



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

Identificación de virus mutualistas en avispas parasitoides de la familia Braconidae (Insecta: Ichneumonoidea) usando datos a escala genómica

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Bióloga

P R E S E N T A:

Diana Abigail Mil Salazar

**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Alejandro Zaldívar Riverón
(2023)**



Ciudad Universitaria, CD.MX.



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.

1. Datos del alumno

Diana Abigail Mil Salazar
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
316289610

2. Datos del director

Dr. Alejandro Zaldívar Riverón
Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Biología
Departamento de Zoología

3. Datos del sinodal 1

Dr. Carlos Salvador Pedraza Lara
Universidad Nacional Autónoma de México
Escuela Nacional de Ciencias Forenses

4. Datos del sinodal 2

Dr. José Alberto Campillo Balderas
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Evolutiva

5. Datos del sinodal 3

Dr. Santiago Alejandro Ramírez Barahona
Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Biología
Departamento de Botánica

6. Datos del sinodal 4

Dra. Rosario Mata López
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de ciencias
Departamento de Biología Evolutiva

Datos de la tesis

Título: Identificación de virus mutualistas en avispa parasitoides de la familia Braconidae (Insecta: Ichneumonoidea) usando datos a escala genómica

Palabras claves: virus mutualistas, parasitoides, bioinformática, genes centrales antiguos, interacciones.

Número de páginas 66

2023

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor, el Dr. Alejandro Zaldívar por permitirme formar parte de este proyecto, por todos sus comentarios y correcciones, por todo el apoyo brindado durante todo proceso de realización de esta tesis y por compartir parte de sus conocimientos conmigo.

Mis especiales agradecimientos a la Dra. Jovana Jasso porque junto al Dr. Alejandro Zaldívar, fue parte fundamental para el desarrollo de este proyecto, así como, su gran participación durante el desarrollo conceptual y metodológico. Por todos sus comentarios, por su paciencia al momento de enseñar y por compartir parte de sus conocimientos conmigo al igual que su motivación por aprender.

A la Dra. Gaelen Burke por compartir con nosotros las bases de datos y la ayuda brindada durante parte de la metodología.

A todos mis compañeros del Zaldivar's lab por sus comentarios durante las exposiciones de este proyecto.

A mis sinodales el Dr. Santiago Ramírez, el Dr. José Campillo, la Dra. Rosario Mata y el Dr. Carlos Pedraza por sus comentarios para mejorar el escrito.

Investigación realizada gracias al Programa UNAM-PAPIIT con clave IN201622 “Influencia de las estrategias de parasitoidismo en los patrones de diversificación de las especies de avispa de la familia Braconidae”.

DEDICATORIAS

Dedico esta tesis a mi mamá y papá por motivarme a hacer siempre lo que más me gusta y disfruto, por darme miles de lecciones y por siempre estar a mi lado incondicionalmente. Se la dedico a mis hermanos, Vic y Fer, por ser las personas con las que me siento más segura y por siempre estar a mi lado haciéndome reír y apoyando en los momentos difíciles. A mis abuelos; Ale, aunque no pudo ver la culminación de este trabajo sé que está orgullosa de mí y a Isidro por darme tantas lecciones durante toda mi vida. Les dedico esta tesis a toda la familia Salazar porque gracias a ellos puedo ser quien soy ahora y por todo el amor y apoyo que siempre me dan. Se la dedico a mis amigos más cercanos de la facultad de ciencias, Ale y Paty, con los que compartí siempre la frustración y llanto, pero también miles de risas y buenos momentos. Por último, a Liz y Julieta por siempre animarme a seguir adelante y aunque sigamos caminos separados siempre encontramos un momento para coincidir.

Resumen	5
1. Introducción	6
1.1. Importancia de los microorganismos asociados a insectos	7
1.2. Diversidad viral	9
1.2.1. Virus de DNA de doble cadena que infectan invertebrados	10
1.3. Virus simbioses en insectos	11
1.3.1. Virus simbioses de origen exógeno con énfasis en insectos.....	11
1.3.2. Entomopoxvirus: virus mutualista de origen exógeno presente en avispas parasitoides	12
1.4. Elementos virales endógenos con énfasis en avispas parasitoides.....	14
1.4.1. Pólidnavirus y partículas similares a virus	14
1.5. Genes centrales antiguos para la búsqueda de elementos virales.....	17
1.6. Clase Insecta.....	19
1.6.1 Orden Hymenoptera	20
1.6.2. Superfamilia Ichneumonoidea.....	22
1.6.2.1. Estrategias de parasitoidismo en Ichneumonoidea.....	23
1.6.3. Familia Braconidae	26
1.7. Secuenciación de nueva generación	28
1.8. Herramientas bioinformáticas para la búsqueda de homologías: Modelo oculto de Markov (HMM) y PSI-BLAST para la búsqueda.....	29
2. Justificación	31
3. Objetivos	32
3.1. Objetivo general	32
3.2. Objetivos particulares	32
4. Materiales y Método	32
<i>4.1. Muestreo de taxones</i>	32
<i>4.2. Construcción de librerías genómicas y secuenciación</i>	34
<i>4.3. Trabajo bioinformático</i>	36
<u>4.3.1. Filtrado, control de calidad y ensamblaje del genoma</u>	36
<u>4.3.2. Búsqueda de microorganismos asociados a braconidos utilizando blastn y asignación taxonómica</u>	36
<u>4.3.3. Generación de marcos de lectura abierta (ORF)</u>	37

4.3.4. Búsquedas dirigidas a genes centrales antiguos empleando HMMER y PSI-BLAST	37
4.3.5. Alineamiento de secuencias y reconstrucción de árboles filogenéticos.....	39
5. Resultados	39
5.1. Filtrado, control de calidad y ensamble de novo	39
5.2. Búsqueda de microorganismos asociados a braconidos	41
5.3. Detección de elementos virales y virus mutualistas	42
5.4. Confirmación de presencia de entomopoxvirus y elementos virales endógenos	44
5.5. Afinidad filogenética de los virus detectados.....	47
6. Discusión	48
6.1. Microorganismos presentes en avispas parasitoides de la familia Braconidae	48
6.2. Eficiencia de las herramientas bioinformáticas para la detección de los elementos virales y virus mutualistas	49
6.3. Presencia de Entomopoxvirus en la familia Braconidae y detección de secuencias genéticas de un nudivirus en <i>Archibracon servillei</i>	51
6.4. Perspectiva para estudios futuros de la presencia de elementos virales	52
7. Conclusiones	53
8. Referencias	55

Resumen

Los virus forman interacciones con diversos organismos, entre ellos, los insectos. Estas interacciones pueden ser beneficiosas para la supervivencia de la progenie del insecto, como en el caso de las avispas parasitoides de la familia Braconidae, parasitoides endo- y ectoparasitoides de larvas de otros insectos. Braconidae presenta asociaciones con virus endógenos como los elementos virales endógenos (*Bracovirus* y partículas similares a virus) encontrados únicamente en especies endoparasitoides, y con virus exógenos como los entomopoxvirus. Los *Bracovirus* se han encontrado en el complejo microgastroide, mientras que las partículas similares a virus y los entomopoxvirus se han encontrado en la subfamilia Opiinae. En este trabajo se buscó en miembros de Braconidae la presencia de elementos virales endógenos y virus exógenos utilizando datos a escala genómica obtenidos mediante la técnica *shotgun*. Se examinaron 24 especies de braconidos tanto endo- como ectoparasitoides pertenecientes a 11 subfamilias. Una primera aproximación para la búsqueda de secuencias virales se realizó a través de la implementación de una búsqueda general de microorganismos asociados a braconidos, para lo cual se utilizó el algoritmo *megablast* con la base de datos *blast nr*. Para la identificación de genes virales, se utilizaron marcos abiertos de lectura (ORF por sus siglas en inglés) obtenidos a partir de la traducción de los *contigs* obtenidos de los ensamblajes de cada muestra, los cuales se compararon con ORFs de genes centrales antiguos pertenecientes a diferentes familias de virus grandes que infectan artrópodos. Las comparaciones se realizaron con dos programas de búsqueda de genes homólogos (HMMER y PSI-BLAST) para después determinar su afinidad filogenética. Las comunidades microbianas predominantes en braconidos fueron Proteobacterias y Actinobacterias, así como, polidnavirus en nueve especies de braconidos. En cinco ORFs de una especie de braconido de la subfamilia Doryctinae, *Rinamba* sp., se encontró tanto similitud genética como afinidad filogenética con un entomopoxvirus relacionado con *Amsacta moorei* entomopoxvirus y *Melanoplus sanguinipes* entomopoxvirus. Esto sugiere de manera robusta que esta especie de braconido podría ser infectada por un entomopoxvirus, aunque se desconoce su origen. Por otro lado, 10 ORFs de *Archibracon servillei*, perteneciente a la subfamilia Braconinae, se relacionaron tanto con la familia *Nudiviridae* como con un entomopoxvirus; sin embargo, los datos genómicos resultaron insuficientes para confirmar su presencia. Estos resultados representan el primer reporte de virus mutualista en una subfamilia de avispas braconidas ectoparasitoides (Doryctinae).

1. Introducción

Los insectos presentan una gran diversidad de microorganismos asociados a diferentes partes del cuerpo, por ejemplo, el exoesqueleto, cutícula, intestino, tejidos y células, por lo tanto, cada una de estas partes se convierten en microhábitats que permiten el establecimiento de microorganismos específicos (Gurung *et al.*, 2019). Estos microorganismos pueden ser bacterias, hongos, arqueas, protistas y virus (Engel y Moran, 2013; Gurung *et al.*, 2019). Entre las interacciones más estudiadas están aquellas formadas con bacterias ya que compone gran parte del microbioma en animales y por lo tanto se sabe que está compuesto principalmente por Proteobacterias, Actinobacterias, Firmicutes, Gammaproteobacteria, Bacteroidetes y Acidobacterias (Engel y Moran, 2013; Nedoluzhko *et al.*, 2017; de Lourdes Ramirez-Ahuja *et al.*, 2019). Por otro lado, las interacciones conocidas con hongos pueden ser patógenos, como en el caso de los géneros *Beauveria* y *Metarhizium*, que incluso han sido utilizados como control biológico contra insectos plaga (Boucias *et al.*, 2018). De igual manera, se conoce una gran diversidad de virus mutualistas son de gran importancia para los insectos que son parasitoides de otros insectos como en los casos de las avispas parasitoides de diferentes familias (Engel y Moran, 2013).

La importancia de la diversidad de microorganismos que interaccionan con los insectos radica en que intervienen en diferentes procesos biológicos del insecto siendo patógenos, o bien pueden ser simbioses y proporcionarles beneficios dependiendo de su ciclo de vida y requerimientos ecológicos (de Lourdes Ramirez-Ahuja *et al.*, 2019). Entre los beneficios que los microorganismos proporcionan al hospedero están aquellos de aspectos fisiológicos que intervienen en la tolerancia a perturbaciones ambientales, defensa contra depredadores, resistencia a insecticidas, defensa contra otros microorganismos patógenos y en el parasitismo en algunos casos. Las comunidades microbianas también pueden estar involucradas en el desarrollo del insecto, e incluso contribuir a la longevidad de éste (Lewis y Lize, 2015; de Lourdes Ramirez-Ahuja *et al.*, 2019).

1.1. Importancia de los microorganismos asociados a insectos

En ocasiones cuando la relación insecto microorganismos es de naturaleza simbiótica, la contribución de los microorganismos a su insecto hospedero depende de su localización en el

cuerpo del insecto (Figura 1) (Douglas, 2015; Lewis y Lize, 2015; Gurung, 2019). Las comunidades presentes en la cutícula (en particular la epicutícula) son denominados como ectosimbiontes y se encuentran en menor cantidad y diversidad debido a las características hidrofóbicas, la escasez en nutrientes esenciales, las alteraciones físicas del organismo (*i.e.* ecdisis) y la secreción de sustancias antimicrobianas (Douglas, 2015; Boucias, 2018).

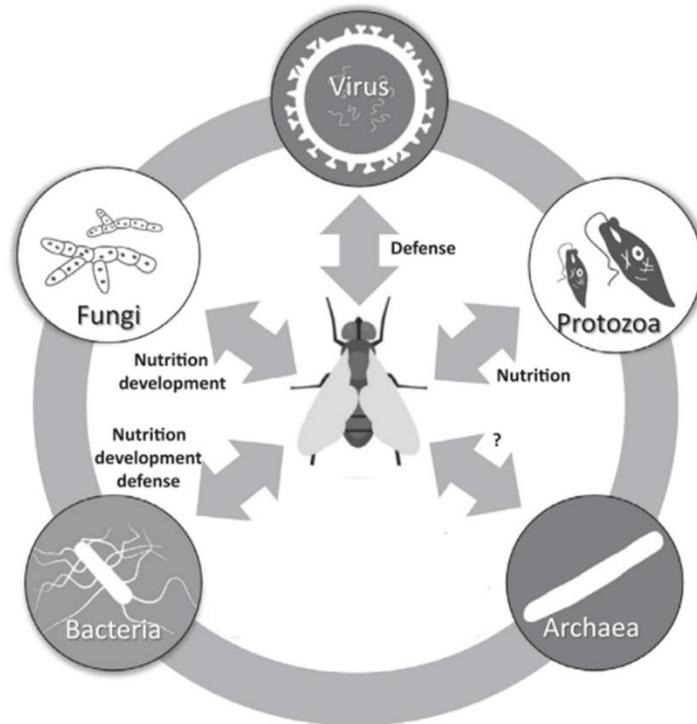


Figura 1. Comunidades microbianas asociadas a insectos y su influencia en el ciclo de vida del hospedero. Estos microorganismos, ya sean, virus, hongos, bacterias, protozoos y arqueas intervienen en la defensa contra patógenos, en la nutrición, desarrollo, reproducción e incluso comportamiento de los insectos. Tomado de Gurung *et al.* (2019).

A diferencia de las comunidades de la cutícula, en el intestino es posible encontrar en mayor cantidad y diversidad de comunidades que forman asociaciones simbióticas llamadas endosimbiontes. Dichas asociaciones son importantes para el mantenimiento de la homeostasis intestinal, la respuesta inmunitaria, la facilitación de la digestión y la obtención de nutrientes esenciales que hacen a estos microorganismos importantes durante todo el ciclo de vida pues algunas llegan a ser propias del estadio de larva o adulto (Fredensborg *et al.*, 2020; Gupta y Nair, 2020; Muñoz-Benavent *et al.*, 2020). La división del intestino en anterior, medio y posterior

recubiertos internamente por una fina capa de cutícula permite que los microorganismos se establezcan a lo largo de estas regiones y sean específicos en cada una de ellas (Engel y Moran, 2013; Boucias *et al.*, 2018).

Las bacterias simbiotes posiblemente sean clave para la adaptación exitosa de los insectos a diferentes ambientes, o como un mecanismo de defensa contra parasitoides (Douglas, 2015). Por ejemplo, se ha reportado que las especies de áfidos *Acyrthosiphon pisum* y *Aphis fabae* forman una asociación simbiótica con la gamma-proteobacteria *Hamiltonella defensa*, la cual proporciona protección contra avispas parasitoides mediante la producción de toxinas que matan a la larva del parasitoide (Kaltenpoth y Engl, 2014).

Caso contrario a las relaciones mutualistas, y por tanto beneficiosas, en las avispas parasitoides de la familia Braconidae se ha observado la presencia de la bacteria patógena *Wolbachia*, una alfa-proteobacteria endosimbionte que infecta los tejidos reproductivos de aproximadamente el 40% de todos los insectos causando incompatibilidad citoplasmática entre hembras no infectadas y machos infectados, además de alterar la proporción de sexos y causar partenogénesis (Smith *et al.*, 2012; Simhadri, 2017). La bacteria es transferida por vía transovárica y la asociación de estas bacterias están presentes en ovarios y óvulos. También se ha encontrado que *Rickettsia* está presente en los ovocitos de avispas y las células del folículo, y esta bacteria también causa efectos en las proporciones de sexos y partenogénesis (Mohammed *et al.*, 2015).

Las comunidades virales que se encuentran en animales pueden ser no únicamente patógenas, como normalmente se pensaría, sino que también existen interacciones entre virus mutualistas que son de gran importancia para otros insectos, ya que intervienen en la defensa contra depredadores, parasitoides o incluso pueden ser importantes para los propios parasitoides (Rossinck, 2019). Estas interacciones se han documentado como parte de la historia evolutiva del insecto, como en el caso de avispas parasitoides y virus endógenos que se han integrado al genoma de la avispa y han sido domesticados (Santos *et al.*, 2021).

1.2. Diversidad viral

En la naturaleza, los virus contribuyen al mantenimiento del equilibrio ecológico al controlar los niveles poblacionales de otros organismos, así como servir como intermediarios para el

intercambio genético entre especies que han sido infectadas (Santos López *et al.*, 2004). Los virus se definen como parásitos intracelulares con ácido nucleico, sin estructura celular y que necesitan de una célula hospedera para llevar a cabo la replicación, transcripción y otros procesos moleculares (Hurst, 2021). El material genético de los virus está constituido principalmente por ácido desoxirribonucleico o ácido ribonucleico, bicatenario (dsDNA o dsRNA) o monocatenario (ssDNA o ssRNA), lineal o circular (Hurst, 2021; Lefkowitz, 2015). El genoma viral puede estar distribuido en varios segmentos y varía en tamaño, lo cual es importante para los diferentes mecanismos de replicación e interacción celular con el hospedero (Hurst, 2021; Simmonds y Aiewsakun, 2018).

Los virus forman viriones o partículas virales rodeados por una nucleocápside que ayuda con el proceso de infección. Algunos virus pueden presentar una nucleocápside con envoltura y en algunos casos, como en los viriones, presentar proteínas asociadas a la envoltura de la nucleocápside que sirven como receptores de unión celular e infección (Zhang *et al.*, 2019). Los viriones presentan una enorme variabilidad en la morfología y tamaño, pudiendo tener formas icosaédricas, helicoidales o filamentosas, entre muchas otras (Simmonds *et al.*, 2018).

La diversidad de los virus es muy amplia. Actualmente el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, por sus siglas en inglés) reconoce 17 phyla, 40 clases, 72 órdenes, 264 familias, 11273 especies (Simmonds y Aiewsakun, 2018; ICTV, 2022). La gran diversidad se debe a su alta tasa de replicación y mutación que promueve una amplia variabilidad morfológica, genética y ecológica (Reyes *et al.*, 2017). El origen de los virus sigue siendo incierto; sin embargo, diversos estudios han revelado el origen común de diversos grupos de virus debido a que comparten homología con genes centrales antiguos (loci conservados que comparten varios grupos de virus). Por ejemplo, los virus dsDNA con genomas grandes comparten genes y proteínas cercanamente relacionadas a su hospedero celular; por lo tanto, se piensa que han evolucionado con ayuda de la captura de genes del hospedero (Iyer *et al.*, 2001). Se conoce que una gran diversidad de virus infecta muchos grupos de animales, por lo tanto, juegan un papel ecológico y evolutivo relevante como en el caso de los invertebrados.

1.2.1. Virus de DNA de doble cadena que infectan invertebrados

Los invertebrados son infectados por una basta cantidad de virus, entre ellos los virus de DNA gigantes. De manera general estos virus se pueden dividir en tres grandes grupos que comparten características entre sí. El primer grupo son los virus nucleocitoplasmáticos de DNA de gran tamaño, ahora clasificados como *Nucleocytophycota*, que contienen los viriones y genomas más grandes conocidos hasta ahora (Mönttinen *et al.*, 2021). Se caracterizan por tener un genoma lineal o circular de doble cadena, completan toda o parte de la replicación y el ensamblaje en el citoplasma del hospedero (Colson *et al.*, 2013). Dentro de este grupo se clasifican virus de la familia *Poxviridae* (*Chordopoxvirina* y *Entomopoxvirinae*), *Iridoviridae*, *Ascoviridae* y *Mimiviridae* (Iyer *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2017).

El segundo grupo de virus está conformado por virus de dsDNA lineal con cápsides icosaédricas rodeadas por una envoltura que incluyen a los virus de la familia *Malacoherpesviridae* y el orden *Herpesvirales* (Williams *et al.*, 2017). Por último, en el tercer grupo se clasifican los virus con nucleocápside en forma de bastoncillo y genoma dsDNA circular. Se caracterizan por replicarse y ensamblarse en el núcleo de las células del hospedero. En este grupo se encuentran las familias *Baculoviridae*, *Nudiviridae*, *Hytrosaviridae* y *Nimiviridae*. Dentro del grupo se consideran también los virus filamentosos que se encuentran en especies de insectos del género *Leptopilina* y *Apis mellifera* (Hymenoptera) (Williams *et al.*, 2017).

Del último grupo viral se sabe que, la familia *Nudiviridae* dio origen a los elementos virales endógenos asociados a avispas endoparasitoides, como la familia *Polydnviridae* y las partículas similares a virus. La endogenización de *Nudiviridae* se estima que pudo haber ocurrido varias veces en distintos linajes de insectos (Wang *et al.*, 2007; Cheng *et al.*, 2020). Por ejemplo, se estima que el género *Bracovirus* (*Polydnviridae*) se integraron a partir de un nudivirus ancestral en las avispas parasitoides de la familia Braconidae hace 103 millones de años (Bézier *et al.*, 2015). Algo similar ocurrió en la avispa parasitoide *Venturia canescens* (Ichneumonidae), que presenta partículas similares a virus provenientes de la endogenización de un *Alphanudivirus* (Drezen *et al.*, 2017; 2021).

1.3. Virus simbiotes en insectos

Recientemente y a pesar de que los virus siempre se han visto como agentes patógenos que pueden llegar a ser mortales, se han encontrado virus que forman simbiosis con plantas, hongos, mamíferos e insectos (Roossinck, 2011). La simbiosis mutualista, según Roossinck (2011), se refiere a la relación entre dos organismos que se benefician entre sí. La interacción entre virus-hospedero ha traído ventajas porque provocan cambios en el hospedero mejorando su adaptación, ciclo de vida, reproducción, desarrollo y supervivencia que a la larga podría desencadenar en coevolución (Jagdale y Joshi, 2018).

La simbiosis entre virus-insectos afectan principalmente el comportamiento y la fisiología de los insectos parasitados para que los hospederos tengan resistencia contra factores bióticos desfavorables. Estos virus también proporcionan protección contra infecciones por bacterias, parasitismo por otros insectos, o como en el caso de las avispas parasitoides, ayudan la supervivencia de la progenie (Jagdale y Joshi, 2019). En el caso de insectos, por ejemplo, los elementos virales endógenos y los entomopoxvirus encontrados en *Diachasmimorpha longicaudata* (Jagdale y Joshi, 2018) están relacionados con la supresión de la respuesta inmunológica y el desarrollo de los hospederos de las avispas parasitoides de la superfamilia Ichneumonoidea (Hymenoptera).

1.3.1. Virus simbiotes de origen exógeno con énfasis en insectos

En la literatura se han reportado casos de virus de adquisición exógena que forman simbiosis con insectos. Dichos virus aseguran el éxito ecológico del insecto mediante diversas estrategias dentro de su historia de vida. Por ejemplo, el *Desnovirus-2* (HaDv-2), presente en la polilla *Helicoverpa armigera* es un virus que pertenece a la familia *Parvoviridae* que se transmite verticalmente a través del huevo y se ha observado que los hospederos que lo presentan aumentan los niveles de fecundidad y longevidad (Burand *et al.*, 2012; Jagdale y Joshi, 2018). Por otra parte, la avispa *Diadromus pulchellus* (Ichneumonidae) presenta una asociación con el ascovirus *Diadromus pulchellus toursvirus* (DpTV), el cual se mantiene en el núcleo de las células de la avispa en forma de episoma sin integrarse al genoma del hospedero (Jagdale y Joshi, 2018, Coffman y Burke, 2020). Una vez que los viriones infectan a *D. pulchellus* y a su vez ésta parasita a una larva de lepidóptero, los viriones inhiben la mielinización de la larva de lepidópteros durante la

parasitación, de tal forma que el huevo de la avispa es protegido (Bigot *et al.*, 2009; Coffman y Burke, 2020).

Otro caso de virus simbioses de origen exógeno que se presenta en avispas parasitoides ocurre en *Dinocampus coccinellae* (Braconidae), parasitoide de mariquitas. Esta avispa presenta un virus de +ssRNA de origen exógeno conocido como virus de la parálisis o *Dinocampus coccinellae paralysis virus* (DcPV) que se ubica en el revestimiento celular del oviducto de las avispas hembra (Jagdale y Joshi, 2018; Dheilly *et al.* 2015). DcPV se replica dentro del tejido neuronal de la mariquita durante el parasitismo, lo que conlleva a la manipulación del comportamiento del hospedero para que proteja al huevo de la avispa (Dheilly *et al.* 2015; Coffman y Burke, 2020).

1.3.2. Entomopoxvirus: virus mutualista de origen exógeno presente en avispas parasitoides

La familia *Poxviridae* se encuentra representada por virus grandes nucleocitoplasmáticos de dsDNA que infectan a una gran cantidad de animales, los cuales, se clasifican principalmente en dos grandes subfamilias: *Chordopoxvirinae*, que infectan vertebrados; y *Entomopoxvirinae*, que infectan insectos y se caracterizan por replicarse en el citoplasma del hospedero (Moss, 2013; Thézé *et al.*, 2013).

Los entomopoxvirus (EPV) infectan, hasta donde se sabe, a coleópteros, lepidópteros, ortópteros y dípteros (Thézé *et al.*, 2013). La clasificación interna de los EPV aún no está bien definida debido a la falta de datos genómicos, ya que solo dos genomas se encuentran secuenciados completamente (*Melanoplus sanguinipes entomopoxvirus*, *Amsacta moorei entomopoxvirus*), lo que demuestra la falta de investigación sobre la biodiversidad del grupo (Thézé *et al.*, 2013; Coffman y Burke, 2020). Por ejemplo, el entomopoxvirus de *Melanoplus sanguinipes* (Orthoptera) y el entomopoxvirus presente en las avispas parasitoides de *Diachasmimorpha longicaudata* (Braconidae: Opiinae) y sus hospederos, permanecen sin clasificar (Lawrance, 2005; Harrison y Hoover, 2012; Thézé *et al.*, 2013).

Los EPV se distinguen por la síntesis de una estructura esférica conocida como cuerpo de oclusión que contiene a los viriones (Arif *et al.*, 2021). Los EPV llevan a cabo su ciclo de replicación dentro del citoplasma del hospedero y permanecen ahí hasta que ocurre la lisis celular,

de tal manera que se puedan propagar de insecto a insecto (Moss, 2013; Arif *et al.*, 2021). Recientemente, Coffman *et al.* (2020) reportaron al entomopoxvirus *Diachasmimorpha longicaudata entomopoxvirus* (DIEPV) mutualista de *Diachasmimorpha longicaudata*, una especie de avispa de la subfamilia Opiinae (Braconidae) parasitoide de la mosca de la fruta del Caribe. Este Entomopoxvirus difiere de todos los demás virus de su tipo por no expresar cuerpos de oclusión, y únicamente expresar viriones dentro de los hemocitos (células del sistema inmune en invertebrados) de las moscas después del parasitoidismo (Lawrance, 2002). DIEPV provoca cambios en la morfología de los hemocitos y, por lo tanto, inhibe el proceso de mielinización en las moscas al causar daño en dichas células, desencadenando problemas en la respuesta inmunológica en las moscas (Lawrence, 2005; Coffman *et al.*, 2020). Sin embargo, en las avispas no ocasiona ningún daño y al contrario facilita el parasitismo al debilitar el sistema inmunológico del hospedero. Esto evidencia una posible adquisición mutualista entre virus-hospedero de origen exógeno, y al contrario de los elementos virales endógenos que necesitan a la avispa para replicarse ya que han sido domesticados, DIEPV puede replicarse sin necesidad de la avispa (Coffman *et al.*, 2020).

Posiblemente, DIEPV se transmite de la avispa hembra a su prole por transferencia vertical y únicamente se replica en el oviducto lateral de las avispas hembra (similar a los elementos virales endógenos) (Coffman *et al.*, 2020). Por lo tanto, se asume una evolución convergente de este virus sin necesidad de que hubiera domesticación viral, ya que DIEPV mantiene características de un patógeno viral y un simbiote viral beneficioso (Coffman y Burke, 2020).

1.4. Elementos virales endógenos con énfasis en avispas parasitoides

Los elementos virales endógenos (EVEs) son fragmentos de DNA derivados de un genoma viral que se integró en la línea germinal de un hospedero no viral y se transmitió de manera vertical (Drezen *et al.*, 2021; Katzourakis y Gifford, 2010). En animales, la mayoría de los EVEs que se han identificado permanecen inactivos o consisten en pocos genes (Drezen *et al.*, 2017). Los miembros de la familia Polydnviridae y los virus similares a partículas son más complejos comparados con otros EVEs, ya que conservan parte de la maquinaria para empaquetar y expresar viriones, por lo tanto, se dice que estos han sido domesticados (Drezen *et al.*, 2021).

1.4.1. Polidnavirus y partículas similares a virus

Los polidnavirus (PDV) se encuentran presentes en las células somáticas y la línea germinal (región del cáliz) de las avispas endoparasitoides, pero la replicación sólo ocurre en el núcleo de las células del cáliz, ubicadas en la parte distal del oviducto lateral de las hembras (Drezen *et al.*, 2021) (Burker y Strand, 2014; Legai *et al.*, 2020; Muller *et al.*, 2021). Los polidnavirus se distinguen por presentar un genoma proviral dividido en dos unidades funcionales. La primera unidad conformada por los segmentos provirales involucrados en la replicación y que tienen la función de producir viriones en las células del cáliz; la segunda unidad conformada por los múltiples dominios de DNA de origen nudiviral que amplifican y empaquetan los viriones y expresan los genes de virulencia en el hospedero (Strand y Burke, 2013; 2014). Los PDVs solo se transmiten verticalmente a través de la línea germinal de las avispas endoparasitoides como provirus y la actividad transcripcional es específica del hospedero debido a la ausencia de los genes necesarios para la replicación y formación de viriones (Figura 2).

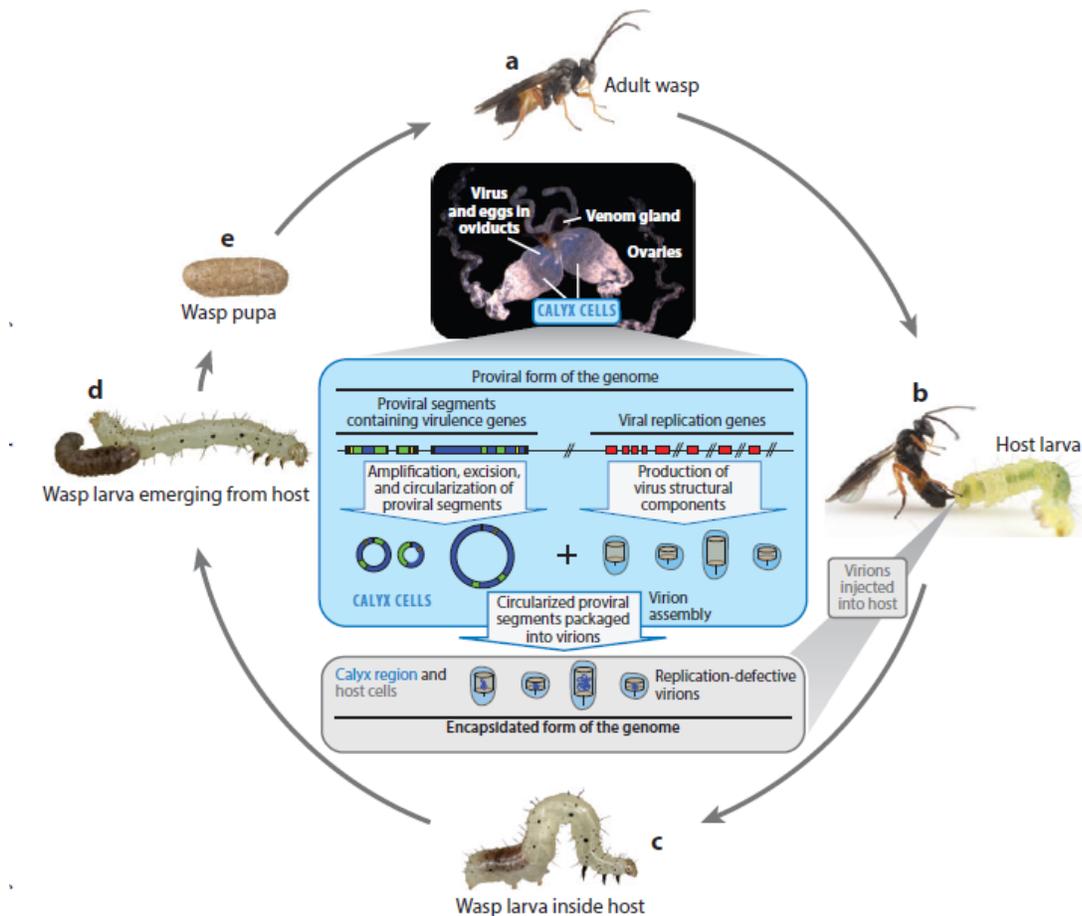


Figura 2. Ciclo de replicativo de un polidnavirus (*Bracovirus*) en la avispa endoparasitoide *Cotesia congregata*, en donde se observan las unidades genómicas que conforman los *Bracovirus*. (a) El ciclo de vida comienza en las células del cáliz situadas en el oviducto lateral de las hembras adultas, en la cual ocurre la replicación de genes virales, lo que deriva en la formación del virión. (b) La avispa oviposita dentro del hospedero, en donde las partículas infectivas del virión son liberadas. (c) Los huevos de las avispas eclosionan en larvas y permanecen dentro del hospedero hasta que (d) salen del hospedero y pupan. Tomado de Strand y Burke (2014).

Los PDVs se clasifican en dos géneros, *Bracovirus* e *Ichnovirus*. El género *Bracovirus* se encuentra asociado únicamente a las avispas endoparasitoides de la subfamilia Braconidae (complejo microgastroide) (Figura 3) (Sharanowski *et al.*, 2011). Los *Bracovirus* pueden encontrarse dispersos en todo el genoma de las avispas y es posible identificarlos mediante cortes histológicos de la región del cáliz (Drezen *et al.*, 2021; Burke *et al.*, 2021; Santos *et al.*, 2021). Los genes de *Bracovirus* relacionados a la formación de viriones comparten homología con los de nudivirus, pero los dsDNA empaquetados en los viriones tienen poca similitud de secuencia con los genomas de los nudivirus (Burke, 2019).

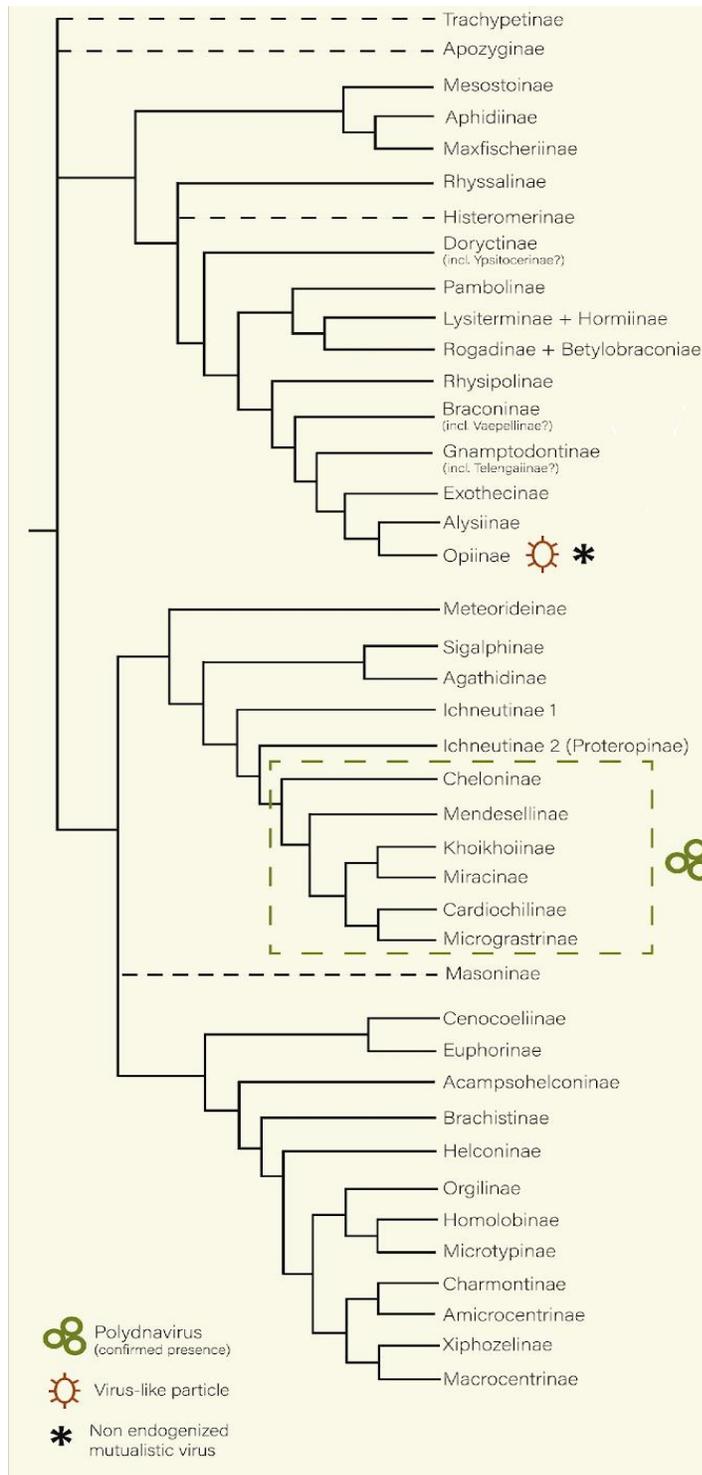


Figura 3. Filogenia resumida de Braconidae donde se señalan las subfamilias que presentan virus mutualistas y elementos virales endógenos. El recuadro verde punteado encierra el complejo microgastroide, donde se han encontrado polidnavirus (*Bracovirus*) y que está conformado por avispas

endoparasitoides. Opiinae está señalado por poseer VLPs y un virus mutualista no endógeno (*Entomopoxvirinae*). Modificado de Santos *et al.* (2021).

Los *Ichnovirus* se encuentran asociados a la familia Ichneumonidae (Campopleginae y Bachinae) igualmente subfamilias endoparasitoides. Los genomas provirales consisten en dos tipos de segmentos virales: los anidados y los únicos, los genes que comprenden ambos segmentos virales se encuentran en un dominio denominado regiones codificantes de proteínas estructurales (Drezen *et al.*, 2022). Se cree que el género *Ichnovirus* se originó a partir de ancestros de virus estrechamente relacionados de origen desconocido; sin embargo, en un estudio reciente, se cree que posiblemente podrían corresponder a virus de ADN nucleocitoplasmático grande (Muller *et al.*, 2021).

Las partículas similares a virus (VLPs) son estructuras formadas únicamente por proteínas, no contienen DNA y tienen la capacidad de infectar o producir factores de virulencia debido a su origen viral (Zeltins, 2013). Se ha sugerido que la avispa de la familia Ichneumonidae, *Venturia canescens*, perdió el *Ichnovirus* asociado a ella y posteriormente se asoció con un nudivirus endógeno que produce partículas similares a virus. Los genes virales adquiridos en esta avispa permanecen dispersos en el genoma de la avispa sin genoma proviral (Burke *et al.*, 2018). Por otro lado, en la familia Braconidae, únicamente en subfamilia Opiinae en el género *Fopius*, es la única subfamilia donde se han reportado VLPs en donde los análisis filogenéticos sugieren una segunda integración proveniente de la absorción de un *Alphanudivirus* patógeno (Figura 3) (Roossinck, 2011; Strand y Burke, 2013; Santos *et al.*, 2021).

1.5. Genes centrales antiguos para la búsqueda de elementos virales

Santos *et al.* (2018) define a los genes centrales antiguos como loci que codifican componentes de replicación conservados y que son comunes en la mayoría de las familias de virus de DNA de doble cadena que infectan a artrópodos. Los genes centrales antiguos codifican principalmente proteínas de replicación y transcripción de DNA implicado en funciones estructurales y de infectividad viral (Garavaglia *et al.*, 2012). En avispas parasitoides, Burke *et al.* (2021) identificaron de manera exitosa elementos virales endógenos buscando genes centrales antiguos de diferentes familias de virus grandes de DNA que infectan artrópodos (NALDV) y virus

nucleocitoplasmáticos de DNA de gran tamaño (NCLDV) que codifican para proteínas estructurales implicadas en gran parte de la maquinaria molecular del virus: *DNApol*, *helicasa*, *lef-5*, *lef-8*, *lef-9* y *p33*. La búsqueda de genes centrales antiguos empleada por Burke *et al.* (2021) demostró ser un nuevo método para la identificación de elementos virales endógenos presentes en avispas endoparasitoides.

En general, algunos de los genes involucrados en la replicación, transcripción, empaquetamiento, ensamble, morfogénesis e infectividad de los viriones parecen estar conservados en *Baculoviridae*, *Nudiviridae*, *Bracovirus* y en partículas similares a virus (figura 4) (Drezen *et al.*, 2021; Burke *et al.*, 2018; Bézier *et al.*, 2013).

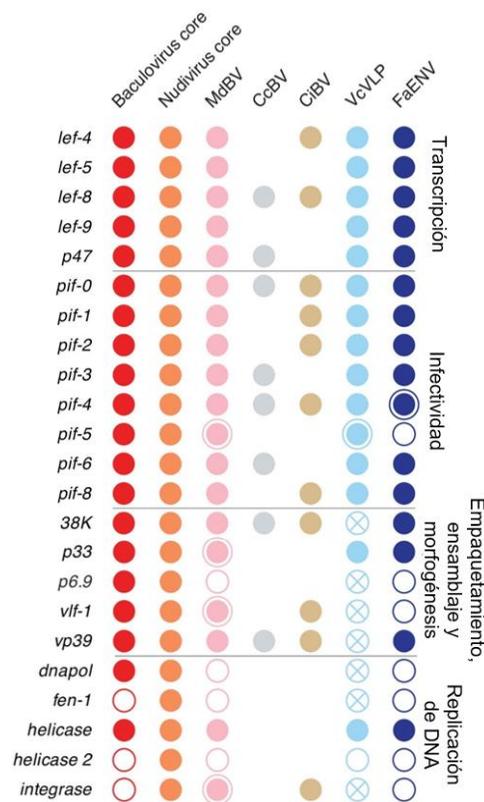


Figura 4. Algunos de los genes centrales antiguos que son compartidos entre baculovirus, nudivirus, el género *Bracovirus*, nudivirus endógenos y partículas similares a virus. Todos los genes centrales antiguos están involucrados en la transcripción, infectividad, empaquetamiento, ensamblaje, morfogénesis y la replicación del DNA. Los círculos con color indican los genes que son compartidos entre estas familias. Los círculos en blanco, con una tache en el centro, o con doble círculo representan genes ausentes, pseudogenes, o falta de información, respectivamente (modificado de Burke, 2019).

1.6. Clase Insecta

Los insectos son el grupo de organismos más diverso y abundante en el planeta, con una amplia distribución en ecosistemas terrestres, semiacuáticos y acuáticos. Morfológicamente su cuerpo se encuentra dividido en cabeza, tórax y abdomen; poseen tres pares de patas unidas al tórax, un par de antenas y piezas bucales mandibuladas (Capinera, 2011). Análisis filogenéticos recientes basados en datos moleculares y de registro fósil sugieren que los primeros insectos no alados (Apterygota) aparecieron en el Silúrico temprano, hace ~441 millones de años, mientras que los insectos alados (Pterygota) probablemente surgieron entre el Devónico temprano y el Carbonífero, hace ~324 millones de años (Gillott, 2005; Misof *et al.*, 2014).

Características como la presencia de alas y el vuelo, el desarrollo de nuevos mecanismos de defensa, los cambios en la fisiología y las conductas relacionadas con el cortejo permitieron que los insectos se dispersaran a gran escala y colonizaran nuevos hábitats (Gillott, 2005; Engel, 2015). Complementario al vuelo, el ciclo de vida holometábolo implicó la aparición de diferentes etapas de desarrollo que comprenden huevo, larva, pupa y adulto, cada una con características morfológicas y fisiológicas distintas. Las diferentes etapas de desarrollo posibilitaron la disminución de la competencia intraespecífica ya que las dietas y el comportamiento varían dependiendo del hábitat y de las necesidades específicas requeridas en cada etapa del ciclo de vida (Suzuki *et al.*, 2008; Engel, 2015). Igualmente, debido al ciclo de vida relativamente corto y el gran número de individuos que pueden nacer por generación es posible una mayor variabilidad genética, por lo tanto, adaptaciones rápidas frente a cambios ambientales drásticos (Gillott, 2005; Jarzembowski, 2021).

Desde una perspectiva ecológica, los insectos terrestres participan en la polinización de plantas con flores, en los ciclos biogeoquímicos y en la degradación de la materia orgánica del suelo, contribuyendo de esta manera a su formación (Miller, 1993; Wagner, 2018). Los insectos depredadores y parásitos actúan como reguladores de poblaciones de insectos plaga, además muchos grupos de insectos forman parte de la dieta de vertebrados como anfibios, reptiles, aves, murciélagos y mamíferos pequeños (You *et al.*, 2005; Wagner, 2018), teniendo papeles importantes en la cadena alimenticia de muchos otros grupos de animales.

1.6.1 Orden Hymenoptera

El orden Hymenoptera incluye a las comúnmente conocidas abejas, hormigas y avispas, pero también abarca una gran diversidad de organismos poco conocidos, como las avispas de la madera, las moscas sierra, y las avispas parasitoides. Hymenoptera es considerado junto con Diptera, Lepidoptera y Coleoptera uno de los órdenes más diversos dentro de la clase Insecta, dado que presentan organismos con gran variedad de formas, tamaños y estrategias de vida (Huber, 2017). A la fecha, se han descrito cerca de 150,000 especies para Hymenoptera, aunque se estima que la diversidad de este grupo es mucho mayor (Zhang, 2013; Huber, 2017). Entre las familias más grandes dentro de Hymenoptera se encuentran Ichneumonidae, con cerca de 23,000 especies descritas, Braconidae con alrededor de 21,000 especies descritas, y Formicidae con más de 16,000 especies descritas (Johnson, 2013; Yu, 2021; Antweb, 2021).

Los himenópteros parasitoides son un grupo de gran importancia dentro del orden Hymenoptera por varios atributos. Pueden ser bioindicadores de la diversidad de los grupos a los que atacan, al ser en su mayoría específicos de una especie o un grupo en particular, por lo tanto, son controladores biológicos naturales de poblaciones de insectos plaga en ecosistemas agrícolas y forestales (Hubert, 2017; Reed y Landolt, 2018). Esto ha permitido que sean utilizados en programas de biocontrol contra especies de insectos que causan pérdidas significativas en sembradíos, permitiendo el aumento en la productividad de cultivos para consumo humano (Wang *et al.*, 2019). Por ejemplo, las especies de la familia Agaonidae son polinizadores exclusivos de *Ficus*, pues completan su ciclo de vida dentro del circonio de los higos (Resh y Cardé, 2009).

Los himenópteros son insectos holometábolos, es decir, que llevan a cabo una metamorfosis completa, poseen dos pares de alas membranosas donde el par de alas posteriores es más pequeño que las anteriores, presentan piezas bucales mandibuladas y la determinación del sexo es haplo-diploide, es decir, de huevos fertilizados diploides nacen hembras y de huevos haploides no fertilizados nacen machos (Nieves-Aldrey, 2006; Johnson, 2013). Es considerado un grupo monofilético, forma parte del clado de los Endopterygota (holometábolos) y se encuentra dividido en dos subórdenes: Symphyta y Apocrita (Figura 5) (Sharky, 2007; Peters *et al.*, 2017).

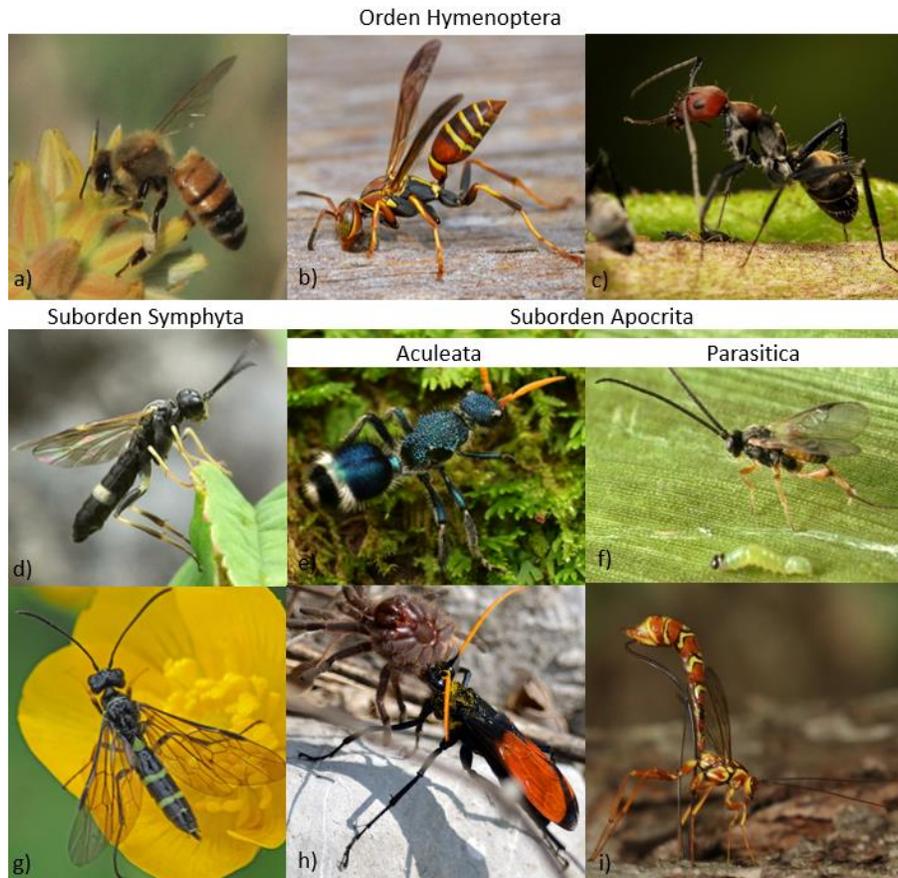


Figura 5. Algunos miembros representativos dentro del orden Hymenoptera: a) *Apis mellifera* (Apidae), b) *Polistes dorsalis* (Vespidae) y c) *Camponotus rufoglaucus* (Formicidae). Suborden Symphyta: d) *Cephus pygmeus* (Cephidae) y g) *Allantus basalis* (Tenthredinidae). Suborden Apocrita, miembros de Aculeata: e) *Ephutomorpha paradisiaca* (Mutilidae) y h) *Pepsis mildei* (Pompilidae) y miembros de Parasitica: f) *Cotesia icipe* (Braconidae) y j) *Megarhyssa greenei* (Ichneumonidae). Imágenes tomadas de Naturalista, 2023; Escudero, 2023; Clarke, 2019; Uys, 2019; Riegel, 2019; Humala, 2019; Hoenle, 2022; Rodríguez, 2011; Sevgan, 2022 y Desmeules, 2021.

Symphyta es considerado un grupo parafilético (Peters *et al.*, 2017). Entre sus características distintivas está la venación completa en las alas, el tórax y un abdomen bien diferenciado, el ovopositor está modificado en forma de sierra y generalmente sus larvas son fitófagas (se alimentan de tejido vegetal) (Gayubo y Pujade, 2015). Dentro de este suborden se encuentran las moscas sierra, las avispas de la madera y los orúsidos quienes son los únicos parasitoides dentro Symphyta y generalmente sus hospederos son coleópteros (Zharky, 2007; Gayubo y Pujade, 2015; Peters *et al.*, 2017). Por otro lado, Apocrita se ha recuperado como un

grupo monofilético y se caracteriza por tener el primer segmento abdominal fusionado con el tórax, formando el propodeo, mientras que el segundo segmento abdominal forma una estrecha constricción entre el tórax y la parte restante del abdomen formando el peciolo (cintura de avispa) (Reed y Landolt, 2018). A su vez, Apocrita se divide en dos grupos sin rango: Aculeata, cuyos miembros tienen el ovopositor modificado en un aguijón, y Parasítica, cuyos miembros poseen un ovopositor modificado en una especie de taladro. Parasítica incluye principalmente avispas parasitoides de artrópodos, así como algunos integrantes fitófagos (Sharky, 2007; Johnson, 2013).

1.6.2. Superfamilia Ichneumonoidea

Los ichneumonoideos son el grupo de avispas más rico en especies dentro del orden Hymenoptera, con cerca de 47,000 especies descritas (Yu *et al.*, 2016). Esta superfamilia se divide en dos familias: Ichneumonidae y Braconidae (Jasso-Martínez *et al.*, 2022). Los miembros de esta superfamilia se caracterizan por ser en su mayoría parasitoides de etapas larvales de otros insectos holometábolos, aunque hay algunos que parasitan ninfas de insectos hemimetábolos, mientras que también hay algunas especies fitófagas formadoras de agallas (Whitfield, 2004).

Entre las características morfológicas y diagnósticas de las especies de la superfamilia Ichneumonoidea se encuentran la presencia de patas posteriores con trocánter bien diferenciado, alas anteriores con estigma y al menos una celda cerrada, venas C y Sc + R + Rs fusionadas en la parte proximal que da lugar a una obstrucción de la celda costal (Figura 6). Además, algunas especies de esta superfamilia presentan alas reducidas generalmente no funcionales (Capinera, 2001).

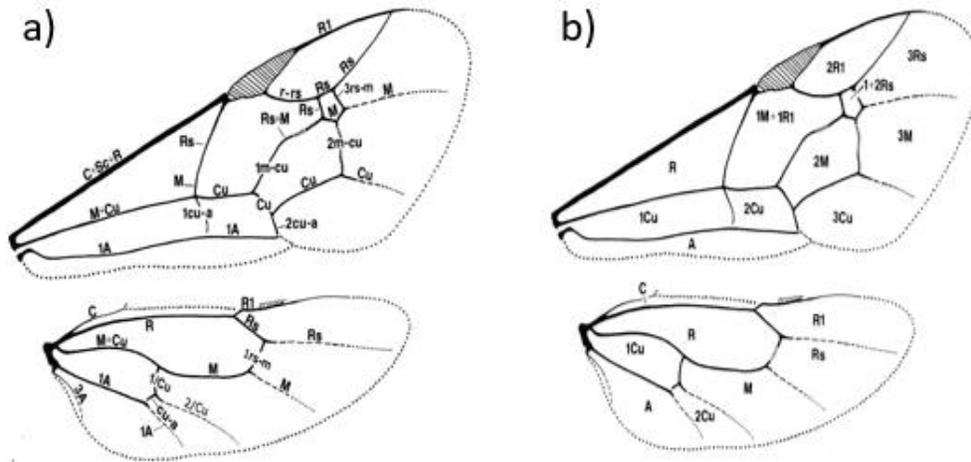


Figura 6. Venación y celdas de alas anteriores y posteriores presentes en los miembros de la superfamilia Ichneumonoidea. La figura a) representa el nombre de cada una de las venas, mientras que la figura b) representa el nombre de las celdas que se forman por la presencia de las venas. La venación de las alas como las celdas son caracteres taxonómicos importantes para determinación de especies. Tomado de Bennett *et al.* (2019).

Los ichneumonoideos son de gran importancia económica dado que son usados como control biológico de plagas de insectos herbívoros. Se estima que los miembros de este grupo proporcionan aproximadamente 17,000 millones de dólares anuales en servicios ecosistémicos (Sharanowski *et al.*, 2021). Algunos de los diferentes miembros de esta superfamilia son usados para el estudio de la fisiología de los parasitoides, la respuesta inmunológica de los hospederos, los procesos evolutivos de la adquisición y la arquitectura de virus endógenos tales como polidnavirus que impulsó la evolución de las estrategias de parasitoidismo (Legeai *et al.*, 2020; Sharanowski *et al.*, 2021).

1.6.2.1. Estrategias de parasitoidismo en Ichneumonoidea

Los miembros de la superfamilia Ichneumonoidea son generalmente parasitoides, completan su desarrollo larvario en un hospedero alimentándose de la hemolinfa, y como resultado el hospedero muere al término del desarrollo larvario del parasitoide (Jonhson, 2013; Quicke, 2015). Existen diversas estrategias de parasitoidismo dentro de la superfamilia Ichneumonoidea (Gauthier *et al.*, 2021). Estas estrategias de parasitoidismo se dividen en dos grupos principales: ectoparasitoides,

es decir, aquellas avispas que depositan sus huevos sobre el hospedero, y endoparasitoides, que son avispas que depositan sus huevos dentro del hospedero (Godfray, 1994; Quicke, 2015). Junto a estas condiciones de ecto- o endoparasitoidismo se presentan las estrategias de koinobiosis e idiobiosis (también conocidos como cenobiosis). En la primera, los parasitoides paralizan temporalmente a su hospedero y permiten su desarrollo posterior a la parasitación, mientras que en la segunda los parasitoides paralizan permanentemente a su hospedero (Askew y Shaw, 1986; Quicke, 2015).

Los koinobiontes son generalmente especialistas y atacan hospederos diurnos o nocturnos a menudo expuestos, y usualmente son endoparasitoides (Quicke, 1997; Quicke, 2015). En el caso de los idiobiontes, la mayoría son generalistas y los hospederos a los que atacan regularmente tienen hábitos diurnos y se encuentran ocultos entre la hierba, además, la mayoría son ectoparasitoides (Quicke, 1997; Quicke, 2015). Aunque casi siempre los koinobiontes son endoparasitoides y los idiobiontes ectoparasitoides, existen algunos casos de koinobiontes ectoparasitoides, como los miembros de la subfamilia Rhysipolinae (Johnson, 2013; Quicke, 2015) o bien, idiobiontes endoparasitoides como los miembros de la subtribu Aspidobraconina (subfamilia Braconinae) (Quicke, 1989; 1997).

Los miembros de Ichneumonoidea presentan otras estrategias relacionadas con la interacción directa o indirecta con otros parasitoides. Por ejemplo, cuando más de una larva se desarrolla en un mismo hospedero se les consideran gregarios, siendo esta condición común en los endoparasitoides. También están los superparasitoides, que depositan sus huevos dentro o fuera de un hospedero que fue previamente parasitado por un miembro de la misma especie, y los hiperparasitoides, que son parasitoides que parasitan larvas de otras avispas parasitoides (Quicke, 2015).

Sharanowski y colaboradores (2021) recientemente realizaron un estudio filogenético de la superfamilia Ichneumonoidea utilizando datos a escala genómica. En este estudio propusieron que el ancestro común para la superfamilia Ichneumonoidea fue un idiobionte/ectoparasitoide, por lo que el endoparasitismo pudo ser una condición derivada del ectoparasitoidismo, tal como había sido previamente sugerido por Quicke y colaboradores (2000). Específicamente para la familia Braconidae, la condición ancestral de la estrategia de parasitoidismo no se recuperó de forma

robusta, variando, dependiendo de los datos y de los taxones que se incluían en el análisis (Sharanowski *et al.*, 2021). Sin embargo, al interior de la familia se llegaron a algunas conclusiones, recuperándose para los no ciclóstomos una condición ancestral idiobionte/ectoparasitoide y para los ciclóstomos *sensu latum*. la condición koinobionte/endoparasitoide (Figura 7). Esto sugiere que pudo haber varias transiciones evolutivas entre idiobiontes y ectoparasitoides dentro de Braconidae (Sharanowski *et al.*, 2021). Recientemente Jasso-Martínez *et al.* (2022), realizó un estudio filogenético de la familia Braconidae con base de datos genómicos, en donde se recuperó como el estado ancestral de dicha familia la estrategia endoparasitoide - koinobionte, con varias transiciones subsecuentes entre el ecto-endoparasitoidismo, así como de la koino-idiobiosis.

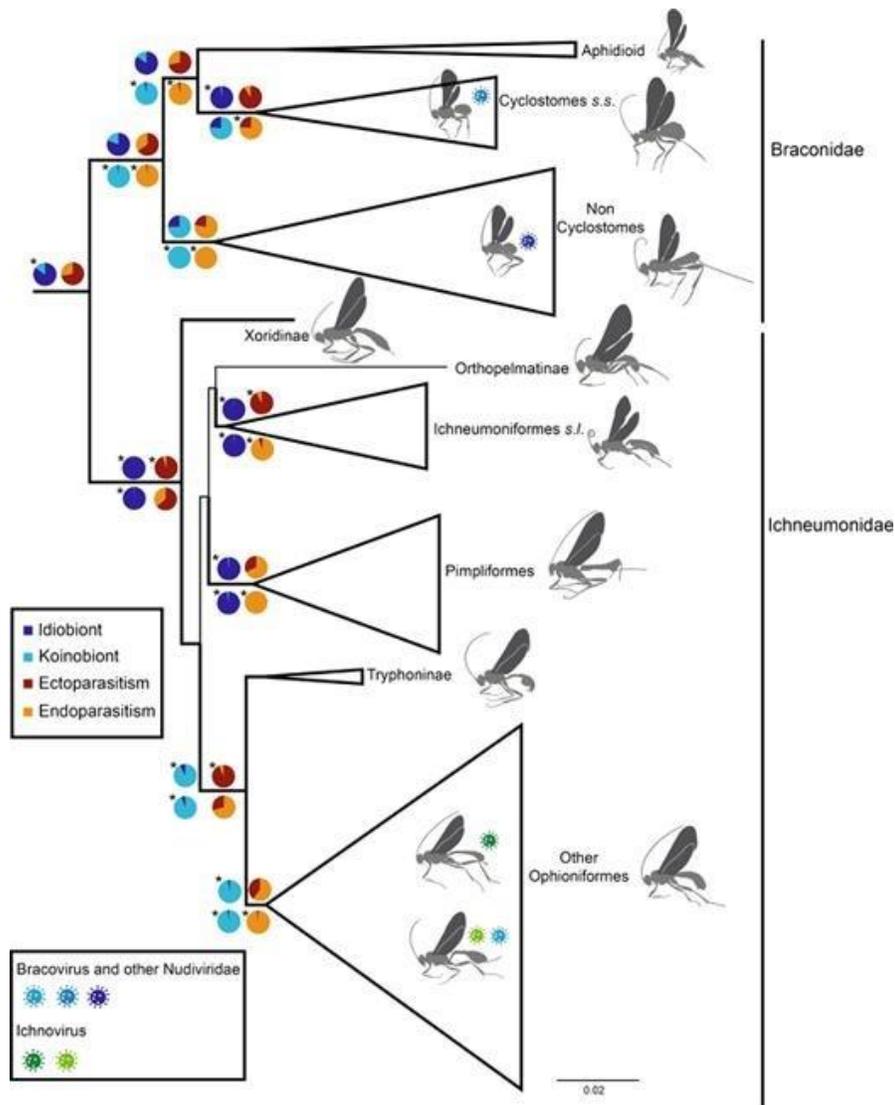


Figura 7. Filogenia de la superfamilia Ichnomonoidea. Los círculos en los nodos representan la condición endo- ectoparasitoide, e idio- koinobiosis. Los círculos representan las transiciones entre diferentes estrategias de parasitoidismo a lo largo de la historia evolutiva de Ichneumonidae. (tomado de Sharanowski, *et al.* 2021).

1.6.3. Familia Braconidae

Braconidae es la segunda familia más rica en especies dentro del orden Hymenoptera con más de 21,000 especies descritas distribuidas en 41 subfamilias (Yu *et al.*, 2016; Jasso-Martínez *et al.*, 2022). Sus miembros son principalmente parasitoides de larvas de insectos holometábolos, pero también existen algunos miembros considerados fitófagos (que forman agallas en las hojas de plantas) dentro de las subfamilias Doryctinae, Braconinae y Mesostoinae (Wharton y Hanson, 2005; Coronado-Blanco y Zaldívar-Riverón, 2014; Samacá-Sáenz *et al.*, 2020). Su diversidad radica en los nichos que habitan y las estrategias de parasitoidismo que presentan, siendo endoparasitoides o ectoparasitoides, koinobiontes o idiobiontes, solitarios o gregarios, además de habitar en casi todos los ecosistemas terrestres, principalmente en los trópicos (Campos, 2001).

La familia Braconidae se divide en dos grupos principales dependiendo de la morfología de las partes bucales: los ciclóstomos, que presentan un clípeo deprimido y un labro cóncavo, y los no ciclóstomos, que tienen un clípeo plano o convexo y un labro setoso (Figura 8). Generalmente, los braconidos son más pequeños y diversos que los miembros de su grupo hermano, la familia Ichneumonidae. Los braconidos llegan a medir entre 1 y 30 mm, no presentan vena costal, la vena 2m-cu se encuentra ausente (Figura 9), y los terguitos abdominales 2 y 3 se encuentran fusionados (Campos, 2001).

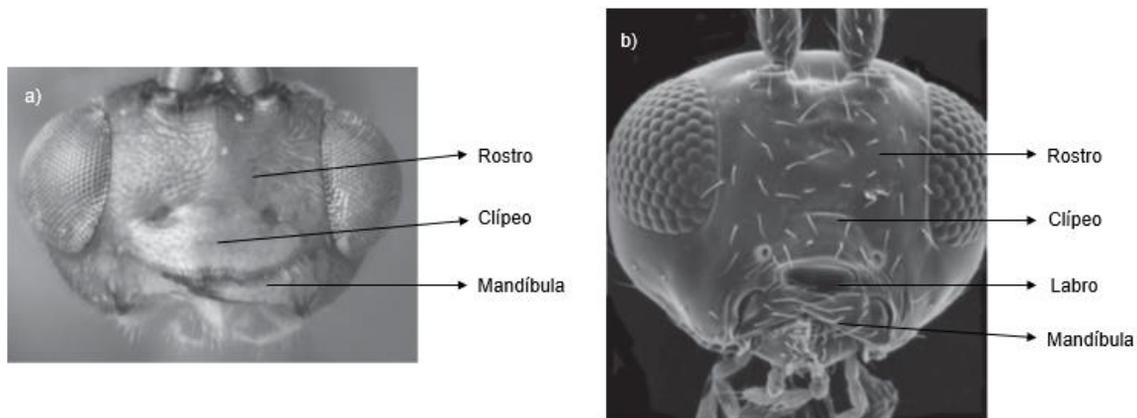


Figura 8. Vista frontal de la cabeza. a) Condición no ciclostoma, el clípeo cubre completamente el labro y por lo tanto no se observa una cavidad ovoide. b) Condición ciclostoma, el labro se encuentra completamente expuesto, margen inferior del clípeo y la parte superior de las mandíbulas forman una cavidad ovoide. Modificado de Quicke (2015).

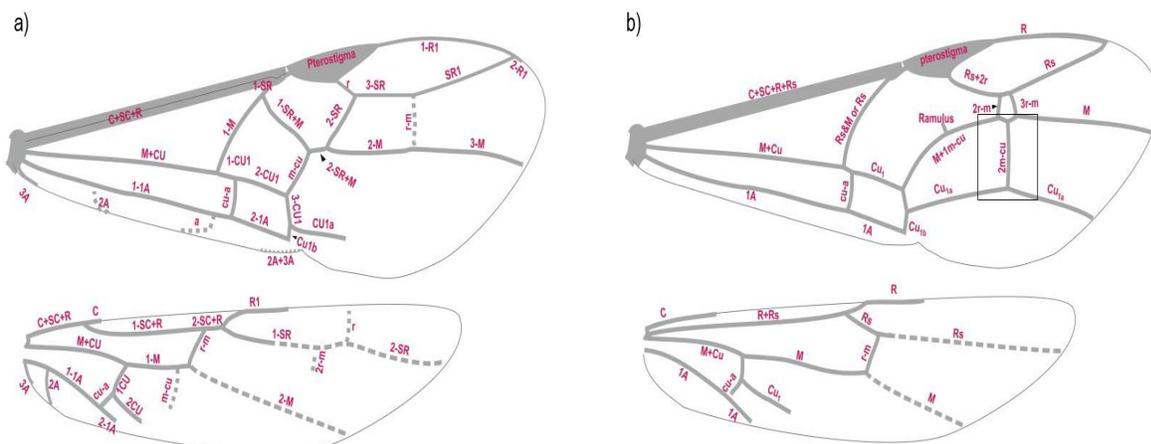


Figura 9. Diferencias entre la venación de alas anteriores y posteriores de las familias de Ichneumonoidea. a) Familia Braconidae, donde la vena 2m-cu se encuentra ausente, además, la vena 1-SR+M se encuentra presente o parcialmente presente en los braconídeos. b) Familia Ichneumonidae, donde la vena 2m-cu se encuentra presente y la vena 1-SR+M no está presente. Modificada de Quicke (2015).

La mayoría de los no ciclóstomos son koinobiontes endoparasitoides, mientras que los miembros del grupo de los ciclóstomos presentan gran variedad de estrategias de parasitoidismo, habiendo koinobiontes endoparasitoides, idiobiontes ectoparasitoides, y en algunos pocos casos koinobiontes ectoparasitoides. Los braconídeos generalmente atacan a miembros de los órdenes

Lepidoptera, Diptera, Coleoptera y Hemiptera, y especies fitófagas (Zaldívar-Riverón *et al.* 2006; Sharanowski *et al.* 2011). Algunos braconidos son utilizados para estudiar diferentes áreas como interacciones entre hospedero-parasitoide, de fisiología y también de control biológico, estudios sobre biodiversidad y conservación, adaptaciones morfológicas y evolución convergente (Matthews, 1974; Sharanowski *et al.* 2011).

1.7. Secuenciación de nueva generación

En 1977 Sanger y colaboradores propusieron un método para obtener secuencias de DNA, denominada técnica de secuenciación Sanger, permitiendo secuenciar genes y posteriormente genomas completos de bacterias y organismos con genomas relativamente pequeños (Schuster, 2008). Sin embargo, con la llegada del proyecto del genoma humano fue necesario desarrollar nuevas tecnologías que fueran más eficientes, rápidas y económicas en cuanto a la cantidad de secuencias que podían generar en comparación con la técnica Sanger. En 2005 apareció una nueva tecnología conocida como pirosecuenciación y, posteriormente, en los años siguientes salieron al mercado varias plataformas de secuenciación. En 2007 apareció Solexa/Illumina basada en secuenciación por síntesis (Margulies *et al.*, 2005; Van Dijk *et al.*, 2014). Ese mismo año salió al mercado SOLiD, una plataforma centrada en la secuenciación por ligación (Valouev *et al.*, 2008), y en el año 2011 Ion Torrent, basada en la detección de pH (Rothberg *et al.*, 2011). A todas estas técnicas mencionadas anteriormente se les denominó secuenciación de nueva generación (NGS por sus siglas en inglés) (Aguilar-Bultet & Falquet, 2015).

La secuenciación de nueva generación se caracteriza por secuenciar segmentos de DNA de manera masiva y en paralelo, llegando a obtener millones de secuencias cortas o *reads*, mismos que pueden ser ensamblados en secuencias de mayor longitud (*contigs*) con base en diferentes métodos y algoritmos. Las técnicas de NGS, además de generar secuencias en menor tiempo y con un costo relativamente bajo (Rubio *et al.*, 2020), no necesitan un paso previo de clonación debido a que se van construyendo bibliotecas con el DNA que se va extrayendo (Mardis, 2013). Sin embargo, la longitud de los *reads* generados por NGS son de menor longitud en comparación con Sanger, lo que podría generar limitaciones en diferentes tipos de estudios (Mardis, 2013; Aguilar-Bultet & Falquet, 2015).

Se han desarrollado diversas técnicas de secuenciación que permiten la identificación del genoma parcial o completo de cualquier organismo como las técnicas de secuenciación reducida del genoma o la secuenciación de genoma completo. Entre las técnicas de secuenciación reducida del genoma se encuentra la técnica de RADseq (*Restriction-site Associated DNA sequencing*), que permite generar secuencias relativamente cortas a partir de una gran cantidad de loci mediante la identificación de sitios adyacentes a enzimas restricción (Eaton *et al.*, 2013; Wright *et al.*, 2019). Otra técnica de representación reducida del genoma es la captura de secuencias basada en la hibridación de los fragmentos de DNA con sondas que son complementarias a miles de regiones genómicas de interés (Harvey *et al.*, 2016). Para la captura de secuencias se han propuesto dos métodos; elementos ultraconservados (UCEs por sus siglas en inglés) y *Anchored Hybrid Enrichment* (AHE por sus siglas en inglés). UCEs utiliza menos sondas y se enfoca en la búsqueda loci mayores a 1000 pb que pueden incluir regiones entre intrones y exones mientras que, AHE se enfoca en la búsqueda de loci de entre 300-600 pb que sean exónicas (Zhang *et al.*, 2019).

La secuenciación del genoma completo (*whole genome sequencing* en inglés) busca la secuencia del genoma completo de un organismo sin la necesidad de utilizar técnicas de captura que asilen regiones específicas (Haworth *et al.*, 2016; Morgensztern *et al.*, 2018). La técnica de secuenciación *Shotgun* consiste en fragmentar el DNA en fragmentos cortos para después secuenciarlos de manera aleatoria, los cuales posteriormente serán ensamblados (Raghavendra y Pullajah, 2018; Young y Gillung, 2020). Actualmente, PacBio (Pacific Bioscience) es considerada secuenciación de tercera generación y no necesita de un paso previo de amplificación de DNA, al secuenciarse en tiempo real y genera *reads* más largos en comparación con la secuenciación de segunda generación (p. ej. Illumina), disminuyendo en gran medida errores al ensamblar el genoma (Van Dijk *et al.*, 2014).

1.8. Herramientas bioinformáticas para la búsqueda de homologías: Modelo oculto de Markov (HMM) y PSI-BLAST para la búsqueda

La identificación de homología entre secuencias de proteínas es utilizada para inferir relaciones evolutivas; sin embargo, el grado de similitud entre proteínas varía dependiendo del grado de divergencia entre la función y estructura de ésta (Madera y Gough, 2002). Dos proteínas son homólogas remotas si la identidad de secuencia entre ellas es menor al 25% debido a una

divergencia evolutiva; sin embargo, pueden compartir estructuras y funciones comunes (Kaushik *et al.*, 2013). Para la identificación de homólogos remotos, existen varios métodos de búsqueda, entre ellos los métodos basados en alineamientos de perfiles como HMM y PSI-BLAST (Chen *et al.*, 2018).

Los modelos ocultos de Markov (*Hidden Markov Models, HMM*) transforman un alineamiento de secuencias múltiples en un sistema de puntuación específico de posición (Chen *et al.*, 2018; Eddy, 1998). Los métodos de alineación HMM son herramientas útiles para la detección de homología remota, ya que tienden a ser más sensibles que los métodos de alineación de secuencias y alineación de perfiles (Chen *et al.*, 2018). Un perfil (modelos estadísticos) de HMM contiene los estados de *match*, inserción y eliminación de una alineación de secuencias múltiples, y cada estado tiene la probabilidad de distribución y la probabilidad de transición (Figura 10) (Eddy, 1998). Este modelo utiliza un sistema de puntuación específico por posición con la finalidad de obtener información sobre el grado de conservación dentro de un alineamiento múltiple. El puntaje resultante es la probabilidad de que la secuencia esté relacionada con el modelo dado y la probabilidad es usada para encontrar un valor *e-value* (De Fonzo, 2007; Eddy, 1998).

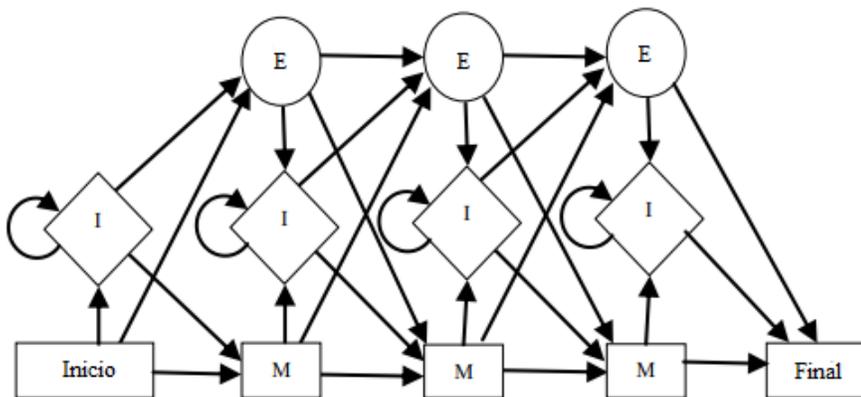


Figura 10. Estructura de los perfiles creados con HMM. M: *match*, I: inserción, E: eliminación. Modificado de Chakrabarti *et al.* (2013).

HMMER (*biosequence analysis using profile hidden Markov models*) es un programa que implementa métodos para crear y manipular perfiles de HMM para hacer búsquedas más sensibles de homología en bases de datos (Zhang y Wood, 2003; Eddy, 1998). El paquete de HMMER

incluye cuatro programas de búsqueda de base de datos para el análisis de secuencias de proteínas: phmmer, hmmscan, hmmsearch y jackhammer (Finn *et al.*, 2011).

PSI-BLAST (*Protein Specific Iterated BLAST*), por otra parte, construye un alineamiento múltiple a partir de una búsqueda de similitud en la base de datos de *blastp*. Con los resultados de la búsqueda se construye un perfil o PSSM (Position Specific Scoring Matrix) que permite realizar una nueva búsqueda para encontrar nuevos homólogos. Con esos nuevos homólogos genera un nuevo perfil, el cual contendrá mayor cantidad de información y podrá realizar otra búsqueda de homólogos remotos (Figura 11) (Schäffer *et al.*, 2001; Altschul y Koonin, 1998).

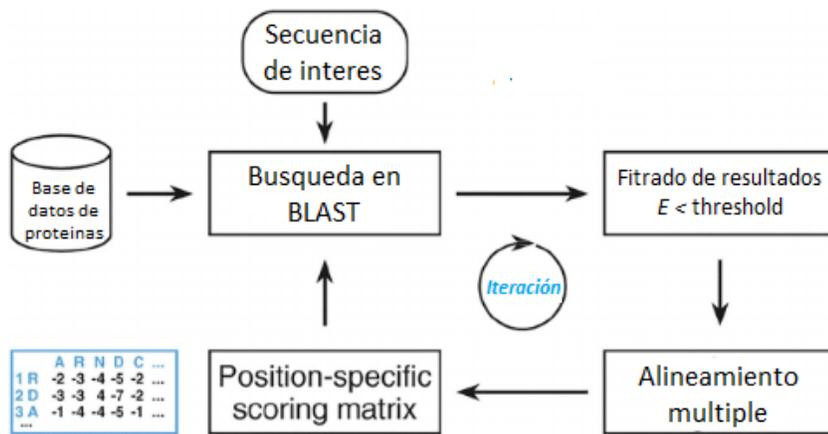


Figura 11. Esquema de las búsquedas realizadas con PSI-BLAST. Modificado de Yousaf *et al.* (2021).

2. Justificación

El presente trabajo tiene la finalidad de investigar la posible existencia de asociaciones con elementos virales endógenos (polidnavirus y virus similares a partículas), virus mutualistas exógenos y comunidades microbianas en avispas endoparasitoides y ectoparasitoides de la familia Braconidae, con énfasis en miembros de las subfamilias ciclostomas. En los trabajos publicados con anterioridad únicamente han reportado la presencia de elementos virales endógenos en avispas parasitoides del complejo microgastroide y la subfamilia Opiinae, además de un entomopoxvirus mutualista en la avispa *Diachasmimorpha longicaudata* (Opiinae). Asimismo, los reportes sobre la diversidad microbiana en avispas parasitoides son escasos. Con la detección de polidnavirus, partículas similares a virus o virus mutualistas en avispas ectoparasitoides se pretende destacar la

importancia que tienen dentro de la relación ecológica parásito-hospedero, así como las relaciones evolutivas que podrían tener con otros miembros de Braconidae o con virus que infectan artrópodos. Con el apoyo de datos a escala genómica obtenidos por secuenciación *shotgun* y las herramientas bioinformáticas actuales es posible desarrollar nuevas metodologías de identificación que sean confiables y reproducibles para su posterior aplicación.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Investigar la presencia de virus mutualistas, elementos virales endógenos y comunidades microbianas en avispas parasitoides pertenecientes a subfamilias de Braconidae empleando datos de secuenciación masiva.

3.2. Objetivos particulares

- Identificar secuencias de virus mutualistas y elementos virales endógenos (EVEs) presentes en especies de subfamilias de Braconidae tanto endo- como ectoparasitoides mediante la detección de genes centrales antiguos.
- Investigar la afinidad filogenética de las secuencias de virus mutualistas y EVEs identificadas en las especies de braconidos examinados.
- Evaluar el desempeño de programas bioinformáticos para identificar secuencias homólogas de genes centrales antiguas de virus mutualistas.

4. Materiales y Método

4.1. Muestreo de taxones

Para este estudio se estudiaron 24 especies de avispas braconidas pertenecientes a las siguientes 11 subfamilias tanto ecto- como endoparasitoides (Tabla 1): Aphidiinae (un género), Braconinae (dos géneros), Doryctinae (cinco géneros), Hormiinae (cuatro géneros), Opiinae (un género), Pambolinae (un género), Rhysipolinae (dos géneros), Exothecinae (un género), Mesostoinae (dos géneros), Rhyssalinae (dos géneros), y Telengaiinae (dos géneros). Estas especies fueron obtenidas

de los siguientes once países: Argentina, Brasil, Japón, Kenia, Madagascar, México, Reino Unido, Rusia, Sudáfrica, Turkmenistán y Vietnam. La antigüedad de recolecta de los ejemplares fue considerablemente variable, abarcando de los años 1937 a 2014. Todos los ejemplares se encontraban montados y depositados en la Colección Nacional de Insectos (CNIN) del Instituto de Biología de la UNAM (IBUNAM).

Las especies de braconídeos examinados en este estudio fueron originalmente secuenciados para llevar a cabo estudios filogenéticos de la familia Braconidae utilizando secuencias de mitogenomas (Jasso-Martínez et al. 2022). Las secuencias obtenidas con la técnica de shotgun, a partir de las cuales se realizó este estudio, están disponibles en SRA para siete de las muestras utilizadas (Tabla 1) como parte del BioProject PRJNA795146. Las secuencias de las muestras restantes estarán disponibles en SRA una vez que se haya publicado el artículo con los resultados de este trabajo.

Tabla 1. Lista de taxones, subfamilia y localidad correspondiente.					
Subfamilia	Estrategia de parasitoidismo	CNIN*	Taxon	Localidad	Accession number SRA shotgun data
Aphidiinae	Endoparasitoides/ Koinobiontes	4276	<i>Pseudephedrus</i> sp.	Argentina: Neuquén Lago Curruvú. -39.21296, -71.30387. 16-XII-2010	
Braconinae	Ectoparasitoides/ Idiobionte	4277	<i>Archibracon servillei</i>	Kenia: Nyanza, Ungoye. 0° 36' N, 34° 05' E. 1147 m.	
		4281	<i>Ipobracon</i> sp.	Madagascar: Toliara Prov. Ranobe. 23° 02.783' S, 43°	
Doryctinae	Ectoparasitoides/ Idiobiontes	939	<i>Pseudodoryctes</i> sp	Desconocido	
		1464	<i>Notiospathius</i> sp.	México	
		1656	<i>Spathius</i> aff <i>moscus</i>	Tailandia	
		3333	<i>Monarea frida</i>	México: Jalisco, BS Chamela	
		4360	<i>Rinamba</i> sp.	Madagascar	
Exothecinae	Idiobiontes	4296	<i>Xenarcha lustrator</i>	Rusia. 1973	SAMN24689965
Hormiinae	Ectoparasitoides/ Idiobiontes	4180	<i>Pseudohormius turkmenus</i>	Turkmenistán: 28 km NNW of Serakhs (= Sarahs), floodplain, steppe. 27.04.1990	
		4190	<i>Parahormius nitidus</i>	Vietnam: Prov. Bac Thai Phu Luong, Quang Chu (20km N Thai Nguyen). 16-23.04.1986	SAMN24689957
		4192	<i>Allobracon scorteus</i>	Brasil: Nova Teutonia. 27° 11' B, 52° 23' L. 20.08.1937	

		4196	<i>Afrotitermus natalicus</i>	Sudáfrica: Natal 75 km WSW Estcourt Cathedral PksFor Sta. 20.12.1979	
Mesostoinae	Endoparasitoides	4290	<i>Mesostoa kerri</i>	Desconocido	
		4316	<i>Methaspathius kuscheli</i>	Desconocido	
Opiinae	Endoparasitoides/ Koinobiontes	4297	<i>Orientopius belokobilskii</i>	Rusia: Primorskiy Territory (kray), 50 km N of Ol'ga. 44°04'34.2"N, 135°09'11.3"E. 1979	SAMN24689966
Pambolinae	Ectoparasitoides	4301	<i>Dimerus mira</i>	Desconocido	
Rhysipolinae	Ectoparasitoides	4169	<i>Pseudavga flavicoxa</i>	Reino Unido: Jealotts Hill, Berks. 3.10.2014	
		4313	<i>Rhysipolis bicarinator</i>	Rusia: Primorskiy Territory (kray), 20 km NE of Spassk-Dalniy, forest. 44°23'38.7"N, 32°53'46.5"E. 1998	
Rhysalinae	Ectoparasitoides/ Idiobiontes	4285	<i>Oncophanes minutus</i>	Reino Unido: Highgrove, Doughton. 27.6.2014	
		4289	<i>Proacrisis orientalis</i>	Rusia: Primorskiy Territory (kray), Brovnichi. 43°18'06.8"N, 133°03'29.7"E. 1984	SAMN24689962
Telengaiinae	Ectoparasitoides	4315	<i>Tamdaona</i> sp.	Japon: Ryukyus, Iriomote Is. 24°20'04.2"N, 123°49'53.7"E. 1996	SAMN24689974
		4308	<i>Telegaia ventralis</i>	Turkmenistán: Repetek. 38°33'54.6"N, 63°10'45.1"E. 1987	SAMN24689970
<i>incertae sedis</i>		4188	<i>Avga dorsomaculata</i>	Turkmenistán: 5 km NW of Kara-Kala, Parkhay. 16.05.1993	SAMN24689956
*CNIN: Colección Nacional de Insectos, IB UNAM					

4.2. Construcción de librerías genómicas y secuenciación

El DNA genómico de cada ejemplar fue extraído mediante una técnica no destructiva (Ceccarelli *et al.*, 2012). Brevemente, en esta técnica el ejemplar completo se deja en una solución buffer con proteinasa K para luego ser incubado a 56°C toda la noche. Posteriormente, el ejemplar es removido y lavado para su montaje en seco, y el sobrenadante es pasado por el kit de columna genómica de DNA EZ-10 Spin Kitminipreps (BIOBasic, Toronto, Ontario, Canadá) siguiendo el protocolo del fabricante. La fragmentación del DNA se realizó con el sonicador Qsonica Q800R (Qsonica 457 LLC, Newton, CT, U.S.A.). El número de ciclos empleados (1 ciclo = 15s en movimiento, 90s sin movimiento) dependió del tipo de preservación y del tiempo de colecta de la muestra; se empleó un ciclo para muestras montadas y antiguas (40 años de antigüedad o más) y

dos o tres ciclos para muestras más recientes y preservada en etanol. La cuantificación del DNA se realizó con un fluorómetro Qubit 2.0 (Invitrogen, Life Technologies, CA, U.S.A.). Se usaron de 2 a 100 ng del DNA inicial en 100µL de agua ultrapura para la preparación de las librerías genómicas (Tabla 2).

La preparación de las librerías genómicas se llevó a cabo con secuenciación tipo *shotgun* siguiendo el protocolo descrito por Branstetter *et al.* (2017), usando el kit Kapa Hyper Prep (Kapa Biosystems Inc., Wilmington, MA, U.S.A) y los adaptadores TruSeq (Glenn *et al.*, 2016). La secuenciación de las librerías genómicas se realizó con un instrumento Illumina Hiseq X Ten en el Departamento de Ciencias de la Salud Ambiental, Universidad de Georgia, Athens, GA, U.S.A.

Tabla 2. Cantidad de ADN inicial y combinación de primers utilizados para cada muestra					
CNIN *	Taxon	Subfamilia	DNA Inicial (ng/ul)	Primer itu5	Primer itu7
4276	<i>Pseudephedrus</i> sp.	Aphidiinae	38	4B	10-9
4277	<i>Archibracon servillei</i>	Braconinae	26	4C	10-10
4281	<i>Ipobracon</i> sp.	Braconinae	100	4B	12-9
1464	<i>Notiospathius</i> sp.	Doryctinae	65	3B	11-5
1656	<i>Spathius</i> aff <i>moscus</i>	Doryctinae	100	3D	11-7
3333	<i>Monarea frida</i>	Doryctinae	100	4B	12-3
4360	<i>Rinamba</i> sp.	Doryctinae	100	4C	12-4
4296	<i>Xenarcha lustrator</i>	Exothecinae	26	5B	13-2
4180	<i>Pseudohormius turkmenus</i>	Hormiinae	100	3C	13-7
4190	<i>Parahormius nitidus</i>	Hormiinae	23	6B	13-7
4192	<i>Allobracon scorteus</i>	Hormiinae	50	2A	12-12
4196	<i>Afrotitermus natalicus</i>	Hormiinae	11	4H	13-5
4290	<i>Mesostoa kerri</i>	Mesostoinae	1.8	5E	13-11
4316	<i>Methaspathius kuscheli</i>	Mesostoinae	7	3F	11-1
4297	<i>Orientopius belokobilskii</i>	Opiinae	14	6B	13-4
4301	<i>Dimerus mira</i>	Pambolinae	20	6F	13-2
4169	<i>Pseudavga flavicoxa</i>	Rhysipolinae	60	3G	13-4
4313	<i>Rhysipolis bicarinator</i>	Rhysipolinae	100	3C	11-3
4285	<i>Oncophanes minutus</i>	Rhysalinae	80	5D	13-9
4289	<i>Proacrisis orientalis</i>	Rhysalinae	22	5D	13-10
4308	<i>Telegaia ventralis</i>	Telengaiinae	31	6F	13-5
4315	<i>Tamdaona</i> sp.	Telengaiinae	28	3E	11-5
4188	<i>Avga dorsomaculata</i>	<i>incertae sedis</i>	80	2G	12-1
*CNIN: Colección Nacional de Insectos, IBUNAM.					

4.3. Trabajo bioinformático

4.3.1. Filtrado, control de calidad y ensamble del genoma

El control de calidad de las secuencias crudas se llevó a cabo con el programa FastQC (Andrews, 2010), una herramienta diseñada para verificar la calidad de secuencias sin procesar. El programa FastQC que se usó se puede encontrar en la plataforma web Galaxy (<https://usegalaxy.org/root>), aquí se utilizaron los conjuntos de datos de cada ejemplar (R1 y R2). Posteriormente, las secuencias fueron filtradas con el programa Trimmomatic v. 0.38.0 que también se encuentra en la plataforma web Galaxy (Bolger *et al.*, 2014). Esta herramienta es utilizada para remover los nucleótidos que después de la secuenciación se consideran de mala calidad y para remover secuencias de adaptadores añadidos durante la secuenciación, únicamente el conjunto de datos *paired-end* producidos por Illumina fueron limpiados. En Trimmomatic se modificaron los siguientes parámetros: SLIDINGWINDOW con un valor de 20 y MINLEN con un valor de 30. Una vez filtradas las secuencias con Trimmomatic se hizo un segundo control de calidad con las secuencias post-filtrado con FastQC.

Se realizó un ensamble *de novo* usando las secuencias previamente filtradas en el programa rnaSPAdes (Bankevich *et al.*, 2012) implementado en la plataforma Galaxy, originalmente diseñado para realizar ensambles *de novo* de transcriptomas. Se utilizaron secuencias *pair-end* (en sentido *forward – reverse*) y un valor de k-mer de 55. Todos los *contigs* menores a 200 pb fueron descartados manualmente.

4.3.2. Búsqueda de microorganismos asociados a braconidos utilizando blastn y asignación taxonómica

Los *contigs* de las secuencias ensambladas se utilizaron para las búsquedas de similitud dentro de la base de datos de GenBank utilizando el algoritmo de BLAST (*Basic Local Alingnement Search Tool*) (Altschul *et al.* 1990). BLAST permite comparar secuencias de nucleótidos y proteínas contra la base de datos del Genbank del NCBI con el fin de encontrar secuencias homólogas con el mayor porcentaje de similitud posible y el *E-value* más bajo (Altschul *et al.* 1990). Para ello, se utilizó el programa NCBI-BLAST v. 2.10 y se empleó la opción *Megablast*.

Para ejecutar el programa se utilizó un script en donde se especificó el tipo de BLAST a utilizar (*blastn -megablast*), así como el número de secuencias alineadas a guardar que tuvieran mayor porcentaje de similitud por cada *contig*, esto con la finalidad de que el archivo de salida incluyera una lista con los 10 mejores *hits* de cada *contig* que tuvieran los porcentajes de similitud más altos, cada uno de los *hits* contenían el número de acceso del NCBI, el Reino al que pertenecía la secuencia y su porcentaje de similitud. BLAST se corrió en la supercomputadora Mitzli de la UNAM.

La asignación taxonómica de los *contigs* se realizó con el programa R v. 2021.09.1+372 empleando el script modificado de Holmes y Rabosky (2018), que requiere de los paquetes *taxize* (Chamberlain y Szöcs, 2013) y *seqinr* (Charif y Lobry, 2007) para poder realizar la búsqueda taxonómica dentro de la base de datos del NCBI. Se realizó un filtrado con valor de *threshold*: 90%. Cada una de las secuencias fue recuperada hasta la categoría taxonómica de género, sin embargo, únicamente se utilizó la categoría taxonómica de phyla y familia como datos informativos.

4.3.3. Generación de marcos de lectura abierta (ORF)

Con las secuencias de nucleótidos ensambladas anteriormente se realizó la generación de los marcos abiertos de lecturas (*ORFs* por sus siglas en inglés) por *contig* usando el programa Emboss getorf v. 5.0.0.1 (Rice *et al.*, 2000) el cual encuentra y genera las secuencias de marcos abiertos de lectura en una o más secuencias de nucleótidos y se generan secuencias de aminoácidos. Los parámetros utilizados se dejaron por defecto y únicamente se reportaron los ORFs traducidos entre las regiones de codones de paro para las 24 muestras. El archivo de salida se generó en un archivo de texto. Emboss getorf v. 5.0.0.1 se corrió en la plataforma web Galaxy.

4.3.4. Búsquedas dirigidas a genes centrales antiguos empleando HMMER y PSI-BLAST

Una primera aproximación para la búsqueda de genes centrales antiguos fue utilizando el programa HMMER (*biosequence analysis using profile hidden Márkov models*) y la paquetería hmmsearch v.3.3.2 (Eddy, 2011), la cual implementa métodos de búsqueda de homología usando modelos probabilísticos denominados perfiles de modelos ocultos de Márkov. Para realizar la búsqueda fue necesario utilizar bases de datos de modelos ocultos de Márkov construidas y proporcionadas por

Burke *et al.* (2021) de seis genes centrales antiguos: *dnapol*, *helicasa*, *lef-5*, *lef-8*, *lef-9* y *p33*. Cada base de datos contenía secuencias de proteínas recuperados de 24 especies de virus grandes de dsDNA que infectan artrópodos y de virus nucleocitoplasmáticos de DNA de gran tamaño: AcMNPV, CpGV, NeseNPV, CuniNPV, ToNV, OrNV, HzNV-2, PmNV, DiNV, GbNV, GpSGHV, MdSGHV, LbFV, WSSV, CoBV, AMEV, MSEV, VACV, IIV-6, LDV1, HvAV-3e, PbCV1, ApMV, y HHV-3. Cada archivo de ORFs obtenidos anteriormente de cada una de las muestras fue alineado contra las bases de datos de los seis genes centrales antiguos. El archivo de salida generado contenía el nombre del nodo contra el cual tuvo *match*, los valores estadísticos, incluyendo *E-value* y la secuencia alineada.

Una segunda aproximación para la búsqueda de genes centrales antiguos se realizó utilizando el programa PSI-BLAST (Altschul *et al.*, 1997), el cual es utilizado para alineamientos locales entre secuencias de proteínas dentro de base de datos del NCBI. Nuevamente se utilizó la base de datos construida por Burke *et al.* (2021) para contrastar cada uno de los ORFs. Esta base de datos contiene los alineamientos de las 24 especies virales mencionadas anteriormente para cada gen central antiguo. Se utilizaron los siguientes parámetros para los alineamientos: `-evaluate 0.005 -outfmt "6 std qlen slen qcovs ppos"`. El archivo de salida contenía el número de acceso del virus con el que tuvo mejor *match*, el nombre del *contig* con el que tuvo *match* y los valores estadísticos del alineamiento. Los *contigs* que tuvieron *match* con algunos de los genes centrales antiguos fueron separados en un archivo tipo *fasta* para cada una de las muestras. Los *contigs* se utilizaron para realizar un *blastp* en BLAST v. 2.13.0. con la finalidad de encontrar similitud con nudivirus endógenos, virus mutualistas, familias previamente identificadas con polidnavirus y partículas similares a virus. Para *blastp* se usaron los parámetros por defecto y únicamente se recuperaron los primeros 15 *hits*. El programa se corrió en BLAST en línea del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

4.3.5. Alineamiento de secuencias y reconstrucción de árboles filogenéticos

La reconstrucción de árboles filogenéticos se realizó utilizando secuencias de ORFs de NALDVs y NCLDVs y virus de avispas parasitoides tanto endógenos como exógenos publicados en la base de datos NCBI nr. Todas las referencias de dichos ORF utilizadas fueron tomadas del estudio de Burke *et al.* (2021). Los alineamientos se hicieron con las secuencias anteriormente mencionadas

junto con las secuencias de ORFs de braconidos que tuvieron *hits* virales. Los alineamientos se realizaron con MAFFT v.7.450 usando el algoritmo FFT-NS-X2 implementado en el programa Geneious v.10.2.3 y la reconstrucción de los árboles filogenéticos por genes, así como un árbol concatenado, se hizo con el programa IQ-TREE v. 2.1.3 (Minh *et al.*, 2020), un algoritmo estocástico rápido y efectivo para inferir árboles filogenéticos por máxima verosimilitud. Se utilizaron los siguientes parámetros en IQ-TREE v.2.1.3: *bootstrap* de 1000 réplicas y SH-aLRT (*approximate likelihood ratio test*) de 1000 réplicas y para la estimación de árbol filogenético.

Se construyó una matriz concatenada que incluyó los alineamientos de *DNApol*, *helicasa*, *lef-8*, *lef-9* y *p33* en el programa Geneious v.10.2.3., posteriormente se realizaron los alineamientos en MAFFT v.7.450 usando el algoritmo FFT-NS-X2. La construcción del árbol concatenado se realizó en IQ-TREE v. 2.1.3., donde primero se realizó la búsqueda del mejor modelo evolutivo utilizando como primer parámetro TESTMERGE, posteriormente se usaron los parámetros anteriormente mencionados.

5. Resultados

5.1. Filtrado, control de calidad y ensamble de novo

La secuenciación por Illumina Hiseq generó entre 38,357 y 2,123,994 *paired-end reads* por muestra, de las cuales se obtuvieron entre un mínimo y un máximo de 35,718 a 1,910,476 *reads* posterior al filtrado (Tabla 3). Los datos ensamblados arrojaron un número de *contigs* de entre 584 a 17861, mientras que la longitud de los *contigs* vario de 200pb a 92,629pb.

Subfamilia	CNIN*	Taxón	Número de reads R1	Número de reads R1 (post-trimm)	Número de reads R2	Número de reads R1 (post-trimm)	Número de contigs	Longitud de contigs (pb)
Aphidiinae	4276	<i>Pseudephedrus</i> sp.	239400	224560	239400	224560	35125	13018
Braconinae	4277	<i>Archibracon servillei</i>	1141078	1063006	1141078	1063006	59467	31876
	4281	<i>Ipobracon</i> sp.	114949	110750	114949	110750	21582	3180
Doryctinae	939	<i>Pseudodoryctes</i> sp	1242856	1160801	1242856	1160801	70312	15279
	1464	<i>Notiospathius</i> sp.	1080042	952239	1080042	952239	147264	12738

	1656	<i>Spathius aff moscus</i>	1146564	1056585	1146564	1056585	150667	16501
	3333	<i>Monarea frida</i>	716861	630626	716861	630626	84180	12774
	4360	<i>Rinamba</i> sp.	1316602	1173449	1316602	1173449	144216	92629
Exothecinae	4296	<i>Xenarcha lustrator</i>	212749	209503	212749	209503	12965	7977
Hormiinae	4180	<i>Pseudohormius turkmenus</i>	38357	35718	38357	35718	14480	4919
	4190	<i>Parahormius nitidus</i>	144518	130098	144518	130098	19686	9824
	4192	<i>Allobracon scorteus</i>	634062	604034	634062	604034	584	908
	4196	<i>Afrotitermus natalicus</i>	260802	256445	260802	256445	5082	1270
Mesostoinae	4290	<i>Mesostoa kerri</i>	598685	592425	598685	592425	98746	61018
	4316	<i>Methaspathius kuscheli</i>	273422	254601	273422	254601	7535	1028
Opiinae	4297	<i>Orientopius belokobilskii</i>	1080685	1023847	1080685	1023847	21261	15702
Pambolinae	4301	<i>Dimerus mira</i>	1161769	982930	1161769	982930	10948	5808
Rhysipolinae	4169	<i>Pseudavga flavicoxa</i>	154233	134609	154233	134609	125120	15235
	4313	<i>Rhysipolis bicarinator</i>	2123294	1910476	2123294	1910476	38450	7976
Rhyssalinae	4285	<i>Oncophanes minutus</i>	437783	418890	437783	418890	174861	12548
	4289	<i>Proacrisis orientalis</i>	892786	845938	892786	845938	14902	3000
Telengaiinae	4308	<i>Telegaia ventralis</i>	284573	270608	284573	270608	76451	8132
	4315	<i>Tamdaona</i> sp.	489720	445980	489720	445980	89816	15341
<i>incertae sedis</i>	4188	<i>Avga dorsomaculata</i>	950380	851180	950380	851180	10412	17786

*CNIN: Colección Nacional de Insectos, IB UNAM

5.2. Búsqueda de microorganismos asociados a braconidos

La búsqueda rápida de microorganismos asociados a Braconidae realizadas con *blastn* arrojó resultados sobre la composición microbiana en avispas parasitoides ectoparasitoides y endoparasitoides. En total, se encontraron 562 familias distribuidas en 56 phyla. La composición fue mayormente bacteriana, predominando los phyla Proteobacteria y Actinobacteria con las familias Streptomycetacea, Burkholderiaceae Bradyrhizobiaceae, Bradyrhizobiaceae, Enterobacteriaceae y Rhizobiaceae, así como la familia de protistas Plasmodiidae (Figura 12). Tanto en las familias endoparasitoides como ectoparasitoides predominaron las bacterias. La presencia de virus, hongos, arqueas, apicomplexos, nemátodos y platelmintos fue menor tanto en

ecto- y endoparasitoides en comparación de las bacterias; sin embargo, la subfamilia ectoparasitoide Rhysalinae presentó mayor cantidad de virus en comparación con las demás subfamilias.

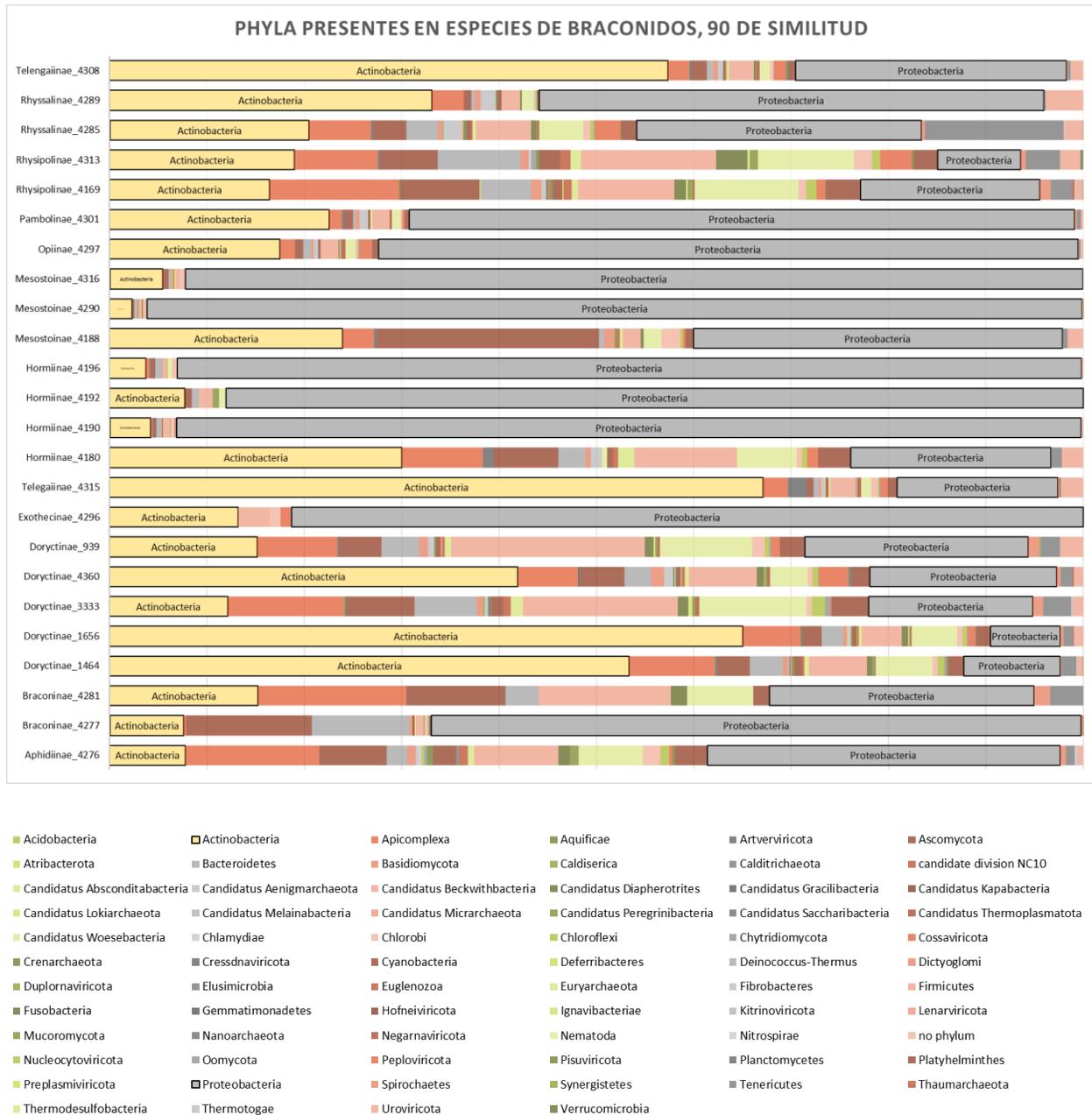


Figura 12. Distribución de phyla encontrados en cada especie de avispa con un 90% de similitud. El eje X representa la abundancia de phyla presentes en cada especie. Los phyla están representados por un gradiente de color. El eje Y representa la especie de braconidos por la subfamilia y CNIN (tabla 1). Las bacterias con mayor abundancia se encuentran encerradas con un rectángulo negro y con la etiqueta del nombre.

En nueve de las 24 especies analizadas se encontraron *hits* virales con las familias *Polydnaviridae* y *Nudidiviridae*. En la tabla 4 se encuentran las especies en las cuales se encontraron polidnavirus en al menos un *conting*. La especie de braconido *Oncophanes minutus* (Rhyssalinae) tuvo un mayor número de *hits* con Polidnavirus, mientras que en *Rinamba* sp. (Doryctinae) se encontraron *hits* virales con polidnavirus y nudivirus. Los resultados de la tabla 4 representan la primera evidencia que indica la presencia de virus mutualistas en las especies de braconidos utilizadas en este trabajo.

Tabla 4. Especies de braconidos que tuvieron *hits* con Polidnavirus y Nudivirus s. El numero en paréntesis representa el número de *contigs* que coincidieron con polidnavirus y nudivirus.

Subfamilia	CNIN	Taxón	Polidnavirus	Nudivirus
	1464	<i>Notiospathius</i> sp.	PDV (1)	
	1656	<i>Spathius aff moscus</i>	PDV (5)	
Doryctinae	4360	<i>Rinamba</i> sp.	PDV (1)	NV (1)
Pambolinae	4301	<i>Dimerus mira</i>	PDV (1)	
	4169	<i>Pseudavga flavicoxa</i>	PDV (1)	
Rhysipolinae	4313	<i>Rhysipolis bicarinator</i>	PDV (3)	
Rhyssalinae	4285	<i>Oncophanes minutus</i>	PDV (14)	
Telengaiinae	4315	<i>Tamdaona</i> sp.	PDV (1)	
incertae sedis	4188	<i>Avga dorsomaculata</i>	PDV (3)	

5.3. Detección de elementos virales y virus mutualistas

Las búsquedas de genes centrales antiguos utilizando HMMER y PSI-BLAST arrojaron resultados positivos. En 22 de las 24 muestras de braconidos se encontraron *hits* virales con al menos un gen central antiguo. Las búsquedas realizadas con HMMER recuperaron un mayor número de ORFs con similitud viral. Hubo varios *hits* virales que coincidieron tanto en la búsqueda de HMMER como de PSI-BLAST. Los genes *lef-8* y *DNAPol* tuvieron un mayor número de coincidencias con al menos un ORF en 18 de las 24 secuencias de braconidos, mientras que los genes *helicasa* y *p33* coincidieron con al menos un ORF en 12 de las 24 secuencias de braconidos. Las secuencias de braconidos que tuvieron un mayor número de coincidencias virales fueron aquellas que tenían un mayor número de ORFs.

Dado que las búsquedas con HMMER y PSI-BLAST no confirmaban la presencia de elementos virales por completo, se realizó una nueva búsqueda en *blastp* con los ORFs que tuvieron coincidencia con genes centrales antiguos para ver si coincidían con virus relacionados con EVEs o virus exógenos. Las búsquedas realizadas en *blastp* arrojaron que sólo dos de las 22 secuencias de braconidos que habían tenido coincidencias con genes centrales antiguos en las búsquedas anteriores tuvieron coincidencias con genes virales.

Archibracon servillei, un ectoparasitoide de la subfamilia Braconinae, tuvo *hits* virales con HMMER y PSI-BLAST en 11 *contigs* de longitud entre 214 pb y 782 pb resultando en 134 ORFs que oscila entre 52 a 300 aminoácidos. Después de las búsquedas en *blastp* se encontraron coincidencias en solo nueve ORFs de entre 79 a 300 aminoácidos. Los ORFs que tuvieron *hits* virales en *blastp* coincidieron con cuatro genes centrales antiguos (*DNApol*, *helicasa*, *lef-5* y *lef-8*) de la familia Nudiviridae.

Rinamba sp., un ectoparasitoide de la subfamilia Doryctinae, tuvo *hits* en las búsquedas con HMMER y PSI-BLAST en dos *contigs* de longitudes entre 27018bp y 92629bp resultando en 613 ORFs de 50 a 1335 aminoácidos. Después de la búsqueda con *blastp*, se encontraron coincidencias en cinco ORFs de entre 127 a 1335 aminoácidos. Los cinco mejores *hits* coincidieron con cinco genes centrales antiguos (*DNApol*, *helicasa*, *lef-8*, *lef-9* y *p33*) de la familia Entomopoxvirinae.

Tabla 5. <i>Hits</i> virales en genes centrales antiguos obtenidos después del filtrado en <i>blastp</i> . NV: nudivirus, EPV: entomopoxvirus								
CNIN	Subfamilia	Taxon	DNApol	helicasa	lef-5	lef-8	lef-9	p33
4277	Braconinae	<i>Archibracon servillei</i>	NV	NV		NV	NV-EPV	
4360	Doryctinae	<i>Rinamba sp.</i>	EPV	EPV		EPV	EPV	EPV

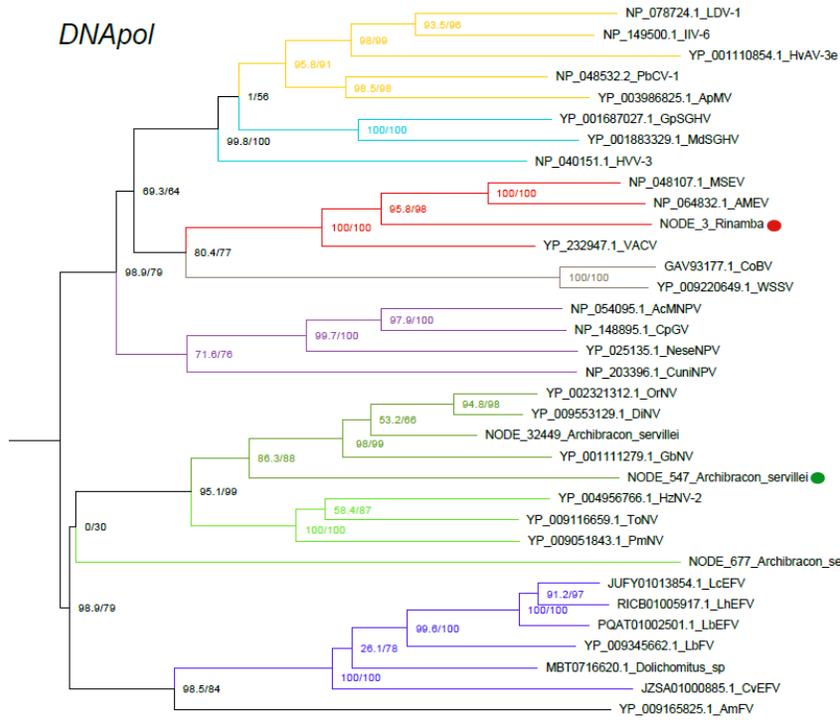
5.4. Confirmación de presencia de entomopoxvirus y elementos virales endógenos

Las reconstrucciones filogenéticas de cada gen central antiguo demostraron la relación de los ORFs de *Rinamba sp.* con entomopoxvirus. En el árbol filogenético de *DNApol helicasa*, *lef-8* y *p33*, *Rinamba* se posicionó como grupo hermano del virus *Vaccinia*, *Melanoplus sanguinipes entomopoxvirus* y *Amsacta moorei entomopoxvirus* siendo los valores de soporte de estas relaciones generalmente altos (*bootstrap* = 81–100). En el árbol de *lef-9*, *Rinamba* fue grupo hermano de *Melanoplus sanguinipes entomopoxvirus* y *Amsacta moorei entomopoxvirus*, (*bootstrap*= 98.9) (Figura 12).

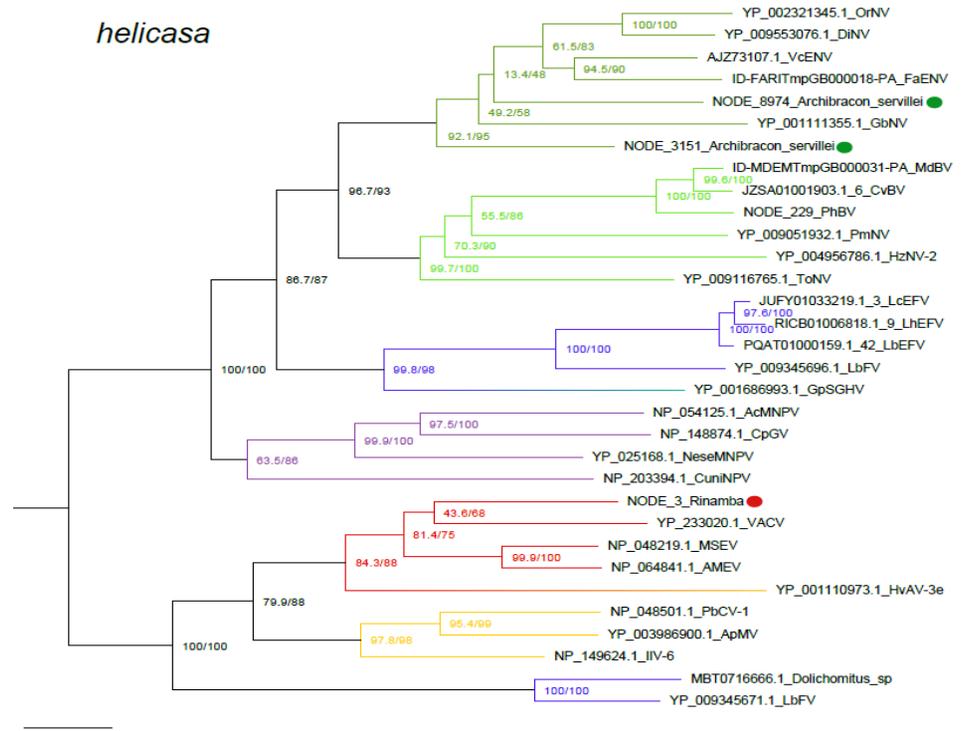
En el caso de *A. servillei*, las secuencias de esta especie de braconino se agruparon tanto con miembros de la familia *Nudiviridae* como de *Entomopoxvirinae* (Figura 13). En el árbol de *DNApol* dos secuencias se agruparon con *Alphanudivirus* (nodos 32449 y 547) y una secuencia de

esta especie (nodo 677) se posicionó como grupo hermano de la familia *Nudiviridae*, sin embargo, el soporte de las ramas para esta secuencia fue muy bajo (*bootstrap*= 0-30). Los valores de *bootstrap* que apoyaron estas relaciones con *Alphanudivirus* fueron generalmente altos (*bootstrap*= 86.3–100). En el árbol de *helicasa* y *lef-8*, *A. servillei* se agrupó con *Alphanudivirus* (*bootstrap*= 92). Finalmente, en el árbol de *lef-9* una secuencia de esta especie se anidó dentro del grupo de los *Alphanudivirus* (*bootstrap*= 98), mientras que una tercera se anidó dentro del clado de entomopoxvirus como grupo hermano de *Rinamba* (*bootstrap*= 100) (Figura 13).

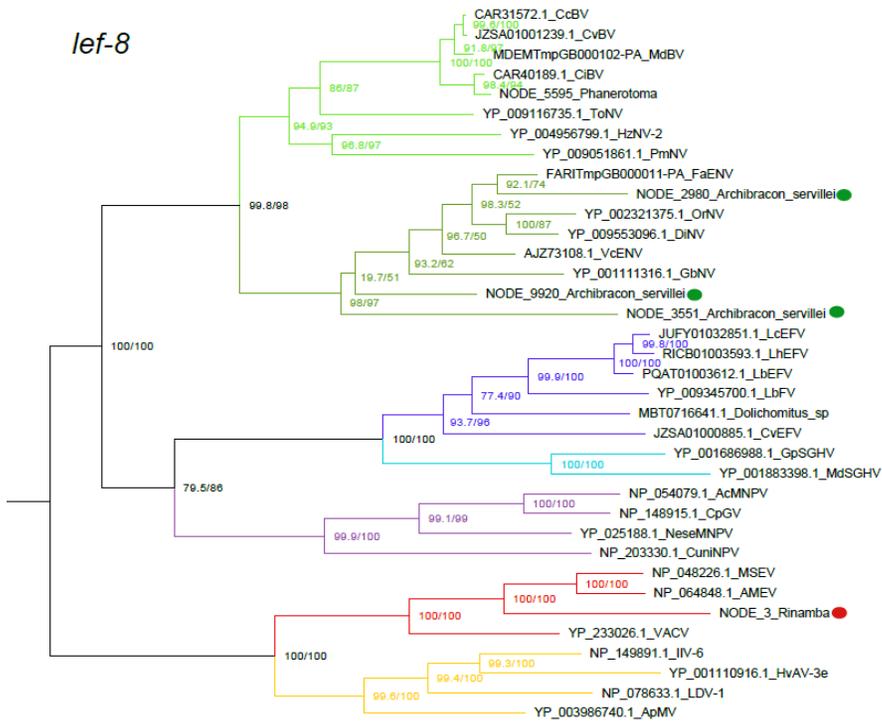
DNApol



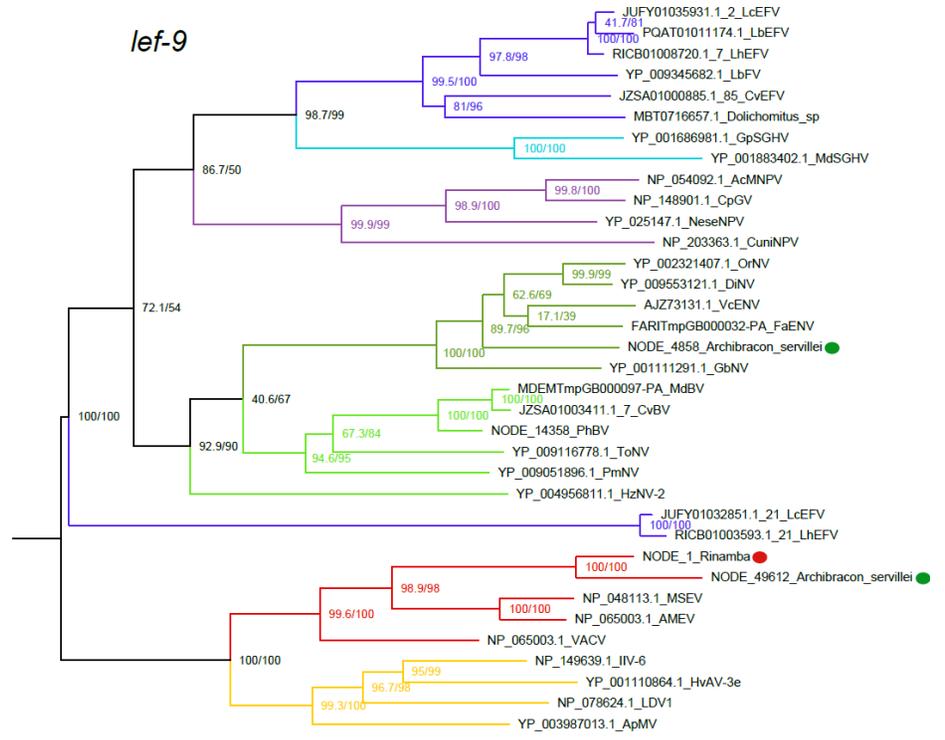
helicasa



lef-8



lef-9



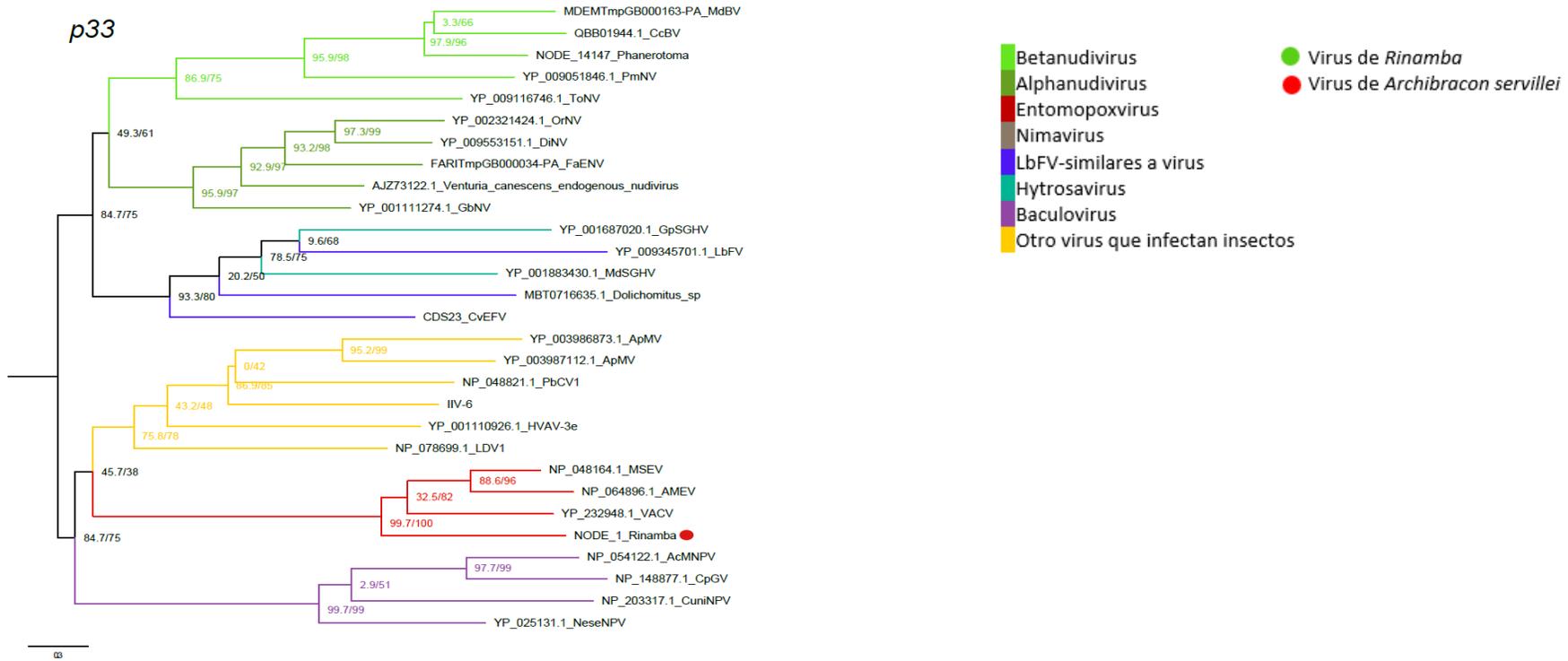


Figura 13. Árboles filogenéticos de familias de virus de doble cadena que infectan artrópodos y otros animales. Árboles obtenidos por el método de máxima verosimilitud y las matrices que contenían las secuencias de los cinco genes centrales antiguos para diferentes familias de virus, los árboles no tienen raíz dado que se desconoce el origen de los virus, los árboles se ordenaron con *midpoint*. Los números en los nodos indican valores de *bootstrap*. Las familias virales se encuentran separadas por colore, mientras que las secuencias virales encontradas en las especies de avispas se encuentran señaladas con un círculo rojo para el virus de *Rinamba* y un círculo verde para el virus de *Archibracon servillei*. Los nombres completos de los virus usados para las filogenias se encuentran en el anexo 1.

5.5. Afinidad filogenética de los virus detectados

En la Figura 14 se observan las relaciones filogenéticas de virus mutualistas tanto endógenos (*Bracovirus* y LbFV) como exógenos (*Entomopoxvirinae*) con otros virus que infectan artrópodos. En la reconstrucción filogenética se observa que los *Bracovirus* se agrupan en el clado de *Betanudiviridae*, lo que confirma el origen a partir de un nudivirus. Las secuencias virales encontrada en *Rinamba* se posicionó en el grupo de los entomopoxvirus, teniendo como grupo hermano al virus *Vaccinia* y a *Melanoplus sanguinipes entomopoxvirus* + *Amsacta moorei entomopoxvirus* (Figura 14).

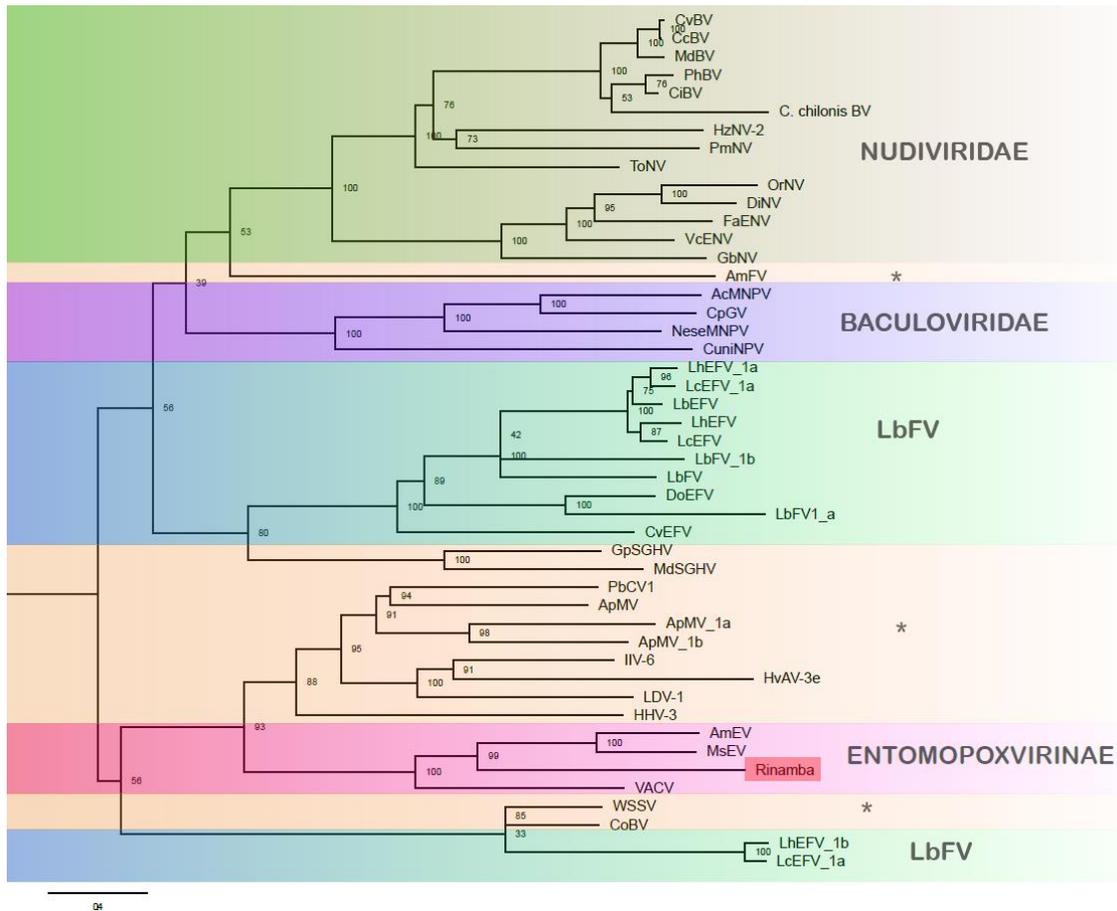


Figura 14. Árbol filogenético concatenado (*DNApol*, *helicasa lef-8*, *lef-9* y *p33*) obtenido por el método de máxima verosimilitud incluyendo secuencias de cinco genes centrales antiguos para diferentes familias de virus, así como para *Rinamba* sp. Los números en los nodos representan valores de *bootstrap*. Los * corresponde otras familias de virus.

6. Discusión

6.1. Microorganismos presentes en avispas parasitoides de la familia Braconidae

La presencia de diferentes microorganismos entre las avispas parasitoides varía entre especies endoparasitoides y ectoparasitoides, ya que diferentes grupos de hospederos pueden afectar las comunidades microbianas (Duan *et al.*, 2020). Además, otros factores como la dieta, el ambiente, la genética, la historia evolutiva, el tipo de hospedero, la etapa de desarrollo, la distribución geográfica e incluso el pH repercuten en la diversidad microbiana de los insectos (Kaczmarczyk-Ziemba *et al.* 2020; Engel y Moran, 2013),

En un estudio previo sobre el microbioma de la avispa *Telenomus tridentatus*, Ramírez-Ahuja *et al.* (2019) encontraron una composición bacteriana representada mayormente por Proteobacterias, Actinobacterias y Firmicutes, composición que coincide con otros reportes de dípteros, himenópteros y lepidópteros, así como hongos de los phyla Ascomycota y Basidiomycota encontrados en otros estudios (Nedoluzhko *et al.*, 2017; Gloder *et al.*, 2021). De igual manera, Yun *et al.* (2014) y Kaczmarczyk-Ziemba *et al.* (2020) encontraron una composición similar, donde siempre predominaban las Proteobacterias, siguiendo siempre en menor o mayor diversidad las Actinobacterias y Firmicutes. Badrulisham *et al.* (2022), analizaron la composición microbiana de la avispa parasitoide *Dolichogenidea metesae* (Braconidae: Microgastrinae) donde predominaron las Proteobacteria y Bacteroidetes, lo que coincidía con lo encontrado en la avispa parasita *Megaphragma amalphitanum* (Trichogrammatidae) (Nedoluzhko *et al.* 2017).

La abundancia de bacterias encontradas en las especies de braconidos examinados en este estudio fue similar a lo reportado en trabajos previos (Yun *et al.*, 2014; Nedoluzhko *et al.*, 2017; Ramírez-Ahuja *et al.*, 2019; Kaczmarczyk-Ziemba *et al.*, 2020; Badrulisham *et al.* 2022), ya que tanto Proteobacterias como Actinobacterias fueron las predominantes en todas las secuencias analizadas. Las Proteobacterias se han reportado como una parte esencial en la nutrición de los insectos directamente relacionadas con el metabolismo, mientras que las Actinobacterias están relacionadas con la producción de antibióticos en su hospedero (Kikuchi *et al.*, 2007; Kaltenpoth *et al.*, 2009). Cabe mencionar que no se encontraron bacterias patógenas como *Wolbachia* y *Rickettsia*, dos bacterias patógenas importantes porque se han encontrado en diferentes grupos de himenópteros (Cavichioli de Oliveira y Cônsoli, 2020; Badrulisham *et al.* 2022).

A pesar de que la composición microbiana encontrada en las diversas especies de braconidos coincidieron con lo reportada en la literatura anteriormente no se descarta la posibilidad de contaminación en los ejemplares de braconidos. Dado que las secuencias genómicas de las avispas provenían de ejemplares antiguos de museo, pudieron ser expuestas a diversos tipos de contaminación desde la recolección del ejemplar. En este trabajo no se siguió un protocolo específico para determinar las comunidades microbianas asociadas a braconidos debido a que el principal fin de esta búsqueda fue observar coincidencia con elementos virales endógenos o virus mutualistas. Los resultados de estas búsquedas determinaron la posible existencia de EVEs o virus mutualista presentes en al menos seis especies, ya que en los resultados (tabla 4) se encontraron coincidencias con polidnavirus y nudivirus. Esta primera aproximación sirvió para enfatizar en la presencia de virus mutualistas insertos en los genomas de las avispas y por lo tanto llevar a cabo búsqueda dirigida a EVEs y virus mutualistas implementando los genes centrales antiguos.

Es importante mencionar que en esta primera aproximación se utilizaron nucleótidos, por lo que es posible que hubiera regiones en los *contigs* que no fueran codificantes. Por lo tanto, en las subsecuentes búsquedas dirigidas se utilizaron marcos abiertos de lectura que sí codifican para proteínas y que pueden encontrar la presencia de algún gen central antiguo pertenecientes a virus que infectan artrópodos. Otro punto para considerar es que en las búsquedas con marcos abiertos de lectura no se tomaron en cuenta los *hits* virales con *Bracovirus* porque pueden ser confundidos con genes de la avispa debido a que comparten genes eucariontes al ser endógenos.

6.2. Eficiencia de las herramientas bioinformáticas para la detección de los elementos virales y virus mutualistas

Las herramientas bioinformáticas actualmente representan un recurso robusto para las investigaciones con enfoques evolutivos. En este trabajo se implementaron tres métodos de búsqueda de homología entre secuencias de proteínas para la detección de genes centrales antiguos en genomas de avispas de la familia Braconidae. Las búsquedas de homología con proteínas son más sensibles que las búsquedas con nucleótidos, ya que las secuencias de nucleótidos pueden cambiar sin que se refleje un cambio significativo en las proteínas como las sustituciones sinónimas, es decir, cuando comienza la traducción puede haber un cambio en la tercera base de un aminoácido y no afectaría el marco de lectura (Eddy, 2011).

PSI-BLAST y HMMER se implementaron como primera aproximación en la detección de genes centrales antiguos. Ambos programas detectaron una gran cantidad de ORFs que tuvieron *hits* con al menos uno de los genes centrales antiguos. La mayoría de los ORFs que tuvieron *hits* con genes centrales con PSI-BLAST y HMMER, no tuvieron *hits* virales con *blastp*. Esto indica que los primeros *hits* detectados con PSI-BLAST y HMMER posiblemente eran falsos positivos, es decir, que ambos programas detectaron ORFs con similitud a genes centrales, aunque en realidad se trataban de genes de la avispa o de genes de origen retroviral que pueden ser transferidos entre el genoma de eucariotas (Burke *et al.*, 2021).

Anteriormente, Reid *et al.* (2007), Chen *et al.* (2016) e Islam *et al.* (2018), demostraron que ambos programas pueden utilizarse de manera complementaria para mejorar el rendimiento de las búsquedas y evitar en menor medida falsos positivos. HMMER toma en cuenta las probabilidades de inserción y eliminación en cada posición de aminoácidos, por lo tanto, es más sensible, ya que detecta regiones sumamente conservadas de familias de proteínas y a un menor costo computacional (Pearson, 2013; Chen *et al.*, 2016). En cambio, PSI-BLAST, al realizar muchas búsquedas iterativas puede ocasionar que se incorporen proteínas no homólogas en los perfiles de las iteraciones posteriores, lo que conduce a resultados erróneos, además, el costo computacional es mayor que el HMMER, pero es más rápido (Islam *et al.*, 2018).

El uso PSI-BLAST y HMMER de manera combinada, permitió identificar regiones homólogas con genes centrales antiguos en *Archibracon servillei* y *Rinamba* sp. que, como se mencionó anteriormente, se verificaron usando *blastp*. En el caso de *Archibracon servillei*, se identificaron nueve ORFs homólogos a virus, de los cuales ocho fueron únicamente resultados de las búsquedas con HMMER y solo un ORF coincidió en la búsqueda con HMMER y PSI-BLAST. En el caso de *Rinamba*, cinco ORFs tuvieron *hits* con genes centrales antiguos, de los cuales cuatro se encontraron con ambos métodos y uno solo con PSI-BLAST.

Los datos de genomas completos son necesarios para la búsqueda de elementos virales. En este trabajo se utilizaron secuencias genómicas de braconidos no publicados y algunos previamente publicados en GenBank. Los datos de secuenciación que se generaron en este trabajo fueron de genomas parciales. Al ensamblar el genoma se obtuvieron pocos *contigs* entre las diferentes muestras, siendo *Rinamba* sp. el taxón con el mayor número de *contigs* y de mayor longitud, curiosamente, *Rinamba* sp. también fue uno de los taxones que tuvo *hits* virales. A pesar

de que la secuenciación fue muy somera, ayudó a la identificación de secuencias virales y proporcionar un panorama general de las comunidades microbianas presentes en los braconidos.

6.3. Presencia de *Entomopoxvirus* en la familia *Braconidae* y detección de secuencias genéticas de *nudivirus* en *Archibracon servillei*

La búsqueda de elementos virales y virus mutualistas utilizando genes centrales antiguos puede confirmar la presencia de dichos virus debido a que son genes conservados y que forman parte de la maquinaria molecular que forma los viriones. En este trabajo se confirmó la posible presencia de un entomopoxvirus en *Rinamba*, un ectoparasitoide idiobionte de la subfamilia Doryctinae, que tiene como posibles hospederos larvas de coleópteros xilófagos y perforadores de madera.

En estudios previos se había confirmado la presencia de un entomopoxvirus mutualista en la avispa parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata*, un endoparasitoide koinobionte de la subfamilia Opiinae (Braconidae) que parasita moscas de la fruta (Ovruski *et al.*, 2000). Coffman *et al.* (2020), sugieren que DIEPV tiene un origen exógeno debido a la falta de genes flanqueantes entre los genes de la avispa y los genes virales de DIEPV. Además, a diferencia de los EVES el virus se puede replicar tanto en la avispa parasitoide como en la mosca sin causar infección en la avispa. Sin embargo, de manera similar a los EVES, conservan genes centrales antiguos que son transferidos de la madre al hijo llevando a cabo la replicación en el oviducto lateral de las hembras. Asimismo, El origen de DIEPV proviene, posiblemente, de un poxvirus patógeno de moscas, ya que los análisis filogenéticos muestran la estrecha relación con el virus *Yalta*, un virus que comparte genes similares a los entomopoxvirus. Coffman y Burke (2020) confirmaron en su investigación que DIEPV se transmite verticalmente e impulsa considerablemente la supervivencia de la progenie de la avispa durante el parasitismo. Ambos trabajos sugieren la coevolución entre virus-hospedero ya que los virus mutualistas derivan de patógenos de los insectos hospederos de las avispas parasitoides.

En este trabajo, *Rinamba* sp. tuvo secuencias virales que se relacionaron en los análisis filogenéticos con *Amsacta moorei entomopoxvirus* y *Melanoplus sanguinipes entomopoxvirus* dos entomopoxvirus que tienen como hospederos a lepidópteros y ortópteros respectivamente. Tomando en cuenta los descubrimientos de Coffman y Burke (2020), se esperaría que *Rinamba* se relacionara con un entomopoxvirus que tuviera como hospedero un coleóptero xilófago (e.g. *Melolontha melolontha entomopoxvirus*) ya que son hospederos de *Rinamba*; sin embargo, hasta

la fecha no hay datos genómicos completos de más entomopoxvirus que infecten coleópteros. Además, contrario a *D. longicaudam*, *Rinamba* es un ectoparasitoide idiobionte, es decir, que ovoposita sobre el hospedero y no permite que su hospedero siga desarrollándose. Por lo tanto, una explicación biológica sobre la presencia de un entomopoxvirus en *Rinamba* tendría que investigarse a profundidad.

En estudios previos, se dio a conocer que DIEPV causa cambios fisiológicos y morfológicos en los hospederos afectando el desarrollo mediante la alteración de la hormona juvenil (JH), y de esta forma se ralentiza el crecimiento del hospedero (Coffman *et al.* 2020; Balgopal *et al.* 1996). En *Rinamba* podría ocurrir algo similar a pesar de que sea un ectoparasitoide idiobionte, y la principal función del entomopoxvirus asociado sea ralentizar la muda del hospedero y debilitar el sistema inmunológico al infectar los hemocitos (células inmunitarias). Ambos factores, así como el veneno y la secreción de las propias larvas de las avispa asegurarían el éxito de la parasitación. Las relaciones encontradas en este trabajo para las secuencias obtenidas de *Rinamba* sp. sugieren la presencia de un entomopoxvirus, aunque futuros estudios con un mayor esfuerzo de secuenciación permitirán confirmar la presencia de este virus mutualista o si se trata de una infección viral de la avispa.

En el caso de la secuencia viral asociada a *Archibracon servillei*, se encontró que existe relación con nudivirus y con entomopoxvirus; sin embargo, las secuencias virales de *A. servillei* que se relacionaron con ambas familias virales en los árboles filogenéticos de construidos por gen, no se consideraron para el árbol filogenético concatenado debido a que las secuencias virales de *A. servillei* eran muy pequeñas (entre 100 a 150 aa), lo que dificultaba el alineamiento con las secuencias de los virus utilizados para la reconstrucción filogenética ya que tenía una longitud mayor a 2000 aa. Por ende, para futuros estudios se propone realizar una secuenciación con más *reads* y un mejor ensamble del genoma que permita confirmar la presencia de un nudivirus, ya que representaría el primer reporte de un virus endógeno en la subfamilia Braconinae y en un ectoparasitoide.

6.4. Perspectiva para estudios futuros de la presencia de elementos virales

Es necesaria la secuenciación de genomas completos de braconidos endo y ectoparasitoides, así como la búsqueda de parámetros más adecuados que permitan ensamblar de mejor manera estos

genomas con el fin de encontrar, con mayor certidumbre, elementos virales endógenos o virus mutualistas (e.g. entomopoxvirus) que fueron adquiridos durante la historia evolutiva de las especies de Braconidae. El hallazgo de entomopoxvirus en especies ectoparasitoides es evidencia de la adquisición de virus en braconidos que no necesariamente fueron domesticados por un ancestro de nudivirus. Este nuevo hallazgo abre las puertas a la exploración de virus exógenos que, de manera similar a los EVEs, tienen implicaciones importantes en las estrategias de parasitoidismo de las especies endoparasitoides, aunque a la fecha se desconoce el papel biológico que estos virus puedan tener en las especies ectoparasitoides. Es necesario también seguir explorando y desarrollando “pipelines” que ayuden a la identificación de genes centrales antiguos, al igual que desarrollar una manera de confirmar si las secuencias víricas son de origen endógeno, exógeno o si se trata de una infección por algún otro tipo de virus que infecte invertebrados.

7. Conclusiones

- Se realizó una búsqueda de microorganismos, elementos virales endógenos y virus exógenos en especies de avispas parasitoides de la familia Braconidae pertenecientes a 11 subfamilias a partir de datos de secuenciación masiva.
- Se realizó la secuenciación parcial del genoma de 24 especies de braconidos con la técnica *shotgun*. Se examinaron cuatro especies endoparasitoides y 20 ectoparasitoides provenientes de 11 países, las cuales se recolectaron entre los años 1937 y 2014.
- Para la búsqueda de microorganismos asociados a braconidos, se hizo una búsqueda en BLAST nr con los *contigs* de nucleótidos. Para la identificación de virus, se usaron marcos abiertos de lectura obtenidos a partir de la traducción de *contigs* y genes centrales antiguos de diferentes familias de virus grandes que infectan artrópodos y que comparten un origen común.
- En dos especies de ectoparasitoides, *Rinamba* sp. y *Archibracon servillei*, se encontró tanto similitud genética como afinidad filogenética con dos virus simbioses. Un total de cinco marcos abiertos de lectura provenientes de *Rinamba* sp. (Doryctinae) se relacionaron con los homólogos correspondientes de entomopoxvirus, lo que indica la posibilidad de que exista un entomopoxvirus que forme algún tipo de interacción con esta especie de avispa ectoparasitoide. Por otra parte, 10 marcos abiertos de lectura de *Archibracon servillei* (Braconidae) se relacionaron tanto con la familia Nudiviridae como con un entomopoxvirus, aunque no fue posible confirmar su relación debido a la naturaleza de los datos obtenidos.

- Los resultados obtenidos para *Rinamba* sp. representan el primer registro de un virus mutualista de origen exógeno en una especie ectoparásitoide.
- Este trabajo de tesis apoya ampliamente la implementación de herramientas bioinformáticas para la búsqueda de homologías, así como el uso de genes centrales antiguos para la identificación de virus simbiotes en insectos. Este trabajo demuestra que el uso de búsquedas dirigidas a elementos centrales antiguos puede servir como un método eficaz para identificar virus mutualistas en familias de insectos, y podría implementarse en un futuro no solo a insectos sino también a otros grupos de animales.

8. Referencias

- Aguilar-Bultet, L., y Falquet, L. (2015). Secuenciación y ensamblaje de novo de genomas bacterianos: una alternativa para el estudio de nuevos patógenos. *Revista de salud animal*, 37(2), 125-132.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, 25(17), 3389-3402.
- Altschul, S. F., & Koonin, E. V. (1998). Iterated profile searches with PSI-BLAST—a tool for discovery in protein databases. *Trends in biochemical sciences*, 23(11), 444-447.
- Andrews, S. (2010). *FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data*. Retrieved from <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- AntWeb. (2021). Antweb Statistics Versión 8.63.2. Julio 13, 2021, de California Academy of Sciences Sitio web: <https://www.antweb.org/>
- Arif, B., Pavlik, L., Nałçacıoğlu, R., Muratoğlu, H., İnan, C., Yakupoğlu, M., Özşahin, E., Demir I., Sezen, K., Demirbağ, Zihni. (2021). Poxviruses of Insects (Poxviridae). En Bamford & Zuckerman (Eds). *Encyclopedia of virology* (pp.858-866). Academic Press.
- Askew, R.R. y Shaw, M.R. (1986). Parasitoid communities: their size, structure and development. En J. Waage, y D. Greathead, (Ed.), *Insect Parasitoids* (pp. 225–264). Academic Press, London.
- Badrulisham, A. S., Bakar, M. A. L. A., Zain, B. M. M., Md-Nor, S., Abd Rahman, M. R., Mohd-Yusof, N. S., ... & Yaakop, S. (2022). Metabarcoding of Parasitic Wasp, Dolichogenidea metesae (Nixon) (Hymenoptera: Braconidae) That Parasitizing Bagworm, Metisa plana Walker (Lepidoptera: Psychidae). *Tropical Life Sciences Research*, 33(1), 23.)
- Balgopal MM, Dover BA, Goodman WG, Strand MR. (1996). Parasitism by *Microplitis demolitor* induces alterations in the juvenile hormone titers and juvenile hormone esterase activity of its host, *Pseudoplusia includens*. *J Insect Physiol* 42:337–345
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., ... et al. (2012). SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *Journal of Computational Biology*, 19(5), 455-477. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
- Bennett, A. M., Cardinal, S., Gauld, I. D., & Wahl, D. B. (2019). Phylogeny of the subfamilies of Ichneumonidae (Hymenoptera). *Journal of Hymenoptera Research*, (1), 1-157.
- Bézier, A., Louis, F., Jancek, S., Périquet, G., Thézé, J., Gyapay, G., Musset, K., Lesobre, J., Lenoble, P., Dupuy, C., Gundersen-Rindal, D. E., Herniou, E. A., & Drezen, J. (2013). Functional endogenous viral elements in the genome of the parasitoid wasp *Cotesia congregata*: Insights into the Evolutionary dynamics of bracoviruses. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 368(1626), 20130047. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0047>
- Bézier, A., Thézé, J., Gavory, F., Gaillard, J., Poulain, J., Drezen, J. M., & Herniou, E. A. (2015). The genome of the nucleopolyhedrosis-causing virus from *Tipula oleracea* sheds new light on the Nudiviridae family. *Journal of Virology*, 89(6), 3008-3025.
- Bigot, Y., Renault, S., Nicolas, J., Moundras, C., Demattei, M. V., Samain, S., ... & Federici, B. A. (2009). Symbiotic virus at the evolutionary intersection of three types of large DNA viruses; iridoviruses, ascoviruses, and ichnoviruses. *PLoS One*, 4(7), e6397.
- Bolger, A. M., Lohse, M. y Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 211-2120. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Boucias, D. G., Zhou, Y., Huang, S. y Keyhani, N. O. (2018). Microbiota in insect fungal pathology. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(14), 5873-5888.
- Branstetter, M.G., Longino, J.T., Ward, P.S. & Faircloth, B.C. (2017) Enriching the ant tree of life: enhanced UCE bait set for genome-scale phylogenetics of ants and other Hymenoptera. *Methods in Ecology and Evolution*, 8, 768–776.

- Burand, J. P., Kim, W., Afonso, C. L., Tulman, E. R., Kutish, G. F., Lu, Z., & Rock, D. L. (2012). Analysis of the genome of the sexually transmitted insect virus *Helicoverpa zea* nudivirus 2. *Viruses*, *4*(1), 28-61.
- Burke, G. R., & Strand, M. R. (2014). Systematic analysis of a wasp parasitism arsenal. *Molecular ecology*, *23*(4), 890-901.
- Burke, G. R., Simmonds, T. J., Sharanowski, B. J., & Geib, S. M. (2018). Rapid viral symbiogenesis via changes in parasitoid wasp genome architecture. *Molecular biology and evolution*, *35*(10), 2463-2474.
- Burke, G. R. (2019). Common themes in three independently derived endogenous nudivirus elements in parasitoid wasps. *Current opinion in insect science*, *32*, 28-35
- Burke, G. R., Hines, H. M., & Sharanowski, B. J. (2021). The presence of ancient core genes reveals endogenization from diverse viral ancestors in parasitoid wasps. *Genome biology and evolution*, *13*(7), 105.
- Campos, D. F. (2001). Lista de los géneros de avispas parasitoides Braconidae (Hymenoptera: Ichneumonoidea) de la región Neotropical. *Biota Colombiana*, *2*(3).
- Clarke, F. (2019). Observacion en Naturalista. <https://www.naturalista.mx/observations/30381091>. Acceso 24 de Septiembre de 2023.
- Capinera, J. (2011). *Insects and wildlife: arthropods and their relationships with wild vertebrate animals*. John Wiley & Sons.
- Cavichioli de Oliveira, N., & Cônsoli, F. L. (2020). Beyond host regulation: changes in gut microbiome of permissive and non-permissive hosts following parasitization by the wasp *Cotesia flavipes*. *FEMS Microbiology Ecology*, *96*(2), fiz206.
- 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.
- Coffman, K. A., & Burke, G. R. (2020). Genomic analysis reveals an exogenous viral symbiont with dual functionality in parasitoid wasps and their hosts. *PLoS Pathogens*, *16*(11), e1009069.
- Coffman, K. A., Harrell, T. C., & Burke, G. R. (2020). A mutualistic poxvirus exhibits convergent evolution with other heritable viruses in parasitoid wasps. *Journal of Virology*, *94*(8), e02059-19.
- Chakrabarti, T., Saha, S., & Sinha, D. (2013). DNA Multiple Sequence Alignment by a Hidden Markov Model and Fuzzy Levenshtein Distance based Genetic Algorithm. *International Journal of Computer Applications*, *73*(16), 26–30. <https://doi.org/10.5120/12826-0206>
- Chamberlain, S. A., & Szöcs, E. (2013). taxize: taxonomic search and retrieval in R. *F1000Research*, *2*.
- Charif, D., & Lobry, J. R. (2007). SeqinR 1.0-2: a contributed package to the R project for statistical computing devoted to biological sequences retrieval and analysis. In *Structural approaches to sequence evolution* (pp. 207-232). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Chen, J., Long, R., Wang, X. L., Liu, B., & Chou, K. C. (2016). dRHP-PseRA: detecting remote homology proteins using profile-based pseudo protein sequence and rank aggregation. *Scientific Reports*, *6*(1), 32333.
- Chen, J., Guo, M., Wang, X., & Liu, B. (2018). A comprehensive review and comparison of different computational methods for protein remote homology detection. *Briefings in bioinformatics*, *19*(2), 231-244.
- Cheng, R. L., Li, X. F., & Zhang, C. X. (2020). Nudivirus remnants in the genomes of arthropods. *Genome biology and evolution*, *12*(5), 578-588.
- Colson, P., De Lamballerie, X., Yutin, N., Asgari, S., Bigot, Y., Bideshi, D. K., Cheng, X. W., Federici, B. A., Van Etten, J. L., Koonin, E. V., La Scola, B., & Raoult, D. (2013). “Megavirales”, a proposed new order for eukaryotic nucleocytoplasmic large DNA viruses. *Archives of Virology*, *158*(12), 2517-2521. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1768-6>

- Coronado-Blanco, J. M. y Zaldívar-Riverón, A. (2014). Biodiversidad de Braconidae (Hymenoptera: Ichneumonoidea) en México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 85, 372-378.
- Current ICTV Taxonomy Release | ICTV. (2022). Ictv.global. <https://ictv.global/taxonomy>
- De Fonzo, V., Aluffi-Pentini, F., & Parisi, V. (2007). Hidden Markov models in bioinformatics. *Current Bioinformatics*, 2(1), 49-61.
- De Lourdes Ramírez-Ahuja, M., Gómez-Govea, M. A., Lugo-Trampe, A., Borrego-Soto, G., Delgado-Enciso, I., Ponce-García, G., Martínez-Fierro, M. L., Ramírez-Valles, E. G., Treviño, V., Flores-Suarez, A. E. y Rodríguez-Sanchez, I. P. (2019). Microbiota of *Telenomus tridentatus* (Platygastridae: Scelionidae): An unwanted parasitoid. *Journal of Applied Entomology*, 143(8), 834–841.
- Desmeules, F. (2021). Observación en naturalista. <https://www.naturalista.mx/observations/83561688>. Acceso 24 de septiembre de 2023.
- Dheilly, N. M., Maure, F., Ravallec, M., Galinier, R., Doyon, J., Duval, D., ... & Mitta, G. (2015). Who is the puppet master? Replication of a parasitic wasp-associated virus correlates with host behaviour manipulation. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1803), 20142773.
- Douglas, A. E. (2015). Multiorganismal insects: diversity and function of resident microorganisms. *Annual review of entomology*, 60, 17-34.
- Drezen, J. M., Gauthier, J., Josse, T., Bézier, A., Herniou, E., & Huguet, E. (2017). Foreign DNA acquisition by invertebrate genomes. *Journal of invertebrate pathology*, 147, 157-168.
- Drezen, J. M., Leobold, M., Bézier, A., Huguet, E., Volkoff, A. N., & Herniou, E. A. (2017). Endogenous viruses of parasitic wasps: variations on a common theme. *Current opinion in virology*, 25, 41-48.
- Drezen, J. M., Bézier, A., Burke, G. R., & Strand, M. R. (2021). Bracoviruses, ichnoviruses, and virus-like particles from parasitoid wasps retain many features of their virus ancestors. *Current opinion in insect science*.
- Duan, R., Xu, H., Gao, S., Gao, Z., & Wang, N. (2020). Effects of different hosts on bacterial communities of parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1435.
- Eaton, D. A., & Ree, R. H. (2013). Inferring phylogeny and introgression using RADseq data: an example from flowering plants (Pedicularis: Orobanchaceae). *Systematic biology*, 62(5), 689-706.
- Eddy, S. R. (1998). Profile hidden Markov models. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 14(9), 755-763.
- Eddy, S. R. (2011). Accelerated profile HMM searches. *PLoS computational biology*, 7(10), e1002195.
- Engel, P., y Moran, N. A. (2013). The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 699–735.
- Escudero, L. (2023). Observación en Naturalista. <https://www.naturalista.mx/observations/184244260>. Acceso 24 de septiembre de 2023.
- Finn, R. D., Clements, J., & Eddy, S. R. (2011). HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic acids research*, 39(suppl_2), W29-W37
- Fredensborg, B. L., Fossdal í Kálvalíð, I., Johannesen, T. B., Stensvold, C. R., Nielsen, H. V., & Kapel, C. M. (2020). Parasites modulate the gut-microbiome in insects: a proof-of-concept study. *PLoS One*, 15(1), e0227561.
- Garavaglia, M. J., Miele, S. A. B., Iserte, J. A., Belaich, M. N., & Ghiringhelli, P. D. (2012). The ac53, ac78, ac101, and ac103 genes are newly discovered core genes in the family Baculoviridae. *Journal of virology*, 86(22), 12069-12079.
- Gauthier, J., Boulain, H., Van Vugt, J. J., Baudry, L., Persyn, E., Aury, J., Noël, B., Bretaudeau, A., Legeai, F., Warris, S., Chebbi, M. A., Dubreuil, G., Duvic, B., Kremer, N., Gayral, P., Musset, K., Josse, T., Bigot, D., Bressac, C., . . . Drezen, J. M. (2021). Chromosomal scale assembly of parasitic wasp genome reveals symbiotic virus colonization. *Communications biology*, 4(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01623-8>
- Gayubo, S. F., y Pujade, J. (2015). Orden Hymenoptera. *Revista IDE@*, 59, p. 1-36.
- Gillott, C. (2005). *Entomology*. Springer Science & Business Media.
- Glenn, T.C., Nilsen, R., Kieran, T.J., Finger, J.W. Jr, Pierson, T.W., Bentley, K.E., Hoffberg, S., Louha, S., García-De León, F.J, del Río Portilla, M.A., Reed, K.D., Anderson, J.L., Meece, J.K., Aggery, S.E.,

- R. Rekaya, R., Alabady M., Belanger M., Winker, K. & Faircloth, B.C. (2016) Adapterama I: universal stubs and primers for thousands of dual-indexed Illumina libraries (iTru and iNext). *PeerJ*, **7**, e7755.
- Gloder, G., Bourne, M. E., Verreth, C., Wilberts, L., Bossaert, S., Crauwels, S., ... & Lievens, B. (2021). Parasitism by endoparasitoid wasps alters the internal but not the external microbiome in host caterpillars. *Animal microbiome*, *3*(1), 1-15
- Godfray, H. C. J. (1994). *Parasitoids: behavioral and evolutionary ecology* (Vol. 67). Princeton University Press.
- Gurung, K., Wertheim, B., & Falcao Salles, J. (2019). The microbiome of pest insects: it is not just bacteria. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, *167*(3), 156-170.
- Gupta, A., & Nair, S. (2020). Dynamics of insect-microbiome interaction influence host and microbial symbiont. *Frontiers in microbiology*, *11*, 1357.
- Harrison, R., & Hoover, K. (2012). Baculoviruses and other occluded insect viruses. *Insect pathology*, *73*-131.
- Harvey, M. G., Smith, B. T., Glenn, T. C., Faircloth, B. C., & Brumfield, R. T. (2016). Sequence Capture versus Restriction Site Associated DNA Sequencing for Shallow Systematics. *Systematic Biology*, *65*(5), 910-924.
- Haworth, A., Savage, H., & Lench, N. (2016). Diagnostic Genomics and Clinical Bioinformatics. *Medical and Health Genomics*, 37-50.
- Holmes, I., & Rabosky, A. R. D. (2018). Natural history bycatch: a pipeline for identifying metagenomic sequences in RADseq data. *PeerJ*, *6*, e4662.
- Hoenle, P. (2022). Observación en naturalista. <https://www.naturalista.mx/observations/137555395>. Acceso 24 de septiembre de 2023.
- Huber, J. T. (2017). Biodiversity of Hymenoptera. En R. G. Foottit y P. H. Adler (Ed.), *Insect biodiversity: science and society* (pp. 419-461). John Wiley & Sons.
- Humala, A. (2019). Observación en naturalista. <https://www.naturalista.mx/observations/36809432>. Acceso 24 de septiembre de 2023.
- Hurst, C. J. (Ed.). (2021). *Studies in viral ecology*. Wiley-Blackwell.
- Islam, S. A., Kearney, C. M., & Baker, E. J. (2018). Assigning biological function using hidden signatures in cystine-stabilized peptide sequences. *Scientific reports*, *8*(1), 9049.
- Iyer, L. M., Aravind, L., & Koonin, E. V. (2001). Common origin of four diverse families of large eukaryotic DNA viruses. *Journal of virology*, *75*(23), 11720-11734.
- Jasso-Martínez, J. M., Quicke, D. L., Belokobylskij, S. A., Santos, B. F., Fernández-Triana, J. L., Kula, R. R., & Zaldívar-Riverón, A. (2022). Mitochondrial phylogenomics and mitogenome organization in the parasitoid wasp family Braconidae (Hymenoptera: Ichneumonoidea). *BMC ecology and evolution*, *22*(1), 1-15.
- Jagdale, S. S., & Joshi, R. S. (2018). Enemies with benefits: mutualistic interactions of viruses with lower eukaryotes. *Archives of virology*, *163*, 821-830).
- Jagdale, S. S., & Joshi, R. S. (2019). Facilitator roles of viruses in enhanced insect resistance to biotic stress. *Current Opinion in Insect Science*, *33*, 111-116.
- Jarzembowski, E. A. (2021). Insects. En D. Alderton y S. A. Elias (Ed.) *Encyclopedia of geology* (pp. 266-272). Academic Press.
- Johnson, N. F. (2013). Hymenoptera. *Encyclopedia of Biodiversity: Second Edition*, *4*, 177-184.
- Kaczmarczyk-Ziemba, A., Zagaja, M., Wagner, G. K., Pietrykowska-Tudruj, E., & Staniec, B. (2020). First insight into microbiome profiles of Myrmecophilous beetles and their host, red wood ant *Formica polyctena* (Hymenoptera: formicidae)—a case study. *Insects*, *11*(2), 134.) (Engel, P., & Moran, N. A. (2013). The gut microbiota of insects—diversity in structure and function. *FEMS microbiology reviews*, *37*(5), 699-735

- Kaltenpoth, M., Göttler, W., Herzner, G., & Strohm, E. (2009). Symbiotic bacteria protect wasp larvae from fungal infestation. *Current Biology*, **15**, 475–479
- Kaltenpoth, M. y Engl, T. (2014). Defensive microbial symbionts in Hymenoptera. *Functional Ecology*, **28**(2), 315–327.
- Katzourakis, A., & Gifford, R. J. (2010). Endogenous viral elements in animal genomes. *PLoS genetics*, **6**(11), e1001191.
- Kikuchi, Y., Hosokawa, T., & Fukatsu, T. (2007). Insect-microbe mutualism without vertical transmission: A stinkbug acquires a beneficial gut symbiont from the environment every generation. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**, 4308–4316
- Lawrence, P. O. (2002). Purification and partial characterization of an entomopoxvirus (DLEPV) from a parasitic wasp of tephritid fruit flies. *Journal of insect science*, **2**(1). <https://doi.org/10.1093/jis/2.1.10>
- Lawrence, P. O. (2005). Morphogenesis and cytopathic effects of the *Diachasmimorpha longicaudata* entomopoxvirus in host haemocytes. *Journal of Insect Physiology*, **51**(2), 221–233.
- Lefkowitz, E.J. (2015). Taxonomy and Classification of Viruses. In *Manual of Clinical Microbiology* (eds J.H. Jorgensen, K.C. Carroll, G. Funke, M.A. Pfaller, M.L. Landry, S.S. Richter, D.W. Warnock, M.L. Landry, A.M. Caliendo, C.C. Ginocchio, Y.-W. Tang and A. Valsamakis
- Legeai, F., Santos, B. F., Robin, S., Bretaudeau, A., Dikow, R. B., Lemaitre, C., Jouan, V., Ravallec, M., Drezen, J., Tagu, D., Baudat, F., Gyapay, G., Zhou, X., Liu, S., Webb, B. A., Brady, S. G., & Volkoff, A. N. (2020). Genomic architecture of endogenous ichnoviruses reveals distinct evolutionary pathways leading to virus domestication in parasitic wasps. *BMC Biology*, **18**(1). <https://doi.org/10.1186/s12915-020-00822-3>
- Lewis, Z., y Lizé, A. (2015). Insect behaviour and the microbiome. *Current Opinion in Insect Science*, **9**, 86–90.
- Naturalista. Disponible en <https://www.naturalist.mx>. Acceso [septiembre, 2023]
- Mardis, E. R. (2013). Next-generation sequencing platforms. *Annual review of analytical chemistry*, **6**, 287–303.
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W. E., Attiya, S., Bader, J. S., Bemben, L. A., Berka, J., Braverman, M., Chen, Y., Chen, Z., Dewell, S., Du, L., Fierro, J., Gomes, X. V., Godwin, B., He, W., Helgesen, S., Ho, C. H., Irzyk, G. P., . . . Rothberg, J. M. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, **437**(7057), 376–380. <https://doi.org/10.1038/nature03959>
- Miller, J. C. (1993). Insect natural history, multi-species interactions and biodiversity in ecosystems. *Biodiversity & Conservation*, **2**(3), 233–241.
- Minh, B. Q., Schmidt, H. A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M. D., Von Haeseler, A., & Lanfear, R. (2020). IQ-TREE 2: new models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Molecular biology and evolution*, **37**(5), 1530–1534.
- Misof, B., Liu, S., Meusemann, K., Peters, R. S., Donath, A., Mayer, C., Frandsen, P. B., Ware, J. L., Flouri, T., Beutel, R. G., Niehuis, O., Petersen, M., Izquierdo-Carrasco, F., Wappler, T., Rust, J., Aberer, A. J., Aspöck, H., Aspöck, H., Bartel, D., . . . Zhou, X. (2014). Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. *Science*, **346**(6210), 763–767. <https://doi.org/10.1126/science.1257570>
- Matthews, R. W. (1974). Biology of Braconidae. *Annual Review of Entomology*, **19**(1), 15–32.
- Mohammed, M. A., Zuki, A. A., Yusof, S., y Yaakop, S. (2015). Isolation and Characterization of *Wolbachia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) from Several Economic Importance Parasitoids (Hymenoptera: Braconidae). *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, **5**(4), 256–263.
- Mönttinen, H. A. M., Bicep, C., Williams, T. A., & Hirt, R. P. (2021). The genomes of nucleocytoplasmic large DNA viruses: viral evolution writ large. *Microbial genomics*, **7**(9). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000649>

- Morgensztern, D., Devarakonda, S., Mitsudomi, T., Maher, C., & Govindan, R. (2018). Mutational events in lung cancer: Present and developing technologies. In *IASLC Thoracic Oncology* (pp. 95-103). Elsevier.
- Moss, B. (2013). Poxvirus DNA replication. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(9), a010199.
- Muller, H., Chebbi, M. A., Bouzar, C., Périquet, G., Fortuna, T. M., Calatayud, P., Rü, B. L., Obonyo, J., Kaiser, L., Drezen, J., Huguet, E., & Gilbert, C. (2021). Genome-Wide patterns of bracovirus chromosomal integration into multiple host tissues during parasitism. *Journal of Virology*, 95(22). <https://doi.org/10.1128/jvi.00684-21>
- Muñoz-Benavent, M., Pérez-Cobas, A. E., García-Ferris, C., Moya, A., & Latorre, A. (2020). Insects' potential: Understanding the functional role of their gut microbiome. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 113787.
- Nedoluzhko, A. V., Sharko, F. S., Tsygankova, S. V., Boulygina, E. S., Sokolov, A. S., Rastorguev, S. M., Kadnikov, V. V., Mardanov, A. V., Ravin, N. V., Mazur, M. A., Polilov, A. A., Gruzdeva, N. M., Prokhortckouk, E. B. y Skryabin, K. G. (2017). Metagenomic analysis of microbial community of a parasitoid wasp *Megaphragma amalphantanum*. *Genomics Data*, 11, 87–88.
- Nieves-Aldrey, J. L., Fontal-Cazalla, F., y Fernández, F. (2006). *Introducción a los Hymenoptera de la Región Neotropical*. Universidad Nacional de Colombia.
- Ovruski, S., Aluja, M., Sivinski, J., & Wharton, R. (2000). Hymenopteran parasitoids on fruit infesting Tephritidae (Diptera) in Latin America and the southern United States: diversity, distribution, taxonomic status and their use in fruit fly biological control. *Integrated Pest Management Reviews*, 5(2), 81-107.
- Pearson, W. R. (2013). An introduction to sequence similarity (“homology”) searching. *Current protocols in bioinformatics*, 42(1), 3-1.
- Peters, R. S., Krogmann, L., Mayer, C., Donath, A., Gunkel, S., Meusemann, K., ... & Niehuis, O. (2017). Evolutionary history of the Hymenoptera. *Current Biology*, 27(7), 1013-1018.
- Quicke, D.L.J., 1989. Further new host records for genera and species of Braconinae (Hym., Braconidae). *Entomol. Mon. Mag.* 125, 199-205.
- Quicke, D.L.J., 1997. Subfamily Braconinae. In: Wharton, R.A., Marsh, P.M. and Sharkey, M.J. (Eds.). *Manual of the New World Genera of the Family Braconidae (Hymenoptera)*. International Society of Hymenopterists, Special Publ. 1, Washington, DC, pp. 149-174.
- Quicke, D. L. J., LeRalec, A., & Vilhelmsen, L. (2000). Ovipositor structure and function in the parasitic Hymenoptera. *Rendiconti*, (47), 197-239
- Quicke, D. L. J. (2015). *The Braconid and Ichneumonid Parasitoid Wasps: Biology, Systematics, Evolution and Ecology*. Wiley Blackwell.
- Raghavendra, P., & Pullaiah, T. (2018). Pathogen identification using novel sequencing methods. *Advances in Cell and Molecular Diagnostics; Academic Press: London, UK*, 161-199.
- Reed, H. C., y Landolt, P. J. (2018). Ants, wasps, and bees (Hymenoptera). En G. R. Mullen y L. A. Durden (Ed.), *Medical and Veterinary Entomology* (pp. 459-488). Elsevier Inc.
- Reid, A. J., Yeats, C., & Orengo, C. A. (2007). Methods of remote homology detection can be combined to increase coverage by 10% in the midnight zone. *Bioinformatics*, 23(18), 2353-2360.
- Resh, V. H., y Cardé, R. T. (Eds.). (2009). *Encyclopedia of insects*. Academic press.
- Reyes, A., Alves, J. M. P., Durham, A. M., & Gruber, A. (2017). Use of profile hidden Markov models in viral discovery: Current insights. *Advances in Genomics and Genetics*, 7, 29-45.
- Rice, P., Longden, I., & Bleasby, A. (2000). EMBOSS: the European molecular biology open software suite. *Trends in genetics*, 16(6), 276-277.
- Riegel, F. (2019). Observación en Naturalista. <https://www.naturalista.mx/observations/26102113>. Acceso 24 de septiembre de 2023.
- Rodríguez, I. A. (2011). Observación en naturalista. <https://www.naturalista.mx/observations/15742862>. Acceso 24 de septiembre de 2023.
- Roossinck, M. J. (2011). The good viruses: viral mutualistic symbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 9(2), 99-108.

- Roossinck, M. J. (2015). Move over, bacteria! Viruses make their mark as mutualistic microbial symbionts. *Journal of Virology*, 89(13), 6532-6535
- Rothberg, J. M., Hinze, W., Rearick, T. M., Schultz, J. H., Mileski, W. J., Davey, M. S., Leamon, J. H., Johnson, K. L., Milgrew, M., Edwards, M., Hoon, J., Simons, J. F., Marran, D. F., Myers, J. W., Davidson, J. F., Branting, A., Nobile, J. R., Puc, B. P., Light, D. R., . . . Bustillo, J. (2011). An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*, 475(7356), 348-352. <https://doi.org/10.1038/nature10242>
- Samacá-Sáenz, E., Egan, S. P., & Zaldívar-Riverón, A. (2020). Species Diversity in the Braconid Wasp Genus *Allorhogas* (Doryctinae) Associated with Cynipid Galls on Live Oaks (*Quercus*: Fagaceae) Using Natural History, Phylogenetics, and Morphology. *Insect Systematics and Diversity*, 4(5), 3.
- Santos, B. F., Klopstein, S., Whitfield, J. B., & Sharanowski, B. J. (2021). Many evolutionary roads led to virus domestication in ichneumonid parasitoid wasps. *Current opinion in insect science*.
- Santos-López, G., Borraz-Argüello, M., & Reyes-Leyva, J. R. (2004). La naturaleza e importancia de los virus. *Elementos (Puebla, Pue.)*, 53, 25–31.
- Schäffer, A. A., Aravind, L., Madden, T. L., Shavirin, S., Spouge, J. L., Wolf, Y. I., & Altschul, S. F. (2001). Improving the accuracy of PSI-BLAST protein database searches with composition-based statistics and other refinements. *Nucleic acids research*, 29(14), 2994-3005.
- Schuster, S. C. (2008). Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nature methods*, 5(1), 16-18.
- Sevgan, S. (2022). Observación en naturalista. <https://www.naturalista.mx/observations/107899601>. Acceso 24 de septiembre de 2023.
- Sharanowski, B. J., Dowling, A. P., & Sharkey, M. J. (2011). Molecular phylogenetics of Braconidae (Hymenoptera: Ichneumonoidea), based on multiple nuclear genes, and implications for classification. *Systematic Entomology*, 36(3), 549-572.
- Sharanowski, B. J., Ridenbaugh, R. D., Piekarski, P. K., Broad, G. R., Burke, G. R., Deans, A. R., Lemmon, A.R., Moriarty, E. C., Diehl, G.J., Whitfield, J. B. y Hines, H. M. (2021). Phylogenomics of Ichneumonoidea (Hymenoptera) and implications for evolution of mode of parasitism and viral endogenization. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 156, 107023.
- Simhadri, R. K., Fast, E. M., Guo, R., Schultz, M. J., Vaisman, N., Ortiz, L., Bybee, J., Slakto, E. y Frydman, H. M. (2017). The gut commensal microbiome of *Drosophila melanogaster* is modified by the endosymbiont *Wolbachia*. *MSphere*, 2(5), e00287-17.
- Simmonds, P., & Aiewsakun, P. (2018). Virus classification—where do you draw the line? *Archives of virology*, 163(8), 2037-2046.
- Smith, M. A., Bertrand, C., Crosby, K., Eveleigh, E. S., Fernandez-Triana, J., Fisher, B. L., Gibbs, J., Hajibabaei, M., Hallwachs, W., Hind, K., Hreck, J., Huang, D., Janda, M., Janzen, D. H., Li, Y., Miller, S. E., Packer, L., Quicke, D., Ratnasingham, S., Rodriguez, J., Rougerie, R., Shaw, M. R., Sheffield, C., Stahlhut, J. K., Steinke, D., Whitfield, J., Wood, M. y Zhou, X. (2012). *Wolbachia* and DNA barcoding insects: Patterns, potential, and problems. *PLoS ONE*, 7(5).
- Strand, M. R., & Burke, G. R. (2013). Polydnavirus-wasp associations: evolution, genome organization, and function. *Current opinion in virology*, 3(5), 587-594.
- Strand, M. R., & Burke, G. R. (2014). Polydnaviruses: nature's genetic engineers. *Annual Review of Virology*, 1, 333-354.
- Suzuki, Y., Truman, J. W., & Riddiford, L. M. (2008). The role of Broad in the development of *Tribolium castaneum*: implications for the evolution of the holometabolous insect pupa. *Development*, 135(3), 569-577.
- Thézé, J., Takatsuka, J., Li, Z., Gallais, J., Doucet, D., Arif, B. M., Nakai, M., & Herniou, E. A. (2013). New insights into the evolution of entomopoxvirinae from the complete genome sequences of four entomopoxviruses infecting adoxophyes *Honmai*, *Choristoneura biennis*, *Choristoneura rosaceana*, and *Mythimna separata*. *Journal of Virology*, 87(14), 7992-8003. <https://doi.org/10.1128/jvi.00453-13>

- Valouev, A., Ichikawa, J. K., Tonthat, T., Stuart, J., Ranade, S., Peckham, H. E., Zeng, K., Malek, J. A., Costa, G. L., McKernan, K., Sidow, A., Fire, A., & Johnson, S. (2008). A high-resolution, nucleosome position map of *C. Elegans* reveals a lack of universal sequence-dictated positioning. *Genome Research*, *18*(7), 1051-1063. <https://doi.org/10.1101/gr.076463.108>
- Van Dijk, E. L., Auger, H., Jaszczyszyn, Y., & Thermes, C. (2014). Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends in genetics*, *30*(9), 418-426.
- Wagner, D. L. (2018). Trends in biodiversity: Insects. En Dellasala, D. A. y Goldstein, M. I. (Ed.) *Encyclopedia of the anthropocene* (pp. 131-143). Elsevier.
- Wang, Y. J., Burand, J. P., & Jehle, J. A. (2007). Nudivirus genomics: diversity and classification. *Virologica Sinica*, *22*(2), 128-136.
- Wang, Z. Z., Liu, Y. Q., SHI, M., Huang, J. H., y Chen, X. X. (2019). Parasitoid wasps as effective biological control agents. *Journal of Integrative Agriculture*, *18*(4), 705-715.
- Wharton, R. A., y Hanson, P. E. (2005). Gall wasps in the family Braconidae (Hymenoptera). En A. Raman, W. C. Schaefer y T. M. Withers (Ed.) *Biology, Ecology, and Evolution of Gall-inducing Arthropods* (pp. 321-383). Science Publishers, Enfield, New Hampshire.
- Whitfield, J. B. (2004). *Ichneumonoidea*. Recuperado de <http://tolweb.org/Ichneumonoidea/11174/2004.06.10>.
- Williams, T., Bergoin, M., & van Oers, M. M. (2017). Diversity of large DNA viruses of invertebrates. *Journal of invertebrate pathology*, *147*, 4-22.
- Wright, B., Farquharson, K. A., McLennan, E. A., Belov, K., Hogg, C. J., & Grueber, C. E. (2019). From reference genomes to population genomics: comparing three reference-aligned reduced-representation sequencing pipelines in two wildlife species. *BMC genomics*, *20*(1), 1-10.
- Wynand U. (2019). Observación en Naturalista. <https://www.naturalista.mx/observations/36934692>. Acceso 24 de septiembre de 2023.
- You, M., Xu, D., Cai, H., & Vasseur, L. (2005). Practical importance for conservation of insect diversity in China. *Biodiversity & Conservation*, *14*(3), 723-737.
- Young, A. D., & Gillung, J. P. (2020). Phylogenomics—principles, opportunities and pitfalls of big-data phylogenetics. *Systematic Entomology*.
- Yousaf, A., Shehzadi, T., Farooq, A., & Ilyas, K. (2021). Protein active site prediction for early drug discovery and designing. *International Review of Applied Sciences and Engineering*, *13*(1), 98-105.
- Yu, D. (2021). Taxapad Ichneumonoidea (version May 2009). In: Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 2016 Annual Checklist (Roskov Y., Abucay L., Orrell T., Nicolson D., Flann C., Bailly N., Kirk P., Bourgoin T., DeWalt R.E., Decock W., De Wever A., eds). Digital resource at www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2016. Species 2000: Naturalis, Leiden, the Netherlands. ISSN 2405-884X.
- Yu, D., Van Achterberg, C., Horstmann, K., (2016). Taxapad 2016. Ichneumonoidea 2015 (Biological and taxonomical information), Taxapad Interactive Catalogue Database on flash-drive. www.taxapad.com. Nepean, Ontario, Canada.
- Yun, J. H., Roh, S. W., Whon, T. W., Jung, M. J., Kim, M. S., Park, D. S., ... & Bae, J. W. (2014). Insect gut bacterial diversity determined by environmental habitat, diet, developmental stage, and phylogeny of host. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(17), 5254-5264
- Zaldívar-Riverón, A., Mori, M., & Quicke, D. L. (2006). Systematics of the cyclostome subfamilies of braconid parasitic wasps (Hymenoptera: Ichneumonoidea): a simultaneous molecular and morphological Bayesian approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *38*(1), 130-145.
- Zeltins, A. (2013). Construction and characterization of virus-like particles: a review. *Molecular biotechnology*, *53*(1), 92-107.
- Zhang, Z., & Wood, W. I. (2003). A profile hidden Markov model for signal peptides generated by HMMER. *Bioinformatics*, *19*(2), 307-308.
- Zhang, Z. Q. (2013). Phylum Arthropoda. *Zootaxa*, *3703*(1): 017–0

- Zhang, Y. M., Williams, J. L., & Lucky, A. (2019). Understanding UCEs: a comprehensive primer on using ultraconserved elements for arthropod phylogenomics. *Insect Systematics and Diversity*, 3(5)
- Zhang J, Yoon K-J, Zimmerman J. Overview of viruses. In: Zimmerman J, Karriker L, Ramirez A, Schwartz K, Stevenson G, Zhang J, editors. *Diseases of Swine*. 11 ed. Hoboken, NJ: Wiley Blackwell (2019). p. 427–37.

Anexo 1. Lista de los nombres de los virus utilizados para la reconstrucción filogenética

Nombre virus	Abreviatura
<i>Cotesia chilonis bracovirus</i>	CcBV
<i>Chelonus inanitus bracovirus</i>	CiBV
<i>Cotesia congregata bracovirus</i>	CcBV
<i>Cotesia vestalis bracovirus</i>	CvBV
<i>Microplitis demolitor bracovirus</i>	MpBV
<i>Phanerotoma sp. Bracovirus</i>	PhBV
<i>Tipula oleracea nudivirus</i>	ToNV
<i>Oryctes rhinoceros nudivirus</i>	OrNV
<i>Helicoverpa zea nudivirus</i>	HzNV
<i>Gryllus bimaculatus nudivirus</i>	GbNV
<i>Drosophila innubila nudivirus</i>	DiNV
<i>Penaeus monodon nudivirus</i>	PnNV
<i>Venturia canescens endogenous nudivirus</i>	VcENV
<i>Fopius arisanus endogenous nudivirus</i>	FaENV
<i>Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus</i>	AcMNPV
<i>Cydia pomonella granulovirus</i>	CpGV
<i>Neodiprion sertifer nucleopolyhedrovirus</i>	NeseNPV
<i>Culex nigripalpus nucleopolyhedrovirus</i>	CuniNPV
<i>Apis mellifera filamentous virus</i>	AmFV
<i>Leptopilina boulardi filamentous virus</i>	LbFV
<i>Leptopilina heterotoma endogenous filamentous virus</i>	LhEFV
<i>Leptopilina clavipes endogenous filamentous virus</i>	LcEFV
<i>Leptopilina boulardi endogenous filamentous virus</i>	LbEFV
<i>Cotesia vestalis endogenous filamentous virus</i>	CvEFV
<i>Glossina pallidipes salivary gland hypertrophy virus</i>	GpSGHV
<i>Musca domestica salivary gland hypertrophy virus</i>	MdSGHV
<i>Human alphaherpesvirus-3</i>	HHV-3
<i>Heliothis virescens ascovirus</i>	HvAV-3e
<i>Lymphocystis disease virus</i>	LDV1
<i>Paramecium bursaria Chlorella virus</i>	PbCV1
<i>Invertebrate iridescent virus</i>	IIV-6
<i>Acanthamoeba polyphaga mimivirus</i>	ApMV
<i>Vaccinia virus</i>	VACV
<i>Amsacta moorei entomopoxvirus</i>	AMEV
<i>Melanoplus sanguinipes entomopoxvirus</i>	MSEV
<i>White spot syndrome virus</i>	WSSV
<i>Chionoecetes opilio bacilliform virus</i>	CoBV
<i>Dolichomitus sp</i>	