práctico (Dimas, 2017; Palma-Castillo, 2017).

## **2.6 Identificación molecular**

La determinación y clasificación de organismos usando exclusivamente caracteres morfológicos dominó la sistemática durante mucho tiempo (Díaz, 1998; Peña *et al*, 2013). Sin embargo, el reconocimiento morfológico requiere mucha especialización, además de una profunda observación y conocimiento de las variaciones en los estados de desarrollo y cambios por influencia ambiental (Díaz, 1998). Estas situaciones han incrementado la búsqueda de herramientas de identificación y, con el surgimiento de la biología molecular, se acerca a la meta de reconocer especies más allá de su fenotipo (Becerra y Paredes, 2000; Rentaria, 2006). Actualmente, estas herramientas son ampliamente usadas debido a su confiabilidad, requerimiento de pequeñas cantidades de muestras de ADN, accesibilidad y fácil reproducción (Song, *et al.*, 2012; Contreras-Rendón *et al.*, 2017).

### **2.6.1 Marcadores moleculares y técnicas moleculares**

Con el objetivo de examinar y aislar genes de interés que permitan reconocer organismos e inferir su parentesco, se utilizan los marcadores moleculares (Szalanski y Powers, 1996; Becerra y Paredes, 2000; Rentaria, 2006). Los marcadores moleculares son biomoléculas que se pueden relacionar con un rasgo genético (Díaz, 1998). Pueden ser marcadores moleculares: *las proteínas* (antígenos e isoenzimas) y el *ADN* (genes), técnicas de carácter molecular y bioquímico (Díaz, 1998; Becerra y Paredes, 2000).

Los primeros marcadores moleculares usados fueron por identificación de proteínas e isoenzimas en la época de los 70's (Díaz, 1998; Becerra y Paredes, 2000) a base de observaciones por electroforesis en geles de poliacrilamida; ambas técnicas son de carácter bioquímico (Becerra y Paredes, 2000). Le siguieron los marcadores de ADN (marcadores moleculares). Las técnicas que usan ADN se han convertido en un gran apoyo para la taxonomía tradicional en la identificación rápida de organismos

El éxito de los marcadores y las técnicas moleculares se debe, en gran parte, por la creación de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Esta técnica consiste en amplificar el ADN para producir fragmentos específicos *in vitro*; además, permite el estudio de la variación genética (Rosero *et al.*, 2010). Otra técnica es el análisis de restricciones enzimáticas (REN), la cual ha demostrado ser muy útil y confiable ya que permite obtener patrones de bandas característicos de cada muestra analizada y observar diferencias entre varios individuos. Esto se logra mediante el uso de endonucleasas, las cuales son enzimas que reconocen y “cortan” secuencias específicas dentro de las moléculas de ADN, produciendo fragmentos únicos de distintos tamaños (Lee y Miller, 1978). Otra técnica es el análisis mediante una mezcla de técnicas PCR-RFLP (basada en el análisis de restricción sobre productos de PCR) y, finalmente, una de las herramientas más promisorias, es la secuenciación. Dichas herramientas proveen una gran cantidad de información referente a la identidad de una especie y variabilidad intra e inter-específica (Pancorbo *et al.*, 2006).

### **2.6.2 Genes mitocondriales**

El ADN mitocondrial contiene información que es muy eficaz resolviendo filogenias a nivel específico. El uso de los genes mitocondriales ha aumentado en filogenética y genética de poblaciones debido al desarrollo de la metodología para aislar el ADN mitocondrial, uso de restricción de enzimas para detectar las diferencias de los nucleótidos, el desarrollo de métodos de PCR y la aplicabilidad de primers universales para la amplificación del ADN.

En estudios de relaciones filogenéticas se usan los genes COI y COII que codifican para la enzima citocromo oxidasa (Patwardhan *et al.*, 2014); los cuales se han usado para

análisis de poblaciones de parasitoides (del Pino *et al.*, 2013; Franck *et al.*, 2017) y el COI se ha propuesto como un potencial código de barras para la identificación de insectos en general (Song *et al.*, 2012). El gen del citocromo *b* se reporta como el marcador más útil para recuperar relaciones filogenéticas entre taxones muy cercanos, pero puede perder resolución en nodos más profundos. Aunque el citocromo *b* ha probado ser útil recuperando información genética útil en una variedad de niveles taxonómicos, su utilidad depende de la profundidad de linaje y evolución (Patwardhan *et al.*, 2014).

### **2.6.3 Gen citocromo oxidasa subunidad I (COI) para la identificación de insectos**

El marcador molecular COI es considerado el “código de barras de la vida” del ADN para la identificación preliminar de especies animales. Este marcador es ampliamente utilizado para la identificación de insectos debido a que su tasa de mutación es a menudo suficientemente rápido para distinguir especies estrechamente relacionadas, y a su vez la secuencia se conserva entre sus congéneres (Harvey *et al.*, 2003). El uso del gen COI es muy utilizado por varias ventajas (Lanteri, 2007; Pečnikar y Buzan, 2013): a) el ADN mitocondrial es fácil de aislar debido a su alta abundancia en las células, b) sólo presenta herencia materna y por lo tanto ausencia de recombinación que permite establecer una historia evolutiva del grupo taxonómico a estudiar, c) tiene altas tasas de mutación en diferentes partes de la molécula, d) la respiración celular ha sido muy estudiada y por lo tanto la actividad del gen COI es muy conocida, e) su estructura y tamaño es muy conservada en todos los organismos aeróbicos, f) presenta regiones altamente conservadas seguidas de unas regiones altamente variables que permiten estudiar la diferenciación genética entre poblaciones de una misma especie y entre especies de un mismo género, y g) se utiliza para una gran cantidad de insectos (Freeland, 2005; Lanteri, A. A. 2007, Pečnikar y Buzan, 2013). Por lo tanto la secuencia de dicho gen permite, además de la identificación de insectos, realizar un análisis de las relaciones filogenéticas dentro de poblaciones de insectos y mostrar la distancia o cercanía entre individuos de un mismo grupo y en este caso de la familia Miridae (Jung y Lee, 2011; Souza *et al.*, 2015). Sin embargo, para llevar a cabo un estudio filogenético de este grupo, lo ideal es utilizar secuencias de varios genes mitocondriales y nucleares, debido a que en muchos casos la interpretación de la evolución

de un grupo taxonómico puede ser afectada más por la tasa evolutiva del gen analizado, que por la evolución real de este grupo (Freeland, 2005; Jung y Lee, 2011).

#### **2.6.4 Identificación molecular en Heteroptera**

Dentro de la clase Insecta, el suborden Heteroptera ocupa el quinto lugar en riqueza de especies (~40,000); esta diversidad limita su determinación a través de técnicas tradicionales. Algunos grupos de este suborden son difíciles de identificar por su reducido tamaño o compleja morfología; para otros, el número de taxónomos especialistas es reducido y en el caso de diversas familias, las claves morfológicas son escasas o incluso inexistentes para la determinación en estados inmaduros (Schuch, 2009; Foottit *et al.*, 2014).

En general, la determinación de heterópteros demanda mucho tiempo y se requiere de una profunda especialización; por ello, las herramientas moleculares ayudan en la identificación rutinaria de los especímenes que pertenecen a este suborden en entornos aplicados; esto permite el reconocimiento de especies morfológicamente crípticas y en fases inmaduras, situaciones necesarias para la detección temprana de posibles especies de plagas (Foottit *et al.*, 2014). Mientras que el código de barras de ADN (COI) se ha utilizado con éxito para la identificación molecular en varios taxones de insectos tales como Ephemeroptera (Stahls y Savolainen, 2008), Trichoptera (Pauls *et al.*, 2010), Lepidoptera (Saldamando y Márquez, 2012), Hymenoptera (Packer y Ruz, 2017) y Coleoptera (Raupach *et al.*, 2010; Kubisz *et al.*, 2012), los estudios que analizan al suborden Heteroptera son poco frecuentes, no obstante, los trabajos pioneros en este grupo, revelan el potencial de dicha herramienta para determinar especies, resaltando determinaciones certeras a corto plazo utilizando poco tejido y la resolución de incógnitas filogenéticas (Park *et al.*, 2011; Souza *et al.*, 2015; Foottit *et al.*, 2014).

La mayoría de las investigaciones recientes que usan COI para la determinación de heterópteros se dirigen a resolver relaciones dentro de grupos taxonómicamente problemáticos; sin embargo, algunos de estos taxones, presentan situaciones de *reciente especiación*, colocando a la región COI como un marcador molecular insuficiente para la determinación de especies, con poca divergencia, subestimando su utilidad como código de

barras de ADN para la identificación de heteróptera en general (Song *et al.*, 2012). Pese a esta desventaja, COI es ampliamente recomendada en la bibliografía, haciendo necesario evaluar su potencial e idoneidad dentro de distintas familias del suborden (Souza *et al.*, 2015; Foottit *et al.*, 2014).

### **2.6.5 Identificación molecular de Miridae**

A pesar de las numerosas preguntas biológicas y sistemáticas que quedan por abordar de la familia Miridae, los diversos análisis cladísticos se basan en caracteres morfológicos únicamente (Schuh, 1974, 1976). Dentro de las excepciones que utilizan marcadores moleculares para la sistemática de míridos destacan los trabajos de Schuh *et al.* (2009) y Jung y Lee (2011). El primer estudio, explora la ubicación de Miridae dentro del suborden Heteroptera con base a las relaciones con otras familias. La segunda investigación cuestiona, a través de cuatro marcadores moleculares ([16S, COI] y [18S, 28S]), el hábito zoofitófago, proponiendo que la alimentación herbívora facultativa proviene de un ancestro depredador y no fitófago como se sostiene en trabajos anteriores basados en morfología (Schuh *et al.*, 2009; Wheeler, 2001).

Durante las últimas décadas, los genes mitocondriales, en especial la región COI, son la fuente de información más utilizada para estudios moleculares; en míridos, no es la excepción (Raupachet *et al.*, 2014; Souza *et al.*, 2015). Las determinaciones realizadas por COI en esta familia arrojan resultados confiables; las especies se diferencian cuando presentan más del 2% de divergencia, y los análisis construyen agrupaciones lógicas y concisas en las topologías de árboles de distancia tipo Neighbor joining (NJ) (Tembe *et al.*, 2014). Contrario a esto, en algunas especies de Miridae; COI es insuficiente para diferenciar especies, aunque estos casos no son la mayoría (Foottit *et al.*, 2014; Raupachet *et al.*, 2014). Por lo tanto, es esencial explorar los marcadores mitocondriales conocidos, además de los potenciales en míridos, con visión a programas agrícolas aplicados y en ciencia básica.

#### **2.6.4 Secuenciación**

La secuenciación es el arreglo u ordenamiento de los monómeros que conforman el ADN o ARN (Rentaria, 2006; De Necochea y Canul, 2004; Peña *et al*, 2013). Permite la lectura de las bases nitrogenadas que contienen la información genética (Peña *et al*, 2013), y el análisis detallado de regiones de interés para estudios sistemáticos (Rentaria, 2006). Las técnicas que existen para secuenciar son: *la química, la enzimática y la automática* (Rentaria, 2006). La secuenciación automática, usa la reacción de Fred Sanger pero con fluorescencia, en vez de radiactividad, que se detecta por medio de rayos láser (De Necochea y Canul, 2004; Peña *et al*, 2013). A cada uno de los cuatro monómeros de ADN (los nucleótidos adenina, guanina, citosina y timina) se marca con una molécula fluorescente diferente, se puede determinar rápidamente el orden de los nucleótidos. La secuenciación acoplada a métodos de reconstrucción computacional ha sido fundamental en la secuenciación de los genomas modelo de humanos, animales y plantas (Rentaria, 2006; Peña *et al.*, 2013).

### 3. JUSTIFICACIÓN

El crecimiento en la poblacional humana, ha traído como consecuencia el incremento en el requerimiento de alimentos vegetales libres de insecticidas, lo que ha impulsado la innovación en los sistemas de producción agrícola. Actualmente, los consumidores exigen productos cultivados responsablemente, además, los requisitos para la exportación son cada vez más rigurosos en cuanto a límites de residuos de insecticidas presentes en los vegetales se refiere. Una de las alternativas más promisorias para combatir las pérdidas causadas por los insectos plaga es *el control biológico* a través de su integración en un programa de MIP. En la última década, diversos programas fitosanitarios en agricultura protegida utilizan móridos zoofitófagos como depredadores con excelentes resultados. La mayoría de estos trabajos se han efectuado en el continente Europeo, donde se ha evaluado la reducción en la incidencia de organismos perjudiciales y su interacción con los cultivos a nivel fisiológico y otros enemigos naturales. En México, existen pocos estudios relacionados con móridos depredadores que presentan potencial como agentes de control biológico. Por lo tanto, en el presente estudio, se expone un amplio panorama para futuras investigaciones en el país explorando los efectos de móridos zoofitófagos dentro de sistemas productivos y de importancia económica.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 4.1 General**

Identificar a dos móridos depredadores, así como determinar la fecundidad, longevidad y efecto fitófago de uno de ellos sobre plantas de tomate.

### **4.2 Específicos**

- Identificar a dos especies de móridos depredadores a través de caracteres morfológicos y moleculares.
- Determinar la fecundidad y longevidad, bajo condiciones de laboratorio, de una de las especies determinadas previamente por caracteres moleculares.
- Evaluar el establecimiento, de una de las especies determinadas previamente por caracteres moleculares, en el cultivo de tomate bajo condiciones de invernadero.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Obtención y cría de los míridos

El 26 de abril de 2016 se colectaron ~100 individuos (ninfas y adultos) de, aparentemente, dos especies de míridos sobre plantas conocidas comúnmente como “torito” (*Proboscidea sinaloensis* Van Eselt) (Pedaliaceae) en el campo experimental de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS) (Km. 17.5 carretera Culiacán-El Dorado). Estos insectos se encontraban alimentándose de huevos y ninfas de la mosca blanca *B. tabaci*. Después de la colecta, los individuos de las dos especies de míridos se colocaron en frascos de plástico (150 mL de capacidad), los cuales se cubrieron con tela de organza y se transportaron al Laboratorio de Entomología Agrícola (LEA) del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF) de la Universidad Michoacán de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). En el laboratorio, los individuos se liberaron en una jaula de madera (45 × 65 × 45 cm) cubierta con tela organza que contenía en su interior, como sustrato de oviposición y fuente de agua, dos plantas de tomate tipo saladette (variedad Moctezuma) (~15 cm de altura). Las ninfas y los adultos se alimentaron con huevos de la palomilla de los cereales *Sitotroga cerealella* (Oliver) (Lepidoptera: Gelechiidae) (Bio-bich®, Uruapan, Michoacán, México) que se colocaron sobre cintas adhesivas (~5 cm de largo), mismas que a su vez, se colocaron sobre las hojas de las plantas de tomate. Cada cinco días, las plantas de tomate se retiraron de la jaula de cría y se colocaron en otras libres de insectos. El proceso de cría se realizó en condiciones de laboratorio (~24 °C, 56% de humedad relativa y un fotoperiodo de 12:12 h [luz: oscuridad]).

Dos meses después de la colecta de los insectos, y de acuerdo a las características morfológicas, cada especie de mírido se separó en una jaula de madera, como la descrita anteriormente, donde se mantuvieron sobre plantas de tomate y se alimentaron con huevos de *S. cerealella* + una solución de azúcar al 5%. La solución de azúcar se colocó en tubos de plástico tipo Falcon de 15 mL rellenos con algodón.

## **5.2 Identificación morfológica**

Con la ayuda de las claves taxonómicas de Ferreira *et al.* (2015), Ferreira y Henry (2011) y la guía para la identificación de míridos de interés en tomate de Goula y Alomar (1994), en el LEA del IIAF de la UMSNH se realizó la identificación morfológica preliminar de las dos especies de míridos colectadas en campo. Para la confirmación de la identificación, se enviaron 24 adultos (12 machos y 12 hembras) de cada especie al Dr. Thomas J. Henry (Systematic Entomology Laboratory, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture, National Museum of Natural History, Washington, D. C.). En la Colección de Enemigos Naturales del IIAF de la UMSNH se depositaron 10 hembras y 10 machos de ambas especies como material de referencia.

## **5.3 Identificación molecular**

### **5.3.1 Extracción de ADN genómico**

Para la identificación molecular, se utilizaron individuos provenientes de ambas especies desconocidas colectadas en el campo experimental de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Sinaloa. También se utilizaron individuos de las especies *E. varians* provenientes de colonias establecidas en el LEA del IIAF-UMSNH y del laboratorio de Ecotoxicología de Insectos de la Universidad Federal de Lavras, Brasil; así como de *E. modestus* provenientes de la cría de Koppert de México S.A de C.V. Querétaro, México. La extracción del ADN se realizó a partir de adultos (sin sexar). El origen, año de colecta, número de individuos procesados y técnicas de extracción se presentan en el cuadro 1. La extracción del ADN se realizó con base a las técnicas de Fitzsimmons (1997) y Doyle (1991). La primer técnica se diseñó para realizar la extracción de ADN de sangre de tortugas y se ha adaptado para su uso en peces e insectos del orden Odonata (Urbiola-Rangel y Chassin-Noria, 2013; Vega-Sánchez *et al.*, 2013); esta técnica, ha mostrado mejores resultados en muestras frescas. La segunda técnica se diseñó originalmente para extraer ADN de plantas y, posteriormente, se ha usado en otros organismos tales como hongos, bacterias y nematodos. Actualmente, esta última técnica se ha estandarizado para la extracción de ADN en insectos preservados en alcohol a 80% (Cubillos-Salamanca, 2017; Contreras-Rendón *et al.*, 2017).

**Cuadro 1.** Procedencia de adultos de la familia Miridae y técnica de extracción de ADN utilizada para la identificación molecular de las especies

Origen de los individuos	Año de colecta	Técnica de extracción/n	
		Fitzsimmons (1997)	Doyle (1991)
<b>Especie A</b>			
Campo experimental de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Sinaloa	2016	30	-
<b>Especie B</b>			
Campo experimental de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Sinaloa.	2016	30	15
<b><i>Engytatus varians</i></b>			
Cría del LEA del IIAF-UMSNH.	2015-2017	30	15
Laboratorio de Ecotoxicología de Insectos de la Universidad Federal de Lavras, Brasil.	2015	-	15
<b><i>Engytatus modestus</i></b>			
Koppert de México S.A de C.V. Querétaro, México.	2017	-	15

n, número de extracciones por técnica.

### 5.3.2 Descripción de las técnicas de extracción de ADN

*Extracción de ADN de acuerdo a la metodología de Fitzsimmons (1997).* En un tubo de 1.5 mL de plástico (Eppendor®, Hamburgo, Alemania) se colocó un adulto de la familia Miridae, se agregaron 300 µL de solución de extracción (50 mM de Tris HCl, 50 mM EDTA pH 8, 1% de SDS y 50 mM de NaCl) y se maceró con un micropistilo. Posteriormente, a cada muestra se le adicionaron 5 µL de proteinasa K (10 mg/mL) y se incubó por 90 minutos a 60 °C. Cada 15-20 min, la muestra se agitó manualmente durante 1 min para favorecer su desintegración. Después de este tiempo, cada muestra se lavó con 305 µL de fenol, se agitó suavemente y se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se recuperó y se colocó en un tubo de 1.5 mL, al cual se le agregó un volumen de la mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) como segundo lavado. Esta muestra se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min; el sobrenadante se colocó en otro tubo que contenía 150 µL de acetato de amonio al 7.5 M, se agitó suavemente y se mantuvo a -70 °C durante 20 min.

Posteriormente, la muestra se centrifugó a 13,000 rpm durante 20 min y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. Se agregó 1 mL de etanol al 95% a 4°C, se agitó manualmente y se colocó a -70 °C durante toda la noche. La muestra se centrifugó a 13,000 rpm por 20 minutos y se eliminó el etanol. Se agregaron 600 µL de etanol a 4°C al 70% y se centrifugó por 20 min a 13,000 rpm. El etanol se eliminó por decantación y se secó a 60 °C en incubadora por 20 min hasta eliminar el alcohol. El ADN se resuspendió en 20 µL de agua de grado molecular y se mantuvo a -20 °C hasta su uso.

*Extracción de ADN de acuerdo a la metodología de Doyle (1991):* el buffer de extracción (tris-HCL 10 mM PH 8; Na<sub>2</sub> EDTA, H<sub>2</sub>O 20 mM pH 8.0; NaCl 1.4 M) adicionado con CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) al 2% se calentó a baño María (80 °C) durante 10-15 min. En un tubo de 2 mL se colocaron 100 µL de esta solución y se introdujo un individuo preservado en etanol absoluto. Este individuo se maceró con un micropistilo y se agregaron 900 µL de buffer de extracción con CTAB. La muestra se colocó nuevamente

a baño María por 1 hora a 96°C y se agitó con vórtex cada 15 min para desintegrar el tejido. La muestra se centrifugó y el sobrenadante se colocó en un tubo de 1.5 mL. Se agregaron 500 µL de cloroformo-álcool isoamílico (24:1) y se agitó por inversión durante 10 min; se centrifugó a 11, 454 rpm por 10 min. La parte acuosa se extrajo y se vertió en un tubo limpio de 2 mL. Se agregaron 700 µL de cloroformo-álcool isoamílico (24:1) y se repitió el paso anterior. La parte acuosa o sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo de 1.5 mL con 950 µL de etanol 100% a -20 °C. Se mezcló suavemente y se dejó en refrigeración durante toda la noche a -20 °C. Se centrifugó a 11,454 rpm por 30 min y el sobrenadante se decantó.

La pastilla se resuspendió en 400 µL de agua ultra pura usada en la analítica High Performance Liquid Chromatography (HPLC, por sus siglas en inglés) y se incubó a 55 °C por 15 min. Se añadieron 34 µL de acetato de sodio al 3M y 1 mL de etanol al 95% (-20 °C) y se refrigeró por 1 hora a -20 °C. La pastilla se centrifugó por 5 min a 11,454 rpm y nuevamente se decantó el sobrenadante. Para limpiar la pastilla de ADN, se hicieron dos lavados con 600 µL de isopropanol al 70% y se centrifugó a 11,454 rpm. Se decantó y dejó secar a temperatura ambiente por 1 hora. La pastilla se resuspendió en 20 µL de agua HPLC y se conservó a -20 °C hasta su uso.

### **5.3.3 Cuantificación del ADN genómico**

Las extracciones realizadas por la técnica de Fitzsimmons (1997) se examinaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% con un amortiguador de corrida TBE (89 mM Tris, mM ácido bórico, 2.5 mM EDTA, pH 8.3). Por cada 20 mL de agarosa se agregaron 2 µL de SYBR® Green (Thermo Fisher Scientific Inc., *Waltham, MA*, Estados Unidos de América). Después de la electroforesis, los geles se visualizaron y capturaron en un sistema de fotodocumentación EAGLE EYE II (Stratagene®, Massachusetts, Estados Unidos de América).

Las extracciones realizadas por la técnica de Doyle (1991) se analizaron en un gel de agarosa teñido con GelRed® (Biotium, Alameda, CA) y se observaron bajo un

trasluminador de rayos UV (Infinity-3026 WL/LC/26MX VilberLourmat<sup>®</sup>, Eberhardzell, Alemania) y un marcador molecular de 1 kb (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las extracciones se validaron por la cuantificación de la concentración del ADN en ng/μl, evaluando su pureza por medio de la relación (A260/A280).

### 5.3.4 Amplificaciones del gen Citocromo oxidasa

La amplificación parcial del gen mitocondrial COI se llevó a cabo a través de la PCR. Los cebadores específicos que se utilizaron para invertebrados se diseñaron con base a los estudios de Folmer *et al.* (1994) (Cuadro 2).

**Cuadro 1.** Secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación parcial del gen COI, acuerdo con Folmer *et al.* (1994).

Orientación y nombre del cebador	Secuencia del cebador	Tamaño de fragmento esperado (pb)
Forward LCO Cebador de inicio	5'GGTCAACAAATCATAAGATATTGG3'	658
Reverse HCO Cebador de término	5'TAAACTTCAGGCTGACCAAAAAATCA 3'	658

### 5.3.5 Condiciones de amplificación

*Técnica de Fitzsimmons* (1997): para la reacción de la PCR se utilizaron los siguientes componentes para un volumen final de 25 μL: 200 μM de dNTP's, 3.5 mM de MgCl<sup>2</sup>, 0.5 μM de cada primer, 2 Ude Taq polimerasa, 2.5 μL de buffer 10 X (100 Mm Tris, 500 mM KCl; pH 8.4), 50 μg/mL BSA y 20 a 60 ng de ADN. El proceso de amplificación fue el siguiente: 94 °C por 3 min como desnaturalización inicial, seguido de 35 ciclos a 94 °C 1 min, 40 °C 1 min (para alineamiento), 72 °C por 1 min y extensión final de 72 °C durante 5 min.

*Técnica de Doyle (1991)*: la concentración y calidad de ADN se midió bajo un espectrofotómetro NanoDrop 2000c® (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos de América). Para la reacción de PCR se utilizaron los siguientes componentes para un volumen final de 15 µL: 0.8 mM de dNTPs, 20 pmol de cada primer, 2 unidades de Platinum Taq ADN Polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA), 1x PlatinumTaq ADN polimerasa buffer y 60 ng de ADN. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 94 °C por 4 min, seguido de 35 ciclos de 92 °C 2 min, 45 °C 1 min (para alineamiento), 72 °C 1 min y extensión final de 72 °C durante 5 min. Las amplificaciones se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% con el mismo equipo y marcador molecular descrito anteriormente. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su secuenciación.

### **5.3.6 Secuenciación de productos de la PCR y análisis**

Todas las amplificaciones se secuenciaron en ambas direcciones por el método de Sanger (1975). Las reacciones de PCR obtenidas por la técnica de Fitzsimmons (1997) se enviaron a la empresa MacroGen (Rockville, Maryland, Estados Unidos de América). El segundo bloque de amplificaciones a través de la extracción con la técnica de Doyle (1991) se secuenciaron en el Departamento de Genética del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillos, Estado de México, México.

Las secuencias se ensamblaron y se editaron en el programa BioEdit versión 7.0.5 y se compararon con la ayuda del programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés). Las similitudes entre secuencias biológicas se exploraron en la base de datos del GenBank. Posteriormente, se construyó un árbol de distancias tipo NJ. Para ello, se seleccionaron 16 secuencias de la tribu Dicyphini de la familia Miridae identificadas hasta especie y disponibles en la base de datos del GenBank (Cuadro 3). El criterio de selección de las secuencias fue el tamaño (rango entre 625-726 pb). Estas secuencias se sometieron a un alineamiento con el programa MEGA7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis versión 7.0) (Tamura *et al.*, 2015), en donde se agruparon dentro de la tribu antes señalada.

**Cuadro 2.** Relación de las especies de la familia Miridae seleccionadas con su respectiva clave de acceso en el GenBank y número de pares de bases.

Clave de acceso	Especie	Pares de bases (pb)
KT598371.1	<i>Nesidiocoris tenuis</i>	726
ALR96507.1	<i>Nesidiocoris tenuis</i>	726
KM022848.1	<i>Macrolophus pygmaeus</i>	658
FM210177.1	<i>Macrolophus caliginosus</i>	658
KR578158.1	<i>Macrolophus tenuicornis</i>	658
KM022470.1	<i>Macrolophus rubi</i>	658
KR032838.1	<i>Tupiocoris agilis</i>	658
KR044999.1	<i>Tupiocoris confusus</i>	658
HQ106443.1	<i>Tupiocoris californicus</i>	658
HQ106445.1	<i>Tupiocoris rubi</i>	658
KR035861.1	<i>Tupiocoris similis</i>	658
KR583969.1	<i>Dicyphus discrepans</i>	658
KJ541563.1	<i>Dicyphus globulifer</i>	658
KM022250.1	<i>Dicyphus errans</i>	658
KM022312.1	<i>Dicyphus pallidus</i>	658
KM022434.1	<i>Dicyphus epilobii</i>	658
KR044361.1	<i>Dicyphus famelicus</i>	658

#### 5.4 Fecundidad y longevidad, en condiciones de laboratorio, de una de las especies determinadas molecularmente

Los adultos utilizados en este experimento se obtuvieron de la siguiente forma. De la cría previamente establecida y mantenida en el laboratorio se separaron 100 ninfas de cuarto y quinto instar, las cuales se liberaron en una jaula de madera (45 × 65 × 45 cm) cubierta con tela organza que contenía tres plantas de tomate. Estas ninfas se alimentaron con huevos de *S. cerealella* + una solución de azúcar al 5%, como se describió anteriormente. Después de la emergencia, los adultos se mantuvieron en esta misma jaula durante cinco días con el fin de asegurar su apareamiento. En un vaso de plástico transparente (0.5 L de capacidad) se colocó una sección apical del tallo (~10 cm) de una planta de tomate tipo saladette (variedad Moctezuma) que contenía 1-2 hojas en desarrollo. Para evitar la deshidratación, la base de la sección del tallo de tomate se introdujo en un tubo de plástico (7 mm de

diámetro × 5.5 cm de altura) que contenía una solución nutritiva al 5% de Steiner (1984) (Dimas 2017). Este tubo de plástico se sujetó con plastilina a la base del vaso de plástico y se cubrió con algodón. El vaso de plástico se cubrió con tela de organza para evitar el escape de los insectos y favorecer la aireación. Posteriormente, se introdujeron 2 machos + 1 hembra (5 días de edad) de *E. varians* (= a una repetición), los cuales se alimentaron con huevos de *S. cerealella* dispuestos sobre 1cm<sup>2</sup> de cinta adhesiva de doble cara (Truper®, Jilotepec de Abasolo, México) que se colocó en la parte media de la pared del vaso. También se les ofreció una solución de azúcar al 5% en un tubo Eppendor® de 1.5 mL relleno con algodón, el cual se sujetó, de forma invertida, de la pared del vaso.

Los adultos del depredador se transfirieron, cada cuatro días, a un nuevo vaso de plástico con una nueva sección apical de tallo de tomate hasta su muerte. Las plantas de tomate ovipositadas se conservaron en condiciones de laboratorio (~25 °C, 56% de humedad relativa [HR] y un fotoperiodo de 12:12 h [luz: oscuridad]). La solución nutritiva se reemplazó cuando fue necesario. Se realizaron 20 repeticiones. Después de 7 días de oviposición, las plantas se observaron cada 24 h hasta el 18° día y se contabilizó el número de ninfas emergidas. Las hembras de diversas especies de míridos depredadores, entre ellas *E. varians*, ovipositan endofíticamente; es decir, insertan sus huevos en los tallos de la planta, peciolo y nervaduras principales de las hojas (Pineda *et al.*, 2016). Por lo tanto, para determinar la fecundidad acumulada, durante toda la vida, de las hembras de este depredador, en este estudio se consideró el número de ninfas emergidas/hembra, como fue reportado por Silva *et al.* (2016) y Mena-Mociño (2016) para esta misma especie de depredador. Para determinar la longevidad, las hembras y machos se observaron cada 24 h hasta su muerte.

## **5.5 Evaluación de la fitofagia**

### **5.5.1 Condiciones experimentales y prácticas del cultivo de tomate**

Este experimento se realizó en un cultivo de tomate tipo saladette (variedad Moctezuma) en un invernadero (69 × 24 m) comercial y demostrativo del Centro de Desarrollo Tecnológico (CDT) del Fideicomiso Instituido en Relación a la Agricultura (FIRA) ubicado en Morelia,

Michoacán. Este invernadero es de tecnología media debido a que cuenta con un sistema de riego semiautomatizado, su apertura y cierre de cortinas es de forma mecánica por accionamiento manual y está cubierto con plástico de polietileno y malla antiáfidos.

### 5.5.2 Descripción del experimento

El experimento inició el 4 de julio de 2017, cuando las plantas de tomate tenían 50 días después del trasplante. Las plantas se encontraban distribuidas en 14 hileras, cada una con 144 plantas separadas, entre sí, por 40 cm. La separación entre hileras fue de 1.1 m.

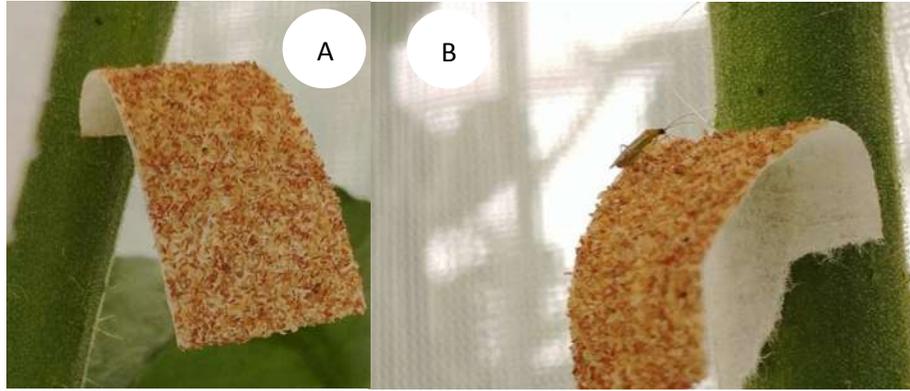
El daño causado por *E. varians* se evaluó, separadamente, con hembras y machos bajo dos tratamientos: sin alimento y con alimento a base de huevos de *S. cerealella*. Para ello, se seleccionó el tercer racimo de flores de la planta de tomate, el cual se cubrió con una jaula cilíndrica (60 cm de diámetro × 35 cm de largo), hecha a partir de dos aros de plástico y dos varillas de madera como soporte. Esta jaula se cubrió con tela de organza para evitar el escape de los insectos (Figura 3). Los extremos de la jaula se encontraban abiertos con el fin de colocarse alrededor de los tallos de las plantas de tomate. Posteriormente, se liberaron 3 machos o 3 hembras ( $\leq 5$  días de edad), presumiblemente apareados. El racimo de flores estaba conformado, en promedio, por siete flores, un fruto en etapa de desarrollo comúnmente conocida como “canica” (~1 cm de diámetro) y un fruto desarrollado (~4 cm de diámetro). Las jaulas se sujetaron, de cada extremo, al tallo de la planta de tomate con una cuerda de polietileno.

Los huevos de *S. cerealella* que se les ofreció a los machos o hembras de *E. varians* se colocaron sobre un recuadro (2 cm<sup>2</sup>) de cinta adhesiva (Scotch Brand®, Minneapolis, Estados Unidos de América), la cual se sujetó, de uno de sus extremos, al tallo de la planta de tomate (Figura 4). El alimento se reemplazó cada cuatro días hasta la muerte de los individuos. Se realizaron ocho repeticiones por tratamiento y testigo, en el cual no se liberaron insectos (testigo 1). Una repetición consistió de una jaula que incluyó a 3 machos o 3 hembras de *E. varians* con o sin alimento. Para descartar el efecto de las jaulas sobre el desarrollo de los frutos, también se incluyó un tratamiento, considerado como testigo 2, en

el cual el racimo de flores no se cubrió con la jaula antes descrita. El experimento se instaló únicamente en cuatro hileras del invernadero, como se esquematiza en la Figura 5. Durante la evaluación, las temperaturas mínima y máxima fueron entre 10-28 y 36-41 °C, respectivamente, mientras que las HR mínima y máxima fueron entre 29.4-38.7 y entre 74.87-97.4%, respectivamente.

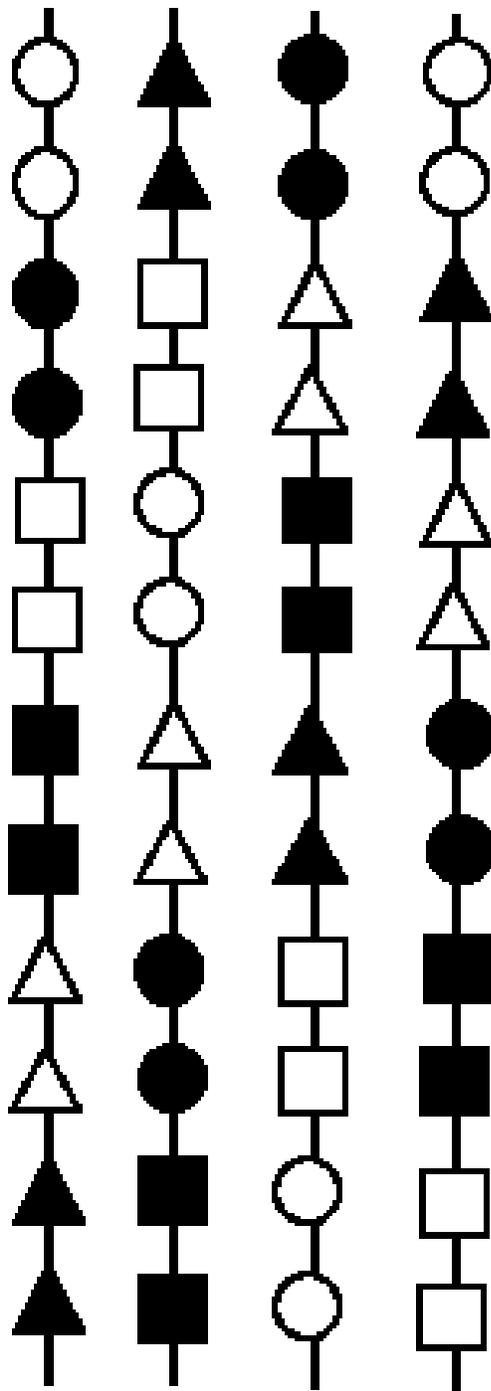


**Figura 3.** Jaula instalada alrededor del tercer racimo de la planta de tomate en condiciones de invernadero para evaluar el daño ocasionado por los adultos de *Engytatus varians*



**Figura 4.** A) Cinta adhesiva, sujeta al tallo de la planta de tomate, con huevos de *Sitotroga cerealella*. B) Hembra de *Engytatus varians* alimentándose de los huevos de *Sitotroga cerealella*.

Seis días antes del inicio del experimento (28 de junio del 2017) se realizó una aplicación de 110 mL del insecticida-acaricida botánico Biodie® (3.50% de argemonina, un alcaloide extraído de la planta *Argemone mexicana* L.; Promotora Técnica Industrial, Jiutepec, Morelos, México) + 30 mL del adherente dispersante Prolux Ultra® (Promotora Técnica Industrial, Jiutepec, Morelos, México), disueltos en 150 L de agua, contra el ácaro *Tetranychus urticae* Koch. En esta misma mezcla se adicionaron 110 mL del fungicida comercial Velonil® (52% de clorotalonil; Velsimex, Ciudad de México, México), como preventivo para el oomicete *Phytophthora infestans* (Mont.) y el hongo *Fusarium oxysporum* Schltdl. A los diez días después del inicio del experimento (14 de julio del 2017) se aplicaron 300 mL del fungicida-acaricida Tools® (52% de azufre elemental; Valent, Ciudad de México, México) + 5 mL Engeo® (12.62% de tiametoxam + 9.49% de lambda cyalotrina; Syngenta Agro, San Luis Potosí, México) + 30 mL del adherente dispersante antes mencionado, disueltos en 300 L de agua, contra las moscas blancas *B. tabaci* y *T. vaporariorum*, el psílido de la papa *B. cockerelli*, el pulgón del durazno *M. persicae* y los ácaros *T. urticae* y *A. lycopersici*.



**Figura 5.** Distribución de los tratamientos utilizados para evaluar el daño ocasionado por los adultos de *Engytatus varians* sobre las plantas y frutos de tomate. Hembras con alimento ○, hembras sin alimento ●, machos con alimento △ machos sin alimento ▲, testigo 1 ■ y testigo 2 □

Esta mezcla de compuestos se aplicó dos veces más, durante el experimento con intervalos de 10 días (24 de julio y 03 de agosto de 2017). Las aplicaciones se realizaron con una aspersora de motor tipo parihuela. Para favorecer la polinización, se realizaron dos liberaciones del abejorro *Bombus impatiens* Cresson (Hymenoptera: Apidae) (Natupol®, Koppert, Querétaro, México); la primera el 7 de junio y la segunda el 9 de agosto de 2017. Por cada 1,250 m<sup>2</sup> se colocó una colmena de abejorros, compuesta por una reina y 80 obreras.

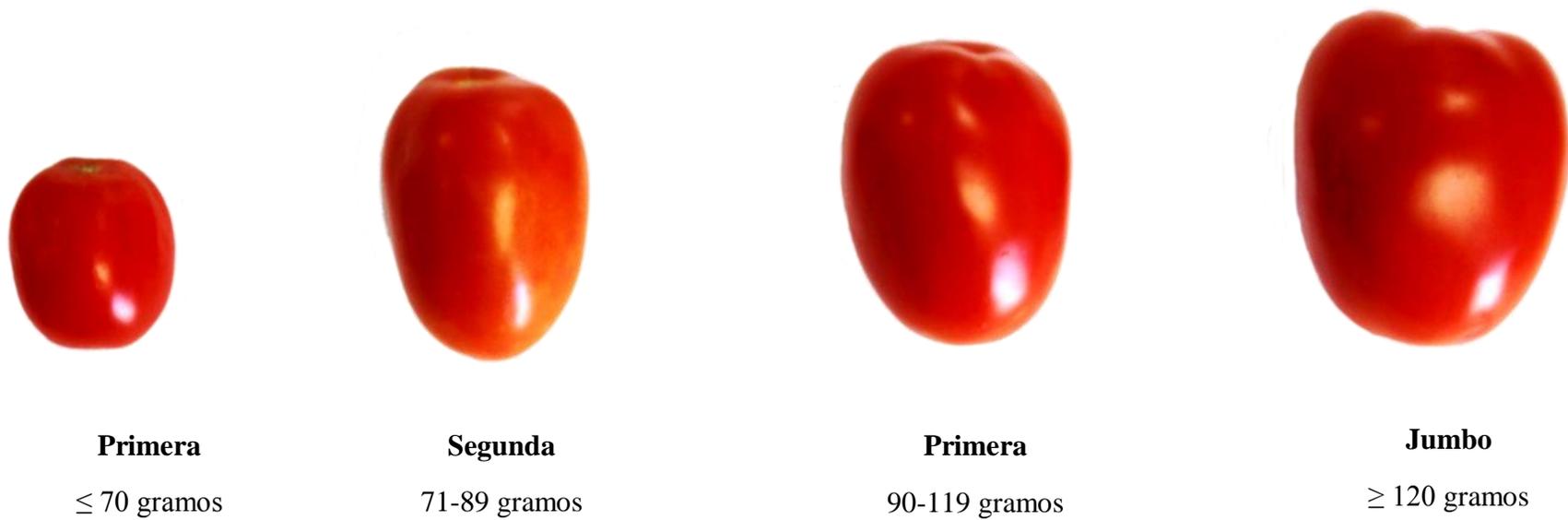
Las plantas de tomate se fertilizaron, con la solución nutritiva de macronutrientes (Ca [NO<sub>3</sub>]<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, KNO<sub>3</sub> y K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (Steiner, 1984) y micronutrientes (hierro, manganeso, boro, zinc, cobre y molibdeno) (Kelatex-Multi®, San Nicolás de Los Garza, Nuevo León, México), cada 1.5 h durante 3 min a través de riegos por goteo. Sin embargo, la frecuencia y duración de estos riegos dependió de las condiciones diarias de temperatura y humedad. Con el fin de optimizar el uso del agua, el sistema de riego es cerrado y con recuperación de la solución nutritiva.

Las plantas de tomate se condujeron a dos tallos. Cuando tenían 45 días de edad se trasplantaron en bolsas de plástico negro bicapa (50 x 50 cm) con protección hacia los rayos UV. El sustrato empleado consistió de una mezcla de vermiculita y tezontle (1:1) granulometría de 50% de partículas finas y 50% de partículas gruesas con una aireación de 27%. Después de 10 días del trasplante (~35 cm de altura), las plantas se tutoraron con una cuerda de polietileno que se sujetó al alambre de tutorado. El tutorado y la eliminación de brotes laterales se realizaron una vez por semana. La eliminación de hojas senescentes, así como las hojas basales, se realizó en función de la definición del primer racimo de frutos; posteriormente, conforme al requerimiento de las plantas. Con el fin de homogenizar el calibre de los frutos, también se eliminaron los frutos malformados, lo que se conoce comúnmente como raleo de frutos. Cuando las plantas desarrollaron el quinto racimo de frutos se inclinaron sobre el sustrato para favorecer su desarrollo.

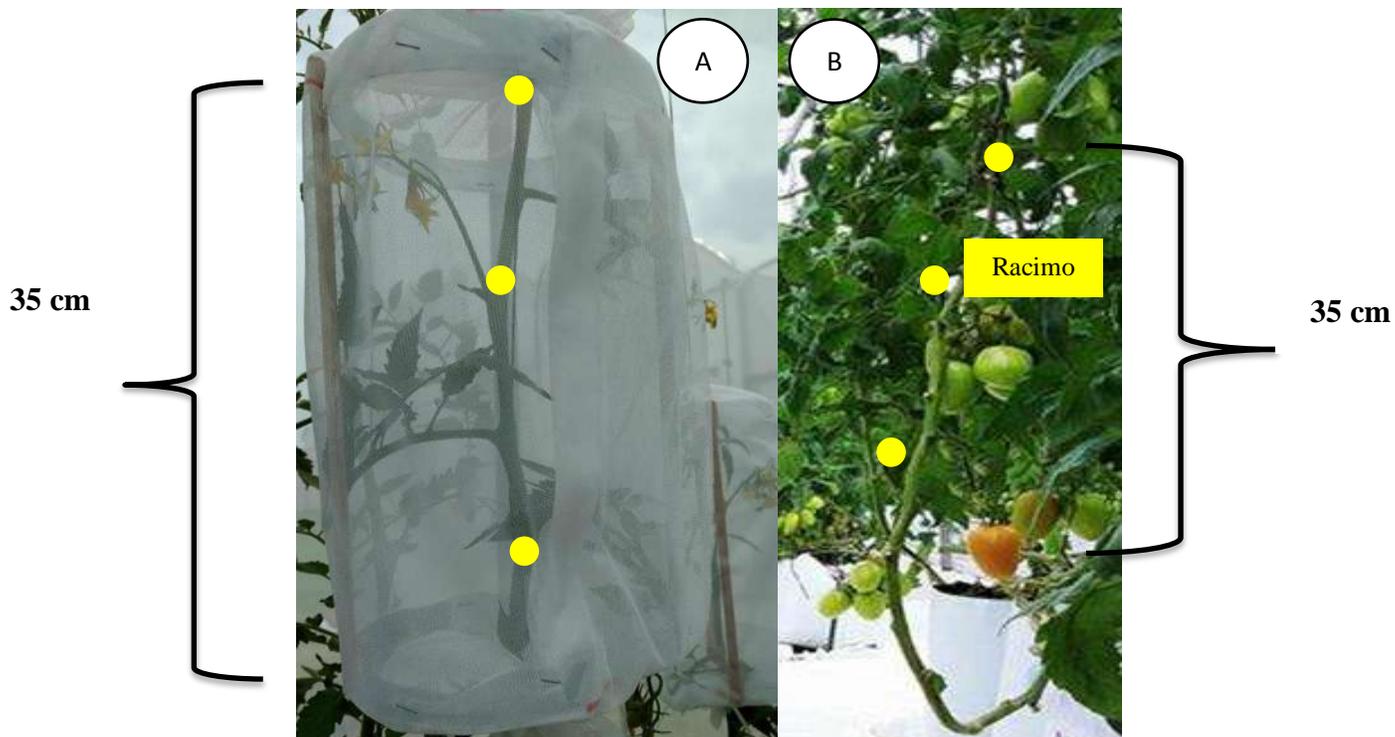
## 5.7 Evaluaciones

Para evaluar la longevidad, las hembras y machos de *E. varians* presentes en las jaulas de los tratamientos ensayados se observaron cada 24 h hasta su muerte. También se determinó la descendencia, la cual se consideró como el número de ninfas emergidas en los tratamientos que contenían hembras con alimento y hembras sin alimento. Para evaluar los efectos causados por los adultos de *E. varians* sobre las plantas de tomate, se observaron diariamente los tallos y los frutos. Se registró el número de anillos necróticos en tallos y punturas en los frutos ocasionadas por la alimentación de los adultos de *E. varians*, con base a lo reportado por Calvo y Urbaneja (2003) para *N. tenuis* (ver Figura 2). Los frutos de tomate se cosecharon cuando presentaron la madurez comercial ( $\geq 90\%$  de color rojo), se pesaron individualmente en una balanza de precisión (Scout® Pro 200, Ohaus, Nueva Jersey, Estados Unidos de América) y posteriormente se clasificaron en cuatro categorías, con base a su peso en gramos (Figura 6): Chico ( $\leq 70$  gramos), Segunda (71-89 gramos), Primera (90-119 gramos) y Jumbo ( $\geq 120$  gramos). Lo anterior según la categoría comercial propuesta por el CDT-FIRA (adaptado de la Norma Mexicana para hortalizas frescas [tomate] NMX-FF-031-1982) (<http://www.economia-nmx.gob.mx>). También se registró el número total de frutos por cada una de estas categorías en cada tratamiento, así como el rendimiento promedio en gramos en cada cosecha. Con el fin de conocer el posible efecto de los adultos de *E. varians* sobre la calidad de los frutos, también se determinó, con un refractómetro (Ade Advanced Optics® Oregon, Estados Unidos de América) y a través de la escala de grados Brix ( $^{\circ}\text{Bx}$ ), el contenido de azúcares disueltos en los frutos de tomate provenientes de la primera y cuarta cosecha. Para ello, se eligió al azar un fruto de tomate de cada tratamiento de estas cosechas y, con una pipeta Pasteur de 3 mL (HYLA, S.A. de C.V., México, México), se extrajeron 0.5 mL de jugo del centro del fruto de tomate. La determinación de los  $^{\circ}\text{Bx}$  de los frutos de tomate se realizó, en el mismo fruto, en dos tiempos en cada una de ambas cosechas; la primera el día de la cosecha y la segunda 10 días después de la misma. Durante este tiempo, los frutos se mantuvieron a 4 °C.

El jugo de tomate se colocó sobre el prisma del refractómetro y posteriormente se observó, a través del ocular la escala Brix por refracción, mostrando en porcentaje la concentración de azúcares disueltos. Finalmente, después de las cosechas de los frutos de tomate se midió el diámetro del tallo en tres puntos diferentes (Figura 7), donde se ubicaron las jaulas, así como en el testigo 2.



**Figura 6.** Clasificación de las categorías comerciales propuesta por el CDT-FIRA, con base al peso en gramos de los frutos de tomate



**Figura 7.** Medición del diámetro del tallo de la planta de tomate. Los círculos de color amarillo indican el sitio de registro del diámetro del tallo en tres diferentes puntos (alto, medio y bajo). A) Tratamiento dentro de jaulas B) Tratamiento de racimo libre. El racimo de frutos se consideró como referencia para los registros de los datos (aproximadamente 35 cm entre cada punto de registro).

## 5.8 Análisis de datos

Los datos de la longevidad de machos y hembras de *E. varians* obtenidos en condiciones de laboratorio, así como los de la descendencia de las hembras en condiciones de invernadero se analizaron a través de la prueba *t* de Student. Los datos de longevidad de hembras y machos en condiciones de invernadero, el número de frutos por racimo, concentración de azúcares disueltos (°Bx) en los frutos de tomate y diámetro de los tallos se analizaron a través del procedimiento de modelos lineales generalizados (GLM). El peso de los frutos de tomate se evaluó con un análisis multifactorial de tres niveles (peso, número de cosecha y tratamientos). Todas las pruebas estadísticas se analizaron con el programa SAS® (SAS/STAT versión 9.3; SAS Instituto, Cary, NC). Las diferencias entre medias se separaron con la prueba de diferencias mínimas significativas (LSD,  $P < 0.05$ ).

## 6. RESULTADOS

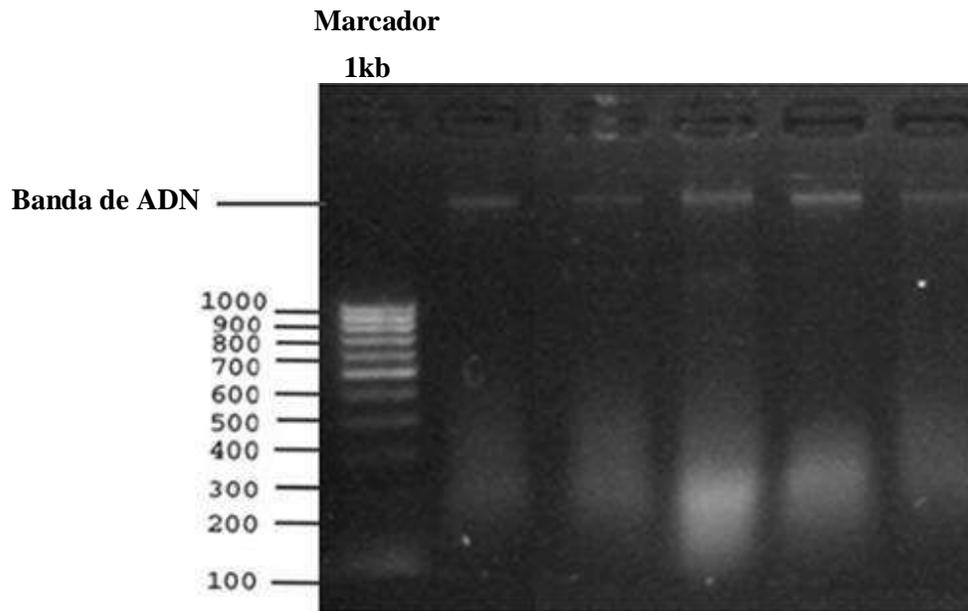
### 6.1 Identificación morfológica

De acuerdo a las claves taxonómicas de Ferreira *et al.* (2015), Ferreira y Henry (2011) y la guía para la identificación de mirmidos de interés en tomate de Goula y Alomar (1994), la identidad de los especímenes colectados en campo corresponde a *N. tenuis* y *Engytatus* sp. El especialista en la familia Miridae corroboró la identificación de la especie *N. tenuis* y determinó a la segunda como *E. varians*.

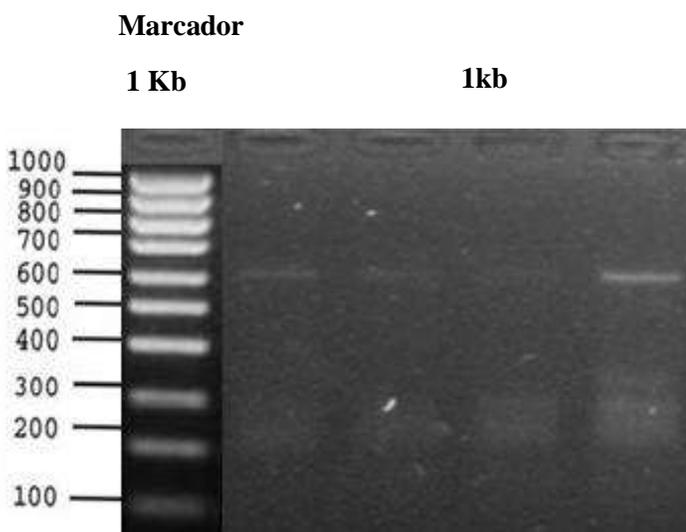
### 6.2 Identificación molecular

#### 6.2.1 Extracción y Amplificación

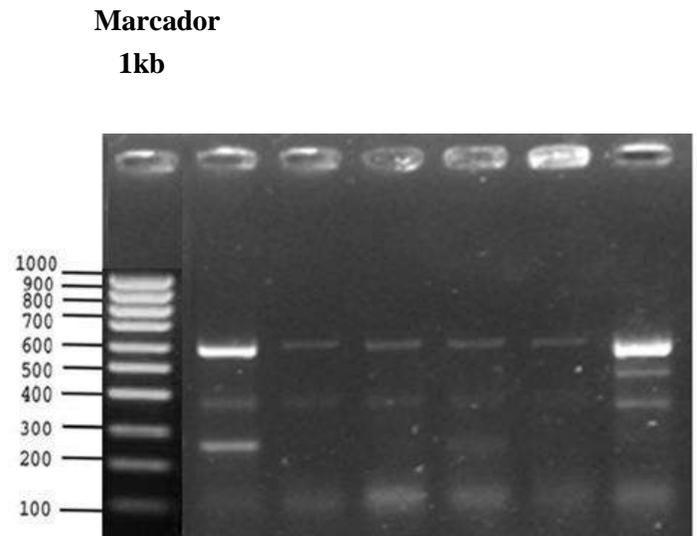
El ADN genómico extraído por el protocolo de Fitzsimmons (1997) se comprobó a través de la electroforesis en gel de agarosa (Figura 8), mostrando bandas de calidad cercana a los 20 y 40 ng/μl. Por otro lado, con la técnica de Doyle (1991) se obtuvieron concentraciones de ADN en un rango de 15 a 261.8 ng/μl, las cuales se corroboraron con la relación de absorbancia A260/280. Estas muestras de ADN se diluyeron a 20 ng/μl para usarse en las amplificaciones por PCR. Con los cebadores LCO 1490 y HCO 2198 (Folmer *et al.*, 1994) se amplificaron fragmentos de ~600 pares de bases (pb) en ambas técnicas (Figuras 9) que corresponde con el tamaño esperado de la región (658 pb). Sin embargo, las amplificaciones realizadas con el ADN precipitado por el método Doyle (1991) generaron bandas indeterminadas de menor longitud al fragmento esperado (Figura 10) que requirieron un lavado extra con el kit ExoSap-IT® (Thermo Fisher Scientific Inc, California, Estados Unidos de América). Previo a la secuenciación, la limpieza de las amplificaciones del ADN del método de Fitzsimmons (1997) se solicitaron de acuerdo a los estándares de la empresa MacroGen (Rockville, Maryland, Estados Unidos de América).



**Figura 8.** Bandas de ADN por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de las extracciones por el protocolo de Fitzsimmons (1997). La banda izquierda contiene el marcador molecular (1Kb).



**Figura 9.** Amplificaciones a partir de ADN por protocolo de Fitzsimmons (1997). El tamaño de la banda se ajusta al fragmento esperado de ~ 650 pares de bases.



**Figura 10.** Amplificaciones de ADN con la técnica de Doyle (1991). Se muestran bandas indeterminadas de menor longitud e intensidad que el fragmento esperado.

### 6.2.2 Secuencias de COI

Se obtuvieron quince secuencias de las tres especies de mիրidos (Cuadro 4). Seis reacciones de PCR se enviaron a la empresa MacroGen; tres productos de PCR pertenecían a la especie determinada morfológicamente como *N. tenuis* y las otras tres al mիրido identificado como *Engytatus* sp. (ambas colectadas en el campo experimental de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Sinaloa). De estas amplificaciones se obtuvieron secuencias con longitudes de 683 a 691 pb. En el Colegio de Postgraduados (COLPOS), Campus Montecillos, Texcoco, Estado de México, se secuenciaron 16 amplificaciones. De éstas solo se consiguieron nueve secuencias; cuatro pertenecieron a *E. varians* de la cría del LEA del IIAF-UMSNH, dos a *E. varians* del Laboratorio de Ecotoxicología de Insectos de la Universidad Federal de Lavras, Brasil y tres a *E. modestus* de Koppert de México S. A de C. V., Querétaro, México. Las longitudes de estas secuencias estuvieron comprendidas entre 686 a 717 pb.

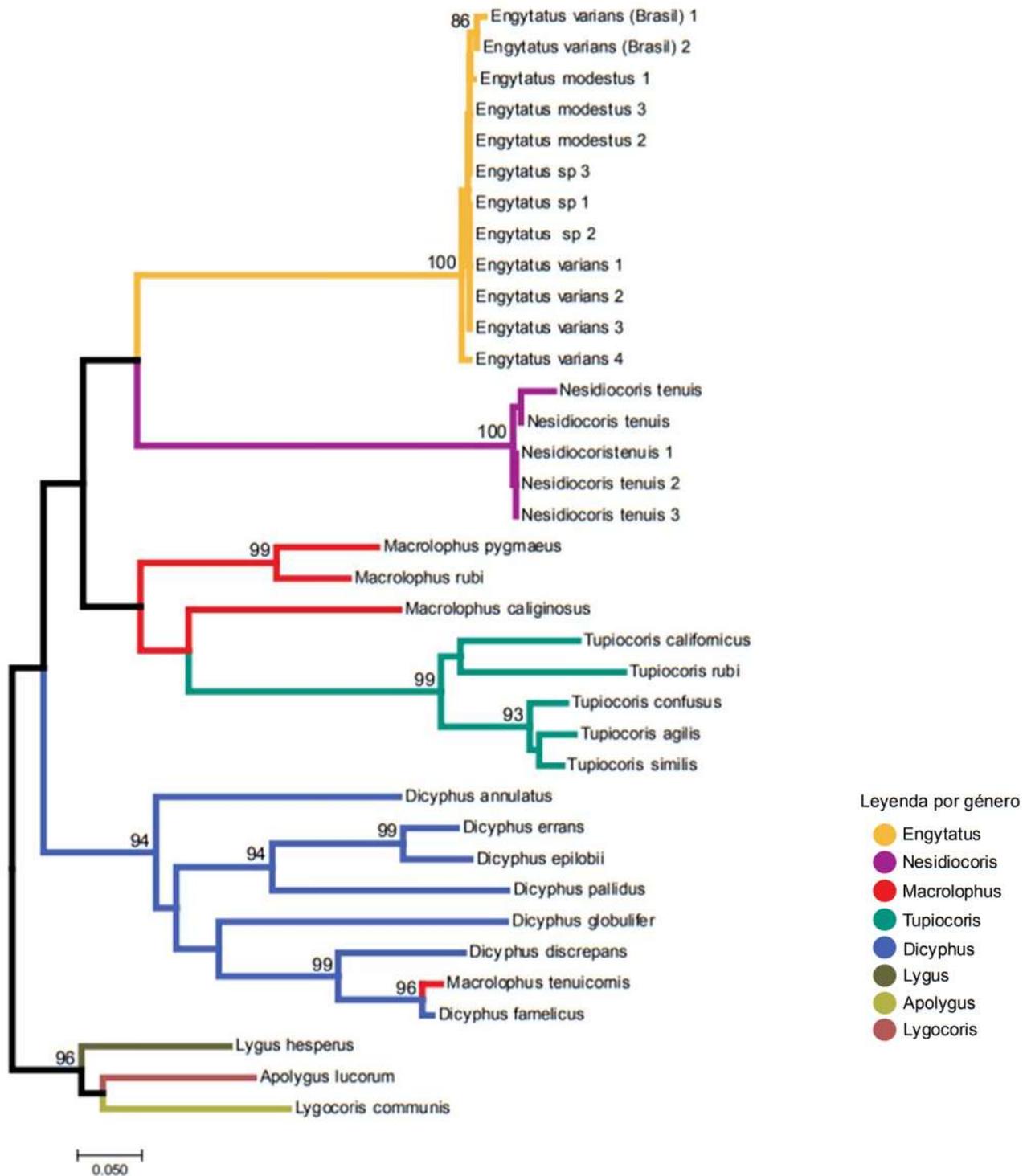
**Cuadro 4.** Etiqueta correspondiente a la identificación morfológica, origen de colecta, lugar de secuenciación y tamaño de la secuencia obtenida.

<b>Etiqueta de la Secuencia</b>	<b>Origen de los individuos</b>	<b>Centro de secuenciación</b>	<b>Tamaño (pb)</b>	
<i>Nesidiocoris tenuis</i>	Campo experimental de la Facultad de	Macrogen	691	
<i>Nesidiocoris tenuis</i>	Agronomía de la Universidad Autónoma de		684	
<i>Nesidiocoris tenuis</i>	Sinaloa		688	
<i>Engytatus</i> sp. 1	Campo experimental de la Facultad de	Macrogen	688	
<i>Engytatus</i> sp. 2	Agronomía de la Universidad Autónoma de		683	
<i>Engytatus</i> sp. 3	Sinaloa.		683	
<i>Engytatus varians</i> 1	LEA del IIAF-UMSNH	COLPOS	717	
<i>Engytatus varians</i> 2			686	
<i>Engytatus varians</i> 3			684	
<i>Engytatus varians</i> 4			686	
<i>Engytatus varians</i> 1(Brasil)	Laboratorio de Ecotoxicología de Insectos	COLPOS	716	
<i>Engytatus varians</i> 2(Brasil)	Universidad Federal de Lavras, Brasil.		710	
<i>Engytatus modestus</i> 1	Koppert de México S.A de C.V. Querétaro,	COLPOS	702	
<i>Engytatus modestus</i> 2			México	714
<i>Engytatus modestus</i> 3				717

Las secuencias se compararon por medio del programa BLAST con las 7,759 secuencias disponibles para COI de la familia Miridae en el GenBank. Las tres secuencias derivadas de la especie identificada morfológicamente como *N. tenuis* coincidieron en más del 98% con

las secuencias de esta misma especie. Las doce secuencias restantes no tuvieron coincidencias en la búsqueda de identidades.

Como en la base de datos del Genbank no existen secuencias del gen COI o de otro marcador molecular para el género *Engytatus*, las secuencias de la especie *E. varians* provenientes de la cría del LEA-IIAF-UMSNH sirvieron como referencia para este género. Se construyó el árbol de distancias tipo NJ con las 20 secuencias seleccionadas de la base de datos y se incluyó como grupo externo a tres miembros de la tribu Mirinii, tomando como referencia el trabajo de Jung y Lee (2011): *Lygus hesperus* (Knight) (658 pb), *Lygocoris communis* Knight (658 pb) y *Apolygus lucorum* (Meyer-Dür) (658 pb) (Figura 11). La topología del árbol muestra a doce secuencias en un grupo monofilético que se recupera el 100% de las réplicas. Estas secuencias pertenecen a las chinches determinadas morfológicamente como *Engytatus* sp. (Campo experimental de la Facultad de Agronomía UAS), *E. varians* (LEA-IIAF- UMSNH y Laboratorio de Ecotoxicología de Insectos de la Universidad Federal de Lavras, Brasil) y *E. modestus* (Koppert de México S.A de C.V. Querétaro, México). Las tres secuencias obtenidas de los míridos determinados morfológicamente como *N. tenuis* se agruparon en aquellas que se seleccionaron del GenBank para esta especie, formando también un clado monofilético recuperado con un coeficiente de 100% las 700 réplicas por bootstrap a las que fue sometido el análisis. Las especies seleccionadas del género *Macrolophus* no se agruparon en el mismo clado. La especie *Macrolophus tenuicornis* Fieber se traslapó con el grupo constituido por miembros del género *Dicyphus* y se recuperó el 95% con *Dicyphus famelicus* (Uhler), mientras que el resto, aparece más cercano al género *Tupiocoris*. El grupo externo constituido por los tres miembros de la tribu Mirinii es apropiado para esta aproximación, otorgando una raíz sólida y diferenciada al árbol, con 95% de recuperación de replicas.



**Figura 11.** La relación se infirió utilizando el método Neighbor-Joining. Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de ramificación = 3.46069633. El porcentaje de árboles replicados en el que los taxones asociados se agrupan en la prueba de bootstrap (700 réplicas) se muestran junto a las ramas. El árbol está dibujado a escala, con longitudes de rama en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de máxima verosimilitud compuesta y están en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. El análisis involucró 36 secuencias de nucleótidos del gen mitocondrial Citocromo oxidasa subunidad I (COI). Las posiciones de los codones incluidos fueron 1st + 2nd + 3rd + Non coding. Se eliminaron todas las posiciones que contenían gaps y datos faltantes. Hubo un total de 614 posiciones en el conjunto de datos final (MEGA7).

Complementario al análisis de distancias tipo NJ, se construyó un árbol por inferencia bayesiana (Anexo).

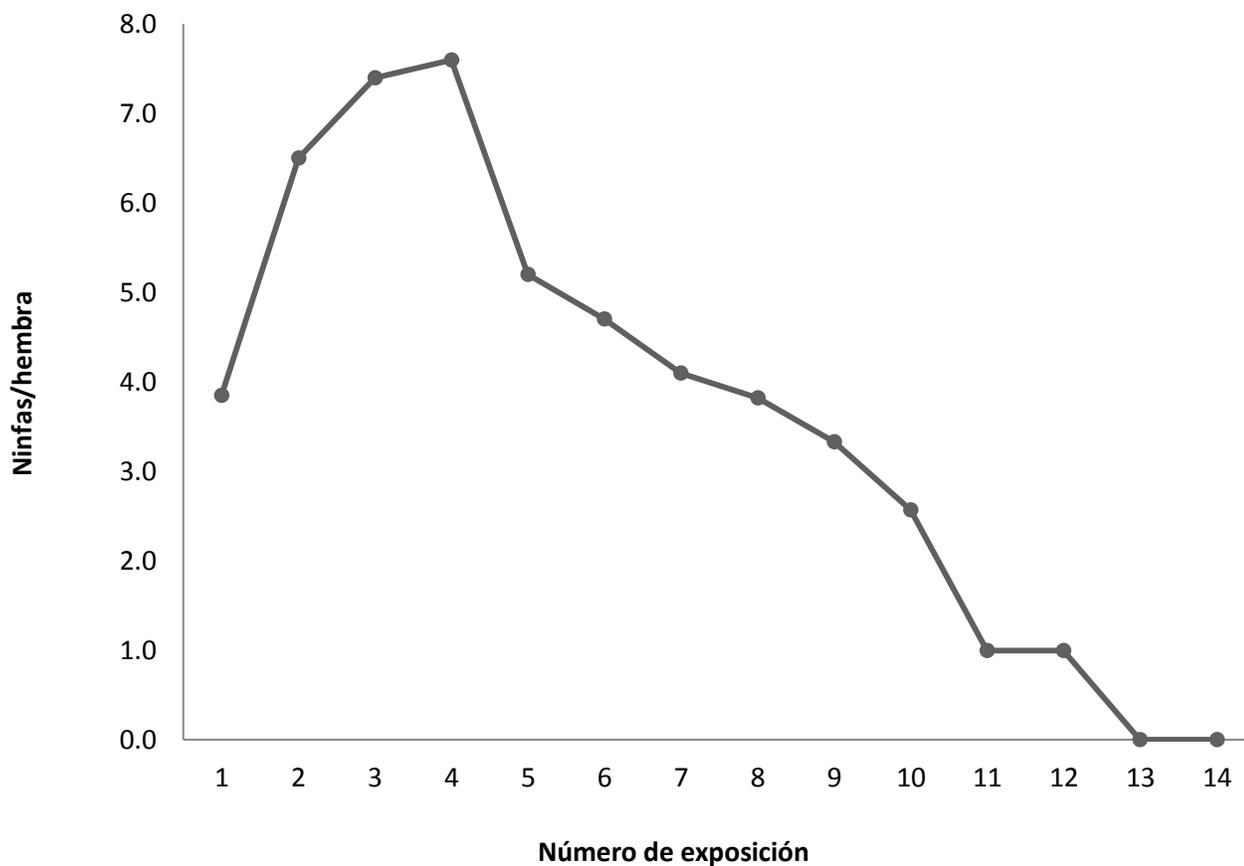
### **6.3 Longevidad y fecundidad en laboratorio**

#### **6.3.1 Longevidad**

La longevidad de los adultos de *E. varians* no fue significativamente diferente entre sexos ( $t= 0.1920$ ,  $P \geq 1.74$ ); los machos vivieron  $33.04 \pm 2.75$  días y las hembras  $26.95 \pm 3.02$ . La mayor mortalidad de los individuos de ambos sexos ocurrió entre los días 19 y 25 (42 y 57% en hembras y machos, respectivamente). Una hembra vivió hasta 60 días y dos machos vivieron más de 60 días; uno 64 y el otro 67 días.

#### **6.3.2 Fecundidad**

El promedio de ninfas/hembra de *E. varians* (fecundidad acumulada) durante toda su vida fue de  $47.2 \pm 2.4$ . El mayor número de ninfas/hembra (entre 6 y 8 ninfas/hembra) se registró en la 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> y 4<sup>a</sup> exposición cuando las hembras tenían entre 9 y 20 días de edad (Figura 12). Posteriormente, el número de ninfas/hembra disminuyó entre 3 y 5 cuando las hembras tenían entre 21 y 41 días de edad (entre la 5<sup>a</sup> y 10<sup>a</sup> exposición). El número de ninfas/hembra disminuyó a 1 en las 11<sup>a</sup> y 12<sup>a</sup> exposiciones, mientras que en las 13<sup>a</sup> y 14<sup>a</sup> exposiciones (53 y 60 días de edad, respectivamente) no hubo descendencia de la única hembra que se encontraba viva.



**Figura 12.** Número de ninfas/hembra de *Engytatus varians* en diferentes exposiciones. Cada exposición tuvo una duración de cuatro días e iniciaron cuando las hembras del depredador tenían 5 días de edad.

## 6.4 Evaluación de la fitofagia

### 6.4.1 Longevidad y descendencia en invernadero

Las hembras que se alimentaron con huevos de *S. cerealella* vivieron significativamente ( $F=6,97$ ;  $gl = 5, 96$ ;  $P < 0.0003$ ) 5 ó 7 días más (19 días, rango entre 18 y 20 días), comparado con las hembras que no tuvieron alimento o los machos con y sin alimento (Cuadro 5).

**Cuadro 3.** Longevidad (días  $\pm$  EE) de hembras y machos de *Engytatus varians* con y sin alimento y descendencia (expresada como promedio de ninfas/hembra  $\pm$  EE) y ninfas totales/hembras bajo las dos condiciones alimenticias.

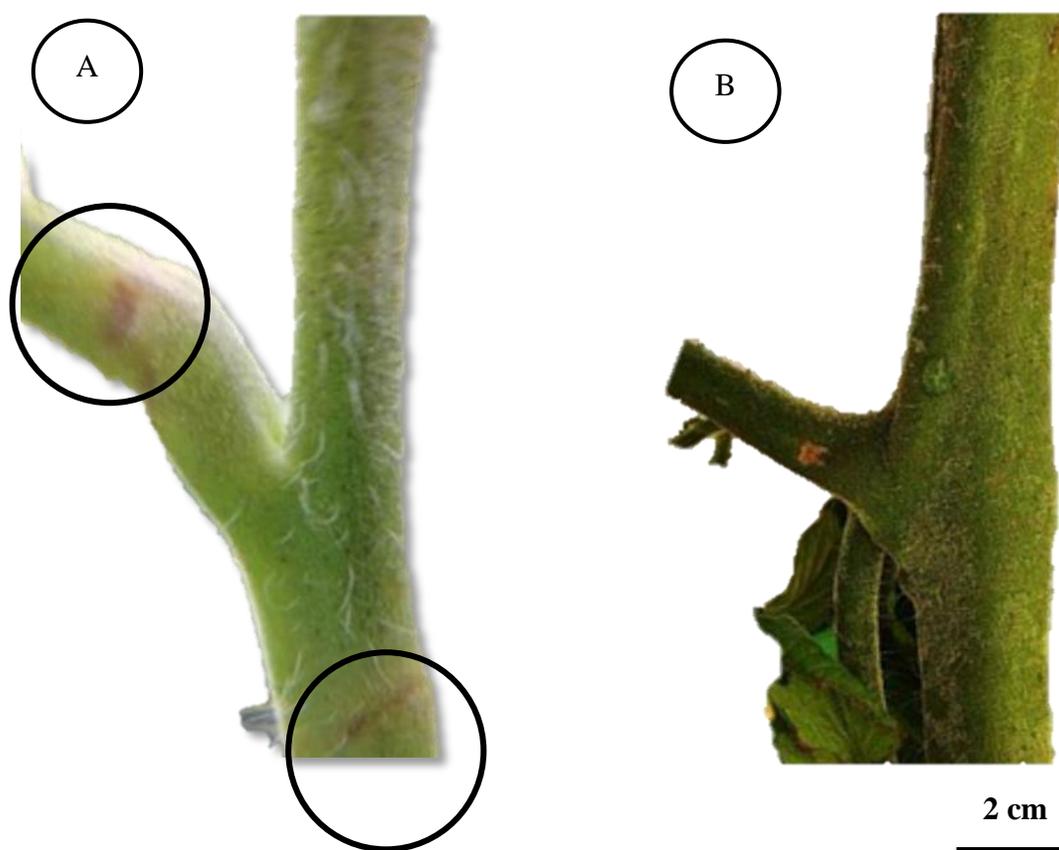
Tratamiento	Longevidad (días) <sup>a</sup>	Descendencia	
		Ninfas/tratamiento <sup>b</sup>	Ninfas totales
<b>Hembras con alimento</b>	19.39 $\pm$ 1.32 a	9.12 $\pm$ 1.14 a	73
<b>Hembras sin alimento</b>	11.84 $\pm$ 1.28 b	1.37 $\pm$ 0.90 b	11
<b>Machos con alimento</b>	13.85 $\pm$ 1.25 b	-	-
<b>Machos sin alimento</b>	12.48 $\pm$ 1.22 b	-	-

Medias dentro de la columna, seguidas por la misma letra no difieren significativamente (<sup>a</sup>ANOVA y <sup>b</sup>*t* de Student, LSD;  $P > 0.05$ ).

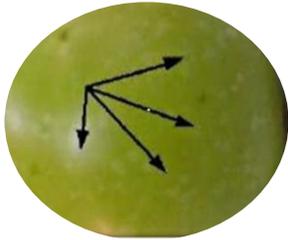
El número de ninfas/hembra de *E. varians* (= descendencia) fue significativamente mayor ( $t = 28.32$ ,  $P \leq 0.00001$ ) cuando las hembras se alimentaron con huevos de *S. cerealella* (9 ninfas/hembra), comparado con lo obtenido en el tratamiento de hembras sin alimento (1.5 ninfas/hembra) (Cuadro 5). En total se colectaron 73 y 11 ninfas en los tratamientos de hembras con alimento y hembras sin alimento, respectivamente. La primera ninfa se colectó 19 días después del inicio del experimento en una de las repeticiones del tratamiento de hembras con alimento, mientras que la última ninfa se colectó a los 40 días después del inicio del experimento en este mismo tratamiento, 5 días antes morir la última hembra.

#### 6.4.2 Daños sobre tallos y frutos

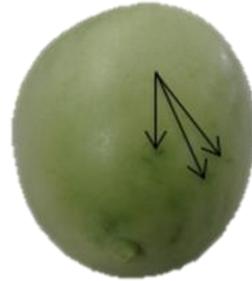
No se registraron daños causados por *E. varians* sobre los tallos y frutos (ver Figuras 13A y B) de tomate (ver Figuras 14A, B, C, D y E). Sin embargo, sobre los frutos se observaron punturas que no son características del daño causado por alimentación de insectos zoofitófagos (Figura 14C). Estas punturas se observaron sobre los frutos únicamente en los tratamientos de hembras con y sin alimento a los 10 días después del inicio del experimento; pero, de acuerdo con el desarrollo y maduración de los frutos, estas punturas se desvanecieron.



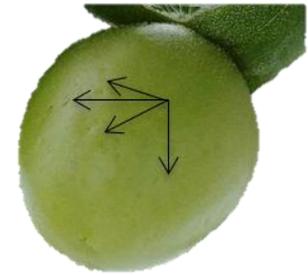
**Figura 13.** Comparación entre A) un tallo con heridas inducidas por *Nesidiocoris tenuis* (foto tomada del sitio web <http://biologicalservices.com.au/products/nesidiocoris-28.html>) y B) tallo sin lesiones donde se liberó *Engytatus varians*.



A) Punturas en frutos causadas por *Nesidiocoris tenuis* (Tomado de Calvo y Urbaneja, 2003).



B) Daño causado por *Engytatus varians* (4 individuos/planta) en tomates tipo saladette var. Río Grande. Foto tomada por Pérez-Aguilar (2015) cuando evaluó la depredación de este mírido sobre *Bactericera cockerelli* bajo condiciones de invernadero.



C) Punturas sobre frutos de tomate tipo saladette var. Moctezuma, pero que no corresponden al daño ocasionado por alimentación de *Engytatus varians*.



D) Punturas ocasionadas por *Engytatus varians* sobre fruto de tomate tipo saladette var. Río Grande (Foto de Pérez-Aguilar 2015).

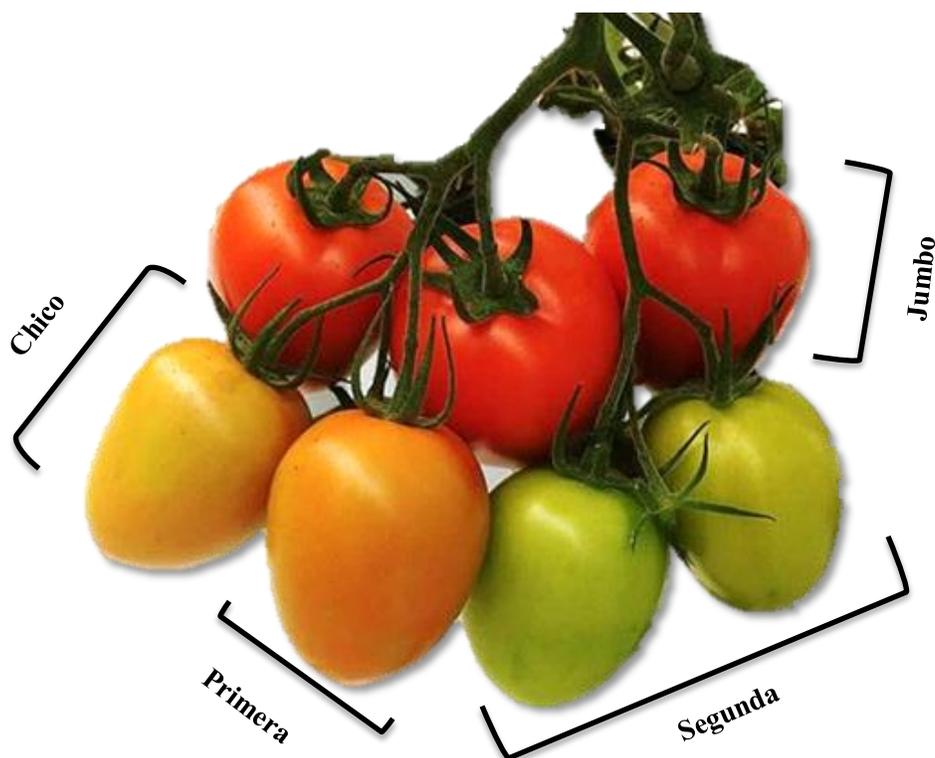


E) Fruto de tomate tipo saladette var. Moctezuma con liberación de *Engytatus varians*. Las punturas se desvanecieron con el desarrollo y maduración del fruto. Esta foto corresponde al mismo fruto de la foto del inciso C, tomada 40 días después.

**Figura 14.** Punturas sobre frutos de tomate causadas por míridos zoofitófagos y fruto sin daño, en reportes previos y en esta investigación.

### 6.4.3 Categorías

Durante todo el experimento se cosecharon 321 frutos de tomate, los cuales se categorizaron a razón de su peso. No se encontraron diferencias significativas en el número total de frutos de tomate entre cada categoría: Chico ( $F=1.37$ ;  $gl = 5, 57$ ;  $P < 0.254$ ), Segunda ( $F= 0.84$ ,  $gl = 5, 69$ ;  $P < 0.529$ ), Primera ( $F=0.18$ ,  $gl = 5, 93$ ;  $P < 0.966$ ) y Jumbo ( $F= 0.35$ ,  $gl = 5, 98$ ;  $P < 0.877$ ) (Cuadro 6). El racimo de frutos utilizado en el experimento estuvo conformado por entre 6 y 8 frutos, sin diferencias significativas entre tratamientos ( $F= 1.354$ ,  $gl = 5, 39$ ;  $P < 0.276$ ). En promedio hubo 2 frutos de tomate de cada una de las categorías antes mencionadas (Figura 15).



**Figura 15.** Conformación promedio de un racimo de frutos de tomate. Se muestran 7 frutos de tomate clasificados en cuatro categorías: 2, 2, 2 y 1 frutos de las categorías Jumbo, Primera, Segunda y Chico, respectivamente.

**Cuadro 4.** Número de frutos de tomate (promedio  $\pm$  EE) por categoría y número de frutos del racimo (promedio  $\pm$  EE) en cada tratamiento.

Tratamiento	Categoría de los frutos de tomate/Número de tomates (n)				
	Chico	Segunda	Primera	Jumbo	Total
<b>Testigo 1</b> (jaula libre de insectos)	1 $\pm$ 0.188a (8)	1.62 $\pm$ 0.56a (11)	2 $\pm$ 0.37a (16)	2.12 $\pm$ 0.47a (17)	6.74 $\pm$ 0.64a (52)
<b>Testigo 2</b> (racimo libre)	1.5 $\pm$ 0.75a (9)	1.62 $\pm$ 0.32a (13)	2.25 $\pm$ 0.46a (14)	2.37 $\pm$ 0.37a (15)	7.86 $\pm$ 0.51a (51)
<b>Hembras con alimento</b>	1.87 $\pm$ 0.83a (11)	1.12 $\pm$ 0.44a (9)	2.25 $\pm$ 0.25a (17)	2.37 $\pm$ 0.41a (19)	7.61 $\pm$ 0.26a (56)
<b>Hembras sin alimento</b>	1.87 $\pm$ 0.12a (9)	1.12 $\pm$ 0.22a (12)	2 $\pm$ 0.26a (16)	2 $\pm$ 0.18a (16)	6.99 $\pm$ 0.27a (53)
<b>Macho con alimento</b>	1.62 $\pm$ 0.51a (11)	2 $\pm$ 0.42a (12)	2 $\pm$ 0.46a (15)	1.87 $\pm$ 0.29a (15)	7.49 $\pm$ 0.27a (57)
<b>Macho sin alimento</b>	1.5 $\pm$ 0.75a (10)	1.2 $\pm$ 0.35a (9)	2 $\pm$ 0.42a (16)	2 $\pm$ 0.26a (17)	6.7 $\pm$ 0.53a (52)

Medias entre filas seguidas por la misma letra no difieren significativamente (ANOVA, LSD;  $P > 0.05$ ). n, número de tomates por categoría.

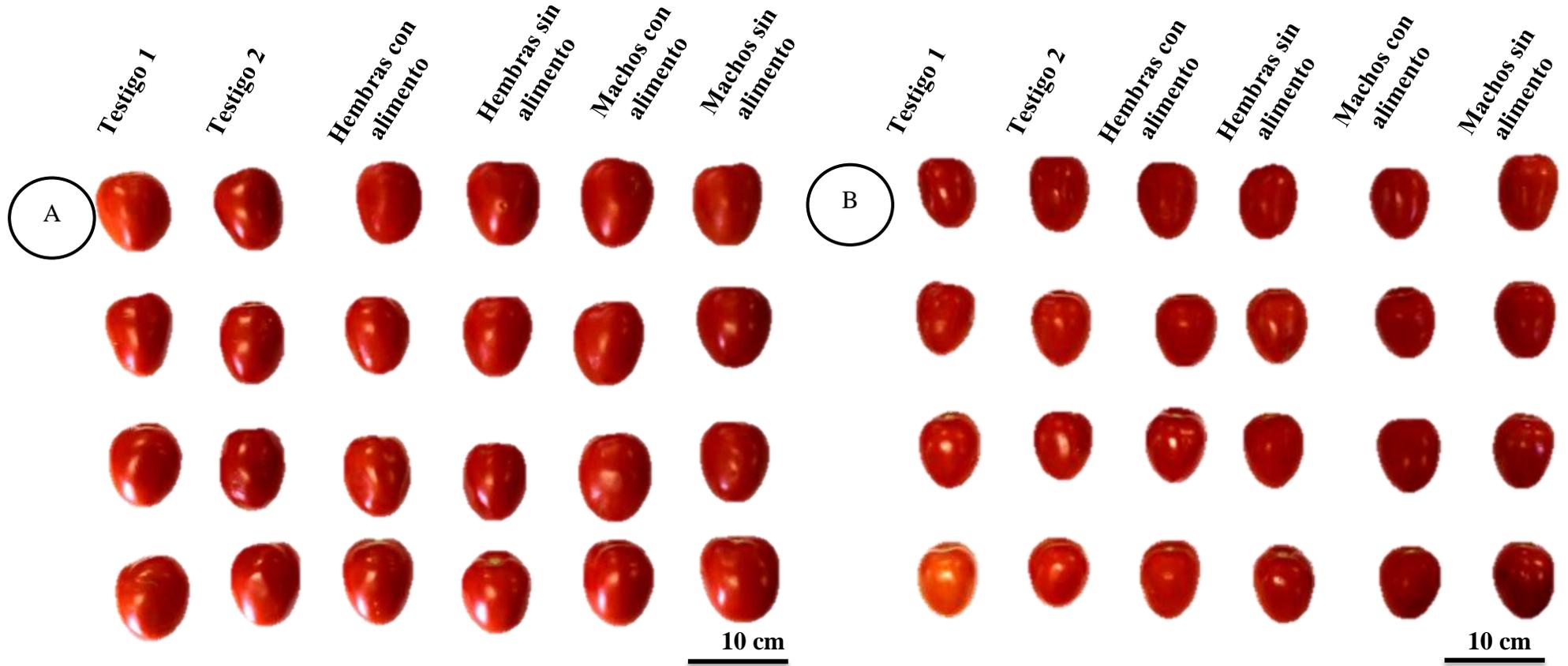
#### 6.4.4. Rendimiento

Se realizaron cuatro cosechas de frutos de tomate con una diferencia de 4 días entre las mismas. El peso por fruto de tomate, en cada una de las cosechas, fue significativamente diferente entre los seis tratamientos ensayados ( $F = 13.46$ ;  $gl = 22,320$ ;  $P < 0.0001$ ) (Cuadro 7). En la primera cosecha, cada fruto de tomate del tratamiento de machos con alimento (142 g) pesó más que los frutos de los tratamientos restantes (112-128 g/fruto), incluido el testigo 1 (122 g/fruto). El tratamiento de hembras con alimento (112 g) registró el peso más bajo. En la segunda cosecha, no hubo diferencias significativas en el peso promedio por fruto entre ambos testigos (141-142 g), pero sí entre los tratamientos de hembras con alimento y machos con y sin alimento (116-118 g/fruto). En el tratamiento de hembras sin alimento se registró un peso intermedio (130 g/fruto) de los frutos entre los tratamientos antes señalados. En la tercera cosecha, el peso más alto por fruto de tomate se registró en los tratamientos Testigo 2, hembras sin alimento y machos con alimento (91-100 g) y fue distinto al registrado en los tratamientos Testigo 1 (75 g) y hembras con alimento (65 g), pero no del tratamiento machos sin alimento (87 g). En la cuarta cosecha, el peso por fruto registrado en el Testigo 2 (90 g) fue significativamente mayor al obtenido en el resto de los tratamientos (73-78 g), excepto en el tratamiento de hembras con alimento (80 g). En general, el peso por fruto de tomate disminuyó conforme al número de cosecha, ya que el peso de éstos fue mayor en las dos primeras cosechas, donde se recolectaron los frutos de mayor peso y que correspondieron a las categorías primera y jumbo (Figura 16).

**Cuadro 7.** Peso promedio (g ± EE) por fruto de tomate de las cuatro cosechas diferentes.

Tratamiento	Número de cosecha/peso (g)/ Número de tomates (n)			
	Primera	Segunda	Tercera	Cuarta
<b>Testigo 1</b> (jaula libre de insectos)	122.63+ 8.88 Ab (8)	142.05 + 5.76 Aa (19)	75.50 + 10.25 Bb (6)	73.56 + 8.37 Bb (9)
<b>Testigo 2</b> (racimo libre)	ND	141.16 + 5.92 Aa (18)	100.42 + 5.48 Ba (21)	90.21 + 6.72 Ba (14)
<b>Hembras con alimento</b>	112.05 + 5.76 Ac (19)	116.94 + 6.09 Ab (17)	65.33 + 10.26 Bb (6)	80.3 + 7.95 Bab (10)
<b>Hembras sin alimento</b>	127.50 + 6.97Ab (13)	130 + 5.76 Bab (19)	91.09 + 7.58 Ca (11)	72.07 + 6.72 Cb (14)
<b>Machos con alimento</b>	141.66 + 6.28 Aa (16)	115.93 + 6.49 Bb (15)	92 + 7.95 Ca (10)	77.86 + 6.49 Cb (15)
<b>Machos sin alimento</b>	126.77 + 5.36 Ab (22)	118.33 + 6.49 Ab (15)	87.38 + 8.88 Bab (8)	75.25 + 6.28 Cb (16)

Medias entre filas (letras mayúsculas) y columnas (letras minúsculas), seguidas por la misma letra, no difieren significativamente (ANOVA, LSD; P > 0.05). ND, No determinado porque este testigo se incluyó hasta la segunda colecta. n, número total de frutos.



**Figura 16.** Frutos de tomate de dos categorías colectados en la segunda cosecha en los diferentes tratamientos ensayados: A) Jumbo y B) Primera.

#### 6.4.5 Grados Brix y diámetro de los tallos

Debido a que los datos de porcentajes de azúcares disueltos en los frutos de tomate fueron muy similares en la primera y segunda medición, tanto de la primera como de la cuarta cosecha, los datos se agruparon por cada determinación de este parámetro: rango de 3.6 a 4.0% y 3.7 a 4.3% de azúcares para la primera y segunda medición de ambas cosechas, respectivamente. El porcentaje de la concentración de azúcares disueltos en los frutos de tomate, expresado como grados Brix, no fue significativamente distinto ( $F = 1.217$ ,  $gl = 5$ ,  $95$ ;  $P < 0.29$ ) entre los tratamientos de cada una de las determinaciones ni entre estas últimas (4% de azúcares en todos los tratamientos) (Cuadro 8).

El diámetro de los tallos (2 cm) no mostró diferencias significativas ( $F = 0.74$ ;  $gl = 6,144$ ;  $P < 0.75$ ) entre los diferentes tratamientos ensayados (Cuadro 8).

**Cuadro 5.** Grados Brix de los frutos (porcentaje  $\pm$  EE) y diámetro (cm  $\pm$  EE) de los tallos de las plantas de tomate cuando se liberaron machos y hembras con y sin alimento.

Tratamiento	Determinaciones de °Bx (%)		Diámetro (cm)
	Primera	Segunda	
<b>Testigo 1 (jaula libre de insectos )</b>	3.92 $\pm$ 0.05Aa	4.1 $\pm$ 0.13Aa	2.17 $\pm$ 0.02a
<b>Testigo 2 (racimo libre)</b>	3.99 $\pm$ 0.06Aa	4.1 $\pm$ 0.05Aa	2.22 $\pm$ 0.04a
<b>Hembras con alimento</b>	3.88 $\pm$ 0.05Aa	4.0 $\pm$ 0.05Aa	2.20 $\pm$ 0.04a
<b>Hembras sin alimento</b>	3.95 $\pm$ 0.05Aa	4.04 $\pm$ 0.05Aa	2.18 $\pm$ 0.02a
<b>Machos con alimento</b>	3.95 $\pm$ 0.06Aa	4.05 $\pm$ 0.06Aa	2.24 $\pm$ 0.03a
<b>Machos sin alimento</b>	3.91 $\pm$ 0.06Aa	4 $\pm$ 0.05Aa	2.19 $\pm$ 0.02a

Medias entre filas (letras mayúsculas) y columnas (letras minúsculas), seguidas por la misma letra, no difieren significativamente (ANOVA, LSD;  $P > 0.05$ ).

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1 Identificación morfológica y molecular

Debido al potencial que poseen los integrantes de la tribu Dicyphini de la familia Miridae como agentes de control biológico, su determinación taxonómica confiable es indispensable. Hasta los últimos 15 años la determinación de especies del suborden Heteroptera generalmente se ha hecho exclusivamente considerando las características morfológicas (Morales *et al.* 2016). Sin embargo, los trabajos realizados sobre la determinación taxonómica de especímenes de este grupo recomiendan el uso, por lo menos, de una herramienta molecular complementaria (Park *et al.*, 2011; Foottit *et al.*, 2014; Raupachet *et al.*, 2014).

En la mayoría de los insectos, el uso de las claves dicotómicas, así como la determinación con descripciones, son los medios de determinación tradicional más recurrentes. Sin embargo, en el caso de la familia Miridae, para algunas subfamilias o zonas geográficas como el continente Americano, son insuficientes (Morales *et al.*, 2016). Sobre la organización taxonómica de la familia Miridae, sobresalen las revisiones extensas de las subfamilias Orthotylinae (Schwartz *et al.* 2006), Bryocorinae (Konstantinov y Knyshev 2015) y Mirinae (Morales *et al.* 2016), las cuales se basan en más de 60 caracteres morfológicos (incluida la genitalia). Como resultado, estos autores proponen nuevas especies, clasificaciones y características a considerar en futuros estudios. En el caso de la tribu Dicyphini, a la cual pertenece *E. varians*, existe poca información de claves y diagnósticos; además de que no hay continuidad del uso de los caracteres, por lo tanto, requieren mayor especialización.

La biología, hábitos y rangos alimenticios de los míridos también se usan con frecuencia para su identificación (Wheeler, 2001; Schuh, 2008), pese a ello, en México, este grupo es de interés reciente, desconociendo para múltiples especies su diversidad y biogeografía. Como corroboración de esta situación, para la especie *N. tenuis*, existe amplia bibliografía en estos aspectos además de diagnósticos morfológicos; estas circunstancias fueron idóneas para su caracterización y solo requirió ratificación del

especialista. Por su parte, en el caso del género *Engytatus*, se requirió el apoyo del especialista de la familia Miridae para la determinación de la especie *E. varians*. Esta especie presenta una amplia pero imprecisa distribución (Hernández y Henry 2010; Medina, 2014), complicando así su determinación por lugar de colecta. Martínez *et al.* (2014) reportaron por primera vez a *E. varians* a partir de especímenes colectados en plantas de tomate que se encontraban alimentándose de ninfas del psílido del tomate (*B. cockerelli*) en un invernadero ubicado en el Trébol, Michoacán, México.

Ferreira y Henry (2011) señalaron que los reportes sobre la determinación de la especie *E. varians* deben confirmarse debido a la frecuente confusión con una de la especies más próximas, *E. modestus*. Por otro lado, también deben revisarse las diferencias morfológicas adquiridas por la especie por diversificación, considerando que, la descripción original de *E. varians* se realizó a partir de ejemplares colectados en San Gerónimo, Guatemala en 1884 (Hernández y Henry 2010). Dichas limitaciones en las determinaciones morfológicas se mencionan por distintos autores como Park *et al.* (2011), Song *et al.* (2012), Jung y Lee (2012) y Footitt *et al.* (2014). Además, Raupach *et al.* (2014) mencionaron que la metamorfosis, el tamaño pequeño y la alta plasticidad fenotípica de la familia Miridae dificultan la determinación de sus especies.

Aunque en algunos casos se puede prescindir de las herramientas moleculares (Morales *et al.*, 2016), otras situaciones, requieren inevitablemente herramientas genéticas (Bickford *et al.*, 2006 y Song, *et al.* 2012). En estos casos se trata de las determinaciones de *especies cripticas*; es decir, donde los caracteres morfológicos externos no se pueden diferenciar entre especies cercanas y el único método es a través del genotipo (Bickford *et al.*, 2006). Esta situación se observa en la diferenciación de especies del género *Engytatus* (Ferreira y Henry, 2011). En la presente investigación, resalta dicha complejidad ya que, en la topología del análisis molecular (ver Figura 11), las secuencias de los individuos determinados como *E. modestus* provenientes de la empresa Koppert de México S.A de C.V. Querétaro, México y aquellos de *E. varians* del Laboratorio de Entomología Agrícola de la UMSNH y Laboratorio de Ecotoxicología de Insectos de la Universidad Federal de Lavras, Brasil (ver cuadro 4) forman un grupo monofilético. Este resultado, junto con las comentarios del especialista Dr. Thomas Henry sugiere una posible sinonimia entre *E.*

*modestus* y *E. varians*. Sin embargo, para el género *Engytatus* no se dispone de otros marcadores moleculares, organismos colectados de otras poblaciones o secuencias de referencia en el GenBank y al respecto se necesitan más estudios para comprobar esta hipótesis. Por otro lado, la determinación de *N. tenuis*, coincidió en un 98% con las secuencias existentes en GenBank del gen mitocondrial COI. Este porcentaje de similitud intraespecífica es reportado por Souza *et al.* (2015), encontrando que las especies del suborden Heteroptera se separan cuando están por debajo de 97% de similitud.

En la presente investigación se eligió la secuenciación del gen mitocondrial COI debido a que, es de las más utilizadas en el reconocimiento de especies por medio de la biología molecular (Will *et al.*, 2004; Raupach *et al.*, 2014) y porque es el marcador más efectivo en cuestiones de comparación por el número de secuencias a cotejar dentro de las bases de datos. Sin embargo, dentro de la familia Miridae, con el uso del gen COI se han diferenciado diversos géneros sin dificultades, pero no así cuando se trata de diferenciar especies, lo que cuestiona su posición como código de barras (Will *et al.*, 2004). Esto se observa en el género *Macrolophus* (Figura 12), que se muestra cercano a *Tupiocoris*. Además, la especie *M. tenuicornis* se excluye del grupo de *Macrolophus* y se incluye dentro del género *Dicyphus*. Este resultado, no sólo debate la posición del gen COI para diferenciar especies, sino que también cuestiona la concordancia de las secuencias disponibles en el GenBank con sus identificaciones morfológicas, y la necesidad de revisar la clasificación en la familia como lo mencionan Park *et al.* (2011), Song *et al.* (2012) y Jung y Lee (2011),

Por otra parte, Jung y Lee (2011) observaron que las secuencias correspondientes a especies determinadas y corroboradas morfológicamente se incluyen dentro de géneros que no les corresponden. Al respecto, estos autores comentaron dos posibles orígenes filogenéticos para la tribu Dicyphini. Los ancestros hipotéticos de la tribu explicarían la alimentación facultativa de sus miembros al sugerir un antepasado depredador y otro fitófago. Esto, sin embargo, pone a discusión la clasificación de la familia Miridae, contraponiendo las investigaciones de Schuch (2009) y Wheeler (2001), quienes sostienen con sólida evidencia morfológica un origen monofilético para la subfamilia Bryocorinae y la tribu Dicyphini con un ancestro herbívoro. Con estas controversias es comprensible la

limitante del gen COI para clasificar con certeza algunas especies, demostrando que los datos morfológicos y moleculares deben complementarse con el objetivo de construir una clasificación más acertada que permita el reconocimiento de los móridos a través de marcadores moleculares más efectivos y características morfológicas más evidentes.

## **7.2 Longevidad y fecundidad en laboratorio**

En este estudio, los machos y hembras de *E. varians* mostraron una longevidad de 33 y 27 días, respectivamente, alimentándose con huevos de *S. cerealella* + solución de azúcar al 5%. La longevidad de los adultos de *E. varians* se ha estudiado previamente (Medina 2014; Palma-Castillo, 2016; Dimas, 2017). Al respecto, Medina (2014), reportó para este depredador, una longevidad de 19 días para machos, y 16 días para hembras; cuando se alimentaron con ninfas de *B. cockerelli*, huevos de *S. cerealella* o una combinación de ambos alimentos; sin embargo, la longevidad obtenida en la presente investigación, coincide a los resultados obtenidos en estudios posteriores, donde *E. varians* se alimenta con una solución de azúcar complementaria. El trabajo de Palma-Castillo (2016), documentó una longevidad de 46 y 37 días en hembras y machos, respectivamente con una dieta de huevos de *S. cerealella* + solución de azúcar. Los resultados de las evaluaciones Dimas (2017), con una dieta de huevos de *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) + solución de azúcar al 5%, reportaron para hembras una longevidad de 36 días y para machos 23 días.

La fecundidad es el parámetro biológico mediante el cual se evalúa la capacidad que tienen los individuos para mantener su poblaciones. En enemigos naturales, este parámetro es muy importante para asegurar su dinámica poblacional en programas de control biológico dentro del contexto de manejo integrado de plagas. En este estudio, la descendencia (=fecundidad) promedio por hembra de *E. varians* fue de 47 ninfas/hembra. Este resultado es similar (58 huevos/hembra) al obtenido por Dimas (2017) con este mismo depredador cuando los adultos se alimentaron con huevos de *E. kuehniella* + solución de azúcar al 5%. Es ampliamente conocido que la dieta tiene influencia sobre la fecundidad de los enemigos naturales, resaltando el incremento significativo en oviposiciones y emergencia de ninfas al alimentar especies zoofitófagas de móridos con una dieta constituida por proteínas y azúcares (Palma-Castillo, 2016).

Por su parte, Baños-Díaz *et al.* (2017) describieron una tendencia en la disminución de emergencia de ninfas de *N. tenuis* cuando los progenitores se alimentaron únicamente de plantas. Los resultados reportados por estos autores coinciden con los presentados en este estudio, donde las emergencias más altas se visualizan en la 3<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup> y 5<sup>a</sup> exposiciones, cuando las hembras tenían entre 12 y 19 días de edad, coincidiendo con la maduración reproductiva de las hembras, interpretado también como el periodo de mayor número de hembras vivas y aptas para ovipositar. En el experimento de Baños-Díaz *et al.* (2017) se reportó la descendencia más alta en 5 ninfas/hembra, mientras que para *E. varians* el mayor número registrado fue de 8 ninfas/hembra (Figura 13).

### **7.3 Evaluación de la fitofagia**

Bajo condiciones de invernadero, las hembras de *E. varians* alimentadas con huevos de *S. cerealella* vivieron entre 1.4 y 1.6 veces más que las hembras que no tuvieron alimento y machos que tuvieron o no alimento. Con base a los resultados del presente estudio, se puede inferir que, para las hembras la dieta es un factor determinante para su supervivencia; sin embargo, en los machos, la reproducción ejerce mayor influencia si se contrastan las longevidades entre machos con alimento (14 días) y machos sin alimento (12 días); este resultado es soportado con los reportes de Palma-Castillo (2016).

Por otro lado, en esta investigación se utilizaron adultos de *E. varians* presumiblemente apareados, debido a que, previo al inicio del experimento, ambos sexos se colocaron durante 5 días sobre plantas de tomate. Sin embargo, la descendencia en el tratamiento de hembras con alimento fue 6.6 veces mayor a la obtenida en el tratamiento de hembras sin alimento. Es importante mencionar que en una de las repeticiones del tratamiento de hembras sin alimento se observó la presencia de una colonia de ácaros, probablemente de la especie *T. urticae*, pero 24 h después estos organismos ya no fueron visibles. Esto supone que las hembras de *E. varians* de este tratamiento se alimentaron de esta presa, lo que pudo influenciar su descendencia ya que, en esta repetición hubo más ninfas (5 ninfas) que en las otras siete repeticiones (entre 0 y 3). Por lo tanto, para tener certeza en que las hembras de *E. varians* necesitan ingerir proteínas para el proceso de vitelogénesis es necesario realizar más investigaciones al respecto.

En las condiciones del presente estudio, la primera ninfa se observó a los 19 días después del inicio del experimento, lo que contrasta con la duración del desarrollo embrionario (11 días) de este mismo depredador reportado por Medina (2014). Aunque el efecto de la dieta sobre la longevidad y descendencia ha sido ampliamente estudiado en estos insectos (Iriarte Castañé, 2001; Burla, et al., 2014, Palma-Castillo, 2016; Dimas, 2017) también se deben considerar las variables del sistema agrícola. Durante el experimento, se realizó la primera aplicación del insecticida tiametoxam 10 días después del inicio del experimento y tres días después la supervivencia de los adultos de *E. varians* disminuyó; se hicieron dos aplicaciones posteriores con intervalos de 10 días. Previamente, Pérez-Aguilar (2016) evaluó los efectos letales y subletales de este neonicotinoide y demostró que después de 72 h la mortalidad de adultos y ninfas de este depredador fue de 90%. Por otro lado, durante el desarrollo del presente estudio también se aplicó el compuesto comercial Biodie® que contiene Argemonina como ingrediente activo. Aunque los compuestos botánicos causan menos efectos sobre los insectos, comparado con los insecticidas organosintéticos (Horowitz y Ishaaya, 2004; Pereira et al., 2014), se desconoce el efecto de este compuesto sobre los adultos de *E. varians*. Sin embargo, Pérez-Torres *et al.* (2017) reportaron una disminución del 40% de la plaga *Ligys lineolaris* (Palisot de Beauvois) (Hemiptera: Miridae) cuando se aplicó Argemonina en el cultivo de amaranto *Amaranthus hypochondriacus* L., lo que indica que las especies de la familia Miridae pueden ser susceptibles a este ingrediente activo.

Calvo *et al.* (2009) reportaron lesiones en forma anillos necróticos (manchas marrones sobre el tejido vegetal) en tallos y peciolas de las plantas de tomate y halos o punturas blanquecinas sobre los frutos causadas por *N. tenuis*, lo que se atribuyó a las altas densidades de este depredador: Por otra parte, los resultados de Silva *et al.* (2016) indicaron que las ninfas y adultos de *M. basicornis*, *E. varians* y *Campyloneuropsis infumatus* (Carvalho) causaron pocas lesiones, aún con 20 míridos/planta en plantas tomate. En la presente investigación, se reflexionó sobre la tasa de liberación basadas en las dosis recomendadas por otros autores (Calvo *et al.*, 2009; 2016) de 1 individuo/planta para *N. tenuis* y *D. hesperus* en ambos casos, además, de los experimentos de Pérez-Aguilar (2016) con la evaluación de 1 y 4 individuos/planta de *E. varians* para la depredación de *B. cockerelli*. De esta forma se decidió utilizar tres individuos/planta debido al espacio a

evaluar (35 cm), considerando que la reducida área incrementaría o evidenciaría los posibles daños por la alimentación zoofitófaga. Además, a diferencia del trabajo de Pérez-Aguilar (2016) no se utilizó la solución de azúcar con el objetivo de inducir la alimentación sobre los tejidos vegetales. Los tallos no presentaron anillos necróticos en nuestro estudio; lo que contrasta con los obtenidos por Pérez-Aguilar (2016) quien registró lesiones en hojas y tallos causadas por *E. varians* similares a los descritos para *N. tenuis* (Calvo y Urbaneja, 2003), y cuya incidencia coincidió a la baja presencia de ninfas de *B. cockerelli* (rango 0.45 y 9 ninfas/hoja), sobre plantas de tomate tipo saladette, var. Río Grande. Este autor, reportó que las lesiones se observaron a partir de la sexta semana de la liberación de los insectos, sin diferencias significativas entre las dosis de liberación (1 y 4 individuo/planta). En este estudio, solo se registraron punturas en algunos frutos de tomate de las repeticiones con hembras de ambos tratamientos, sin embargo, estas punturas no formaron el halo blanco que desarrollan las heridas inducidas por la alimentación de los míridos zoofitófagos. Por lo tanto, nosotros hipotetizamos de que estas punturas fueron producidas por el ovipositor de las hembras de *E. varians*. Además, estas lesiones se desvanecieron durante el desarrollo de los frutos de tomate, similar a lo reportado por Silva *et al.* (2016), donde los daños provocados por ninfas y adultos de *E. varians* desaparecieron a las 2 semanas de ser observados.

Existen investigaciones enfocadas a la evaluación de los daños producidos por los míridos zoofitófagos y esto ha generado controversias respecto a la utilización de estos enemigos naturales como agentes de control biológico. En el caso de *E. varians* este es el primer estudio en el que se reporta la influencia de la presencia de adultos de este depredador sobre plantas de tomate en fructificación. En los resultados obtenidos no existen diferencias en el número total de frutos de tomates/racimo (7) entre tratamientos con la presencia de insectos y los testigos 1 y 2 (jaula libre de insectos y racimo libre) (cuadro 6). Durante el experimento también se registró, el desarrollo de flores, sin embargo, no fue posible atribuir la pérdida de las mismas a la presencia de los adultos de *E. varians*, ya que los dos testigos presentaron abortos florales manifestados en igual manera que los tratamientos con liberación de insectos. Anteriormente, Sánchez y Lacasa (2008) y Sánchez (2013) evaluaron diferentes densidades de *N. tenuis* en cultivos de tomate y reportaron que los abortos florales se relacionó directamente con la densidad del mírido e indirectamente

con la de la presa. Su conclusión justifica que a una densidad moderada, como en el actual experimento, no se contemplan abortos de flores y pérdidas de frutos por míridos.

Sánchez (2009) y Sánchez *et al.* (2014) encontraron que, bajo la influencia de *N. tenuis*, existe una respuesta de sobre compensación de la planta de tomate, con el aumento del peso de los racimos cuando hubo pérdida de flores. Además, Sánchez y Lacasa (2008) predijeron un 15% de compensación del producto en peso final; sin embargo, los resultados obtenidos aún no permiten evidenciar la posible influencia de *E. varians* sobre el rendimiento. Por otro lado, se ha demostrado que algunos míridos como *M. pygmaeus* desencadenan mecanismos de respuesta vegetales a varios niveles como lo exponen Maselou *et al.* (2015) y Pappas *et al.* (2016) para la defensa hacia los artrópodos plaga, mientras que Pérez-Hedo *et al.*, (2015) demostraron la atracción de enemigos naturales. No se ha estudiado la respuesta vegetal bajo la influencia de *E. varians* y esto abre una línea de investigación para comprender las interacciones dentro de los sistemas agrícolas.

Como efectos sobre la calidad en los frutos de tomate de la variedad Moctezuma, en el presente estudio se encontró una concentración de 4% de azúcares disueltos los frutos de tomate, lo que cae dentro del rango (4-6%) de azúcares esperado para los frutos de tomate de esta variedad (Amaya *et al.*, 2010; Hernández-Leal *et al.*, 2013). No existen trabajos donde se evalúe el efecto sobre el grosor de los tallos cuando hay alimentación de míridos. En el actual estudio, el diámetro fue superior a los 2 cm, mostrando dimensiones dentro de la media para la variedad, aunque se han registrado diámetros cercanos a los 4 cm, ligados a la fertilización, pero no se ha relacionado este factor a mayores rendimientos o incremento en la concentración de azúcar final (Corella-Bernalet *et al.*, 2010; Medina-Medina *et al.*, 2012).

## 8. CONCLUSIONES

- Con base en sus caracteres morfológicos y al marcador molecular COI, los míridos determinados en la presente investigación pertenecen a las especies *N. tenuis* y *E. varians*.
- El marcador molecular COI no mostró una distinción clara entre especies del género *Engytatus*.
- El depredador *E. varians* demostró compatibilidad con plantas de tomate tipo saladette var. Moctezuma debido a su longevidad y descendencia en laboratorio e invernadero.
- Es la primera evaluación de míridos sobre esta variedad comercial de tomate, proyectando futuros estudios que involucren variedades genéticamente mejoradas y utilizadas por los productores.
- *Engytatus varians* es compatible con las dosis recomendadas de agroquímicos usados habitualmente bajo invernadero como preventivos de plagas.
- No se registraron daños sobre tallos y frutos de tomate inducidos por alimentación de *E. varians*. Las lesiones registradas sobre los frutos de tomate durante el experimento se desvanecieron durante el desarrollo de los mismos, por lo que se hipotetiza que son ocasionadas por las hembras con el ovipositor.
- No hubo efectos sobre el contenido de azúcares en los frutos ni en el diámetro de los tallos de las plantas de tomate por la presencia de *E. varians*.

## 9. LITERATURA CITADA

- Albajes, R., C. López y X. Pons. 2003. **Predatory fauna in corn fields and response to imidacloprid seed treatment.** Journal of Economic Entomology. 96 (6): 1805-1813.
- Abajes, R. y O. Alomar. 2008. **Facultative predators.** En: Capinera, J.L. (Ed.), Encyclopedia of Entomology. Springer, The Netherlands. 1400–1405 pp.
- Alomar, O. y R. Widenmann. 1999. **Zoophytophagous Heteroptera: implications for life history and integrated pest management.** Entomological Society of America, Maryland. 202 pp.
- Álvarez, J.M., F. Menalled y M.A. Hoy. 2005. **Las herramientas moleculares en el control biológico.** Manejo Integrado de Plagas y Agroecología Costa Rica. 74:4-11.
- Armstrong, K.F., Cameron C.M. y Frampton E.R. 1997 **Fruit fly (Diptera: Tephritidae) species identification: a rapid molecular diagnostic technique for quarantine application.** Bulletin of Entomological Research. 87: 111–118.
- Arnó, J., C. Castañé, J. Riudavets, R. Gabarra. 2010. **Risk of damage to tomato crops by the generalist zoophytophagous predator *Nesidiocoris tenuis* (Reuter) (Hemitera: Miridae).** Bulletin of Entomological Research. 100:105- 115.
- Baños-Díaz, H. L., T. Ruiz-Gil, M. del Toro-Benítez, I. M. Cabrera, y M. A. Martínez-Rivero. 2013. **Desarrollo, reproducción y tablas de vida de *Nesidiocoris tenuis* Reuter empleando como presa estadios inmaduros de mosca blanca.** Revista de Protección Vegetal. 32(2): 10
- Bayer CropScience .2012. **Guía de identificación de plagas y enfermedades del tomate.** 3-4.pp.
- Becerra, V. V., y Paredes M.C. 2000. **Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética.** Agricultura Técnica. 60(3): 270-281.
- Bickford, D., D.J. Lohman, S.N. Sodhi, K.L. Peter, R. Meier, K. Winker, K. K. Ingram y D. Indraneil. 2006. **Cryptic species as a window on diversity and conservation.** Trends in Ecology y Evolution. 22(3): 148 – 155.
- Bueno, V. H. P., J. C. Van Lenteren, J. C. Jr. Lins, A. M. Calixto, F. C. Montes, D. B. Silva, L. D. Santiago y L. M. Pérez. 2013. **New records of *Tuta absoluta*(Meyrick)**

- (Lepidoptera: Gelechiidae) predation by Brazilian hemipteran predatory bugs.**  
Journal of Applied Entomology. 137 (1-2): 29-34.
- Calvo, F. J., A. Torres, J. C. Velázquez, E. Rodríguez y J. R Lomelí. 2016. **Evaluation of *Dicyphus hesperus* for biological control of sweet potato whitefly and potato psyllid on greenhouse tomato.** BioControl. 61 (4): 415–424.
- Calvo, J., A. y Urbaneja. 2004. ***Nesidiocoris tenuis* un aliado para el control biológico de mosca blanca.** Horticultura Internacional. 44: 20-25.
- Calvo, J., A. Urbaneja. 2003. ***Nesidiocoris tenuis* Reu. (Het., Miridae) en tomate: ¿Amigo o Enemigo?.** Almeria Verde. 4: 21-23.
- Calvo, J., K. Bolckmans, P. A. Stansly y A. Urbaneja. 2009. **Predation by *Nesidiocoris tenuis* on *Bemisia tabaci* and injury to tomato.** BioControl. 54 (2): 237-246.
- Castañé, C., J. Arnó, R. Gabarra, O. Alomar. 2011. **Plant damage to vegetable crops by zoophytophagous mirid predators.** Biological Control. 59 (1): 22-29.
- Castineiras, A. 1995. **Natural enemies of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) in Cuba.** Florida Entomologist. 78 (3): 583-585.
- Contreras-Rendón, A., A. T. I. Gutiérrez, J. R. Sánchez-Pale, H. V. Silva-Rojas y A. L. Cerda. 2017. **Comportamiento espacial de zebra chip y *Bactericera cockerelli* (Sulc) (Hemiptera: Triozidae) en *Solanum tuberosum* L. en Valles Altos de México.** Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. 49(1): 175-184.
- Corella-Bernal, R. A., R. Soto-Ortiz, F. Escoboza-García, J. O. Grimaldo, M. A. Huez-López, M. M. Ortega-Nieblas. 2011. **Evaluación de dos variedades de tomate tipo saladette propagadas por estacas y por semilla en invernadero para el valle de Mexicali.** XIV Congreso internacional en ciencias agrícolas. Baja California, México.
- Cubillos-Salamanca, Y. P. 2017. **Especies de trips asociadas a cultivos comerciales de zarzamora en Michoacán y Jalisco y estado de la resistencia a insecticidas de uso común.** Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Chapingo, Texcoco, Estado de México, México. 77 pp.
- De Necochea, C.R., y Canul C. J. T. 2004. **Secuenciación de ácidos nucleicos.** Proyecto de investigación del Instituto de Biotecnología-UNAM. Disponible en:

[http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/secuenciacion\\_acidos\\_nucleicos.pdf](http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/secuenciacion_acidos_nucleicos.pdf)  
(Disponible en Octubre del 2017).

- De Puyseleir, V., S. De Man, M. Höfte, P. De Clercq. 2013. **Plantless rearing of the zoophytophagous bug *Nesidiocoris tenuis***. *BioControl*. 58 (2): 205-213.
- del Pino, M., E. Hernández-Suárez, T. Cabello, P. Rugman-Jones, R. Stouthamer y A. Polaszek. 2013. ***Trichogramma canariensis* (Insecta: Hymenoptera: Trichogrammatidae) a parasitoid of eggs of the twin-spot moth *Chrysodeixis chalcites* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Canary Islands**. *Arthropod Systematics y Phylogeny*. 71 (3): 169–179.
- Discover live. 2013. ***Engytatus modestus* [Base de datos del museo americano de historia natural]**. Disponible en: <http://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Engytatus+modestus>. (Consultada en enero 2018).
- Doyle, J. 1991. **DNA Protocols for Plants**. En: z Hewitt G.M., A.W.B., Johnston, J.P.W. Young. (eds.) **Molecular techniques in taxonomy**. NATO ASI Series (Series H: Cell Biology). vol 57. Springer, Berlin, Heidelberg
- Ferreira, P. S. F., T. J. Henry. 2011. **Synopsis and keys to the tribes, genera, and species of Miridae (Hemiptera: Heteroptera) of Minas Gerais, Brazil Part I: Bryocorinae**. *Zootaxa*. 2920: 1-41
- Ferreira, P., T. Henry y L. Coelho. 2015. **Plant bugs (Miridae)**. En: Panizzi, Á. y J. Grazia, ed. **True bugs (Heteroptera) of the Neotropics**. 1a. edición. Springer, 237-268 pp.
- FIRA, (Fideicomisos Instituidos en Relación a la Agricultura). 2017. **Tomate Rojo**. Dirección de Investigación y Evaluación Económica y Sectorial. Panorama Agroalimentario, México. 24 pp.
- Fitzsimmons, N. 1997. **Male marine turtles: Gene flow, philopatry and mating systems of the green turtle *Chelonia mydas***. Tesis de Doctorado. Universidad de Queensland. Australia. 234-241pp.
- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz y R. Vrijenhoek. 1994. **DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates**. *Molecular Marine Biology and biotechnology*. 3(5): 294-299.
- Footitt, G.R., E. Maw y P. D. N. Hebert. **DNA Barcodes for Nearctic Auchenorrhyncha (Insecta: Hemiptera)**. *PLOS ONE*. 9(7): 1-10.

- Franck P., M. Maalouly-Matar, y J. Olivares. 2017. **Molecular tools for the detection and the identification of Hymenoptera parasitoids in Tortricid fruit pests.** International Journal of Molecular Science. 18 (10): 16 pp.
- Franco, V. K. 2010. **Biología de la reproducción de los míridos depredadores *Macrolophus pygmaeus* y *Nesidiocoris tenuis*.** Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona. Barcelona, España 132 pp.
- Fravel, D.R.2005. **Commercialization and implementation of biocontrol.** Annual Review of Phytopathology. 43:337–59.
- Gessé, S. F. 1992. **Comportamiento alimenticio de *Dicyphus tamaninii* Wanger (Heteroptera: Miridae).** Boletín Sanidad Vegetal Plagas. 18 (4): 685-6916.
- Goula, M., y Mata 2011. ***Orthotylus (Parapachylops) caprai* Wagner, 1955, new record for Iberian Peninsula (Heteroptera Miridae).** Bulletin Société Entomologique de France. 116(2): 177-179.
- Goula, M., O. Alomar. 1994. **Míridos (Heteroptera Miridae) de interés en el control integrado de plagas en el tomate. Guía para su identificación.** Boletín de Sanidad Vegetal Plagas. 20: 131-143.
- Guédez C., C. Castillo, L. Cañizales y R. Olivar. 2008. **Control biológico: una herramienta para el desarrollo sustentable y sostenible.** Academia. 13: 50 – 74.
- Hernández-Quintero, O. 2015. **Capacidad de consumo del depredador *Engytatus varians* (Distant) (Hemiptera: Miridae) sobre dos especies de nóctuidos de importancia agrícola.** Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia Michoacán, México. 41 pp.
- Hernández, L. M. y T. J. Henry. 2010. **The plant bugs or Miridae (Hemiptera: Heteroptera) of Cuba.** Pensoft Series Faunistica No. 92, Sofia and Moscow. 212 pp.
- Hernández-Leal, E., R. Lobato-Ortiz, J.J. García-Zavala, D. Reyes-López, A. Méndez-López, O. Bonilla-Barrientos y A. Hernández-Bautista. 2013. **Comportamiento agronómico de poblaciones F2 de híbridos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.).** Revista Fitotecnia Mexicana. 36(3): 209-215.
- Heyker, L. Baños-Díaz, H. L., T. Ruiz-Gil, M. del Toro-Benítez1, I. MiradaCabrera1 y María de los A. Martínez-Rivera. 2017. **Development, reproduction and life**

- tables of *Nesidiocoris tenuis* Reuter using immature stages of whitefly as prey.**  
Revista de Protección Vegetal. 32(2):1-10.
- Horowitz, A. R., I. Ishaaya, 2004. **Biorational insecticides mechanisms, selectivity and importance in pest management.** En: Horowitz, A. R., I. Ishaaya, (Eds) Insect Pest Management. Springer Berlin Heidelberg. p. 1-28.
- Illingworth, J. F. 1937. **Observations on the predaceous habits of *Cyrtopeltis varians* (Dist.) (Hemip.).** Proceedings of the Hawaiian Entomological Society. 9: 458-459.
- Jung, S. y S. Lee. 2011. **Molecular phylogeny of the plant bugs (Heteroptera: Miridae) and the evolution of feeding habits.** Cladistics. 28 (2012): 50–79.
- Konstantinov, F.V y A A. Knysho. 2015. **The tribe Bryocorini (Insecta: Heteroptera: Miridae: Bryocorinae): phylogeny, description of a new genus, and adaptive radiation on ferns.** Zoological Journal of the Linnean Society .175: 441–472.
- Kubisz, D., L. Kajtoch, M. Mazur y M Rizun. 2012. **Molecular barcoding for central-eastern European Crioceris leaf-beetles (Coleoptera: Chrysomelidae).** Open Life Sciences 7:69–76.
- Lanteri, A. A. 2007. **Código de barras del ADN y sus posibles aplicaciones en el campo de la Entomología.** Sociedad Entomológica Argentina. 66 (3-4): 15-25.
- Lee, H.H. y L.K. Miller. 1978. **Isolation of genotypic variants of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus.** Journal of Virology. 27 :754-767.
- Li, H., J. M. Leavengood Jr., E. G. Chapman, D. Burkhardt, F. Song, P. Jiang, J. Liu, X. Zhou y W. Cai. 2017. **Mitochondrial phylogenomics of Hemiptera reveals adaptive innovations driving the diversification of true bugs.** Proceedings of the royal society B. 284: 10.
- Logarzo, G., L. Williams y D. Carpinter. 2005. **Plant bugs (Heteroptera: Miridae) associated with roadside habitats in Argentina and Paraguay: Host plant, temporal, and geographic range effects.** Annals of the Entomological Society of America, 98 (5): 694-702.
- Maselou, D.A., D. C. Perdakis, M. W. Sabelis, y A. A. Fantinou. 2015. **Plant resources as a factor altering emergent multi-predator effects.** PLOS ONE. 10(9): 1-16.

- Medina, P. M. 2014. **Identificación y biología de *Engytatus varians* Distant (Hemiptera: Miridae): depredación sobre el psílido del tomate, *Bactericera cockerelli* (Sulc.) (Hemiptera: Triozidae).** Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 66 pp.
- Medina-Medina, J. B., J. J Luna-Ruíz, J. Sosa-Ramírez, O. Moreno-Rico y C. Perales-Segovia. 2012. **Adaptaciones morfológicas foliares en tomate cultivado en bioespacio de techo retráctil con clima cálido.** Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 3:173 – 186.
- Mena-Mociño, L. V. 2016. **Características biológicas y reproductivas de *Engytatus varians* (Distant) y *Dicyphus maroccanus* Wagner (Hemiptera: Miridae), depredadores zoofitófagos de plagas de solanáceas.** Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 74 pp.
- Mohd, Z., I. Fauziah, W. Wan Mohamad, S. S. Abdul, M. Ch. Salma y J. Kamaruzaman. 2009. **Biology of *Macrolophus caliginosus* (Heteroptera: Miridae) predator of *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae).** International Journal of Biology. 2(1): 63-70.
- Morales, I., P. S.Ferreira, y D. Forero. 2016. **Taxonomic revision of *Collaria* Provancher, 1872 (Hemiptera: Miridae) with the description of a new species from the Afrotropical region.** Zootaxa. 2: 737–745.
- Moreno-Reséndez, A, J. A. Durón y A. Luévano-González. 2011. **Características de la agricultura protegida y su entorno en México.** Revista Mexicana de Agronegocios. 15 (29): 763-774.
- Navarro-Urbina, E. 2011. **Producción de tomate Saladette (*Lycopersicum esculentum* mill.) bajo condiciones de invernadero en una unidad de producción Chaparrosa, de Cos, Zacatecas.** Tesis de Licenciatura. Facultad de Economía Agrícola y Agronegocios. Universidad Autónoma agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila, México. 78 pp.
- Orozco, M. A., V. V. Villalba, S. N. López. 2012. **Desarrollo de *Tupiocoris cucurbitaceus* (Hemiptera: Miridae) sobre *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) en diversas hortalizas.** Revista de Fitosanidad. 16(3): 147- 153.

- Packer, L., y L. Ruz. 2017. **DNA barcoding the bees (Hymenoptera: Apoidea) of Chile: species discovery in a reasonably well known bee fauna with the description of a new species of *Lonchopria* (Colletidae).** Genome. 60(5): 414-430.
- Palma-Castillo, L. J. 2016. **Efecto de tres dietas alimenticias sobre los parámetros biológicos y demográficos de *Engytatus varians* (Distant) (Hemiptera: Miridae).** Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Michoacán, México. 37 pp.
- Pancorbo, M. M., Ramos R., Saloña M. y Sánchez P. 2006. **Entomología molecular forense.** Ciencia Forense. 8:107-130.
- Pappas, M. L., A. Steppuhn, D. Geuss, N. Topalidou, A. Zografou, M. Sabelis y G. D. Broufas. 2015. **Beyond predation: the zoophytophagous predator *Macrolophus pygmaeus* induces tomato resistance against spidermites.** PLOS ONE. 10(5): 1-18.
- Park, D. S., R. Footitt., E. Maw y P. D. N. Hebert. 2011. **Barcoding bugs: DNA-based identification of the true bugs (Insecta: Hemiptera: Heteroptera).** PLOS ONE. 6(4):1-9.
- Patwardhan, A., R. Samit y A. Roy. 2014. **Molecular markers in phylogenetic studies-A review.** Phylogenetics & Evolutionary Biology. 2(2): 1-9.
- Paulitz, T.C. y R. R. Bélanger. 2001. Biological control in greenhouse systems. Annual Review of Phytopathology.39:103–33.
- Pauls, S. U., R. J. Blahnik, X. Zhou, C. T. Wardwell y R. W. Holzenthal. 2010. **DNA barcode data confirm new species and reveal cryptic diversity in Chilean Smicridea (Smicridea) (Trichoptera: Hydropsychidae).** Journal of the North American Benthological Society. 29(3):1058–1074.
- Pečnikar, Ž. F y E. V. Buzan. 2013. **20 years since the introduction of DNA barcoding: from theory to application.** Journal of Applied Genetics. 55:43–5.
- Peña, C. M. J., O. G. Ramírez y Figueroa B. E. 2013. **Los métodos experimentales que permiten el estudio de las macromoléculas de la vida: historia, fundamentos y perspectivas.** Educación Química. 24(2): 237-246.

- Perdikis, D. C. y D. P. Lykouressis. 2004. ***Macrolophus pygmaeus* (Hemiptera: Miridae) population parameters and biological characteristics when feeding on eggplant and tomato without prey.** Journal of Economic Entomology. 97 (4): 1291-1298.
- Perdikis, D. y D. P Lykouressis. 2000. **Effects of various items, host plants, and temperatures on the development and survival of *Macrolophus pygmaeus* Rambur (Hemiptera: Miridae).** Biological Control 17: 55-60.
- Perdikis, D., D. y Lykouressis. 2002. **Description of the egg and nymphal instars of *Macrolophus pygmaeus* Rambur (Hemiptera: Miridae).** Entomología Hellenica. 14: 32-40.
- Pereira, R. R., M. C. Picanço, P. A Santana, S. S. Moreira, R. N. Guedes, A. S. Corrêa. 2014. **Insecticide toxicity and walking response of three pirate bug predators of the tomato leaf miner *Tuta absoluta*.** Agricultural and Forest Entomology. 16(3): 293-301.
- Pérez-Aguilar, D. 2016. **Evaluación del potencial de control biológico del mírido *Engytatus varians* (Distant) y determinación de su susceptibilidad hacia distintos pesticidas.** Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 81 pp.
- Pérez-Hedo, M., P. Urbaneja-Bernat, J. A. Jaques, V. Flors y A. Urbaneja. 2015. **Defensive plant responses induced by *Nesidiocoris tenuis* (Hemiptera: Miridae) on tomato plants.** Journal of Pest Science. 88:543–554.
- Pérez-Torres, B., A. Aragón-García, V. Cuate-Mozo, J. López-Olguín, M. A. Sánchez y G. Lugo-García. 2017. **Efecto de la aplicación en campo de mezclas de extractos vegetales sobre la presencia y daños de insectos plaga del cultivo de *Amaranthus hypochondriacus* L.** Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia. 34: 477-496.
- Pineda, S., M. Medina, J. I. Figueroa, T. J. Henry, L. V. Mena, J. M. Chavarrieta y A. M. Martínez. 2016. **Life history, diagnosis, and biological aspects of *Engytatus varians* (Hemiptera: Miridae), a predator of *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Trioziidae).** Biocontrol Science and Technology. 26(8): 1073–1086.

- Purcell, M. F., W. J. Marshall y B. E. Tabashnik. 1993. **Effects of insecticide use on abundance and diversity of tomato pests and associated natural enemies in Hawaii**. Hawaiian Entomological Society. 32: 45-59.
- Raupach, M. J., J.J Astrin, K. Hannig, M.K Peters y M.Y. Stoeckle. 2010. **Molecular species identifications of Central European ground beetles (Coleoptera: Carabidae) using nuclear rDNA expansion segments and DNA barcodes**. Frontiers in Zoology. 7: 26 pp.
- Raupach, M. J., H. Lars, S. M. K uchler, F. Deister, J. Morinie y M. M. Gossner. 2014. **Building-up of a DNA barcode library for true bugs (Insecta: Hemiptera: Heteroptera) of Germany reveals taxonomic uncertainties and surprises**. PlosONE. 9(9): 1-13.
- Rentar a, A. M. 2006. Breve revisión de los marcadores moleculares. **Ecología Molecular, UNAM**. Capítulo 18, 541-563.
- Rosero, A. D., Gutiérrez L. A., Cienfuegos A. V., Jaramillo M. y Correa M. M. 2010. **Optimización de un procedimiento de extracción de ADN para mosquitos anofelinos**. Revista Colombiana de Entomología. 36 (2): 260-263.
- SAGARPA (Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2011. **Estudio de oportunidades de mercado e inteligencia comercial y estudio de logística internacional de tomate**. Boletín Técnico. México D.F. 4 p.
- Saldamando, C. I. y E. J. Márquez. 2012. **Aproximación a la filogenia de *Spodoptera* (Lepidoptera: Noctuidae) con el uso de un fragmento del gen de la citocromo oxidasa I (COI)**. Revista de Biología Tropical. 60 (3): 1237-1248.
- Sánchez, J. A. 2009. **Density thresholds for *Nesidiocoris tenuis* (Heteroptera: Miridae) in tomato crops**. Biological Control. 51(3):493-498.
- Sánchez, J. A., Michelangelo La-Spina y A. Lacasa. 2014. **Numerical response of *Nesidiocoris tenuis* (Hemiptera: Miridae) preying on *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) in tomato crops**. European Journal of Entomology. 111(3): 387-395.

- Sánchez, J. A. y A. Lacasa. 2008. **Impact of the zoophytophagous plant bug *Nesidiocoris tenuis* (Heteroptera: Miridae) on tomato yield.** Journal of Economic Entomology. 101 (6): 1864-1870.
- Schuh, R. T. 1995. **Plant bugs of the world (Insecta: Heteroptera: Miridae). Systematic catalog, distributions, host list, and bibliography.** New York Entomological Society, New York. pp. 1329.
- Schuh, R.T., 2008. **On-line Systematic catalog of plant bugs (Insecta: Heteroptera: Miridae).** Disponible en: <http://research.amnh.org/pbi/catalog> (consultado en Abril de 2018).
- Schuh, R. T., Weirauch C., y W.C Wheeler. 2009. **Phylogenetic relationships within the Cimicomorpha (Hemiptera: Heteroptera): a total-evidence analysis.** Systematic Entomology. 34: 15–48.
- Schwartz, M. D., R. T. Schuh y N. Tatarinic. 2006. **A new genus and species of Halticini from South Africa (Hemiptera: Miridae).** African Entomology. 16 (1): 23-32.
- Silva, D. B, V. H. P. Bueno, F. J. Calvo y J.C. van Lenteren. 2016. **Do nymphs and adults of three Neotropical zoophytophagous mirids damage leaves and fruits of tomato?** Bulletin of Entomological Research. 1-8 pp.
- Souza, H. V., S. R. Marchesin y M. M. Itoyama. 2015. **Analysis of the mitochondrial COI gene and its informative potential for evolutionary inferences in the families Coreidae and Pentatomidae (Heteroptera).** Genetics and Molecular Research 15(1):1-15.
- Stahls, G. y E. Savolainen. 2008. **MtDNA COI barcodes reveal cryptic diversity in the *Baetis vernus* group (Ephemeroptera, Baetidae).** Molecular Phylogenetics and Evolution. 46 (1): 82-87.
- Steiner, A.A. 1984. **The universal nutrient solution.** 633-650 pp.
- Tembe, S., Y. Shouche y H.V. Ghate. 2014. **DNA barcoding of Pentatomomorpha bugs (Hemiptera: Heteroptera) from Western Ghats of India.** Meta Gene. 2:737–745.
- Urbaneja A., G. Tapia, P. Stansly. 2005. **Influence of host plant and prey availability on developmental time and survivorship of *Nesidiocoris tenuis* (Het.: Miridae).** Biocontrol Science and Technology. 15 (5): 513-518.

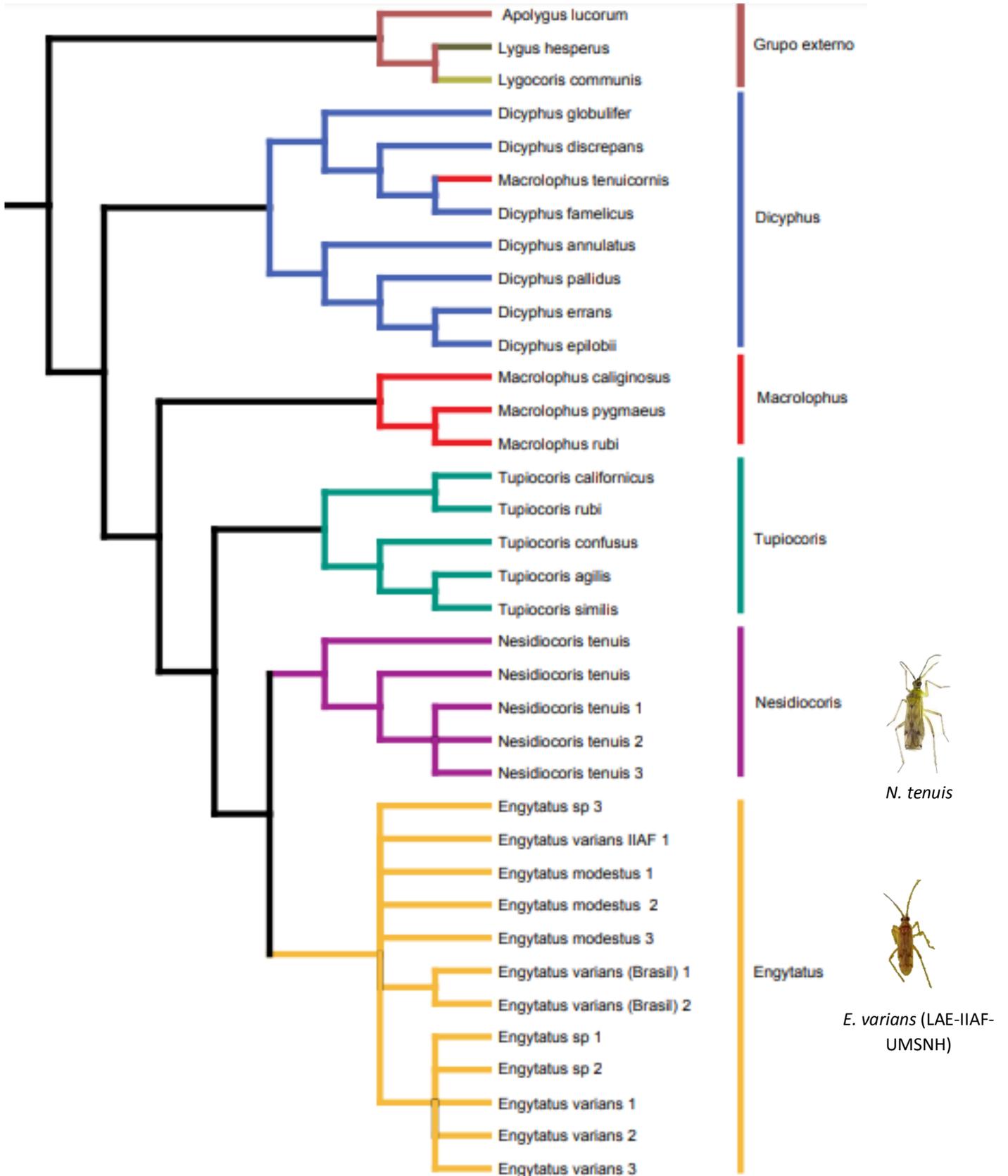
- Urbaneja, A., G. Tapia y P.A. Stansly. 2005. **Influence of host plant and prey availability in the developmental time and survival of *Nesidiocoris tenuis***. *Biocontrol Science and Technology*. 15(5): 513-518.
- Urbiola-Rangel, E. y O. Chassin-Noria. 2013. **Conectividad genética de *Stegastes acapulcoensis* (Pomacentridae) en el Pacífico central de México Hidrobiológica**. 23:(3) 415-419.
- USDA, (United States Department of Agriculture). 2017. **National Agricultural Statistics Service (NASS)**. Vegetables 2016 Summary. February 2017.
- USDA, FAS (Foreign Agricultural Service). 2016. **Mexican continues to expand greenhouse tomato production**. Global Agricultural Information. Report Number MX6021, 1-9.
- USDA, STAT (Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database). 2014. **Consulta de bases de datos de producción mundial de tomate**. Disponible en: <http://USDAstat3.USDA.org/download/Q/QC/S> (consultado en Abril de 2018).
- van Lenteren, J. C. 2000. **A greenhouse without pesticides: fact or fantasy?** *Crop Protection*. 19:375-384.
- van Lenteren, J.C., y J. Woets. 1988. **Biological and integrated pest control in greenhouses**. *Annual Review of Entomology*. 33:239-69.
- Vega-Sánchez, Y., E. Camacho-Morales, O. Chassin-Noria y L. F. M.Cuenca. 2012. **Efecto del tipo de hábitat, genética y selección sexual sobre la morfología alar en *Hetaerina* (Odonata: Calopterygidae)**. *Biológicas*. 14: 53-60.
- Velázquez, R. Y. B. 2015. **Capacidad de consumo de *Engytatus varians* (Distant) (Hemiptera: Miridae) sobre el psílido del tomate, *Bactericera cockerelli* (Sulc) (Hemiptera: Triozidae), y determinación de la progenie del depredador**. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia Michoacán, México. 48 pp.
- Wang, J., Li Zhang, Z. Qi-Li , Z. Min-Qiang, W. Xiao-Tong, Y. Xing-Zhuo y Y. Ming-Long. 2016. **Comparative mitogenomic analysis of mirid bugs (Hemiptera: Miridae) and evaluation of potential DNA barcoding markers**. *PeerJ*:e3661, DOI10.7717/peerj.366.

- Weirauch, C. y, R. T. Schuh. 2011. **Systematics and evolution of Heteroptera: 25 Years of progress.** Annual Review of Entomology. 56:487-510.
- Wheeler Jr., A. G. y B. A. Krimmel. 2015. **Mirid (Hemiptera: Heteroptera) specialists of sticky plants: adaptations, interactions, and ecological implications.** Annual Review of Entomology. 60: 393-414.
- Wheeler, A. G. 2001. **Biology of the plant bugs (Hemiptera: Miridae). Pests, predators, opportunists.** Cornell University Press, Comstock Publishing Associates. Ithaca New York, Estados Unidos.
- Will, K. W. y D. Rubinoffb. 2004. **Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification.** Cladistics 20: 47–55.
- Yarita, Y. 2010. **Ciclo biológico y algunos aspectos del comportamiento de *Dagbertus* sp. en cultivo de palto.** Disponible en:[http://www.avocadosource.com/international/peru\\_papers/YaritaYulissa2005.pdf](http://www.avocadosource.com/international/peru_papers/YaritaYulissa2005.pdf) (consultado en Abril 2018).

## 10. ANEXOS

Como comprobación a la topología obtenida por distancias tipo NJ, se constuyó un árbol con inferencia bayesiana. Para conocer el modelo evolutivo de sustitución que más se ajusta a las secuencias, se usó el programa jModeltest v2.1.4 utilizando el Criterio de Información de Akaike (AIC por sus siglas en inglés) como método de elección. El modelo obtenido fue TPM2uf+I+G. La inferencia filogenética se realizó con el método Bayesiano con ayuda del software MrBayes v3.1.2, bajo el mismo modelo evolutivo de sustitución estimado.

Se usaron las secuencias seleccionadas del GenBank y las secuencias obtenidas en la presente investigación (Cuadros 3 y 4). La topología del árbol Bayesiano (ver de figura de abajo) coincide con lo demostrado por el análisis de NJ (Figura 11). Se muestran las doce secuencias de *Engytatus* en un grupo monofilético. Las tres secuencias obtenidas de los móridos determinados morfológicamente como *N. tenuis* se agruparon en aquellas que se seleccionaron del GenBank para esta especie. Las secuencias del género *Macrolophus* no se agruparon en el mismo clado. La especie *M. tenuicornis* se traslapó con el grupo constituido por miembros del género *Dicyphus*. El género *Tupiocoris* forma un clado monofilético. Para resolver la identidad de las dos especies de móridos de la presente investigación, el análisis por distancia tipo NJ contesta la pregunta de investigación central, el árbol Bayesiano, solventa criterios de relaciones filogenéticas no abordados en este estudio; sin embargo, su construcción soporta los resultados de identificación.



**Figura.** Árbol por inferencia Bayesiana, donde se muestra la relación entre las 36 secuencias analizadas de la tribu Dicyphini.