



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOLOGÍA
SISTEMÁTICA

**SISTEMÁTICA Y EVOLUCIÓN DE LOS GÉNEROS DE AVISPAS
PARASITOIDES DE LA TRIBU HOLCOBRACONINI CAMERON, 1905
(HYMENOPTERA: DORYCTINAE).**

TESIS

(POR ARTÍCULO CIENTÍFICO)

**SYSTEMATICS AND EVOLUTION OF THE PARASITOID WASPS GENERA OF THE
TRIBE HOLCOBRACONINI (HYMENOPTERA: BRACONIDAE: DORYCTINAE)**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

RUBÉN CASTAÑEDA OSORIO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ALEJANDRO ZALDÍVAR RIVERÓN

INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. ALFONSO NERI GARCÍA ALDRETE

INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

DR. CARLOS PEDRAZA LARA

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



OFICIO CPCB/001/2019

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM

Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **12 de noviembre de 2018** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Sistemática** del alumno **CASTAÑEDA OSORIO RUBÉN** con número de cuenta **517007648** por la modalidad de graduación de tesis por artículo científico titulado: **"Systematics and evolution of the parasitoid wasps genera of the Tribe Holcobraconini (Hymenoptera: Braconidae: Doryctinae)"**, que es producto del proyecto realizado en la maestría que lleva por título: **"Sistemática y evolución de los géneros de avispas parasitoides de la tribu Holcobraconini Cameron, 1905 (Hymenoptera: Doryctinae)**, ambos realizados bajo la dirección del **DR. ALEJANDRO ZALDÍVAR RIVERÓN**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. JUAN JOSÉ MORRONE LUPI
Vocal: M. EN C. MARÍA CRISTINA MAYORGA MARTÍNEZ
Secretario: DR. CARLOS SALVADOR PEDRAZA LARA
Suplente: M. EN C. ENRIQUE GONZÁLEZ SORIANO
Suplente: DR. MARK EARL OLSON

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 7 de enero de 2019


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



Agradecimientos institucionales

Al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y al Instituto de Biología de esta máxima casa de estudios.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante mis estudios de maestría.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por el apoyo otorgado para el proyecto de investigación “Estudios macro y microevolutivos en la familia Braconidae (Insecta: Hymenoptera) empleando herramientas filogenómicas”.
No. de proyecto: IN207016.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) de la UNAM por el apoyo económico otorgado durante mi estancia de investigación.

Al Dr. Alejandro Zaldívar Riverón, tutor principal de esta tesis.

A los miembros de mi comité tutorial, Dr. Alfonso Neri García Aldrete y Dr. Carlos Pedraza Lara, por sus revisiones de este trabajo y todas sus aportaciones y sugerencias, así como por acompañarme y guiarme durante la realización de este proyecto.

Agradecimientos personales

Al Dr. Alejandro Zaldívar Riverón, tutor principal de esta tesis. Por aceptarme en su equipo de trabajo, por compartirme su conocimiento y animarme a continuar con mi desarrollo y superación profesional, sobre todo por confiar en mí a pesar de los errores que cometí y por guiarme y apoyarme dentro y fuera del Instituto, gracias por abrirme las puertas de su hogar.

Al Dr. Sergey Belokobylskij y al Dr. Yves Braet, piezas fundamentales en la realización de este proyecto. Por recibirme durante mi estancia académica, por su colaboración y todas las facilidades académicas y personales, por su hospitalidad, por enseñarme parte del mundo y las maravillosas ciudades que pude conocer. Спасибо, Merci beaucoup!

Al Museo del Instituto Real de Ciencias Naturales en Bruselas, Bélgica, al Museo Real de África Central en Tervuren, Bélgica, y al Museo e Instituto de Zoología en Varsovia, Polonia. Por permitirme visitar las colecciones entomológicas y revisar el material y por la facilidad para usar sus instalaciones.

A los miembros del jurado, Dr. Juan José Morrone Lupi, M. en C. María Cristina Mayorga Martínez, Dr. Carlos Pedraza Lara, M. en C. Enrique Gonzales Soriano y al Dr. Mark Earl Olson, por tomarse el tiempo para revisar y corregir este trabajo.

A Cristi, por toda su ayuda y apoyo en la Colección Nacional de Insectos. **A Guille Ortega**, por su ayuda con el material entomológico. **A Susana Guzmán**, por el tiempo y la asesoría otorgados para la toma de fotografías. **A Chío**, por toda su ayuda con las cuestiones administrativas.

Al equipo de trabajo “Zaldívar’s Team”. Por toda su ayuda, orientación y paciencia, por enriquecer este trabajo, por los momentos serios dentro de Instituto y todos los momentos agradables y felices que compartimos desde mi llegada a la UNAM. ¡Los llevo en mi corazón!

A mi familia. Le agradezco a mis padres y hermanos por todo su apoyo, por motivarme a seguir creciendo, por sus consejos y su paciencia, y por su amor incondicional. Y mi familia y amigos en casa, no importa la distancia, siempre estaré con ustedes.

A Christian Delgado, mi compañero de vida. Por tu apoyo constante y compañía, por creer en mí y compartir tu vida conmigo, por tu motivación y por estar para mí en todo momento, en las buenas y en las malas. ¡Gracias por llenarme de felicidad, por todo tu cariño, amor y comprensión!

¡A todos, gracias!

A mis padres

“La taxonomía (la ciencia de la clasificación) a menudo se subestima como una forma glorificada de archivo: con cada especie en su carpeta, como un sello en su lugar prescrito en un álbum; pero la taxonomía es una ciencia fundamental y dinámica, dedicada a explorar las causas de las relaciones y similitudes entre los organismos. Las clasificaciones son teorías sobre la base del orden natural, no catálogos aburridos compilados solo para evitar el caos”.

Stephen Jay Gould, *Wonderful Life: The Burgess Shale and the Nature of History*, 1990

“Nuestras clasificaciones llegarán a ser, en la medida en que puedan hacerse, genealogías”.

Charles Darwin, *En el Origen de las Especies*, 1859

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
<i>Orden Hymenoptera</i>	4
<i>Familia Braconidae</i>	4
<i>Subfamilia Doryctinae</i>	7
<i>Tribu Holcobraconini</i>	9
<i>Historia taxonómica de Holcobraconini y géneros afines</i>	13
JUSTIFICACIÓN	17
OBJETIVOS	18
MANUSCRITO DEL ARTÍCULO	19
DISCUSIÓN	71
<i>Relaciones filogenéticas</i>	71
<i>Límites genéricos</i>	73
<i>Tiempos de divergencia e inferencias biogeográficas</i>	74
CONCLUSIONES	78
LITERATURA CITADA	79

Lista de Figuras

- Figura 1.** Especímenes de algunas subfamilias representantes de Braconidae: A) *Aclitus* sp. (Aphidiinae); B) *Atanycolus cappaerti* (Braconinae); C) *Sharkeyella* sp. (Doryctinae); D) *Maxfischeria folkertsorum* (Maxfischeriinae); E) *Mesostoa kerri* (Mesostoinae); F) *Cotesia glomerata* (Microgastrine); G) *Pambolus albospina* (Pambolinae); H) *Histeromerus mystacinus* (Rhyssalinae); (Fuente: Quicke, 2015).
.....6
- Figura 2.** Esquema de la morfología generaliza de Doryctinae (Braconidae) (Fuente: Quicke, 2015). 8
- Figura 3.** Géneros de Holcobraconini, Binareini y Doryctini tomados en cuenta para este estudio (Habito dorsal). A) *Nervellius exquisitus*; B) *Ivondrovia seyrigi*; C) *Liodoryctes australiensis*; D) *Odontobracon janzeni*; E) *Zombrus* sp. aff. *croceipes*; F) *Binarea pulchripes*; G) *Liobracon* sp. aff. *geniculatus*; H) *Odontodoryctes biannulatus* (Fuente: elaboración propia)..... 10
- Figura 4.** Características diagnósticas que distinguen a los géneros de la tribu Holcobraconini. A) ala posterior mostrando vena m-cu curvada; B) segundo terguito metasomal con área oval levantada; C) coxa posterior con un diente; D) coxa posterior con dos dientes; E) depósito de veneno; F) setas subctenidiales del ovipositor. (Fuente: Rahman *et al.*, 1998; Belokobylskij *et al.*, 2004 y elaboración propia). 12

RESUMEN

La tribu Holcobraconini (Hymenoptera: Braconidae) es un grupo de avispas parasitoides de la subfamilia Dorcytinae que contiene seis géneros (*Holcobracon*, *Nervellius*, *Ivondrovia*, *Liodoryctes*, *Odontobracon* y *Zombrus*) distribuidos principalmente en áreas tropicales y subtropicales del mundo. Esta tribu está representada por ectoparasitoides idiobiontes de larvas de escarabajos xilófagos y barrenadores de madera de las familias Cerambycidae y probablemente Cleridae. Tradicionalmente, la tribu se caracteriza por tener la vena m-cu del ala posterior muy larga y fuertemente curvada hacia el margen apical. Sin embargo, estudios morfológicos y moleculares han relacionado estrechamente con Holcobraconini a cuatro géneros (*Binarea*, *Liobracon*, tribu Binareini; *Monarea*, *Odontodoryctes*, tribu Doryctini) a pesar de que no comparten el carácter diagnóstico de la tribu. En el presente estudio se reconstruyeron las relaciones filogenéticas entre especies de cinco de los seis géneros de Holcobraconini y de especies de los cuatro géneros cercanamente relacionados con base en un marcador genético mitocondrial y tres nucleares. También se estimaron los tiempos de origen y diversificación dentro del grupo usando un método de reloj molecular relajado y se examinó la morfología externa de los géneros involucrados para definir caracteres diagnósticos confiables. La tribu se recuperó como parafilética con respecto a *Binarea*, *Liobracon*, *Monarea* y *Odontodoryctes*. Los géneros fueron recuperados como monofiléticos excepto *Liobracon* y *Zombrus*. *Acanthodoryctes*, *Antidoryctes* y *Priosphys* también se incluyeron dentro de la tribu con base en morfología externa. Con base en evidencia molecular y la revisión morfológica de los géneros involucrados se propone que Holcobraconini esté representado por 13 géneros. El origen de Holcobraconini se estimó que ocurrió durante el Paleoceno tardío y el Eoceno medio, entre 44.43 y 58.15 Ma. Al menos dos principales eventos de dispersión ocurrieron desde la región Etiópica a las regiones biogeográficas restantes. La distribución geográfica actual de la tribu parece haber sido el resultado de un incremento en la temperatura durante un evento geológico conocido como el Máximo térmico del Paleoceno–Eoceno. Este evento permitió la dispersión de los miembros de Holcobraconini a ambientes antiguamente más fríos, originando su distribución pantropical actual con presencia de pocas especies en el Neártico y Paleártico.

ABSTRACT

The tribe Holcobraconini (Hymenoptera: Braconidae) is a small group of parasitoid wasps of the subfamily Doryctinae that contains six genera (*Holcobracon*, *Nervellius*, *Ivondrovia*, *Liodoryctes*, *Odontobracon* and *Zombrus*) mainly distributed in tropical and subtropical areas of the world. This tribe is represented by idiobiont ectoparasitoids of bark boring or xylophagous beetle larvae of the families Cerambycidae and perhaps Cleridae. Traditionally, the tribe is characterized by having the m-cu vein of the hind wing very long and strongly curved towards its apical margin. However, recent morphological and molecular phylogenetic studies have revealed that members of Holcobraconini are closely related to four genera (*Binarea*, *Liobracon*, *Binareini*; *Monarea*, *Odontodoryctes*, *Doryctini*) that do not share the diagnostic character of the tribe. In the present study, phylogenetic relationships were reconstructed among representative species of five of the six Holcobraconini genera and species of the four closely related genera based on one mitochondrial and three nuclear gene markers. Times of origin and main diversification events within the group were also estimated using a bayesian relaxed molecular clock approach and the external morphology of the genera involved was examined to define reliable diagnostic characters. The tribe was recovered as paraphyletic with respect to *Binarea*, *Liobracon*, *Monarea* and *Odontodoryctes*. Most genera were recovered as monophyletic, except *Liobracon* and *Zombrus*. *Acanthodoryctes*, *Antidoryctes* and *Priosphys* were also included within the Holcobraconini based on external morphology. Based on the molecular evidence and the morphological examination of the genera involved, the Holcobraconini is proposed to comprise 13 genera. The origin of Holcobraconini was estimated to have occurred during the Late Paleocene and Middle Eocene, 44.43 to 58.15 Mya. At least two main dispersal events occurred from the Ethiopian to the remaining biogeographic regions. The current geographical distribution of the tribe seems to be closely related to an increase in temperature during a geological event known as the Paleocene-Eocene Thermal Maximum. This event allowed the dispersal of the Holcobraconini species to environments that were formerly colder, giving as a result its current pantropical distribution with presence of few species in the Nearctic and Palearctic regions.

INTRODUCCIÓN

Realizar estudios filogenéticos globales de grupos biológicos ampliamente distribuidos constituye una herramienta apropiada en un contexto evolutivo para documentar patrones biogeográficos históricos de vicarianza, dispersión, especiación y extinción, así como los procesos que dan lugar a dichos patrones (Guo *et al.*, 2012; Economo *et al.*, 2015). En este contexto, los estudios filogenéticos a gran escala nos permiten entender la dinámica de los procesos que causan la riqueza de especies de los diferentes grupos taxonómicos y permiten conocer el origen de esta diversidad biológica y sus cambios a lo largo del tiempo por medio de la estimación de los tiempos de origen y divergencia y de la reconstrucción de la distribución espacial ancestral.

Un gran número de estudios biogeográficos a escala global se han enfocado principalmente en ciertos grupos de vertebrados y de plantas, en donde los eventos vicariantes han jugado un papel predominante en la distribución actual de muchos de sus grupos. Relativamente pocos trabajos han investigado con detalle los procesos biogeográficos que dieron lugar a los patrones de distribución actual de la mayoría de los grupos de invertebrados, incluyendo insectos, de amplia distribución en el planeta (p. ej. Guo *et al.*, 2012; Economo *et al.*, 2015). A continuación se presentan algunos ejemplos representativos de estudios biogeográficos a escala global con grupos de insectos.

Estudios biogeográficos globales recientes realizados con abejas sin aguijón de la tribu Meliponini (Rasmussen & Cameron, 2009) y con polillas de la subfamilia Choreutidae (Rota *et al.*, 2016) mostraron en ambos grupos un patrón de distribución pantropical disyunta, el cual se puede explicar por un evento vicariante en su historia evolutiva temprana, mientras que eventos de dispersión y de dispersión a gran distancia con subsecuente establecimiento explican en gran medida la distribución actual del grupo.

Por otra parte, estudios realizados con escarabajos coprófagos de la familia Scarabaeidae distribuidos en Madagascar (Solé *et al.*, 2011) y de insectos palo (Phasmatodea) presentes en las islas Mascareñas (Bradler *et al.*, 2015) mostraron que estos organismos probablemente colonizaron estas islas a partir de África y de la región australiana, respectivamente, seguida por un evento de radiación y eventos independientes de dispersión a lo largo de su distribución actual, en contraposición a la teoría de que su distribución fue modelada por eventos vicariantes antiguos.

Orden Hymenoptera

Hymenoptera constituye uno de los órdenes de insectos holometábolos con mayor diversidad y riqueza de especies. A la fecha se han descrito aproximadamente 144,695 especies a nivel mundial (Huber, 2009). Los himenópteros son un grupo ampliamente distribuido, estando presentes en casi todos los hábitats terrestres excepto en las regiones polares, y son principalmente abundantes en regiones tropicales y subtropicales del mundo; algunos son de hábitos diurnos y otros de hábitos nocturnos (Gauld & Bolton, 1988, Goulet & Huber, 1993).

Los himenópteros son muy diversos en cuanto al número de especies y a las historias de vida que han evolucionado dentro de este grupo. En este orden se encuentran la mayoría de los insectos parasitoides y sociales, así como una gran variedad de especialistas tanto depredadores como herbívoros. Asimismo, los himenópteros exhiben una amplia gama de comportamientos asociados a la biología de estos organismos, como el despliegue sexual y el cuidado parental (Malyshev, 1968; Austin & Dowton, 2000). Debido a lo anterior, los himenópteros, así como todos los grupos biológicos, han alcanzado una alta complejidad y especialización evolutiva, y han desarrollado múltiples adaptaciones estructurales, fisiológicas y simbióticas (Malyshev, 1968; Austin & Dowton, 2000). Esto hace de los himenópteros un grupo ideal para realizar extensos estudios evolutivos, ecológicos y de comportamiento, y para probar diferentes hipótesis biológicas y filogenéticas a gran escala.

Familia Braconidae

Braconidae es una familia de himenópteros pertenecientes a la superfamilia Ichneumonoidea, la cual incluye también a la familia Ichneumonidae. Braconidae es la segunda familia más grande de himenópteros (Figura 1). El número de especies de braconidos descritos a la fecha es de 18,000, aunque los estimados llegan a las 40,000 especies, y se encuentran agrupadas en 47 subfamilias reconocidas (Goulet & Huber, 1993; Quicke, 2015). Sin embargo, no existe un consenso sobre el número exacto de subfamilias ya que la clasificación en este nivel es considerablemente inestable (Wharton *et al.*, 1997). Tradicionalmente, la familia Braconidae se divide en dos grandes grupos, los ciclóstomos y no ciclóstomos, dependiendo si las piezas bucales adoptan la condición ciclostoma. En esta condición, la porción ventral del clípeo está

rebajada, y junto con el labro cóncavo, forman una depresión redondeada por encima de la mandíbula (Goulet & Huber, 1993; Wharton *et al.*, 1997; Quicke, 2015).

La distribución de los braconídeos es cosmopolita y son muy diversos en regiones tanto tropicales y templadas como en hábitats húmedos y secos (Goulet & Huber, 1993), pero la mayoría de las especies prefieren los climas templados y secos (Gauld & Bolton, 1988).

La gran mayoría de las especies de Braconidae son parasitoides de otros grupos de insectos (Wharton *et al.*, 1997), esto es, que completan su desarrollo larval a expensas de un organismo huésped causando invariablemente su muerte, aunque también se tienen registros de algunas especies que son fitófagas (Gauld & Bolton, 1988; Quicke, 2015). Los huéspedes más comunes suelen ser larvas de lepidópteros, coleópteros y dípteros, pero también se ha reportado que parasitan huevos, pupas, ninfas y organismos adultos (Goulet & Huber, 1993, Wharton *et al.*, 1997).

Existe una variedad de estrategias de parasitoidismo presentes en los braconídeos que van de la mano con la gran riqueza de especies de esta familia. Estas estrategias pueden ser de ectoparasitoidismo o endoparasitoidismo, siendo este último mayormente representado (Wharton *et al.*, 1997). Los braconídeos ectoparasitoides generalmente son idiobiontes, en esta estrategia el huevo puede ser depositado directamente sobre el huésped o cerca de él, y la larva se alimenta externamente del huésped inmóvil que deja de desarrollarse después de haber sido paralizado por la hembra (Gauld & Bolton, 1988; Goulet & Huber, 1993; Wharton *et al.*, 1997; Quicke, 2015). Por otro lado, los endoparasitoides generalmente son koinobiontes, esto es, que paralizan temporalmente a su huésped, o incluso no lo paralizan, y éste continúa desarrollándose y alimentándose después de ser parasitado (Gauld & Bolton, 1988; Goulet & Huber, 1993; Wharton *et al.*, 1997). Los endoparasitoides koinobiontes generalmente pasan la mayoría de su desarrollo dentro del huésped emergen cerca del final de su desarrollo cuando el huésped está cerca de morir y finalmente pupan sobre, cerca o lejos de él (Gauld & Bolton, 1988; Goulet & Huber, 1993; Wharton *et al.*, 1997; Quicke, 2015).

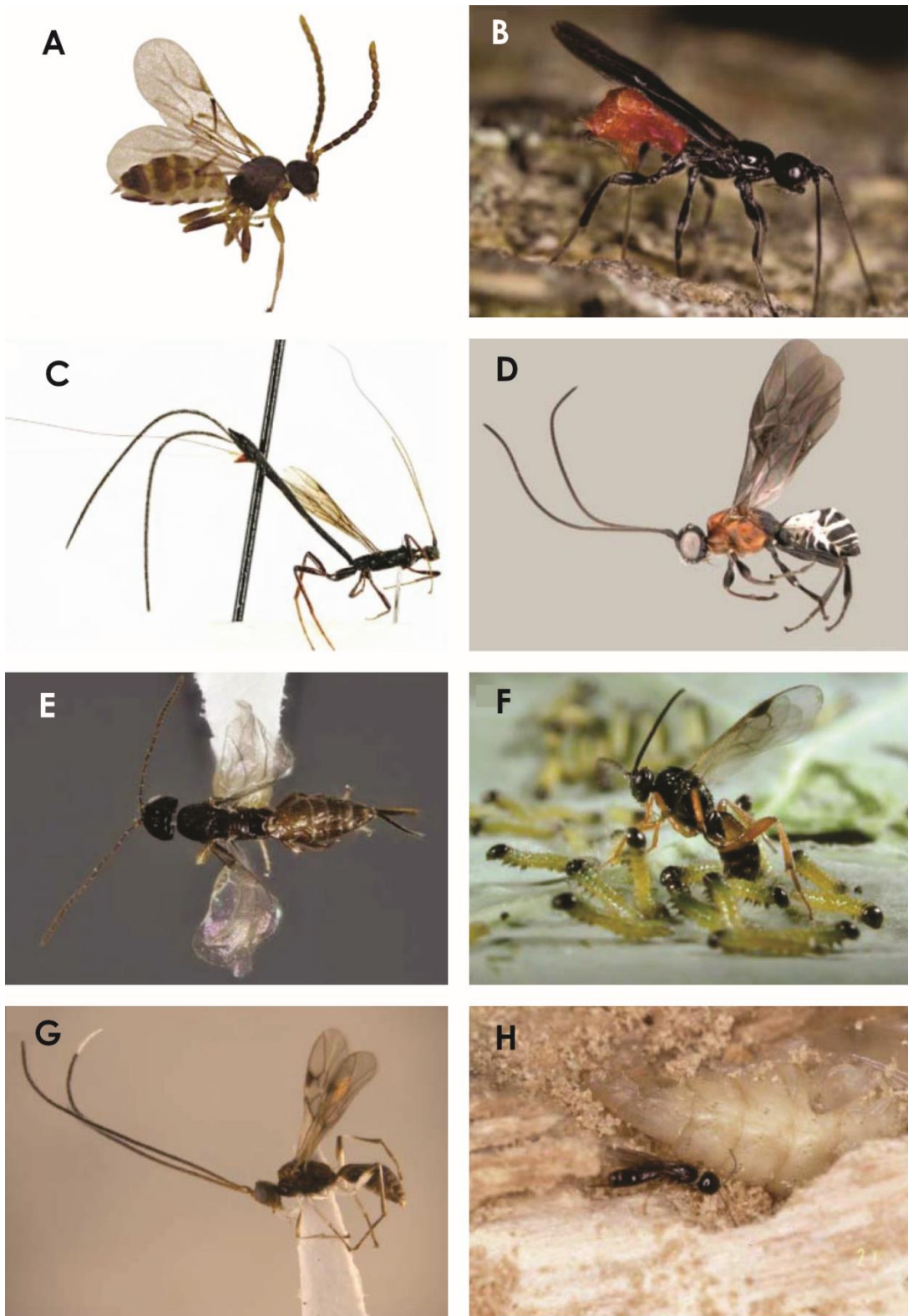


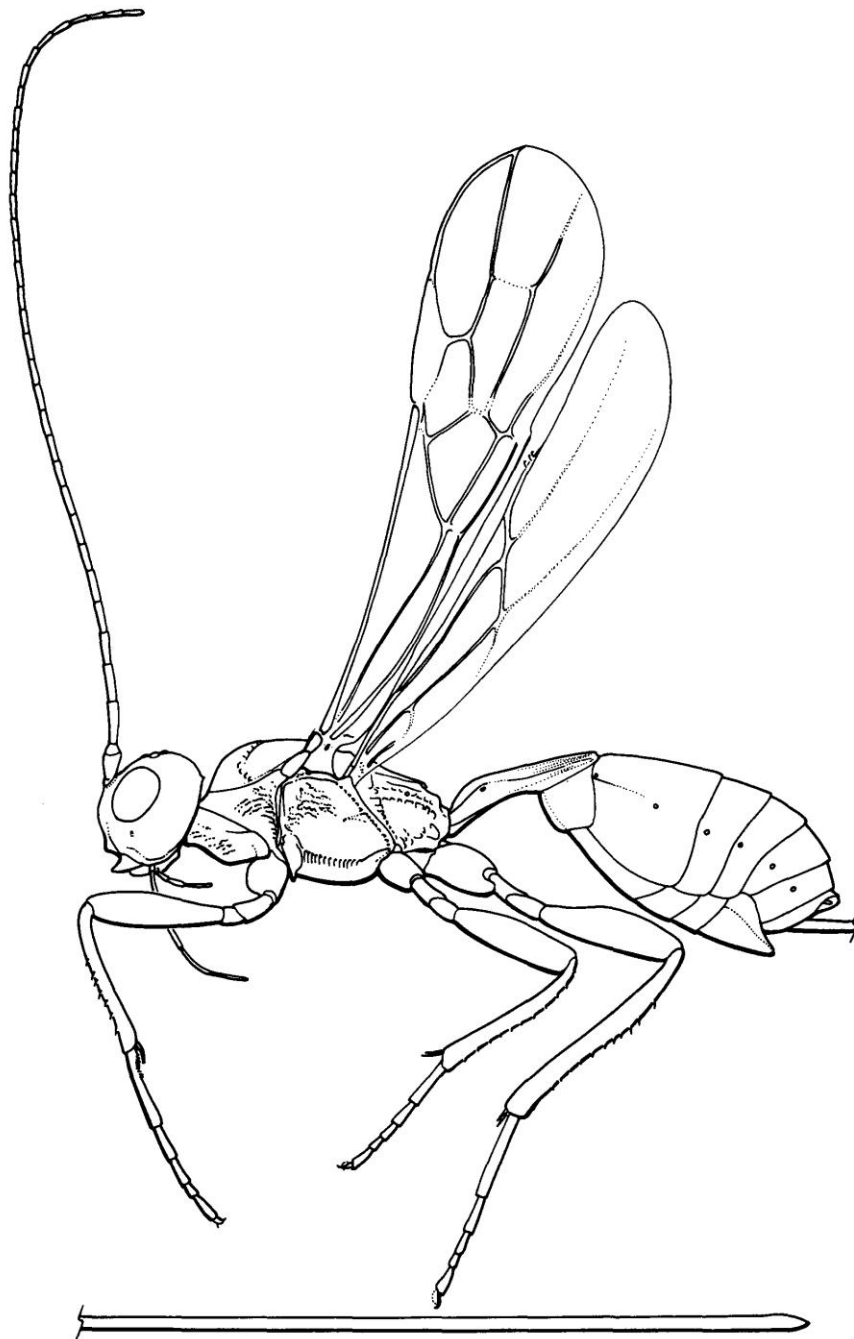
Figura 1. Especímenes de algunas subfamilias representantes de Braconidae: A) *Aclitus* sp. (Aphidiinae); B) *Atanycolus cappaerti* (Braconinae); C) *Sharkeyella* sp. (Doryctinae); D) *Maxfischeria folkertsorum* (Maxfischeriinae); E) *Mesostoa kerri* (Mesostoinae); F) *Cotesia glomerata* (Microgastrine); G) *Pambolus albospina* (Pambolinae); H) *Histeromerus mystacinus* (Rhyssalinae); (Fuente: Quicke, 2015).

Subfamilia Doryctinae

Doryctinae es una de las subfamilias de bracónidos con mayor número de especies (Figura 2). Actualmente, la subfamilia contiene más de 1700 especies descritas en aproximadamente 200 géneros, agrupadas en 13 tribus y 21 subtribus (Belokobylskij *et al.*, 2004; Zaldívar-Riverón *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2016). No obstante, las relaciones dentro de la subfamilia son pobremente conocidas, y muchas de las características usadas por los autores para la diagnosis de las tribus representan sólo “tendencias morfológicas” (Belokobylskij *et al.*, 2004; Quicke, 2015). A pesar de esto, se han realizado varios esfuerzos para dilucidar las relaciones filogenéticas de esta subfamilia empleando métodos filogenéticos formales con base en diferentes sistemas de caracteres tanto morfológicos (Belokobylskij *et al.*, 2004), como moleculares (Zaldívar-Riverón *et al.*, 2008). Sin embargo, estos análisis han puesto en evidencia que muchas de estas tribus no son monofiléticas.

La distribución geográfica de los miembros de Doryctinae es cosmopolita, pero es particularmente diversa en las regiones tropicales del mundo (Goulet & Huber, 1993; Wharton *et al.*, 1997; Quicke, 2015). Las especies de doryctinos generalmente son ectoparasitoides idiobiontes de larvas de coleópteros barrenadores y xilófagos, aunque también pueden parasitar algunos himenópteros y lepidópteros (Gauld & Bolton, 1988; Goulet & Huber, 1993; Wharton *et al.*, 1997; Quicke, 2015). No obstante, en décadas recientes se ha descubierto que algunos doryctinos son fitófagos, pudiendo ser depredadores de semillas o formadores de agallas, como los géneros *Allorhogas*, Gahan y *Monitoriella*, Hedqvist respectivamente (Gauld & Bolton, 1988; Marsh *et al.*, 2000; Zaldívar-Riverón *et al.*, 2007; Quicke, 2015).

Estudios filogenéticos moleculares recientes realizados por Zaldívar-Riverón y colaboradores (2008) evaluaron la monofilia de la subfamilia Doryctinae y la composición de las tribus que incluye a través de un análisis con dos marcadores moleculares, uno nuclear (28S) y uno mitocondrial (COI). Este estudio reveló que las clasificaciones de tribu y subtribu parecen no reflejar la historia evolutiva del grupo. Por el contrario, éstas relaciones aparentan ser más congruentes con la distribución geográfica de los taxones que con su morfología, por lo que se enfatiza que la morfología de los doryctinos es altamente homoplásica y que las características diagnósticas de las tribus representan meras tendencias morfológicas.



Braconidae: Doryctinae

Figura 2. Esquema de la morfología generaliza de Doryctinae (Braconidae) (Fuente: Quicke, 2015).

Además, este estudio incluyó un análisis de fechamiento molecular para calcular los tiempos de origen y divergencia de los principales grupos de Doryctinae. El resultado de este análisis sugirió que Doryctinae y sus grupos principales se originaron durante el Paleoceno Tardío y el Eoceno Temprano. La separación de Doryctinae de las otras subfamilias de ciclóstomos ocurrió hace 55.13 a 59.6 millones de años (media = 57.61; s.d. = 1.56), mientras que la separación de los dos clados principales dentro de Doryctinae ocurrió poco después hace 53.73 a 58.92 millones de años (media = 56.07; s.d. = 1.7), por lo que es posible que la radiación de Doryctinae, así como de muchos otros grupos de animales, ocurriera después del evento de extinción masiva del Cretácico-Terciario (K/T) como resultado de diversos eventos de dispersión entre América y África (Zaldívar-Riverón *et al.*, 2008).

En el estudio anterior también se llevó a cabo un análisis de reconstrucción de la distribución ancestral, el cual indicó que los dos clados principales de Doryctinae tienen distribuciones disyuntas. Uno de estos clados tiene distribución ancestral en el norte de Sudamérica y el segundo clado tiene una distribución ancestral en África. Estos resultados se obtuvieron mediante un análisis de dispersión-vicarianza (DIVA), el cual evalúa los escenarios biogeográficos plausibles entre los nodos presentes de una filogenia bayesiana con el mayor número de clados con soporte significativo (Zaldívar-Riverón *et al.*, 2008).

Tribu Holcobraconini

Holcobraconini Cameron, 1905 es una pequeña tribu de avispa parasitoides de tamaño grande y conspicuas (Figura 3). Los miembros de esta tribu se distribuyen ampliamente en todas las regiones biogeográficas del mundo, aunque su riqueza específica se concentra en zonas tropicales y subtropicales, y pueden llegar a estar presentes al sur de las regiones Paleártica y Neártica (Shenefelt & Marsh, 1976; Yu *et al.*, 2016). Los registros de huéspedes que se han reportado para las especies de Holcobraconini cuya biología es conocida indican que son ectoparasitoides idiobiontes de larvas de escarabajos barrenadores de madera y xilófagos de la familia Cerambycidae y probablemente también Cleridae (Belokobylskij, 1992).

Holcobraconini es una tribu monofilética perteneciente a la subfamilia Doryctinae (Braconidae) y su monofilia está soportada con base en evidencia morfológica y molecular

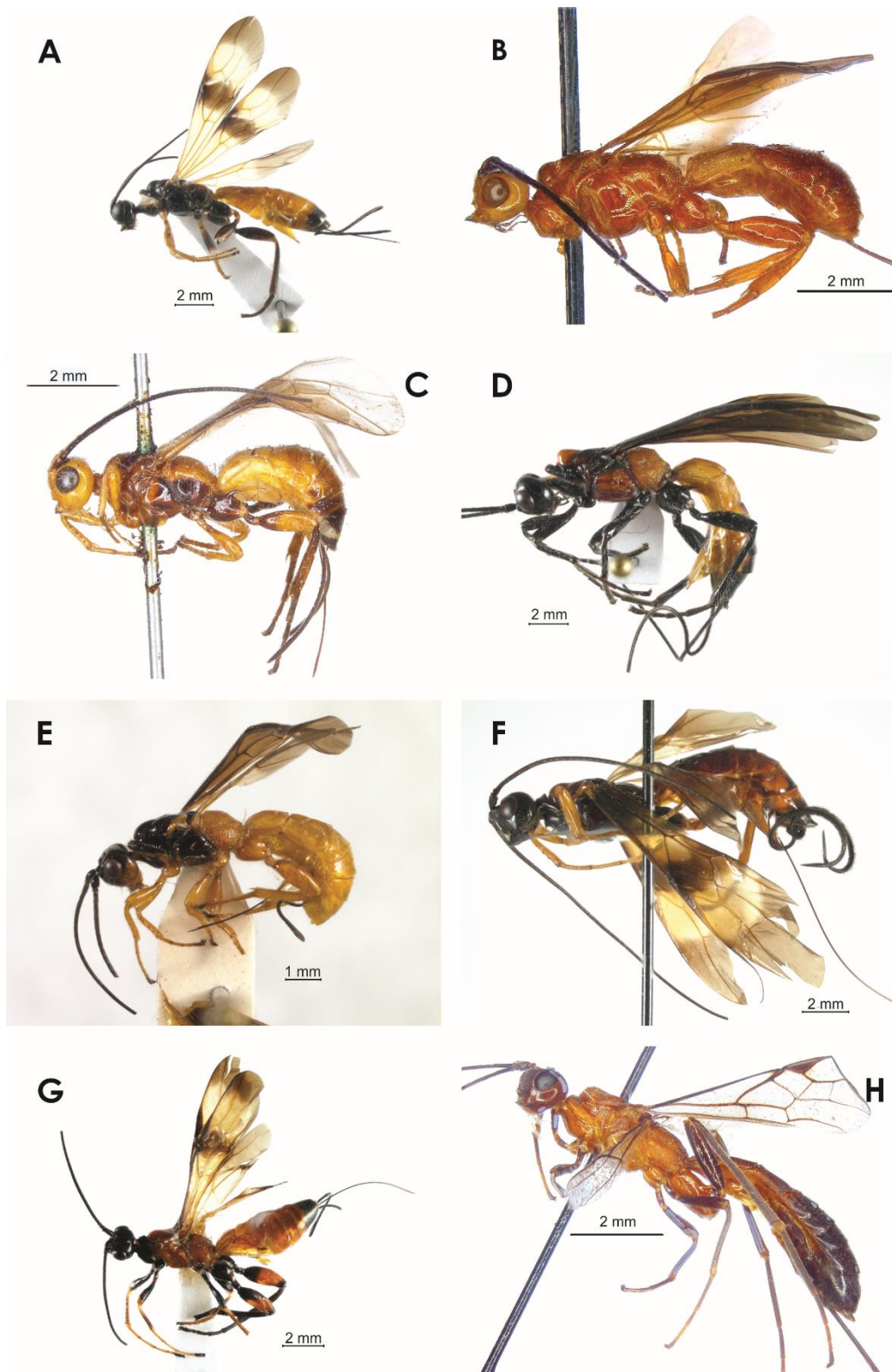


Figura 3. Géneros de Holcobraconini, Binareini y Doryctini tomados en cuenta para este estudio (Habito dorsal). A) *Nervellius exquisitus*; B) *Ivondrovia seyrigi*; C) *Liodoryctes australiensis*; D) *Odontobracon janzeni*; E) *Zombrus* sp. aff. *croceipes*; F) *Binarea pulchripes*; G) *Liobracon* sp. aff. *geniculatus*; H) *Odontodoryctes biannulatus* (Fuente: elaboración propia).

(Belokobylskij *et al.*, 2004; Zaldívar-Riverón *et al.*, 2008). Tradicionalmente, la tribu se divide en tres subtribus: Holcobraconina, con los géneros *Holcobracon* Cameron, 1905 principalmente distribuido en la región Neotropical pero también presente en la Oriental; y *Nervellius* Roman, 1924 (Figura 3A), restringido a la región Neotropical; Ivondroviina que incluye al género *Ivondrovia* Shenefelt & Marsh, 1976 (Figura 3B), restringido a la región Etiópica; y Odontobraconina que está compuesta por los géneros *Liodoryctes* Szépligeti, 1906 (Figura 3C), distribuido en la región Australiana; *Odontobracon* Cameron, 1887 (Figura 3D) que se distribuye en las regiones Neotropical y Neártica; y *Zombrus* Marshall, 1897 (Figura 3E), ocurriendo principalmente en la región Etiópica, pero con pocas especies en las regiones Australiana, Paleártica y Oriental (Belokobylskij, 1992; Belokobylskij & Samartsev, 2011; Yu *et al.*, 2016; Long *et al.*, 2018).

La característica morfológica que distingue a los miembros de la tribu es la vena larga m-cu muy larga y fuertemente curveada hacia el margen apical del ala posterior (Fig. 4A) (Marsh, 1970; Belokobylskij, 1992). Esta característica ha sido tradicionalmente empleada por diversos autores como caracter sinapomórfico, esto es, que reúnen a estos géneros como un grupo monofilético (Cameron, 1905; Marsh, 1988; Belokobylskij, 1992; Rahman, 1998; Belokobylskij *et al.*, 2004). Otras características que definen a la tribu son: el segundo terguito metasomal usualmente con un área oval grande y abultada (Fig. 4B) y la coxa posterior sin ángulo baso-ventral ni tubérculo basal usualmente con uno o dos procesos dorsales (Fig. 4C, 4D). Sin embargo, sólo la primera característica es exclusiva de la tribu, mientras que las dos últimas se comparten con otros grupos de doryctinos (por ejemplo, con miembros del grupo del género *Pedinotus* y algunos miembros de Doryctini; Belokobylskij *et al.*, 2004; Samacá-Sáenz *et al.*, 2016).

Estudios morfológicos y filogenéticos moleculares llevados a cabo para Doryctinae han recuperado a algunos géneros de holcobraconinos estrechamente relacionados con *Acanthodoryctes* Turner, 1918, *Antidoryctes* Belokobylskij & Quicke, 2000, *Binarea* Brullé, 1846 (Figura 3F), y *Liobracon* Szépligeti, 1901 (Figura 3G) de la tribu Binareini, así como *Monarea* Szépligeti, 1904, *Odontodoryctes* Granger, 1949 (Figura 3H) y *Priosphys* Enderlein, 1920 de la tribu Doryctini (Belokobylskij *et al.*, 2004, 2014; Zaldívar-Riverón *et al.*, 2006, 2007, 2008).

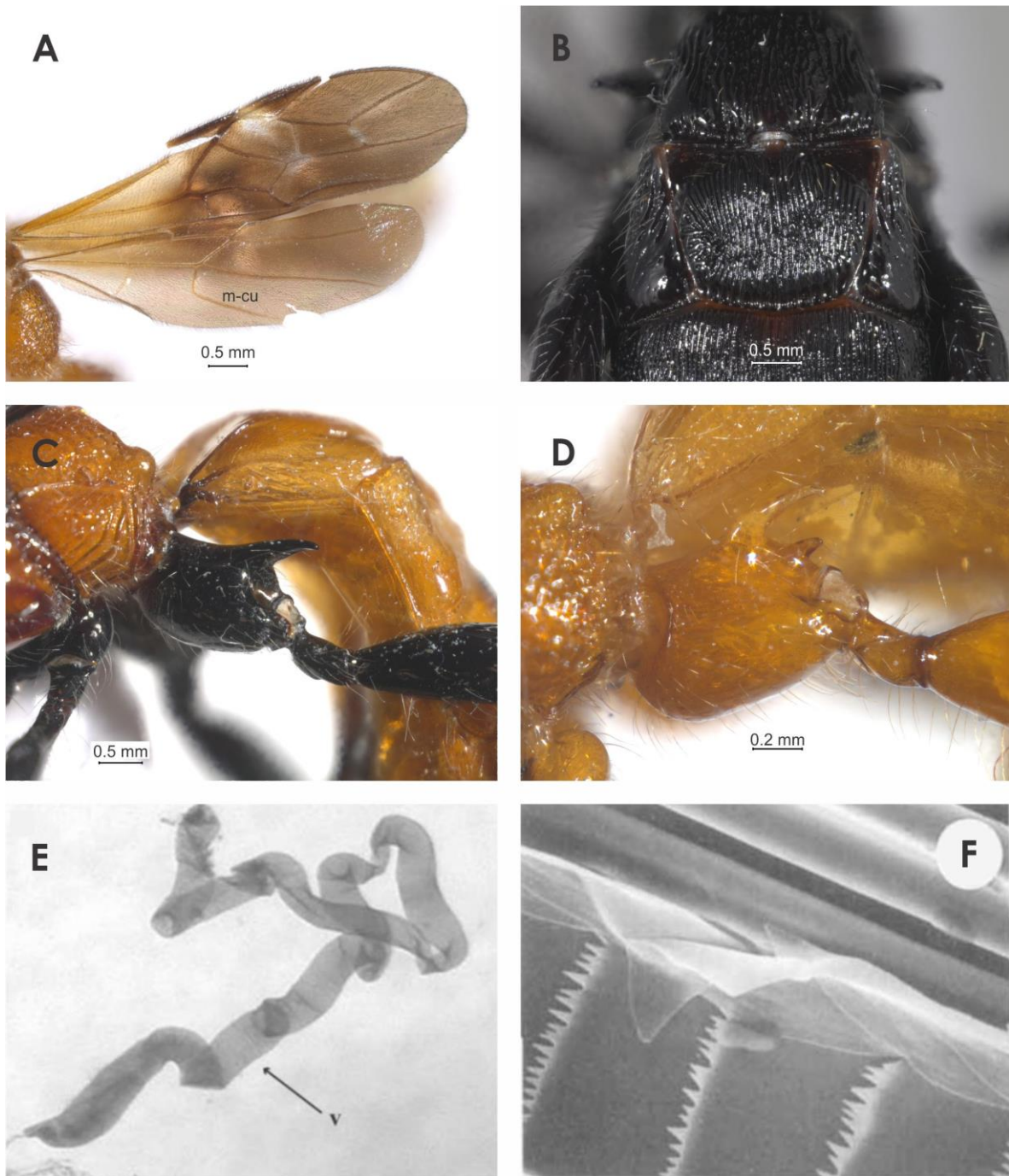


Figura 4. Características diagnósticas que distinguen a los géneros de la tribu Holcobraconini. A) ala posterior mostrando vena m-cu curvada; B) segundo terguito metasomal con área oval levantada; C) coxa posterior con un diente; D) coxa posterior con dos dientes; E) depósito de veneno; F) setas subctenidiales del ovipositor. (Fuente: Rahman *et al.*, 1998; Belokobylskij *et al.*, 2004 y elaboración propia).

Además, estudios morfológicos comparativos han revelado que algunas especies de Holcobraconini comparten con las de Binareini un depósito de veneno elongado, más o menos paralelo a los lados, de apariencia tubular y finamente esculpido (Figura 4E), y un ovipositor con setas subctenidiales extremadamente aplanadas produciendo estructuras sobrepuestas parecidas a hojuelas (Figura 4F), con la primera característica compartida también con *Monarea* (Quicke *et al.*, 1992; Rahman *et al.*, 1998; Belokobylskij *et al.*, 2014). En adición, estudios previos han sugerido la pertenencia de *Odontodoryctes* y *Priosphys* a la tribu con base en la presencia de un proceso dorsal en las coxas posteriores (Belokobylskij *et al.*, 2004).

El estudio filogenético molecular realizado por Zaldívar-Riverón y colaboradores (2008), recuperó a la tribu Holcobraconini como grupo hermano de dos clados principales, uno compuesto principalmente por géneros sudamericanos, como *Acanthorogas*, *Acrophasmus*, *Aivalikus*, *Allorhogas*, *Aphelopsia*, *Barbalhoa*, *Curtisella*, *Curtiselloides*, *Ecpnylus*, *Hansonorum*, *Hecabolus*, *Heerz*, *Heterospilus*, *Histeromeroideis*, *Johnsonius*, *Labania*, *Lamquetia*, *Leluthia*, *Monitoriella*, *Notiospathius*, *Ondigus*, *Osmophila*, *Parallorhogas*, *Pedinotus*, *Percnobracon*, *Polystenus*, *Psenobolus*, *Semirhytus*, *Stenocorse* y *Tarasco*; y el otro clado compuesto exclusivamente por los géneros australianos *Arkoola*, *Jarra*, *Ontsira* y *Syngaster*.

El estudio de Zaldívar-Riverón *et al.* (2008) también sugiere que Holcobraconini se originó durante el Eoceno Medio y el Paleoceno Tardío con la separación de Holcobraconini del clado Sudamericano-Australiano hace 40.16 a 57.26 millones de años (media = 52.11; s.d. = 3.48), ubicando al ancestro común más reciente de la tribu hace 24.50 a 46.32 millones de años (media = 34.36; s.d. = 4.15).

Historia taxonómica de Holcobraconini y géneros afines

Holcobraconini fue constituida como tribu por Cameron (1905), en un estudio en el que incluyó descripciones de nuevas especies y géneros de himenópteros fitófagos y parásitos de Ceilán (actualmente Sri Lanka). A pesar de que la posición taxonómica de la tribu se ha mantenido estable desde que fue erigida, su nomenclatura ha experimentado ciertos cambios.

A finales de la década de 1920 se le dio el nombre de Acanthobraconini propuesto por Fahringer (1928). A partir de la segunda mitad del siglo XX, Granger (1949) erigió la subfamilia Odontobraconinae y reconoce a la tribu como Odontobraconini (Granger, 1968), siendo este nombre el más frecuentemente empleado por diversos autores y en diversos trabajos para referirse al grupo. Fue hasta 1992 que Belokobylskij reconoce como válido el nombre de Holcobraconini y lo restituye como tribu, el cual le corresponde por el principio de prioridad, en un trabajo en el que lleva a cabo un análisis de la filogenia y clasificación de la subfamilia Doryctinae.

El género *Holcobracon* es el género tipo e incluye tres especies, *H. fulvus* Cameron, 1905, *H. inarmatus* (Cameron, 1910) y *H. limatus* (Cresson, 1865). El género *Nervellius* contiene siete especies descritas, *N. costaricensis* Marsh, 1988, *N. darwini* Marsh, 1988, *N. exquisitus* Braet & Barbalho, 2003, *N. paulista* Penteado-Dias, 1996, *N. subdivisus* Roman, 1924, *N. tricoloratus* Marsh, 1988 y *N. philippus* Braet, 2014. Estos géneros se diferencian entre sí porque la celda marginal del ala posterior del primero está dividido por una vena transversal débilmente nebulosa, mientras que el segundo carece de esta vena.

Ivondrovia es un género con dos especies descritas, *I. seyrigi* (Granger, 1949) e *I. grangeri* Belokobylskij, Zaldívar-Riverón & Castaneda-Osorio, 2018 y se distinguen por presentar un notauli profundo y completo; carina occipital completamente ausente y el propodeo principalmente liso con una carina media larga y una areola delineada.

El género *Liodoryctes* agrupa seis especies, *L. atriceps* Turner, 1918, *L. australiensis* (Szepligeti, 1902), *L. dentifer* (Strand, 1911), *L. erythrothorax* Turner, 1918, *L. nigradorsalis* Turner, 1918, *L. varicornis* (Cameron, 1911), los cuales se caracterizan por presentar dos dientes en la parte dorsal de la coxa posterior, uno largo y uno corto, la carina occipital completamente ausente y los notauli reducidos en su mayoría.

Odontobracon es uno de los géneros más diversos e incluye a 15 especies reconocidas: *O. amazonicus* Roman, 1924, *O. armatus* (Cresson, 1865), *O. batesi* Roman, 1924, *O. brachydontus* Marsh, 1988, *O. californicus* Rohwer, 1917, *O. caritus* Marsh,

1988, *O. cellulus* Marsh, 1970, *O. grandis* Ashmead, 1894, *O. janzeni* Marsh, 1988, *O. montanus* Cameron, 1887, *O. niger* Marsh, 1988, *O. nigriceps* Cameron, 1887, *O. oemeovorus* Rohwer, 1917, *O. panamensis* Marsh, 1988 y *O. townesi* Marsh 2002. Las especies de este género se distinguen por presentar un sólo diente grande y curvado en la parte dorsal de la coxa posterior.

Zombrus es el género más diverso de la tribu y contiene aproximadamente 45 especies descritas: *Z. anisopus* Marshall, 1897, *Z. antennalis* Szepligeti, 1914, *Z. atriceps* (Brues, 1924), *Z. baculiger* (Enderlein, 1912), *Z. bicolor* (Enderlein, 1912), *Z. bicoloricorpus* Long, 2018, *Z. bimaculatus* Szepligeti, 1914, *Z. cameroni* Szepligeti, 1913, *Z. concolor* Szepligeti, 1914, *Z. croceipes* (Brues, 1926), *Z. dorsalis* (Brulle, 1846), *Z. duplicatus* (Brues, 1924), *Z. erythrostomus* Cameron, 1912, *Z. flaviceps* Cameron, 1912, *Z. flavicorpus* Long & van Achterberg, 2018, *Z. flavipennis* (Brulle, 1846), *Z. fuscipennis* (Szepligeti, 1902), *Z. giganteus* Szepligeti, 1911, *Z. insularis* (Schulz, 1906), *Z. maculiceps* (Cameron, 1906), *Z. maculifrons* (Cameron, 1905), *Z. maculipennis* (Brulle, 1846), *Z. madagascariensis* Marshall, 1897, *Z. melanopterus* Cameron, 1912, *Z. minor* Szepligeti, 1918, *Z. nigricornis* (Brulle, 1846), *Z. nigripennis* (Kriechbaumer, 1894), *Z. nigripes* (Cameron, 1906), *Z. nigrobalteatus* (Cameron, 1906), *Z. nigromaculatus* (Cameron, 1904), *Z. orientalis* Szepligeti, 1914, *Z. pallidiventris* Cameron, 1910, *Z. pedalis* (Brues, 1924), *Z. pulcher* Szepligeti, 1914, *Z. rufus* (Cameron, 1905), *Z. semialbus* Szepligeti, 1914, *Z. semistriatus* (Brulle, 1846), *Z. sikkimensis* Enderlein, 1920, *Z. similis* Szepligeti, 1906, *Z. spilopterus* Cameron, 1910, *Z. striolatus* (Szepligeti, 1902), *Z. thomsoni* Szepligeti, 1918, *Z. tricoloricorpus* Long, 2018, *Z. tuberculatus* Cameron, 1912 y *Z. wagneri* Szepligeti, 1915. Los miembros de este género presentan dos dientes en la parte dorsal de la coxa posterior, además de que presentan notuali en el mesotórax, así como carina occipital al menos dorsal y lateralmente.

El género **Acanthodoryctes** Turner, 1918 comprende tres especies *A. gilberti* Turner, 1918, *A. morleyi* (Froggatt, 1916) y *A. tomentosus* (Szépligeti, 1905). **Antidoryctes** Belokobylskij & Quicke, 2000 es un género que incluye una sola especie: *A. pronotalis* Belokobylskij & Quicke, 2000. Las especies de estos géneros se diferencian por presentar

el tercer segmento de los palpos labiales largo, escapo de las antenas simple, pronoto dorsalmente plano, con una o dos proyecciones puntiagudas y el ala posterior sin vena m-cu en *Acanthodoryctes*; y el tercer segmento de los palpos labiales corto, escapo de las antenas con un proceso apical semi-oval simple, pronoto dorsalmente plano y con dos bultos laterales obtusos y el ala posterior con vena m-cu en *Antidoryctes*.

El género *Binarea* incluye cuatro especies, *B. calida* Brues, 1912, *B. pulchripes* Szepligeti, 1906, *B. rufipes* Roman, 1924 y *B. spinicollis* Brulle, 1846. *Liobracon* es uno de los géneros más diversos y agrupa 16 especies: *L. aquilonius* Marsh, 1970, *L. brullei* (Szepligeti, 1908), *L. costaricensis* Marsh, 2002, *L. cressonii* (Dalla Torre, 1898), *L. fasciatus* Marsh, 2002, *L. geniculatus* (Brulle, 1846), *L. hoffmannsi* (Enderlein, 1920), *L. janzeni* Marsh, 2002, *L. macula* (Brulle, 1846), *L. multicarinatus* (Cameron, 1887), *L. partitus* Enderlein, 1912, *L. propodealis* Roman, 1924, *L. pseudomacula* Roman, 1924, *L. quadriceps* (Ashmead, 1895), *L. ruficornis* Cameron, 1909 y *L. scholzi* Roman, 1924. Estos géneros se distinguen por presentar un tubérculo medio en el pronoto y tener la vena M+CU más larga que la vena 1M del ala posterior, y se diferencian entre ellos porque *Binarea* presenta 2 o 4 tubérculos afilados o romos en el propleuron y *Liobracon* carece de ellos.

El género *Monarea* contiene cuatro especies, *M. fasciipennis* (Szepligeti, 1902), *M. fridae* Belokobylskij et al, 2014, *M. nigricoxa* Szepligeti, 1906 y *M. tripartita* (Brulle, 1846). Los miembros de este género se distinguen por presentar la siguiente combinación de caracteres: frente cóncava y con una quilla media distintiva, celda discoidal del ala anterior casi sécil, vena m-cu del ala posterior ausente, celda basal del ala posterior ensanchada hacia el ápice y el segundo terguito metasomal con el área media delineada por surcos profundos.

Odontodoryctes es un género que agrupa seis especies: *O. biannulatus* Granger 1949, *O. cingulatus* Granger 1949, *O. gaullei* Granger 1949, *O. seyrigi* Granger 1949, *O. tristis* Granger 1949 y *O. xanthocephalus* Granger 1949. El género *Priosphys* incluye a la especie *P. denticulata* Enderlein, 1920. Estos géneros se distinguen de otros por presentar en la parte dorso de la coxa un diente y una cresta dentada, la forma elongada del cuerpo y las venas del ala posterior.

JUSTIFICACIÓN

A la fecha se han llevado a cabo estudios filogenéticos morfológicos (Belokobylskij *et al.*, 2004) y moleculares (Zaldívar-Riverón *et al.*, 2008) para Doryctinae, en los que se han incluido algunos miembros de Holcobraconini y se recuperaron como grupo parafilético. Sin embargo, no se han realizado estudios filogenéticos exhaustivos enfocados en la tribu. El presente trabajo representa el primer estudio filogenético basado en evidencia molecular y examinación morfológica que pretende incluir la mayoría de los géneros reconocidos de Holcobraconini y a miembros de los géneros estrechamente relacionados, así como un número considerable de especies para cada género. Con esto se espera obtener una hipótesis filogenética robusta que permita definir de manera conclusiva los límites y la composición taxonómica de este grupo. Además, el presente estudio es el primero en inferir su historia biogeográfica, incluyendo sus tiempos de origen y diversificación, así como los principales eventos que dieron lugar a su distribución actual. Se presenta una clave de identificación y la descripción morfológica de los géneros incluidos en este estudio.

OBJETIVOS

GENERAL

Investigar la sistemática y evolución de los géneros de avispa parasitoides de la tribu Holcobraconini empleando marcadores mitocondriales y nucleares.

PARTICULARES

- Reconstruir las relaciones filogenéticas entre los géneros de Holcobraconini y géneros involucrados con base en cuatro marcadores moleculares.
- Evaluar los límites de Holcobraconini y de sus géneros a partir de las relaciones filogenéticas obtenidas.
- Definir caracteres morfológicos diagnósticos consistentes para cada uno de los géneros reconocidos dentro de Holcobraconini.
- Inferir la historia biogeográfica de este grupo de distribución mundial estimando su tiempo de origen, así como los tiempos de diversificación de sus clados principales.

Organisms Diversity & Evolution

Systematics and evolution of the parasitoid wasps genera of the tribe Holcobraconini (Hymenoptera: Braconidae: Doryctinae)

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:									
Full Title:	Systematics and evolution of the parasitoid wasps genera of the tribe Holcobraconini (Hymenoptera: Braconidae: Doryctinae)								
Article Type:	Original Article								
Keywords:	Ichneumonoidea, phylogeny, taxonomy, Insecta, relaxed molecular clock.								
Corresponding Author:	Alejandro Zaldivar-Riveron, PhD Instituto de Biología, UNAM Coyoacan, D. F. MEXICO								
Corresponding Author Secondary Information:									
Corresponding Author's Institution:	Instituto de Biología, UNAM								
Corresponding Author's Secondary Institution:									
First Author:	Rubén Castañeda-Osorio, MSc								
First Author Secondary Information:									
Order of Authors Secondary Information:									
Order of Authors:	Rubén Castañeda-Osorio, MSc Sergey A. Belokobylskij, PhD Yves Braet, PhD Alejandro Zaldivar-Riveron, PhD								
Funding Information:	<table border="1"> <tr> <td>PAPIIT DGAPA UNAM (IN207016)</td> <td>Dr. Alejandro Zaldivar-Riveron</td> </tr> <tr> <td>CONACyT Ciencia Básica (220454)</td> <td>Dr. Alejandro Zaldivar-Riveron</td> </tr> <tr> <td>Russian State Research Project (AAAA-A17-117030310210-3)</td> <td>Dr. Sergey A. Belokobylskij</td> </tr> <tr> <td>Russian Foundation for Basic Research (19-04-00027)</td> <td>Dr. Sergey A. Belokobylskij</td> </tr> </table>	PAPIIT DGAPA UNAM (IN207016)	Dr. Alejandro Zaldivar-Riveron	CONACyT Ciencia Básica (220454)	Dr. Alejandro Zaldivar-Riveron	Russian State Research Project (AAAA-A17-117030310210-3)	Dr. Sergey A. Belokobylskij	Russian Foundation for Basic Research (19-04-00027)	Dr. Sergey A. Belokobylskij
PAPIIT DGAPA UNAM (IN207016)	Dr. Alejandro Zaldivar-Riveron								
CONACyT Ciencia Básica (220454)	Dr. Alejandro Zaldivar-Riveron								
Russian State Research Project (AAAA-A17-117030310210-3)	Dr. Sergey A. Belokobylskij								
Russian Foundation for Basic Research (19-04-00027)	Dr. Sergey A. Belokobylskij								
Abstract:	<p>The tribe Holcobraconini (Braconidae: Doryctinae) is a group of parasitoid wasps mainly distributed along the tropical and subtropical regions of the world. It currently contains six genera (Holcobracon Cameron, Ivondrovia Shenefelt & Marsh, Liodoryctes Szépligeti, Nervellius Roman, Odontobracon Cameron and Zombrus Marshall), which are mainly characterized by having the vein m-cu of the hind wing long and strongly curved towards the apex of wing. Some studies, however, found that four doryctine genera that lack the above feature (Binarea Brullé, Liobracon Szépligeti, Monarea Szépligeti and Odontodoryctes Granger) might be closely related to holcobraconines. Here we reconstructed the phylogenetic relationships among species of five holcobraconine and their four presumable closely related genera using four gene markers and estimated the times of origin and diversification within the tribe. The holcobraconine genera were intermingled in a clade with the above four genera. Liobracon and Zombrus were not recovered as monophyletic. Acanthodoryctes Turner, Antidoryctes Belokobylskij & Quicke and Priosphys Enderlein were also included within the Holcobraconini based on morphology. Based on the molecular evidence and on morphological examination of the genera involved, the Holcobraconini is proposed to comprise 13 genera for which we included morphological diagnoses. The origin of the tribe probably occurred during the late Palaeocene to mid Eocene, 40.72 to 56.39 Mya. At least two main dispersal events from the Ethiopian to the remaining biogeographic regions could have led to the current geographic distribution of the Holcobraconini due</p>								

**Systematics and evolution of the parasitoid wasps genera of the tribe Holcobraconini
(Hymenoptera: Braconidae: Doryctinae)**

Rubén Castañeda-Osorio ^{1,2}, Sergey A. Belokobylskij ^{3,4}, Yves Braet ^{5,6}, Alejandro
Zaldívar-Riverón ¹

¹Colección Nacional de Insectos, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, 3er. circuito exterior s/n, Cd. Universitaria, Copilco, Coyoacán, A. P. 70–233, C. P. 04510., D. F., México; ²Posgrado en Ciencias Biológicas, Unidad de Posgrado, Edificio A, 1º Piso, Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria, Coyoacán, C.P. 04510, Distrito federal, México; ³Museum and Institute of Zoology of the Polish Academy of Sciences, Wilcza 64, 00–679 Warsaw, Poland; ⁴Zoological Institute of the Russian Academy of Sciences, Universitetskaya naberezhnaya 1, Saint Petersburg 199034, Russia; ⁵Unité d'Entomologie fonctionnelle et évolutive, Gembloux Agro-Bio Tech, Université de Liège, B-1030 Gembloux, Belgique; ⁶Royal Belgian Institute of Natural Sciences, O.D. Phylogeny and Taxonomy, Entomology, Vautier street 29, B-1000 Brussels, Belgium

Corresponding author: Alejandro Zaldívar-Riverón (azaldivar@ib.unam.mx).

Acknowledgments

We thank Mike Sharkey for donating part of the examined material, Cristina Mayorga, Guillermina Ortega and Susana Guzmán for their help at the CNIN IB UNAM, and Laura Márquez for her help with the DNA sequencing. This work was supported by grants given by DGAPA-UNAM, Mexico (PAPIIT IN207016) and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT; Proyecto Ciencia Básica convocatoria 2014 No. 220454) to AZR,

and by grants given by of the Russian Foundation for Basic Research (project No. 19-04-00027) and the Russian State Research Project No. AAAA-A17-117030310210-3 to SAB. This work was supported by an MSc scholarship given by CONACyT to R.C.O. R.C.O. thanks the postgraduate program in Biological Sciences of the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) for all the support given during his MSc studies. The present work is submitted as a requirement of the Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas-UNAM (campo de conocimiento en sistemática) for RCO to obtain his MSc degree.

Abstract

The tribe Holcobraconini (Braconidae: Doryctinae) is a group of parasitoid wasps mainly found in the tropical and subtropical regions of the world. It contains six genera (*Holcobracon* Cameron, *Ivondrovia* Shenefelt & Marsh, *Liodoryctes* Szépligeti, *Nervellius* Roman, *Odontobracon* Cameron, and *Zombrus* Marshall), which are mainly characterized by having the m-cu vein of the hind wing long and strongly curved towards the apex of wing. Some studies, however, found that four doryctine genera that lack the above feature (*Binarea* Brullé, *Liobracon* Szépligeti, *Monarea* Szépligeti, and *Odontodoryctes* Granger) might be closely related to holcobraconines. Here we reconstructed the phylogenetic relationships among species of five holcobraconine and their four presumably closely related genera using four gene markers and estimated the times of origin and diversification within the tribe. The holcobraconine genera were intermingled in a clade with the above four genera. *Liobracon* and *Zombrus* were not recovered as monophyletic. *Acanthodoryctes* Turner, *Antidoryctes* Belokobylskij & Quicke and *Priosphys* Enderlein were also included within the Holcobraconini based on morphology. Based on molecular evidence and on morphological examination of the genera involved, Holcobraconini is proposed to comprise 13 genera for which we included morphological diagnoses. The origin of the tribe probably occurred during the late Palaeocene to mid Eocene, 44.43 to 58.15 Mya. At least two main dispersal events from the Ethiopian to the other biogeographic regions could have led to the current geographic distribution of the Holcobraconini associated with the global increase of temperature occurred during the Late Paleocene to Middle Eocene.

Keywords Ichneumonoidea, phylogeny, taxonomy, Insecta, relaxed molecular clock.

Introduction

The doryctine tribe Holcobraconini Cameron, 1905 is a small group of usually large, conspicuous braconid parasitoid wasps that is widely distributed in all biogeographic regions, although most of its species richness is concentrated in tropical and subtropical areas (Shenefelt and Marsh 1976; Yu et al. 2012). The host records that have been reported for species of Holcobraconini show that they are idiobiont ectoparasitoids of bark boring or xylophagous beetle larvae of Cerambycidae and perhaps Cleridae (Belokobylskij 1992; Yu et al. 2016).

In the latest classification of the Holcobraconini (Belokobylskij 1992), it was proposed to contain six genera: *Holcobracon* Cameron, 1905, mostly found in the Neotropical but also present in the Oriental regions; *Ivondrovia* Shenefelt et Marsh, 1976 (Fig. 1b), restricted to the Ethiopian region; the Australian *Liodoryctes* Szépligeti, 1906 (Fig. 1d); *Nervellius* Roman, 1924 (Fig. 1e), occurring in the Neotropics; *Odontobracon* Cameron, 1887 (Fig. 1f) found in the Neotropical and Nearctic regions; and *Zombrus* Marshall, 1897 (Fig. 1h), with mostly occurring in the Ethiopian but with few species in the Australian, Palaearctic and Oriental regions (Belokobylskij 1992; Belokobylskij and Samartsev 2011; Yu et al. 2016; Long et al. 2018).

In the above study (Belokobylskij 1992), the holcobraconine genera were distinguished from the remaining doryctine taxa by the m-cu vein of the hind wing very long and strongly curved toward its apical margin (Fig. 2a); the second metasomal tergite usually with a large raised oval area (Fig. 3c); and the hind coxae without basoventral tubercle, but often with one or two dorsal processes (Figs 4a-c). Only the former feature is exclusive for the tribe, whereas the latter two are shared with other doryctine taxa (*e.g.*

members of the *Pedinotus* genus group and Doryctini; Belokobylskij et al. 2004; Samacá-Sáenz et al. 2016).

Morphological and molecular phylogenetic studies carried out for the Doryctinae have recovered some holcobraconine genera closely related to *Binarea* Brullé, 1846 (Fig. 1a) and *Liobracon* Szépligeti, 1901 (Fig. 1c) of the tribe Binaerini, as well as to *Monarea* Szépligeti, 1904 and *Odontodoryctes* Granger, 1949 (Fig. 1g), of the tribe Doryctini (Belokobylskij et al. 2004, 2014; Zaldívar-Riverón et al. 2006, 2007, 2008). These molecular phylogenetic studies recovered a clade with the above taxa and the members of the Holcobraconini as sister to a clade with two subclades, one mainly composed of South American and the other one exclusively having Australian genera. Comparative morphological studies also revealed that some holcobraconine species share with those of Binareini an undivided venom reservoir that is elongated, more or less parallel on the sides, tubular in appearance, and finely sculptured, and an ovipositor with extremely flattened subctenidial setae, producing overlapping leaflet-like structures, with the former feature being also shared with *Monarea* (Quicke et al. 1992; Rahman et al. 1998; Belokobylskij et al 2014).

In this study, we reconstructed the phylogenetic relationships within the Holcobraconini based on four different gene markers and including various representative species from five of its six currently recognised genera, as well as members of the four presumably closely related genera. Based on our best estimate of phylogeny and on morphological examination of type and additional material, we tested the monophyly of the tribe, assessed its composition and generic limits and carried out a relaxed molecular clock analysis to infer the main events that could have led to its current geographic distribution.

Materials and methods

Taxon sampling

We generated and obtained from previously published studies DNA sequence data for 18 species belonging to the currently recognised holcobraconine genera except *Holcobracon*, and for 10 species of *Binarea*, *Liobracon*, *Monarea* and *Odontodoryctes*. Our taxon sampling included the following numbers of representative species: *Ivondrovia* (one species), *Liodoryctes* (one species), *Nervellius* (four species), *Odontobracon* (eight species), *Zombrus* (four species), *Binarea* (one species), *Liobracon* (seven species), *Monarea* (one species) and *Odontodoryctes* (one species).

We also included in our analyses sequences of 28 species of 14 Neotropical doryctine genera and an Australian species originally assigned to *Ontsira* but that actually belong to an undescribed genus. These genera were recovered within the main South American–Australian doryctine clade, respectively, in Zaldivar-Riverón et al.'s (2008) phylogenetic study of the subfamily, where they appeared as sister clade to the Holcobraconini. The obtained trees were rooted with the aforementioned taxa.

In the cases in which we could not amplify at least three genes for a given species of our ingroup genera we added sequences of an additional specimen of the same species in the same terminal. For a few outgroup genera, we included sequences of different species within a same terminal. A list with the specimens examined, their species assignment, localities, DNA voucher and GenBank numbers is provided in Table 1. We followed biogeographic regions proposed by Morrone (2015).

Morphological features

We examined the external morphology of the specimens, including types, belonging to our ingroup genera, as well as of *Holcobracon*, *Acanthodoryctes* Turner, *Antidoryctes* Belokobylskij & Quicke and *Priosphys* Enderlein. The latter four genera were not included in our molecular phylogenetic study, but their morphology has been previously examined and they appear to belong to the Holcobraconini. All the material examined is deposited in the following collections: Colección Nacional de Insectos, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (IB UNAM); Hungarian Natural History Museum, Budapest, Hungary (HNHM); Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France (MNHN); The Natural History Museum, London, U.K. (BMNH); Swedish Museum of Natural History, Stockholm, Sweden (SMNH); Zoological Institute of the Russian Academy of Sciences, St Petersburg, Russia (ZISP); and Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique (IRSNB), Brussels, Belgium. Wing nomenclature follows Sharkey and Wharton (1997).

DNA Sequencing protocol and amplification

We examined sequences belonging to one mt and three nuclear gene markers. We generated an ~867 bp fragment consisting of the second and third domain regions of the nuclear 28S ribosomal (r), 430 pb of the alpha subunit of the elongation factor-1 complex (EF1- α 1) and 430 pb of the *wingless* (*wg*) nuclear DNA genes. These three genes have been widely employed to investigate the evolutionary relationships of various insect orders at different taxonomic levels (Quicke & Belshaw 1999; Dowton et al. 2002). We also generated 600 bp of the cytochrome oxidase I (COI) mitochondrial DNA gene. This gene has a faster substitution rate and has been shown to improve the resolution of phylogenetic estimates in multigene analyses of higher-level braconid taxa (e.g. Zaldívar-Riverón et al.

2006, 2008, 2014). COI is also the most employed marker within Metazoa to investigate relationships among closely related species (Hebert et al. 2003).

Genomic DNA was extracted from ethanol-preserved specimens using a non-destructive technique both with the FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit (FAVORGEN® BIOTECH CORP.) and an EZ-10 spin Column Genomic DNA Minipreps extraction Kit (BIOBASIC CANADA INC) (Ceccarelli et al. 2012). Each specimen was digested overnight in 300 µL of digestion solution and 20 µL of proteinase K at 56°C, and then the supernatant was then passed through a column following the manufacturer's instructions. The elutions were stored at -20°C and were used for the polymerase chain reactions (PCRs). All specimens were subsequently washed, mounted and labelled for morphological identification.

Amplification was performed with a total volume of 15 µL, which consisted of 3 µL 10 x PCR buffer, 0.2 µL 10nM of each primer, 0.2 µL of Taq polymerase (Bioline®), 3 µL of DNA template and 8.4 µL of ddH₂O. Primers and annealing temperatures used during PCRs are listed in Table 2. Unpurified PCR products were sent for sequencing to the genomic unit at IB-UNAM. Coding protein sequences were manually aligned based on their translated amino acids and were verified using the online version of MAFFT v.7 (Kato and Standley 2013). The alignment of the 28S dataset was carried out based on the 28S braconid secondary structure model proposed by Gillespie et al. (2005).

Phylogenetic analysis

A partitioned Bayesian MCMC analysis was performed for the concatenated data set with the program MrBayes version 3.2.6 (Ronquist et al. 2012). We carried out two simultaneous runs of 50 million generations each, using four chains, uniform priors and

sampling trees every 5,000 generations. Each protein-coding gene was partitioned according to their codon positions, and 28S was considered as a single partition. The appropriate substitution models for each partition were selected based on the Bayesian Information Criterion implemented in the program Partition Finder version 2.1.1 (Lanfear et al. 2016) and are listed in Table 3.

We set the burn-in fraction of 0.25 after examining the stationarity of the Markov chains with the program Tracer version 1.6.0 (Rambaut et al. 2014). The remaining trees of each run were used to reconstruct a majority rule consensus tree with posterior probabilities (PP) of clades. Clades were considered significantly supported if they had a posterior probability of at least 0.95 ($PP \geq 0.95$).

Tests of alternative hypotheses

Our best estimate of phylogeny recovered from the Bayesian analysis was tested against two alternative topologies with Bayes factors comparisons calculated from estimates of marginal likelihoods using the stepping stone (SS) sampling approach (Xie et al. 2011) as implemented in MrBayes version 3.2.6 (Ronquist et al. 2012). The alternative topologies forced the monophylies of *Liobracon* and *Zombrus*, respectively.

The two SS tests were run for 20 million generations, followed by 50 steps with 1000 samples within each step and eliminating the first 25 % of samples for each step. Each test consisted of two independent runs, one for the constrained topology and the other one for an unconstrained topology. The criterion to reject an alternative topology was the arithmetic difference of the Bayes factors of the two runs in log units. A log difference >5.0 was regarded as strong evidence for rejecting an alternative hypothesis (Kass and Raftery 1995).

Divergence-time estimates

We assessed the times of origin and main diversification events within the Holcobraconini using the concatenated data set and the Bayesian relaxed molecular clock approach implemented in the program BEAST version 1.8.2 (Drummond et al. 2012). The analysis was run for 100 million generations, sampling trees every 1,000 generations and treating each marker as a single partition. The evolutionary models selected for each partition are listed in Table 3. An uncorrelated lognormal clock rate and a “birth-death incomplete sampling” speciation tree prior (Stadler 2009) were implemented. The burn-in fraction was set at 0.25. The remaining trees were used to reconstruct a maximum clade credibility tree with PP of clades, mean nodes ages and their 95 % highest posterior densities (HPDs) with the program TreeAnnotator version 1.8.4 (available from the BEAST package).

The analysis was performed calibrating the node that divides the Holcobraconini from the South American + Australian clades. This relationship was recovered in a previous phylogenetics studies (Zaldívar-Riverón et al. 2008). The calibrated node used a mean age of 52.11, a normal distribution that allows a bidirectional decreasing uncertainty and a standard deviation of 3.48.

The MrBayes and BEAST analyses were carried out on the CIPRES cluster website platform (http://www.phylo.org/sub_sections/portal/; Miller et al. 2010).

Results

Phylogenetic relationships

The examined sequences were 600, 430, 430 and 575 base pairs long for COI (mitochondrial), EF1- α (nuclear), *wingless* (nuclear) and 28S, respectively. The concatenated matrix had a total of 2035 nucleotide positions and 58 terminal taxa.

The Bayesian phylogram derived from the concatenated data set is shown in Fig. 5. All ingroup genera were recovered as monophyletic except *Liobracon* and *Zombrus*. The concatenated analysis recovered the Holcobraconini as paraphyletic with respect to *Binarea*, *Liobracon*, *Monarea* and *Odontodoryctes*, though with a marginal non-significant support (PP = 0.91), with *Ivondrovia* in the basal branching, followed by *Odontodoryctes* (PP= 0.97) and then by two major clades (PP= 0.99). One major clade was composed of *Liobracon* + *Binarea*, which were sister to *Nervellius* (PP = 0.85). The only species of *Binarea* that we included was nested within *Liobracon*, although with a non-significant support (PP = 0.5). The second major clade had a clade with the only species of *Liodoryctes* intermingled with the members of *Zombrus* (PP= 0.58) as sister to *Odontobracon* (PP = 1.0), and with *Monarea* as sister to all of them (PP = 0.61).

Tests of alternative hypotheses

The Bayesian tests of alternative topologies carried out with Bayes factors comparisons and the stepping stone (SS) sampling approach statistically rejected the alternative topology that supported the monophyly of *Liobracon* (log difference between the unconstrained and the constrained topologies: -24,088.78 and -24,110.08, respectively). The alternative topology that constrained the species of *Zombrus* was on the other hand not statistically rejected (log difference between the unconstrained and the constrained topologies: -24,107.44 and -24,111.30, respectively).

Divergence time estimates

The chronogram obtained from BEAST (Fig. 6) is generally congruent with the relationships obtained with the Bayesian analysis performed with MrBayes. The main differences in the BEAST analysis was the placement of *Monarea*, which was placed as sister to a *Nervellius* + (*Liobracon* + *Binarea*) clade (PP = 0.65), and with *Liobracon*, which was recovered as monophyletic, although without statistical support (PP = 0.4).

The divergence of the Holcobraconini from the South American + Australian clade and the most recent common ancestor (MRCA) of the former tribe was estimated to have occurred during the Late Paleocene to Middle Eocene, 44.43-58.15 Mya (mean= 51.28 My) and 40.76-56.44 Mya (mean= 48.68 My), respectively. The divergence time between the two major ingroup clades was estimated to occur between the Middle Eocene to Early Oligocene, 29.71-43.48 Mya (mean = 36.42 My). Also, the MRCA of the Neotropical clade composed by *Liobracon* + *Binarea* + *Nervellius* + *Monarea* diverged between the Middle Eocene to Late Oligocene, 25.38-39.16 Mya (mean = 32.26 My), whereas the MRCA of the clade with *Odontobracon* + *Zombrus* + *Liodoryctes* diverged during the Late Oligocene to Middle Miocene, 16.94-26.93 My (mean= 21.82 My).

Discussion

Generic composition of the Holcobraconini

Here we carried out the first extensive molecular phylogenetic analysis for the cosmopolitan doryctine tribe Holcobraconini. Our two Bayesian analyses consistently recovered the tribe as paraphyletic with respect to the two members of the Binareini (*Binarea* and *Liobracon*), as well as to *Monarea* and *Odontodoryctes*, which were previously placed in the Doryctini (Belokobylskij 1992).

Currently, there is no known consistent external morphological synapomorphy that supports the placement of the above genera within the Holcobraconini, since the only feature that supported the generic composition of the tribe before this study, the m-cu vein of the hind wing very long and strongly curved towards its apex, appeared to be lost three different times in our phylogenetic reconstructions. Therefore, we transfer the two genera of the Binaerini, *Binarea* and *Liobracon*, and *Monarea* and *Odontodoryctes* to Holcobraconini. Based on morphological evidence we also place within the latter tribe the two remaining genera of the Binareini, *Acanthodoryctes*, which was the only member of the subtribe Acanthodoryctina (Bleokobylskij 1992), and *Antidoryctes* (Belokobylskij and Quicke, 2000). Members of these two genera share with *Binarea* and *Liobracon* the following exclusive morphological features: occipital carina completely absent, neck of pronotum with one or two obtuse or pointed tubercles or spines (processes); hind coxa without basoventral tubercle; second metasomal tergite with sublateral transverse furrows; usually third segment of the labial palp distinctly shortened. In addition, the venom gland apparatus of *Acanthodoryctes* is considerably similar to those found in members of the Holcobraconini *sensu lato*, *Monarea* and *Binarea* (Quicke et al. 1992).

Although in our molecular phylogenetic study we could not include species of *Priosphys* Enderlein, 1920, it is morphologically very similar to *Odontodoryctes* and thus we also include *Priosphys* within Holcobraconini. The hind coxa in species of *Priosphys* has one or two dorsal teeth followed by an apically posterior dentate crest in line with the teeth (Fig. 7e; Belokobylskij 2004; Braet 2014). This feature closely relates *Priosphys* with *Odontodoryctes*, which also has a dentate keel on the hind coxae, and for years *Odontodoryctes* was a synonym of *Priosphys* (Shenefelt and Marsh 1976). However, Belokobylskij (1992) resurrected the name *Odontodoryctes* based on the following

differences: second metasomal tergite without (*Priosphys*; Fig. 7j) or with (*Odontodoryctes*) basal area delineated posteriorly by deep furrow, third tergite without (*Priosphys*; Fig 7j) or with (*Odontodoryctes*) transverse submedian groove, first flagellomere of antenna shorter (*Priosphys*; Fig. 7f) or distinctly longer (*Odontodoryctes*) than second flagellomere and propodeum without (*Priosphys*) or with (*Odontodoryctes*) areas delineated by carinae.

We therefore recognise within the Holcobraconina a total of 13 genera (see below). Belokobylskij (1992) divided the Holcobraconini into three subtribes based on the external morphology, Odontobraconina (with *Odondobracon*, *Zombrus* and *Liodoryctes*), Holcobraconina (with *Holcobracon* and *Nevellius*) and Ivondroviina (with *Ivondrovia*). Our analyses recovered the members of the above subtribes in separate clades, as well as a clade with the members of the previously regarded tribe Binareini, *Binarea* and *Liobracon*. In addition to this, *Monarea* and *Odontodoryctes* cannot be placed in any the above groups and thus we propose to abandon this subtribal classification.

Based on our morphological examination, we propose the following combination of characters to diagnose the Holcobraconini: 1) m-cu vein of the hind wing very long and strongly curved towards its apical margin (Fig. 2a), rather short and slanted towards the base of the wing (Figs 2b, d), or absent (Fig. 2c); 2) second metasomal tergite usually with a large raised suboval (Fig. 3c) or a sub-triangular medial area (Fig. 3d); 3) hind coxae always without basoventral tubercle, often with dorsal processes (1-2 teeth or dentate keel; Figs 4b-d); 4) an undivided venom reservoir elongated, parallel sided, tubular in appearance and finely sculptured (examined in species of all genera except *Odontodoryctes*, *Priosphys* and *Antidoryctes*; Quicke et al. 1992); and 5) ovipositor (for taxa that were examined for

this feature) with extremely flattened subctenidal setae producing overlapping leaflet-like structures (Rahman et al. 1998).

Below we provide a key to the 13 holcobraconine genera that are recognised after this study, followed by a diagnosis for each of them. All diagnoses were mainly based on morphological examination of type material deposited in the collections mentioned above.

Key to the genera of the tribe Holcobraconini

1. Vein m-cu of hind wing long and strongly curved to distal margin of wing. Hind coxa dorsally often with one or two projections or teeth 2
 - Vein m-cu of hind wing short and oblique to baso-posterior margin of wing; sometimes (*Monarea*) completely absent. Hind coxa dorsally usually without projections or teeth, rarely (*Odontodoryctes*, *Priosphys*) with dentate crest 7

2. Hind coxa dorsally with one or two projections or teeth 3
 - Hind coxa dorsally without any projections or teeth 5

3. Occipital carina completely absent. Notauli reduced at most part. Australian and Ethiopian regions *Liodoryctes Szépligeti*
 - Occipital carina present at least dorsally and laterally, rarely (some *Zombrus*) completely absent. Notauli present at least in anterior half of mesoscutum 4

4. Hind coxa dorsally with two projections, but sometimes second projection very short. Old World (Palearctic, Oriental, Ethiopian and Australian regions)
 - *Zombrus Marshall*

- Hind coxa dorsally with one projection. New World (Nearctic and Neotropical region)
..... *Odontobracon* **Cameron**

5. Occipital carina and subocular suture absent. Frons near antennal sockets without keel.
Third segment of labial palpus not shortened. First flagellomere of antenna not longer than
second flagellomere. Propodeum with distinct areola and medial basal carina, without
areolation. Ethiopian region *Ivondrovia* **Shenefelt & Marsh**

- Occipital carina and usually subocular suture present. Frons near antennal sockets with
more or less high keel Third segment of labial palpus distinctly shortened. First
flagellomere of antenna longer than second flagellomere. Propodeum without areola and
medial basal carina, usually covered by dense areolation 6

6. Marginal cell of hind wing without transverse vein (r). Ocelli arranged in equilateral
triangle. Second metasomal tergite with large and delineated by deep sublateral furrows
oval area. Second suture with distinct sublateral breaks. Oriental and Neotropical regions
..... *Holcobracon* **Cameron**

- Marginal cell of hind wing with distinct transverse vein (r). Ocelli arranged in triangle
with base distinctly larger than its sides. Second metasomal tergite without delineated area.
Second suture almost straight or absent. Neotropical region
..... *Nervellius* **Roman**

7. Occipital carina completely absent. Pronotum dorsally with one or two projections or
lumps. Scapus of antenna often with transformation, more or less distinctly depressed, with

deep excise on inner apical margin, with dense pubescence on inner apical margin.

Marginal cell of hind wing with vein M+CU usually distinctly longer than vein 1-M 8

- Occipital carina present at least dorsally and laterally. Pronotum dorsally always without projection or lumps. Scapus of antenna without transformation and peculiar pubescence on its apical margin. Marginal cell of hind wing with vein M+CU no longer than vein 1-M

..... 11

8. Third segment of labial palps long. Scapus of antenna simple, without transformation and dense apical pubescence. Hind wing without vein m-cu; marginal cell without transverse vein (r). Pronotum dorsally with one or two pointed projections. Metapleura and most part of first metasomal tergite covered by very dense white pubescence. Australian

region *Acanthodoryctes* **Turner**

- Third segment of labial palps shortened. Scapus of antenna with transformation, more or less distinctly depressed, with deep excise on inner apical margin, with dense pubescence on inner apical margin; rarely scapus with simple semi-oval apical process. Hind wing with vein m-cu; marginal cell often with vein r. Pronotum dorsally with one or two subobtuse lumps. Metapleura and first metasomal tergite without very dense white pubescence 9

9. Scapus of antenna with simple semi-oval apical process. Pronotum dorsally flat and with two obtuse lateral lumps. Marginal cell of hind wing without vein r. Second metasomal tergite with mediobasal area delineated by furrow. Australian region

..... *Antidoryctes* **Belokobylskij & Quicke**

- Scapus of antenna more or less distinctly depressed, with deep excise on inner apical margin, with dense pubescence on inner apical margin. Pronotum dorsally convex and with

a single subobtusate submedian lump. Marginal cell of hind wing with vein r. Second metasomal tergite without mediobasal area delineated by furrow 10

10. Propleura below anteriorly with two anterior hook-like pointed teeth, with distinct tubercle in posterior third. Precoxal sulcus absent or very shallow. Hind basitarsus 4.0-5.0 times longer than inner spur, 0.5-0.6 times as long as second-fifth segments of hind tarsus combined. Neotropical region ***Binarea* Brullé**

- Propleura below without teeth and tubercle. Precoxal sulcus usually distinct. Hind basitarsus only 2.5-3.0 times longer than inner spur, 0.35-0.40 times as long as second-fifth segments of hind tarsus combined. Neotropical region ***Liobracon* Szépligeti**

11. Vein m-cu of hind wing completely absent. Second metasomal tergite with distinctly convergent posteriorly sublateral furrows delineating a subtriangle medio-basal area. Hind coxa dorsally without teeth and crest. Neotropical region ***Monarea* Szépligeti**

- Vein m-cu of hind wing always present. Second metasomal tergite not or only with weakly convergent posteriorly sublateral furrows not delineating subtriangle area. Hind coxa dorsally with teeth and dentate crest. Ethiopian region 12

12. Second metasomal tergites without basal area delineated posteriorly by deep furrow. Third metasomal tergite without transverse submedian groove. First flagellomere of antenna shorter than second flagellomere. Propodeum without areas delineated by carinae ***Priosphys* Enderlein**

- Second metasomal tergites with basal area delineated posteriorly by deep crenulate furrow. Third metasomal tergite with transverse submedian groove. First flagellomere of

antenna distinctly longer than second flagellomere. Propodeum with areas delineated by carinae *Odontodoryctes* Granger

***Acanthodoryctes* Turner, 1918**

Type species *Iphyaulax morleyi* Froggart, 1916.

Acanthodoryctes Turner, 1918: 55; Shenefelt & Marsh 1976: 1264; Yu et al 2016.

Diagnosis. Occipital carina completely absent. Maxillary palps relatively long; third segment of labial palp not shortened. Scapus of antennae common, without transformation. Pronotum dorsally flat, with two lateral long and pointed curved projections. Propleuron without teeth. Notauli deep and complete. Propodeum with dense and small areolation, with delineated areola. Precoxal furrow present and shallow. Hind coxa without dorsal projections and basoventral tubercle. First discal cell of fore wing distinctly petiolate anteriorly. In hind wing, vein m-cu absent; marginal cell without transverse vein r; vein M+CU not shorter than vein 1-M. Second metasomal tergite with two deep sublateral and weakly divergent furrows reaching second suture.

Distribution. Australian region.

***Antidoryctes* Belokobylskij & Quicke, 2000**

Type species *Antidoryctes pronotalis* Belokobylskij & Quicke, 2000.

Antidoryctes Belokobylskij & Quicke, 2000: 137; Yu et al 2016.

Diagnosis. Occipital carina completely absent. Maxillary palps relatively long; third segment of labial palp shortened. Scapus of antennae elongated, without deep transformation, only with distinct semi-circular apical lobe. Pronotum dorsally more or less flat, with two elongate, obtuse, wide lateral protuberances. Propleuron without teeth or

protuberances. Notauli deep, almost complete, but very shallow posteriorly. Propodeum rugose-areolate, without delineated areas. Precoxal furrow present and deep. Hind coxa without dorsal projections and basoventral tubercle. First discal cell of fore wing shortly petiolate anteriorly. In hind wing, vein m-cu present; marginal cell without transverse vein r; vein M+CU distinctly longer than vein 1-M. Second metasomal tergite with two shallow and narrow sublateral weakly divergent furrows not reaching second suture; present wide basomedian area delineated by furrow.

Distribution. Australian region.

***Binarea* Brullé, 1846**

(Figs 1a, 3a)

Type species *Binarea spinicollis* Brullé, 1846.

Binarea Brullé, 1846: 470; Shenefelt & Marsh 1976: 1267; Yu et al 2016.

Diagnosis. Occipital carina completely absent. Maxillary palps long and narrow; third labial segment shortened. Scapus of antennae more or less distinctly depressed, with deep excise and dense pubescence on inner apical margin. Pronotum dorsally with single thick and obtuse projection. Propleuron anteriorly with two hook-like pointed teeth. Notauli reduced at posterior part. Propodeum without areolation. Precoxal furrow absent or very shallow. Hind coxa without dorsal projections and basoventral tubercle. First discal cell of fore wing shortly petiolate anteriorly. In hind wing, vein m-cu present, short, slanted towards base of wing; marginal cell of hind wing with transverse vein r and vein M+CU distinctly longer than vein 1-M. Second metasomal tergite with two shallow sublateral convergent furrows reaching second suture.

Distribution. Neotropical region.

***Holcobracon* Cameron, 1905**

Type species *Holcobracon fulvus* Cameron, 1905.

Holcobracon Cameron, 1905: 89; Shenefelt & Marsh 1976: 1363; Yu et al. 2016.

Diagnosis. Occipital carina present at least dorsally and laterally. Frons usually with deep depression and middle longitudinal keel. Third segment of labial palpi distinctly shortened. Scapus of antennae common, without transformation. Notauli deep and complete. Propodeum with dense areolation. Precoxal furrow present. Hind coxa without dorsal projections and basoventral tubercle. First discal cell of fore wing sessile anteriorly. In hind wing, vein m-cu long and strongly curved towards the apical margin of the wing; marginal cell of hind wing without transverse vein r and vein M+CU distinctly longer than vein 1-M. Second metasomal tergite with two deep sublateral and weakly convergent curved furrows separated by a raised oval median area.

Distribution. Oriental and Neotropical regions.

***Ivondrovia* Shenefelt & Marsh, 1976**

(Fig. 1b)

Type species *Lophogaster seyrigi* Granger, 1949.

Lophogaster Granger, 1949: 93 (preocc., not *Lophogaster* Sars, 1857, Crustacea).

Ivondrovia Shenefelt & Marsh, 1976: 1364; Yu et al. 2016; Belokobylskij et al. 2018: 89.

Diagnosis. Occipital carina completely absent. Frons with shallow depression and almost without keel. Third segment of labial palps weakly shortened. Scapus of antennae common, without transformation. Notauli deep and complete. Propodeum mainly smooth, with long median carina and delineated areola. Precoxal furrow present, but shallow. Hind

coxa without dorsal projections and basoventral tubercle. First discal cell of fore wing petiolate anteriorly. In hind wing, vein m-cu long and strongly curved towards the apical margin of the wing; marginal cell of hind wing without transverse vein r and vein M+CU longer than vein 1-M. Second metasomal tergite with deep, convergent posteriorly and fused with second suture lateral furrows; these furrows and second suture medially define a large and leaf-shaped median area; additionally, second tergite in latero-basal halves with sub-triangular area delineated by shallow or deep furrows.

Distribution. Ethiopian region.

Liobracon Szépligeti, 1901

(Figs 1c, 2b)

Type species *Liobracon singularis* Szépligeti, 1901 (= *Syngaster macula* Brullé, 1846).

Liobracon Szépligeti, 1901: 361; Shenefelt & Marsh 1976: 1316; Yu et al. 2016.

Diagnosis. Occipital carina completely absent. Maxillary palps long and narrow; third labial segment shortened. Scapus of antennae usually depressed, with deep excise and dense pubescence on inner apical margin. Pronotum dorsally with one or two projections. Propleuron without teeth and tubercles. Notauli reduced at posterior half of mesoscutum. Propodeum without areolation. Precoxal furrow present. Hind coxa without dorsal projections and basoventral tubercle. First discal cell of fore wing shortly petiolate anteriorly. In hind wing, vein m-cu present, short, slanted towards base of wing; vein M+CU distinctly longer than vein 1-M. Second metasomal tergite with two deep or shallow sublateral convergent furrows reaching second suture.

Distribution. Neotropical and Nearctic regions.

Liodoryctes Szépligeti, 1906

(Fig. 1d)

Type species *Acanthobracon australiensis* Szépligeti, 1902.

Liodoryctes Szépligeti, 1906: 599; Shenefelt & Marsh 1976: 1364; Yu et al. 2016.

Diagnosis. Occipital carina completely absent. Frons usually with deep depression and middle longitudinal keel. Maxillary palps long and narrow; third labial segment shortened. Scapus of antennae common, without transformation. Notauli mostly reduced. Propodeum with dense areolation. Precoxal furrow present. Hind coxa dorsally with two, long and short, projections, without basoventral tubercle. First discal cell of fore wing petiolate anteriorly. In hind wing, vein m-cu long and strongly curved towards the apical margin of the wing; marginal cell of hind wing without transverse vein r and vein M+CU weakly longer than vein 1-M. Second metasomal tergite with two deep sublateral and weakly divergent curved furrows separated by a raised suboval median area.

Distribution. Australian and Ethiopian region.

Monarea Szépligeti, 1904

(Figs 2c, 3d)

Type species *Osmophila fasciipennis* Szépligeti, 1902.

Monarea Szépligeti, 1904: 68; Shenefelt & Marsh 1976: 1320; Belokobylskij et al. 2014: 424; Yu et al. 2016.

Diagnosis. Occipital carina present at least dorsally and laterally. Frons distinctly concave, with median keel. Third segment of labial palps not shortened. Scapus of antennae common, without transformation. Propleuron with additional lower lateral lobes slightly before its anterior margin. Notauli complete. Propodeum mainly smooth. Precoxal furrow

present but shallow. Hind coxa without dorsal projections and basoventral tubercle. First discal cell of fore wing sessile anteriorly. In hind wing, vein m-cu of hind wing absent; marginal cell of hind wing without transverse vein r and vein M+CU distinctly longer than vein 1-M. Second metasomal tergite with two deep sublateral and strongly convergent furrows separated by a sub-triangular medio-basal area.

Distribution. Neotropical region.

***Nervellius* Roman, 1924**

(Figs 1e, 3a)

Type species *Nervellius subdivisus* Roman, 1924.

Nervellius Roman, 1924: 5; Shenefelt & Marsh 1976: 1364; Yu et al. 2016.

Diagnosis. Occipital carina present at least dorsally and laterally. Frons usually concave and with a middle longitudinal keel. Third segment of labial palps distinctly shortened. Scapus of antennae common, without transformation. Pronotum and propleuron without lobes or processes. Notauli complete. Precoxal furrow present, distinct and smooth. Propodeum with large areolation. Hind coxa without dorsal projections and basoventral tubercle, but sometimes with a dorsal tooth (*N. philippus* Braet, 2014). First discal cell of fore wing petiolate anteriorly. In hind wing, vein m-cu long and strongly curved towards the apical margin of wing; marginal cell of hind wing with transverse vein r; vein M+CU weakly longer than vein 1-M. Second metasomal tergite with two shallow sublateral divergent furrows.

Distribution. Neotropical region.

***Odontobracon* Cameron, 1887**

(Figs 1f, 4b)

Type species *Odontobracon nigriceps* Cameron, 1887.

Odontobracon Cameron, 1887: 461; Shenefelt & Marsh 1976: 1365; Marsh 1988: 444; Yu et al. 2016.

Diagnosis. Occipital carina present at least dorsally and laterally. Frons usually with deep depression and middle longitudinal keel. Third segment of labial palps distinctly shortened. Scapus of antennae common, without transformation. Pronotum and propleuron without lobes and processes. Notauli complete. Propodeum with dense areolation, rarely almost smooth. Precoxal furrow present, distinct. Hind coxa dorsally with only a single long projection, without basoventral tubercle. First discal cell of fore wing petiolate anteriorly. In hind wing, vein m-cu long and strongly curved towards the apical margin of the wing; marginal cell of hind wing without transverse vein r and vein M+CU weakly longer than vein 1-M. Second metasomal tergite with deep sublateral and weakly convergent curved furrows separated by a raised oval median area.

Distribution. Nearctic and Neotropical regions.

***Odontodoryctes* Granger, 1949**

(Figs 1g, 2d, 3b, 4b)

Type species *Odontodoryctes biannulatus* Granger, 1949.

Odontodoryctes Granger, 1949: 96; Shenefelt & Marsh 1976: 1328; Yu et al. 2016.

Diagnosis. Occipital carina mainly present. Frons concave, with middle keel. Third segment of labial palps not shortened. Scapus of antennae common, without transformation. Pronotum and propleuron without lobes and processes. Notauli complete. Propodeum areolate-rugose, with delineated areas. Precoxal furrow present, distinct. Hind coxae

dorsally with curved and pointed anterior long and posterior short teeth (spines) and denticulate crest, without basoventral tubercle. First discal cell of fore wing petiolate anteriorly. In hind wing, vein m-cu present, short, slanted towards base of wing; marginal cell of hind wing without transverse vein r and vein M+CU shorter than vein 1-M. Second metasomal tergite with wide semi-round mediobasal area delineated by deep curved furrows; third tergite with submedial transverse furrow.

Distribution. Ethiopian region.

***Priosphys* Enderlein, 1920**

(Fig. 7)

Type species *Priosphys denticulata* Enderlein, 1920.

Priosphys Enderlein, 1920: 132; Shenefelt & Marsh 1976: 1328; Yu et al. 2016.

Diagnosis. Occipital carina mainly present. Frons concave, with fine keel. Third segment of labial palps not shortened. Scapus of antennae common, without transformation. Pronotum and propleuron without lobes and processes. Notauli complete. Propodeum areolate-rugose, without delineated areas. Precoxal furrow present and deep. Hind coxae dorsally with curved and pointed anterior long and posterior short teeth (spines) and denticulate crest, without basoventral tubercle. First discal cell of fore wing petiolate anteriorly. In hind wing, vein m-cu present, short, slanted towards base of wing; marginal cell of hind wing without transverse vein r and vein M+CU shorter than vein 1-M. Second metasomal tergite without delineated by furrow mediobasal area; third tergite without submedial transverse furrow.

Distribution. Ethiopian region.

***Zombrus* Marshall, 1897**

(Figs 1h, 2a, 3c, 4c)

Type species *Zombrus anisopus* Marshall, 1897.

Zombrus Marshall, 1897: 10; Shenefelt & Marsh 1976: 1366; Yu et al. 2016.

Diagnosis. Occipital carina present at least dorsally and laterally, but in a few species completely absent. Frons with deep depression and middle longitudinal keel. Third segment of labial palps distinctly shortened. Scapus of antennae common, without transformation. Pronotum and propleuron without lobes and processes. Notauli complete. Propodeum with dense areolation. Precoxal furrow present, distinct. Hind coxa dorsally with two, long and short projections, without basoventral tubercle. First discal cell of fore wing petiolate anteriorly. In hind wing, vein m-cu long and strongly curved towards the apical margin of wing; marginal cell of hind wing without transverse vein r and vein M+CU distinctly longer than vein 1-M. Second metasomal tergite with two deep sublateral and weakly convergent curved furrows separated by a raised oval median area.

Distribution. Ethiopian, Australian, Oriental and Palaearctic regions.

Generic limits

Our phylogenetic analyses recovered the examined genera as monophyletic except *Liobracon* and *Zombrus*. The placement of *Binarea* within *Liobracon* (though with low support), the test of alternative hypothesis and some morphological features of these two genera strongly suggest that they should be fused. The features that allow distinguishing species of both genera (based on examination of type material) are: propleuron anteroventrally with (*Binarea*) or without (*Liobracon*) two anterior hook-like pointed teeth, an additional distinct tubercle (*Binarea*) in posterior third, and precoxal sulcus absent

(*Binarea*) or present (*Liobracon*). However, we decided to maintain these two taxa separately since we only examined one species of *Binarea*.

The presence of the only species of *Liodoryctes* nested together in a clade with the four species of *Zombrus* is congruent with their geographic distribution, since the single Palearctic species of *Zombrus* here included was recovered as sister to the remaining taxa, all of which occur in the Ethiopian region. The test of alternative hypotheses did not reject the monophyly of the latter genus. We therefore leave *Zombrus* and *Liodoryctes* as separate genera pending future phylogenetic studies with additional species. Based on examination of type material, these two genera can be morphologically distinguished from one another by having the occipital carina completely absent (*Liodoryctes*) or present at least dorsally and laterally (*Zombrus*), and the notauli reduced at most part (*Liodoryctes*) or present at least in anterior half (*Zombrus*).

Biogeographic inferences

We did not perform an ancestral area reconstruction analysis since our taxon sampling did not cover all the biogeographic regions that have been recorded for some holcobraconine genera. However, we mention some biogeographic inferences that we could make for the group based on the recovered relationships and the divergence time estimates and the known geographic distribution of each genus.

Our results suggest that the Holcobraconini probably originated during the Late Paleocene to Mid Eocene. This time of origin for the tribe agrees with the one recovered by Zaldívar-Riverón et al.'s (2008) molecular phylogenetic study of the Doryctinae using the penalised likelihood method (Sanderson 2002). Additionally, the two most basal holcobraconine branching, which includes the genera *Ivondovia* and *Odontodoryctes*, are

restricted to the Ethiopian region, suggesting that this could have been the ancestral area for the MRCA of the tribe.

The recovered divergence time estimates within the Holcobraconini are considerably younger than the proposed age for the final separation between South America and Africa (~105–120 Mya; McLoughlin 2001; Seton et al. 2012). Thus, we propose that at least two main dispersal events could have led to the current geographic distribution of the holcobraconine genera. One of them possibly occurred from the Ethiopian to the Neotropical region during the late Eocene to early Oligocene in the clade that contains *Monarea*, *Nervellius*, *Binarea* and *Liobracon*. The second main dispersal event could have occurred with the *Odontobracon*, *Zombrus* and *Liodoryctes* clade, whose MRCA probably dispersed from the Ethiopian to the Palaeartic, Neotropical and possibly the Australian and Oriental regions during the late Oligocene to early Miocene.

The suggested species diversification of the Holcobraconini and its apparent dispersal to most biogeographic regions during the Late Paleocene to Middle Eocene could have occurred due to an increase in the atmospheric temperature during this period, an event known as Paleocene-Eocene Thermal Maximum (PETM) (Bains et al. 1999; Gingerich 2006; Jardine 2011; McInerney and Wing 2011). This increase of temperature propitiated the environmental conditions that could have favoured the population growth of many insect species, including holcobraconines, as well as their dispersal to previously cold environments (Currano et al. 2011; Jardine 2011; McInerney and Wing 2011), allowing their dispersal to various biogeographic regions.

References

- Bains, S., Corfield, R. M. & Norris, R. D. (1999). Mechanisms of climate warming at the end of the Paleocene. *Science*, 285(5428), 724-727.
- Belokobylskij, S. A. (1992). On the classification and phylogeny of the braconid wasps of subfamilies Doryctinae and Exothecinae (Hymenoptera, Braconidae). Part I. On the classification, 1. *Entomologicheskoye Obozreniye*, 71(4): 900–928. (In Russian). English translation *Entomological Review*, 72, 109–137.
- Belokobylskij, S.A. & Quicke, D.L.J. (2000). Seven new genera of the subfamily Doryctinae (Hymenoptera: Braconidae) from the old world. *Journal of Hymenoptera Research*, 9 (1),111–141.
- Belokobylskij, S. A. & Samartsev, K. G. (2011). First records of the tribe Holcobraconini and the genus *Zombrus* Marshall, 1897 (Hymenoptera: Braconidae: Doryctinae) in Europe. *Zoosystematica Rossica*, 20, 310–318.
- Belokobylskij S. A., Zaldivar-Riverón A. & Quicke D. L. J. (2004). Phylogeny of the parasitic wasp genera of the subfamily Doryctinae (Hymenoptera: Braconidae) from morphological evidence. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 142, 369–404.
- Belokobylskij, S. A., Zaldívar-Riverón, A. & Coronado-Blanco, J. M. (2014). Phylogenetic affinities of *Monarea* Szépligeti, 1904 (Hymenoptera: Braconidae, Doryctinae, with description of a new species from Mexico. *Zootaxa*, 3795, 421–430.
- Belokobylskij, S.A., Zaldívar-Riverón, A. & Castaneda-Osorio, R. (2018) Revision of the Afrotropical genus *Ivondrovia* Shenefelt & Marsh, 1976 with description of a new species (Hymenoptera: Braconidae: Doryctinae). *ZooKeys*, 747: 87–100.
- Belshaw, R. & Quicke, D. L. J. (1997). A molecular phylogeny of the Aphidiinae (Hymenoptera: Braconidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 7, 281–293.

- Braet, Y. (2014). A new Neotropical species of the doryctine wasp tribe Holcobraconini (Hymenoptera: Braconidae), and new records of additional genera. *Bulletin de la Société Royale Belge d'Entomologie*, 150, 56–65.
- Brower, A. V. Z. & DeSalle, R. (1998). Patterns of mitochondrial versus nuclear DNA sequence divergence among nymphalid butterflies: the utility of wingless as a source of characters for phylogenetic inference. *Insect Molecular Biology*, 7, 73–82.
- Brullé, M.A. (1846). Des Hyménoptères. Les Ichneumonides. *In*: Lepeletier de Saint-Fargeau, A. *Histoire Naturelles des Insectes*. Paris, 4, 56–521.
- Cameron, P. (1887). Hymenoptera. *In*: Godman, F.D. & Salvin, O. *Biologia Centrali-Americana; or, Contributions to the knowledge of the fauna and flora of Mexico and Central America*. *Zoology*, 1, 329–422, 471–472.
- Cameron, P. (1905). On the phytophagous and parasitic Hymenoptera collected by Mr. E. Ernest Green in Ceylon. *Spolia Zeylanica*, 3, 67–143.
- Ceccarelli, F. S., Sharkey, M. J. & Zaldívar-Riverón, A. (2012). Species identification in the taxonomically neglected, highly diverse, neotropical parasitoid wasp genus *Notiospathius* (Braconidae: Doryctinae) based on an integrative molecular and morphological approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 62, 485–495.
- Currano, E. D., Kattler, K. R. & Flynn, A. (2011). Paleogene insect herbivory as a proxy for pCO₂ and ecosystem stress in the Bighorn Basin, Wyoming, USA. *Berichte der Geologischen Bundes-Anstalt*, 85, 61.
- Dowton, M., Belshaw, R., Austin, A. D. & Quicke, D. L. J. (2002). Simultaneous molecular and morphological analysis of braconid relationships (Insecta: Hymenoptera: Braconidae) indicates independent mt-tRNA gene inversions within a single wasp family. *Journal of Molecular Evolution*, 54, 210–226.

- Drummond, A. J., Suchard, M. A., Xie, D. & Rambaut, A. (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, 29, 1969–1973.
- Enderlein, G. (1920). Zur Kenntnis aussereuropäischer Braconiden. *Archiv für Naturgeschichte*, 84(A), 11(1918), 51–224.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3, 294–299.
- Gillespie, J. J., Yoder, M. J. & Wharton, R. A. (2005). Predicted secondary structure for 28S and 18S rRNA from Ichneumonoidea (Insecta: Hymenoptera: Apocrita): impact on sequence alignment and phylogeny estimation. *Journal of Molecular Evolution*, 61, 114–137.
- Gingerich, P. D. (2006). Environment and evolution through the Paleocene–Eocene thermal maximum. *Trends in Ecology and Evolution*, 21, 246–253.
- Granger, C. (1949). Braconides de Madagascar. *Mémoires de l'Institut Scientifique de Madagascar (A)*, 2, 1–428.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. & De Waard, J. R., (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society London B: Biological Sciences*, 270, 313–321.
- Jardine, P. (2011). The Paleocene-Eocene Thermal Maximum. *Palaeontology Online*, 1, 1–7.
- Kass, R. E. & Raftery, A. E. (1995) Bayes factors. *Journal of the American Statistical Association*, 90, 773–795.

- Katoh, K. & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 772–780.
- Lanfear, R., Frandsen, P. B., Wright, A. M., Senfeld, T. & Calcott, B. (2016). PartitionFinder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution*, 34, 772–773.
- Long, K. D., Van Achterberg, C. & Hoa, D. T. (2018). New record of the genus *Zombrus* Marshall, 1897 (Hymenoptera: Braconidae: Doryctinae), with description of three new species from Vietnam. *Zootaxa*, 4420, 279–291.
- Marsh, P. M. (1988). Revision of the tribe Odontobraconini in the Western Hemisphere (Hymenoptera: Braconidae: Doryctinae). *Systematic Entomology*, 13, 443–464.
- Marshall, T. A. (1897–1900). Les Braconides (Supplément). In: André, E. (ed.). *Species des Hymenopteres d'Europe et d'Algérie*, Paris, 5 bis, 369 pp.
- McInerney, F. A. & Wing, S. L. (2011). The Paleocene-Eocene thermal maximum: a perturbation of carbon cycle, climate, and biosphere with implications for the future. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 39, 489–516.
- McLoughlin, S. (2001). The breakup history of Gondwana and its impact on pre-Cenozoic floristic provincialism. *Australian Journal of Botany*, 49, 271–300.
- Miller, M. A., Pfeiffer, W. & Schwartz, T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, 1–8.

- Quicke, D. L. J. & Belshaw, R. (1999). Incongruence between morphological data sets: an example from the evolution of endoparasitism among parasitic wasps (Hymenoptera: Braconidae). *Systematic Biology*, 48, 436–454.
- Quicke, D. L. J., Tunstead, J., Falco, J. V. & Marsh, P. M. (1992). Venom gland and reservoir morphology in the Doryctinae and related braconid wasps (Insecta, Hymenoptera, Braconidae). *Zoologica Scripta*, 21, 403–416.
- Rahman, M. H., Fitton, M. G. & Quicke, D. L. J. (1998). Ovipositor internal microsculpture and other features in doryctine wasps (Insecta, Hymenoptera, Braconidae). *Zoologica Scripta*, 27, 333–343.
- Rambaut, A., Suchard, M. A., Xie, D. & Drummond, A. J. (2014). Tracer v1. 6. Available at: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
- Roman, A. (1924). Wissenschaftliche Ergebnisse der schwedischen entomologischen Reise des Herrn Dr. A. Roman in Amazonas 1914-15, 10. Hymenoptera: Braconidae, Cyclostomi pro p. *Arkiv för Zoologi*, 16 (20), 1–40.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A. & Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61, 539–542.
- Samacá-Sáenz, E., Belokobylskij, S.A., Quicke, D.L.J. & Zaldivar-Riveron, A. (2016) Systematics of the Neotropical braconid wasps of the *Pedinotus* genus group (Doryctinae). *Systematic Entomology*, 41, 481–491.
- Sanderson, M. J. (2002). Estimating absolute rates of molecular evolution and divergence times: a penalized likelihood approach. *Molecular Biology and Evolution* 19, 101–109.

- Seton, M., Müller, R. D., Zahirovic, S., Gaina, C., Torsvik, T., Shephard, G., Talsma, A., Gurnus, M., Turner, M., Maus, S. & Chandler, M. (2012). Global continental and ocean basin reconstructions since 200 Ma. *Earth-Science Reviews*, 113, 212–270.
- Shenefelt, R. D. & Marsh, P. M. (1976). Pars 13. Braconidae 9, Doryctinae. In van der Vecht, J. & Shenefelt, R. D. (Eds), *Hymenopterum catalogus (nova edito)*. (pp. 1263–1424). The Netherlands: W. Junk Publishers.
- Stadler T. (2009). On incomplete sampling under birth–death models and connections to the sampling–based coalescent. *Journal of Theoretical Biology*, 261, 58–66.
- Szépligeti, G. (1901). Tropischen Cenocoeliden und Braconiden aus der Sammlung des Ungarischen National-Museums. *Természetrázi Füzetek*, 24, 353–402.
- Szépligeti, G. (1904). Hymenoptera. Fam. Braconidae. *Genera Insectorum*, 22, 1–253.
- Szépligeti, G. (1906). Braconiden aus der Sammlung des ungarischen National-Museums, 1. *Annales Historico-Naturales Musei Nationalis Hungarici*, 4, 547–618.
- Turner, R.E. (1918). Notes on the Braconidae in the British Museum. II. On the Australian species Cardiochilinae and Doryctinae. *Annals and Magazine of Natural History*, 9 (1), 49–57.
- Xie, W., Lewis, P. O., Fan, Y., Kuo, L. & Chen, M-H. (2011). Improving marginal likelihood estimation for Bayesian phylogenetic model selection. *Systematic Biology*, 60, 150–160.
- Yu, D. S. K., van Acherberg, C. & Horstmann, K. (2016). Taxapad, Ichneumonoidea 2015. Database on flash-drive, Ottawa, Ontario. <http://www.taxapad.com/index.php>. Accessed 16 November 2017.
- Zaldivar-Riverón, A., Mori, M. & Quicke, D. L. J. (2006). Systematics of the cyclostome subfamilies of braconid parasitic wasps (Hymenoptera: Ichneumonoidea): a

simultaneous molecular and morphological Bayesian approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 38, 130-145.

Zaldivar-Riverón A., Belokobylskij S. A., León-Regagnon V., Martínez J. J., Briceno R., Quicke D. L. J. (2007). A single origin of gall association in a group of parasitic wasps with disparate morphologies. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44, 981–99.

Zaldivar-Riverón A., Belokobylskij S. A., León-Regagnon V., Briceno R., Quicke D. L. J. (2008). Molecular phylogeny and historical biogeography of the cosmopolitan parasitic wasp subfamily Doryctinae (Hymenoptera: Braconidae). *Invertebrate Systematics*, 22, 345–63.

Zaldivar-Riverón, A., Martínez, J. J., Belokobylskij, S. A., Pedraza-Lara, C., Shaw, S. R., Hanson, P. E. & Varela-Hernández, F. (2014). Systematics and evolution of gall formation in the plant-associated genera of the wasp subfamily Doryctinae (Hymenoptera: Braconidae). *Systematic Entomology*, 39, 633-659.

Table 1. Species assignment, localities and DNA vouchers and Genbank accession numbers of the taxa included in the study.

Asterisks indicate specimens whose sequences were combined in a single terminal.

Taxon names	Voucher no.	Locality details	COI	EF1- α 1	Wg	28S
<i>Binarea pulchripes</i> *	CNIN3092	Paraguay: San Pedro Liberación, 24°6' S – 57°4'6" W			-	
<i>Binarea pulchripes</i> *	CNIN762	Paraguay: San Pedro Liberación, 24°6' S – 57°4'6" W	-	-		-
<i>Ivondrovia grangeri</i> *	CNIN3090	Kenya: Nyanza Province, 0°29.36' S – 34°14.60' E		-	-	
<i>Ivondrovia grangeri</i> *	CNIN3609	Kenya: Nyanza Province, 0°29.36' S – 34°14.60' E	-		-	-
<i>Liobracon</i> sp.	AZR2005	Costa Rica	AY935394	-	-	AY935467
<i>Liobracon</i> sp. aff. <i>fasciatus</i>	CNIN729	French Guiana: Regina, 04°33'20" N – 52°08'19" W		-		
<i>Liobracon</i> sp. aff. <i>geniculatus</i>	CNIN3079	French Guiana: Kourou, 5°8'593" N – 52°42'411" W			-	
<i>Liobracon</i> <i>multicarinatus</i>	CNIN3318	Paraguay: San Pedro Liberación, 24°6' S – 57°4'6" W				
<i>Liobracon aquilonius</i>	CNIN3321	México: Jalisco, Chamela	-	-		
<i>Liobracon</i> sp. aff. <i>costaricensis</i>	CNIN3323	Colombia: Amazonas, 3°48'21" S – 70°18'23" W				
<i>Liobracon</i> sp. aff. <i>costaricensis</i>	CNIN3329	Guyana: Dubulay Ranch				
<i>Liobracon</i> sp. aff. <i>collare</i>	CNIN3331	Colombia: Magdalena, 11°20' N – 74°2'W			-	
<i>Liodoryctes</i> sp. nov.	CNIN3317	Madagascar: Toliara Province	-			
<i>Monarea fridae</i>	CNIN3333	México: Jalisco, Chamela		-		

<i>Nervellius</i> sp. aff. <i>costaricensis</i>	CNIN772	México: Jalisco, Chamela	HQ926119	-	-	-
<i>Nervellius exquisitus</i>	CNIN3076	French Guiana: Regina, 04°33'20" N – 52°08'19" W	-	-	-	-
<i>Nervellius tricoloratus</i>	CNIN3093	Venezuela: Yaracuy, 10°17'84" N – 68°39'32" W	-	-	-	-
<i>Nervellius philippus</i>	CNIN877	French Guiana	-	-	-	-
<i>Odontobracon</i> sp. 1	ZISP-Jo712	Costa Rica	AY935395	-	-	AY935468
<i>Odontobracon nigriceps</i>	Cham0038	México: Jalisco, Chamela, 19°29'53.3" N – 105°02'39.8" W	HM434317	-	-	HQ200885
<i>Odontobracon</i> sp. aff. <i>oemeovorus</i>	CNIN764	México: Jalisco, Chamela, 19°29'57.2" N – 105°02'37.7" W	HQ926118	-	-	-
<i>Odontobracon batesi</i>	CNIN3077	French Guiana: Kourou, 5°8'593" N – 52°42'411" W	-	-	-	-
<i>Odontobracon nigra</i>	CNIN3319	México: Morelos, El limón, 18°32'41.6" N – 98°56'07.3" W	-	-	-	-
<i>Odontobracon janzeni</i>	CNIN3324	Costa Rica: ACG Santa Rosa, 10°51' N – 85°37' W	-	-	-	-
<i>Odontobracon</i> <i>oemeovorus</i> *	CNIN3341	USA: West Virginia, Hardy county, 38° 55' N – 78°49' W	-	-	-	-
<i>Odontobracon</i> <i>oemeovorus</i> *	CNIN3415	USA: West Virginia, Hardy county, 38° 55' N – 78°49' W	-	-	-	-
<i>Odontobracon</i> sp. 2	CNIN3608	Colombia: Santander, 8° 12' N – 73°14' W	-	-	-	-
<i>Odontodoryctes seyrigi</i>	CNIN3078	Madagascar: Fianarantsoa, 21°14'91" S – 47°27'13" E	-	-	-	-
<i>Zombrus</i> sp. 1	Jo801	Kenya: Mpala Ranch	EF645784	-	-	EF645747
<i>Zombrus</i> sp. aff. <i>croceipes</i>	CNIN3091	Kenya: Nyanza Province, 0°29.36' S – 34°14.60' E	-	-	-	-
<i>Zombrus</i> sp. 2	CNIN3325	Benin	-	-	-	-
<i>Zombrus bicolor</i> *	CNIN3709	Russia: Khanka district, Primorkiy Territory	-	-	-	-
<i>Zombrus bicolor</i> *	CNIN3710	Russia: Magarakent district, Republic of Dagestan	-	-	-	-
<i>Allorhogas</i> sp.	CNIN744	Argentina: La Pampa	KC822004	KC822084	KC822131	EF645764

<i>Doryctopambolus clebschi</i>	CNIN370	Dominican Republic: La Vega, 19°4'1" N – 70°51'48.2" W	JN870294	KC822011	JN870627	KC822142
<i>Ecphylus</i> sp. 1	CNIN1095	Venezuela: Aragua, 10°29.478' N – 67°36.5330' W	KC822006	KC822087	KC822133	KC822234
<i>Ecphylus</i> sp. 2	CNIN1097	Costa Rica: Heredia, 10.20° N - 84.04° W	KC822007	KC822088	KC822134	KC822235
<i>Gymnobracon fasciatus</i>	CNIN1666	Colombia: Amazonas, 3°48'21" S – 70°18'28" W	KT851895		KT851926	KT851959
<i>Gymnobracon denticoxa</i>	CNIN1804	French Guiana: Dubulay, 5°40' N – 57° 51' W	KT851897		KT851928	KT851962
<i>Heterospilus tauricus</i> *	CNIN884	Spain: Valencia	KC822008	KC822089	-	KC822236
<i>Heterospilus</i> sp. *	ASDOR129	Mexico: Jalisco	-	-	KC822135	-
<i>Monitoriella rufithorax</i>	CNIN773	Mexico: Veracruz, Los Tuxtlas	KC822009	KC822090	KC822137	KC822237
<i>Notiospathius</i> sp. 1	CNIN360	Venezuela: Falcon, 11°49'4.692" N – 69°57'9972" W	JN870287	KC822059	JN870619	KC822198
<i>Notiospathius</i> sp. 2	CNIN499	French Guiana: Regina	JN870369	KC822020	JN870696	KC822155
<i>Notiospathius</i> sp. 3	CNIN540	Costa Rica: Heredia, 10°20' N, 84°04' W	JN870402	KC822021	KC822099	KC822158
<i>Notiospathius</i> sp. 4	CNIN358	Mexico: Oaxaca, 17°42'11952" N – 96°18'15732" W	JN870285	KC822037	JN870617	KC822172
<i>Notiospathius</i> sp. 5	CNIN417	Colombia: Norte de Santander, 8°14' N, 73°14' W	JN870312	KC822035	KC822105	KC822169
<i>Notiospathius novateutoniae</i>	CNIN1092	Brazil: Minas Gerais	KC821988	KC822051	KC822112	KC822190
<i>Osmophila</i> sp. 1	CNIN1663	French Guiana: Regina, 4°32'01" N – 52°07'45" W	KT851892		KT851923	KT851956
<i>Osmophila</i> sp. 2	CNIN1847	Costa Rica: Heredia, 10°21' N – 84°03' W	KT851899		KT851929	KT851964
<i>Pedinotus columbianus</i>	CNIN1492	Venezuela: Aragua, 10°29.978' N – 67°36.5330' W	KT851888		KT851918	KT851951
<i>Pedinotus ferrugineus</i>	CNIN1986	Mexico: Veracruz, 18°35' N – 95°06' W	KT851904		KT851933	KT851970
<i>Percnobracon witru</i> *	CNIN027	Argentina: La Pampa	-	KC822092	KC822139	-
<i>Percnobracon</i> cf. <i>stenopterus</i> *	IB19	Argentina: La Pampa	DQ498960	-	-	DQ498930

<i>Psenobolus</i> sp. 1 *	CNIN025	Costa Rica	-	KC822093	KC822140	-
<i>Psenobolus</i> sp. 2 *	ASDOR051	México: Jalisco, Chamela	HM434323	-	-	-
<i>Psenobolus</i> sp. 3 *	Jo666SB	Venezuela	-	-	-	KC822238
<i>Sergey coahuilensis</i>	CNIN637	Mexico: Coahuila	JN870454	KC822013	JN870735	KC822143
<i>Sergey tzeltal</i>	CNIN711	Mexico: Chiapas, El Triunfo 15°39.428' N – 92°48.670' W	KC821997	KC822078	KC822122	KC822225
<i>Sergey tzotzil</i>	CNIN716	Mexico: Chiapas, El Triunfo 15°39.428' N – 92°48.670' W	KC821998	KC822079	KC822123	KC822226
<i>Tarasco</i> sp. 1	CNIN705	Argentina: Misiones	KC821993	KC822074	KC822118	KC822221
<i>Tarasco</i> sp. 2	CNIN708	Argentina: Corrientes	KC821994	KC822075	KC822119	KC822222
<i>Tarasco</i> sp. 3	CNIN789	Mexico: Veracruz, 18°35'6.432" N – 95°4'30.684" W	KC822000	KC822081	KC822125	KC822228
<i>Trigonophasmus</i> sp.	CNIN1430	Brazil: Minas Gerais, 20°20.58' S – 46°38.18' W	KT851880		KT851909	KT851941
<i>Trigonophasmus ruficeps</i>	CNIN1665	French Guiana: Regina, 4°32.01' N – 52°07.45' W	KT851894		KT851925	KT851958
Aff. <i>Ontsira</i> sp. 1 *	CNIN1104	Australia: Queensland	KC822010	KC822091	KC822138	-
Aff. <i>Ontsira</i> sp. 2 *	Jo577	Australia	-	-	-	EF645749

Table 2. Primers and annealing temperatures used for PCRs.

Gene	Primer name	Primer sequence (5'-3')	Reference	Annealing temp. (°C)
COI	LCO	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	Folmer et al. (1994)	48
	HCO	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA		
EF-1-alpha	EF1A1F	AGATGGGYAARGGTTCCCTCAA	Belshaw and Quicke (1997)	55
	EF1A1R	AACATGTTGTCDCCGTGCCATCC		
wg	Wg_1	GARTGYAARTGYCAYGGYATGTCTGG	Brower and DeSalle (1998)	50
	Wg_2	ACTICGCRCACCARTGGAATGTRCA		
28S	28SF	GCGAACAAGTAACCGTGAGGG	Belshaw and Quicke (1997)	50
	28SR	TAGTTCACCATCTTTTCGGGTCCC		

Table 3. Evolutionary models used for the Bayesian MCMC analysis.

Gene	Codon position	MrBayes Substitution models	BEAST Substitution models
COI	1 st	GTR + I + G	GTR + I + G
	2 nd	HKY + I + G	
	3 rd	HKY + I + G	
EF1- α 1	1 st	GTR + I + G	TRNEF + I + G
	2 nd	JC + I	
	3 rd	HKY + I + G	
<i>Wingless</i>	1 st	GTR + I + G	TRNEF + I + G
	2 nd	JC + I	
	3 rd	HKY + I + G	
28S	-	SYM + G	GTR + G

FIGURE LEGENDS

Fig. 1 Habitus of holcobraconine genera. **a** *Binarea pulchripes* (CNIN3092). **b** *Ivondrovia seyrigi* (lectotype). **c** *Liobracon* sp. aff. *geniculatus* (CNIN3079). **d** *Liodoryctes australiensis* (lectotype). **e** *Nervellius exquisitus* (CNIN3076). **f** *Odontobracon janzeni* (CNIN3324). **g** *Odontodoryctes biannulatus* (lectotype). **h** *Zombrus* sp. aff. *croceipes* (CNIN3091)

Fig. 2 Photographs showing the hind wing of holcobraconine genera. **a** *Zombrus* sp. **b** *Liobracon* sp. aff. *geniculatus* **c** *Monarea tripartita*. **d** *Odontodoryctes biannulatus*

Fig. 3 Photographs showing some morphological features of holcobraconine genera. Head (dorsal view) with absence/presence of occipital carina (**a, b**): **a** *Binarea spinicollis*; **b** *Odontodoryctes* sp. aff. *xanthocephalus* Granger. Second metasomal tergite (dorsal view) (**c, d, e, f**): **c** *Zombrus* sp. aff. *croceipes*, with a large raised oval area; **d** *Monarea fridae*, with a sub-triangular medio-basal area; **e** *Nervellius* sp. nov. aff. *costaricensis*, with a medial oval area; **f** *Odontodoryctes biannulatus*, with a wide semi-round medio-basal area

Fig. 4 Photographs showing the hind coxae of holcobraconine genera. **a** *Nervellius* sp. nov. aff. *costaricensis*, without dorsal processes; **b** *Odontobracon janzeni*, with one tooth; **c** *Zombrus* sp. aff. *croceipes*, with two teeth; **d** *Odontodoryctes seyrigi*, with one tooth followed by a dentate crest

Fig. 5 Bayesian phylogram derived from the concatenated (COI + EF1- α + *Wingless* + 28S) data set using MrBayes. Black circles near branches represent PP values ≥ 0.95 ; hollow circles represent PP values ≤ 0.94 and ≥ 0.9

Fig. 6 Chronogram derived from the Bayesian relaxed molecular clock analysis performed with BEAST and the concatenated data set showing divergence time estimates for selected clades. Black circles near branches represent the PP values ≥ 0.95 ; blue bars represent the 95 % highest posterior densities (HPD) interval of clades

Fig. 7 *Priosphys denticulata* Enderlain, 1920 (holotype, female). **a** habitus, lateral view; **b** head, dorsal view; **c** head, front view; **d** head, lateral view; **e** hind coxa, lateral view; **f** basal segments of antenna; **g** fore tibia; **h** metasoma, dorsolateral view; **i** first metasomal tergite; **j** second-fourth metasomal tergites; **k** apical part of metasoma; **l** wings

Figure 1

[Click here to access/download;Figure;Figure 1 Holcobraconinae.tif](#)

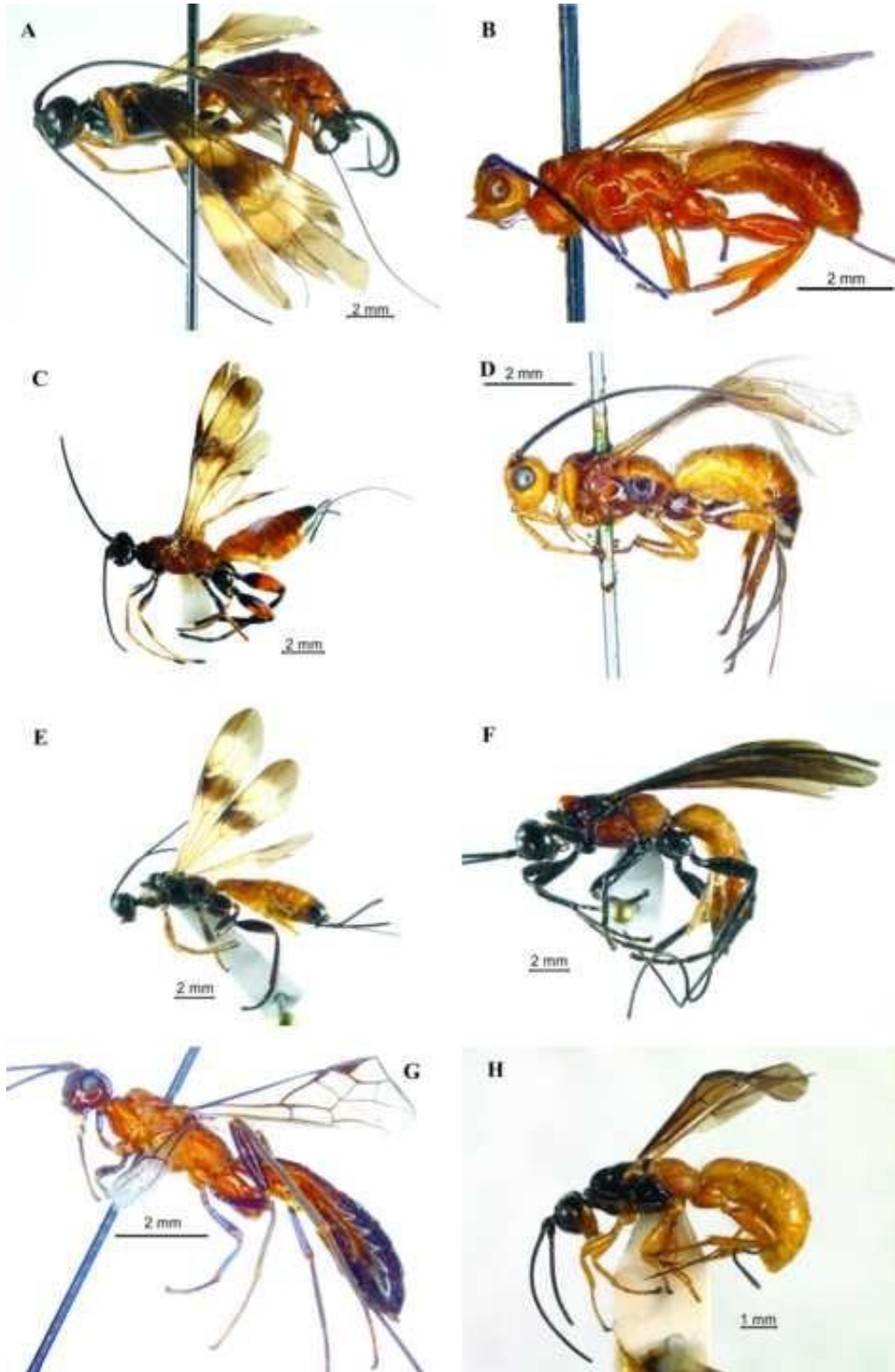


Figure 2
access/download;Figure;Figure 2 Holcobraconinae.tif

[Click here to](#)

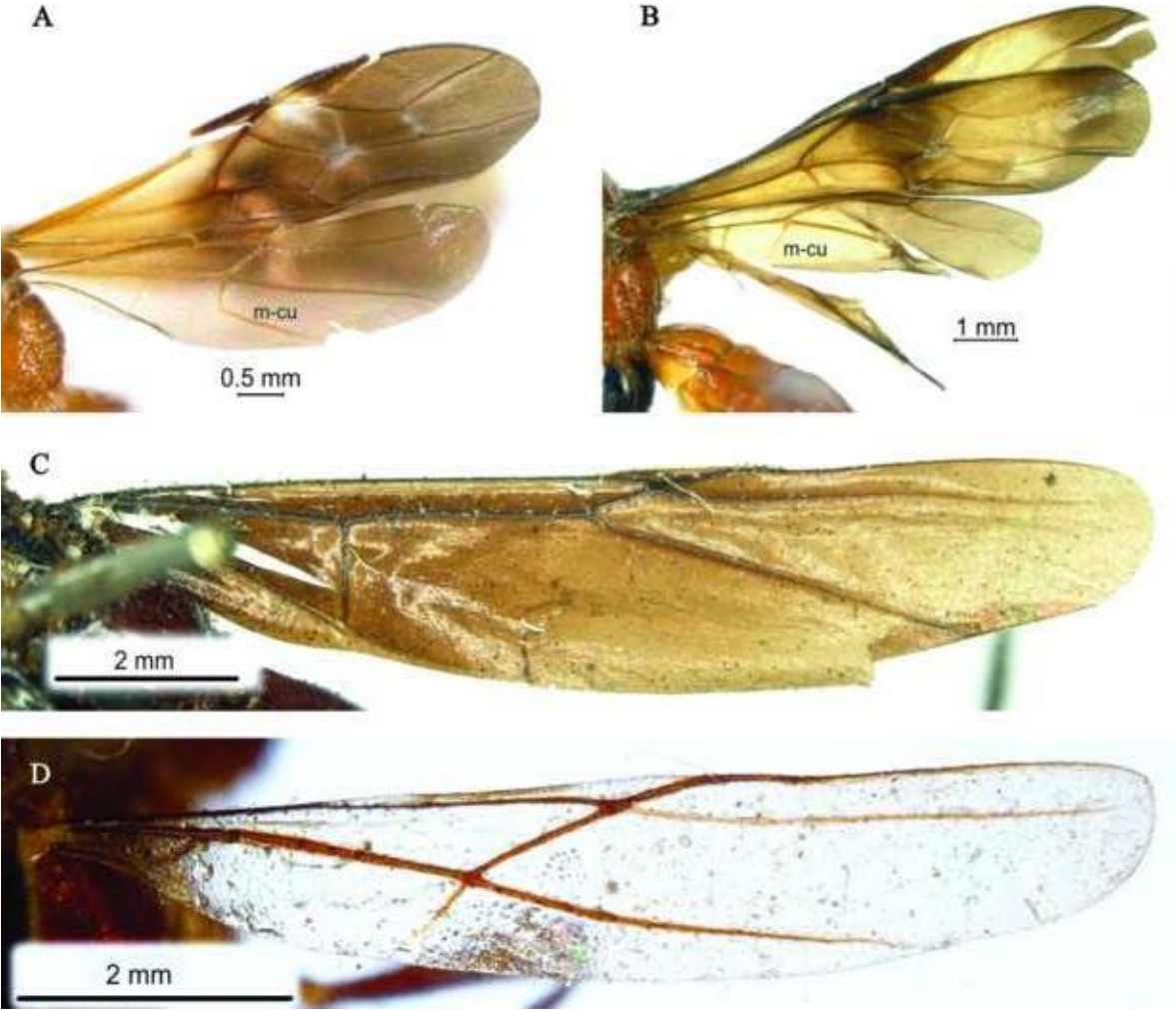


Figure 3

[Click here to access/download;Figure;Figure 3 Holcobraconinae.tif](#)

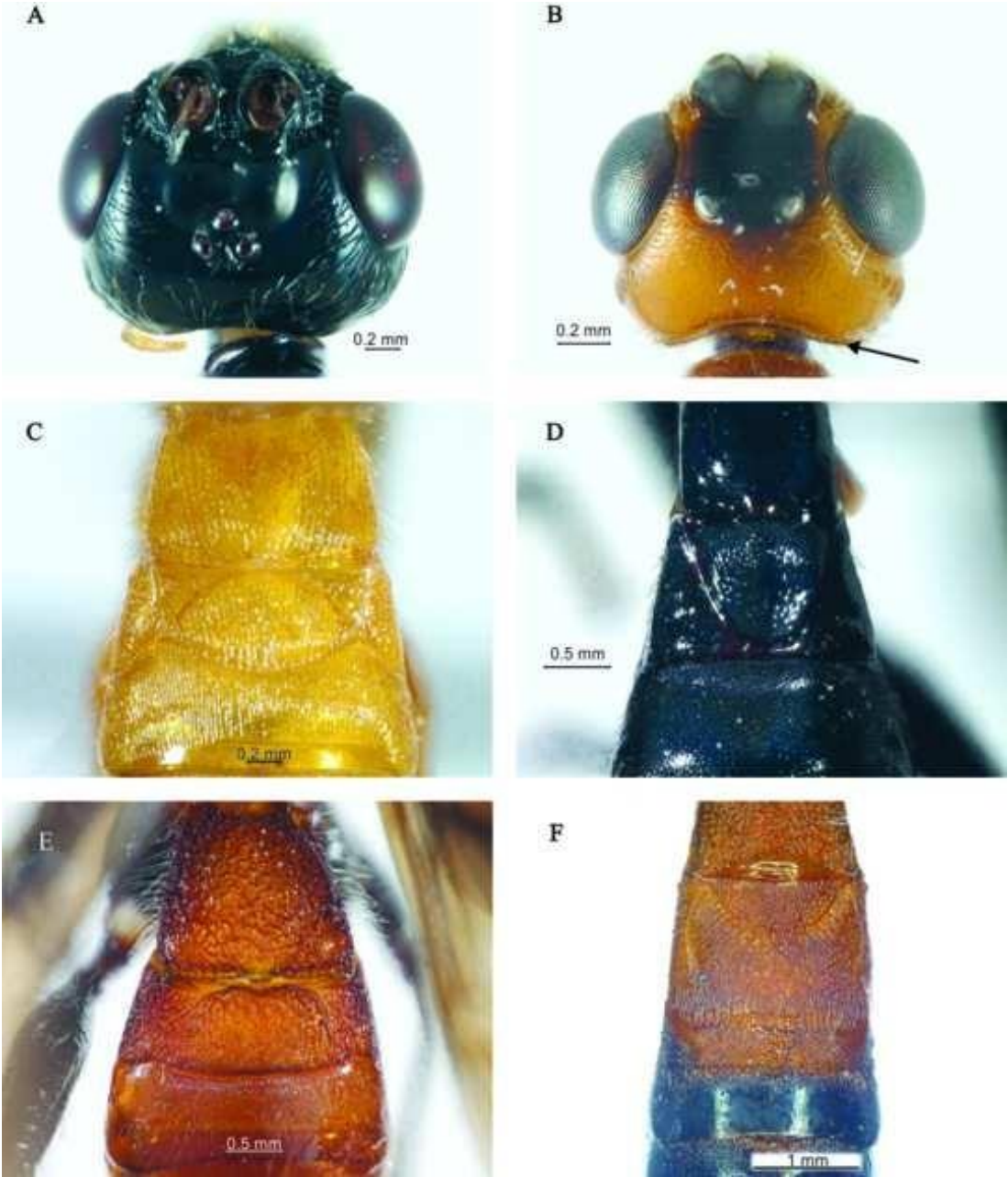


Figure 4
access/download;Figure;Figure 4 Holcobraconinae.tif

[Click here to](#)



Figure 5

[Click here to access/download;Figure;Figure 5 Holcobraconinae.tif](#)

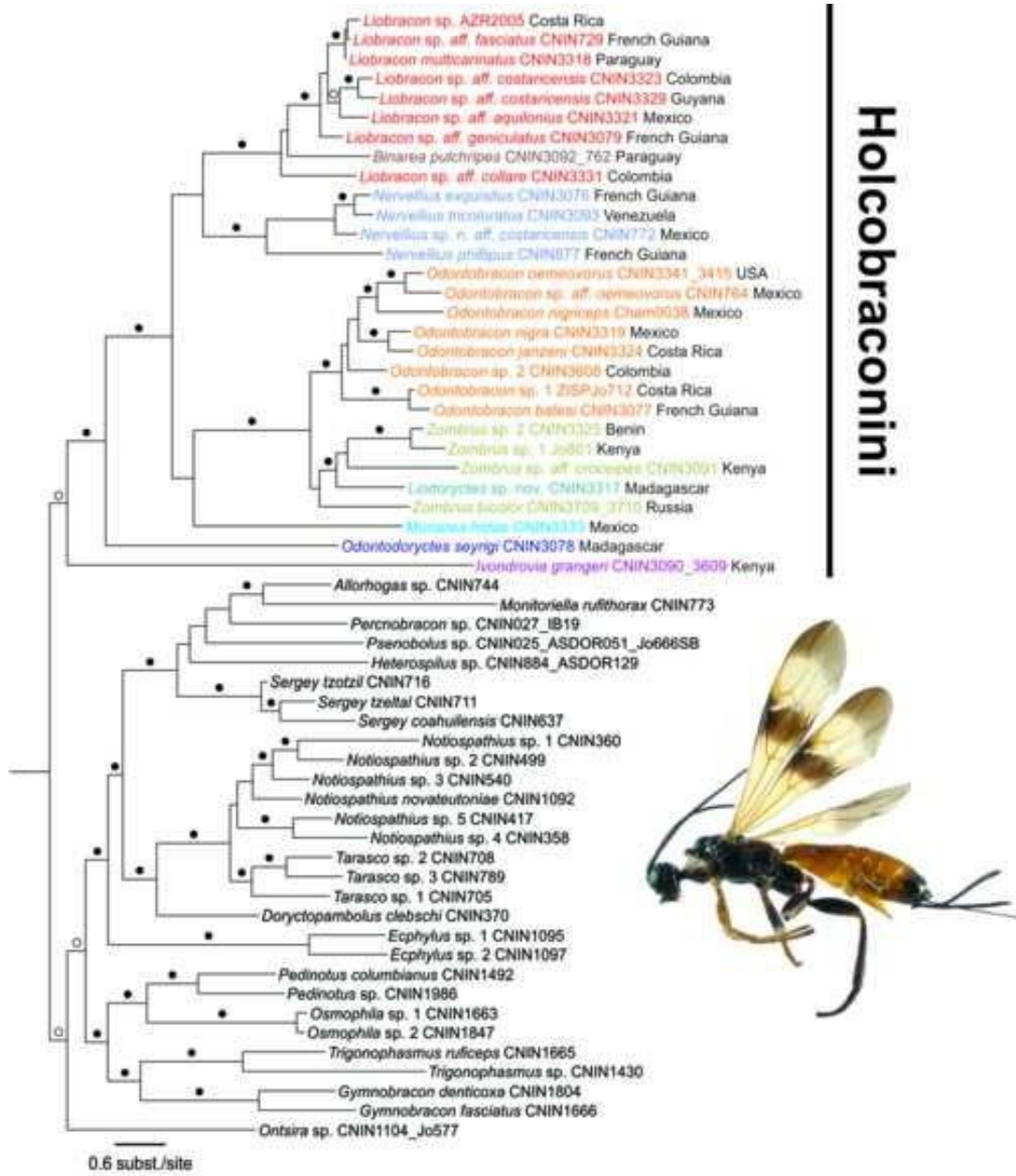


Figure 6
[access/download;Figure;Figure 6 Holcobraconinae.tif](#)

[Click here to](#)

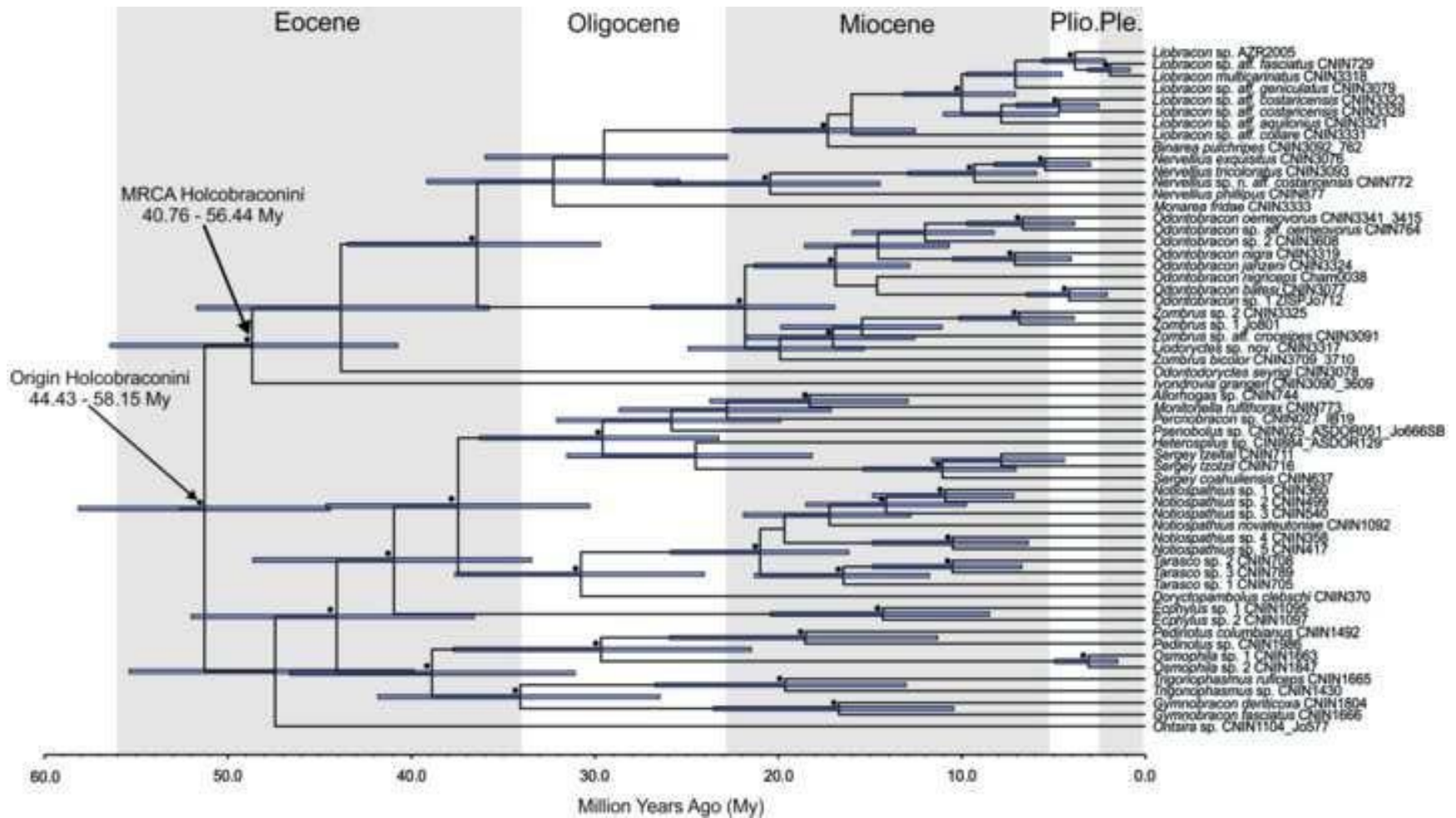
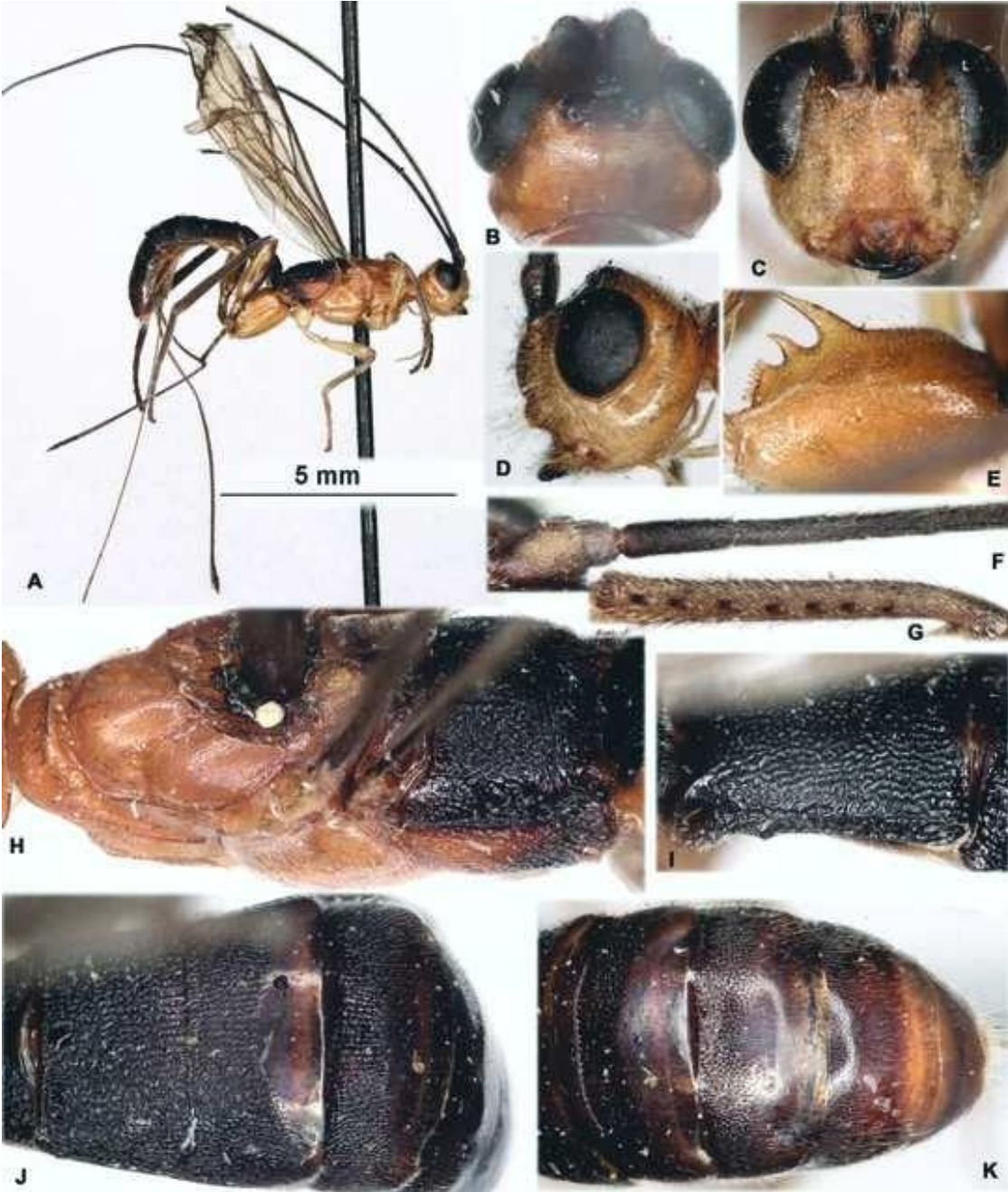


Figure 7

[Click here to access/download;Figure;Figure 7 Holcobraconinae.tif](#)



DISCUSIÓN

El presente estudio representa el primer análisis filogenético enfocado en investigar las relaciones evolutivas de Holcobraconini, una tribu cosmopolita de avispa parasitoides. (Braconidae: Doryctinae). Además, se evaluaron los límites genéricos con base en la filogenia obtenida y con la revisión morfológica de los especímenes incluidos en el estudio. Este análisis incluyó especies representativas de cinco diferentes géneros de Holcobraconini, así como de los géneros estrechamente relacionados que se han propuesto que pertenecen al grupo (Belokobylskij *et al.*, 2004, 2014; Zaldívar-Riverón *et al.*, 2006, 2007, 2008). En contraste con estudios filogenéticos previos realizados para la subfamilia Doryctinae (Belokobylskij *et al.*, 2004; Zaldívar-Riverón *et al.*, 2008), en este trabajo se incluyeron cuatro marcadores moleculares y un mayor número de géneros y de especies dentro de los géneros, los cuales recuperaron una topología considerablemente robusta y con valores de soporte estadísticamente significativos en la mayoría de sus nodos. A partir de la filogenia obtenida se realizó un análisis de fechamiento con la finalidad de inferir los tiempos de divergencia del grupo. Además, debido a que tuvimos un amplio muestreo geográfico, la hipótesis de filogenia obtenida nos permitió realizar inferencias sobre la historia biogeográfica del grupo a una escala global.

Relaciones filogenéticas

Nuestro mejor estimado de la filogenia recuperó consistentemente a la tribu como parafilética con respecto a los cuatro géneros relacionados: *Binarea* y *Liobracon* (tribu Binareini), *Monarea* y *Odontodoryctes* (tribu Doryctinae; Belokobylskij, 1992), lo que concuerda con análisis filogenéticos previos (Belokobylskij *et al.*, 2004, 2014; Zaldívar-Riverón *et al.*, 2006, 2007, 2008). Esta hipótesis de filogenia obtenida corrobora la idea que las características diagnósticas de las tribus de Doryctinae propuestas anteriormente no reflejan fielmente la historia evolutiva del grupo. De la misma manera, se corrobora que la morfología de las avispa de la subfamilia Doryctinae y de la tribu Holcobraconini es altamente homoplásica y que la clasificación taxonómica de este grupo y de muchos otros grupos de insectos resulta difícil y compleja pues en muchas ocasiones carecen de un carácter o conjunto de caracteres exclusivos que ayuden a definir una diagnosis, así como en su

identificación y clasificación en los diferentes niveles taxonómicos, por lo que se considera que se debe usar una combinación de caracteres que se pueda usar al definir a un grupo de estudio, en este caso a la tribu y los géneros relacionados con ella.

Debido a la enorme diversidad de especies de insectos, su clasificación taxonómica puede ser difícil y en consecuencia representa un gran problema cuando se trata de describir e identificar una especie (Brues *et al.*, 1954). De acuerdo con Mayr (1969), una de las funciones de los caracteres taxonómicos es proveer una característica diagnóstica que especifique un taxón dado. Por lo tanto, el problema de la clasificación taxonómica es perceptible dentro de los insectos debido a que en ocasiones carecen de caracteres exclusivos que ayuden a definir, identificar y clasificarlos en los diferentes grupos y niveles.

En el estudio taxonómico realizado en la presente tesis no se encontró un carácter sinapomórfico de morfología externa que sea consistente y que soporte el agrupamiento de *Binarea*, *Liobracon*, *Monarea* y *Odontodoryctes* dentro de Holcobraconini, ya que la única característica que apoyaba la composición genérica y tradicional de la tribu, la vena m-cu del ala posterior fuertemente curvada hacia el margen apical del ala, parece haberse perdido en tres ocasiones diferentes en nuestra reconstrucción filogenética. De acuerdo con la topología obtenida con esta evidencia molecular se transfieren los cuatro géneros anteriormente mencionados a Holcobraconini y con base en evidencia morfológica se colocaron dentro de la tribu los dos géneros restantes de Binareini, *Acanthodoryctes* y *Antidoryctes* (Belokobylskij & Quicke, 2000) y el género *Priosphys* Enderlein, 1920. Por lo tanto, se reconocen dentro de Holcobraconini 13 géneros en total y se propone la siguiente combinación de caracteres para la diagnosis de la tribu con base en la examinación morfológica:

- 1) Vena recurrente (m-cu) del ala posterior muy larga y fuertemente curvada hacia el margen apical del ala; corta e inclinada hacia la base del ala; o completamente ausente.
- 2) Segundo terguito metasomal; usualmente con una gran área media sub-oval elevada; o sub-triangular.

- 3) Coxas posteriores sin ángulo baso-ventral ni tubérculo basal, usualmente con procesos dorsales, como pueden ser 1 o 2 dientes, una cresta o una cresta dentada.
- 4) Glándula de veneno considerablemente alargada y sin dividir, más o menos paralela por los lados, dando apariencia tubular y finamente esculpida.
- 5) Ovipositor con setas subctenidiales extremadamente aplanadas produciendo estructuras sobrelapantes parecidas a hojuelas.

Límites genéricos

Nuestro análisis filogenético recuperó a los géneros examinados como monofiléticos con excepción de *Liobracon* y *Zombrus*. La ubicación de *Binarea* dentro de *Liobracon*, aunque con apoyo estadístico bajo, la prueba de hipótesis alternas no constriñendo el último género como monofilético y el parecido morfológico sugiere que estos dos géneros deben ser sinonimizados. Sin embargo, existen diferencias morfológicas que nos permiten distinguir a las especies de estos dos géneros: el propleuron presenta anteriormente dos dientes agudos con forma de gancho en *Binarea* y carece de ellos en *Liobracon*, además presenta un tubérculo distintivo en el tercio posterior en *Binarea*; surco precoxal ausente en *Binarea* y presente en *Liobracon*. Sin embargo, la literatura indica que el género *Binarea* agrupa cuatro especies, mientras que *Liobracon* contiene 16 especies, por lo que decidimos mantener estos géneros separados debido a que incluimos una sola especie de *Binarea* y siete de *Liobracon* sólo de la región neotropical.

Por otra parte, la presencia de la especie de *Liodoryctes* agrupada dentro del clado con las especies del género *Zombrus* es congruente con su distribución geográfica, ya que la única especie de *Zombrus* del paleártico incluida en este estudio se recuperó como taxón hermano del resto, los cuales se distribuyen en la región Etiópica. Sin embargo, la prueba de topologías alternativas no rechazó la monofilia del género *Zombrus* y por consiguiente decidimos mantener separados ambos géneros en espera de que se realicen análisis filogenéticos con más especies, sobre todo para el género *Zombrus*, pues se sabe que es el género de holcobraconinos con más especies (48 aproximadamente) y que se distribuyen en las regiones Australiana, Etiópica, Oriental y Paleártica. Estos dos géneros se pueden distinguir morfológicamente por la presencia de carina occipital dorsal y lateralmente en *Zombrus* o la

ausencia de ella en *Liodoryctes*, y por la presencia de notauli al menos en la mitad anterior en *Zombrus* o su reducción casi por completo en *Liodoryctes*.

En diversos estudios filogenómicos se ha puesto en evidencia que tener un muestreo taxonómico completo e incluir un mayor número de genes dan como resultado hipótesis filogenéticas más robustas, es decir, con valores de soporte significativos (Misof *et al.*, 2014; Branstetter *et al.*, 2016; Condamine *et al.*, 2016; Giribet, 2016). Asimismo, la resolución de los análisis filogenéticos se ve fuertemente favorecida cuando se tiene un muestreo considerable de taxones (Zwickl & Hillis, 2002). Además, se ha demostrado que la topología obtenida en un análisis filogenético se puede ver afectada por la elección de los marcadores genéticos, la selección del grupo externo y el muestreo y cobertura de taxones (Albert *et al.*, 2008; Blanke *et al.*, 2012).

Tiempos de divergencia e inferencias biogeográficas

En el presente estudio se estimaron los tiempos de origen y los principales eventos de divergencia de la tribu Holcobraconini usando un enfoque de reloj molecular relajado con el método bayesiano implementado en el programa BEAST v.1.8.2 (Drummond *et al.*, 2012).

En un análisis de fechamiento se pueden incorporar puntos de referencia temporales como sitios de calibración, lo que establece una referencia temporal con la que los tiempos de divergencia de los nodos pueden ser escalados, o como constricciones a las edades de los nodos, lo que ayuda a la estimación de los tiempos de divergencia (Magallón, 2004). Por lo tanto, es importante que un nodo de calibración apropiado represente una relación filogenética bien soportada. De acuerdo con Magallón (2004), existen tres fuentes de información cronológica: registro fósil, información geológica y estimaciones de edad con base molecular.

El registro fósil es la fuente de información más común para conocer la edad de los linajes. Además, el registro fósil provee información sobre la edad mínima de los clados. Para usar un fósil para fechar un nodo en la filogenia debe estar correctamente identificado y debe estar fechado adecuadamente, ya sea por correlación estratigráfica o por datación radiométrica (Magallón, 2004). Es importante mencionar que en este estudio no se pudo

implementar una calibración fósil debido a que en la matriz de datos no se contó con ninguna terminal asignada al género *Aivalykus*, un género doryctino del cual se tiene registro fósil confiable y proviene de ámbar dominicano (Muesebeck 1960; Zuparko & Poinar 1997).

En un análisis preliminar en este estudio se implementó un esquema de calibración con tasas de evolución molecular para dos genes, COI y 28S. Para este análisis de prueba se usaron los promedios y las desviaciones estándar de las tasas de evolución estimadas por Papadopoulou *et al.* (2010). Para el gen COI (COI ucl.d.mean (subst/sitio/Ma) se utilizó una distribución lognormal en espacio real, con valor inicial de 0.0168, logaritmo de la media de 0.0168 y logaritmo de la desviación estándar de 0.0018; para el gen 28S se utilizó una distribución lognormal en espacio real, con valor inicial de 0.0006, logaritmo de la media de 0.0006 y logaritmo de la desviación estándar de 0.0003. Los estimados obtenidos para las edades de los clados bajo este esquema de calibración resultaron ser mucho más antiguos que los obtenidos por medio de la calibración secundaria. Por ejemplo, la edad obtenida de la divergencia de *Holcobraconini* del clado Sudamericano + Australiano fue de 92.97 a 165.9 Ma (Media de 128.84 Ma), mientras que el ancestro común más reciente de la tribu se estimó de 82.93 a 152.14 (media de 115.7 Ma). El hecho de que las estimaciones de los tiempos de divergencia se recuperaran muy antiguas se debe a que no se establece un límite o edad máxima de ocurrencia para los puntos de divergencia dando así edades muy anteriores a las que pudieran ser reales. Por lo tanto, para este estudio se descartó este esquema de calibración para evitar tener estimados muy antiguos y erróneos de las edades de la tribu y del resto de los doryctinos aquí incluidos.

El esquema de calibración elegido para este estudio consistió en calibrar un nodo en el árbol ultramétrico reconstruido usando las distribuciones paramétricas de la edad propuesta para el punto de divergencia entre *Holcobraconini* y el clado Sudamericano + Australiano, obtenidas del estudio llevado a cabo por Zaldívar-Riverón *et al.* (2008). Esta relación ha sido recuperada consistentemente en estudios filogenéticos previos para la subfamilia Doryctinae (Belokobylskij *et al.*, 2014; Zaldívar-Riverón *et al.*, 2007, 2008). El nodo calibrado se ajustó a una edad media de 52.11 ma usando una distribución normal que permite incertidumbre bidireccional decreciente y una desviación estándar de 3.48 ma.

A continuación, se presentan las inferencias biogeográficas realizadas para el grupo con base en las relaciones filogenéticas obtenidas, los tiempos de divergencia estimados y las distribuciones geográficas de cada género. El resultado del análisis de fechamiento sugiere que la tribu Holcobraconini probablemente se originó durante el Paleoceno tardío al Eoceno medio. La estimación del origen para la tribu es congruente con el origen estimado por el estudio filogenético molecular de Doryctinae realizado por Zaldívar-Riverón *et al.* (2008) usando el método de verosimilitud penalizado (Sanderson, 2002). Además, los géneros de holcobraconinos que se encuentran en las dos ramificaciones más basales, *Ivondrovia* y *Odontodoryctes*, están restringidos a la región Etiópica, lo que sugiere que esta pudo haber sido el área ancestral para el ancestro común más reciente (ACMR) de la tribu.

Las estimaciones del tiempo de divergencia obtenidos para Holcobraconini son considerablemente más recientes que la edad propuesta para la separación final entre África y Sudamérica (~105 a 120 millones de años, McLoughlin, 2001; Seton et al., 2012). Por lo tanto, se propone que al menos dos eventos principales de dispersión podrían haber dado lugar a la actual distribución geográfica de los géneros de holcobraconinos. El primero de esos eventos posiblemente ocurrió desde la región Etiópica a la Neotropical durante el Eoceno Tardío al Oligoceno Temprano en el clado que contiene a *Monarea*, *Nervellius*, *Binarea* and *Liobracon*. El segundo evento principal de dispersión pudo haber ocurrido con el clado que agrupa a *Odontobracon*, *Liodoryctes* y *Zombrus*, cuyo ancestro común más reciente probablemente se dispersó de la región Etiópica a las regiones Neotropical, Paleártica y posiblemente a la Australiana y Oriental durante en Oligoceno Tardío al Mioceno Temprano.

La historia de diversificación propuesta para Holcobraconini y su dispersión aparente a la mayoría de las regiones biogeográficas durante el Paleoceno tardío al Eoceno medio pudo haber ocurrido debido a un incremento en la temperatura atmosférica durante este periodo, evento conocido como el Máximo Térmico del Paleoceno-Eoceno (PETM) (Bains *et al.*, 1999; Gingerich, 2006; Jardine, 2011; McInerney & Wing, 2011). Este incremento de temperatura hacia el final del Paleoceno e inicio del Eoceno pudo haber propiciado las condiciones ambientales que pudieron favorecer el crecimiento de las poblaciones de muchas especies de insectos incluyendo los Holcobraconinos, así como su dispersión a ambientes

que anteriormente eran más fríos (Currano *et al.*, 2011; Jardine, 2011; McInerney & Wing, 2011), permitiendo así la expansión de su distribución geográfica, dando como resultado la presencia de estos organismos en diversas regiones biogeográficas.

CONCLUSIONES

- Se investigó la sistemática de los géneros de avispas parasitoides de la tribu Holcobraconini Cameron, 1905 y de los géneros cercanamente relacionados con base en cuatro marcadores moleculares (COI, EF1- α , *Wingless* y 28S).
- La tribu Holcobraconini se recuperó como parafilética con respecto a los géneros *Acanthodoryctes*, *Antidoryctes*, *Binarea*, *Liobracon*, *Monarea*, *Odontodoryctes* y *Priosphys*.
- Con base en la hipótesis filogenética obtenida y con la revisión morfológica externa de los ejemplares examinados se propuso una combinación de caracteres para la diagnosis de la tribu: vena m-cu del ala posterior muy larga y fuertemente curvada hacia el margen apical del ala, corta e inclinada hacia la base del ala, o completamente ausente; segundo terguito metasomal usualmente con un área media sub-oval elevada o sub-triangular; coxas posteriores sin ángulo baso-ventral ni tubérculo basal, usualmente con procesos dorsales, como pueden ser 1 o 2 dientes, una cresta o una cresta dentada; glándula de veneno elongada y sin dividir, con las paredes más o menos paralelas entre sí dando una apariencia tubular, y finamente esculpida; ovipositor con setas subctenidiales extremadamente aplanadas produciendo estructuras sobrelapantes parecidas a hojuelas.
- La mayoría de los géneros se recuperaron como monofiléticos, excepto *Liobracon* y *Zombrus*. Debido a que se examinaron pocos ejemplares de estos dos géneros, se sugiere mantenerlos con su composición actual.
- El tiempo de origen y la divergencia de la tribu se estimó que ocurrió durante el Paleoceno tardío y el Eoceno medio (hace 44.43 a 58.15 Ma), y su diversificación en varios continentes pudo haber estado relacionada con un incremento en la temperatura durante este periodo.
- El área ancestral del ancestro común más reciente de Holcobraconini se sugiere que pudo haberse originado en la región Etiópica (continente africano), y que al menos dos eventos de dispersión ocurrieron para Holcobraconini.

LITERATURA CITADA

- Albert, E. M., San Mauro, D., García-París, M., Rüber, L., & Zardoya, R. (2009). Effect of taxon sampling on recovering the phylogeny of squamate reptiles based on complete mitochondrial genome and nuclear gene sequence data. *Gene*, 441, 12–21.
- Austin, A. D., & Dowton, M. (2000). *Hymenoptera: Evolution, Biodiversity and Biological Control*. Csiro Publishing, Melbourne.
- Bains, S., Corfield, R. M., & Norris, R. D. (1999). Mechanisms of climate warming at the end of the Paleocene. *Science*, 285, 724–727.
- Belokobylskij, S. A. (1992). On the classification and phylogeny of the braconid wasps of subfamilies Doryctinae and Exothecinae (Hymenoptera, Braconidae). Part I. On the classification, 1. *Entomologicheskoye Obozreniye*, 71, 900–928. (In Russian). English translation *Entomological Review*, 72, 109–137.
- Belokobylskij, S. A. & Samartsev, K. G. (2011). First records of the tribe Holcobraconini and the genus *Zombrus* Marshall, 1897 (Hymenoptera: Braconidae: Doryctinae) in Europe. *Zoosystematica Rossica*, 20, 310–318.
- Belokobylskij S. A., Zaldívar-Riverón A. & Quicke D. L. J. (2004). Phylogeny of the parasitic wasp genera of the subfamily Doryctinae (Hymenoptera: Braconidae) from morphological evidence. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 142, 369–404.
- Belokobylskij, S. A., Zaldívar-Riverón, A. & Coronado-Blanco, J. M. (2014). Phylogenetic affinities of *Monarea* Szépligeti, 1904 (Hymenoptera: Braconidae, Doryctinae, with description of a new species from Mexico. *Zootaxa*, 3795, 421–430.
- Blanke, A., Wipfler, B., Letsch, H., Koch, M., Beckmann, F., Beutel, R., & Misof, B. (2012). Revival of Palaeoptera—head characters support a monophyletic origin of Odonata and Ephemeroptera (Insecta). *Cladistics*, 28, 1–22.
- Bradler, S., Cliquennois, N., & Buckley, T. R. (2015). Single origin of the Mascarene stick insects: ancient radiation on sunken islands?. *BMC Evolutionary Biology*, 15, 1–10.

- Branstetter, M. G., Danforth, B. N., Pitts, J. P., Faircloth, B. C., Ward, P. S., Buffington, M. L., Gates, M. W., Kula, R. R. & Brady, S. G. (2016). Phylogenomic analysis of ants, bees and stinging wasps: Improved taxon sampling enhances understanding of hymenopteran evolution. *Nature Ecology and Evolution*; 27, 1019–1025.
- Brues, C. T., Melander, A. L., & Carpenter, F. M. (1954). *Classification of insects*. Cambridge, Mass; USA.
- Cameron, P. (1905). On the phytophagous and parasitic Hymenoptera collected by Mr. E. Ernest Green in Ceylon. *Spolia Zeylanica*, 3, 67–143.
- Condamine, F. L., Clapham, M. E., & Kergoat, G. J. (2016). Global patterns of insect diversification: towards a reconciliation of fossil and molecular evidence?. *Scientific reports*, 6, 19208.
- Currano, E. D., Kattler, K. R., & Flynn, A. (2011). Paleogene insect herbivory as a proxy for pCO₂ and ecosystem stress in the Bighorn Basin, Wyoming, USA. *Berichte der Geologischen Bundes-Anstalt*, 85, 61.
- Drummond, A. J., Suchard, M. A., Xie, D., & Rambaut, A. (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, 29, 1969–1973.
- Economio E. P., Klimov P., Sarnat, E. M., Guénard B., Weiser M. D., Lecroq B. & Knowles L. L. (2015). Global phylogenetic structure of the hyperdiverse ant genus *Pheidole* reveals the repeated evolution of macroecological patters. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 282, 20141416.
- Gauld, I., & Bolton, B. (1988). *The Hymenoptera*. Oxford University Press, British Museum (Natural History), London.
- Gingerich, P. D. (2006). Environment and evolution through the Paleocene–Eocene thermal maximum. *Trends in Ecology and Evolution*, 21, 246–253.
- Giribet, G. (2016). New animal phylogeny: future challenges for animal phylogeny in the age of phylogenomics. *Organisms Diversity & Evolution*, 16, 419–426.

- Goulet, H., & Huber, J. T. (1993). *Hymenoptera of the world: An identification guide to families*. Centre for Land and Biological Resources Research Ottawa, Ontario.
- Guo, P., Liu, Q., Xu, Y., Jiang, K., Hou, M., Ding, L., Alexander-Pyron, R. & Burbrink, F. T. (2012). Out of Asia: natricine snakes support the Cenozoic Beringian dispersal hypothesis. *Molecular phylogenetics and evolution*, 63, 825–833.
- Huber, J. T. (2009). Biodiversity of Hymenoptera. In: Foottit, R. G. & Adler, P. *Insect Biodiversity: Science and Society*. 1st edition ed. Oxford, UK: Wiley-Blackwell.
- Jardine, P. (2011). The Paleocene-Eocene Thermal Maximum. *Palaeontology Online*, 1, 1–7.
- Long, K. D., Van Achterberg, C., & Hoa, D. T. (2018). New record of the genus *Zombrus* Marshall, 1897 (Hymenoptera: Braconidae: Doryctinae), with description of three new species from Vietnam. *Zootaxa*, 4420, 279–291.
- Magallón, S. A. (2004). Dating lineages: molecular and paleontological approaches to the temporal framework of clades. *International Journal of Plant Sciences*, 165, S7–S21.
- Malyshev, S. I. (1968). *Genesis of the Hymenoptera and the Phases of their Evolution*. Methuen & Co. LTD., London.
- Marsh, P. M. (1988). Revision of the tribe Odontobraconini in the Western Hemisphere (Hymenoptera: Braconidae: Doryctinae). *Systematic Entomology*, 13, 443–464.
- Marsh P. M., de Macedo M. V., & Pimentel M. C. P. (2000). Descriptions and biological notes on two new phytophagous species of the genus *Allorhogas* from Brasil (Hymenoptera: Braconidae: Doryctinae). *Journal of Hymenoptera Research*, 9, 292–297.
- Mayr, E. (1969). *Principles of systematic zoology*. McGraw-Hill, New York.
- McInerney, F. A., & Wing, S. L. (2011). The Paleocene-Eocene Thermal Maximum: A perturbation of carbon cycle, climate, and biosphere with implications for the future. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 39, 489–516.

- McLoughlin, S. (2001). The breakup history of Gondwana and its impact on pre-Cenozoic floristic provincialism. *Australian Journal of Botany*, 49, 271–300.
- Misof, B., Liu, S., Meusemann, K., Peters, R.S., Donath, A., Mayer, C., Frandsen, P.B., Ware, J., Flouri, T., Beutel, R.G., *et al.* (2014). Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. *Science*, 346, 763–767.
- Muesebeck, C. F. W. (1960). A fossil braconid wasp of the genus *Ecphylus* (Hymenoptera). *Journal of Paleontology*, 34, 495–496.
- Papadopoulou A., Anastasiou I. & Vogler A. P. (2010). Revisiting the insect mitochondrial molecular clock: the mid-Aegean trench calibration. *Molecular Biology and Evolution*, 27, 1659–1672.
- Quicke, D. L. J. (2015). *The Braconid and Ichneumonid Parasitoid Wasps: Biology, Systematics, Evolution and Ecology*. Wiley Blackwell.
- Quicke, D. L. J., Tunstead, J., Falco, J. V., & Marsh, P. M. (1992). Venom gland and reservoir morphology in the Doryctinae and related braconid wasps (Insecta, Hymenoptera, Braconidae). *Zoologica Scripta*, 21, 403–416.
- Rahman, M. H., Fitton, M. G., & Quicke, D. L. J. (1998). Ovipositor internal microsculpture and other features in doryctine wasps (Insecta, Hymenoptera, Braconidae). *Zoologica Scripta*, 27, 333–343.
- Rasmussen, C., & Cameron, S. A. (2009). Global stingless bee phylogeny supports ancient divergence, vicariance, and long distance dispersal. *Biological Journal of the Linnean Society*, 99, 206–232.
- Rota, J., Peña, C., & Miller, S. E. (2016). The importance of long-distance dispersal and establishment events in small insects: historical biogeography of metalmark moths (Lepidoptera, Choreutidae). *Journal of Biogeography*, 43, 1254–1265.
- Samacá-Sáenz, E., Belokobylskij, S.A., Quicke, D.L.J. & Zaldivar-Riveron, A. (2016) Systematics of the Neotropical braconid wasps of the *Pedinotus* genus group (Doryctinae). *Systematic Entomology*, 41, 481–491.

- Sanderson, M. J. (2002). Estimating absolute rates of molecular evolution and divergence times: a penalized likelihood approach. *Molecular Biology and Evolution*, 19, 101–109.
- Seton, M., Müller, R. D., Zahirovic, S., Gaina, C., Torsvik, T., Shephard, G., Talsma, A., Gurnus, M., Turner, M., Maus, S., & Chandler, M. (2012). Global continental and ocean basin reconstructions since 200 Ma. *Earth-Science Reviews*, 113, 212–270.
- Shenefelt, R. D., & Marsh, P. M. (1976). Pars 13. Braconidae 9, Doryctinae. In J. van der Vecht and R. D. Shenefelt (Ed.), *Hymenopterum catalogus (nova edito)*. (pp. 1263–1424). The Netherlands: W. Junk Publishers.
- Sole, C. L., Wirta, H., Forgie, S. A., & Scholtz, C. H. (2011). Origin of Madagascan Scarabaeini dung beetles (Coleoptera: Scarabaeidae): dispersal from Africa. *Insect Systematics & Evolution*, 42, 29–40.
- Wharton, R. A., Marsh, P. M. and Sharkey, M. J. (1997) Manual of the New World Genera of the Family Braconidae (Hymenoptera). *Special Publication of the International Society of Hymenopterists*, 1, 1–439.
- Yu, D. S. K., van Achterberg, C. & Horstmann, K. (2016). Taxapad, Ichneumonoidea 2015. Database on flash-drive, Ottawa, Ontario. <http://www.taxapad.com/index.php>. Accessed 16 November 2017.
- Zaldívar-Riverón, A., Mori, M., & Quicke, D. L. J. (2006). Systematics of the cyclostome subfamilies of braconid parasitic wasps (Hymenoptera: Ichneumonoidea): a simultaneous molecular and morphological Bayesian approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 38, 130–145.
- Zaldívar-Riverón A., Belokobylskij S. A., León-Regagnon V., Martínez J. J., Briceno R, Quicke D. L. J. (2007). A single origin of gall association in a group of parasitic wasps with disparate morphologies. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44, 981–99.
- Zaldívar-Riverón A., Belokobylskij S. A., León-Regagnon V., Briceno R., Quicke D. L. J. (2008). Molecular phylogeny and historical biogeography of the cosmopolitan

parasitic wasp subfamily Doryctinae (Hymenoptera: Braconidae). *Invertebrate Systematics*, 22, 345–63.

Zuparko, R. L., and Poinar, G. O. (1997). *Aivalykus dominicanus* (Hymenoptera: Braconidae), a new species from Dominican amber. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 99, 744–747.

Zwickl, D. J., & Hillis, D. M. (2002). Increased taxon sampling greatly reduces phylogenetic error. *Systematic Biology*, 51, 588-598.