

MULTIPLEX PCR ASSAY TO IDENTIFY *Trichogramma* PARASITOIDS (HYMENOPTERA, TRICHOGRAMMATIDAE) REARED FROM MEXICAN INSECTARIES

PCR MÚLTIPLE PARA IDENTIFICAR ESPECIES DE *Trichogramma* (HYMENOPTERA, TRICHOGRAMMATIDAE) PARASITOIDES CRIADAS EN INSECTARIOS MEXICANOS

Jaime González-Cabrera¹, Hugo C. Arredondo-Bernal^{1*}, Richard Stouthamer²

¹Centro Nacional de Referencia de Control Biológico. Km 1.5 Carretera Tecomán-Estación FFCC. 28110. Colonia Tepeyac. Tecomán, Colima, México. (jgonz017@student.ucr.edu) (hugo.arredondo@senasica.gob.mx). ²Department of Entomology, University of California, Riverside, CA 92521, USA. (richard.stouthamer@ucr.edu).

ABSTRACT

Accurate identification of species as biological candidates is the first step in establishing successful biological control programs. In Mexico, *Trichogramma* parasitoids are identified using morphological characters, which is a laborious procedure made only by experts; in addition, some morphological structures are susceptible to changes due to differences in diet or environment, and consequently there is a latent risk of misidentification. Moreover, morphological identification requires the presence of males, leaving female-only populations unidentifiable. As an alternative to morphological identification, the purpose of this work was to develop a molecular method for the identification of *Trichogramma* parasitoids from Mexican insectaries. *Trichogramma* species reared in six insectaries were DNA-identified and subsequently, based on differences in ITS2 sequences, a DNA-multiplex PCR assay was designed to distinguish among those reared species. Thus, discrepancies were found between the reported and DNA-determined species identity, whereas the sample of all the insectaries together was supposed to contain three species of *Trichogramma* (*T. pretiosum*, *T. exiguum* and *T. platneri*), only two species (*T. pretiosum* and *T. fuentesi*) were present. In addition, it was found the presence of unnoticed species replacement. Fortunately, an accurate taxonomic identification of *Trichogramma* species can be made by using the DNA-multiplex PCR assay that was generated in this work. Additionally, this methodology may identify the native *Trichogramma* species, whose use in mass rearing projects is uncommon.

RESUMEN

La identificación precisa de insectos benéficos es el primer paso en el establecimiento de programas exitosos de control biológico. En México, los parasitoides *Trichogramma* se identifican mediante caracteres morfológicos, lo cual es un procedimiento laborioso realizado solo por expertos; además, algunas estructuras morfológicas son susceptibles a cambios debido a las diferencias en la dieta o las condiciones ambientales, y por tanto existe el riesgo latente de una identificación taxonómica errónea. Más aún, la identificación morfológica requiere la presencia de machos, dejando a las poblaciones conformadas por solo hembras (partenogenéticas) sin identificar. Como alternativa a la identificación morfológica, el propósito de este estudio fue desarrollar un método molecular para la identificación de parasitoides *Trichogramma* de insectarios mexicanos. Las especies de *Trichogramma* reproducidas en seis insectarios se identificaron por ADN y después, con base en diferencias de las secuencias de ITS2, se diseñó una prueba PCR-múltiple para distinguir entre las especies reproducidas. Así, se encontraron discrepancias entre la identidad reportada y la determinada por ADN: se suponía que las muestras de todos los insectarios contenían tres especies de *Trichogramma* (*T. pretiosum*, *T. exiguum* y *T. platneri*), pero solo hubo dos especies (*T. pretiosum* y *T. fuentesi*) presentes. Además, se encontró la presencia de especies de reemplazo. Afortunadamente, utilizando la prueba PCR ADN-múltiple generada en este estudio puede hacerse una identificación taxonómica exacta de las especies de *Trichogramma*. Además, esta metodología puede identificar las especies nativas de *Trichogramma*, cuyo uso en proyectos de reproducción masiva es rara.

*Author for correspondence ❖ Autor responsable.

Received: June, 2013. Approved: July, 2014.

Published as ARTICLE in *Agrociencia* 48: 703-711. 2014.

Key words: *Trichogramma pretiosum*, *T. exiguum*, *T. platneri*, *T. fuentesi*, Identificación-DNA, secuencias de ADN ITS2.

Key words: *Trichogramma pretiosum*, *T. exiguum*, *T. platneri*, *T. fuentesi*, DNA-identification, ITS2 sequences.

INTRODUCTION

In México, *Trichogramma* parasitoids are important agents of biological control against lepidoptera pests (Williams *et al.*, 2013). These parasitoids are released to protect crops such as apples, sugarcane or tobacco, in approximately 1.5 million ha⁻¹ (Domínguez, 1996). Worldwide, Mexico occupies the third place in area treated with *Trichogramma* (van-Lenteren and Bueno, 2003; González-Cabrera *et al.*, 2014). Although the efficacy of *Trichogramma* parasitoids is known, there are reports that mass-reared *Trichogramma*, as compared to wild wasps, have a low field performance with respect to survival (Mansfield and Mills, 2002), parasitization (Ashley *et al.*, 1973; Lundgren and Heimpel, 2002; Vejar-Cota *et al.*, 2005) and host acceptance (Bergeijk *et al.*, 1989). Inadequate field performance of *Trichogramma* parasitoids can be caused by cold temperatures, heavy rain, high parasitoid dispersion or a mismatch between the intended and released specie. Some *Trichogramma* species are habitat (Thorpe, 1985; Hassan, 1994; Romeis *et al.*, 2005) and host specific (Curl and Burbutis, 1978; Yu *et al.*, 1984; Stevens, 1995); consequently, mass rearing and releasing the wrong *Trichogramma* specie could result in failure to control the target pest.

Trichogramma parasitoids are identified using morphological characters, a method with the following drawbacks: 1) it is a laborious procedure carried out only by experts (Pinto, 1998; Platner *et al.*, 1999); 2) some morphological structures are susceptible to changes due to differences in diet or environment (Pinto *et al.*, 1989); consequently, some of these characters can be misinterpreted by the observer; 3) morphological identification requires the presence of males (Pinto, 1998), leaving female-only populations unidentifiable. Using molecular biology techniques it is possible to generate an accurate multiplex PCR key to identify *Trichogramma* species in a geographical area (Stouthamer *et al.*, 1999). Misidentification of *Trichogramma* parasitoids using morphological characters was reported in Mexico (García-González *et al.*, 2005; España-Luna *et al.*, 2006) and delivering wrong species does not contribute to the field success of *Trichogramma* parasitoids,

INTRODUCCIÓN

En México, los parasitoides del género *Trichogramma* son importantes agentes de control biológico contra las plagas de lepidópteros (Williams *et al.*, 2013). Para proteger cultivos como manzana, caña de azúcar o tabaco, estos parasitoides se liberan en 1.5 millones de ha⁻¹ aproximadamente (Domínguez, 1996). En el mundo, México ocupa el tercer lugar en superficie tratada con *Trichogramma* (van-Lenteren y Bueno, 2003; González-Cabrera *et al.*, 2014). Aunque se conoce la eficacia de *Trichogramma*, hay informes de que los especímenes de *Trichogramma* reproducidos masivamente, en comparación con las avispas silvestres, tienen un rendimiento bajo en el campo con respecto a la sobrevivencia (Mansfield y Mills, 2002), parasitismo (Ashley *et al.*, 1973; Lundgren y Heimpel, 2002; Vejar-Cota *et al.*, 2005) y aceptación por el huésped (Bergeijk *et al.*, 1989). Un rendimiento en campo inadecuado de parasitoides *Trichogramma* puede ser causado por temperaturas frías, lluvia fuerte, dispersión alta del parasitoide, o desigualdad entre la especie liberada y la que se buscaba. Algunas especies de *Trichogramma* son específicas para el hábitat (Thorpe, 1985; Hassan, 1994; Romeis *et al.*, 2005) y el huésped (Curl and Burbutis, 1978; Yu *et al.*, 1984; Stevens, 1995); en consecuencia, la reproducción masiva y liberación de la especie equivocada de *Trichogramma* podría fracasar en el control de la plaga objetivo.

Las especies de *Trichogramma* se identifican utilizando caracteres morfológicos, un método con los siguientes inconvenientes: 1) es un procedimiento laborioso llevado a cabo únicamente por expertos (Pinto, 1998; Platner *et al.*, 1999); 2) algunas estructuras morfológicas son susceptibles a cambios debido a las diferencias en la dieta o las condiciones ambientales (Pinto *et al.*, 1989); en consecuencia, algunas de estas estructuras pueden malinterpretarse por el observador; y 3) la identificación morfológica requiere la presencia de machos (Pinto, 1998), dejando a las poblaciones conformadas por solo hembras sin identificar. El uso de técnicas de biología molecular permite generar una clave múltiple para PCR identificar de manera exacta especies de *Trichogramma*, de una zona geográfica (Stouthamer *et al.*, 1999). En México hay reportes de identificación errónea de parasitoides *Trichogramma* utilizando caracteres morfológicos (García-González *et al.*, 2005; España-Luna

and should be prevented. Therefore, the objective of this study was to develop a molecular method for the identification of those *Trichogramma* parasitoids that are reared in Mexican insectaries.

MATERIALS AND METHODS

In early 2010, an e-mail letter stating the objectives of this study was sent to 27 *Trichogramma* producers (privates, it included the centers for the study and production of beneficial insects, hereafter called CREROB), which were listed in the “Directorio-2010 de laboratorios reproductores y comercializadores de agentes de control biológico, Dirección General de Sanidad Vegetal y del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria/Centro Nacional de Referencia de Control Biológico”. By the end of 2010, six insectaries sent three separate samples of their *Trichogramma* rearings (individual colonies), which were a total of 10. In this study, to maintain anonymity of the collaborating insectaries, it is mentioned only their state location: Baja California Sur, Coahuila, Colima, Durango and Sonora.

Obtention of *Trichogramma* samples

On site, personnel of each insectary put live host egg cards on enclosed containers and let the wasp to emerge. Upon the natural death of the emerged adults these containers were sent to San Luis Rio Colorado, Sonora, México. One week after the arrival of each shipment, these containers were sent to the Entomology Department of the University of California, Riverside, USA, for its analysis.

Sequencing of DNA, aligning and comparing of ITS2 sequences

The reared species from the 10 *Trichogramma* spp. colonies were DNA-identified, as follows: per rearing sample the DNA of four random individuals was obtained using the Chelex DNA extraction method (Walsh *et al.*, 1991). Each wasp was ground in 60 μ L 5% Chelex-100 (Bio-Rad laboratories, Hercules, California, USA) and 2 μ L proteinase K (20 mg mL⁻¹); the mixture was incubated for 60 min at 55 °C, followed by 10 min at 99 °C. Using the ITS2-forward (5'-TGTGAACTGCAGGACACATG-3') and ITS2-reverse (5'-GTCTTGCCTGCTCTGAG-3') primers the entire ITS2 region of rDNA (Stouthamer *et al.*, 1999) was amplified. PCR was performed in 25 μ L reactions containing 2 μ L DNA template, 1X PCR-buffer (New England Biolabs, Ipswich Massachusetts, USA), 0.2 μ mol L⁻¹ each dATP, dCTP, dGTP, 0.4 μ M dUTP, 1 μ mol L⁻¹ MgCl₂, 0.2 μ M forward and

et al., 2006), y la liberación de especies equivocadas no contribuye al éxito en el campo de parasitoides *Trichogramma*, y una identificación errónea debería prevenirse. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue desarrollar un método molecular para la identificación de especies de *Trichogramma* que se reproducen en insectarios mexicanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

A principios de 2010 se envió un correo electrónico indicando los objetivos de este estudio a 27 productores de *Trichogramma* que se enlistan en el “Directorio-2010 de Laboratorios Reproductores y Comercializadores de Agentes de Control Biológico. Dirección General de Sanidad Vegetal y del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria/Centro Nacional de Referencia de Control Biológico” (privados, incluía a los centros para el estudio y la reproducción de insectos benéficos, llamados CREROB). A finales de 2010, seis insectarios enviaron tres muestras por separado de sus crías de *Trichogramma* (colonias individuales), un total de 10. En este estudio, para mantener el anonimato de los insectarios colaboradores, se menciona solo su ubicación estatal: Baja California Sur, Coahuila, Colima, Durango y Sonora.

Obtención de las muestras de *Trichogramma*

En cada insectario, el personal colocó tarjetas con huevos parasitados en contenedores cerrados y dejó que las avispas emergieran. Después de la muerte natural de los adultos que emergieron, estos contenedores se enviaron a San Luis Río Colorado, Sonora, México. Una semana después de la llegada de cada envío, estos contenedores fueron llevados al Departamento de Entomología de la Universidad de California, Riverside, EE.UU., para su análisis.

Secuenciación de ADN, alineación y comparación de secuencias de ITS2

Las especies reproducidas de las 10 colonias de *Trichogramma* spp. se identificaron por ADN así: por cada muestra se obtuvo el ADN de cuatro individuos al azar usando el método de Chelex-100 para extraer ADN (Walsh *et al.*, 1991). Cada avispa se molió en 60 μ L de Chelex-100 al 5% (Bio-Rad laboratories, Hercules, California, EE.UU.) y 2 μ L de proteinasa K (20 mg mL⁻¹); la mezcla se incubó 60 min a 55 °C, seguida de 10 min a 99 °C. Utilizando los iniciadores ITS2-directo (5'-TGTGAACTGCAGGACACATG-3') e ITS2-reverso (5'-GTCTTGCCTGCTCTGAG-3') toda la región ITS2 del ADNr (Stouthamer

reverse primer, 1 U Taq polymerase enzyme (NEB), and 13.3 μL sterile distilled water. PCR was performed using a thermocycler Ep gradient S (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). The PCR cycling program was 3 min at 95 °C, followed by 37 cycles of 45 s at 92 °C, 45 s at 53 °C and 1 min at 72 °C with 3 min at 72 °C after the last cycle. PCR products were separated on a 1 % agarose gel and stained with ethidium bromide; size ladders (1 kb bp, Fermentas[®], Thermo Fisher Scientific, Vilnius Lithuania) were run along with the samples for reference. PCR products and ladders were photographed with a Carestream Molecular Imaging V.5.0.2.3.0 (Carestream Health, Inc. Rochester New York, USA). PCR products were purified using the Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega Corporation, Madison Wisconsin, USA) and direct-sequenced in both directions at the University of California, Riverside, Genomics Institute, Core Instrumentation Facility using an Applied Biosystems 3730 DNA analyzer with a Big-Dye[®] V3.1 kit (Applied Biosystems, Foster City California, USA). The resultant ITS-2 sequences were imported and manually aligned and edited in BioEdit version 7.0.5.3 (Hall, 1999). The identity of specimens was determined by comparing their DNA sequence with those present in GenBank[®] (Benson *et al.*, 2008) (accession numbers 37730880AY182765 and 37778494AY182761).

Multiplex-PCR design

A multiplex PCR assay was designed to identify the species (as indicated by the ITS-2 sequences) in the samples, as follows (Garipey *et al.* 2005, for an overview of the principles of multiplex PCR): based on the alignment of ITS2 sequences, three PCR primers were designed using Primer3 v.0.4.0 (Rozen and Skaletsky, 2000): a common forward primer T.pf-uni-F (5'-TCAAACGAAACGCAAGAGAA-3'); two species-specific reverse primers, T.sp1-R (5'-GAGCCTGATCGTGTGCTAAA-3') and T.sp2-R (5'-GAGCTAGCCAGGCGCTATAA-3'). T.sp1-R and T.sp2-R primers resulted in PCR products of 173 bp and 250 bp, respectively.

Multiplex-PCR conditions

To identify *Trichogramma* species that were reared in the insectaries, this multiplex PCR assay was used on 20 random wasps per sample. The described DNA extraction method, PCR master mix, PCR cycling program, agarose gel and UV-photograph equipment were used with the following modifications: PCR master mix, 12.8 μL sterile distilled water, 0.2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ forward and two reverse primer; PCR program, 30 s in the first and second step of the 37 cycles, the first step at 94 °C and the second step at 59 °C; and the product was

et al., 1999) se amplificó. El PCR se realizó en reacciones de 25 μL que contenían 2 μL de ADN molde, 1X amortiguador para PCR (New England Biolabs, Ipswich Massachusetts, EE.UU.), 0.2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ cada uno de dATP, dCTP y dGTP, 0.4 μM dUTP, 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ MgCl_2 , 0.2 μM iniciadores de PCR directo y reverso, 1 U de enzima Taq polimerasa (NEB), y 13.3 μL de agua destilada estéril. El PCR se realizó usando un termociclador Ep de gradiente S (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania). El programa de ciclos de PCR fue de 3 min a 95 °C, seguidos por 37 ciclos de 45 s a 92 °C, 45 s a 53 °C y 1 min a 72 °C con 3 min a 72 °C después del último ciclo. Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 1 % y se tiñeron con bromuro de etidio; los marcadores moleculares (1 kb pb Fermentas[®], Thermo Fisher Scientific, Vilnius Lituania) se incluyeron junto con las muestras para referencia. Los productos PCR y marcadores moleculares se fotografiaron con una Carestream Molecular Imaging V.5.0.2.3.0 (Carestream Health, Inc. Rochester Nueva York, EE.UU.). Los productos PCR se purificaron utilizando el Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, EE.UU.) y se secuenciaron en directo en ambas direcciones en la Universidad de California, Riverside, Genomics Institute, Core Instrumentation Facility, con un analizador Applied Biosystems 3730 DNA con un kit V3.1 Big-Dye[®] (Applied Biosystems, Foster City California, EE.UU.). Las secuencias de ITS-2 se importaron, alinearon manualmente y editaron en BioEdit versión 7.0.5.3 (Hall, 1999). La identidad de los especímenes se determinó al comparar su secuencia de ADN con las de los especímenes presentes en GenBank[®] (Benson *et al.*, 2008) (números de acceso 37730880AY182765 y 37778494AY182761).

Diseño de la PCR-múltiple

Una prueba de PCR-múltiple se diseñó para identificar las especies (usando las secuencias de ITS-2) en las muestras, de la siguiente manera (Garipey *et al.*, 2005, para una visión general de los principios de PCR-múltiple): con base en la alineación de las secuencias ITS2 se diseñaron tres iniciadores de PCR usando Primer3 v.0.4.0 (Rozen y Skaletsky, 2000): un iniciador común directo T.pf-uni-F (5'-TCAAACGAAACGCAAGAGAA-3'), dos iniciadores reversos específicos para especies, T.sp1-R (5'-GAGCCTGATCGTGTGCTAAA-3') y T.sp2.R (5'-GAGCTAGCCAGGCGCTATAA-3'). Los iniciadores de PCR T.sp1-R y T.sp2-R dieron por resultado productos PCR de 173 y 250 bp, respectivamente.

Condiciones de la PCR-múltiple

Para identificar las especies de *Trichogramma* que se reprodujeron en los insectarios, se usó la PCR-múltiple en 20 avispa

run in a 1.5 % agarose gel. In each gel, negative and positive controls were included; such DNA belonged to the material that previously was sent to sequencing.

RESULTS AND DISCUSSION

Intraspecific variation in the ITS2 sequences allowed the design of a common forward primer T.pf-uni-F and two species-specific reverse primers, T.sps1-R and T.sp2-R; those primers resulted in PCR product size consistent with either *T. pretiosum* or *T. fuentesi*. The utility of the DNA-multiplex PCR assay to identify *Trichogramma* species that were reared in six Mexican insectaries was demonstrated using 20 random wasps per sample, in agarose gel each specimen matched one of the positive controls (Figure 1), *i.e.*, it identified *T. pretiosum* and *T. fuentesi*. Along with an accurate identification of the mass-reared *Trichogramma*, this DNA-Multiplex may open a path for using native or local species; in México 23 species were reported (Pinto, 1998; García-González *et al.*, 2005; España-Luna *et al.*, 2008). The local

(obtenidas al azar) por muestra. El método de extracción de ADN, reacciones de PCR, programa de ciclos de PCR, gel de agarosa y equipo de fotografía UV (ya descritos) fueron utilizados pero con las siguientes modificaciones: reacciones de PCR, 12.8 μ L de agua destilada estéril, 0.2 μ mol L⁻¹ de iniciador directo y dos reversos, programa PCR, 30 s en la primera y segunda etapa de los 37 ciclos, el primer paso a 94 °C y el segundo paso a 59 °C; el producto se ejecutó en un gel de agarosa al 1.5 %. En cada gel, para referencia se incluyeron testigos negativos y positivos; el ADN pertenecía al material enviado antes a la secuenciación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La variación intra-específica en las secuencias de ITS2 permitió el diseño de un común iniciador directo T.pf-uni-F y dos iniciadores reversos específicos a una especie, T.sps1-R y T.sp2-R; estos iniciadores resultaron en un producto de PCR con tamaño consistente con *T. pretiosum* o *T. fuentesi*. La utilidad de la PCR-múltiple para identificar especies de *Trichogramma* reproducidas en seis insectarios mexicanos se mostró usando 20 avispas al azar por

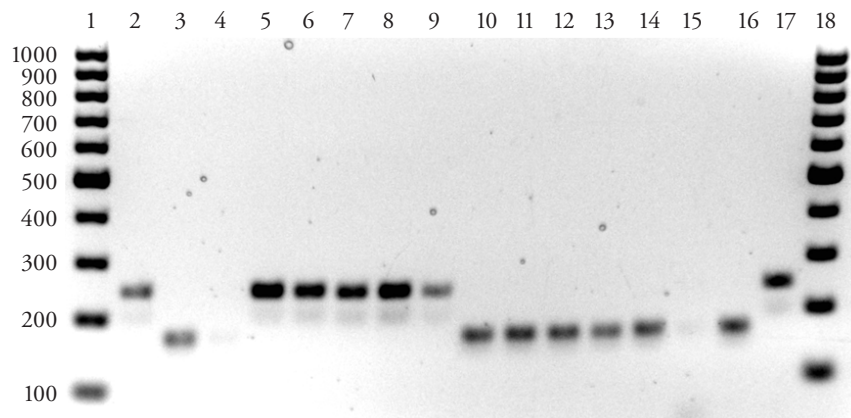


Figure 1. PCR product obtained by multiplex-PCR for identifying *Trichogramma pretiosum* and *T. fuentesi*. Lane 1, 100-bp ladder size standard (Fermentas®). Lane 2, *T. pretiosum* (positive control). Lane 3, *T. fuentesi* (positive control). Lane 4, water (negative control). Lane 5-9, *T. pretiosum* (PCR-products of rearing 5b). Lane 10-14, *T. fuentesi* (PCR-products of rearing 2b). Lane 15, water (negative control). Lane 16, *T. fuentesi* (positive control). Lane 17, *T. pretiosum* (positive control). Lane 18, 100-bp ladder size standard (Fermentas®).

Figura 1. Producto PCR obtenido por PCR-múltiple para identificar *Trichogramma pretiosum* y *T. fuentesi*. Carril 1, 100 pb de marcador molecular tamaño estándar (Fermentas®). Carril 2, *T. pretiosum* (testigo positivo). Carril 3, *T. fuentesi* (testigo positivo). Carril 4, agua (testigo negativo). Carril 5-9, *T. pretiosum* (Productos de PCR de la cría 5b). Carril 10-14, *T. fuentesi* (productos PCR de la cría 2b). Carril 15, agua (testigo negativo). Carril 16, *T. fuentesi* (testigo positivo). Carril 17, *T. pretiosum* (testigo positivo). Carril 18, 100 pb de marcador molecular tamaño estándar (Fermentas®).

Mexican species can be identified accurately using the DNA-based method that was described in this study, and after linking the ITS2 DNA sequence for those species with their names based on morphology, these local parasitoids can be tested for their fecundity or host specificity. To develop a multiplex-PCR for identifying these 23 local species, first, it is necessary to determine the DNA sequences of the ITS2 region for each species. Second, based in the size of each ITS2, roughly subdivide the species in three species-specific multiplex-PCR groups, grouping together the species with similar ITS2 sizes. Third, based on the need for identifying specific species, species-specific primers can be developed for each group based on the areas of maximal difference of the species specific DNA fragments (as it was done in this study). In Portugal and España, a similar approach of molecular identification was developed to distinguish five local species of *Trichogramma* (Silva *et al.*, 1999; Del-Pino *et al.*, 2013); and in Mexico, España-Luna *et al.* (2008) developed a dichotomous molecular key to identify five *Trichogramma* species of agricultural importance. These latter authors, reported along with *T. fuentesi* and *T. pretiosum*, also *T. atopovirilia*, *T. exiguum* and *T. pintoii*. Twenty three *Trichogramma* species are present in Mexico; however, as shown in this (Table 1) and others studies (García-González *et al.*, 2005; España-Luna *et al.*, 2008), the Mexican insectaries rear almost exclusively *T. pretiosum*. In addition to identifying accurately mass reared and local *Trichogramma*, this DNA-multiplex can identify female-only populations because only one specimen is required to make its taxonomic identification. In Mexico, female-only populations of *Trichogramma* were reported (Stouthamer and Luck, 1993; Stouthamer and Werren, 1993).

Mexican insectary personnel reported that in the ten rearings (individual colonies) three species of *Trichogramma* (*T. pretiosum*, *T. exiguum* and *T. platneri*) were reared; however, the multiplex PCR assay identified either *T. pretiosum* or *T. fuentesi* (Table 1, Figure 1). This homogeneity (only two species were reared) is explained because the initial stock in five cases originated from other Mexican insectaries and because in two cases the insectaries initiated their rearing stocks from field collected *Trichogramma*. For the latter situation, Pinto (1998) and Kuske *et al.* (2003) mentioned that collecting in the field raises the possibility of capturing species that

muestra, en gel de agarosa cada espécimen correspondió a uno de los testigos positivos (Figura 1), es decir, se identificó a *T. pretiosum* y *T. fuentesi*. Además de una identificación exacta de las *Trichogramma* reproducidas masivamente, esta PCR-múltiple puede ser una opción para usar especies nativas o locales; en México se reportaron 23 especies (Pinto, 1998; García-González *et al.*, 2005; España-Luna *et al.*, 2008). Las especies mexicanas locales pueden identificarse correctamente usando el método basado en ADN que se generó en este estudio, y después de enlazar la secuencia de ITS2 con sus nombres basados en morfología, estos parasitoides locales pueden ser probados por su fecundidad o especificidad de huésped. Para identificar estas 23 especies locales, a través de un PCR-múltiple, primero es necesario determinar las secuencias de ADN de la región ITS2 para cada especie. Segundo, con base en el tamaño de cada ITS2, subdividir en forma general las especies en tres grupos múltiples PCR específicos para especie agrupando las especies con tamaños similares de ITS2. Tercero, con base en la necesidad de identificar especies específicas, pueden desarrollarse iniciadores de PCR con base en las áreas de diferencia máxima de fragmentos de ADN (como se hizo en este estudio). En Portugal y España, se desarrolló un enfoque similar de identificación molecular para distinguir cinco especies locales de *Trichogramma* (Silva *et al.*, 1999; Del-Pino *et al.*, 2013); y en México, España-Luna *et al.* (2008) desarrollaron una clave dicotómica molecular para identificar cinco especies de *Trichogramma* de importancia agrícola. Estos últimos autores reportaron junto con *T. fuentesi* y *T. pretiosum*, también *T. atopovirilia*, *T. exiguum* y *T. pintoii*. Veintitrés especies de *Trichogramma* están presentes en México; sin embargo, como se muestra en este (Tabla 1) y otros estudios (García-González *et al.*, 2005; España-Luna *et al.*, 2008), los insectarios mexicanos reproducen casi exclusivamente *T. pretiosum*. Además de identificar con exactitud *Trichogramma* producidas en insectarios, ADN-múltiple también puede identificar a las poblaciones partenogenéticas porque sólo se requiere un espécimen para su identificación taxonómica. En México, se han reportado poblaciones partenogenéticas de *Trichogramma* (Stouthamer y Luck, 1993; Stouthamer y Werren, 1993).

Personal de los insectarios mexicanos reportaron que en las diez crías (colonias individuales)

Table 1. Species of *Trichogramma* reared in six Mexican insectaries during 2010.
Cuadro 1. Especies de *Trichogramma* reproducidas en seis insectarios mexicanos durante el 2010.

Insectary	State	Rearing	Origen of the stock	Reported species	Identified species in shipment		
					#1	#2	#3
1	B.C.S.	1 ^a	Unknown [†]	<i>pretiosum</i>	<i>pretiosum</i>	<i>pretiosum</i>	<i>pretiosum</i>
2	Coahuila	2 ^a	Insectary #3	<i>pretiosum</i>	<i>pretiosum</i>	<i>pretiosum</i>	<i>pretiosum</i>
		2b	Field	<i>exiguum</i>	<i>fuentesii</i>	<i>fuentesii</i>	<i>fuentesii</i>
3	Colima	3 ^a	Field	spp.	<i>pretiosum</i>	<i>pretiosum</i>	<i>pretiosum</i>
		3b	Unknown	<i>exiguum</i>	<i>pretiosum</i>	<i>pretiosum</i>	<i>pretiosum</i>
4	Durango	4 ^a	Insectary #2	<i>exiguum</i>	<i>fuentesii</i>	<i>pretiosum</i>	<i>pretiosum</i>
5	Sonora	5 ^a	Insectary #1	<i>pretiosum</i>	<i>pretiosum</i>	<i>pretiosum</i>	<i>pretiosum</i>
		5b	Insectary #2	<i>exiguum</i>	<i>pretiosum</i>	<i>pretiosum</i>	<i>pretiosum</i>
6	Sonora	6 ^a	Unknown	<i>pretiosum</i>	<i>pretiosum</i>	<i>pretiosum</i>	<i>pretiosum</i>
		6b	Unknown	<i>platneri</i>	<i>pretiosum</i>	<i>pretiosum</i>	<i>pretiosum</i>

[†] Either field collected or received from another Mexican insectary ❖ [†]O recolectado de campo o recibido de otro insectario mexicano.

were previously released, and in México field release of *Trichogramma* occurred since 1920s (Williams *et al.*, 2013).

From the ten rearings, the insectary personnel correctly identified *T. pretiosum* in four cases, but in two cases *T. fuentesii* were mistaken as *T. exiguum* and also in two cases *T. pretiosum* were thought as *T. exiguum*; in a similar vein, in one case *T. pretiosum* was misidentified as *T. platneri* (Table 1). Misidentification of *Trichogramma* parasitoids using morphological characters were reported in México (García-González *et al.*, 2005; España-Luna *et al.*, 2006). Slight morphological variation in the broad and short ventral ridge of *T. fuentesii* can be interpreted as narrow and long; if this mistake occurs the identified species would be *T. exiguum* (Pinto, 1998). For the same reason, *i.e.*, phenotypic plasticity of the morphological characters, *T. pretiosum* can be identified either as *T. platneri* or *T. exiguum* (Pinto, 1998).

Throughout the study, unnoticed species replacement was found. In the first shipment, *T. fuentesii* was produced in two rearings; however, in one rearing during the second and third shipments *T. fuentesii* was replaced by *T. pretiosum* (Table 1). Unnoticed replacement of *Trichogramma* species was reported in México (García-González *et al.*, 2005) and USA (Lundgren and Heimpel, 2002; Lundgren and Heimpel, 2003).

The laborious training required to identify *Trichogramma* parasitoids using morphological

se reproducían tres especies de *Trichogramma* (*T. pretiosum*, *T. exiguum* y *T. platneri*); sin embargo, la prueba de PCR-múltiple identificó solo a *T. pretiosum* y *T. fuentesii* (Tabla 1, Figura 1). Esta homogeneidad de especies criadas (sólo dos especies) se explica porque el pie de cría en cinco casos se originó de otros insectarios mexicanos y porque en dos casos los insectarios iniciaron sus colonias con material recolectado en el campo. Para esta última situación, Pinto (1998) y Kuske *et al.* (2003) mencionaron que la recolecta de campo plantea la posibilidad de capturar especies liberadas previamente y en México la liberación de *Trichogramma* ocurre desde 1920 (Williams *et al.*, 2013).

De las diez colonias, el personal del insectario identificó correctamente *T. pretiosum* en cuatro casos, pero en dos casos *T. fuentesii* se identificó como *T. exiguum*, en dos casos *T. pretiosum* se confundió con *T. exiguum* y en una ocasión *T. pretiosum* se identificó mal como *T. platneri* (Cuadro 1). En México, usando caracteres morfológicos se reportó la identificación errónea de los parasitoides *Trichogramma* (García-González *et al.*, 2005; España-Luna *et al.*, 2006). Las sutiles diferencias morfológicas en la carina ventral ancha y corta de *T. fuentesii* se pueden interpretar como estrecha y larga; si ocurre este error los especímenes se identificarían mal como *T. exiguum* (Pinto, 1998). Por esta misma razón, *i.e.*, la plasticidad fenotípica de los caracteres morfológicos, *T. pretiosum* puede confundirse con *T. platneri* o *T. exiguum* (Pinto, 1998).

characters, which is a procedure made only by experts (Pinto, 1998; Platner *et al.*, 1999), along with the latent risk of misidentification, remains an obstacle for using native or local *Trichogramma* species in biological control projects (Pinto, 1998). Then, to avoid unnoticed replacement, taxonomic misidentification (both cases were found in this study) and foment the use of local *Trichogramma* species, it is recommended to identify *Trichogramma* species using a DNA-Multiplex PCR assay. The biggest obstacle to adopt molecular techniques is the cost of the equipment. Molecular identification is accurate (Stouthamer *et al.*, 1999), and possibly in the long run the benefits of molecular identification will outweigh the high initial cost of molecular equipment.

CONCLUSIONS

As a results of implementing DNA-multiplex on the *Trichogramma* samples from the Mexican insectaries there were found discrepancies between the reported and DNA-determined species identity, while the sample of all the insectaries together was supposed to contain three species of *Trichogramma* (*T. pretiosum*, *T. exiguum* and *T. platneri*), only two species were present (*T. pretiosum* and *T. fuentesi*). Also there was found unnoticed species replacement: throughout the study, in one colony *T. fuentesi* was replaced by *T. pretiosum*.

ACKNOWLEDGEMENTS

Thanks to Paul Rugman-Jones for guidance in the molecular analysis and for proof reading the article, Anabel Valencia Villalobos and Marco Antonio Mellin Rosas for their coordination on the delivery of the *Trichogramma* samples, and special thanks to the personnel of the collaborating insectaries. This research was supported in whole or in part by UC MEXUS-CONACYT agreement in higher education and research, Robert and Peggy van den Bosch Memorial Scholarship, and the University of California, campus Riverside, Entomology department.

LITERATURE CITED

- Ashley, T. R., D. González, and T. F. Leigh. 1973. Reduction in effectiveness of laboratory-reared *Trichogramma*. *Environ. Entomol.* 2: 1069-1073.
- Benson, D. A., I. Karsch-Mizrachi, D. J. Lipman, J. Ostell, and D. L. Wheeler. 2008. GenBank. *Nucl. Acids Res.* 36: 25-30.

Durante el estudio se encontró un reemplazo inadvertido de especies. En el primer envío, *T. fuentesi* se reproducía en dos colonias; sin embargo, durante el segundo y tercero envíos, en una colonia *T. fuentesi* fue reemplazada por *T. pretiosum* (Tabla 1). Un reemplazo inadvertido de las especies de *Trichogramma* fue reportado en México (García-González *et al.*, 2005) y EE.UU. (Lundgren y Heimpel, 2002; Lundgren y Heimpel, 2003).

La compleja identificación morfológica de los parasitoides *Trichogramma*, la cual es un procedimiento realizado sólo por expertos (Pinto, 1998; Platner *et al.*, 1999), junto con el riesgo latente de una identificación errónea, son obstáculos para usar especies nativas o locales de *Trichogramma* en proyectos de control biológico (Pinto, 1998). Entonces, para evitar el reemplazo inadvertido de especies, identificación errónea (ambos casos se encontraron en este estudio) y fomentar el uso de especies locales de *Trichogramma*, se recomienda identificar las especies de *Trichogramma* usando una prueba de PCR ADN-múltiple. El mayor obstáculo para adoptar técnicas moleculares es el costo del equipo. La identificación molecular es exacta (Stouthamer *et al.*, 1999), y posiblemente, a largo plazo, los beneficios de la identificación molecular superarán el alto costo inicial del equipo molecular.

CONCLUSIONES

Como resultado de la implementación de ADN-múltiple en las muestras de *Trichogramma* se encontraron discrepancias entre la identidad reportada y la determinada por ADN; se suponía que la muestra de todos los insectarios contenía tres especies de *Trichogramma* (*T. pretiosum*, *T. exiguum* y *T. platneri*), pero sólo se detectaron dos especies (*T. pretiosum* y *T. fuentesi*). También se encontró reemplazo inadvertido de especies: durante el estudio, una colonia de *T. fuentesi* fue sustituida por *T. pretiosum*.

—Fin de la versión en Español—



- Bergeijk, K. E. V., F. Bigler, N. K. Kaashoek, and G. A. Pak. 1989. Changes in host acceptance and host suitability as an effect of rearing *Trichogramma maidis* on a factitious host. *Entomol. Exp. Appl.* 52: 229-238.

- Curl, G. D., and P. P. Burbutis. 1978. Host preference studies with *Trichogramma nubilale* (Hymenoptera-Trichogrammatidae). *Environ. Entomol.* 7: 541-543.
- Del-Pino, M., P. F. Rugman-Jones, E. Hernández-Suárez, A. Polaszek, and R. Stouthamer. 2013. Rapid molecular identification of five species of *Trichogramma* occurring in the Canary Islands with notes on their distribution in banana groves. *Biocontrol* 58: 515-524.
- Domínguez, E. R. 1996. Control biológico de plagas agrícolas en México. In: Zapatero, M. C. (ed). *El Control Biológico en América Latina*. IOBC. Buenos Aires, Argentina. pp: 55-62.
- España-Luna, M. P., O. C. Alvarado-Gómez, A. González-Hernández, S. Favela-Lara, J. Lozano-Gutiérrez, and F. García-González. 2006. Diferenciación genética de especies crípticas de *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Folia Entomol. Mex.* 45: 283-290.
- España-Luna, M. P., A. González-Hernández, O. G. Alvarado-Gómez, and J. Lozano-Gutiérrez. 2008. Identificación molecular de especies crípticas de *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) de importancia agrícola en México. *Acta Zool. Mex. (n.s.)* 24:1-14.
- García-González, F., A. González-Hernández, and M. P. España-Luna. 2005. Especies de *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) presentes en centros reproductores de México. *Acta Zool. Mex. (n.s.)* 21(3): 125-135.
- Garipey, T. D., U. Kuhlmann, T. Haye, C. Gillott, and M. Erlandson, M. 2005. A single-step multiplex PCR assay for the detection of European *Peristenus* spp., parasitoids of *Lygus* spp. *Biocontrol Sci. Technol.* 15: 481-495.
- González-Cabrera, J., H. C. Arredondo-Bernal, and R. Stouthamer. 2014. Quality assessment of trichogramma parasitoids (*Trichogramma* spp.) from six Mexican insectaries. *Agrociencia* 48: 321-329.
- Hassan, S. A. 1994. Strategies to select *Trichogramma* species for use in biological control. In: E. Wajnberg and S. A. Hassan (eds). *Biological Control with Egg Parasitoids*. CAB International, Wallingford, pp: 55-72.
- Kuske, S., F. Widmer, P. J. Edwards, T. C. J. Turlings, D. Babendreier, and F. Bigler. 2003. Dispersal and persistence of mass released *Trichogramma brassicae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in non-target habitats. *Biol. Control* 27: 181-193.
- Lundgren, J. G., and G. E. Heimpel. 2002. Augmentation of *Trichogramma brassicae* for control of cruciferous lepidoptera. In: *Proc. 1st Int. Sympo. on Biological Control of Arthropods*. Honolulu, Hawaii, USA. pp: 160-166.
- Lundgren, J. G., and G. E. Heimpel. 2003. Quality assessment of three species of commercially produced *Trichogramma* and the first report of thelytoky in commercially produced *Trichogramma*. *Biol. Control* 26: 68-73.
- Mansfield, S., and N. J. Mills. 2002. Direct estimation of the survival time of commercially produced adult *Trichogramma platneri* Nagarkatti (Hymenoptera: Trichogrammatidae) under field conditions. *Biol. Control* 25: 41-48.
- Pinto, J. D. 1998. Systematics of the North American species of *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Memoirs of the Entomological Society of Washington*. Num. 22. The Entomological Society of Washington, Washington, D.C.
- Pinto, J. D., R. K. Velten, G. R. Platner, and E. R. Oatman. 1989. Phenotypic plasticity and taxonomic characters in *Trichogramma* (Hymenoptera, Trichogrammatidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 82: 414-425.
- Platner, G. R., R. K. Velten, M. Planoutene, and J. D. Pinto. 1999. Slide-mounting techniques for *Trichogramma* (Trichogrammatidae) and other minute parasitic Hymenoptera. *Entomol. News* 110: 56-64.
- Romeis, J., D. Babendreier, F. L. Wackers, and T. G. Shanower. 2005. Habitat and plant specificity of *Trichogramma* egg parasitoids: underlying mechanisms and implications. *Basic Appl. Ecol.* 6: 215-236.
- Rozen, S., and H. Skaletsky. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz, S. and S. Misener (eds). *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press. Totowa, NJ, USA, pp: 365-386.
- Silva, I. M. M. S., J. Honda, F. V. Kan, J. G. Hu, L. Neto, B. Pintureau, and R. Stouthamer. 1999. Molecular differentiation of five *Trichogramma* species occurring in Portugal. *Biol. Control* 16: 177-184.
- Stevens, P. S. 1995. Host preferences of *Trichogrammatoidea Bactrae fumata* (Hym.: Trichogrammatidae) an egg parasitoid of leafrollers (Lep.: Tortricidae). *Entomophaga* 40: 379-385.
- Stouthamer, R., and J. H. Werren. 1993. Microbes associated with parthenogenesis in wasps of the genus *Trichogramma*. *J. Invertebr. Pathol.* 61: 6-9.
- Stouthamer, R., and R. F. Luck. 1993. Influence of microbe-associated parthenogenesis on the fecundity of *Trichogramma deion* and *Trichogramma pretiosum*. *Entomol. Exp. Appl.* 67: 183-192.
- Stouthamer, R., J. G. Hu, F. V. Kan, G. R. Platner, and J. D. Pinto. 1999. The utility of internally transcribed spacer 2 DNA sequences of the nuclear ribosomal gene for distinguishing sibling species of *Trichogramma*. *Biocontrol* 43: 421-440.
- Thorpe, K. W. 1985. Effects of height and habitat type on egg parasitism by *Trichogramma minutum* and *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera, Trichogrammatidae). *Agric. Ecosyst. Environ.* 12: 117-126.
- van-Lenteren, J. C., and V. Bueno. 2003. Augmentative biological control of arthropods in Latin America. *Biocontrol* 48: 123-139.
- Vejar-Cota, G., A. Caro, L.A. Rodríguez-del-Bosque, and D. Sahagún. 2005. Inundative releases of hymenopterous parasitoids against *Diatraea considerata* (Lepidoptera: Crambidae) on sugarcane in Northwestern México. *J. Entomol. Sci.* 40: 231-233.
- Walsh, P. S., D. A. Metzger, and R. Higuchi. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10:506-513.
- Williams, T., H. C. Arredondo-Bernal, and L. A. Rodríguez-del-Bosque. 2013. Biological pest control in México. *Annu. Rev. Entomol.* 58: 119-40.
- Yu, D. S. K., E. A. C. Hagley, and J. E. Laing. 1984. Biology of *Trichogramma minutum* Riley collected from apples in Southern Ontario. *Environ. Entomol.* 13: 1324-1329.