



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**INSTITUTO DE ECOLOGÍA**

**BIOLOGÍA EVOLUTIVA**

**Ecología evolutiva de la interacción tritrófica *Datura stramonium-***

***Lema daturaphila*-parasitoides**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:**

**BIÓL. CAROL ESTEFANÍA VILLANUEVA HERNÁNDEZ**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JUAN SERVANDO NÚÑEZ FARFÁN**  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DR. CARLOS RAFAEL CORDERO MACEDO**  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

**DR. FRANCISCO ARMENDÁRIZ TOLEDANO**  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.**

**Julio, 2022**



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.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ENTIDAD INSTITUTO DE ECOLOGÍA

OFICIO CPCB/575/2022

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que, que el Comité Académico, del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su reunión ordinaria del día 04 de abril de 2022, aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Evolutiva** de la alumna **VILLANUEVA HERNÁNDEZ CAROL ESTEFANÍA**, con número de cuenta: **313068504** con la tesis titulada: **“ECOLOGÍA EVOLUTIVA DE LA INTERACCIÓN TRITRÓFICA DATURA STRAMONIUM-LEMA DATURAPHILA-PARASITOIDES”**, bajo la dirección del **DR. JUAN SERVANDO NÚÑEZ FARFÁN**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. ALBERTO KEN OYAMA NAKAGAWA  
Vocal: DRA. MARISOL DE LA MORA CUIEL  
Secretario: DR. FRANCISCO ARMEDÁRIZ TOLEDANO  
Vocal: DRA. EK DEL VAL DE GORTARI  
Vocal: DRA. KARINA BOEGE PARÉ

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

**ATENTAMENTE**  
**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 15 de junio de 2022

**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**



## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme la oportunidad de seguir creciendo profesionalmente.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría (Beca # 762512).

Al Proyecto PAPIIT IN216620: "Evolución de la defensa química de las plantas cuando sus herbívoros están ausentes", que financió esta investigación.

A mi tutor principal, Dr. Juan Núñez Farfán, por su apoyo y orientación en el transcurso de todo este proyecto.

A los miembros de mi comité tutor, Dr. Carlos Rafael Cordero Macedo y Dr. Francisco Armendáriz Toledano, por su asesoría, comentarios y sugerencias en el desarrollo de mi proyecto.

## **AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL**

Mamá y papá, muchas gracias por su apoyo incondicional durante estos años. Gracias por su comprensión, su tiempo, sus pláticas y sus abrazos reconfortantes en mis días malos. Gracias por ponerme el lunch, por esperarme e ir por mí, por acompañarme a buscar bichos y por cuidarme y apoyarme con todas mis decisiones, entre miles de cosas más. Ya sé que a veces les asusta el camino que estoy tomando (y a mí también), pero les prometo que llegarán las recompensas. Los amo infinitamente y como siempre, todos mis logros son sus logros (¡este es uno de ellos!).

Dr. Juan Núñez Farfán, muchas gracias por confiar en mis ideas. Me siento muy afortunada de formarme como ecóloga bajo su enseñanza y supervisión. Gracias por compartir conmigo el asombro ante los bichos, por bajar la velocidad cuando estoy tomando fotografías y por sus enseñanzas académicas y no académicas. ¡Muchas gracias por todo!

Dr. Carlos Cordero y Dr. Francisco Armendáriz, muchas gracias por su tiempo, su disposición y las sugerencias que ayudaron a mejorar este trabajo. A los miembros de mi Comité Jurado: Dr. Ken Oyama, Dra. Marisol de la Mora, Dr. Francisco Armendáriz, Dra. Ek del Val y Dra. Karina Boege, muchísimas gracias por sus revisiones, me hicieron pensar, cuestionarme muchas cosas y por supuesto, ayudaron a mejorar este trabajo.

Dra. Sabina Velázquez Márquez, muchísimas gracias por todo tu apoyo en el laboratorio, por tenerme paciencia, por enseñarme todas las técnicas que debía saber, por todo el tiempo que invertiste conmigo tratando de sacarle el ADN a mis microavispa, por el apoyo con mis plantas, las salidas de campo y los VOCs. Pero más importante, muchas gracias Sabi por tu amistad. En estos tiempos horribles de pandemia y experimentos fallidos, tu amistad fue una luz en el laboratorio jaja. Te quiero mucho y deseo que te pasen las mejores cosas del universo.

Dra. Rosalinda Tapia, muchas gracias por todo el apoyo logístico, técnico y moral en el laboratorio.

Dr. Juan Vázquez Martínez, muchísimas gracias por recibirme en su laboratorio y por todo el apoyo que me brindó con el préstamo y uso del GC-MS. Sin su ayuda no se hubiera logrado una buena parte de esta tesis.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Genética Ecológica y Evolución del Instituto de Ecología de la UNAM. De una u otra forma me ayudaron en el transcurso de la maestría, o me sacaron unas buenas risas xD. Gracias Pao, Franco, Dani, John, Lau y Sandra. Gracias a Jaime Solis, por todo el apoyo y el

tiempo que nos brindó a mí y a mis *Lemas*. A todos los profes (y no profes) que suben sus videos a YouTube y que nos ayudan a los estudiantes desesperados.

A mis hermanitos, Juan y Gera, que quiero mucho.

A mis hermosos perritos, Lucke y Balo, por contagiarme su felicidad, ser mis compañeros y darme ganas de vivir cuando ya no quiero nada.

A todas las personas que compartieron este camino conmigo, que me apoyaron y de las que aprendí tanto.

“Last but not least, I wanna thank ME. I wanna thank me for believing in me, I wanna thank me for doing all this hard work, I wanna thank me for having no days off, I wanna thank me, for never quitting. I wanna thank me for always being a giver and tryna to give more than I receive. I wanna thank me for trying to do more right than wrong,

I wanna thank me for just being me at all times.”

-Snoop Dogg.

Estudiar la maestría fue un reto académico. Pero estudiar la maestría en pandemia fue todo un reto personal. Fueron tiempos oscuros y difíciles de incertidumbre. Llegué al agotamiento físico y mental en muchas ocasiones e incluso llegué a pensar que este momento nunca iba a llegar. En estos dos años y medio, esta atmósfera agobiante me llevó a reflexionar mucho sobre mí y mi autoconocimiento. Por eso mismo, valoro mucho mi esfuerzo, todo lo que aprendí y mis ganas de seguir adelante. Sobre todo, valoro las “cosas” que me inundaron de felicidad y que me hicieron tener más confianza en mí:

- Las aves, por ser hermosas. Amo la libertad y seguridad que me dieron para ir sola al bosque. Verlas me hace sentir viva y ojalá el *birding* esté siempre en mi vida, que a mi *life list* todavía le faltan muchas especies por añadir.
- Mi proyecto, Bio-divulgación, que creció justo en tiempos de pandemia. Me hace feliz compartir todo lo que sé y me llena de retos cada vez que comparto algo nuevo.
- Keane, por hacer música hermosa que me acompañó en los momentos solitarios y más difíciles durante la elaboración de esta tesis.
- La fotografía, el yoga, el running, que siempre me permiten descubrirme, me imponen retos y me hacen feliz en todo momento.

En fin, sin todos ustedes y sin mí misma, esta investigación no se hubiera logrado.

**Ecología evolutiva de la interacción tritrófica *Datura stramonium*-*Lema daturaphila*-parasitoides**

*“I need a place that’s hidden in the deep,  
where lonely angels sing you to your sleep,  
though all the world is broken”*

Atlantic, Keane.

*“I don’t know what my future holds,  
but I expected to have all the options”*

Anne with an E.



## ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
I. INTRODUCCIÓN.....	3
<b>La interacción tritrófica.....</b>	<b>3</b>
<b>Variación genética a nivel geográfico en la interacción tritrófica: parasitoides .....</b>	<b>5</b>
<b>Interacción <i>Datura stramonium</i>-<i>Lema daturaphila</i>-parasitoides.....</b>	<b>7</b>
II. PLANTEAMIENTO DE LA PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	7
III. HIPÓTESIS.....	8
IV. OBJETIVOS .....	9
V. MÉTODOS .....	9
<b>Sistema de estudio .....</b>	<b>9</b>
<b>Área de estudio .....</b>	<b>11</b>
<b>Experimento de colecta de volátiles.....</b>	<b>12</b>
<b>Análisis genéticos de <i>Emersonella lemae</i> .....</b>	<b>16</b>
VI. RESULTADOS .....	20
<b>Experimento de colecta de volátiles.....</b>	<b>20</b>
<b>Análisis genéticos de <i>Emersonella lemae</i> .....</b>	<b>25</b>
VII. DISCUSIÓN.....	33
<b>Interacción <i>Datura stramonium</i>-<i>Lema daturaphila</i>: volátiles .....</b>	<b>33</b>
<b>Variación genética a nivel geográfico en <i>Emersonella lemae</i> .....</b>	<b>39</b>
VIII. CONCLUSIONES .....	45
IX. REFERENCIAS.....	46
X. ANEXOS.....	64

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Ubicación geográfica y características climáticas de las poblaciones muestreadas de <i>Lema daturaphila</i> . ((P) Precipitación anual, (T) Temperatura media anual. Sistema Metereológico Nacional, 2021). .....	16
<b>Cuadro 2.</b> Índice de diversidad de Shannon ( $H$ ) para los volátiles por tratamiento. ....	21
<b>Cuadro 3.</b> ANOVAs para el área relativa bajo la curva de cada tratamiento en función de los compuestos ( $*p < 0.05$ , $**p < 0.01$ , $***p < 0.001$ ). .....	22
<b>Cuadro 4.</b> ANCOVA del área bajo la curva para cada compuesto de <i>Datura stramonium</i> , utilizando como covariable el tiempo de inyección. ....	23
<b>Cuadro 5.</b> Diversidad genética obtenida con Cyt- <i>b</i> y COI en diferentes poblaciones de <i>Emersonella lemae</i> de México: Población, número de individuos analizados ( $n$ ), sitios segregantes ( $S$ ), diversidad nucleotídica ( $\pi$ ), número de haplotipos ( $h$ ), diversidad haplotípica ( $H_d$ ) e índice de diversidad theta ( $\theta$ ). La última fila muestra los valores totales. ....	25
<b>Cuadro 6.</b> Análisis de varianza molecular (AMOVA) para las diferentes poblaciones de <i>Emersonella lemae</i> del centro de México, usando DNA mitocondrial. Para Cyt- <i>b</i> se evaluaron 3 (Valsequillo-Toluca-Centro) y 4 grupos (Valsequillo-Toluca-Tlaxiaca-Centro). Con COI se evaluaron 2 grupos (Valsequillo-Centro). *Valores estadísticamente significativos. ....	30
<b>Cuadro 7.</b> Compuestos orgánicos volátiles de un mismo genotipo de <i>Datura stramonium</i> : fórmula, grupo químico y tiempo de retención (RT). Se muestran algunas de las plantas donde se han detectado y su función en diferentes sistemas biológicos como atrayentes de: herbívoros ( <b>h</b> ), parasitoides ( <b>p</b> ) o depredadores ( <b>d</b> ). Se incluye la referencia de dichas investigaciones. ....	34

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Sistema tritrófico de estudio. Flor (a), fruto (b) e individuo (c) de <i>Datura stramonium</i> . Huevos (d), larvas (e) y adultos (f) de <i>Lema daturaphila</i> . Adulto de <i>Emersonella lemae</i> (g), hembra de <i>E. lemae</i> ovipositando en huevos de <i>L. daturaphila</i> (h) y mosca Tachinidae junto a larva de <i>L. daturaphila</i> (i). 10	
<b>Figura 2.</b> Poblaciones muestreadas de <i>Emersonella lemae</i> . En amarillo, la población de Valsequillo, Puebla, de donde también se seleccionaron las semillas de <i>Datura stramonium</i> . ....	11
<b>Figura 3.</b> Compuestos orgánicos volátiles emitidos por <i>D. stramonium</i> . ....	20
<b>Figura 4.</b> Semi cuantificación de los seis compuestos orgánicos volátiles de <i>Datura stramonium</i> bajo diferentes tratamientos de herbivoría (valores transformados con la función logaritmo natural). Tratamientos: Adultos de <i>L. daturahila</i> ( <b>ALD</b> ), Control sin daño ( <b>CSD</b> ), Daño Artificial ( <b>DA</b> ), Daño artificial + OS ( <b>DOS</b> ), Huevos de <i>L. daturaphila</i> ( <b>HLD</b> ), Herbivoría de especialistas + generalistas ( <b>HSG</b> ), Larvas de <i>L. daturaphila</i> ( <b>LLD</b> ) y <i>S. purpurascens</i> ( <b>SP</b> ). ....	21
<b>Figura 5.</b> Semi cuantificación de los diferentes compuestos volátiles de <i>Datura stramonium</i> en cada tratamiento de herbivoría (valores transformados con la función logaritmo natural). Tratamientos: Adultos de <i>L. daturahila</i> ( <b>ALD</b> ), Daño artificial + OS ( <b>DOS</b> ), Larvas de <i>L. daturaphila</i> ( <b>LLD</b> ), Control	

sin daño ( <b>CSD</b> ), Huevos de <i>L. daturaphila</i> ( <b>HLD</b> ), <i>S. purpurascens</i> ( <b>SP</b> ), Daño Artificial ( <b>DA</b> ), Herbivoría de especialistas + generalistas ( <b>HSG</b> ) y el <b>TOTAL</b> de tratamientos.....	24
<b>Figura 6.</b> (A) Red de haplotipos por <i>median-joining</i> para <i>Emersonella lemae</i> (Cyt- <i>b</i> ), el tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia del haplotipo. Los haplotipos A y B (en blanco) pertenecen a <i>E. pubipennis</i> . (B) Distribución geográfica y frecuencia de los haplotipos de Cyt- <i>b</i> en cada población, junto a cada círculo se indica el tamaño de muestra. ....	26
<b>Figura 7.</b> (A) Red de haplotipos por <i>median-joining</i> para <i>Emersonella lemae</i> (COI), el tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia del haplotipo. El haplotipo “E” pertenece a <i>E. lemae</i> de Costa Rica. (B) Distribución geográfica y frecuencia de los haplotipos de COI en cada población, junto a cada círculo se indica el tamaño de muestra. ....	28
<b>Figura 8.</b> Mapas de calor de los valores de diferenciación genética ( $F_{ST}$ ) calculados entre pares de poblaciones de <i>E. lemae</i> , utilizando los genes mitocondriales Cyt- <i>b</i> (A) y COI (B). El * indica un valor estadísticamente significativo ( $p=0.05$ ). ....	29
<b>Figura 9.</b> Árbol consenso derivado de un análisis Bayesiano de 30 millones de generaciones a partir de una matriz concatenada con los genes (Cyt- <i>b</i> y COI). Los valores de probabilidad posterior se muestran en cada nodo. También se muestran los haplotipos para cada individuo y las poblaciones que lo comparten.....	31
<b>Figura 10.</b> Gráfico de <i>Skyline</i> bayesiano representando la historia demográfica de <i>Emersonella lemae</i> con ambos genes mitocondriales.....	32
<b>Figura 11.</b> Mapa topográfico con las ubicaciones de las poblaciones de <i>Emersonella lemae</i> . Se muestran las curvas de nivel correspondientes a diferentes altitudes y se indica la ubicación de la Sierra Nevada (A), la Sierra del Ajusco-Chichinauhtzin (B), el Nevado de Toluca (C) y las montañas del límite Estado de México-Michoacán (D). ....	43

## RESUMEN

Los parasitoides son clave para entender la complejidad ecológica y evolutiva de la interacción antagonista planta-herbívoro. La hierba anual *Datura stramonium* varía geográficamente en sus defensas directas contra herbívoros. Su herbívoro especialista, *Lema daturaphila*, está adaptado a dichas defensas, y es a su vez hospedero de diferentes especies parasitoides que reducen drásticamente sus poblaciones. El objetivo de este trabajo fue determinar el rol ecológico y evolutivo de los parasitoides en esta interacción. Para ello se utilizaron dos aproximaciones diferentes: el análisis de la emisión de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) por *D. stramonium* como un mecanismo de defensa indirecta para atraer parasitoides; y el análisis la estructura filogeográfica de *Emersonella lemae*, parasitoide de los huevos de *L. daturaphila* y causante de una alta mortalidad en sus poblaciones. La producción de VOCs se determinó en plantas de un mismo genotipo de *D. stramonium*, asignadas a diferentes tratamientos que alternaron el tipo y estado de desarrollo de los herbívoros. Por otra parte, se amplificaron dos marcadores mitocondriales (*Cyt-b* y *COI*) en individuos de *E. lemae* de doce poblaciones del Centro de México. Se identificaron 6 VOCs, importantes como atrayentes de parasitoides y depredadores en otros sistemas tritróficos. Se detectaron diferencias cualitativas entre los tratamientos en el emisión de VOCs; no hubo diferencias cuantitativas. Todos los VOCs liberados por *D. stramonium* tienen un papel potencial en la atracción de los parasitoides de *L. daturaphila*. Por otra parte, las poblaciones de *E. lemae* poseen una alta diversidad genética y haplotipos únicos en cada localidad. Los análisis de estructura genética separaron a la población de Valsequillo y Toluca del resto de las poblaciones. Un patrón filogeográfico similar ha sido reportado para su insecto huésped *L. daturaphila*, y se relaciona con las principales barreras geográficas del Centro de México, que limitan el flujo génico entre las poblaciones. En conjunto, estos resultados nos permiten conocer de qué manera interactúan los tres niveles tróficos y señalan las vías de estudio de las defensas indirectas de *D. stramonium* y la variación genética de los parasitoides de su principal herbívoro (en específico, *E. lemae*).

## ABSTRACT

Parasitoid insects are key to understanding the ecological and evolutionary complexity of the antagonistic plant-herbivore interactions. The annual herb *Datura stramonium* varies geographically in the extent of its direct defenses against herbivores. Its main, specialist, herbivore, *Lema daturaphila*, is adapted to cope with these defenses and, in turn, is the host of different parasitoid species that drastically decimate *L. daturaphila* populations. This study aimed to determine the ecological and evolutionary roles of parasitoids in this interaction. For this, two different approaches were used followed: First, the analysis of volatile organic compounds (VOCs) emission by *D. stramonium*'s plants, as an indirect defense mechanism to attract parasitoids. Second, the analysis of the phylogeographic structure of *Emersonella lemae*, parasitoid of *L. daturaphila*'s eggs, an antagonist that causes a high mortality in *L. daturaphila* populations. VOCs production was determined in plants of a single genotype of *D. stramonium*, assigned to different treatments varying in the type and stage of development of herbivores. On the other hand, variation at two mitochondrial markers (Cyt-b and COI) was screened in individuals of *E. lemae* from twelve populations in Central Mexico. Six VOCs were identified as important attractants for parasitoids and predators, like in other tritrophic systems. There were qualitative, but quantitative, differences between treatments in VOCs emission. All volatiles emitted by *D. stramonium*'s plants have a potential role in attracting parasitoids of *L. daturaphila*. Further, *E. lemae* populations possess high genetic diversity and exclusive haplotypes in each locality. Genetic structure analyzes revealed that populations of Valsequillo and Toluca diverge from all other the populations. A similar phylogeographic pattern has already been reported for its insect host *L. daturaphila* and are likely related to the main geographic barriers in Central Mexico, restricting gene flow among populations. Altogether, results shed light on how the three trophic levels interact and point further research avenues in the study of indirect defenses of *D. stramonium* and the genetic variation of parasitoids of its main herbivore (specifically, *E. lemae*).

## I. INTRODUCCIÓN

El tercer nivel trófico es un componente esencial en la “carrera armamentista” entre plantas e insectos (Price *et al.*, 1980). Los enemigos naturales de los insectos herbívoros han sido un elemento clave para entender la complejidad ecológica y evolutiva de esta interacción antagonista. Hoy se sabe que los tres niveles tróficos están conectados y que debido a las fuerzas ascendentes (los niveles tróficos inferiores afectan a los superiores, p.ej., por restricción de recursos) y descendentes (los niveles tróficos superiores influyen sobre los inferiores, p.ej., por depredación), se imponen presiones selectivas mutuas entre sí (Ode, 2006; Stam *et al.*, 2014; Wilkinson y Sherrat, 2016; Li *et al.*, 2020).

### La interacción tritrófica

La evolución de los mecanismos de defensa por parte de las plantas es el punto de unión entre los tres niveles tróficos (Ehrlich y Raven, 1964; Futuyma y Agrawal, 2009). Las plantas pueden percibir a sus herbívoros e iniciar una respuesta defensiva incluso desde el momento en que los insectos caminan sobre sus tejidos, cuando ovipositan o cuando se alimentan de ellas (Hall *et al.*, 2004; Turlings y Erb, 2018). Esta detección, dispara la inducción de respuestas que las hacen menos vulnerables o eliminan a los insectos herbívoros (Alijborg y Chen, 2018).

Las respuestas de las plantas incluyen defensas directas e indirectas. Las primeras involucran los mecanismos endógenos que utiliza la planta para enfrentar el ataque de los insectos, como la formación de neoplasmas (crecimiento de células no diferenciadas similar a un tumor), tricomas o metabolitos especializados (Petzold-Maxwell *et al.*, 2011; Hilker y Fatouros, 2015; Alijborg y Chen, 2018). Las defensas indirectas, por otro lado, involucran atributos que generan la atracción del tercer nivel trófico para enfrentarse a los herbívoros (Turlings y Erb, 2018).

Los principales enemigos naturales y agentes de mortalidad de los insectos herbívoros son los parasitoides (Hawkins *et al.*, 1997). El ciclo de vida de un parasitoide se caracteriza porque en sus estados inmaduros se alimenta, crece y se desarrolla sobre o dentro del cuerpo de otro artrópodo, usualmente un insecto (Godfray, 1994; Hare y Weseloh, 2009). Su crecimiento produce la muerte de su huésped, por lo que son muy importantes en la regulación de las poblaciones naturales de insectos herbívoros (Clarke *et al.*, 2019).

Los parasitoides pertenecen principalmente a los órdenes Diptera e Hymenoptera y aunque son altamente diversos, todos tienen en común la búsqueda de su huésped (Mills, 2009; Colazza y Wajnberg,

2013). Las hembras parasitoides utilizan señales químicas y visuales que les ayudan a orientarse en una compleja red de interacciones (Dindo y Nakamura, 2018). En el proceso inicial de búsqueda, destaca la detección de las “llamadas de ayuda” que emiten las plantas para atraer a los enemigos naturales de sus herbívoros (Kessler y Baldwin, 2001; Hare y Sun, 2011a). De esta forma se establece una conexión entre la búsqueda de huésped de los parasitoides y las defensas indirectas de las plantas.

La liberación de compuestos químicos volátiles atrayentes de los llamados guardaespaldas o “*bodyguards*”, como los parasitoides, se ha documentado en al menos 49 especies de plantas pertenecientes a 25 familias (Mumm y Dicke, 2010); aunque se espera que sea un fenómeno mucho más extendido. Las mezclas de volátiles pueden integrarse por más de 200 compuestos diferentes, entre los que destacan los terpenoides, los derivados de ácidos grasos y los benzenoides (Mumm y Dicke, 2010). En particular, las señales químicas (p.ej. volátiles) que resulten de la interacción entre planta y herbívoros serán las más relevantes para la detección del huésped por el parasitoide y, por tanto, las que promuevan el control *top-down* de los insectos herbívoros (Rowell-Rahier y Pasteels, 1992; Kessler y Heil, 2011).

Estos volátiles generalmente se desencadenan a partir de la detección de compuestos específicos (en inglés, *elicitor*: molécula que provoca una respuesta bioquímica asociada con la expresión de defensas en las plantas), que pueden estar presentes ya sea en las secreciones orales (OS) de los insectos herbívoros, en las secreciones asociadas a sus huevos o en el oviducto de las hembras (Benhamou, 1996; Hilker *et al.*, 2005; Hilker y Fatouros, 2015; Turlings y Erb, 2018). La especificidad de los volátiles que libere la planta dependerá del tipo de estímulo que detecte. De manera general, los volátiles se pueden dividir en HIPVs (*herbivore-induced plant volatiles*), si se producen en respuesta al daño tisular; o en OIPVs (*oviposition-induced plant volatiles*), si se producen en respuesta a la oviposición de los insectos (Hilker y Fatouros, 2015; Ode, 2013).

Por tanto, los *elicitores* promueven que las plantas respondan específicamente al daño por herbívoros y lo distinguan de otro tipo de daños (Paré y Tumlinson, 1999). Algunos de estos compuestos se han identificado como enzimas o derivados de ácidos grasos y se han asociado con la vía metabólica de los octadecanoides, que está involucrada en la defensa de las plantas (Alborn *et al.*, 1997; Neveu *et al.*, 2002; Hilker y Fatouros, 2015). Con daño mecánico, pero sin la presencia de *elicitores*, las plantas no emiten volátiles atrayentes de parasitoides (Neveu *et al.*, 2002; Alborn *et al.*, 1997).

También, se sabe que la especificidad de la señal que emiten las plantas depende ampliamente de la detección de estos *elicitores*. Por ejemplo, algunos parasitoides de huevos sólo responden a los OIPVs

y no a los volátiles emitidos después de recibir daño por herbívoros (Fatouros *et al.*, 2008). Por lo que a partir de los *elicitores*, las emisiones de volátiles pueden diferir tanto en su abundancia como en su composición y pueden ser tan específicas que incluso informen sobre la cantidad, el tipo y la edad de los herbívoros que están atacando (Hilker *et al.*, 2005; Fatouros *et al.*, 2008; de Boer *et al.*, 2008; Hilker y Fatouros, 2015).

En consecuencia, la información que proporcionan los volátiles afecta notoriamente a los niveles superiores (Vet, 2001). Está bien demostrado que factores como la genética de la planta influyen sobre la comunidad de artrópodos y las interacciones que se establecen sobre ella (Dungey *et al.*, 2000; Mooney y Agrawal, 2008). Los mosaicos de volátiles determinan de muchas maneras el comportamiento de los parasitoides. En específico, influyen directamente sobre su movimiento y, por tanto, pueden afectar la complejidad estructural, la fragmentación y la conectividad de las poblaciones de parasitoides (Aartsma *et al.*, 2017). De esta forma, la eficiencia de búsqueda de los parasitoides a partir de los compuestos volátiles, puede ser una manera de enlazar su comportamiento y sus procesos poblacionales (Vet, 2001).

### **Variación genética a nivel geográfico en la interacción tritrófica: parasitoides**

La historia evolutiva de una interacción tritrófica no estaría completa sin considerar la variación genética de las especies que interactúan. A largo plazo, una interacción donde las especies se imponen presiones selectivas constantemente entre sí, puede dar origen a un proceso coevolutivo (Ehrlich y Raven; 1964; Eaton, 2008; Dicke, 2008; Futuyma, 2009). Bajo este escenario, parte de la variación genética presente en las especies puede asociarse a los factores biológicos propios de la interacción (Whitham *et al.*, 2003), pero también a la heterogeneidad geográfica que enfrentan sus diferentes poblaciones (Craig *et al.*, 2007).

Los factores ambientales, la variación en los rasgos bajo selección o la ausencia de alguna de las especies en una población, pueden promover que incluso en distancias geográficas cortas, existan presiones selectivas distintas, generando un mosaico geográfico coevolutivo (Thompson, 2005; Moreira *et al.*, 2015). De esta forma, las comunidades compuestas de las mismas especies podrán tener poblaciones genéticamente diferenciadas de otras y adaptadas a las poblaciones locales de las otras especies en su comunidad (Craig *et al.*, 2007).

A nivel geográfico, los insectos parasitoides están limitados a los lugares donde se encuentra su huésped (Couchoux *et al.*, 2016). Algunos de ellos pueden seguir y sincronizar la migración con los insectos que parasitan (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2015). Sin embargo, la especificidad parasitoide-huésped

no siempre es un buen indicador de la estructura genética del parasitoide y no garantiza que ambos muestren historias evolutivas concordantes (Jourdie *et al.*, 2010a; Sutton *et al.*, 2016). De hecho, los patrones de estructuración genética de los parasitoides pueden ser muy distintos según sus habilidades de dispersión y colonización, su tamaño poblacional e historia de vida (Kankare *et al.*, 2005; Elzinga *et al.* 2007; Nair *et al.* 2016).

La diferenciación genética del parasitoide puede incrementarse con la reducción de su densidad y tamaño efectivo poblacional. Esto, junto con variaciones en las dinámicas poblacionales del huésped, puede generar pérdida de su variación genética y un mayor riesgo de extinción local (Lynch *et al.*, 1995; Nair *et al.*, 2016). Por el contrario, las poblaciones grandes de parasitoides tienden a ser más diversas y a tener mayor número de individuos dispersores (Elzinga *et al.*, 2007). De esta forma, las poblaciones de las especies que interactúan pueden seguir trayectorias evolutivas distintas si siguen patrones de flujo génico diferentes (Althoff y Thompson, 1999).

Cuando el huésped es migratorio existe una mayor riqueza y homogeneidad genética en sus poblaciones, en comparación con los parasitoides (Wei *et al.*, 2017). Pero también se han encontrado parasitoides altamente móviles que se dispersan grandes distancias, escapando de las dinámicas locales de su huésped (Kankare *et al.*, 2005; Couchoux *et al.*, 2016; Sutton *et al.*, 2016). Estos hallazgos son particularmente interesantes porque muchos se han realizado con himenópteros pequeños. Dichas microavispa se han encontrado a grandes alturas y con ayuda del viento pueden dispersarse varios kilómetros desde su parche de origen (Glick, 1939; Freeman, 1945; Jourdie *et al.*, 2010a).

Una buena capacidad de dispersión de los parasitoides puede promover que estén presentes en la mayoría de las poblaciones del huésped, sin importar su tamaño, si están aisladas o si colonizaron de manera reciente (Elzinga *et al.* 2007; Jourdie *et al.*, 2010a; Kankare *et al.*, 2005). La búsqueda de recursos es otro factor que fomenta su dispersión. En un paisaje fragmentado, los niveles tróficos superiores tienden a moverse a mayor escala debido a que los recursos están distribuidos heterogéneamente, produciendo una estructuración genética más débil (Nair *et al.*, 2016).

En otros casos, la diferenciación poblacional puede atribuirse sólo a factores geográficos, como la distancia o barreras formadas por el hábitat (Althoff, 2008; Seyahoei *et al.*, 2011). Por tanto, conocer la estructuración y diversidad genética entre poblaciones de parasitoides, puede proveer nuevas formas de conocer el proceso ecológico y evolutivo que gobierna sus interacciones con otras especies (Wei *et*

*al.*, 2017). Asimismo, nos puede ayudar a entender cómo las fuerzas evolutivas moldean la coevolución de rasgos a través del paisaje (Sutton *et al.*, 2016).

### **Interacción *Datura stramonium*-*Lema daturaphila*-parasitoides**

*Datura stramonium* es una hierba que se distribuye ampliamente en el centro de México, donde coexiste con una comunidad de herbívoros diversa (Cabrales, 1991). La relación de esta planta con sus herbívoros se ha abordado con énfasis en sus defensas directas. A nivel poblacional, *D. stramonium* muestra variación en la densidad de tricomas foliares y en la concentración de alcaloides. Estas defensas son más efectivas contra herbívoros generalistas (Castillo *et al.*, 2013; Castillo *et al.*, 2014).

Debido a que en *D. stramonium* se ha encontrado una relación positiva entre la concentración de atropina, la densidad de tricomas y el daño foliar ocasionado por sus herbívoros especialistas (*Lema daturaphila* y *Epitrix parvula*), se ha sugerido que estos insectos están adaptados a las defensas de la planta (Castillo *et al.*, 2013) y que incluso, algunos alcaloides podrían funcionar como fagoestimulantes para estos herbívoros (Shonle y Bergelson, 2000). Sin embargo, se conoce muy poco sobre las defensas indirectas de *D. stramonium* y el papel de los enemigos naturales de sus herbívoros en la interacción.

En el centro de México, *L. daturaphila* es el principal herbívoro de *D. stramonium*. Este crisomélido es huésped de seis diferentes especies de parasitoides. Sus huevos son atacados por microavispa de la especie *Emersonella lemae* y sus larvas son hospederas de moscas de la familia Tachinidae y de avispa de la familia Ichneumonidae. En algunas poblaciones de *D. stramonium*-*L. daturaphila*, el parasitoidismo es tan alto que produce una mortalidad del 100% de los huevos y más del 60% de las larvas de *L. daturaphila* (Villanueva-Hernández, 2019). Además, la presencia de los parasitoides no es homogénea, sino que su composición y abundancia varían entre poblaciones (Villanueva-Hernández, 2019).

## **II. PLANTEAMIENTO DE LA PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

*Lema daturaphila* constituye un agente selectivo para *D. stramonium* (De-la-Cruz *et al.*, 2020), debido a que es su principal herbívoro y reduce el éxito reproductivo de las plantas. Además, este escarabajo está bien adaptado a las defensas de *D. stramonium* y soporta altas cantidades de alcaloides (Kogan y Goeden, 1971). Incluso, como parte de un comportamiento defensivo, excreta algunos de estos metabolitos en sus secreciones orales (Villanueva-Hernández, 2019).

En ciertas especies de plantas se ha documentado la existencia de una disyuntiva entre defensas directas e indirectas, cuando las primeras no son tan efectivas contra herbívoros especialistas (Ballhorn *et al.*, 2008). Ya que los parasitoides reducen la carga de herbívoros, podrían ser muy importantes para *D. stramonium* como agentes defensivos contra *L. daturaphila*. Por tanto, ¿la emisión de volátiles en *D. stramonium* podría ser un mecanismo de defensa indirecta en respuesta específica a la herbivoría de *L. daturaphila*? y ¿existirá una conexión entre la emisión de volátiles como defensas indirectas de *D. stramonium* y la búsqueda de huésped por parte de los diferentes parasitoides del escarabajo?

Como además existe variación geográfica en los niveles de parasitoidismo de *L. daturaphila* (Villanueva-Hernández, 2019), conocer la variación y estructura genética de las poblaciones de parasitoides podría ser relevante para entender, entre otras cosas, sus patrones de movimiento y dispersión (en muchas ocasiones mediados por volátiles). Entre todos los parasitoides que atacan a *L. daturaphila*, *E. lemae* representa la mayor ventaja para la planta debido a que reduce la transición huevo-larva del herbívoro (Hilker y Fatouros, 2015).

*Emersonella lemae*, además, es el único parasitoide de *L. daturaphila* presente en todas las poblaciones de *D. stramonium* del Centro de México (Villanueva-Hernández, 2019). Produce una alta mortalidad en los huevos del crisomélido y puede encontrarse incluso en poblaciones recién colonizadas por la planta y el herbívoro (Obs. pers., verano de 2019-2021). Por tanto, ¿la alta dispersión de *E. lemae* se verá reflejada en su estructura genética poblacional?, ¿existirá una relación entre la diversidad genética de *E. lemae* y sus niveles de infestación a nivel local? y ¿la interacción con *L. daturaphila* se verá reflejada en la distribución geográfica de su diversidad genética?

### III. HIPÓTESIS

La interacción tritrófica *Datura stramonium*-*Lema daturaphila*-parasitoides, es el resultado de una evolución conjunta donde la interacción planta-parasitoide ha sido mediada por las defensas de *D. stramonium*. Específicamente, *D. stramonium* produce volátiles como un mecanismo de defensa indirecta para atraer parasitoides, estos volátiles son indicativos de la presencia de su herbívoro especialista *L. daturaphila*, y específicos (HIPVs u OIPVs) del estado de desarrollo (p. ej. huevo, larva) de *L. daturaphila* presente sobre *D. stramonium*.

A su vez, como resultado de la relación entre *E. lemae* y su insecto huésped, las poblaciones de *E. lemae* son afectadas por las mismas barreras geográficas que *L. daturaphila* y por tanto, presentan una estructura

filogeográfica concordante con su huésped. La alta dispersión de *E. lemae* se relaciona con una baja estructura genética poblacional y sus niveles de infestación sobre las poblaciones de *L. daturaphila* se relacionan positivamente con su diversidad genética.

#### IV. OBJETIVOS

Determinar a partir de la emisión de volátiles por *Datura stramonium* y la estructura filogeográfica de *Emersonella lemae*, el papel ecológico y evolutivo que tienen los parasitoides en la interacción *Datura stramonium-Lema daturaphila*.

- a. Evaluar la producción de volátiles en *Datura stramonium* en respuesta específica a la presencia, herbivoría y estado de desarrollo de *Lema daturaphila*.
- b. Determinar la diversidad y estructura filogeográfica de las poblaciones de *Emersonella lemae* en el Centro de México a partir de dos marcadores moleculares de herencia materna, *Cyt-b* y *COI*.
- c. Identificar los procesos históricos poblacionales y los principales componentes geográficos que han influido en el establecimiento de las poblaciones de *Emersonella lemae*.

#### V. MÉTODOS

##### Sistema de estudio

❖ *Datura stramonium* (Solanaceae)

*Datura stramonium* es una hierba anual de verano que se distribuye principalmente en regiones de clima templado (Weaver y Warwick, 1984). Se caracteriza por presentar tricomas foliares y producir alcaloides y flavonoides, como mecanismos de defensa directa (Núñez-Farfán, 1991). Alberga una diversa comunidad de herbívoros, como los especialistas tróficos *Lema daturaphila* y *Epitrix parvula* y los generalistas *Sphenarium purpurascens* y *Spodoptera frugiperda*. Además, es atacada por un depredador de semillas pre-dispersión especializado en *Datura*, *Trichobaris soror* (Cabrales, 1991).

❖ *Lema daturaphila* (Chrysomelidae)

Este crisomélido especialista en el género *Datura*, es el principal folívoro de *D. stramonium* en el centro de México (Kogan y Goeden, 1970; Núñez-Farfán y Dirzo, 1994). Sus huevos son ovoides, de alrededor de 1 mm y amarillos brillantes. Están cubiertos por una sustancia pegajosa y se encuentran en puestas de entre 15 y 30 huevos (Omer-Cooper y Miles, 1951). Sus larvas presentan una conducta gregaria y pueden

producir defoliaciones de hasta el 100% (Núñez-Farfán y Dirzo, 1994; Garrido, 2004). Presenta cuatro estadios larvales muy parecidos entre sí (Omer-Cooper y Miles, 1951; Garrido, 2004).

Luego de pupar en el suelo, los adultos regresan a la planta, donde se alimentan, se aparean y ovipositan (Garrido, 2004). Mientras forrajean y cuando son perturbadas, las larvas de *L. daturaphila* levantan la cabeza y emiten una secreción oral de color café verdoso. En la composición química de estas secreciones se han identificado cuatro tropano alcaloides: 3-tigloyloxy-6-hydroxytropano, apoatropina, atropina y escopolamina (Villanueva-Hernández, 2019). Estos compuestos son parte de los metabolitos especializados que produce *D. stramonium* (Núñez-Farfán, 1991).



**Figura 1.** Sistema tritrófico de estudio. Flor (a), fruto (b) e individuo (c) de *Datura stramonium*. Huevos (d), larvas (e) y adultos (f) de *Lema daturaphila*. Adulto de *Emersonella lemae* (g), hembra de *E. lemae* ovipositando en huevos de *L. daturaphila* (h) y mosca Tachinidae junto a larva de *L. daturaphila* (i).

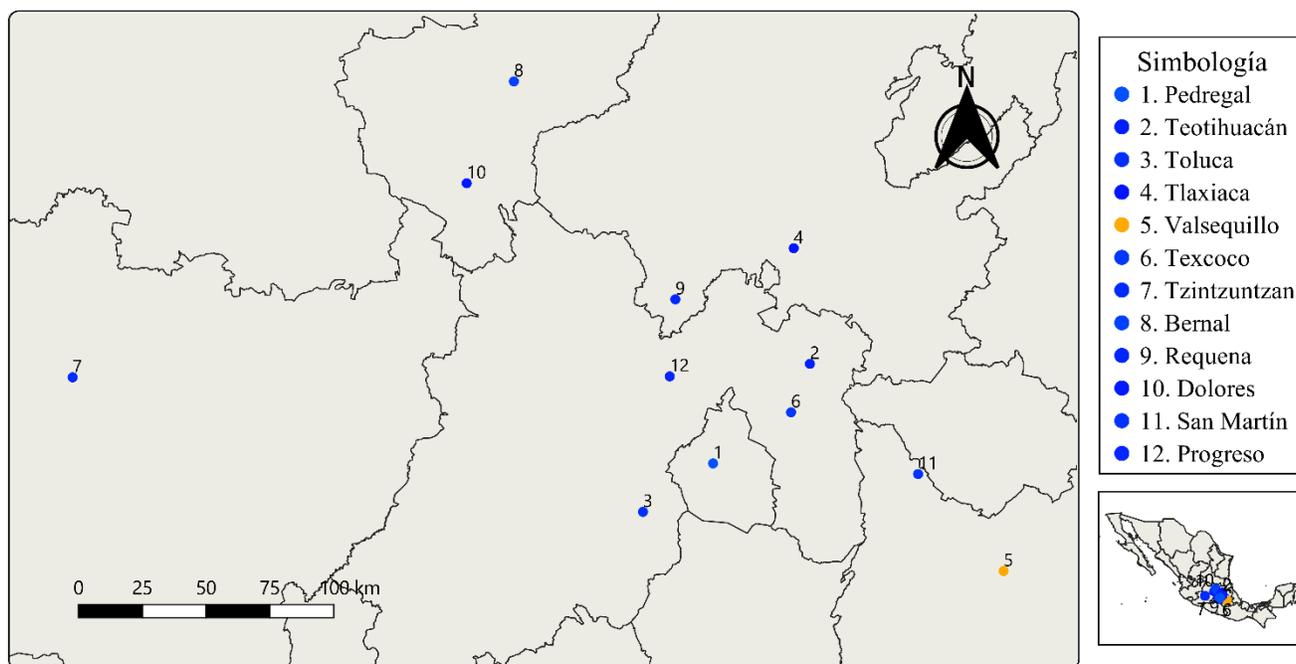
## ❖ Parasitoides

*Emersonella lemae* (Eulophidae) es una microavispa (~1 mm de longitud) idiobionte que ataca los huevos de este crisomélido. Generalmente parasitan todos los huevos de una puesta, produciendo una alta mortalidad en las poblaciones donde se encuentran. En campo se les observa posándose sobre los huevos de *L. daturaphila* recién puestos (Obs. pers., Fig. 1).

En cuanto al estado larval, se han identificado cuatro géneros de moscas de la familia Tachinidae: *Patelloa*, *Winthemia*, *Heliodoros* y *Pseudochaeta*. Todas son parasitoides koinobiontes y en campo se les observa atacando el 2° y el 3° estadio larval de *L. daturaphila*. En algunas poblaciones coexisten con *E. lemae*, pero en bajas cantidades si la avispa es abundante (Villanueva-Hernández, 2019).

### Área de estudio

La interacción tritrófica *D. stramonium*-*L. daturaphila*-parasitoides se ha registrado en varias localidades del centro de México, principalmente sobre el Eje Neovolcánico Transversal y la cuenca del río Balsas. Las avispas de *E. lemae* se colectaron años previos en doce poblaciones diferentes (Fig. 2). Entre estos lugares, se seleccionaron semillas de *D. stramonium* provenientes de la población de Valsequillo (Fig. 2, color amarillo) para evaluar la producción de volátiles.



**Figura 2.** Poblaciones muestreadas de *Emersonella lemae*. En amarillo, la población de Valsequillo, Puebla, de donde también se seleccionaron las semillas de *Datura stramonium*.

## Experimento de colecta de volátiles

Las semillas de un mismo genotipo de Valsequillo, Puebla se colectaron en años previos (Castillo *et al.*, 2014). Dicha población se caracteriza porque coexisten parasitoides de huevo y de larva al mismo tiempo (Villanueva-Hernández, 2019). Para romper la latencia, las semillas se prepararon de la siguiente forma: se sumergieron en agua a 60°C por 20 s y posteriormente se realizaron 5 ciclos de lavados donde las semillas se sumergieron en agua a 37-40°C durante 10 min. Entre cada lavado se cambió el agua y al día siguiente se removió la testa. Después, las semillas se colocaron en cajas de Petri con papel húmedo dentro de cámaras ambientales controladas (temperatura media 28/23°C, fotoperiodo 12:12 h).

Una vez que emergieron los cotiledones, se colocaron en almácigos con una mezcla de 3 partes de arena y 2 de perlita y se trasladaron al invernadero. Al alcanzar el tamaño suficiente, se trasplantaron a macetas individuales con las mismas condiciones del sustrato. A partir de la segunda semana en el invernadero, se añadieron 20 mL de fertilizante (Peters 20-20-20 NPK: 3.9% NH<sub>4</sub>-N, 5.8% NO<sub>3</sub>-N, 10% urea-N, 20% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 20% K<sub>2</sub>O-K) a cada planta, a una concentración de 2g/L de manera semanal. Las plantas se monitorearon diariamente y en la etapa de floración, se procedió con la aplicación de tratamientos.

Simultáneamente se mantuvo bajo condiciones controladas (22°C, fotoperiodo 12:12 h) el crecimiento de una colonia de *L. daturaphila*. Los individuos utilizados provienen de colectas de las poblaciones de Teotihuacán, Pedregal y Puebla (Fig. 2). Huevos, larvas y adultos se mantuvieron en contenedores de 500 mL y se alimentaron con hojas de *D. stramonium*. Su crecimiento se monitoreó diariamente, con el fin de mantener los números constantes. Una semana previa a la aplicación de tratamientos, se colectaron individuos adultos de *S. purpurascens* en la población de Progreso (Fig. 2). Estos insectos se mantuvieron bajo las mismas condiciones que *L. daturaphila*.

Dos días antes del experimento, las larvas del 2° y 3° estadio de *L. daturaphila* y los adultos de *S. purpurascens* se alimentaron con hojas de *D. stramonium* del genotipo seleccionado de Valsequillo. Para las plantas, los *elicitors* de las secreciones orales de los insectos son muy importantes en el reconocimiento del daño por herbívoros (Consales *et al.*, 2012), por lo que después de 5 h de que las larvas comenzaran a alimentarse, se realizó la extracción de sus OS. Con una micropipeta se tocó a la larva en cualquier parte de su cuerpo, lo que provocó una regurgitación inmediata. De cada larva se colectaron 2-5 µL de OS y se mezclaron en alícuotas de 40 µL que se almacenaron a -20°C hasta su posterior uso en los tratamientos experimentales. Asimismo, con base en su tamaño y coloración, se

seleccionaron larvas del 2° y 3° estadio que se mantuvieron en ayunas durante 16 h. Finalmente, para evitar el movimiento de los insectos entre plantas, dentro del invernadero se colocaron jaulas individuales con tela tipo malla para cada planta de cada tratamiento y se distribuyeron con 2 m de distancia entre ellas.

- *Tratamientos*

La aplicación de los tratamientos se realizó cuando los individuos de *D. stramonium* alcanzaron un tamaño similar en la etapa de floración. Cada tratamiento tuvo un total de 4 réplicas y todos se aplicaron el mismo día durante 4 días. La elección de las plantas para los tratamientos fue al azar, cada una se colocó dentro de una jaula de tela y la posición de sus respectivos tratamientos se aleatorizó en el invernadero para reducir el efecto de la variabilidad ambiental dentro del mismo.

Los tratamientos que se diseñaron fueron los siguientes:

1. Daño por herbivoría de larvas de *L. daturaphila*: Además de ser las principales depredadoras de *D. stramonium*, las larvas de *L. daturaphila* son atacadas por diferentes moscas y avispas parasitoides (Villanueva-Hernández, 2019). Para evaluar la producción de volátiles en *D. stramonium* en respuesta específica a su principal herbívoro, en una planta se colocaron grupos de 3 larvas del 2° y 3° estadio en cada hoja de 9 nodos a partir de la primera ramificación.
2. Daño por herbivoría de *S. purpurascens*: Para evaluar si la producción de volátiles en *D. stramonium* difería con daño de un herbívoro generalista, se asignaron 6 adultos de *S. purpurascens* en una planta. Este número se eligió debido a que producen un daño similar a la cantidad de larvas asignadas en el primer tratamiento.
3. Daño por herbívoros especialistas + generalistas: En las poblaciones naturales de *D. stramonium* coexisten de manera simultánea herbívoros especialistas y generalistas. La presencia de ambos puede afectar la composición y abundancia de la mezcla de volátiles emitida (Hare y Sun, 2011b). Para evaluar esto, en una planta se colocaron grupos de 3 larvas de *L. daturaphila* del 2° y 3° estadio en cada hoja de 6 nodos a partir de la primera ramificación. En la misma planta y al mismo tiempo se asignaron 5 adultos de *S. purpurascens*.
4. Presencia de huevos de *L. daturaphila*: Los *elicitors* presentes en los huevos de los insectos pueden ser suficientes para desencadenar la liberación de volátiles (Hilker *et al.*, 2005). Estos OIPVs podrían ser muy importantes para atraer parasitoides de huevos como *E. lemae* (Fatouros *et al.*, 2008). Para evaluar la producción de volátiles en respuesta específica a este estado de

desarrollo, en una planta de *D. stramonium* se colocaron 3 puestas de huevos de *L. daturaphila* en cada hoja de 7 nodos a partir de la primera ramificación.

5. Presencia de adultos de *L. daturaphila*: Aunque en menor grado, los adultos de *L. daturaphila* también se alimentan de *D. stramonium*. Además, algunos *elicitores* que desencadenan la liberación de OIPVs también pueden estar presentes en el oviducto de las hembras (Hilker *et al.*, 2005). Para evaluar la producción de volátiles en respuesta a la presencia de adultos de *L. daturaphila*, se colocaron 12 individuos hembras y machos sobre una planta.
6. Daño artificial + OS: En algunas plantas, las secreciones orales de los herbívoros pueden ser suficientes para semejar el daño por insectos y desencadenar la liberación de HIPVs (Alborn *et al.*, 1997). Para evaluar si esto ocurre en *D. stramonium*, con ayuda de un sacabocados (diámetro de 1.1 cm) y sin dañar la venación principal, se aplicó un daño artificial del 60% en cada hoja de 7 nodos a partir de la primera ramificación. Sobre el perímetro de cada lugar dañado se colocaron 2  $\mu$ L de OS.
7. Daño artificial: Para asegurar que la emisión de volátiles se debía a los insectos o a sus OS y no sólo al daño mecánico, en una planta de *D. stramonium* se aplicó un daño artificial del 60% en cada hoja de 7 nodos a partir de la primera ramificación. Se usaron las mismas condiciones del tratamiento anterior.
8. Control sin daño: Se asignó una planta sin la aplicación de cualquier tipo de daño.

La duración de cada tratamiento fue de 24 h y su aplicación comenzó a la misma hora todos los días. Al finalizar, se colectaron 4-5 hojas de diferentes nodos distribuidos a lo largo de la planta a partir de la primera ramificación. Estas hojas se colocaron en frascos de vidrio de 175 mL, previamente esterilizados. Cada frasco se etiquetó con sus respectivos datos y se selló con papel aluminio y cinta teflón. Las muestras se guardaron a -80°C hasta su posterior análisis.

- *Colecta y lectura de volátiles*

La captura de volátiles se realizó con SPME (*solid-phase microextraction*) o microextracción de fase sólida. Las hojas de cada frasco se trituraron por 1 min con un pistilo de vidrio esterilizado. Después, el frasco se selló con papel aluminio y se incubó a 40°C por 10 min. Transcurrido el tiempo, se introdujo una columna de SPME a través del aluminio y dentro del frasco se expusieron 10 cm de fibra al *headspace*, sin tocar el tejido. El sistema se incubó a 40°C durante 30 min.

La desorción de la columna ocurrió a 250°C por 10 min, en un cromatógrafo de gases (PerkinElmer® Claurus® 580) acoplado a espectrometría de masas (PerkinElmer® 560 S) (GC/MS). Se utilizó helio como gas de acarreo a un flujo constante de 1 mL/min y se usó una columna capilar Elite-5MS de 30 m x 320 µm x 0.25 µm (PerkinElmer® Inc.). El programa de temperatura del horno inició a 35°C y se mantuvo 5 min, después se incrementó a una tasa de 10°C/min hasta los 100°C y enseguida se aplicó una segunda rampa de 15°C/min hasta 300°C, se mantuvo por 1 min. En el espectrómetro de masas la temperatura de la línea de transferencia se mantuvo a 200°C y la de la fuente de iones a 230°C. Las lecturas se tomaron en el modo SCAN desde 34 hasta 450 m/z a 70 eV.

- *Identificación y cuantificación de los compuestos*

Los cromatogramas obtenidos por GC-MS se examinaron con el software AMDIS. La identificación de cada componente se realizó con base en su espectro de masas y tiempo de retención. Para ello se utilizó la base de datos y software NIST, con el fin de determinar el mejor candidato según la similitud entre los espectros comparados, la presencia y proporción de iones. Así, la identidad de los compuestos se determinó con un match  $\geq 800/1000$ . Finalmente, para la semi cuantificación de los compuestos se utilizó el área relativa bajo la curva, obtenida con TurboMass.

- *Análisis de datos*

Para determinar la diversidad de volátiles en cada tratamiento, se calculó el índice de Shannon ( $H$ ). Se tomó en cuenta el número de compuestos por tratamiento (riqueza) y el área relativa bajo la curva de cada réplica (abundancia). Con el objetivo de cumplir los supuestos de normalidad y homocedasticidad de las pruebas paramétricas, se transformó el área relativa bajo la curva con la función logaritmo natural. Se realizó un ANOVA de un factor para: a) evaluar diferencias en la emisión de cada volátil entre tratamientos y b) evaluar diferencias en la cantidad emitida de volátiles dentro de cada tratamiento. Se realizó una prueba de Tukey en caso de encontrar diferencias significativas.

Para evaluar diferencias en la cuantificación total entre volátiles, se realizó un análisis de covarianza (ANCOVA). Con el fin de controlar el efecto que pudo tener el tiempo de inyección de cada muestra en el GC-MS, se tomó en cuenta la hora de detección de cada compuesto desde la primera inyección. De esta forma se incluyeron las variables compuesto, tiempo (covariable) y su interacción como variables explicativas y el área relativa bajo la curva como variable de respuesta. En caso de

encontrar diferencias significativas, se realizó una prueba de Games-Howell. Todos los análisis estadísticos se realizaron en R v4.1.2 (R Core Team, 2021).

### **Análisis genéticos de *Emersonella lemae***

Las avispas se obtuvieron de colectas previas en el año 2019. En cada población (Fig. 2, Cuadro 1) se colectaron 30 puestas de *L. daturaphila* y su crecimiento se monitoreó en laboratorio. Todas las avispas de una misma puesta se almacenaron en frascos Eppendorf con alcohol al 70%. Se seleccionaron 15 puestas de *E. lemae* (o todas las que estuvieran disponibles) de cada población. Asumiendo que en una puesta todos los individuos son hermanos y con base en un dimorfismo sexual apreciable en el metasoma, se seleccionaron todas las hembras de cada puesta. Finalmente, se utilizó una hembra de cada puesta para realizar la extracción de ADN.

**Cuadro 1.** Ubicación geográfica y características climáticas de las poblaciones muestreadas de *Lema daturaphila*. ((P) Precipitación anual, (T) Temperatura media anual. Sistema Metereológico Nacional, 2021).

<b>Población</b>	<b>Coordenadas</b>	<b>Altitud (msnm)</b>	<b>P(mm)</b>	<b>T °C</b>
Pedregal, Ciudad de México	19°18'36''N, 99°11'24''W	2256	816.9	17.5
Teotihuacán, Estado de México	19°40'48''N, 98°49'48''W	2306	616.6	15.9
Toluca, Estado de México	19°7'48''N, 99°27'0''W	2630	828.9	12.9
Tlaxiaca, Hidalgo	20°6'36''N, 98°53'24''W	2300	403.2	15.3
Valsequillo, Puebla	18°54'36''N, 98°6'33''W	2200	668.3	16.2
Texcoco, Estado de México	19°30'0''N, 98°54'0''W	2250	508.3	15.3
Tzintzuntzan, Michoacán	19°37'48''N, 101°34'12''W	2200	669.7	16.4
Bernal, Querétaro	20°43'48''N, 99°55'48''W	2061	465.5	17.3
Requena, Hidalgo	19°55'12''N, 99°19'48''W	2123	642.5	16.7
Progreso, Estado de México	19°38'00.2''N, 99°21'03.4''W	2420	916.3	15.5
Dolores, Querétaro	20°21'4.63''N, 100°6'19.32''W	1937	616.5	18.5
San Martín, Puebla	19°16'13.6''N, 98°25'40.5''W	2265	760.6	15.6

- *Extracción de ADN*

El ADN total de cada individuo se obtuvo con el kit DNeasy Blood & Tissue (Quiagen), siguiendo el protocolo del fabricante e implementando ciertas modificaciones según los protocolos de Navajas *et al.*

(1998), Wang *et al.* (2019) y Cruaud *et al.* (2019). Antes de la extracción, cada individuo se sumergió tres veces en agua doblemente destilada durante 20 s y luego se secaron sobre un papel filtro. El insecto se homogeneizó sobre un pedazo de Parafilm® con 20 µL del buffer ATL, usando como pistilo un tubo de PCR. Después se transfirió a un tubo de 1.5 mL añadiendo los 160 µL restantes de buffer ATL y enjuagando muy bien el Parafilm® y el tubo. Luego de añadir la proteinasa K, las muestras se incubaron durante 2-3 horas a 56°C y se continuó con el protocolo. El ADN se eluyó con 30 µL de agua a 55°C y se dejó en reposo por 15 minutos antes de la centrifugación. Después se realizó una segunda elución en el mismo tubo con 12 µL de agua. El ADN extraído se almacenó a -20°C hasta su posterior uso.

- *Amplificación y secuenciación de los marcadores mitocondriales*

Para obtener un fragmento de 470 pb del marcador molecular citocromo *b* (*cyt-b*) se utilizaron los *primers*: *Forward* 5'-GTT CTA CTT TGA GGN CAA ATR TC-3' y *Reverse* 5'-AAC TCC TCC TAG TTT ATT NGG-3', previamente utilizados para la familia Eulophidae y el género *Emersonella* (Cuignet *et al.*, 2007). Para obtener un fragmento de 479 pb del gen mitocondrial citocromo oxidasa I (COI) se utilizaron los *primers*: *COI-3F* 5'-CCA GGT TCA TTA ATT GGG AAT G-3' y *COI-2R* 5'-GCT CCA GCT AAC ACA GGT AAT G-3', que se diseñaron con una secuencia reportada de *E. lemae* (GenBank KF444814.1) (Forbes y Funk, 2013).

La amplificación se realizó en un volumen final de 30 µL con los siguientes reactivos: 7 µL de ADN, 0.5 µL de cada nucleótido al 10 mM, 0.2 µL de GoTaq® polimerasa (Promega), 0.8 µL de cada *primer*, 1.8 µL de MgCl<sub>2</sub>, 6 µL de buffer de reacción y 12.4 µL de H<sub>2</sub>O dd. Para mejorar la amplificación de algunos fragmentos, se implementó dentro del volumen final de reacción DMSO al 2% o BSA al 1.6%.

Las condiciones de amplificación para *cyt-b* fueron: una desnaturalización inicial a 95°C por 2 min; seguida de 35 ciclos de 95°C por 1 min, 50°C, 51°C, 56.2°C, 58.5°C y 59.5°C por 40 s y 72°C por 1 min; con una extensión final a 72°C por 5 min. Para amplificar la región de COI, las condiciones fueron: una desnaturalización inicial a 95°C por 2 min; seguida por 32 ciclos a 95°C por 1 min, 55°C, 57°C, 59°C, 61°C, 63°C, 65°C y 67°C por 40 s y 72°C por 1 min; con una extensión final a 72°C por 5 min. La amplificación de cada gen se verificó en un gel de agarosa al 0.9% coloreado con EtBr y buffer TAE al 2%. Como referencia se utilizó un marcador de tamaño molecular de 100 pb.

Los productos de PCR se enviaron a secuenciar a Psomagen, Inc., donde fueron purificados y secuenciados en ambas direcciones (*Forward* y *Reverse*).

- *Procesamiento de las secuencias*

La calidad de los cromatogramas se revisó con Geneious Prime v.2021.2.2 (Kearse *et al.*, 2012). Se eliminaron las secuencias incompletas y las de lectura incierta. En el mismo software se eliminaron los extremos de baja calidad de cada secuencia y se realizó el ensamble de los fragmentos *forward* y *reverse* para cada individuo. Se realizó un alineamiento múltiple de secuencias para cada gen utilizando MAFFT v.7.490 (Katoh *et al.* 2002; Katoh y Standley, 2013) implementado en Mesquite v.3.70 (Maddison & Maddison, 2021). El alineamiento se revisó manualmente, se eliminaron las secuencias con regiones incompletas y se corroboraron los polimorfismos de cada secuencia con el cromatograma correspondiente.

- *Diversidad genética*

Con DnaSP v6.12.03 (Rozas *et al.*, 2017) se estimó el número de sitios polimórficos ( $S$ ), la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ), el número de haplotipos ( $h$ ), la diversidad haplotípica ( $H_d$ ) y el índice de diversidad theta ( $\theta$ ) para cada marcador y localidad (Watterson, 1975; Nei, 1987; Nei y Miller, 1990; Nei y Kumar, 2000).

- *Estructuración genética*

La relación entre los haplotipos se analizó a través de una red generada con el algoritmo de *median-joining* utilizando PopART (Bandelt *et al.*, 1999; Leigh y Bryant, 2015). Para enraizar la red de *Cyt-b*, se utilizaron dos secuencias de *E. pubipennis* provenientes de Panamá, GenBank (AY820858.1 y AY820859.1) (Cuignet *et al.* 2007). Para COI se utilizó una secuencia de *E. lemae* proveniente de Costa Rica, GenBank (KF444814.1) (Forbes y Funk, 2013).

Con Arlequin v3.5.2.2 (Excoffier y Lischer, 2010) se calcularon los valores de  $F_{ST}$  entre poblaciones para cada marcador, utilizando el número de diferencias pareadas entre los haplotipos. Con base en las distancias  $F_{ST}$  y las principales barreras geográficas que afectan la dispersión de *L. daturaphila* (Sierra-Guerrero, 2021), se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) con 10,000 permutaciones para obtener el valor de significancia. De esta forma se probó la distribución de la varianza genética con base en las principales barreras geográficas del Centro de México: la Sierra del

Ajusto-Chichinautzin y la Sierra Nevada (volcán Popocatepetl e Iztaccíhuatl), que separan a Toluca y Valsequillo, respectivamente, del resto de las poblaciones. Debido a los valores de  $F_{ST}$ , con *Cyt-b* también se separó a Tlaxiaca como otro grupo. Para COI sólo se probó la estructuración con la segunda barrera geográfica, debido a que los valores de  $F_{ST}$  para Toluca no fueron significativos. De esta forma, se evaluó la existencia de 3 y 4 grupos para *Cyt-b* y 2 para COI.

- *Reconstrucción filogenética*

Los análisis filogenéticos se realizaron a partir de una matriz concatenada con ambos genes (857 pb). También se incluyeron los individuos con haplotipos para un solo marcador. Con el fin de probar la monofilia de los haplotipos del centro de México, debido a la alta diversidad genética que se encontró, se incluyeron cinco secuencias de especies del mismo género: *E. pubipennis\_s1*, *E. pubipennis\_s2*, *E. rotunda\_s1*, *E. rotunda\_s2* y *E. lemae* (Costa Rica), con números de acceso en GenBank (AY820858.1, AY820859.1, AY820861.1, AY820862.1 y KF444814.1). Como grupo externo se incluyeron dos secuencias de un género hermano: *Horismenus\_sp1* y *Horismenus\_sp2* (GenBank AY820875.2, AY820874.1).

Con jModelTest v2.1.10 (Darriba *et al.*, 2012) se seleccionó el modelo de evolución para cada región y en combinación, con base en el Criterio de Información de Akaike (AIC) (Akaike, 1974). Se realizó un análisis de Inferencia Bayesiana con MrBayes v. 3.2 (Ronquis *et al.*, 2012), implementado en CIPRES (Miller *et al.*, 2010). Se realizaron dos corridas independientes, cada una con cuatro cadenas MCMC (una fría y tres calientes, con una temperatura de 0.04), que corrieron por 30 millones de generaciones, muestreando cada 1,000 generaciones. Para asegurar un buen resultado, se verificó el intercambio entre cadenas (entre 0.1-0.7) y se eliminó el 25% de los árboles como parte del *burn-in*. La convergencia de las cadenas y el tamaño de ESS >200 se verificó con Tracer v1.7.1 (Rambaut *et al.*, 2018). Finalmente, la visualización de los árboles y su anotación se realizó con FigTree v1.4.4 (Rambaut, 2010) y R v4.1.2 (R Core Team, 2021).

- *Demografía histórica*

Para estimar las dinámicas demográficas de *E. lemae* a través del tiempo, se realizó un análisis Bayesiano de *skyline plot* en BEAST v.1.10.4 (Drummond *et al.*, 2005; Suchard *et al.*, 2018). Se usaron todos los individuos en una matriz con ambos genes y también de manera separada para cada marcador. Se utilizó un modelo *piecewise-linear*, un reloj molecular *lognormal* relajado y el modelo de sustitución

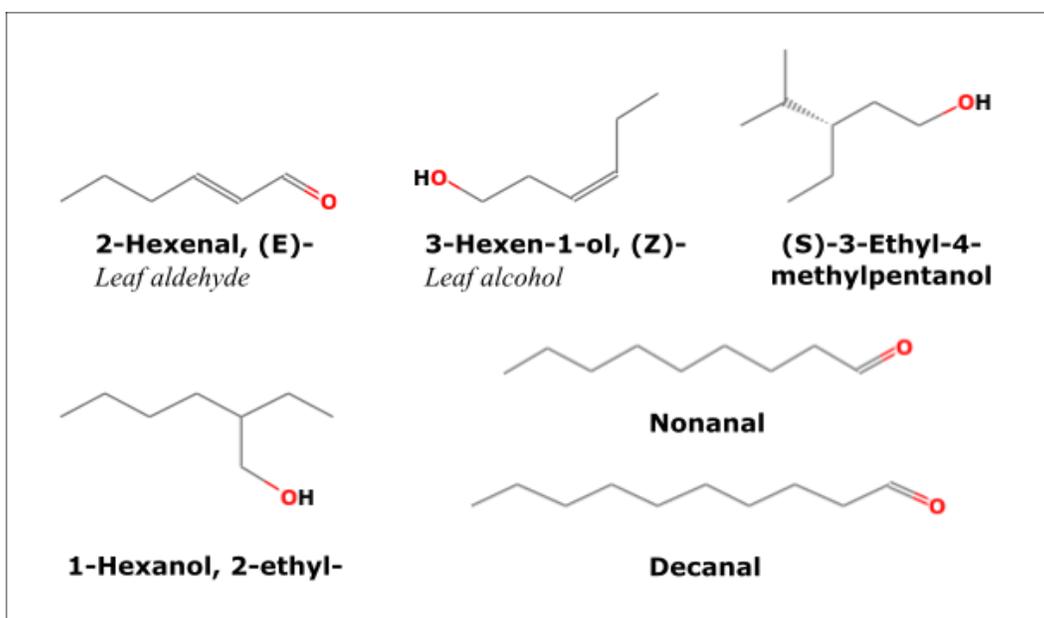
seleccionado con jModelTest v2.1.10. Se realizaron tres corridas independientes de 50 millones de generaciones cada una, muestreando cada 5,000 generaciones. La convergencia de las cadenas y el tamaño de ESS se verificó con Tracer v1.7.1.

De igual forma, con Arlequin v3.5.2.2 se calcularon las pruebas de neutralidad  $D$  de Tajima (Tajima, 1989) y  $F_s$  de Fu (Fu, 1997) para cada marcador. Dichos estadísticos se obtuvieron para cada población y con el total de los individuos.

## VI. RESULTADOS

### Experimento de colecta de volátiles

En el total de tratamientos, se identificaron 6 diferentes compuestos orgánicos volátiles (Fig. 3, Cuadro 7). Por su estructura química se pueden dividir en alcoholes y aldehídos. Entre ellos, se presentaron dos GLVs (*green leaf volatiles*): 2-Hexenal, (E)- y 3-Hexen-1-ol, (Z)-.



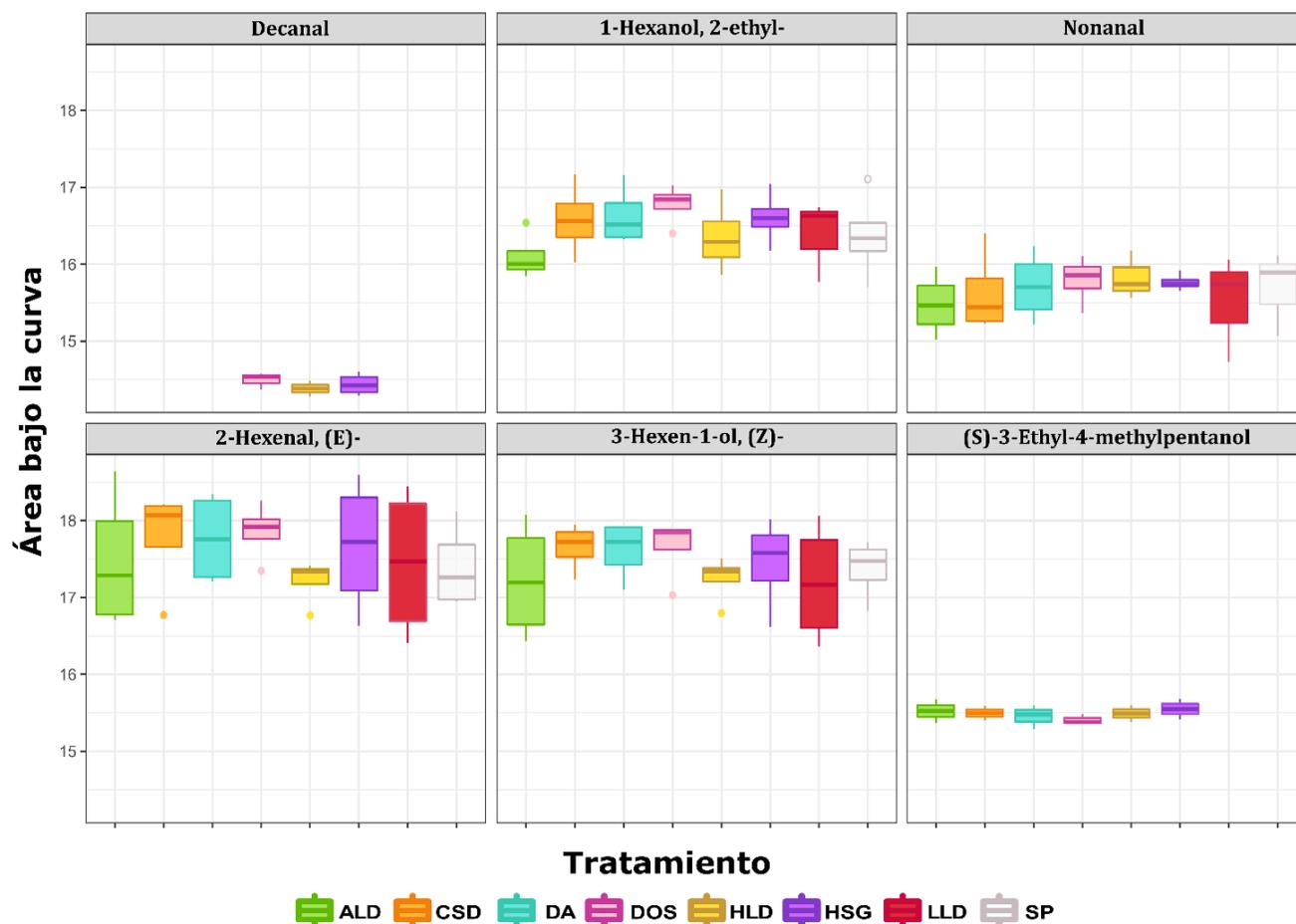
**Figura 3.** Compuestos orgánicos volátiles emitidos por *D. stramonium*.

La mayoría de los compuestos se detectaron en todos los tratamientos, a excepción del (S)-3-Ethyl-4-methylpentanol y el decanal. El primero ausente en el tratamiento con herbivoría de larvas de *L. daturaphila* y en el tratamiento con herbivoría de *S. purpurascens* (Fig. 4). El decanal, por otro lado, se detectó en los tratamientos con Daño artificial + OS, Huevos de *L. daturaphila*, y Herbivoría por especialistas + generalistas (Fig. 4).

**Cuadro 2.** Índice de diversidad de Shannon ( $H$ ) para los volátiles por tratamiento.

	Adultos <i>Lema</i> <i>daturaphila</i>	Daño artificial + OS	Larvas <i>Lema</i> <i>daturaphila</i>	Control sin daño	Huevos <i>Lema</i> <i>daturaphila</i>	Herbivoría <i>Sphenarium</i> <i>purpurascens</i>	Daño artificial	Herbivoría especialistas + generalistas
$H$	1.21171	1.30470	1.08387	1.22012	1.36677	1.17615	1.25344	1.28271

Al determinar la diversidad con el índice de Shannon, se encontró que el tratamiento de Huevos de *L. daturaphila* tuvo la mayor diversidad de compuestos (Cuadro 2), seguido de los tratamientos con Daño artificial + OS y Herbivoría por especialistas + generalistas. Sólo en estos tratamientos se presentaron todos los compuestos. La diversidad más baja se presentó en el tratamiento de larvas de *L. daturaphila* ( $H=1.08387$ ).



**Figura 4.** Semi cuantificación de los seis compuestos orgánicos volátiles de *Datura stramonium* bajo diferentes tratamientos de herbivoría (valores transformados con la función logaritmo natural). Tratamientos: Adultos de *L. daturaphila* (ALD), Control sin daño (CSD), Daño Artificial (DA), Daño artificial + OS (DOS), Huevos de *L. daturaphila* (HLD), Herbivoría de especialistas + generalistas (HSG), Larvas de *L. daturaphila* (LLD) y *S. purpurascens* (SP).

El análisis de varianza no detectó diferencias significativas en la emisión de cada volátil entre tratamientos (Anexo 1, Cuadro A1). Por tanto, los diferentes tipos de herbivoría no generaron un cambio en la cantidad de cada compuesto orgánico liberado (Fig. 4). Sin embargo, sí hubo cambios al comparar el área relativa bajo la curva de todos los compuestos en cada tratamiento (Fig. 5, Cuadro 3).

**Cuadro 3.** ANOVAs para el área relativa bajo la curva de cada tratamiento en función de los compuestos (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

Tratamiento	Fuente de variación	g.l.	S.C.	C.M.	F	<i>p</i>
ALD	Área por compuesto	4	12.655	3.164	8.006	<b>0.00175**</b>
	Error	13	5.137	0.395		
DOS	Área por compuesto	5	30.636	6.127	65.4	<b>2.25e-06***</b>
	Error	16	1.499	0.094		
LLD	Área por compuesto	3	7.721	2.5736	4.018	<b>0.0409*</b>
	Error	10	6.405	0.6405		
CSD	Área por compuesto	4	15.813	3.953	15.74	<b>6.64e-05***</b>
	Error	13	3.265	0.251		
HLD	Área por compuesto	5	16.241	3.248	28.67	<b>1.38e-06***</b>
	Error	13	1.473	0.113		
SP	Área por compuesto	3	7.172	2.3906	8.843	<b>0.002**</b>
	Error	11	2.974	0.2703		
DA	Área por compuesto	4	16.474	4.119	21.62	<b>7.16e-06***</b>
	Error	14	2.667	0.191		
HSG	Área por compuesto	5	29.275	5.855	23.44	<b>0.0001***</b>
	Error	16	3.996	0.250		

En general, para cada tratamiento la cantidad de volátiles liberados difirió significativamente entre compuestos (Cuadro 3). El 2-Hexenal, (E)- y el 3-Hexen-1-ol, (Z) fueron los volátiles que mostraron las mayores cantidades emitidas. El 1-Hexenol, 2-ethyl y el Nonanal, mostraron valores intermedios, seguidos del (S)-3-Ethyl-4-methylpentanol. El decanal fue el compuesto con las menores cantidades liberadas (Fig. 5).

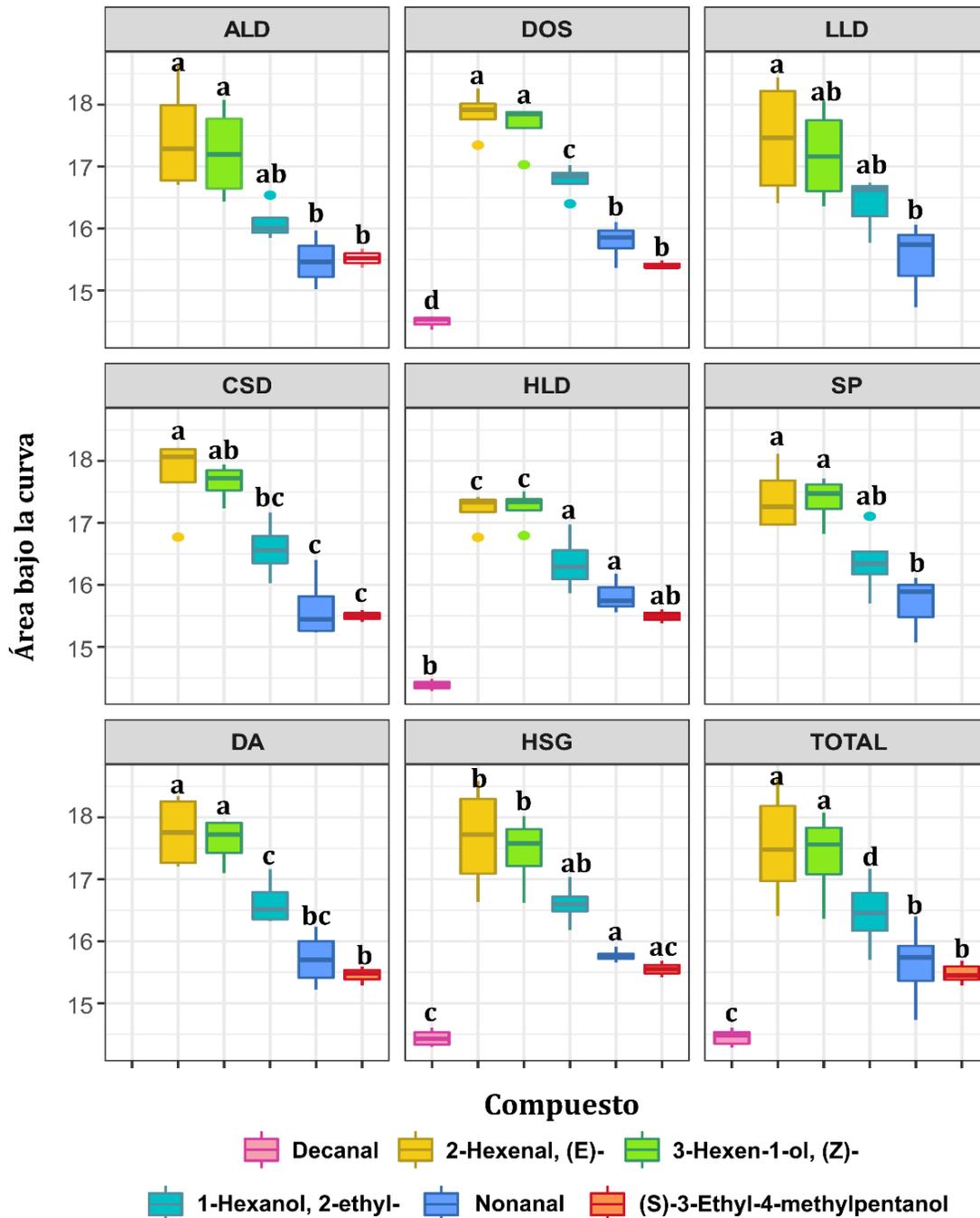
Los resultados del ANCOVA muestran que las variables tiempo, compuesto y su interacción tienen efectos significativos en la cuantificación de los volátiles (Cuadro 4). De manera general, el tiempo en el que se inyectaron las muestras tuvo un efecto negativo en la cantidad detectada de cada volátil, es

decir, las cantidades decrecieron a medida que incrementó el tiempo desde el inicio de la inyección (Anexo 1, Fig. A1).

**Cuadro 4.** ANCOVA del área bajo la curva para cada compuesto de *Datura stramonium*, utilizando como covariable el tiempo de inyección.

	<b>Fuente de variación</b>	<b>g.l.</b>	<b>S.C.</b>	<b>C.M.</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>TOTAL</b>	Tiempo	1	5.680	5.6797	38.6909	<b>5.81e-09***</b>
	Compuesto	5	139.368	27.8737	189.8784	<b>2.395e-40***</b>
	Tiempo * Compuesto	5	2.950	0.5900	4.0192	<b>0.001973**</b>
	Error	135	19.818	0.1468		

Sin embargo, aun controlando este factor, hubo diferencias significativas en la cantidad emitida entre compuestos. En el total de los tratamientos, las cantidades liberadas de decanal y de 1-Hexanol, 2-ethyl difirieron significativamente del resto de los compuestos (Fig. 5, TOTAL).



**Figura 5.** Semi cuantificación de los diferentes compuestos volátiles de *Datura stramonium* en cada tratamiento de herbivoría (valores transformados con la función logaritmo natural). Tratamientos: Adultos de *L. daturahila* (ALD), Daño artificial + OS (DOS), Larvas de *L. daturaphila* (LLD), Control sin daño (CSD), Huevos de *L. daturaphila* (HLD), *S. purpurascens* (SP), Daño Artificial (DA), Herbivoría de especialistas + generalistas (HSG) y el TOTAL de tratamientos.

## Análisis genéticos de *Emersonella lemae*

- *Diversidad genética*

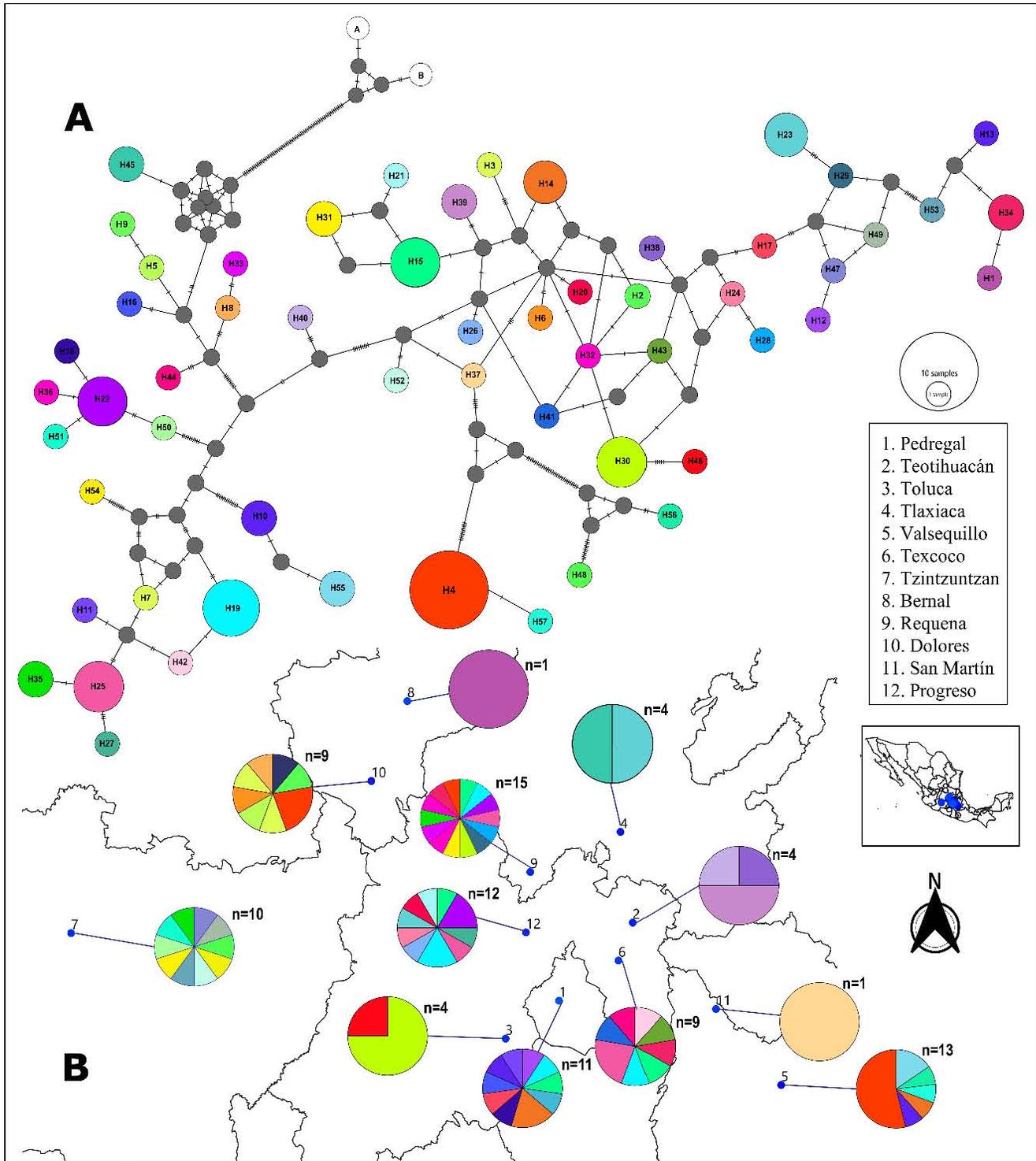
Para *Cyt-b* se obtuvieron un total de 437 sitios para 93 secuencias de 12 poblaciones diferentes. No se presentaron *gaps* en el alineamiento y hubo un total de 96 sitios polimórficos. Se encontraron 83 sitios parsimoniosamente informativos y 13 *singletons*, que definieron un total de 57 haplotipos (Anexo 2). En la mayoría de las poblaciones la diversidad haplotípica fue alta y la diversidad nucleotídica osciló entre 0.00572 a 0.05533 (Cuadro 5). En las poblaciones de Bernal y San Martín sólo fue posible amplificar una secuencia.

**Cuadro 5.** Diversidad genética obtenida con *Cyt-b* y COI en diferentes poblaciones de *Emersonella lemae* de México: Población, número de individuos analizados (*n*), sitios segregantes (*S*), diversidad nucleotídica ( $\pi$ ), número de haplotipos (*h*), diversidad haplotípica ( $H_d$ ) e índice de diversidad theta ( $\theta$ ). La última fila muestra los valores totales.

Población	Cyt-b						COI					
	<i>n</i>	<i>S</i>	$\pi$	<i>h</i>	$H_d$	$\theta$	<i>n</i>	<i>S</i>	$\pi$	<i>h</i>	$H_d$	$\theta$
Pedregal	11	49	0.04094	10	0.982	0.03828	8	34	0.03146	8	1.000	0.03122
Teotihuacán	4	20	0.02365	3	0.833	0.02496	2	10	0.02381	2	1.000	0.02381
Toluca	4	5	0.00572	2	0.500	0.00624	1	0	0.00000	1	0.000	0.00000
Tlaxiaca	4	26	0.03966	2	0.667	0.03245	2	0	0.00000	1	0.000	0.00000
Valsequillo	13	63	0.04181	6	0.718	0.04646	3	0	0.00000	1	0.000	0.00000
Texcoco	9	38	0.03725	8	0.972	0.03199	11	37	0.03260	9	0.964	0.03008
Tzintzuntzan	10	74	0.05533	10	1.000	0.05986	9	61	0.04841	9	1.000	0.05344
Bernal	1	0	0.00000	1	0.000	0.00000	-	-	-	-	-	-
Requena	15	50	0.03916	14	0.990	0.03519	8	41	0.04311	7	0.964	0.03765
Progreso	12	39	0.03602	10	0.970	0.02955	13	43	0.03265	11	0.9744	0.03307
Dolores	9	43	0.04189	8	0.972	0.03620	3	15	0.02381	3	1.000	0.02381
San Martín	1	0	0.00000	1	0.000	0.00000	1	0	0.00000	1	0.000	0.00000
<b>Total</b>	<b>93</b>	<b>96</b>	<b>0.04278</b>	<b>57</b>	<b>0.978</b>	<b>0.04304</b>	<b>61</b>	<b>76</b>	<b>0.03777</b>	<b>42</b>	<b>0.9803</b>	<b>0.03876</b>

Para COI se obtuvieron un total de 61 secuencias y 42 haplotipos (Anexo 3) para 11 poblaciones, con una longitud de 420 pb. Hubo 76 sitios polimórficos, de los cuales 53 fueron parsimoniosamente informativos y 23 fueron *singletons*. Se presentó un *gap* en un individuo de Progreso (Pro-23). Debido a dificultades para amplificar este marcador, no se obtuvieron secuencias para Bernal y en algunas poblaciones el tamaño de muestra es muy bajo. En el resto de las poblaciones la diversidad haplotípica

fue alta y la diversidad nucleotídica osciló entre 0.02381 a 0.04841 (Cuadro 5). Para ambos marcadores, Tzintzuntzan presentó los más altos valores de  $\pi$  y  $\theta$ .



**Figura 6.** (A) Red de haplotipos por *median-joining* para *Emersonella lemae* (Cyt-*b*), el tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia del haplotipo. Los haplotipos A y B (en blanco) pertenecen a *E. pubipennis*. (B) Distribución geográfica y frecuencia de los haplotipos de Cyt-*b* en cada población, junto a cada círculo se indica el tamaño de muestra.

- *Estructuración genética*

En la red de haplotipos para *Cyt-b* (Fig. 6A), el grupo externo (*E. pubipennis*) mostró mayor relación con el haplotipo de Tlaxiaca (H45), seguido de Pedregal, Dolores, Texcoco y Requena (H16, H5, H9, H44, H8 y H33). A lo largo de toda la red se pueden ver haplotipos faltantes (no muestreados o extintos) y en el centro se observa una gran cantidad de reticulaciones. En algunos casos se observan muchos pasos mutacionales entre los haplotipos, por ejemplo, entre H37 y H56, H48 y H4. La mayoría de estos últimos corresponden a Valsequillo. Muy pocos casos muestran una estructura en forma de estrella, por ejemplo, H22 con H18, H36 y H51.

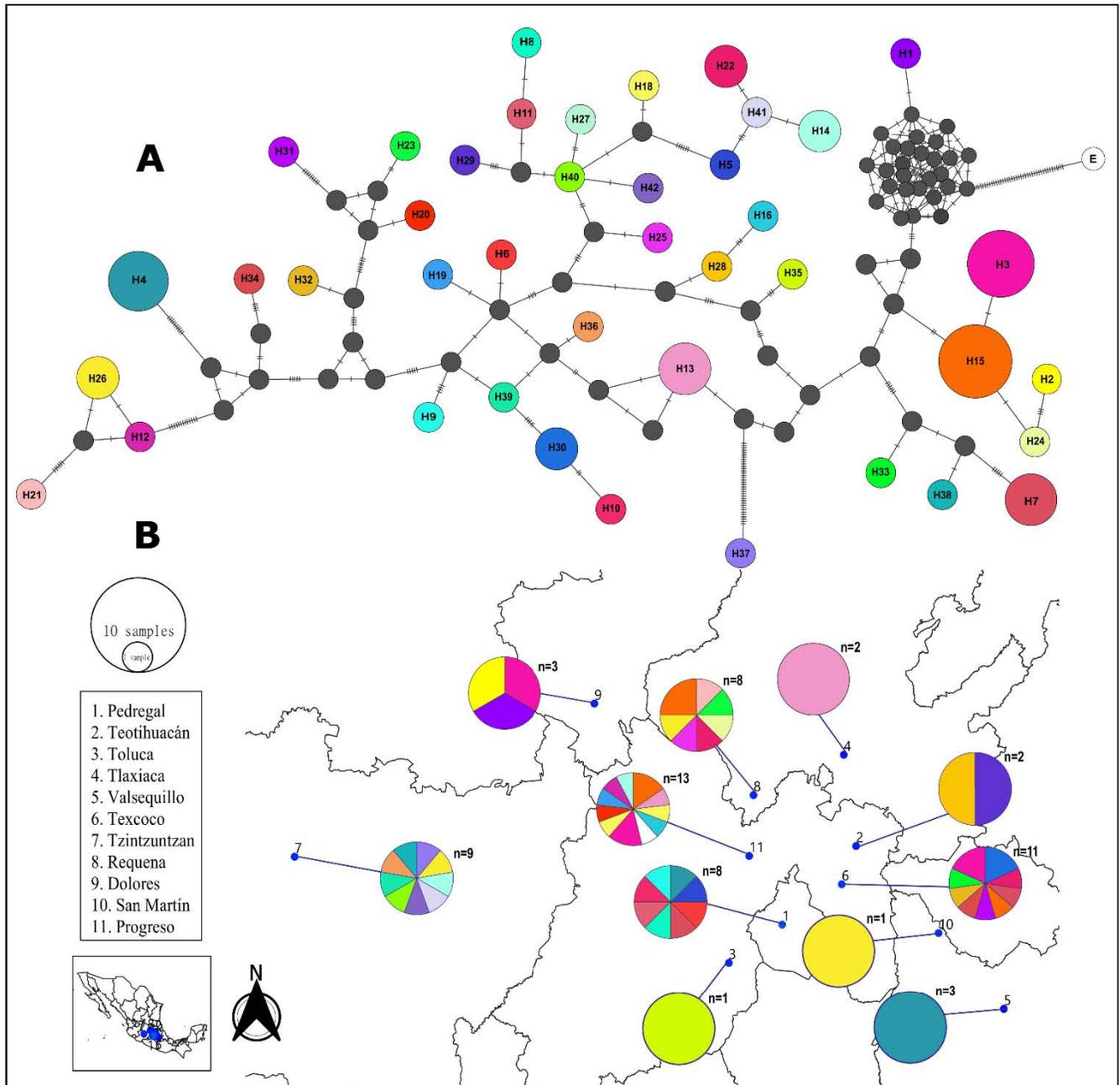
La mayoría de las poblaciones presentaron haplotipos únicos y en bajas frecuencias. Con *Cyt-b*, el haplotipo H4 fue el más abundante y se presentó en Dolores, Requena y Valsequillo. Los haplotipos compartidos entre poblaciones fueron: H10 y H14 (Pedregal y Valsequillo); H15 y H19 (Pedregal, Progreso, Requena y Texcoco); H22 (Progreso y Requena); H23 (Progreso y Tlaxiaca); H25 (Progreso, Requena y Texcoco); H30 (Requena y Toluca); H31 y H35 (Requena y Tzintzuntzan); y H34 (Requena y Texcoco) (Fig. 6B). Bernal y San Martín presentaron sólo un haplotipo.

En la red de haplotipos para COI (Fig. 7A), el grupo externo (*E. lemae*, Costa Rica) mostró mayor relación con el haplotipo H1 (Dolores), seguido de H15 (Progreso, Requena, Texcoco). En el interior de la red se observan varios haplotipos faltantes (extintos o no muestreados). El haplotipo más frecuente fue H15, del cual derivan H3, H24 y H2. En muchas áreas de la red se presenta un gran número de pasos mutacionales entre los haplotipos, por ejemplo, en las conexiones con H37, H12 y H4.

Las poblaciones que compartieron haplotipos fueron: Dolores, Progreso y Texcoco (H3); Pedregal y Valsequillo (H4); Progreso, Texcoco y Pedregal (H7); Progreso y Tlaxiaca (H13); Progreso y Tzintzuntzan (H14); Requena y Texcoco (H22); y Requena y Tzintzuntzan (H26). Progreso fue la población que compartió mayor número de haplotipos con el resto de las poblaciones. De manera general, se obtuvo una menor diversidad poblacional en comparación con *Cyt-b*, por ejemplo: en Dolores sólo se presentaron 3 haplotipos; y en Toluca sólo hubo uno. El resto de las poblaciones (Tlaxiaca, San Martín y Valsequillo) tuvieron sólo un haplotipo, pero el tamaño muestral fue pequeño (Fig. 7B).

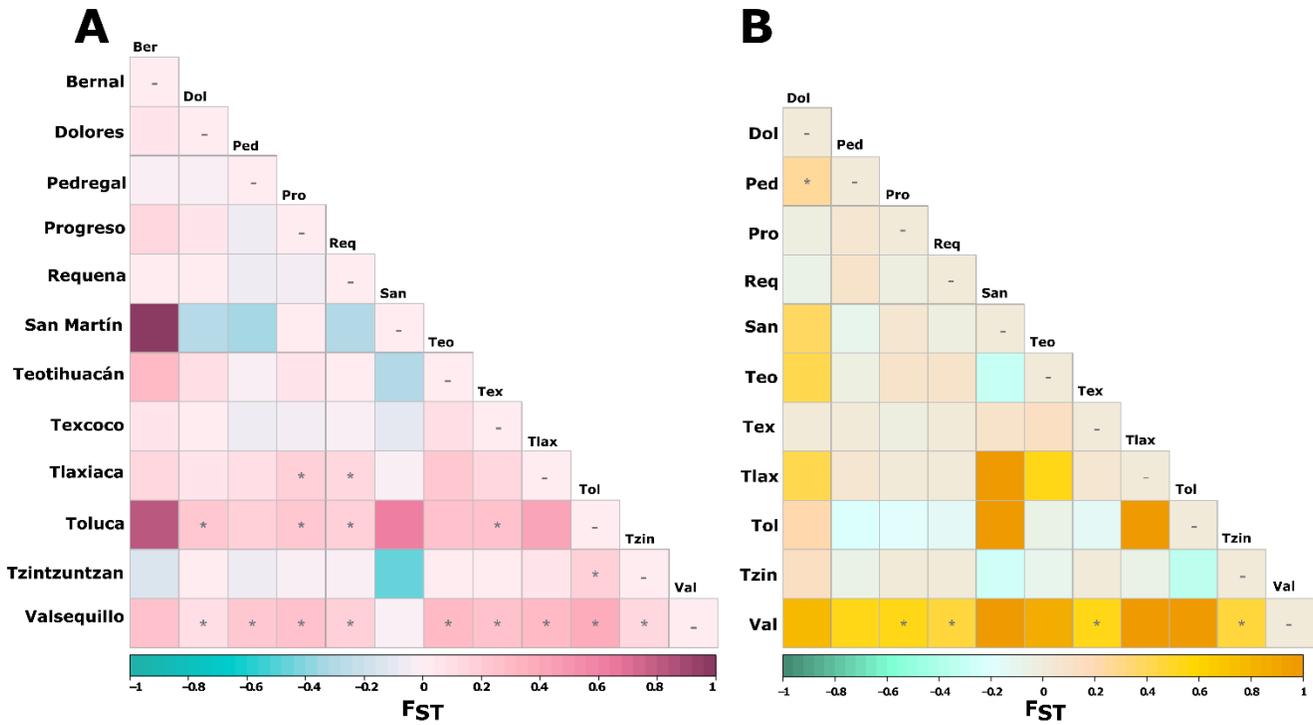
Los valores de  $F_{ST}$  para *Cyt-b* estuvieron entre 0.00396 (Texcoco-Tzintzuntzan) a 1 (Bernal-San Martín). Sin embargo, las distancias poblacionales estadísticamente significativas fueron pocas. Valsequillo y Toluca fueron las localidades que mostraron mayor número de distancias significativas

respecto al resto de las poblaciones (Fig. 8A, Anexo 4). El valor más alto se encontró entre éstas dos ( $F_{ST}$  0.45073), seguido de Toluca y Tlaxiaca ( $F_{ST}$  0.38942). También fue significativa el valor entre Tlaxiaca-Requena ( $F_{ST}$  0.14593) y Tlaxiaca-Progreso ( $F_{ST}$  0.17609). Algunos valores resultaron negativos debido a las diferencias en el tamaño de muestra entre poblaciones.



**Figura 7.** (A) Red de haplotipos por *median-joining* para *Emersonella lemae* (COI), el tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia del haplotipo. El haplotipo “E” pertenece a *E. lemae* de Costa Rica. (B) Distribución geográfica y frecuencia de los haplotipos de COI en cada población, junto a cada círculo se indica el tamaño de muestra.

Con el gen COI, los valores de  $F_{ST}$  se encontraron entre 0.01295 (Requena-Texcoco) y 1 (San Martín-Toluca, Tlaxiaca, Valsequillo; Tlaxiaca-Toluca, Valsequillo; Toluca-Valsequillo). Sólo fueron estadísticamente significativas las diferencias entre Dolores-Pedregal ( $F_{ST}$  0.26017) y, nuevamente, las de Valsequillo respecto a Progreso, Requena, Texcoco y Tzintzuntzan. De estas últimas, el valor más alto se encontró con Texcoco (0.54599), seguido de Progreso (0.54196). Se encontraron valores negativos de  $F_{ST}$  debido a las diferencias en el tamaño de muestra entre poblaciones (Fig. 8B, Anexo 5).



**Figura 8.** Mapas de calor de los valores de diferenciación genética ( $F_{ST}$ ) calculados entre pares de poblaciones de *E. lemae*, utilizando los genes mitocondriales *Cyt-b* (A) y COI (B). El \* indica un valor estadísticamente significativo ( $p=0.05$ ).

El AMOVA para *Cyt-b* mostró que la agrupación a partir de las barreras geográficas (Sierra Nevada/Sierra del Ajusco-Chichinautzin, 3 grupos) explicó el 20.81% de la variación y el 79% restante se encontró a nivel intra poblacional. Al utilizar 4 grupos y separar también a Tlaxiaca, la variación entre los grupos propuestos también resultó significativa y explicó el 21.01% de la variación observada con este marcador. Para COI, la variación explicada por grupos no resultó significativa, probablemente esto se deba a que Valsequillo tiene un tamaño muestral pequeño con este marcador. El 51.76% de la variación se encontró dentro de las poblaciones (Cuadro 6).

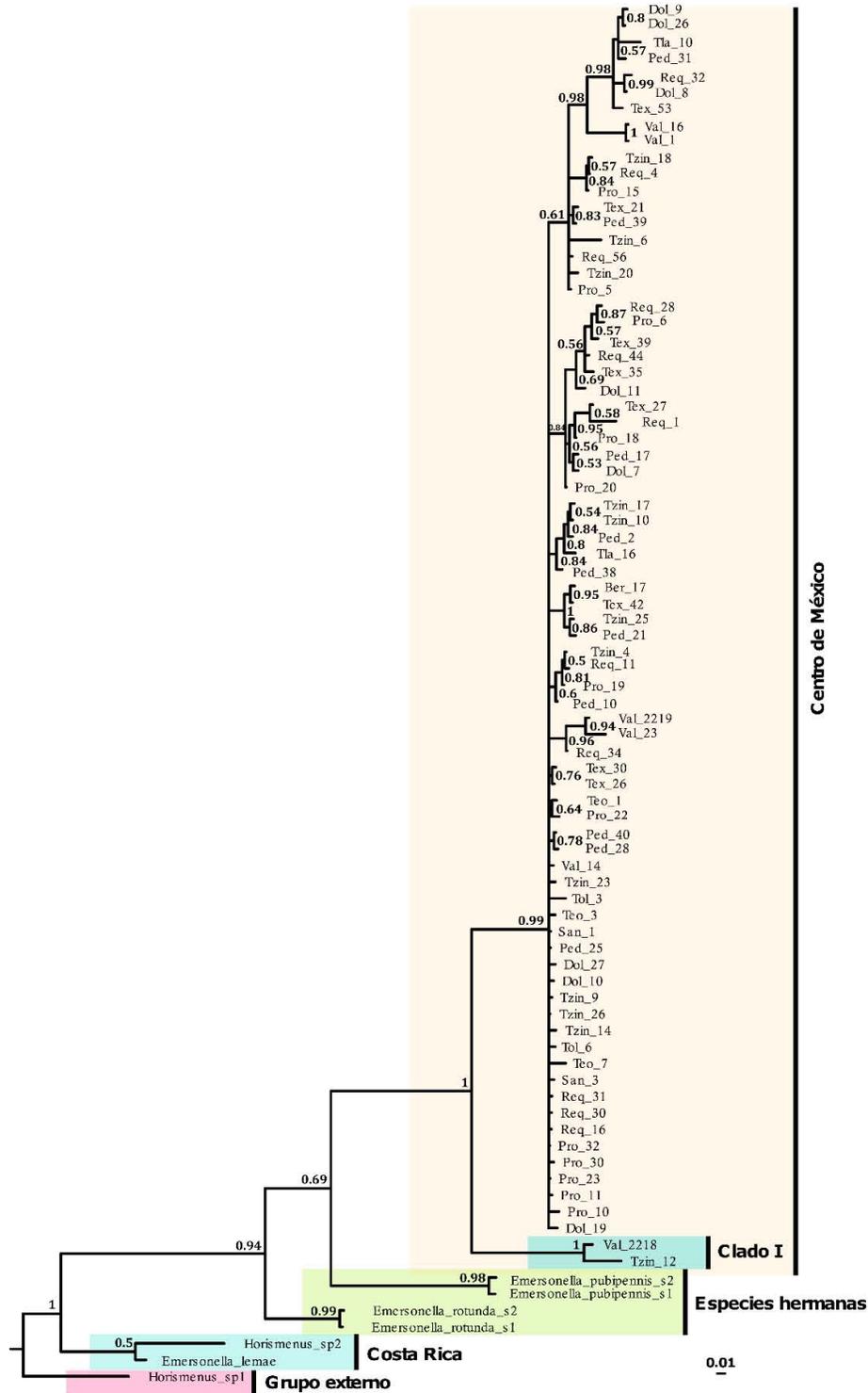
**Cuadro 6.** Análisis de varianza molecular (AMOVA) para las diferentes poblaciones de *Emersonella lemae* del centro de México, usando DNA mitocondrial. Para Cyt-*b* se evaluaron 3 (Valsequillo-Toluca-Centro) y 4 grupos (Valsequillo-Toluca-Tlaxiaca-Centro). Con COI se evaluaron 2 grupos (Valsequillo-Centro). \*Valores estadísticamente significativos.

Marcador # grupos	Fuente de variación	d.f.	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación	Coefficientes <i>F</i> y <i>p</i>
Cyt- <i>b</i> 3 grupos	Entre grupos	2	83.173	2.26903	20.81	$F_{CT}$ <b>0.20806*</b> 0.012±0.001
	Entre poblaciones dentro de grupos	9	78.937	0.02131	0.20	$F_{SC}$ 0.00247 0.476±0.004
	Dentro de las poblaciones	81	697.837	8.61527	79.00	$F_{ST}$ <b>0.21001*</b> 0.001±0.0003
	<b>Total</b>	92	859.946	10.90561		
Cyt- <i>b</i> 4 grupos	Entre grupos	3	101.900	2.25306	21.01	$F_{CT}$ <b>0.21005*</b> 0.004±0.0006
	Entre poblaciones dentro de grupos	8	60.209	-0.14212	-1.32	$F_{SC}$ -0.01677 0.777±0.004
	Dentro de las poblaciones	81	697.837	8.61527	80.32	$F_{ST}$ <b>0.19680*</b> 0.001±0.0003
	<b>Total</b>	92	859.946	10.72620		
COI 2 grupos	Entre grupos	1	44.703	6.47370	46.87	$F_{CT}$ 0.46873 0.090±-0.002
	Entre poblaciones dentro de grupos	9	73.622	0.18927	1.37	$F_{SC}$ 0.02579 0.253±0.004
	Dentro de las poblaciones	50	357.413	7.14826	51.76	$F_{ST}$ <b>0.46873*</b> 0.002±0.0004
	<b>Total</b>	60	475.738	13.81123		

- *Reconstrucción filogenética*

El modelo de sustitución seleccionado para la matriz con ambos genes mitocondriales fue el GTR + gamma. El árbol consenso obtenido por Inferencia Bayesiana (Fig. 9) sustentó las poblaciones de *E. lemae* del centro de México como un grupo monofilético (0.69 PP), separado de otras especies de *Emersonella*. Sin embargo, no fue posible separar los haplotipos entre poblaciones, aunque se formaron dos grupos que incluyen el Clado 1 (dos secuencias de Valsequillo y Tzintzuntzan) y el resto de los individuos (1.0 PP). Así las poblaciones formaron un grupo parafilético (0.99 PP). También, la secuencia

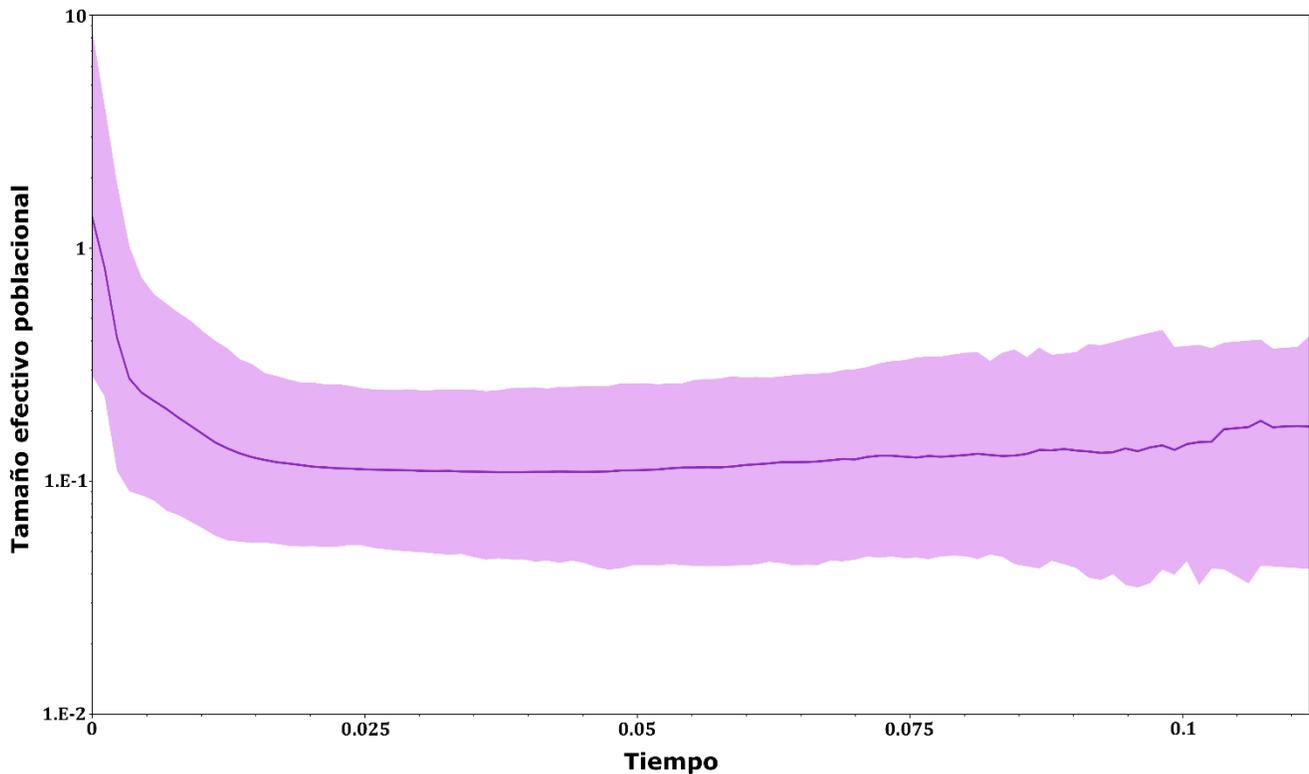
de *E. lemae* de Costa Rica se agrupó con el género *Horismenus*, aunque con una baja probabilidad (0.5 PP).



**Figura 9.** Árbol consenso derivado de un análisis Bayesiano de 30 millones de generaciones a partir de una matriz concatenada con los genes (*Cyt-b* y *COI*). Los valores de probabilidad posterior se muestran en cada nodo. También se muestran los haplotipos para cada individuo y las poblaciones que lo comparten.

- *Demografía histórica*

Se utilizó el modelo GTR + gamma y sitios invariantes para el análisis bayesiano de la demografía histórica. El gráfico de *skyline* con ambos marcadores mitocondriales (Fig. 10) muestra un tamaño estable la mayor parte del tiempo, pero hacia el presente existe un marcado crecimiento poblacional. Al realizar los análisis separados para cada marcador, predominó un tamaño poblacional constante y en el último periodo de tiempo se observó una ligero decline demográfico (Anexo 6).



**Figura 10.** Gráfico de *Skyline* bayesiano representando la historia demográfica de *Emersonella lemae* con ambos genes mitocondriales.

Para ambos marcadores los valores de la  $D$  de Tajima a nivel poblacional fueron no significativos. Con *Cyt-b* resultaron positivos para la mayoría de ellas, a excepción de Teotihuacán, Valsequillo, Tzintzuntzan y Toluca. Para COI, los valores fueron positivos para Pedregal, Texcoco y Requena; negativos para Tzintzuntzan y Progreso. Respecto a la prueba  $F_s$  de Fu, tampoco se obtuvieron valores significativos a nivel poblacional (Anexo 7).

Al evaluar las pruebas de neutralidad con todas las poblaciones del centro de México, se obtuvo una  $D$  de Tajima negativa y no significativa para *Cyt-b* (-0.01984,  $p=0.552$ ) y COI (-0.08771,  $p=0.550$ ).

Por otro lado, los resultados de la prueba *F<sub>s</sub>* de Fu fueron negativos y estadísticamente significativos con ambos marcadores: *Cyt-b* (-16.09709, *p*=0.005) y *COI* (-12.57035, *p*=0.005). Estos valores permiten rechazar la hipótesis de neutralidad, debido a dos posibles causas: a) selección natural y b) una expansión reciente de la población, que coincide con los resultados del análisis de *skyline*.

## VII. DISCUSIÓN

Los parasitoides, por su estilo y estrategia de vida, establecen una interacción estrecha y muy interesante con su insecto y planta hospedera. Conocer a los parasitoides nos permite conocer todo el sistema tritrófico y explorarlo desde distintas perspectivas.

### **Interacción *Datura stramonium*-*Lema daturaphila*: volátiles**

Aunque todos los días las plantas emiten gran cantidad de VOCs (*volatile organic compounds*) algunos de ellos se sintetizan *de novo* o se liberan a altas cantidades en presencia de insectos herbívoros (Douma *et al.*, 2019). En este trabajo, el análisis de *D. stramonium* en respuesta a la presencia, herbivoría y estado de desarrollo de *L. daturaphila* reveló seis diferentes compuestos orgánicos volátiles. En el Cuadro 7 se presenta una síntesis de algunas de las plantas (o insectos) donde también se han detectado los volátiles identificados. Asimismo, se incluyen algunos de los insectos que han respondido a su emisión, ya sean herbívoros, parasitoides o depredadores.

El 2-Hexenal, (E)- y el 3-Hexen-1-ol, (Z)- fueron los volátiles liberados en mayor cantidad. Estos compuestos son responsables del olor fresco de las hojas verdes (Hatanaka *et al.*, 1999), son ubicuos en la mayoría de las plantas, pero cuando hay estrés en los tejidos, las vías productoras de GLVs se activan rápidamente para producirlos en grandes cantidades (Ameye *et al.*, 2018). De esta forma, son unos de los primeros volátiles liberados después del daño (James, 2005).

Por su rápida emisión, los GLVs pueden proveer información inmediata sobre la ubicación del herbívoro que está atacando (Scala *et al.*, 2013). Pero debido a que carecen de especificidad, se ha sugerido que el 2-Hexenal, (E)- y el 3-Hexen-1-ol, (Z)- actúan como claves de largo alcance en lugar de ser claves directamente asociadas con el herbívoro (Takabayashi *et al.*, 1998; Rodrigues *et al.*, 2014). Así, permiten a los enemigos naturales encontrar el hábitat de su huésped y de hecho pueden generar un vuelo orientado en algunos parasitoides (Cuadro 7, Takabayashi *et al.*, 1995; Birkett *et al.*, 2003; Mao *et al.*, 2018). Sin embargo, su emisión disminuye rápidamente después de las primeras etapas de infestación y entonces otros compuestos guían la búsqueda del parasitoide (Turlings *et al.*, 1998; Birkett *et al.*, 2003).

**Cuadro 7.** Compuestos orgánicos volátiles de un mismo genotipo de *Datura stramonium*: fórmula, grupo químico y tiempo de retención (RT). Se muestran algunas de las plantas donde se han detectado y su función en diferentes sistemas biológicos como atrayentes de: herbívoros (**h**), parasitoides (**p**) o depredadores (**d**). Se incluye la referencia de dichas investigaciones.

Compuesto	RT (min)	Especies de plantas	Función	Referencia
<b>2-Hexenal, (E)-</b> C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O Aldehído	11.3	<i>Morus alba</i> (Moraceae), <i>Gossypium hirsutum</i> (Malvaceae), <i>Brassica oleracea</i> , y <i>Rorippa indica</i> (Brassicaceae), *excrementos de <i>Pieris rapae</i> ( <b>h</b> ).	Estimula antenas y atrae a <i>Microplitis croceipes</i> y <i>Cotesia marginiventris</i> ( <b>p</b> , Hymenoptera) e <i>Hyphantria cunea</i> ( <b>h</b> , Lepidoptera). Atrayente de <i>Geocoris pallens</i> ( <b>d</b> , Hemiptera), <i>Spodoptera litura</i> ( <b>h</b> , Lepidoptera), <i>C. glomerata</i> y <i>Aphidius rophalosiphi</i> ( <b>p</b> , Hymenoptera),	Ngumbi <i>et al.</i> , 2009, 2010, 2012; James, 2005; Agelopoulos y Keller, 1994; Wickremasinghe y van Emden, 1992; Du <i>et al.</i> , 2022; Takabayashi <i>et al.</i> , 1998.
<b>3-Hexen-1-ol, (Z)-</b> C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O Alcohol	11.7	<i>Phaseolus vulgaris</i> (Fabaceae), <i>G. hirsutum</i> , <i>Zea mays</i> (Poaceae), <i>Solanum tuberosum</i> (Solanaceae), <i>B. oleracea</i> y <i>R. indica</i> .	Atrayente de <i>Orius tristicolor</i> ( <b>d</b> , Hemiptera), <i>Stethorus punctum picipes</i> ( <b>d</b> , Coleoptera), <i>Leptinotarsa decemlineata</i> ( <b>h</b> , Coleoptera), <i>Encarsia formosa</i> , <i>Anagrus daanei</i> , <i>A. rophalosiphi</i> , <i>C. kariyai</i> y <i>C. glomerata</i> ( <b>p</b> , Hymenoptera), avispas de la familia Braconidae ( <b>p</b> ) y otros micro-Hymenoptera ( <b>p</b> ).	Birkett <i>et al.</i> , 2003; James, 2005; Ngumbi <i>et al.</i> , 2009; Wickremasinghe y van Emden, 1992; Du <i>et al.</i> , 2022; Takabayashi <i>et al.</i> , 1998; Weissbecker <i>et al.</i> , 1999.
<b>(S)-3-Ethyl-4-methylpentanol</b> C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> O Alcohol	16.4	<i>Vitis vinífera</i> (*vino, Vitaceae), <i>Apocynum lactifolium</i> (Apocynaceae), <i>Coffea arabica</i> y <i>C. canephora</i> (Rubiaceae), <i>Torenia hybrida</i> y <i>T. fournieri</i> (Scrophulariaceae), *feromonas sexuales de <i>Polyergus rufescens</i> y <i>P. breviceps</i> .	<i>Hypothenemus hampei</i> ( <b>h</b> , Coleoptera), <i>Phytoseiulus persimilis</i> ( <b>d</b> , Mesostigmata), *machos de <i>P. rufescens</i> y <i>P. breviceps</i> (Hymenoptera: Formicidae).	Meng <i>et al.</i> , 2011; Kim <i>et al.</i> , 2021; Mendesil <i>et al.</i> , 2009; Castracani <i>et al.</i> , 2008; Greenberg <i>et al.</i> , 2007; Cruz y Malo, 2013; Shimoda <i>et al.</i> , 2012.
<b>1-Hexanol, 2-ethyl-</b> C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> O Alcohol	16.6	<i>B. oleracea</i> , <i>Triadica sebifera</i> (Euphorbiaceae), <i>Asparagus officinalis</i> (Asparagaceae), <i>Olea europaea</i> (Oleaceae), *larvas de <i>Heliothis virescens</i> .	Atrayente de <i>Bemisia tabaci</i> ( <b>h</b> , Hemiptera), <i>Bikasha collaris</i> ( <b>h</b> , Coleoptera), <i>Ostrinia nubilalis</i> ( <b>h</b> , Lepidoptera).	Kong <i>et al.</i> , 2016; Sun <i>et al.</i> , 2019; Ingrao <i>et al.</i> , 2019; Du <i>et al.</i> , 2022; Solé <i>et al.</i> , 2010; Morawo y Fadamiro, 2016; Caselli <i>et al.</i> , 2021.

<b>Nonanal</b> C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O Aldehído	18.5	<i>T. sebifera</i> , <i>A. officinalis</i> , <i>S. tuberosum</i> , <i>B. oleracea</i> , <i>Z. mays</i> , <i>Aquilaria sinensis</i> (Thymelaeaceae), *feromonas sexuales de <i>Galleria mellonella</i> .	Atrayente de <i>B. collaris</i> (h), <i>Erigonidium graminicolum</i> (d, Araneae), <i>O. similis</i> (d), <i>L. decemlineata</i> (h), <i>C. plutellae</i> (p), <i>O. nubilalis</i> (h), <i>M. mediator</i> (p), <i>Bracon hebetor</i> (p, Hymenoptera), <i>Heortia vitessoides</i> (h, Lepidoptera), <i>Cantheconidea concinna</i> (d, Hemiptera).	Sun <i>et al.</i> , 2019; Yu <i>et al.</i> , 2008; Dickens <i>et al.</i> , 2002; Du <i>et al.</i> , 2022; Yang <i>et al.</i> , 2016; Solé <i>et al.</i> , 2010; Yu <i>et al.</i> , 2010; Dweck <i>et al.</i> , 2010; Qiao <i>et al.</i> , 2018.
<b>Decanal</b> C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O Aldehído	20.8	<i>B. oleracea</i> , <i>Z. mays</i> , <i>G. hirsutum</i> , <i>A. sinensis</i> , <i>S. tuberosum</i> , *larvas de <i>H. virescens</i> (h), *feromonas sexuales de <i>G. mellonella</i> .	<i>S. litura</i> (h), <i>O. nubilalis</i> (h), <i>M. croceipes</i> (p); <i>C. concinna</i> (d); estimula antenas de <i>M. mediator</i> (p), <i>B. hebetor</i> (p), <i>H. vitessoides</i> (h) y <i>Perillus bioculatus</i> (d, Hemiptera).	Du <i>et al.</i> , 2022; Solé <i>et al.</i> , 2010; Morawo y Fadamiro, 2016; Yu <i>et al.</i> , 2010; Dweck <i>et al.</i> , 2010; Qiao <i>et al.</i> , 2018; Weissbecker <i>et al.</i> , 1999.

El 1-Hexanol-2-ethyl y el Nonanal fueron los volátiles que se presentaron en todos los tratamientos en cantidades intermedias. Ambos se han reportado en plantas sin daño, con daño mecánico y con daño por herbívoros (Ingrao *et al.*, 2019). Son considerados importantes para localizar la planta hospedera de algunos insectos herbívoros y se ha observado que su emisión incrementa en plantas infestadas (Kong *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2019). El primero de ellos se ha reportado en plantas de *D. stramonium* infectadas con el virus TSWV (*Tomato spotted wilt virus*). Su emisión incrementó la preferencia y oviposición de *Bemisia tabaci* en comparación con plantas sin virus (Chen *et al.*, 2017).

Respecto al Nonanal, se trata de un compuesto muy común en diversas plantas. En *Solanum tuberosum* es el volátil más abundante en ausencia de daño (Dickens, 2006). Su emisión incrementa con la infestación y regurgitación de *Spodoptera litura* (Du *et al.*, 2022) y en combinación con otras feromonas y volátiles, puede ser atractivo para *Leptinotarsa decemlineata* (Yu *et al.*, 2008). Es muy importante como señal para los insectos herbívoros y, en otras solanáceas como *Nicotiana tabacum*, está involucrado en la elección del sitio de oviposición de *Helicoverpa assulta*, a pesar de su baja abundancia (Solé *et al.*, 2010; Qiao *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2020). Además, se ha detectado en las feromonas sexuales de la mariposa *Galleria mellonella* (Dweck *et al.*, 2010) y aunque es usado por muchos herbívoros, también puede atraer parasitoides y depredadores como arañas y hemípteros (Yu *et al.*, 2008; Dweck *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2016).

El (S)-3-Ethyl-4-methylpentanol junto con el Decanal, fueron los compuestos menos abundantes en *D. stramonium*. Aunque se han detectado en bajos niveles en otras plantas, pueden ser cruciales para determinadas interacciones planta-herbívoro (Cuadro 7). El primero está presente en el aroma floral de *Torenia* y *Apocynum lancifolium* (Shimoda *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2021), así como en las feromonas sexuales de las hormigas *Polyergus breviceps* (Greenberg *et al.*, 2007). Debido a que es un compuesto inusual, podría ser importante para distinguir a las plantas que lo producen. Sin embargo, en *Coffea arabica* se sospecha que la combinación del (S)-3-Ethyl-4-methylpentanol con otros volátiles es lo que incrementa la atracción de herbívoros como *Hypothenemus hampei*, en lugar del compuesto por sí solo (Mendesil *et al.*, 2009).

En cuanto al Decanal, se trata de otro compuesto utilizado por diversos insectos herbívoros para localizar a su planta hospedera (Solé *et al.*, 2010; Qiao *et al.*, 2018; Du *et al.*, 2022). Se ha reportado que su emisión es baja al inicio de la infestación, pero incrementa después del segundo día a la par que decrementa la emisión de GLVs (Qiao *et al.*, 2018). Es una señal clave para la atracción de algunos parasitoides (Dweck *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2010; Morawo y Fadamiro, 2016). De hecho, se ha reportado como parte de los volátiles que liberan las larvas de *Heliothis virescens* cuando comen exclusivamente plantas de algodón, por lo que el Decanal se convierte en un elemento necesario para que los parasitoides reconozcan la presencia de su huésped (Ngumbi *et al.*, 2009; Morawo y Fadamiro, 2016).

Considerando esto, aunque los 6 compuestos tienen un papel fundamental como mediadores entre planta-insecto, sus funciones pueden ser muy diversas según el contexto ecológico y las especies que interactúan. En el género *Datura*, la producción de volátiles como defensas indirectas ha sido poco explorada y la mayoría de los resultados se centran en *D. wrightii*, donde los análisis con GC-MS han detectado hasta 27 compuestos diferentes (Zhang *et al.*, 2022). Bajo herbivoría con *L. daturaphila*, el compuesto más abundante ha sido (E)- $\beta$ -cariophyllene (Hare, 2007), aunque también se ha detectado 3-Hexen-1-ol, (Z) en altos niveles, así como 2-Hexenal, (E), Decanal y 1-Hexanol, 2-ethyl (Hare, 2007; Hare y Sun, 2011b; Wilson *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2022). Cuando *D. wrightii* está expuesta a daño por *Manduca sexta* también se ha reportado la presencia de Nonanal (Fraser *et al.*, 2003) y como parte de su aroma floral se incluye el 3-Hexen-1-ol, (Z) (Raguso *et al.*, 2003).

La mayoría de los volátiles liberados por la herbivoría de *L. daturaphila* en *D. wrightii* también han sido liberados en plantas sin daño, aunque en menores concentraciones (Hare, 2007). Al combinar el daño con el herbívoro generalista *Tupiocoris notatus*, la composición de las mezclas no cambió, sólo

se elevaron las cantidades emitidas (Hare y Sun, 2011b). De manera similar, en este trabajo con *D. stramonium* la mayoría de los compuestos estuvieron presentes en todos los tratamientos, incluso en ausencia de daño, con daño artificial o con daño por el herbívoro generalista *S. purpurascens*. Sin embargo, la cantidad de volátiles detectados fue mucho menor y no hubo diferencias cuantitativas entre tratamientos.

Una posible explicación es que los cambios no se detectaron debido al tiempo de colecta utilizado. En este caso, sólo se realizó una medición 24 h después del inicio de la infestación. Anteriormente se ha demostrado que la composición y cantidad de los volátiles emitidos varía a través del tiempo (Turlings *et al.*, 1998; Birkett *et al.*, 2003). En *D. wrightii*, por ejemplo, la producción de HIPVs comienza el día del daño, alcanza sus niveles máximos 1-2 días después y su producción persiste hasta una semana (Hare y Sun, 2011b), por lo que el tiempo puede ser un factor muy importante en la composición de los volátiles emitidos y detectados.

De igual forma, la producción de compuestos orgánicos volátiles puede variar con las fluctuaciones ambientales (Loreto *et al.*, 2006). Así, la temperatura del aire, la humedad relativa y el estado hídrico de la planta pueden ser los principales factores que determinen la cantidad y calidad de los VOCs producidos (Wilson *et al.*, 2018). Este ruido ambiental puede ser tan grande, que minimice y oculte los cambios generados por la herbivoría (Wilson *et al.*, 2018), por lo que es importante no ignorar su papel en la producción de volátiles en condiciones naturales (Hare y Sun, 2011a). Por ejemplo, con *D. wrightii* la emisión de VOCs es diferente entre temporadas, incluso la producción en plantas sin daño puede exceder a la de plantas con herbívoros (Hare y Sun, 2011a). En nuestro caso, el tiempo en que se aplicó el daño y los días en que se realizaron las mediciones, parecen haber influido en la variación de los volátiles. Ya que las plantas de *D. stramonium* se mantuvieron en condiciones de invernadero (donde se controló el estado hídrico y los nutrientes de las plantas) y las mediciones se realizaron en laboratorio, es posible que dichos factores abióticos influyeran en la emisión total de volátiles.

Los cambios por condiciones ambientales pueden sugerir que la producción de VOCs es un indicador general y no específico del daño por herbívoros, sobretudo en ausencia de enemigos naturales especialistas que puedan potenciar la evolución de mezclas específicas (Hare y Sun *et al.*, 2011b). Sin embargo, en el sistema tritrófico que se establece sobre *D. stramonium*, todos los parasitoides ejercen una fuerte presión sobre la sobrevivencia de *L. daturaphila*, por lo que la emisión de VOCs podría no reducirse sólo a la variación ambiental. En *D. wrightii*, aunque el 3-Hexen-1-ol, (Z), el Nonanal y el

Decanal han desencadenado una respuesta y atracción de herbívoros como *M. sexta* (Fraser *et al.*, 2003; Allmann *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2022), también son mediadores de interacciones con el tercer nivel trófico.

Bajo herbivoría con *L. daturaphila*, se ha observado que altos niveles de producción de VOCs en *D. wrightii* están relacionados con altos niveles de depredación de larvas por *Geocoris pallens* (Hare y Sun, 2011a). También, altos niveles de 2-Hexenal, (E) tienen un papel importante en la atracción de insectos depredadores del herbívoro *M. sexta*: la herbivoría de estas larvas o la aplicación de sus OS en plantas de *D. wrightii* induce una mayor producción de este compuesto, por lo que *M. sexta* prefiere ovipositar en plantas donde haya mayor producción del isómero 3-Hexenal, (Z), sin importar que haya mayor competencia entre larvas (Allmann *et al.*, 2013). Dentro de los enemigos naturales de *M. sexta* que pueden responder a los volátiles liberados por *D. wrightii* se encuentran los parasitoides de huevo *Trichogramma deion* y *T. sathon* (Wilson y Woods, 2016), así como los parasitoides de larva *Drino rhoeo* (Diptera, Wilson y Woods, 2015) y *Cotesia congregata* (Hymenoptera, Zhang *et al.*, 2022).

Con esta última especie, existe una interacción mediada por los volátiles liberados bajo herbivoría de *L. daturaphila*. Las hembras de *M. sexta* prefieren ovipositar en plantas infestadas con larvas de este escarabajo, debido a que los volátiles liberados por *D. wrightii* son menos atractivos para *C. congregata*, en comparación con los VOCs que se liberan sólo con *M. sexta*. Entre los compuestos más abundantes del *headspace* alrededor de *D. wrightii* se encuentra el 3-Hexen-1-ol, (Z) que, en combinación con otros compuestos, fue atractivo para *M. sexta* en presencia de *L. daturaphila* (Zhang *et al.*, 2022).

Entonces, ¿podrían estos compuestos volátiles significar algo para los parasitoides de *L. daturaphila* sobre *D. stramonium*?, la respuesta es que muy probablemente sí. La mayoría de estos VOCs son fundamentales en diversas interacciones planta-parasitoides y, en una especie hermana como *D. wrightii* se ha demostrado su potencial como infoquímicos. *Lema daturaphila* es capaz de suprimir defensas directas en *D. stramonium* como la producción de atropina y escopolamina (Zhang *et al.*, 2022), por lo que las defensas indirectas pueden ser una gran alternativa para enfrentarse a este depredador. Aun así, es importante considerar que las mezclas de volátiles también pueden evolucionar directamente contra los herbívoros (Zu *et al.*, 2020). Por el momento, aunque no se detectaron diferencias cuantitativas entre tratamientos, es importante recordar que en muchos casos la proporción de los compuestos dentro de las mezclas es lo que determina la atracción de un insecto (Fukushima *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2022).

De esta forma, un aspecto a mejorar es el uso de un control estándar de los compuestos para tener una cuantificación más precisa de cada uno y estimar su proporción.

Aun así, se lograron identificar diferencias cualitativas a partir de la detección del (S)-3-Ethyl-4-methylpentanol y el Decanal. Su presencia y abundancia relativa permitió distinguir al tratamiento de Huevos de *L. daturaphila* como el más diverso. Estos compuestos podrían ser una señal importante para *E. lemae*, quien parasita en altos niveles los huevos de *L. daturaphila* (Villanueva-Hernández, 2019). Aunque su presencia en los tratamientos con Daño artificial + OS y Herbivoría por especialistas + generalistas podría indicar que también son importantes para los parasitoides de las larvas de este crisomélido.

En consecuencia, es indispensable probar de manera experimental el efecto de todos estos VOCs en la atracción de los parasitoides de *L. daturaphila*. Sólo de esta forma se pueden tener resultados certeros sobre el papel de los volátiles como defensas indirectas en *D. stramonium*. Otro aspecto importante es determinar la fuente de origen de cada uno de los compuestos, es decir, si derivan de la planta, del herbívoro o de ambos. De igual forma, es necesario tomar en cuenta la importancia de las fluctuaciones ambientales sobre la producción de VOCs, principalmente en condiciones naturales. Y por último, es importante evaluar la emisión de volátiles entre diferentes genotipos y poblaciones de *D. stramonium*. En este estudio sólo trabajamos con un genotipo de una población, pero sabemos que la infestación de parasitoides difiere a nivel local y la emisión de VOCs podría ser un factor determinante en estas variaciones poblacionales. Por ahora, estos resultados constituyen un primer paso para entender las dinámicas químico-ecológicas que median la interacción *D. stramonium*-*L. daturaphila*-parasitoides.

### **Variación genética a nivel geográfico en *Emersonella lemae***

La diversidad y dinámicas poblacionales de los parasitoides nos ayudan a entender cómo interactúan con los niveles tróficos inferiores. En este trabajo, analizamos la diversidad y estructura genética de *E. lemae* en el centro de México, guiados por los siguientes hallazgos: 1) es un parasitoide muy abundante y causa una alta mortalidad en las poblaciones de *L. daturaphila* y 2) está presente incluso en las poblaciones recién colonizadas por la planta y el escarabajo.

- *Diversidad genética*

En general, *E. lemae* mostró una alta diversidad en ambos genes mitocondriales. En otras especies de parasitoides ya se ha reportado un alto número de haplotipos o una diversidad nucleotídica similar, por

ejemplo, en *Anastatus orientalis* ( $Hd=0.583-0.911$ ,  $\pi=0.0027-0.0089$ ; Manzoor *et al.*, 2021), *Orthopelma mediator* ( $Hd=0.82$ ; Kohnen *et al.*, 2012), *Baryscapus servadeii* ( $h=87$ ,  $\pi=0.016$ ; Auger-Rozenberg *et al.*, 2015), *Megastigmus dorsalis* ( $h=89$ ; Nicholls *et al.*, 2010) y *Pnigalio mediterraneus* ( $h=53$ ,  $Hd=0.656-0.943$ ,  $\pi=0.00304-0.00719$ ; Gebiola *et al.*, 2014). Aunque otros parasitoides también muestran poca o ninguna variación en estos genes altamente conservados (Seyahooei *et al.*, 2011), se ha demostrado que el ADN mitocondrial de estos organismos generalmente es muy diverso, y esta variación se ha asociado con el estilo de vida de los parasitoides, la asociación con sus hospederos y las diferencias en sus ciclos de vida (Dowton y Austin, 1995; Oliveira *et al.*, 2008).

Aunque COI fue un marcador más difícil de amplificar y por tanto hubo un menor tamaño de muestra, fue posible observar que las secuencias de *E. lemae* correspondientes a Cyt-*b* fueron ligeramente más diversas. Estas diferencias se han reportado en insectos, pero en general se sabe que ambos genes tienen un nivel de variación similar (Simmons y Weller, 2001). Lo que sí fue evidente, es que con ambos marcadores la población de Tzintzuntzan fue la más diversa. En esta localidad las puestas de huevos de *L. daturaphila* presentaron un parasitoidismo del 100% en el año de colecta (Villanueva-Hernández, 2019). En muestreos posteriores incluso ha sido imposible encontrar larvas o adultos del escarabajo, debido a que todos los huevos están infestados con *E. lemae* (obs. pers.). Otras poblaciones donde el parasitoidismo de huevos ha sido muy alto, son Pedregal, Valsequillo, Requena y Texcoco, mismas que también mostraron una alta diversidad nucleotídica y haplotípica en este estudio. Comúnmente se ha asociado una elevada variación genética con grandes tamaños poblacionales del organismo (Hague y Routman, 2016) y de su huésped, en el caso particular de los parasitoides (Anton *et al.*, 2007). Por lo que es posible que exista una relación positiva entre el tamaño poblacional y la diversidad genética de *E. lemae*. Aunque es cierto que en poblaciones como Toluca y Tlaxiaca hay bajos niveles de parasitoidismo (Villanueva-Hernández, 2019), y también bajos niveles de diversidad genética, es necesario incrementar el tamaño de muestra en estas poblaciones para tener un escenario más completo.

En comparación con el herbívoro huésped, *L. daturaphila* también muestra una alta diversidad haplotípica en el centro de México (Sierra-Guerrero, 2021), no obstante, en la mayoría de las poblaciones *E. lemae* es más diversa. Un claro ejemplo es la población de Dolores, donde el tamaño muestral de *E. lemae* para COI fue menor ( $n=3$ ) en comparación con *L. daturaphila* ( $n=6$ ), pero en esta última especie sólo se presentó un haplotipo, mientras que con *E. lemae* hubo tres diferentes. Con otras poblaciones como Texcoco o Pedregal, también existe una mayor diversidad genética en el parasitoide.

- *Estructuración genética*

No existe una tendencia clara de agrupación por localidades entre los haplotipos, pero las poblaciones que compartieron mayor número de ellos son las que se ubican sobre la región del Valle de México, es decir, Pedregal, Texcoco, Progreso y Requena. A estas mismas poblaciones corresponden los haplotipos más abundantes, sin embargo, la mayoría de ellos fueron únicos y se conectaron entre sí a través de múltiples reticulaciones con uno o varios pasos mutacionales, lo que también refleja la alta variación genética que existe en las poblaciones de esta especie.

Los grupos externos incluidos en ambas redes tampoco permitieron discriminar entre localidades geográficas. En el caso de *Cyt-b*, los haplotipos de *E. pubipennis* tuvieron mayor relación con Tlaxiaca, y para COI, el haplotipo de Costa Rica de *E. lemae* se asoció con Dolores. Pero el resto de los haplotipos de estas dos poblaciones y del resto de las localidades, estuvieron presentes a lo largo de toda la red. Este resultado puede relacionarse con los bajos niveles de diferenciación genética entre poblaciones. Aunque son muy pocos los haplotipos compartidos entre ellas, los valores de  $F_{ST}$  fueron bajos y no significativos para la mayoría, incluso en poblaciones más alejadas como Tzintzuntzan y Texcoco ( $Cyt-b=0.0039$ ,  $COI=0.0389$ ). Esto podría indicar, por un lado, el flujo génico histórico que ha habido entre las poblaciones, pero también la presencia de polimorfismos ancestrales que se han mantenido en ellas (Marko y Hart, 2011; Charlesworth, 2010).

La dispersión, colonización y el establecimiento de las poblaciones de *E. lemae*, podrían ser afectados por dinámicas poblacionales de los niveles tróficos inferiores, debido a que *D. stramonium* es una planta distribuida en hábitats perturbados y sus poblaciones suelen estar sujetas a las alteraciones antropogénicas. De esta forma, *D. stramonium* puede sufrir extinciones locales en periodos cortos de tiempo, teniendo consecuencias sobre *L. daturaphila* y a su vez, sobre *E. lemae*. Por ejemplo, en los años 2018 y 2019, *D. stramonium* y *L. daturaphila* tuvieron un tamaño poblacional grande en Toluca (Villanueva-Hernández, 2019), pero para 2020 esta población ya no existía. Estos cambios locales podrían propiciar que *E. lemae* se mueva constantemente entre poblaciones en búsqueda de recursos, como ocurre con otros parasitoides (Nair *et al.*, 2016).

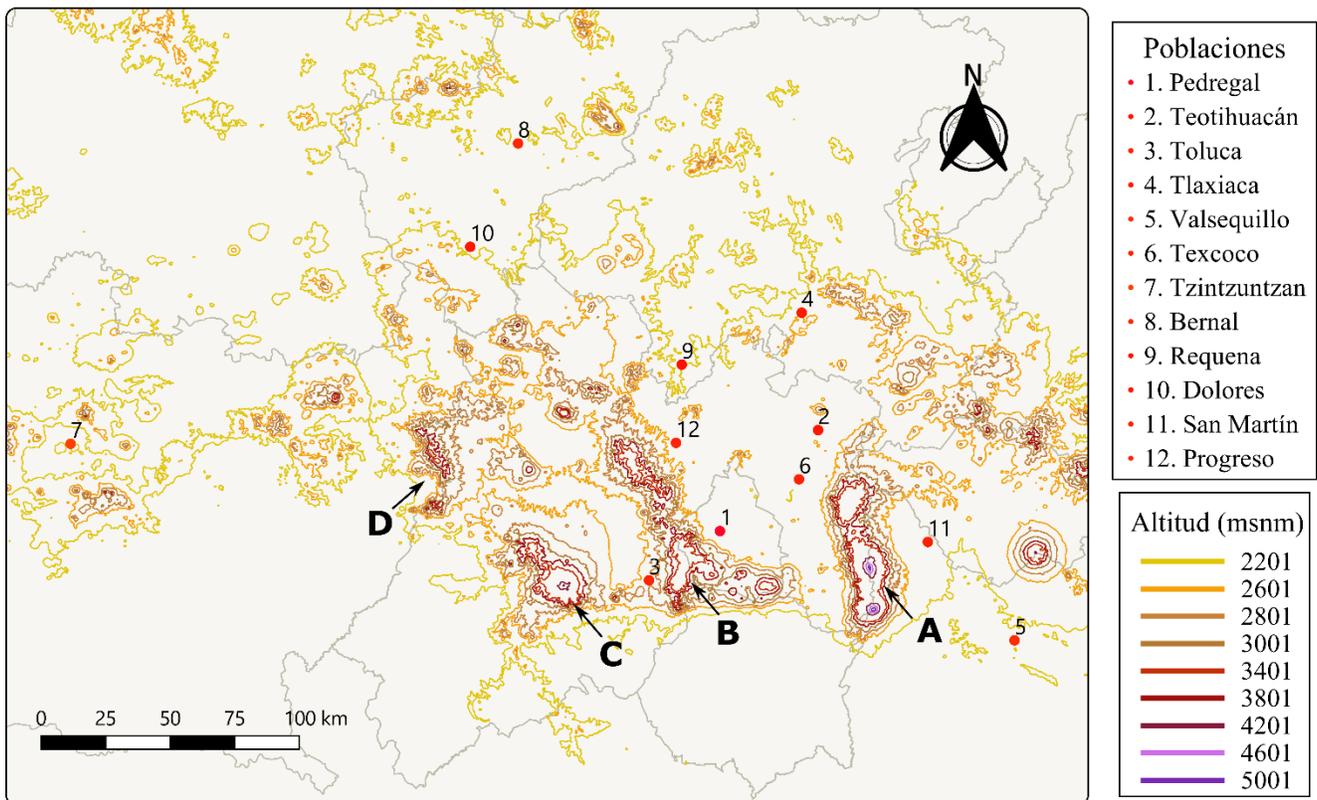
Pero ¿cómo es que un insecto tan pequeño se orienta en un ambiente tan grande y complejo para localizar a su huésped? Aunque se requieren estudios específicos, es probable que *E. lemae* logre dispersarse grandes distancias de forma pasiva a través del viento (Jourdie *et al.*, 2010a; Couchoux *et al.*, 2016) y posteriormente utilice claves químicas y visuales para encontrar los huevos de su escarabajo. En

esta última fase podrían ser muy importantes los compuestos orgánicos volátiles que libere *D. stramonium*. De esta forma, *E. lemae* podría ser capaz de localizar poblaciones recién colonizadas por *D. stramonium* y *L. daturaphila* (p. ej. en la localidad de Progreso, obs. pers.). Y por ello, aunque aún no podemos probar el flujo génico, sí podemos hablar de que existe una alta dispersión entre poblaciones. En Progreso, por ejemplo, los haplotipos presentes se compartieron con el resto de las poblaciones del Valle de México.

Sin embargo, también es posible que al ser un parasitoide pequeño, *E. lemae* se mueva por foresia utilizando a *L. daturaphila* como medio de transporte, un comportamiento que ya se ha reportado en este género (Cuignet *et al.*, 2007). Es importante recordar que un parasitoide no puede sobrevivir sin su insecto huésped, por lo que tienden a estar limitados a las mismas ubicaciones (Couchoux *et al.*, 2016). Aunque la mayoría de las poblaciones de *E. lemae* no mostraron estructuración genética significativa, también se observó una diferenciación estadísticamente significativa en dos de ellas: Valsequillo y Toluca. Este patrón es similar al de las poblaciones del centro de México de su insecto huésped, *L. daturaphila* (Sierra-Guerrero, 2021). Entre estas dos localidades y el resto de las poblaciones, existen dos barreras geográficas importantes. Valsequillo se ubica dentro de la zona neovolcánica de México en el estado de Puebla, hacia el este de la Sierra Nevada, donde se encuentran específicamente los volcanes Popocatepetl e Iztaccíhuatl, con una altitud de hasta 5,500 m.s.n.m. (Fig. 11A) (Yarza de De la Torre, 2003). Aunque Valsequillo comparte algunos haplotipos con Pedregal, Dolores y Requena, en general muestra diferenciación con todas las poblaciones, a excepción de San Martín y Bernal. Sus haplotipos se caracterizan por conectarse a través de un alto número de pasos mutacionales, por lo que esta barrera podría estar restringiendo el flujo génico y promoviendo la diferenciación de esta población. Con *L. daturaphila* no existen datos de esta localidad, pero sí de San Martín, que geográficamente está aislada por la presencia de las mismas montañas.

Por otra parte, la población de Toluca se ubica en el centro del Estado de México y está rodeada por diferentes montañas del Eje Volcánico Transversal. La principal es la Sierra del Ajusco-Chichinauhtzin (Fig. 11B), que conforma el límite sur de la cuenca de México (Urrutia-Fucugauchi y Martín del Pozzo, 1993) y separa a Toluca de las poblaciones del noreste de esta barrera. Se caracteriza por albergar bosques de coníferas y pastizales de alta montaña y su máxima altitud se alcanza en el volcán Ajusco, con 3937 m.s.n.m., por lo que podría representar un límite a la dispersión de *E. lemae*. Con *Cyt-b*, los individuos de Toluca mostraron una moderada diferenciación respecto a las poblaciones del otro

lado de esta barrera (Dolores, Progreso, Requena y Texcoco). El valor más alto de  $F_{ST}$  se presentó respecto a Valsequillo (0.3894) y con Pedregal la diferencia no fue significativa ( $F_{ST}=0.1602$ ). Para COI tampoco se detectaron valores estadísticamente significativos, pero probablemente se deba al tamaño muestral pequeño. Una coincidencia importante, es que la población de Toluca de *L. daturaphila* también mostró gran diferenciación respecto a las poblaciones separadas por esta barrera (Sierra-Guerrero, 2021). Por tanto, aunque *E. lemae* se dispersa ampliamente entre localidades, está siguiendo una trayectoria similar con su insecto huésped y ambos se ven afectados por las mismas barreras geográficas.



**Figura 11.** Mapa topográfico con las ubicaciones de las poblaciones de *Emersonella lemae*. Se muestran las curvas de nivel correspondientes a diferentes altitudes y se indica la ubicación de la Sierra Nevada (A), la Sierra del Ajusco-Chichinauhtzin (B), el Nevado de Toluca (C) y las montañas del límite Estado de México-Michoacán (D).

Del lado oeste, la población de Toluca está rodeada por otras elevaciones como el Nevado de Toluca (Fig. 11C) y las montañas ubicadas en el límite Estado de México y Michoacán (Fig. 11D). Dichas barreras posiblemente influyeron en su diferenciación respecto a Tzintzuntzan. Los patrones de estructuración genética con Toluca y Valsequillo, también se explicaron a través de la prueba de AMOVA, donde la agrupación a partir de las barreras geográficas explicó un gran porcentaje de la variación (20.81% con *Cyt-b* y 46.87% con COI). Con *Cyt-b*, la separación de Tlaxiaca también ayudó

a explicar la distribución de la varianza genética. Además de Valsequillo, esta población mostró diferenciación significativa con Progreso y Requena, a pesar de encontrarse relativamente cerca y sin ninguna barrera geográfica notable entre ellas. En estos casos, la diferenciación podría asociarse con contrastes en las condiciones climáticas de las regiones, sin importar las distancias geográficas entre ellas (Seyahooei *et al.*, 2011). Tlaxiaca, aunque comparte vegetación del Valle del Mezquital con Requena, se encuentra en una zona más árida en comparación con ésta y Progreso (Gobierno del Estado de Hidalgo, 2002). Sin embargo, sería necesario un mayor número de individuos para corroborar estas diferencias.

- *Reconstrucción filogenética*

En el árbol construido por Inferencia Bayesiana, no fue posible resolver las relaciones entre los haplotipos de las diferentes poblaciones del centro de México. La politomía que se encontró puede deberse a que los haplotipos presentes han dado origen a otra variedad de ellos al mismo tiempo, pero también a que los marcadores o la cantidad de datos no contenían suficiente señal filogenética como para resolver relaciones a nivel intraespecífico (Walsh *et al.*, 1999). Por tal razón, es necesario emplear otras alternativas (p. ej. marcadores menos conservados) para verificar que no se trata de politomías blandas.

Un resultado interesante es que se formó un clado entre dos secuencias de poblaciones distantes: Valsequillo y Tzintzuntzan. Ambos haplotipos mostraron los niveles más altos de variación en comparación con el resto de las poblaciones, lo cual fue muy evidente durante el alineamiento múltiple de secuencias. Además, el individuo perteneciente a Valsequillo corresponde a un muestreo realizado durante el 2018, lo cual podría indicar que también es importante la variación genética a nivel temporal.

A pesar de la alta diversidad genética, todas las poblaciones formaron un grupo único, separado de otras especies del género *Emersonella*. Esto nos ayuda a confirmar que en el Centro de México, *E. lemae* es un grupo monofilético y no un complejo de especies crípticas (Haine *et al.*, 2006). Una gran diversidad también se observó con la secuencia de *E. lemae* proveniente de Costa Rica, que se enlazó en la red de COI a través de un gran número de haplotipos y pasos mutacionales y que finalmente se agrupó con *Horismenus*, un género hermano. Este resultado podría deberse a distintos factores, como la distancia geográfica o a la diferencia de huésped (Nicholls *et al.*, 2017). En Costa Rica, *E. lemae* parasita los huevos de un crisomélido del género *Neochlamisus* (Forbes y Funk, 2013).

- *Demografía histórica*

Debido a que ambos genes mitocondriales son universales, están involucrados en la respiración celular y muestran un nivel de variación similar en insectos (Adams y Palmer, 2003; Simmons y Weller, 2001), se esperaría que estén bajo presiones parecidas y muestren una historia demográfica concordante. De acuerdo con esta premisa, los análisis de *skyline* de los genes por separado recuperaron un patrón parecido entre ellos (Anexo 6). Al analizarse en conjunto, ambos genes soportaron un crecimiento en el tamaño poblacional de *E. lemae* en el periodo más reciente de tiempo. Este incremento poblacional también se sustentó con los resultados de la prueba *F<sub>s</sub>* de Fu.

Como carecemos de edades de divergencia para escalar a tiempo real los datos de este análisis, no es posible asociar las diferencias en el tamaño poblacional con eventos históricos. Estudios similares con otros insectos, han sugerido una expansión poblacional asociada a una dispersión a través del Eje Neovolcánico Transversal (Zúñiga *et al.*, 2006; Anducho-Reyes *et al.*, 2008; De-la-Mora *et al.*, 2015). En este caso es evidente que las montañas del Centro de México tienen un papel fundamental en la distribución de *E. lemae*, pero es importante complementar esta información (p. ej. con tiempos de divergencia de éstas y otras poblaciones) para inferir cómo sucedió su expansión a través de ellas.

Por último, es conveniente señalar que *E. lemae* es una de las dos especies del género *Emersonella* que están presentes en la zona Neártica, ya que la mayoría tienen una distribución Neotropical (Alvarenga *et al.*, 2015). Existen reportes sobre la presencia de *E. lemae* al norte y sur de México, por lo que sería valioso incluir individuos de estas poblaciones para tener un panorama más completo sobre la dispersión y el crecimiento poblacional de esta especie.

## VIII. CONCLUSIONES

Este trabajo ayudó a comprender la biología y la estructura genética poblacional del sistema tritrófico *Datura stramonium-Lema daturaphila*-parasitoides (en específico *E. lemae*). Los principales resultados indican que la herbivoría y presencia de *L. daturaphila* inducen la liberación de VOCs que podrían ser usados por los parasitoides para localizar a su huésped. Asimismo, se encontró una alta diversidad genética en el parasitoide *E. lemae*, se sugiere una alta dispersión entre sus poblaciones, pero también una estructuración filogeográfica similar a la de *L. daturaphila*. Al igual que su insecto huésped, su historia poblacional parece estar estrechamente relacionada con la orografía del centro de México, específicamente con el Eje Neovolcánico Transversal. Para complementar estos resultados, es necesario

probar directamente la atracción de los parasitoides hacia los diferentes VOCs de *D. stramonium*, así como incluir otras poblaciones de *E. lemae* presentes a lo largo de México.

## IX. REFERENCIAS

- Aartsma, Y., Bianchi, F.J.J.A., van der Werf, W., Poelman, E.H. & Dicke, M. (2017). Herbivore-induced plant volátiles and tritrophic interactions across spatial scales. *New Phytologist*, 216: 1054-1063.
- Adams, K.L. & Palmer, J.D. (2003). Evolution of mitochondrial gene content: gene loss and transfer to the nucleus. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29: 380-395.
- Agelopoulos, N. G. & Keller, M. A. (1994). Plant-natural enemy association in tritrophic system, *Cotesia rubecula*-*Pieris rapae*-brassicaceae (Cruciferae). III: Collection and identification of plant and frass volátiles. *Journal of Chemical Ecology*, 20: 1955-1967.
- Akaike, H. (1974). A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control*, 19: 716-723.
- Alborn, H.T., Turlings, T.C.J., Jones, T.H., Stenhagen, G., Loughrin, J.H. & Tumlinson, J.H. (1997). An elicitor of plant volátiles from beet armyworm oral secretion. *Science*, 276: 945-949.
- Allmann, S., Späthe, A., Bisch-Knaden, S., Kallenbach, M., Reinecke, A., Sachse, S., Baldwin, I.T. & Hansson, B.S. (2013). Feeding-induced rearrangement of green leaf volátiles reduces moth oviposition. *eLife*, 2: 1-23.
- Aljbory, Z. & Chen, M.S. (2018). Indirect plant defense against insect herbivores: a review. *Insect Science*, 25: 2-23.
- Althoff, D.M. & Thompson, J.N. (1999). Comparative geographic structures of two parasitoid-host interactions. *Evolution*, 53: 818-825.
- Althoff, D.M. (2008). A test of host-associated differentiation across the “parasite continuum” in the tri-trophic interaction among yuccas, bogus yucca moths, and parasitoids. *Molecular Ecology*, 17: 3917-3927.
- Alvarenga, T.M., Costa, V.A., Hansson, C. & Carvalho, C.F. (2015). Two new species of *Emersonella* (Hymenoptera: Eulophidae: Entedoninae) from the Brazilian Atlantic Forest. *Zoologia*, 32: 145-150.

- Ameye, M., Allmann, S., Verwaeren, J., Smagghe, G., Haesaert, G., Schuurink, R., & Audenaert, K. (2018). Green leaf volatile production by plants: a meta-analysis. *New Phytologist*, *220*: 666-683.
- Anducho-Reyes, M.A., Cognato, A.I., Hayes, J.L. & Zúñiga, G. (2008). Phylogeography of the bark beetle *Dentroctonus mexicanus* Hopkins (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *49*: 930-940.
- Anton, C., Zeisset, I., Musche, M., Durka, W., Boomsma, J.J. & Settele, J. (2007). Population structure of a large blue butterfly and its specialist parasitoid in a fragmented landscape. *Molecular Ecology*, *16*: 3828-3838.
- Auger-Rozenberg, M.A., Torres-Leguizamon, M., Courtin, C., Rossi, J.P. & Kerdelhué, C. (2015). Incongruent evolutionary histories of two parasitoids in the Mediterranean Basin: influence of host specialization and ecological characteristics. *Journal of Biogeography*, *42*: 1040-1051.
- Ballhorn, D.J., Kautz, S., Lion, U. & Heil, M. (2008). Trade-offs between direct and indirect defences of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.). *Journal of Ecology*, *96*: 971-980.
- Bandelt, H.J., Forster, P. & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, *16*: 37-48.
- Benhamou, N. (1996). Elicitor-induced plant defence pathways. *Trends in Plant Science*, *1*: 233-240.
- Birkett, M.A., Chamberlain, K., Guerrieri, E., Pickett, J.A., Wadhams, L.J. & Yasuda, T. (2003). Volatiles from whitefly-infested plants elicit a host-locating response in the parasitoid, *Encarsia formosa*. *Journal of Chemical Ecology*, *29*: 1589-1600.
- Cabrales, R. (1991). Demografía e historia natural de *Datura stramonium* L. en el Pedregal de San Ángel con algunas implicaciones evolutivas. Tesis de Licenciatura, UNAM. México, D.F.
- Caselli, A., Favaro, R., Petacchi, R. & Angeli, S. (2021). Infestation of the gall midge *Dasineura oleae* provides first evidence of induced plant volatiles in olive leaves. *Bulletin of Entomological Research*, 1-13.
- Castillo, G., Cruz, L.L., Hernández-Cumplido, J., Oyama, K., Flores-Ortiz, C.M., Fornoni, J., Valverde, P.L. & Núñez-Farfán, J. (2013). Geographic association and temporal variation of chemical and physical defense and leaf damage in *Datura stramonium*. *Ecological Research*, *28*: 663-672.

- Castillo, G., Cruz, L.L., Tapia-López, R., Olmedo-Vicente, E., Carmona, D., Anaya-Lang, A.L., Feroni, J., Andraca-Gómez, G., Valverde, P.L. & Núñez-Farfán, J. (2014). Selection mosaic exerted by specialist and generalist herbivores on chemical and physical defense of *Datura stramonium*. *PLoS ONE* 9: 1-7.
- Castracani, C., Tamarri, V., Grasso, D.A., Moli, F.L., Palla, G., Millar, J.G., Francke, W. & Mori, A. (2008). Chemical communication in mating behaviour of the slave-making ant *Polyergus rufescens* (Hymenoptera, Formicidae): 3-ethyl-4-methylpentanol as a critical component of the queen sex pheromone. *Insectes Sociaux*, 55: 137-143.
- Charlesworth, D. (2010). Don't forget the ancestral polymorphisms. *Heredity*, 105: 509-510.
- Chen, G., Su, Q., Shi, X., Liu, X., Peng, Z., Zheng, H., Xie, W., Xu, B., Wang, S., Wu, Q., Zhou, X. & Zhang, Y. (2017). Odor, not performance, dictates *Bemisia tabaci*'s selection between healthy and virus infected plants. *Frontiers in Physiology*, 8: 1-9.
- Clarke, C., Calatayud, P., Sforza, R., Ndemah, R. & Nyamukondiwa, C. (2019). Editorial: Parasitoids ecology and evolution. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 7:485.
- Colazza, S. & Wajnberg, E. (2013). Chemical ecology of insect parasitoids: towards a new era. En: Wajnberg, E. & Colazza, S. (Eds). *Chemical ecology of insect parasitoids*. (pp. 1-8). Oxford: John Wiley & Sons, Ltd.
- Consales, F., Schweizer, F., Erb, M., Gouhier-Darimont, C., Bodenhausen, N., Bruessow, F., Sobhy, I. & Reymond, P. (2012). Insect oral secretions suppress wound-induced responses in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 63: 727-737.
- Couchoux, C., Seppä, P. & van Nouhuys, S. (2016). Strong dispersal in a parasitoid wasp overwhelms habitat fragmentation and host population dynamics. *Molecular Ecology*, 25: 3344-3355.
- Craig, T.P., Itami, J.K. & Horner, J.D. (2007). Geographic variation in the evolution and coevolution of a tritrophic interaction. *Evolution*, 61: 1137-1152.
- Cruaud, A., Nidelet, S., Arnal, P., Weber, A., Fusu, L., Gumovsky, A., Huber, J., Polaszek, A. & Rasplus, J.Y. (2019). Optimized DNA extraction and library preparation for minute arthropods: Application to target enrichment in chalcid wasps used for biocontrol. *Molecular Ecology Resources*, 19: 702-710.

- Cruz, E.N. & Malo, E.A. (2013). Chemical analysis of coffee berry volatiles that elicit an antennal response from the coffee berry borer *Hypothenemus hampei*. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 57: 321-327.
- Cuignet, M., Hance, T. & Windsor, D.M. (2007). Phylogenetic relationships of egg parasitoids (Hymenoptera: Eulophidae) and correlated life history characteristics of their Neotropical Cassidinae hosts (Coleoptera, Chrysomelidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 42: 573-584.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R. & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9: 772.
- de Boer, J.G., Hordijk, C.A., Posthumus, M.A. & Dicke, M. (2008). Prey and non-prey arthropods sharing a host plant: effects on induced volatile emissions and predator attraction. *Journal of Chemical Ecology*, 34: 281-290.
- De-la-Cruz, I.M., Merilä, J., Valverde, P.L., Flores-Ortiz, C.M. & Núñez-Farfán, J. (2020). Genomic and chemical evidence for local adaptation in resistance to different herbivores in *Datura stramonium*. *Evolution*, 74: 2629-2643.
- De-la-Mora, M., Piñero, D. & Núñez-Farfán, J. (2015). Phylogeography of specialist weevil *Trichobaris soror*: a seed predator of *Datura stramonium*. *Genetica*, 143: 681-691.
- Dindo, M.L. & Nakamura, S. (2018). Oviposition strategies of tachinid parasitoids: two *Exorista* species as case studies. *International Journal of Insect Science*, 10: 1-6.
- Dicke, M. (2008). Tritrophic interactions. En: Capinera J.L. (Eds). *Encyclopedia of Entomology*. Springer, Dordrecht.
- Dickens, J.C., Oliver, J.E., Hollister, B., Davis, J.C. & Klun, J.A. (2002). Breaking a paradigm: male-produced aggregation pheromone for the Colorado potato beetle. *Journal of Experimental Biology*, 205: 1925-1933.
- Dickens, J.C. (2006). Plant volatiles moderate response to aggregation pheromone in Colorado potato beetle. *Journal of Applied Entomology*, 130: 26-31.

- Douma, J.C., Ganzeveld, L.N., Unsicker, S.B., Boeckler, G.A. & Dicke, M. (2019). What makes a volatile organic compound a reliable indicator of insect herbivory?. *Plant Cell and Environment*, *42*: 3308-3325.
- Dowton, M. & Austin, A.D. (1995). Increased genetic diversity in mitochondrial genes is correlated with the evolution of parasitism in the Hymenoptera. *Journal of Molecular Evolution*, *41*: 958-965.
- Drummond, A.J., Rambaut, A., Shapiro, B. & Pybus, O.G. (2005). Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Molecular Biology and Evolution*, *22*: 1185-1192.
- Du, Y.W., Shi, X.B., Zhao, L.C., Yuan, G.G., Zhao, W.W., Huang, G.H., Chen, G. (2022). Chinese cabbage changes its release of volatiles to defend against *Spodoptera litura*. *Insects*, *13*: 1-14.
- Dungey, H.S., Potts, B.M., Whitham, T.G. & Li, H.F. (2000). Plant genetics affects arthropod community richness and composition: evidence from a synthetic eucalypt hybrid population. *Evolution*, *54*: 1938-1946.
- Dweck, H.K.M., Svensson, G.P., Gündüz, E.A. & Anderbrant, O. (2010). Kairomonal response of the parasitoid, *Bracon hebetor* Say, to the male-produced sex pheromone of its host, the greater waxmoth, *Galleria mellonella* (L.). *Journal of Chemical Ecology*, *36*: 171-178.
- Eaton, C.D. (2008). Coevolutionary research. En: Jorgesen, S. y Fath, B. (Eds). *Encyclopedia of Ecology*. Academic Press, California.
- Elzinga, J.A., van Nouhuys, S., van Leeuwen, D.J. & Biere, A. (2007). Distribution and colonisation ability of three parasitoids and their herbivorous host in a fragmented landscape. *Basic and Applied Ecology*, *8*: 75-88.
- Ehrlich, P.R. & Raven, P.H. (1964). Butterflies and plants: a study in coevolution. *Evolution*, *18*: 586-608.
- Excoffier, L. & Lischer, H.E.L. (2010). Arlequin ver. 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, *10*: 564-567.

- Fatouros, N.E., Dicke, M., Mumm, R., Meiners, T., & Hilker, M. (2008). Foraging behavior of egg parasitoids exploiting chemical information. *Behavioral Ecology*, *19*: 677-689.
- Forbes, A.A. & Funk, D.J. (2013). Aspects of the natural history of *Neochlamisus* (Coleoptera: Chrysomelidae) II: characterization of parasitoids guilds from different plant hosts. *Annals of the Entomological Society of America*, *106*: 818-831.
- Fraser, A.M., Mechaber, W.L. & Hildebrand, J.G. (2003). Electroantennographic and behavioral responses of the sphinx moth *Manduca sexta* to host plant headspace volatiles. *Journal of Chemical Ecology*, *29*: 1813-1833.
- Freeman, J. A. (1945). Studies in the distribution of insects by aerial currents. *Journal of Animal Ecology*, *14*: 128-154.
- Fu, Y.X. (1997). Statistical test of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, *147*: 915-925.
- Fukushima, J., Kainoh, Y., Honda, H. & Takabayashi, J. (2002). Learning of herbivore-induced and nonspecific plant volatiles by a parasitoid, *Cotesia kariyai*. *Journal of Chemical Ecology*, *28*: 579-586.
- Futuyma, D.J. (2009). Coevolution. En; Resh, V., Cardé, R. (Eds). *Encyclopedia of Insects*. Academic Press, California.
- Futuyma, D.J. & Agrawal, A.A. (2009). Macroevolution and the biological diversity of plants and herbivores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*: 18054-18061.
- Garrido, E. (2004). Efecto de la tolerancia en líneas endogámicas de *Datura stramonium* sobre el desempeño de *Lema trilineata*. Tesis de Licenciatura, UNAM. México, D.F.
- Gebiola, M., Lopez-Vaamonde, C., Nappo, A.G. & Bernardo, U. (2014). Did the parasitoid *Pnigalio mediterraneus* (Hymenoptera: Eulophidae) track the invasión of the horse chestnut leafminer?. *Biological Invasions*, *16*: 843-857.
- Glick, P. A. (1939). *The distribution of insects, spiders and mites in the air*. Washington, D.C.: United States Department of Agriculture. Technical Bulletin No. 673.

- Gobierno del Estado de Hidalgo. (2002). *Enciclopedia de los Municipios de México*. Recuperado el 10 de marzo de 2022, de [intranet.e-hidalgo.gob.mx/enciclomuni/municipios/13052a.htm](http://intranet.e-hidalgo.gob.mx/enciclomuni/municipios/13052a.htm)
- Godfray, H.C.J. (1994). *Parasitoids: Behavioral and Evolutionary Ecology*. United States of America: Princeton University Press.
- Greenberg, L., Tröger, A.G., Francke, W., McElfresh, J.S., Topoff, H., Aliabadi, A. & Millar, J.G. (2007). Queen sex pheromone of the Slave-making Ant, *Polyergus breviceps*. *Journal of Chemical Ecology*, 33: 935-945.
- Hague, M.T.J. & Routman, E.J. (2016). Does population size affect genetic diversity? A test with sympatric lizard species. *Heredity*, 116: 92-98.
- Haine, E.R., Martin, J. & Cook, J.M. (2006). Deep mtDNA divergences indicate cryptic species in a fig-pollinating wasp. *BMC Evolutionary Biology*, 6: 1-11.
- Hall, D.E., MacGregor, K.B., Nijssse, J. & Bown, A.W. (2004). Footsteps from insect larvae damage leaf surfaces and initiate rapid responses. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 441-447.
- Hare, J.D. (2007). Variation in herbivore and methyl jasmonate-induced volatiles among genetic lines of *Datura wrightii*. *Journal of Chemical Ecology*, 33: 2028-2043.
- Hare, J.D. & Weseloh, R.M. (2009). Host seeking, by parasitoids. En: Resh, V. & Cardé, R. (Eds). *Encyclopedia of Insects* (pp. 463-466). California: Academic Press.
- Hare, J.D. & Sun, J.J. (2011a). Production of herbivore-induced plant volatiles is constrained seasonally in the field but predation on herbivores is not. *Journal of Chemical Ecology*, 37: 430-442.
- Hare, J.D. & Sun, J.J. (2011b). Production of induced volatiles by *Datura wrightii* in response to damage by insects: effect of herbivore species and time. *Journal of Chemical Ecology*, 37: 751-764.
- Hatanaka, A. (1999). Biosynthesis of so-called “green odor” emitted by green leaves. En: Barton, S.D., Nakanishi, K., Meth-Cohn, O. (Eds). *Comprehensive Natural Products Chemistry* (pp. 83-115). Pergamon.
- Hawkins, B.A., Cornell, H.V. & Hochberg, M.E. (1997). Predators, parasitoids and pathogens as mortality agents in phytophagous insect populations. *Ecology*, 78: 2145-2152.

- Hilker, M., Stein, C., Schröder, R., Varama, M. & Mumm, R. (2005). Insect egg deposition induces defence responses in *Pinus sylvestris*: characterization of the elicitor. *Journal of Experimental Biology*, 208: 1849-1854.
- Hilker, M. & Fatouros, N.E. (2015). Plant responses to insect egg deposition. *Annual Review of Entomology*, 60: 493-515.
- Ingrao, A.J., Walters, J. & Szendrei, Z. (2019). Biological control of Asparagus pests using synthetic herbivore-induced volatiles. *Environmental Entomology*, 48: 202-210.
- James, D.G. (2005). Further field evaluation of synthetic herbivore-induced plant volatiles as attractants for beneficial insects. *Journal of Chemical Ecology*, 31: 481-495.
- Jourdie, V., Virla, E., Murillo, H., Bento, J.M.S., Turlings, T.C.J. & Alvarez, N. (2010a). Phylogeography of *Chelonus insularis* (Hymenoptera: Braconidae) and *Campoletis sonorensis* (Hymenoptera: Ichneumonidae), two primary neotropical parasitoids of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 103: 742-749.
- Jourdie, V., Alvarez, N., Molina-Ochoa, J., Williams, T., Bergvinson, D., Benrey, B., Turlings, T.C.J. & Franck, P. (2010b). Population genetic structure of two primary parasitoids of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera), *Chelonus insularis* and *Campoletis sonorensis* (Hymenoptera): to what extent is the host plant important?. *Molecular Ecology*, 19: 2168-2179.
- Kankare, M., van Nouhuys, S., Gaggiotti, O. & Hanski, I. (2005). Metapopulation genetic structure of two coexisting parasitoids of the Glanville fritillary butterfly. *Oecologia*, 143: 77-84.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K. & Miyata, T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, 30: 3059-3066.
- Katoh, K. & Standley, D.M. (2013). MAFFT Multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 772-780.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P. & Drummond, A. (2012). Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28: 1647-1649.

- Kessler, A. & Baldwin, I.T. (2001). Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science*, 291: 2141-2144.
- Kessler, A. & Heil, M. (2011). The multiple faces of indirect defences and their agents of natural selection. *Functional Ecology*, 25: 348-357.
- Kim, J., Lee, J., Park, Y., Ann, S. & Baik, J. (2021). Fragrance and metabolite components of flowers from Korean Native *Apocynum lancifolium* Russanov. *Journal of Environmental Science International*, 30: 879-889.
- Kogan, M. & Goeden, R.D. (1970). The host-plant range of *Lema trilineata daturaphila* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 63: 1175-1180.
- Kogan, M. & Goeden, R.D. (1971). Feeding and host-selection behavior of *Lema trilineata daturaphila* larvae (Coleoptera: Chrysomelidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 64: 1435-1448.
- Kohnen, A., Richter, I. & Brandl, R. (2012). No concordant phylogeographies of the rose gall wasp *Diplolepis rosae* (Hymenoptera, Cynipidae) and two associated parasitoids across Europe. *PLoS ONE*, 7: 1-8.
- Kong, H., Zeng, Y., Xie, W., Wang, S., Wu, Q., Jiao, X., Xu, B. & Zhang, Y. (2016). Differing behavioural responses of *Bemisia tabaci* MEAM1 and MED to cabbage damaged by conspecifics and heterospecifics. *Scientific Reports*, 6: 1-6.
- Leigh, J. W. & Bryant, D. (2015). POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6: 1110-1116.
- Li., Y., Meng, J., Zhang, C., Ji, S., Kong, Q., Wang, R., & Liu, J. (2020). Bottom-up and top-down effects on phytoplankton communities in two freshwater lakes. *PLoS ONE*, 15: 1-15.
- Loreto, F., Barta, C., Brillì, F., & Nogues, I. (2006). On the induction of volatile organic compound emissions by plants as consequence of wounding or fluctuations of light and temperature. *Plant, Cell and Environment*, 29: 1820-1828.
- Lynch, M. Conery, J. & Bürger, R. (1995). Mutation accumulation and the extinction of small populations. *The American Naturalist*, 146: 489-518.

- Maddison, W. P. & Maddison, D. R. (2021). Mesquite: a modular system for evolutionary análisis. Version 3.70. <http://www.mesquiteproject.org>
- Manzoor, A., Zhang, Y.L., Xin, B., Wei, K. & Wang, X.Y. (2021). Genetic diversity, population structure and rapid early detection of the parasitoid *Anastatus orientalis* (Hymenoptera: Eupelmidae) inside eggs of spotted lanternfly (Hemiptera: Fulgoridae). *Annals of Applied Biology*, 179: 12-20.
- Mao, G., Tian, J., Li, T., Fouad, H., Ga'al, H., & Mo, J. (2018). Behavioral responses of *Anagrus nilaparvatae* to common terpenoids, aromatic compounds, and fatty acid derivates from rice plants. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 166: 483-490.
- Marko, P.B. & Hart, M.W. (2011). The complex analytical landscape of gene flow inference. *Trends in Ecology and Evolution*, 26: 448-456.
- Mendesil, E., Bruce, T.J.A., Woodcock, C.M., Caulfield, J.C., Seyoum, E., & Pickett, J.A. (2009). Semiochemicals used in host location by the Coffee berry Borer, *Hypothenemus hampei*. *Journal of Chemical Ecology*, 35: 944-950.
- Meng, J., Fang, Y., Gao, J., Zhang, A., Liu, J., Guo, Z., Zhang, Z. & Li, H. (2011). Changes in aromatic compounds of cabernet Sauvignon wines during ageing in stainless steel tanks. *African Journal of Biotechnology*, 10: 11640-11647.
- Miller, M.A., Pfeiffer, W. & Schwartz, T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *Gateway Computing Environment Workshop*: 1-8.
- Mills, N. (2009). Parasitoids. En: Resh, V. & Cardé, R. (Eds). *Encyclopedia of insects* (pp. 748-751). California: Academic Press.
- Mooney, K. A. & Agrawal, A. A. (2008). Plant genotype and induced responses affect resistance to herbivores on evening primrose (*Oenothera biennis*). *Ecological Entomology*, 31: 20-31.
- Morawo, T. & Fadamiro, H. (2016). Identification of key plant-associated volatiles emitted by *Heliothis virescens* larvae that attract the parasitoid, *Microplitis croceipes*: implications for parasitoid perception of odor blends. *Journal of Chemical Ecology*, 42: 1112-1121.

- Moreira, X., Abdala-Roberts, L., Parra-Tabla, V. & Mooney, K.A. (2015). Latitudinal variation in herbivory: influences of climatic drivers, herbivore identity and natural enemies. *Oikos*, 124: 1444-1452.
- Mumm, R. & Dicke, M. (2010). Variation in natural plant products and the attraction of bodyguards involved in indirect plant defense. *Canadian Journal of Zoology*, 88: 628-667.
- Nair, A., Fountain, T., Ikonen, S., Ojanen, S.P. & van Nouhuys, S. (2016). Spatial and temporal genetic structure at the fourth trophic level in a fragmented landscape. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283: 1-8.
- Navajas, M., Lagnel, J., Gutierrez, J. & Boursot, P. (1998). Species-wide homogeneity of nuclear ribosomal *ITS2* sequences in the spider mite *Tetranychus urticae* contrasts with extensive mitochondrial *COI* polymorphism. *Heredity*, 80: 742-752.
- Nei, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Nei, M. & Miller, J.C. (1990). A simple method for estimating average number of nucleotide substitutions within and between populations from restriction data. *Genetics*, 125: 873-879.
- Nei, M. & Kumar, S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Neveu, N., Grandgirard, J., Nenon, J.P. & Cortesero, A.M. (2002). Systemic release of herbivore-induced plant volatiles by turnips infested by concealed root-feeding larvae *Delia radicum* L. *Journal of Chemical Ecology*, 28: 1717-1732.
- Ngumbi, E., Chen, L. & Fadamiro, H.Y. (2009). Comparative GC-EAD responses of a specialist (*Microplitis croceipes*) and a generalist (*Cotesia marginiventris*) parasitoid to cotton volatiles induced by two caterpillar species. *Journal of Chemical Ecology*, 35: 1009-1020.
- Ngumbi, E., Chen, L. & Fadamiro, H. (2010). Electroantennogram (EAG) responses of *Microplitis croceipes* and *Cotesia marginiventris* and their lepidopteran hosts to a wide array of odor stimuli: correlation between EAG response and degree of host specificity?. *Journal of Insect Physiology*, 56: 1260-1268.

- Ngumbi, E., Jordan, M. & Fadamiro, H. (2012). Comparison of associative learning of host-related plant volatiles in two parasitoids with different degrees of host specificity, *Cotesia marginiventris* and *Microplitis croceipes*. *Chemoecology*, 22: 207-215.
- Nicholls, J.A., Preuss, S., Hayward, A., Melika, G., Csóka, G., Nieves-Aldrey, J.L., Askew, R.R., Tavakoli, M., Schönrogge, K. & Stone, G.N. (2010). Concordant phylogeography and cryptic speciation in two Western Palaearctic oak gall parasitoid species complexes. *Molecular Ecology*, 19: 592-609.
- Nicholls, J.A., Schönrogge, K., Preuss, S. & Stone, G.N. (2017). Partitioning of herbivore hosts across time and food plants promotes diversification in the *Megastigmus dorsalis* oak gall parasitoid complex. *Ecology and Evolution*, 8: 1300-1315.
- Núñez-Farfán, J. (1991). Biología evolutiva de *Datura stramonium* en el centro de México: selección natural de la resistencia a los herbívoros, sistema de cruzamiento y variación genética intra e interpoblacional. Tesis de doctorado. UNAM. México, D.F.
- Núñez-Farfán, J. & Dirzo, R. (1994). Evolutionary ecology of *Datura stramonium* L. in Central Mexico: natural selection for resistance to herbivorous insects. *Evolution*, 48: 423-436.
- Ode, P.J. (2006). Plant chemistry and natural enemy fitness: effects on herbivore and natural enemy interactions. *Annual Review of Entomology*, 51: 163-185.
- Ode, P. (2013). Plant defences and parasitoid chemical ecology. En: Wajnberg, E. & Colazza, S. (Eds). *Chemical ecology on insect parasitoids* (pp. 1-8). Oxford John Wiley & Sons, Ltd.
- Oliveira, D.C.S.G., Raychoudhury, R., Lavrov, D.V. & Werren, J.H. (2008). Rapidly evolving mitochondrial genome and directional selection in mitochondrial genes in the parasitic wasp *Nasonia* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Molecular Biology and Evolution*, 25: 2167-2180.
- Omer-Cooper, J. & Miles, P. (1951). On *Lema trilineata*- a beetle closely resembling the tobacco slug, attacking the cape gooseberry. *South African Journal of Science*, 47: 330- 333.
- Paré, P.W. & Tumlinson, J.H. (1999). Plant volatiles as a defense against insect herbivores. *Plant Physiology*, 121: 325-332.

- Pérez-Rodríguez, J., Shortall, C.R. & Bell, J.R. (2015). Large-scale migration synchrony between parasitoids and their host. *Ecological Entomology*, 40: 654-659.
- Petzold-Maxwell, J., Wong, S., Arellano, C. & Gould, F. (2011). Host plant direct defence against eggs of its specialist herbivore, *Heliothis subflexa*. *Ecological Entomology*, 36: 700-708.
- Price, P.W., Bouton, C.E., Gross, P., McPheron, B.A., Thompson, J.N. & Weis, A.E. (1980). Interactions among three trophic levels: influence of plants on interactions between insect herbivores and natural enemies. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 11: 41-65.
- Qiao, H., Lu, P., Liu, S., Xu, C., Guo, K., Xu, R. & Chen, J. (2018). Volatiles from *Aquilaria sinensis* damaged by *Heortia vitessoides* larvae deter the conspecific gravid adults and attract its predator *Cantheconidea concinna*. *Scientific Reports*, 8: 1-15.
- Raguso, R.A., Henzel, C., Buchmann, S.L., Nabhan, G.P. (2003). Trumpet flowers of the sonoran desert: floral biology of *Peniocereus* cacti and sacred *Datura*. *International Journal of Plant Sciences*, 164: 877-892.
- Rambaut, A. (2010). FigTree v1.4.4. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Edinburgh.
- Rambaut, A. Drummond, A.J., Xie, D., Baele, G. & Suchard, M.A. (2018). Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology*, 67: 901-904.
- R Core Team. (2021). R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A. Höhna, S., Larget, B., Liu, L. Suchard, M.A. & Huelsenbeck, J.P. (2012). MrBayes 3.2: efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61: 539-542.
- Rowell-Rahier, M. & Pasteels, J. (1992). Third trophic level influences of plant allelochemicals. En Rosenthal, G.A. & Berenbaum, M. R. (Eds). *Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites* (pp. 243-277). Academic Press, Inc.

- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J.C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S.E., Sánchez-García, A. (2017). DnaSP 6: DNA Sequence polymorphism analysis of large datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 34: 3299-3302.
- Scala, A., Allmann, S., Mirabella, R., Haring, M., & Schuurink, R. (2013). Green leaf volatiles: a plant's multifunctional weapon against herbivores and pathogens. *International Journal of Molecular Sciences*, 14: 17781-17811.
- Seyahooei, M.A., van Alphen, J.J.M. & Kraaijeveld, K. (2011). Genetic structure of *Leptopilina boulardi* populations from different climatic zones of Iran. *BMC Ecology*, 11: 1-9.
- Shimoda, T., Nishihara, M., Ozawa, R., Takabayashi, J. & Arimura, G.I. (2012). The effect of genetically enriched (*E*)- $\beta$ -ocimene and the role of floral scent in the attraction of predatory mite *Phytoseiulus persimilis* to spider mite-induced volatile blends of torenia. *New Phytologist*, 193: 1009-1021.
- Shonle, I. & Bergelson, J. (2000). Evolutionary ecology of the tropane alkaloids of *Datura stramonium* L. (Solanaceae). *Evolution*, 54: 778-788.
- Sierra-Guerrero, P.I. (2021). Filogeografía de *Lema daturaphila* (Coleoptera), depredador especialista de *Datura stramonium*. Tesis de Licenciatura, UNAM. Ciudad Universitaria, Ciudad de México.
- Simmons, R.B. & Weller, S.J. (2001). Utility and Evolution of Cytochrome *b* in Insects. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 20: 196-210.
- Sistema Meteorológico Nacional. (2021). *Información estadística climatológica: Normales Climatológicas por Estado*. Gobierno de México. Recuperado el 22 de septiembre de 2021, de <https://smn.conagua.gob.mx/es/climatologia/informacion-climatologica/normales-climatologicas-por-estado>
- Solé, J., Sans, A., Riba, M. & Guerrero, A. (2010). Behavioural and electrophysiological responses of the European corn borer *Ostrinia nubilalis* to host-plant volatiles and related chemicals. *Physiological Entomology*, 35: 354-363.
- Stam, J.M., Kroes., Li, Y., Gols, R., van Loon, J.J.A., Poelman, E.H. & Dicke, M. (2014). Plant interactions with multiple insect herbivores: from community to genes. *Annual Review of Plant Biology*, 65: 689-713.

- Suchard, M.A., Lemey, P., Baele, G., Ayres, D.L., Drummond, A.J. & Rambaut, A. (2018). Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evolution*, 4: 1-5.
- Sun, X., Siemann, E., Liu, Z., Wang, Q., Wang, D., Huang, W., Zhang, C., & Ding, J. (2019). Root-feeding larvae increase their performance by inducing leaf volatiles that attract above-ground conspecific adults. *Journal of Ecology*, 107: 2713-2723.
- Sutton, T.L., Riegler, M. & Cook, J.M. (2016). One step ahead: a parasitoid disperses farther and forms a wider geographic population than its fig wasp host. *Molecular Ecology*, 25: 882-894.
- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphisms. *Genetics*, 123: 585-595.
- Takabayashi, J., Takahashi, S., Dicke, M. & Posthumus, M.A. (1995). Developmental stage of herbivore *Pseudaletia separata* affects production of herbivore-induced synomone by corn plants. *Journal of Chemical Ecology*, 21: 273-287.
- Takabayashi, J., Sato, Y., Horikoshi, M., Yamaoka, R., Yano, S., Oshaki, N. & Dicke, M. (1998). Plant effects on parasitoid foraging. Differences between two tritrophic systems. *Biological Control*, 11: 97-103.
- Thompson, J. (2005). Coevolution: the geographic mosaic of coevolutionary arms races. *Current Biology*, 15: 992-994.
- Turlings, T.C.J., Lengwiler, U.B., Bernasconi, M.L. & Wechsler, D. (1998). Timing of induced volatile emissions in maize seedlings. *Planta*, 207: 146-152.
- Turlings, T.C.J. & Erb, M. (2018). Tritrophic interactions mediated by herbivore-induced plant volatiles: mechanisms, ecological relevance and application potential. *Annual Review of Entomology*, 63: 433-452.
- Urrutia-Fucugauchi, J. y Martin del Pozzo, A.L. (1993). Implicaciones de los datos paleomagnéticos sobre la edad de la Sierra de Chichinautzin, cuenca de México. *Geofísica Internacional*, 32: 523-533.

- Rodrigues, C., Blassioli-Moraes, M.C., Borges, M., Soares, C.S., Sujii, E. & Laumann, A. (2014). Field evaluation of (*E*)-2-hexenal efficacy for behavioral manipulation of egg parasitoids in soybean. *BioControl*, 59: 525-537.
- Vet, L.E.M. (2001). Parasitoid searching efficiency links behaviour to population processes. *Applied Entomology and Zoology*, 36: 399-408.
- Villanueva-Hernández, C.E. (2019). Interacción *Lema daturaphila* (Chrysomelidae)-parasitoides sobre *Datura stramonium* (Solanaceae). Tesis de Licenciatura, UNAM. Los Reyes Iztacala, Estado de México.
- Walsh, H.E., Kidd, M.G., Moum, T. & Friesen, V.L. (1999). Polytomies and the power of phylogenetic inference. *Evolution*, 53: 932-937.
- Wang, Y.S., Dai, T.M., Tian, H., Wan, F.H. & Zhang, G.F. (2019). Comparative analysis of eight DNA extraction methods for molecular research in mealybugs. *PLoS ONE*, 14: 1-15.
- Wang, C., Li, G., Miao, C., Zhao, M., Wang, B. & Guo, X. (2020). Nonanal modulates oviposition preference in female *Helicoverpa assulta* (Lepidoptera: Noctuidae) via the activation of peripheral neurons. *Pest Management Science*, 76: 3159-3167.
- Watterson, G.A. (1975). On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theoretical Population Biology*, 7: 256-276.
- Weaver, S.E. & Warwick, S.I. (1984). The biology of Canadian weeds.: 64. *Datura stramonium* L. *Canadian Journal of Plant Science*, 64: 979-991.
- Wei, S.J., Zhou, Y., Fan, X.L., Hoffmann, A.A., Cao, L.J., Chen, X.X. & Xu, Z.F. (2017). Different genetic structures revealed resident populations of a specialist parasitoid wasp in contrast to its migratory host. *Ecology and Evolution*, 7: 5400-5409.
- Weissbecker, B., Van Loon, J.J. & Dicke, M. (1999). Electroantennogram responses of a predator *Perillus bioculatus*, and its prey, *Leptinotarsa decemlineata*, to plant volatiles. *Journal of Chemical Ecology*, 25: 2313-2325.
- Whitham, T.G., Young, W.P., Martinsen, G.D., Gehring, C.A., Schweitzer, J.A., Shuster, S.M., Wimp, G.M., Fischer, D.G., Bailey, J.K., Lindroth, R.L., Woolbright, S. & Kuske, C.R. (2003).

- Community and ecosystem genetics: a consequence of the extended phenotype. *Ecology*, 84: 559-573.
- Wickremasinghe, M.G.V. & van Emden, H.F. (1992). Reactions of adult female parasitoids, particularly *Aphidius rhopalosiphi*, to volatile chemical cues from the host plants of their aphid prey. *Physiological Entomology*, 17: 297-304.
- Wilkinson, D.M. & Sherratt, T.N. (2016). Why is the world green? The interactions of top-down and bottom-up processes in terrestrial vegetation ecology. *Plant Ecology and Diversity*, 9: 127-140.
- Wilson, J.K. & Woods, H.A. (2015). Protection via parasitism: *Datura* odors attract parasitoid flies, which inhibit *Manduca* larvae from feeding and growing but may not help plants. *Oecologia*, 179: 1159-1171.
- Wilson, J.K. & Woods, H.A. (2016). Innate and learned olfactory responses in a wild population of the egg parasitoid *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Journal of Insect Science*, 16: 1-8.
- Wilson, J.K., Woods, H.A. & Kessler, A. (2018). High levels of abiotic noise in volatile organic compounds released by a desert perennial: implications for the evolution and ecology of airborne chemical communication. *Oecologia*, 188: 367-379.
- Yang, G., Zhang, Y.N., Gurr, G.M., Vasseur, L. & You, M.S. (2016). Electroantennogram and behavioral responses of *Cotesia plutellae* to plant volatiles. *Insect Science*, 23: 245-252.
- Yarza de De la Torre, E. (2003). Los volcanes del Sistema Volcánico Transversal. *Investigaciones geográficas*, 50: 221-234.
- Yu, H., Zhang, Y., Wu, K., Gao, X.W., & Guo, Y.Y. (2008). Field-testing of synthetic herbivore-induced plant volatiles as attractants for beneficial insects. *Environmental Entomology*, 37: 1410-1415.
- Yu, H., Zhang, Y., Wyckhuys, K.A.G., Wu, K., Gao, X. & Guo, Y. (2010). Electrophysiological and behavioral responses of *Microplitis mediator* (Hymenoptera: Braconidae) to caterpillar-induced volatiles from cotton. *Environmental Entomology*, 39: 600-609.

- Zhang, J., Komail, S.A., Wei, Z., Keeseey, I.A., Parker, A.L., Feistel, F., Chen, J., Cassau, S., Fandino, R.A., Grosse-Wilde, E., Dong, S., Kingsolver, J., Gershenson, J., Knaden, M. & Hansson, B.S. (2022). Competing beetles attract egg laying in a hawkmoth. *Current Biology*, 32: 861-869.
- Zu, P., Boege, K., del-Val, E., Schuman, M.E., Stevenson, P.C., Zaldivar-Riverón, A. & Saavedra, S. (2020). Information arms race explains plant-herbivore chemical communication in ecological communities. *Science*, 368: 1377-1381.
- Zúñiga, G., Cisneros, R., Salinas-Moreno, Y., Hayes, J.L. & Rinehart, J. (2006). Genetic structure of *Dentroctonus mexicanus* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) in the Trans-Mexican Volcanic Belt. *Genetics*, 99: 945-958.

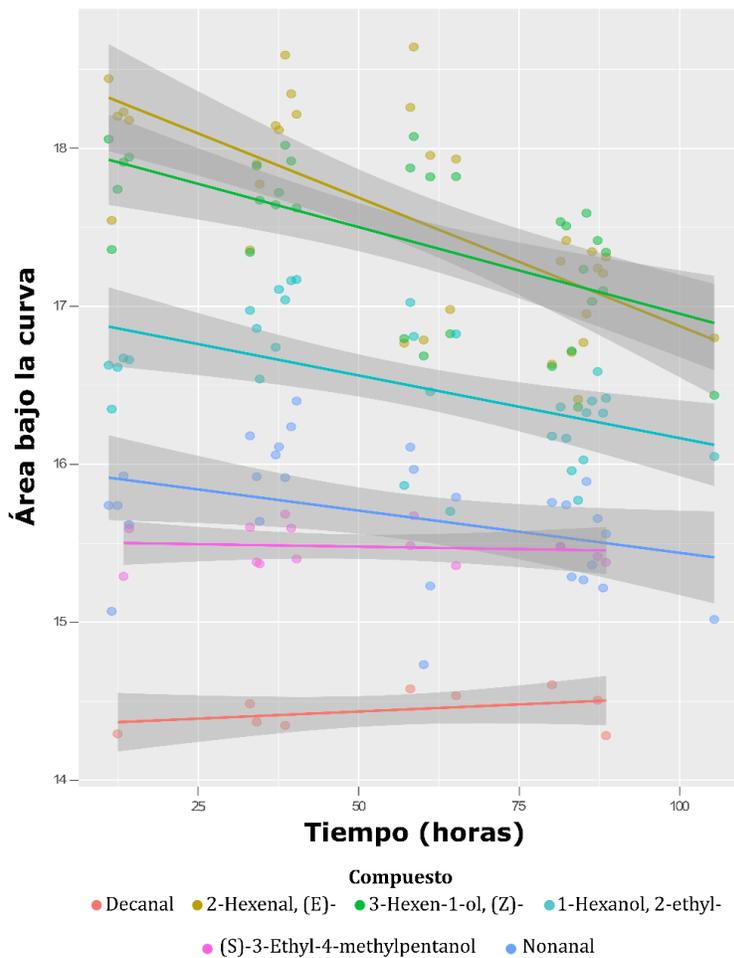
## X. ANEXOS

### Anexo 1. Semicuantificación de los compuestos orgánicos volátiles en *D. stramonium*.

**Cuadro A1.** Análisis de varianza para la semi cuantificación de los diferentes compuestos liberados en función del tratamiento. No se detectaron diferencias significativas entre ellos.

Rasgo	Fuente de variación	g.l.	S.C.	C.M.	F	p*
<b>2-Hexenal, (E)</b>	Tratamiento	7	1.425	0.2036	0.408	0.888
	Error	24	11.073	0.4989		
<b>3-Hexen-1-ol, (Z)</b>	Tratamiento	7	1.095	0.1564	0.55	0.788
	Error	24	6.823	0.2843		
<b>(S)-3-Ethyl-4-methylpentanol</b>	Tratamiento	5	0.03153	0.006305	0.277	0.913
	Error	8	0.18201	0.022751		
<b>1-Hexanol, 2-ethyl</b>	Tratamiento	7	1.269	0.1812	0.991	0.462
	Error	23	4.207	0.1829		
<b>Nonanal</b>	Tratamiento	7	0.415	0.05925	0.302	0.945
	Error	21	4.125	0.19645		
<b>Decanal</b>	Tratamiento	2	50.01503	0.007515	0.424	0.673
	Error	6	0.10633	0.017721		

**Figura A1.** Diferencias en el área bajo la curva en función del tratamiento, usando como covariable el tiempo de detección en el GC-MS desde el inicio de la inyección.



**Anexo 2.** Haplotipos de *Emersonella lemae* del gen *Cyt-b* de las poblaciones del centro de México.

**>H1**

ACAGTTATTACAACTTAGTATCCGCAATCCCATATATTGGAAATCAAATTGTCCAATGATTATGAGGAGGTT  
TTTCTGTAAATAATGCCACTCTAAATCGCTTTTACTCTCTACACTTTATTTTACCTTTTGCAATTTTATTTCTAG  
TTATTATTCATTTAACATTTCTTCATGAATCAGGATCATCTAATCCAATAGGAGTTAGAAGAAATTTTAATAAAA  
ATTCCATTTAACCCTTATTTTACAATTAAGACATTATTGGTTTTATTATAATAATTACAATTCTATTATTAATT  
TCTTTTATAAATCCATATATCTTATCAGATCCAGAAAATTTCAATAAAGCTAATTCAATAATTACTCCTATTCA  
TATCAACCTGAATGATATTTTTTATTTGCTTACGCAATCTTACGATCAATCCCAATAAACTAGG

**>H2**

ACAGTTATTACAACTTAGTATCTGCAATCCCATATATTGGAAATCAAATTGTTCAATGATTATGGGGAGGAT  
TTTCTGTAAATAATGCCACTCTAAATCGATTTTACTCTCTACACTTTATTTTACCTTTTGTAATTTTATTTCTAG  
TTATTATTCATTTAACATTTCTTCATGAATTAGGATCATCTAACCCATAGGAGTTAGAAGAAATTTTAATAAAA  
ATTCCATTTAATCCTTATTTTACAATTAAGACATTATTGGTTTTATTATAATAATTACAATTCTATTATTAATT  
TCTTTTATAAATCCATATATCTTATCAGATCCAGAAAATTTAATAAAGCTAATTCAATAATTACCCCTATTCA  
TATCAACCTGAATGATATTTTTTATTTGCTTATGCAATCTTACGATCAATCCCAATAAACTAGG

**>H3**

ACAGTTATTACAACTTAGTATCTGCAATCCCATATATTGGAAATCAAATTGTTCAATGATTATGAGGAGGGT  
TTTCTGTAAATAATGCCACTCTAAATCGCTTTTACTCTCTACACTTTATTTTACCTTTTGTAATTTTATTTCTAGT  
TATTATTCATTTAACATTTCTTCATGAATTAGGATCATCTAACCCATAGGAGTTAGAAGAAATTTTAATAAAA  
TTCCATTTAACCCTTATTTTACAATTAAGACATTATCGGTTTTATTATAATAATTACAATTCTATTATTAATTT  
CTTTTATAAATCCATATATCTTATCAGATCCGAAAATTTAATAAAGCTAATTCAATAATTACCCCTATTCA  
ATTCAACCTGAATGATATTTTTTATTTGCTTATGCAATCTTACGATCAATCCCAATAAACTAGG

**>H4**

ACAGTTATTACAACTTAGTATCTGCAATCCCATATATCGGAAATCAAATCGTTCAATGATTATGAGGGGGAT  
TTTCTGTAAATAATGCCACTCTAACCCTTTTATTCTTTACACTTTATTTTACCTTTTGTAATTTTATTTCTAGT  
TATTATTCATTTAACATTTCTTCATGAATTAGGATCATCTAATCCAATAGGAATTAGAAGAAATTTTAATAAAA  
ATTCCATTTAATCCATATTTTACAATTAAGACATTATTGGTTTTATTATAATAATTACAATTCTATTATTAATT  
TCTTTTATAAATCCATATATCTTATCAGACCCAGAAAATTTCAATAAAGCTAATTCAATAATTACTCCTATTCA  
TATTCAGCCTGAATGATATTTTTTATTTGCTTATGCAATCTTACGATCAATCCCAATAAACTAGG

**>H5**

ACAGTTATTACAACTTAGTATCTGCAATCCCATATATCGGAAATCAAATTGTTCAATGATTATGAGGAGGAT  
TTTCTGTAAACAATGCTACTCTTAATCGATTTTATTCTCTTCACTTTATTTTACCTTTTGCAATTTTATTTTTAGT  
TATTATTCATTTAACATTTCTCCATGAATTAGGATCCTCTAATCCTATAGGAATTAGAAGAAATTTTAATAAAA  
TTCCATTTAACCCTTATTTTACAATTAAGACATTATTGGTTTTATTATAATAATTACAATTCTATTATTAATTT  
CTTTTATTAATCCATATATCTTATCAGACCCTGAAAATTTAATAAAGCTAATTCAATAATTACCCCAATTCAT  
ATTCAACCAGAATGATATTTTTTATTTGCTTATGCAATCTTACGATCAATCCCAATAAACTAGG

**>H6**

ACAGTTATTACAACTTAGTATCTGCAATCCCATATATTGGAAATCAAATTGTTCAATGATTATGGGGAGGGT  
TTTCTGTAAATAATGCCACTCTAAATCGCTTTTACTCTCTACACTTTATTTTACCTTTTGTAATTTTATTTCTAGT  
TATTATTCATTTAACATTTCTTCATGAATTAGGATCATCTAACCCATAGGAGTTAGAAGAAATTTTAATAAAA  
TTCCATTTAATCCTTATTTTACAATTAAGACATTATTGGTTTTATTATAATAATTACAATTCTATTATTAATTT  
CTTTTATAAATCCATATATCTTATCAGACCCAGAAAATTTAATAAAGCTAATTCAATAATTACCCCTATTCA  
ATTCAACCTGAATGATATTTTTTATTTGCTTATGCAATCTTACGGTCAATCCCAATAAACTAGG

**>H7**

ACAGTTATTACAACTTAGTATCTGCAATCCCATATATTGGAAATCAAATTGTTCAATGATTATGAGGAGGAT  
TTTCTGTAAATAATGCTACTCTTAATCGATTTTATTCTCTACACTTTATTTTACCTTTTGCAATTTTATTTTTAGT

TATTATTCATTTAACATTTCTTCATGAACTAGGGTCATCAAATCCTATAGGAATTAGAAGAAATTTTAATAAA  
ATTCCATTTAATCCTTATTTTACAATTAAGACATTATTGGTTTTATTATAATAATTACAATTCTATTATTAATT  
TCTTTTATTAATCCATATATCTTATCAGACCCAGAAAATTTTAATAAAGCTAATTCAATAATTACTCCTATTCA  
TATTCAACCAGAATGATATTTTTTTATTTGCTTACGCAATCTTACGATCAATTCCCAATAAACTAGG

>H8

ACAGTTATTACAAACCTAGTATCTGCAATTCCATATATTGGAAATCAAATTGTTCAATGATTATGAGGAGGAT  
TTTCTGTAAACAATGCTACTCTTAATCGGTTTTATTCTCTTCACTTTATTTTACCTTTTGCAATTTTATTTTTAGT  
TATTATTCATTTAACATTTCTTCATGAATTAGGATCCTCTAATCCTATAGGAATTAGAAGAAATTTTAATAAAA  
TTCCATTTAACCTTATTTTACAATTAAGACATTATTGGTTTTATTATAATAATTACAATTCTATTATTAATTT  
CTTTTATTAACCCATATATCTTATCAGACCCTGAAAATTTTAATAAAGCTAATTCAATAATTACCCCAATTCA  
ATTCAACCAGAATGATATTTTTTTATTTGCTTATGCAATTTTACGATCAATCCCAATAAACTAGG

>H9

ACAGTTATTACAAACCTAGTATCTGCAATCCATATATCGGAAATCAAATTGTTCAATGATTATGAGGAGGAT  
TTTCTGTAAACAATGCTACTCTTAATCGATTTTATTCTCTTCACTTTATTTTACCTTTTGCAATTTTATTTTTAGT  
TATTATTCATTTAACATTTCTCCATGAATTAGGATCCTCTAATCCTATAGGAATTAGAAGAAATTTTAATAAAA  
TTCCATTTAACCTTATTTTACAATTAAGACATTATTGGTTTTATTATAATAATTACAATTCTATTATTAATTT  
CTTTTATTAATCCATATATCTTATCAGACCCTGAAAATTTTAATAAAGCTAATTCAATAATTACCCCAATTCA  
ATTCAACCAGAATGATATTTTTTTATTTGCTTATGCAATCTTACGATCAATCCCAATAAACTAGG

>H10

ACAGTTATTACAAACTTAGTATCTGCAATCCCTTATATTGGAAATCAAATTGTTCAATGATTATGGGGGGGAT  
TTTCTGTAAATAATGCTACTCTTAATCGATTCTATTCTCTTCACTTTATTTTACCTTTTGTAATTTTATTTTTAGT  
TATTATTCATTTAACATTTCTTCATGAACTAGGATCTTCTAATCCTATAGGAATTAGAAGAAATTTTAATAAAA  
TCCCATTTAATCCTTATTTTACAATTAAGATATTATTGGCTTTATTATAATAATTACAATTCTATTATTAATTT  
CTTTTATTAATCCATATATCTTATCAGACCCAGAAAATTTTAATAAAGCTAATTCAATAATTACCCCCATTCA  
ATTCAACCAGAATGATATTTTTTTATTTGCTTATGCAATCTTACGATCAATCCCAATAAACTAGG

>H11

ACAGTTATTACAAACTTAGTATCTGCAATTCCATATATTGGAAATCAAATTGTTCAATGATTATGAGGGGGAT  
TTTCTGTAAATAATGCTACTCTTAATCGATTTTATTCTCTACACTTTATTTTACCTTTTGCAATTTTATTTTTAAT  
TATTATTCATTTAACATTTCTTCATGAACTAGGGTCATCAAATCCTATAGGAATTAGAAGAAATTTTAATAAAA  
ATTCCATTTAATCCTTATTTTACAATTAAGACATTATTGGTTTTATTATAATAATTACAATTCTATTATTAATT  
TCTTTTATTAATCCATATATCTTATCAGACCCAGAAAATTTTAATAAAGCTAATTCAATAATTACTCCTATTCA  
TATTCAACCAGAATGATATTTTTTTATTTGCTTACGCAATCTTACGATCAATTCCCAATAAACTAGG

>H12

ACAGTTATTACAAACTTAGTATCTGCAATCCCATATATTGGGAATCAAATTGTTCAATGATTATGAGGGGGAT  
TTTCTGTAAATAATGCCACTCTAAATCGCTTTTACTCTCTACACTTTATTTTACCTTTTGCAATTTTATTTCTAG  
TTATTATTCATTTAACATTTCTTCATGAATTAGGATCATCTAACCCAATAGGAGTTAGAAGAAATTTTAATAAAA  
ATTCCATTTAACCCTTATTTTACAATTAAGACATTATTGGTTTTATTATAATAATTACAATTCTATTATTAATT  
TCTTTTATAAATCCATATATCTTATCAGATCCAGAAAATTTTAATAAAGCTAATTCAATAATTACCCCTATTCA  
TATTCAACCTGAATGATATTTTTTTATTTGCTTATGCAATCTTACGGTCAATTCCCAATAAACTAGG

>H13

ACAGTTATTACAAACTTAGTATCCGCAATCCCATATATTGGAAATCAAATTGTCCAATGATTATGAGGAGGTT  
TTTCTGTAAATAATGCCACTCTAAATCGCTTTTACTCTCTACACTTTATTTTACCTTTTGCAATTTTATTTCTAG  
TTATTATTCATTTAACATTTCTTCATGAACTAGGATCATCTAATCCAATAGGAGTTAGAAGAAATTTTAATAAAA  
ATTCCATTTAACCCTTATTTTACAATTAAGACATTATTGGTTTTATTATAATAATTACAATTCTATTATTAATT  
TCTTTTATAAACCCTATATATCTTATCAGATCCAGAAAATTTCAATAAAGCTAATTCAATAATTACTCCTATTCA  
TATTCAACCTGAATGATATTTTTTTATTTGCTTATGCAATCTTACGATCAATCCCAATAAACTAGG

>H14

ACAGTTATTACAACTTAGTATCTGCAATCCCATATATTGGAAATCAAATTGTTCAATGATTATGGGGAGGGT  
TTTCTGTAAATAATGCCACTCTAAATCGTTTTACTCTCTACACTTTATTTTACCTTTTGTAAATTTATTTCTAGT  
TATTATTCATTTAACATTTCTTCATGAATTAGGATCATCTAACCCCTATAGGAGTTAGAAGAAATTTTAATAAAA  
TTCCATTTAACCCCTATTTTACAATTAAGACATTATTGGTTTTATTATAATAATTACAATTCTATTATTAATTT  
CTTTTATAAATCCATATATCTTATCAGATCCAGAAAATTTTAATAAAGCTAATTCAATAATTACCCCTATTTCAT  
ATTCAACCTGAATGATATTTTTTTATTTGCTTATGCAATCTTACGATCAATCCCCAATAAACTAGG

>H15

ACAGTTATTACAACTTAGTATCTGCAATCCCATATATTGGAAATCAAATTGTTCAATGATTATGGGGAGGGT  
TTTCTGTAAATAATGCCACTCTAAATCGTTTTACTCTCTACACTTTATTTTACCTTTTGTAAATTTATTTCTAGT  
TATTATTCATTTAACATTTCTTCATGAATTAGGGTCATCTAACCCCTATAGGAGTTAGAAGAAATTTTAATAAAA  
TTCCATTTAACCCCTATTTTACAATTAAGACATTATTGGTTTTATTATAATAATTACAATTCTATTATTAATTT  
CTTTTATAAATCCATATATCTTATCAGATCCAGAAAATTTTAATAAAGCTAATTCAATAATTACCCCTATTTCAT  
ATTCAACCTGAATGATATTTTTTTATTTGCTTATGCAATCTTACGATCAATCCCCAATAAACTAGG

>H16

ACAGTTATTACAAACCTAGTATCCGCAATTCCATATATTGGAAATCAAATTGTTCAATGATTATGAGGAGGAT  
TTTCTGTAAACAATGCTACTCTTAATCGATTTTATTCTCTTCACTTTATTTTACCTTTTGTAAATTTATTTTCTAGT  
TATTATTCATTTAACATTTCTCCATGAATTAGGATCCTCTAATCCTATAGGAATTAGAAGAAATTTTAATAAAA  
TTCCATTTAACCCCTATTTTACAATTAAGACATTATTGGTTTTATTATAATAATTACAATTCTATTATTAATTT  
CTTTTATTAATCCATATATCTTATCAGACCCTGAAAATTTTAATAAAGCTAATTCAATAATTACCCCAATTTCAT  
ATTCAACCAGAATGATATTTTTTTATTTGCTTATGCAATCTTACGGTCAATCCCCAATAAACTAGG

>H17

ACAGTTATTACAACTTAGTATCTGCAATCCCATATATTGGAAATCAAATTGTTCAATGATTATGAGGGGGGT  
TTTCTGTAAATAATGCCACTCTAAATCGTTTTACTCTCTACACTTTATTTTACCTTTTGTAAATTTATTTCTAG  
TTATTATTCATTTAACATTTCTTCATGAATTAGGATCATCTAACCCCTATAGGAGTTAGAAGAAATTTTAATAAAA  
ATTCCATTTAATCCTTATTTTACAATTAAGACATTATTGGTTTTATTATAATAATTACAATTCTATTATTAATT  
TCTTTTATAAATCCATATATCTTATCAGATCCAGAAAATTTTAATAAAGCTAATTCAATAATTACCCCTATTCA  
TATTCAACCTGAATGATATTTTTTTATTTGCTTATGCAATCTTACGATCAATTCCCCAATAAACTAGG

>H18

ACAGTTATTACAAATTTAGTATCTGCAATCCCATATATTGGAAATCAAATTGTTCAATGATTATGAGGGGGGT  
TCTCTGTAAATAATGCCACTCTTAATCGATTTTATTCTCTACACTTTATTTTACCTTTTGTAAATTTATTTCTAGT  
TATTATTCATTTAACATTTCTTCATGAACTAGGATCATCTAATCCTATAGGAATTAGAAGAAATTTTAATAAAA  
TCCCATTTAATCCTTATTTTACAATTAAGACATTATTGGTTTTATTATAATAATTACAATTCTATTATTAATTT  
CTTTTATTAATCCATATATCTTATCGGACCCTGAAAATTTCAATAAAGCTAATTCAATAATTACCCCCATTTCAT  
ATTCAACCAGAATGGTATTTTTTTATTTGCTTATGCAATCTTACGATCAATCCCCAATAAACTAGG

>H19

ACAGTTATTACAACTTAGTATCTGCAATCCCATATATTGGAAATCAAATTGTTCAATGATTATGAGGGGGAT  
TTTCTGTAAATAATGCTACTCTTAATCGATTTTATTCTCTACACTTTATTTTACCTTTTGCAGTTTTATTTTTAGT  
AATTATTCATTTAACATTTCTTCATGAACTAGGGTCATCAATCCTATAGGAATTAGAAGAAATTTTAATAAAA  
ATTCCATTTAATCCTTATTTTACAATTAAGACATTATTGGTTTTATTATAATAATTACAATTCTATTATTAATT  
TCTTTTATTAATCCATATATCTTATCAGACCCGAAAATTTTAATAAAGCTAATTCAATAATTACTCCTATTCA  
TATTCAACCAGAATGATATTTTTTTATTTGCTTACGCAATCTTACGATCAATTCCCCAATAAACTAGG

>H20

ACAGTTATTACAACTTAGTATCTGCAATCCCATATATTGGAAATCAAATTGTTCAATGATTATGGGGAGGGT  
TTTCTGTAAATAATGCCACTCTAAATCGTTTTACTCTCTACACTTTATTTTACCTTTTGTAAATTTATTTCTAG  
TTATTATTCATTTAACATTTCTTCATGAATTAGGATCATCTAACCCCTATAGGAGTTAGAAGAAATTTTAATAAAA  
ATTCCATTTAATCCTTATTTTACAATTAAGACATTATTGGTTTTATTATAATAATCACAATTCTATTATTAATT  
TCTTTTATAAATCCATATATCTTATCAGATCCAGAAAATTTTAATAAAGCTAATTCAATAATTACCCCTATTCA  
TATTCAACCTGAATGATATTTTTTTATTTGCTTATGCAATCTTACGATCAATCCCCAATAAACTAGG

>H21

ACAGTTATTACAAACTTAGTATCTGCAATCCCATATATTGGAAATCAAATTGTTCAATGATTATGGGGGGGGT  
TTTCTGTAAATAATGCCACTCTTAATCGCTTTTACTCTCTACACTTTATTTTACCTTTTGTAAATTTTATTCTAGT  
TATTATTCATTTAACATTTCTTCATGAATTAGGGTCATCTAACCCCTATAGGAGTTAGAAGAAATTTTAATAAAA  
TTCCATTTAACCCCTTATTTTACAATTAAGACATTATTGGTTTTATTATAATAATTACAATTCTATTATTAATTT  
CTTTTATAAATCCATATATCTTATCAGATCCAGAAAATTTTAATAAAGCTAATTCAATAATTACCCCTATTCAC  
ATTCAACCTGAATGATATTTTTTATTTGCTTATGCAATCTTACGATCAATCCCCAATAAACTAGG

>H22

ACAGTTATTACAAATTTAGTATCTGCAATCCCATATATTGGAAATCAAATTGTTCAATGATTATGAGGGGGGT  
TCTCTGTAAATAATGCCACTCTTAATCGATTTTATTCTCTACACTTTATTTTACCTTTTGTAAATTTTATTCTAGT  
TATTATTCATTTAACATTTCTTCATGAACTAGGATCATCTAATCCTATAGGAATTAGAAGAAATTTTAATAAAA  
TCCCATTTAATCCTTATTTTACAATTAAGACATTATTGGTTTTATTATAATAATTACAATTCTATTATTAATTT  
CTTTTATTAATCCATATATCTTATCAGACCCTGAAAATTTCAATAAAGCTAATTCAATAATTACCCCATTCAT  
ATTCAACCAGAATGGTATTTTTTATTTGCTTATGCAATCTTACGATCAATCCCCAATAAACTAGG

>H23

ACAGTTATTACAAACTTAGTATCCGCAATCCCATATATTGGGAATCAAATTGTTCAATGATTATGAGGAGGGT  
TTTCTGTAAATAATGCCACTCTAAATCGCTTTTACTCTCTACACTTTATTTTACCTTTTACAATTTTATTCTAG  
TTATTATTCATTTAACATTTCTTCATGAATTAGGATCATCTAACCCGATAGGAGTTAGAAGAAATTTTAATAAAA  
ATTCCATTTAACCCCTTATTTTACAATTAAGACATTATTGGTTTTATTATAATAATTACAATTCTATTATTAATTT  
TCTTTTATAAATCCATATATCTTATCAGATCCAGAAAATTTTAATAAAGCTAATTCAATAATTACTCCTATTCA  
TATTCAACCTGAATGATATTTTTTATTTGCTTATGCAATCTTACGATCAATTCCCAATAAACTAGG

>H24

ACAGTTATTACAAACTTAGTATCTGCAATCCCATATATTGGAAATCAAATTGTTCAATGATTATGGGGGGGGT  
TTTCTGTAAATAATGCTACTCTAAATCGCTTTTACTCTCTACACTTTATTTTACCTTTTGTAAATTTTATTCTAGT  
TATTATTCATTTAACATTTCTTCATGAATTAGGATCATCTAACCCCTATAGGAGTTAGAAGAAATTTTAATAAAA  
TTCCATTTAATCCTTATTTTACAATTAAGACATTATTGGTTTTATTATAATAATTACAATTCTATTATTAATTT  
CTTTTATAAATCCATATATCTTATCAGATCCAGAAAATTTTAATAAAGCTAATTCAATAATTACCCCTATTCAT  
ATTCAACCTGAATGATATTTTTTATTTGCTTATGCAATCTTACGATCAATCCCCAATAAACTAGG

>H25

ACAGTTATTACAAACTTAGTATCTGCAATCCCATATATTGGAAATCAAATTGTTCAATGATTATGAGGGGGGT  
TTTCTGTAAATAATGCTACTCTTAATCGATTTTATTCTCTACACTTTATTTTACCTTTTGCAGTTTTATTTTTAGT  
TATTATTCATTTAACATTTCTTCATGAACTAGGGTCATCAAATCCTATAGGAATTAGAAGAAATTTTAATAAAA  
ATTCCATTTAACCCCTTATTTTACAATTAAGACATTATTGGTTTTATTATAATAATTACAATTCTATTATTAATTT  
TCTTTTATTAATCCATATATCTTATCAGACCCAGAAAATTTTAATAAAGCTAATTCAATAATTACTCCTATTCA  
TATTCAACCAGAATGATATTTTTTATTTGCTTACGCAATCTTACGATCAATTCCCAATAAACTAGG

>H26

ACAGTTATTACAAACTTAGTATCTGCAATCCCATATATTGGAAATCAAATTGTTCAATGATTATGGGGGAGGGT  
TTTCTGTAAATAATGCCACTCTAAATCGCTTTTACTCTCTACACTTTATTTTACCTTTTATAAATTTTATTCTAGT  
TATTATTCATTTAACATTTCTTCATGAATTAGGGTCATCTAACCCCTATAGGAGTTAGAAGAAATTTTAATAAAA  
TTCCATTTAATCCTTATTTTACAATTAAGACATTATTGGTTTTATTATAATAATTACAATTCTATTATTAATTT  
CTTTTATAAATCCATATATCTTATCAGATCCAGAAAATTTTAATAAAGCTAATTCAATAATTACCCCTATTCAT  
ATTCAACCTGAATGATATTTTTTATTTGCTTATGCAATCTTACGATCAATCCCCAATAAACTAGG

>H27

ACAGTTATTACAAACTTAGTATCTGCAATCCCATATATTGGAAATCAAATTGTTCAATGATTATGGGGGGGGT  
TTTCTGTAAATAATGCTACTCTTAATCGATTTTATTCTCTACACTTTATTTTACCTTTTGCAGTTTTATTTTTAGT  
TATTATTCATTTAACATTTCTTCATGAACTAGGGTCATCAAATCCTATAGGAATTAGAAGAAATTTTAATAAAA  
ATTCCATTTAACCCCTTATTTTACAATTAAGACATTATTGGTTTTATTATAATAATTACAATTCTATTATTAATTT

TCTTTTATTAATCCATATATCTTATCAAACCCAGAAAATTTTAATAAAGCTAATTCAATAATTACTCCTATTCA  
TATTCAACCAGAATGATATTTTTTTATTTGCTTACGCAATCTTACGATCAATTCCCAATAAACTAGG

>H28

ACAGTTATTACAACTTAGTATCTGCAATCCCATATATTGGAAATCAAATTGTTCAATGATTATGGGGGGGGT  
TTTCTGTAAATAATGCTACTCTAAATCGCTTTTACTCTCTACACTTTATTTTACCTTTTGCAATTTTATTTCTAGT  
TATTATTCATTTAACATTTCTTCATGAATTAGGATCATCTAATCCTATAGGAGTTAGAAGAAATTTTAATAAAA  
TTCCATTTAATCCTTATTTTACAATTAAGACATTATTGGTTTTATTATAATAATTACAATTCTATTATTAATTT  
CTTTTATAAATCCATATATCTTATCAGATCCGGAATAATTTTAATAAAGCTAATTCAATAATTACCCCTATTCA  
ATTCAACCTGAATGATATTTTTTTATTTGCTTATGCAATCTTACGATCAATCCCAATAAACTAGG

>H29

ACAGTTATTACAACTTAGTATCTGCAATCCCATATATTGGAAATCAAATTGTTCAATGATTATGAGGGGGGT  
TTTCTGTAAATAATGCCACTCTAAATCGCTTTTACTCTCTACACTTTATTTTACCTTTTGCAATTTTATTTCTAG  
TTATTATTCATTTAACATTTCTTCATGAATTAGGATCATCTAACCCAATAGGAGTTAGAAGAAATTTTAATAAAA  
ATTCCATTTAACCCTTATTTTACAATTAAGACATTATTGGTTTTATTATAATAATTACAATTCTATTATTAATTT  
TCTTTTATAAATCCATATATCTTATCAGATCCAGAAAATTTTAATAAAGCTAATTCAATAATTACTCCTATTCA  
TATTCAACCTGAATGATATTTTTTTATTTGCTTATGCAATCTTACGATCAATTCCCAATAAACTAGG

>H30

ACAGTTATTACAACTTAGTATCTGCAATCCCATATATTGGAAATCAAATTGTTCAATGATTATGGGGGAGGAT  
TTTCTGTAAATAATGCTACTCTAAATCGCTTTTACTCTCTACACTTTATTTTACCTTTTGTAATTTTATTTCTAGT  
TATTATTCATTTAACATTTCTTCATGAATTAGGATCATCTAACCCCTATAGGAGTTAGAAGAAATTTTAATAAAA  
TTCCATTTAATCCTTATTTTACAATTAAGACATTATTGGTTTTATTATAATAATTACAATTCTATTATTAATTT  
CTTTTATAAATCCATATATCTTATCAGATCCAGAAAATTTTAATAAAGCTAATTCAATAATTACCCCTATTCA  
ATTCAACCTGAATGATATTTTTTTATTTGCTTATGCAATCTTACGATCAATCCCAATAAACTAGG

>H31

ACAGTTATTACAACTTAGTATCTGCAATCCCATATATTGGAAATCAAATTGTTCAATGATTATGGGGGGGAT  
TTTCTGTAAATAATGCCACTCTAAATCGCTTTTACTCTCTACACTTTATTTTACCTTTTGTAATTTTATTTCTAGT  
TATTATTCATTTAACATTTCTTCATGAATTAGGGTCATCTAACCCCTATAGGAGTTAGAAGAAATTTTAATAAAA  
TTCCATTTAATCCTTATTTTACAATTAAGACATTATTGGTTTTATTATAATAATTACAATTCTATTATTAATTT  
CTTTTATAAATCCATATATCTTATCAGATCCAGAAAATTTTAATAAAGCTAATTCAATAATTACCCCTATTCA  
ATTCAACCTGAATGATATTTTTTTATTTGCTTATGCAATCTTACGATCAATCCCAATAAACTAGG

>H32

ACAGTTATTACAACTTAGTATCTGCAATCCCATATATTGGAAATCAAATTGTTCAATGATTATGGGGGAGGAT  
TTTCTGTAAATAATGCCACTCTAAATCGCTTTTACTCTCTACACTTTATTTTACCTTTTGTAATTTTATTTCTAGT  
TATTATTCATTTAACATTTCTTCATGAATTAGGATCATCTAACCCCTATAGGAGTTAGAAGAAATTTTAATAAAA  
TTCCATTTAATCCTTATTTTACAATTAAGACATTATTGGTTTTATTATAATAATTACAATTCTATTATTAATTT  
CTTTTATAAATCCATATATCTTATCAGATCCAGAAAATTTTAATAAAGCTAATTCAATAATTACCCCTATTCA  
ATTCAACCTGAATGATATTTTTTTATTTGCTTATGCAATCTTACGATCAATCCCAATAAACTAGG

>H33

ACAGTTATTACAACTTAGTATCTGCAATCCCATATATTGGAAATCAAATTGTTCAATGATTATGAGGAGGAT  
TTTCTGTAAACAATGCTACTCTTAATCGGTTTTATTCTCTTCACTTTATTTTACCTTTTGTAATTTTATTTTATAGT  
TATTATTCATTTAACATTTCTTCATGAATTAGGATCCTCTAATCCTATAGGAATTAGAAGAAATTTTAATAAAA  
TTCCATTTAATCCTTATTTTACAATTAAGACATTATTGGTTTTATTATAATAATTACAATTCTATTATTAATTT  
CTTTTATTAACCCATATATCTTATCAGACCCGAAAATTTTAATAAAGCTAATTCAATAATTACCCCAATTCA  
ATTCAACCAGAATGATATTTTTTTATTTGCTTATGCAATTTTACGATCAATCCCAATAAACTAGG

>H34

ACAGTTATTACAACTTAGTATCCGCAATCCCATATATTGGAAATCAAATTGTCCAATGATTATGAGGAGGTT  
TTTCTGTAAATAATGCCACTCTAAATCGCTTTTACTCTCTACACTTTATTTTACCTTTTGCATTTTATTTCTAG  
TTATTATTCATTTAACATTTCTTCATGAATTAGGATCATCTAATCCAATAGGAGTTAGAAGAAATTTAATAAAA  
ATTCCATTTAACCCTTATTTTACAATTAAGACATTATTGGTTTTATTATAATAATTACAATTCTATTATTAATT  
TCTTTTATAAATCCATATATCTTATCAGATCCAGAAAATTTCAATAAAGCTAATTCAATAATTACTCCTATTCA  
TATCAACCTGAATGATATTTTTTATTTGCTTACGCAATCTTACGATCAATCCCCAATAAACTAGG

>H35

ACAGTTATTACAACTTAGTATCTGCAATCCCATATATTGGAAATCAAATTGTTCAATGATTATGAGGGGGGT  
TTTCTGTAAATAATGCTACTCTTAATCGATTTTATTCTCTACACTTTATTTTACCTTTTGCAGTTTATTTTTAGT  
TATTATTCATTTAACATTTCTTCATGAACTAGGGTCATCAAATCCTATAGGAATTAGAAGAAATTTAATAAAA  
ATTCCATTTAACCCTTATTTTACAATTAAGACATTATTGGTTTTATTATAATAATTACAATTCTATTATTAATT  
TCTTTTATTAATCCATATATCTTATCAGACCCAGAAAATTTAATAAAGCTAATTCAATAATTACTCCTATTCA  
TATCAACCAGAATGATATTTTTTATTTGCTTACGCAATCTTACGGTCAATTCCCCAATAAACTAGG

>H36

ACAGTTATTACAAATTTAGTATCTGCAATCCCATATATTGGAAATCAAATTGTTCAATGATTATGAGGGGGGT  
TCTCTGTAAATAATGCCACTCTTAATCGATTTTATTCTCTACACTTTATTTTACCTTTTGCATTTTATTTCTAGT  
TATTATTCATTTAACATTTCTTCATGAACTAGGATCATCTAATCCTATAGGAATTAGAAGAAATTTAATAAAA  
TCCATTTAATCCTTATTTTACAATTAAGACATTATTGGTTTTATTATAATAATTACAATTCTATTATTAATTT  
CTTTTATTAATCCATATATCTTATCAGACCCGAAAATTTCAATAAAGCTAATTCAATAATTACCCCATTCAT  
ATTCAACCAGAATGGTATTTTTTATTTGCTTATGCAATCTTACGGTCAATCCCCAATAAACTAGG

>H37

ACAGTTATTACAACTTAGTATCTGCAATCCCATATATTGGAAATCAAATTGTTCAATGATTATGGGGAGGGT  
TTTCTGTAAATAATGCCACTCTTAATCGCTTTTACTCTCTACACTTTATTTTACCTTTTGTAAATTTATTTCTAGT  
TATTATTCATTTAACATTTCTTCATGAATTAGGATCATCTAATCCTATAGGAATTAGAAGAAATTTAATAAAA  
TTCCATTTAATCCTTATTTTACAATTAAGACATTATTGGTTTTATTATAATAATTACAATTCTATTATTAATTT  
CTTTTATAAATCCATATATCTTATCAGATCCAGAAAATTTAATAAAGCTAATTCAATAATTACCCCTATTCA  
ATTCAACCTGAATGATATTTTTTATTTGCTTATGCAATCTTACGATCAATCCCCAATAAACTAGG

>H38

ACAGTTATTACAACTTAGTATCTGCAATCCCATATATTGGAAATCAAATTGTTCAATGATTATGGGGGGGGT  
TTTCTGTAAATAATGCCACTCTAAATCGCTTTTACTCTCTACACTTTATTTTACCTTTTGTAAATTTATTTCTAGT  
TATTATTCATTTAACATTTCTTCATGAATTAGGATCTTCTAACCCATAGGAGTTAGAAGAAATTTAATAAAA  
TTCCATTTAATCCTTATTTTACAATTAAGACATTATTGGTTTTATTATAATAATTACAATTCTATTATTAATTT  
CTTTTATAAATCCATATATCTTATCAGATCCAGAAAATTTAATAAAGCTAATTCAATAATTACCCCTATTCA  
ATTCAACCTGAATGATATTTTTTATTTGCTTATGCAATCTTACGATCAATCCCCAATAAACTAGG

>H39

ACAGTTATTACAACTTAGTATCTGCAATCCCTATATTGGAAATCAAATTGTTCAATGATTATGAGGAGGGT  
TTTCTGTAAATAATGCCACTCTAAATCGCTTTTACTCTCTACACTTTATTTTACCTTTTGTAAATTTATTTCTAGT  
TATTATTCATTTAACATTTCTTCATGAATTAGGGTCATCTAACCCATAGGAGTTAGAAGAAATTTAATAAAA  
TTCCATTTAACCCTTATTTTACAATTAAGACATTATTGGTTTTATTATAATAATTACAATTCTATTATTAATTT  
CTTTTATAAATCCATATATCTTATCAGATCCAGAAAATTTAATAAAGCTAATTCAATAATTACCCCTATTCA  
ATTCAACCTGAATGATATTTTTTATTTGCTTATGCAATCTTACGATCAATCCCCAATAAACTAGG

>H40

ACAGTTATTACAACTTAGTATCTGCAATCCCATATATTGGAAATCAAATTGTTCAATGATTATGAGGAGGAT  
TTTCTGTAAATAATGCCACTCTTAATCGATTTTATTCTCTACACTTTATTTTACCTTTTGCATTTTATTTTTAGT  
TATTATTCATTTAACATTTCTTCATGAATTAGGGTCATCTAATCCTATAGGAATTAGAAGAAATTTAATAAAA  
TTCCATTTAATCCTTATTTTACAATTAAGACATTATTGGTTTTATTATAATAATTACAATTCTATTATTAATTT  
CTTTTATTAATCCATATATCTTATCGAACCCGAAAAATTTAATAAAGCTAATTCAATAATTACCCCTATTCA  
ATTCAACCTGAATGATATTTTTTATTTGCTTATGCAATCTTACGATCAATCCCCAATAAACTAGG

>H41

ACAGTTATTACAAACTTAGTATCTGCAATCCCATATATTGGAAATCAAATTGTTCAATGATTATGGGGAGGAT  
TTTCTGTAAATAATGCCACTCTAAATCGCTTTTACTCTCTACACTTTATTTTACCTTTTGTAAATTTTATTTCTAGT  
TATTATTCATTTAACATTTCTTTCATGAATTAGGGTCATCTAACCCCTATAGGAGTTAGAAGAAATTTTAATAAAA  
TTCCATTTAATCCTTATTTTACAATTAAGACATTATTGGTTTTATTATAATAATTACAATTCTATTATTAATTT  
CTTTTATAAATCCATATATCTTATCAGATCCAGAAAATTTTAATAAAGCTAATTCAATAATTACCCCTATTCAT  
ATTCAACCTGAATGATATTTTTTATTTGCTTATGCAATCTTACGATCAATCCCCAATAAACTAGG

>H42

ACAGTTATTACAAACTTAGTATCTGCAATCCCATATATTGGAAATCAAATTGTTCAATGATTATGAGGGGGAT  
TTTCTGTAAATAATGCTACTCTTAATCGATTTTATTCTCTACACTTTATTTTACCTTTTGCAGTTTTATTTTTAGT  
AATTATTCATTTAACATTTCTTTCATGAACTAGGGTCATCAAATCCTATAGGAATTAGAAGAAATTTTAATAAAA  
ATTCCATTTAATCCTTATTTTACAATTAAGACATTATTGGTTTTATTATAATAATTACAATTCTATTATTAATTT  
TCTTTTATTAATCCATATATCTTATCAGACCCAGAAAATTTTAATAAAGCTAATTCAATAATTACTCCTATTCA  
TATTCAACCAGAATGATATTTTTTATTTGCTTACGCAATCTTACGATCAATTCCCAATAAACTAGG

>H43

ACAGTTATTACAAACTTAGTATCTGCAATCCCATATATTGGAAATCAAATTGTTCAATGATTATGGGGGGGAT  
TTTCTGTAAATAATGCCACTCTAAATCGCTTTTACTCTCTACACTTTATTTTACCTTTTGTAAATTTTATTTCTAGT  
TATTATTCATTTAACATTTCTTTCATGAATTAGGATCATCTAACCCCTATAGGAGTTAGAAGAAATTTTAATAAAA  
TTCCATTTAATCCTTATTTTACAATTAAGACATTATTGGTTTTATTATAATAATTACAATTCTATTATTAATTT  
CTTTTATAAATCCATATATCTTATCAGATCCAGAAAATTTTAATAAAGCTAATTCAATAATTACCCCTATTCAT  
ATTCAACCTGAATGATATTTTTTATTTGCTTATGCAATCTTACGATCAATCCCCAATAAACTAGG

>H44

ACAGTTATTACAAACCTAGTATCTGCAATCCCATATATTGGAAATCAAATTGTTCAATGATTATGAGGAGGAT  
TTTCTGTAAACAATGCTACTCTTAATCGATTTTATTCTCTTCACTTTATTTTACCTTTTGCAGTTTTATTTTTAGT  
TATTATTCATTTAACATTTCTTTCATGAATTAGGATCCTCTAATCCTATAGGAATTAGAAGAAATTTTAATAAAA  
TTCCATTTAACCCCTTACTTTACAATTAAGACATTATTGGTTTTATTATAATAATTACAATTCTATTATTAATTT  
CTTTTATTAATCCATATATCTTATCAGACCCGAAAATTTTAATAAAGCTAATTCAATAATTACCCCAATTCAT  
ATTCAACCAGAATGATATTTTTTATTTGCTTATGCAATCTTACGATCAATCCCCAATAAACTAGG

>H45

ACAGTTATTACAAACCTAGTATCTGCAATCCGTATATTGGAAATCAAATTGTTCAATGATTATGAGGAGGAT  
TTTCTGTAAATAATGCTACTCTTAATCGATTTTATTCTCTTCACTTTATTCTACCTTTTATAATTTTATTTTTAGT  
TATTATTCATTTAACATTTCTCCATGAATTAGGATCCTCTAATCCTATAGGAATTAGAAGAAATTTTAATAAAA  
TTCCATTTAACCCCTTATTTTACAGTTAAAGACATTATTGGTTTTATTATAATAATTACAATTCTATTATTAATTT  
CTTTTATTAATCCATATATCTTATCAGACCCGAAAATTTTAATAAAGCTAATTCAATAATTACCCCAATTCAT  
ATTCAACCAGAATGATATTTTTTATTTGCTTATGCAATCTTACGATCAATCCCCAATAAACTAGG

>H46

ACAGTTATTACAAACTTAGTATCTGCAATCCCATATATTGGAAATCAAATTGTTCAATGATTATGGGGAGGAT  
TTTCTGTAAATAATGCTACTCTAAATCGCTTTTACTCTCTACACTTTATTTTACCTTTTGTAAATTTTATTTCTAGT  
TATTATTCATTTAACATTTCTTTCATGAATTAGGATCATCTAACCCCTATAGGAGTTAGAAGAAATTTTAATAAAA  
TTCCATTTAACCCCTTATTTTACAATTAAGACATTATTGGTTTTATTATAATAATTACAATTCTATTATTAATTT  
CTTTTATAAATCCATATATCTTATCAAATCCGAAAAATTTTAATAAAGCTAATTCAATAATTACCCCTATTCAT  
ATTCAACCTGAATGATATTTTTTATTTGCTTATGCAATCTTACGATCAATCCCCAATAAACTAGG

>H47

ACAGTTATTACAAACTTAGTATCTGCAATCCCATATATTGGGAATCAAATTGTTCAATGATTATGAGGGGGAT  
TTTCTGTAAATAATGCCACTCTAAATCGCTTTTACTCTCTACACTTTATTTTACCTTTTGTAAATTTTATTTCTAG  
TTATTATTCATTTAACATTTCTTTCATGAATTAGGATCATCTAACCCCAATAGGAGTTAGAAGAAATTTTAATAAAA  
ATTCCATTTAACCCCTTATTTTACAATTAAGACATTATTGGTTTTATTATAATAATTACAATTCTATTATTAATTT

TCTTTTATAAATCCATATATCTTATCAGATCCAGAAAATTTTAATAAAGCTAATTCAATAATTACCCCTATTCA  
TATTCAACCTGAATGATATTTTTTATTTGCTTATGCAATCTTACGATCAATTCCCAATAAACTAGG

>H48

ACAGTAATCACAAATTTAGTCTCTGCAATTCCTTATATCGGAAATCAAATTGTTCAATGATTATGAGGAGGGT  
TTTCTGTAAATAATGCAACTCTTAACCGATTCTACTCCTTACATTTTATTTACCTTTTATAATTTTATTATAG  
TTATTATTCATTTAACATTTCTTCATGAGTTAGGATCCTCAAATCCTATAGGAATTAAGAAATTTCAATAAAA  
ATCCCATTTAATCCATACTTTATAATTAAGACATTATTGGTTTTATTATAATAATTTCAATTTTATTATTAATT  
TCTTTTATAAATCCTTACATTTTATCAGACCCAGAAAACCTTCAATAAAGCCAACCTCTATAATCACCCCAATTCA  
CATTCAACCTGAGTGATATTTTTCTATTTGCATATGCTATTTTACGGTCAATTCCAAATAAACTAGG

>H49

ACAGTTATTACAACTTAGTATCTGCAATCCCATATATTGGGAATCAAATTGTTCAATGATTATGAGGGGGTT  
TTTCTGTAAATAATGCCACTCTAAATCGCTTTTACTCTCTACACTTTATTTTACCTTTTGTCAATTTTATTCTAG  
TTATTATTCATTTAACATTTCTTCATGAATTAGGATCATCTAACCCAATAGGAGTTAGAAGAAATTTTAATAAAA  
ATTCCATTTAACCCTTATTTTACAATTAAGACATTATTGGTTTTATTATAATAATTACAATTCTATTATTAATT  
TCTTTTATAAATCCATATATCTTATCAGATCCAGAAAATTTTAATAAAGCTAATTCAATAATTACCCCTATTCA  
TATTCAACCTGAATGATATTTTTTATTTGCTTATGCAATCTTACGATCAATTCCCAATAAACTAGG

>H50

ACAGTTATTACAACTTAGTATCTGCAATCCCATATATTGGGAATCAAATTGTTCAATGATTATGAGGGGGGT  
TCTCTGTAAATAATGCTACTCTTAATCGATTTTATTCTCTACACTTTATTTTACCTTTTGTCAATTTTATTCTAGT  
TATTATTCATTTAACATTTCTTCATGAACTAGGATCATCTAATCCTATAGGAATTAGAAGAAATTTTAATAAAA  
TCCCATTTAATCCTTATTTTACAATTAAGACATTATTGGTTTTATTATAATAATTACAATTCTATTATTAATTT  
CTTTTATTAATCCATATATCTTATCAGACCCTGAAAATTTCAATAAAGCTAATTCAATAATTACCCCCATTCA  
ATTCAACCAGAATGGTATTTTTTATTTGCTTATGCAATCTTACGATCAATCCCAATAAACTAGG

>H51

ACAGTTATTACAAATTTAGTATCTGCAATCCCATATATTGGGAATCAAATTGTTCAATGATTATGAGGGGGGT  
TCTCTGTAAATAATGCCACTCTTAATCGATTTTATTCTCTACACTTTATTTTACCTTTTGTCAATTTTATTCTAGT  
TATTATTCATTTAACATTTCTTCATGAACTAGGATCATCTAATCCTATAGGAATTAGAAGAAATTTTAATAAAA  
TCTCATTTAATCCTTATTTTACAATTAAGACATTATTGGTTTTATTATAATAATTACAATTCTATTATTAATTT  
CTTTTATTAATCCATATATCTTATCAGACCCTGAAAATTTCAATAAAGCTAATTCAATAATTACCCCCATTCA  
ATTCAACCAGAATGGTATTTTTTATTTGCTTATGCAATCTTACGATCAATCCCAATAAACTAGG

>H52

ACAGTTATTACAACTTAGTATCTGCAATCCCATATATTGGGAATCAAATTGTTCAATGATTATGGGGAGGGT  
TTTCTGTAAATAATGCCACTCTTAATCGCTTTTACTCTCTACACTTTATTTTACCTTTTGTAAATTTTATTCTAGT  
TATTATTCATTTAACATTTCTTCATGAATTAGGGTCATCTAATCCTATAGGAATTAGAAGAAATTTTAATAAAA  
TTCCATTTAATCCTTATTTTACAATTAAGACATTATTGGTTTTATTATAATAATTACAATTCTATTATTAATTT  
CTTTTATAAATCCATATATCTTATCAGATCCAGAAAATTTTAATAAAGCTAATTCAATAATTACCCCCATTCA  
ATTCAACCTGAATGATATTTTTTATTTGCTTATGCAATCTTACGATCAATCCCAATAAACTAGG

>H53

ACAGTTATTACAACTTAGTATCCGCAATCCCATATATTGGGAATCAAATTGTCCAATGATTATGAGGGGGTT  
TTTCTGTAAATAATGCCACTCTAAATCGCTTTTACTCTCTACACTTTATTTTACCTTTTGTCAATTTTATTCTAG  
TTATTATTCATTTAACATTTCTTCATGAATTAGGATCATCTAATCCAATAGGAGTTAGAAGAAATTTTAATAAAA  
ATTCCATTTAACCCTTATTTTACAATTAAGACATTATTGGTTTTATTATAATAATTACAATTCTATTATTAATT  
TCTTTTATAAATCCATATATCTTATCAGATCCAGAAAATTTCAATAAAGCTAATTCAATAATTACTCCTATTCA  
TATTCAACCTGAATGATATTTTTTATTTGCTTATGCAATCTTACGATCAATCCCAATAAACTAGG

>H54

ACAGTTATTACAAATTTAGTATCTGCAATTCATATATTGGAAATCAAATGTTCAATGATTATGAGGAGGAT  
TCTCTGTGAATAATGCCACTCTTAATCGATTTTATTCTCTACTTTTATTACCTTTTGTCAATTTTATTTATAG  
TTATTATTCATTTAACATTTCTTCATGAAATAGGATCATCTAATCCTATAGGAATTAGAAGAAATTTAATAAAA  
ATCCCATTTAATCCTTATTTTACAATTAAGACATTATTGGTTTTATTATAATAATTACAATCCTATTATTAATT  
TCTTTTATTAATCCATATATCTTATCAGACCCGAAAATTTAATAAAGCTAATTCAATAATTACTCCTATTCA  
TATCAACCAGAATGATATTTTTTATTTGCTTATGCAATCTTACGATCAATTCCCAATAAACTAGG

>H55

ACAGTTATTACAACTTAGTATCTGCAATCCCTTATATTGGAAATCAAATGTTCAATGATTATGGGGGGGGT  
TTTCTGTAAATAATGCTACTCTTAATCGATTCTATTCTCTTACTTTTATTACCTTTTGTAAATTTTATTTTAGT  
TATTATTCATTTAACATTTCTTCATGAACTAGGATCTTCTAATCCTATGGGAATTAGAAGAAATTTAATAAAA  
TCCCATTTAATCCTTATTTTACAATTAAGATATTATTGGCTTTATTATAATAATTACAATTCTATTATTAATTT  
CTTTTATTAATCCATATATCTTATCAGACCCAGAAAATTTAATAAAGCTAATTCAATAATTACCCCCATTCA  
ATTCAACCAGAATGATATTTTTTATTTGCTTATGCAATCTTACGATCAATTCCCAATAAACTAGG

>H56

ACAGTAATCACAAATTTAGTCTCTGCAATTCCTTATATCGGAAATCAAATGTTCAATGATTATGGGGAGGGT  
TTTCTGTAAATAATGCAACTCTTAACCGATTCTACTCCTTACATTTTATTACCTTTTATAATTTTATTTATAA  
TTATTATTCATTTAACATTTCTTCATGAATTAGGATCCTCGAATCCTATAGGAATTAGAAGAAATTTCAATAAA  
ATTCCATTTAATCCGACTTTATAATTAAGACATTATTGGTTTTATTATAATAATTTCAATTTTATTATTAATT  
TCTTTTATAAATCCTTATATTTTATCAGACCCAGAAAATTTAATAAAGCCAATCTATAATTACCCCTATTCA  
CATTCAACCTGAATGATATTTTCTATTTGCATATGCTATTTTACGATCAATTCCCAATAAACTAGG

>H57

ACAGTTATTACAACTTAGTATCTGCAATCCCATATATCGGAAATCAAATCGTTCAATGATTATGAGGGGGAT  
TTTCTGTAAATAATGCCACTCTTAACCGCTTTTATTCTTTACTTTTATTACCTTTTGTAAATTTTATTCCTAGT  
TATTATTCATTTAACATTTCTTCATGAATTAGGATCATCTAATCCAATAGGAATTAGAAGAAATTTAATAAAA  
ATTCCATTTAATCCATATTTTACAATTAAGACATTATTGGTTTTATTATAATAATTACAATTCTATTATTAATT  
TCTTTTATAAATCCATATATCTTATCAGACCCGAAAATTTCAATAAAGCTAATTCAATAATTACTCCTATTCA  
TATTCAGCCTGAATGATATTTTTTATTTGCTTATGCAATCTTACGATCAATTCCCAATAAACTAGG

**Anexo 3.** Haplotipos de *Emersonella lemae* del gen COI de las poblaciones del centro de México.

>H1

CATGCTTTTGTAAATAATTTTTTTTTTTGTTATACCCGTAATAATAGGGGGATTTGGGAATTTTTTAATCCCTATA  
TTTTAGGTGTTCTGATATAGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGGTTTTGGTTATTACCCCCTAGAATTAC  
TTTATTAATTTCTAGAATATTTATTGGATCTGGGACGGGGACAGGTTGAACTGTGTATCCCCCTTTATCTTCAA  
ATTTGTCTCATGCCGGACCTTCGGTTGATTTATCTATTTTTTCTTTGCATATTGCAGGTGCCAGATCAATTATAG  
GTTCAATTAATTTTATTACTACAATTTTAAATATAAAAATTATTTAAAATTGAAATTATTCCATTATTGCTTGAT  
CAATATTATTGACTGCAATTTTATTATTATTATCATTACCTGTGTTA

>H2

CATGCTTTTGTAAATAATTTTTTTTTTTGTTATACCCGTAATAATAGGGGGATTTGGGAATTTTTTAATCCCTATA  
TTTTAGGTGTTCTGATATAGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGGTTTTGGTTATTACCCCCTAGAATTAC  
TTTATTAATTTCTAGGATATTTATTGGATCTGGAACCTGGGACAGGTTGAACTGTATAACCCCCTTTATCTTCAA  
ATTTGTCTCATGCTGGCCCTTCAGTTGATTTATCAATTTTTTCTTTACATATTGCAGGTGCAAGATCAATTATG  
GGTTCAATTAATTTTATTACTACAATTTTAAATATAAAAATTATTTAAAATTGAAATTATCCCATTATTGCTTG  
ATCAATATTATTGACTGCAATTTTATTATTATTATCATTACCTGTGTTA

>H3

CATGCTTTTGTAAATAATTTTTTTTTTTGTTATACCCGTAATAATAGGGGGATTTGGGAATTTTTTAATCCCTATA  
TTTTAGGTGTTCTGATATAGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGGTTTTGGTTATTACCCCCTAGAATTAC

TTTATTAATTTCTAGGATATTTATTGGATCTGGGACTGGGACAGGTTGAACTGTATATCCCCCTTTATCTTCAA  
ATTTGTCTCATGCTGGCCCTTCAGTTGATTTATCTATTTTTCTTTACATATTGCAGGTGCAAGATCAATTATGG  
GTTCAATTAATTTTATTACTACAATTTTAAATATAAAAATTATTTAAAATTAAAATTATTCCATTATTTGCTTGAT  
CAATATTATTGACTGCAATTTTATTATTATTATCATTACCTGTGTTA

>H4

CATGCTTTTGTATAATTTTTTTTTTTGTAATACCTGTGATAATAGGTGGATTTGGAAATTTTTTAATTCCTATA  
TTTTAGGTGTTCCCTGATATAGCTTTTCCTCGAATAAATAATATAAAGGTTTTGATTATTACCACCTAGGATTAC  
TTTATTAATTTCTAGAATGTTTATTGGATCCGGGACTGGGACAGGTTGAACTGTATATCCACCTTTATCTTCAA  
ATTTATCTCATGCTGGTCCCTCCGTTGATTTATCTATTTTTCTTTACATATTGCAGGTGCTAGGTCAATTATAG  
GTTCAATTAATTTTATTACTACAATTTTAAATATAAAAATTATTTAAAATTGAAATTATTCCATTATTTGCCTGA  
TCAATATTATTGACTGCAATTTTATTATTATTATCATTACCTGTGTTA

>H5

CATGCTTTTGTATAATTTTTTTTTTTGTTATACCTGTGATAATAGGGGGATTTGGGAATTTTTTAATCCCTATA  
TTTTAGGTGTTCCCTGACATAGCTTTTCCTCGAATAAATAATATAAAGGTTTTGATTATTACCCCTAGAATTAC  
TTTATTAATTTCTAGAATATTTATTGGATCTGGAACAGGTTGAACTGTATATCCACCTTTATCTTCAA  
ATTTGTCTCATGCTGGCCCTTCAGTTGATTTATCTATTTTTCTTTACATATTGCAGGTGCAAGATCAATTATGG  
GTTCAATTAATTTTATCACCACAATTTTAAATATAAAAATTATTTAAAATTGAAATTATCCATTATTTGCTTGG  
TCAATATTGTTGACTGCAATTTTATTATTATTATCATTACCTGTGTTA

>H6

CATGCTTTTGTATAATTTTTTTTTTTGTTATACCTGTGATAATAGGAGGATTTGGGAATTTTTTAATCCCTATA  
TTTTAGGTGTTCCCTGATATAGCTTTTCCTCGAATAAATAATATAAAGGTTTTGGTTATTACCTCCTAGAATTAC  
TTTATTAATTTCTAGAATATTTATTGGATCTGGGACTGGAACAGGTTGAACTGTATATCCACCTTTATCTTCAA  
ATTTGTCTCATGCTGGCCCTTCAGTTGATTTATCTATTTTTCTTTACATATTGCAGGTGCAAGATCAATTATGG  
GTTCAATTAATTTTATTACTACAATTTTAAATATAAAAATTATTTAAAATTGAAATTATCCATTATTTGCTTGG  
TCAATATTGTTGACTGCAATTTTATTATTATTATCATTACCTGTGTTA

>H7

CATGCTTTTGTATAATTTTTTTTTTTGTTATACCTGTGATAATAGGAGGATTTGGGAATTTTTTAATCCCTATA  
TTTTAGGTGTTCCCTGATATAGCTTTTCCTCGAATAAATAATATAAAGGTTCTGGTTATTACCTCCTAGAATTAC  
TTTATTAATTTCTAGGATATTTATTGGATCTGGAACAGGTTGAACTGTATATCCACCTTTATCTTCAA  
ATTTGTCTCATGCTGGCCCTTCAGTTGATTTATCAATTTTTCTTTACATATTGCAGGTGCAAGATCAATTATA  
GGTTCAATTAATTTTATTACTACAATTTTAAATATAAAAATTATTTAAAATTGAAATTATTCCATTATTTGCTTG  
GTCAATATTATTGACTGCAATTTTATTATTATTATCATTACCTGTGTTA

>H8

CATGCTTTTGTATAATTTTTTTTTTTGTTATACCTGTGATAATAGGAGGATTTGGGAATTTTTTAATCCCTATA  
TTTTAGGTGTTCCCTGATATAGCTTTTCCTCGAATAAATAATATAAAGGTTTTGGTTATTACCCCTAGAATCAC  
TTTATTAATTTCTAGAATATTTATTGGGTCTGGAACAGGTTGAACTGTATATCCACCTTTATCTTCAA  
ATTTGTCTCATGCTGGTCCCTTCAGTTGATTTATCTATTTTTCTTTACATATTGCAGGTGCGAGATCAATTATGG  
GTTCAATTAATTTTATTACCACAATTTTAAATATAAAAATTATTTAAAATTAAAATTATTCCATTATTTGCTTGG  
TCAATATTGTTGACTGCAATTTTATTATTATTATCATTACCTGTGTTA

>H9

CATGCTTTTGTATAATTTTTTTTTTTGTTATACCTGTGATAATAGGGGGATTTGGGAATTTTTTAATTCCTATA  
TTTTAGGTGTTCCCTGATATAGCTTTTCCTCGAATAAATAATATAAAGGTTTTGGTTATTACCCCTAGAATTAC  
TTTATTAATTTCTAGAATATTTATTGGATCCGGAACAGGTTGAACTGTATATCCACCTTTATCTTCAA  
ATTTGTCTCATGCTGGCCCTTCAGTTGATTTATCTATTTTTCTTTACATATTGCAGGTGCAAGATCAATTATGG  
GTTCAATTAATTTTATTACTACAATTTTAAATATAAAAATTATTTAAAATTAAAATTATTCCATTATTTGCTTGG  
TCAATATTGTTGACTGCAATTTTATTATTATTATCATTACCTGTGTTA

>H10

CATGCTTTTGTAATAATTTTTTTTTTTGTTATACCCGTGATAATAGGAGGATTTGGGAATTTTTTAATCCCTATA  
TTTTAGGTGTTCCCTGACATAGCTTTTCCTCGAATAAATAATATAAGGTTTTGGTTATTACCTCCTAGAATTAC  
TTTATTAATTTCTAGAATATTTATTGGATCTGGAACAGGTTGAACTGTATACCCACCTTTATCTTCAA  
ATTTGTCTCATGCTGGCCCTCAGTTGATTTATCTATTTTTCTTTACATATTGCAGGTGCAAGATCAATTATGG  
GTTCAATTAATTTTATTACTACAATTTTAAATATAAAAATTATTTAAAATTAAAATTATTCCATTATTTGCTTGGT  
CAATATTGTTGACTGCAATTTTATTATTATTATCATTACCTGTGTTA

>H11

CATGCTTTTGTAATAATTTTTTTTTTTGTTATACCTGTAATAATAGGAGGATTTGGGAATTTTTTAATCCCTATA  
TTTTAGGTGTTCCCTGATATAGCTTTTCCTCGAATAAATAATATAAGGTTTTGGTTATTACCCCCTAGAATCAC  
TTTATTAATTTCTAGAATATTTATTGGGTCTGGAACAGGTTGAACTGTATACCCACCTTTATCTTCAA  
ATTTGTCTCATGCTGGTCCCTCAGTTGATTTATCTATTTTTCTTTACATATTGCAGGTGCGAGATCAATTATGG  
GTTCAATTAATTTTATTACCACAATTTTAAATATAAAAATTATTTAAAATTGAAATTATTCCATTATTTGCTTGG  
TCAATATTGTTGACTGCAATTTTATTATTATTATCATTACCTGTGTTA

>H12

CATGCTTTTGTAATAATTTTTTTTTTTGTAATACCAGTGATAATAGGTGGATTTGGGAATTTTTTAATCCTATA  
TTTTAGGGGTACCAGATATAGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGGTTTTGATTATTACCACCTAGAATTAC  
TTTATTAATTTCTAGAATATTTATTGGATCTGGGACTGGTACAGGTTGAACTGTATATCCCTCTTTATCTTCAA  
ATTTGTCTCATGCAGGACCTTCAGTTGATTTATCTATTTTTCTTTACATATTGCAGGTGCTAGATCAATTATAG  
GTTCAATTAATTTTATTACAACAATTTTAAATATAAAAATTATTTAAAATTGAAATTATCCATTATTTGCTTGA  
TCAATATTATTGACTGCAATTTTATTATTATTATCATTACCTGTGTTA

>H13

CATGCTTTTGTAATAATTTTTTTTTTTGTTATACCTGTGATAATAGGGGGATTTGGGAATTTTTTAATCCCTATA  
TTTTAGGTGTTCCCTGATATAGCTTTTCCTCGAATAAATAATATAAGGTTTTGGTTATTACCCCCTAGAATTAC  
TTTATTAATTTCTAGAATATTTATTGGATCTGGGACTGGAACAGGTTGAACTGTATATCCACCTTTATCTTCAA  
ATTTGTCTCATGCTGGTCCCTCAGTTGATTTATCTATTTTTCTTTACATATTGCAGGTGCAAGATCAATTATGG  
GTTCAATTAATTTTATTACTACAATTTTAAATATAAAAATTATTTAAAATTGAAATTATCCATTATTTGCTTGG  
CAATATTGTTGACTGCAATTTTATTATTATTATCATTACCTGTGTTA

>H14

CATGCTTTTGTAATAATTTTTTTTTTTGTTATACCTGTAATAATAGGGGGATTTGGGAATTTTTTAATCCCTATA  
TTTTAGGTGTTCCCTGACATAGCTTTCCCCGAATAAATAATATAAGGTTTTGATTATTACCTCCTAGAATTAC  
TTTATTAATTTCTAGAATATTTATTGGATCTGGAACAGGTTGAACTGTATACCCACCTCTATCTTCAA  
ATTTGTCTCATGCTGGCCCTCAGTTGATTTATCTATTTTTCTTTACATATTGCAGGTGCAAGATCAATTATGG  
GTTCAATTAATTTTATCACCACAATTTTAAATATAAAAATTATTTAAAATTGAAATTATTCCATTATTTGCTTGG  
TCAATATTGTTGACTGCAATTTTATTATTATTATCATTACCTGTGTTA

>H15

CATGCTTTTGTAATAATTTTTTTTTTTGTTATACCCGTAATAATAGGGGGATTTGGGAATTTTTTAATCCCTATA  
TTTTAGGTGTTCCCTGATATAGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGGTTTTGGTTATTACCCCCTAGAATTAC  
TTTATTAATTTCTAGGATATTTATTGGATCTGGGACTGGGACAGGTTGAACTGTATATCCCCCTTTATCTTCAA  
ATTTGTCTCATGCTGGCCCTCAGTTGATTTATCTATTTTTCTTTACATATTGCAGGTGCAAGATCAATTATGG  
GTTCAATTAATTTTATTACTACAATTTTAAATATAAAAATTATTTAAAATTGAAATTATTCCATTATTTGCTTGG  
CAATATTATTGACTGCAATTTTATTATTATTATCATTACCTGTGTTA

>H16

CATGCTTTTGTAATAATTTTTTTTTTTGTTATACCTGTAATAATAGGAGGATTTGGGAATTTTTTAATCCCTATA  
TTTTAGGTGTTCCCTGATATAGCTTTCCCCGAATAAATAATATAAGGTTTTGGTTATTACCCCCTAGAATTAC  
TTTATTAATTTCTAGAATATTTATTGGGTCTGGAACAGGTTGAACTGTATACCCACCTTTATCTTCAA  
ATTTATCTCATGCTGGTCCCTCAGTTGATTTATCTATTTTTCTTTACATATTGCAGGTGCAAGATCAATTATGG  
GTTCAATTAATTTTATTACTACAATTTTAAATATAAAAATTATTTAAAATTAAAATTATCCATTATTTGCTTGG  
TCAATATTGTTGACTGCAATTTTATTATTATTATCATTACCTGTGTTA

>H17

CATGCTTTTGTAATAA-TTTTTTTTTTGTATACCCGTAATAATAGGGGGATTGGGAATTTTTTAATCCCTATA  
TTTTAGGTGTTCCCTGATATAGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGGTTTTGGTTATTACCCCCTAGAATTAC  
TTTATTAATTTCTAGGATATTTATTGGATCTGGGACTGGGACAGGTTGAACTGTATATCCCCCTTTATCTTCAA  
ATTTGTCTCATGCTGGCCCTTCAGTTGATTTATCTATTTTTTCTTTACATATTGCAGGTGCAAGATCAATTATGG  
GTTCAATTAATTTTATTACTACAATTTTAAATATAAAAATTATTTAAAATTGAAATTATCCATTATTTGCTTGAT  
CAATATTATTGACTGCAATTTTATTATTATTATCATTACCTGTGTTA

>H18

CATGCTTTTGTAATAATTTTTTTTTTGTATACCTGTAATAATAGGGGGATTGGGAATTTTTTAATCCCTATA  
TTTTAGGTGTTCCCTGATATAGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGGTTTTGGTTATTACCTCCTAGAATCAC  
TTTATTAATTTCTAGAATATTTATTGGGCTGGAACAGGTTGAACTGTATACCCACCTTTATCTTCAA  
ATTTGTCTCATGCTGGCCCTTCAGTTGATTTATCTATTTTTTCTTTACATATTGCAGGTGCGAGATCAATTATGG  
GTTCAATTAATTTTATTACCACAATTTTAAATATAAAAATTATTTAAAATTGAAATTATCCATTATTTGCTTGG  
TCAATATTGTTGACTGCAATTTTATTATTATTATCATTACCTGTGTTA

>H19

CATGCTTTTGTAATAATTTTTTTTTTGTATACCTGTGATAATAGGAGGATTGGGAATTTTTTAATCCCTATA  
TTTTAGGTGTTCCCTGATATAGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGGTTTTGGTTATTACCCCCTAGAATTAC  
TTTATTAATTTCTAGAATATTTATTGGATCTGGGACTGGAACAGGTTGGACTGTATATCCACCTTTATCTTCAA  
ATTTGTCTCATGCTGGCCCTTCAGTTGATTTATCTATTTTTTCTTTACATATTGCAGGTGCAAGATCAATTATGG  
GTTCAATTAATTTTATTACTACAATTTTAAATATAAAAATTATTTAAAATTGAAATTATCCATTATTTGCTTGG  
TCAATATTGTTGACTGCAATTTTATTATTATTATCATTACCTGTGTTA

>H20

CATGCTTTTGTAATAATTTTTTTTTTGTAAATACCTGTGATAATAGGGGGATTGGAACTTTTTAATCCCAAT  
ATTTTTAGGTGTACCTGATATAGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGGTTTTGGTTATTACCTCCTAGAATTA  
CTTTATTAATTTCTAGAATATTTATTGGATCTGGGACGGGGACAGGTTGAACTGTGTACCCACCTTTATCTTCAA  
AATTTGTCTCATGCTGGACCCTCAGTTGATTTATCTATTTTTTCTTTACATATTGCAGGTGCCAGATCAATTATA  
GGTTCAATTAATTTTATTACTACAATTTTAAATATAAAAATTATTTAAAATCAAATTATCCATTATTTGCTTG  
ATCAATATTATTGACTGCAATTTTATTATTATTATCATTACCTGTGTTA

>H21

CATGCTTTTGTAATAATTTTTTTTTTGTAAATACCAGTGATAATAGGAGGATTGGGAATTTTTTAATCCCTATA  
TTTTAGGGGTACCAGATATAGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGGTTTTGATTATTACCACCTAGAATTAC  
TTTATTAATTTCTAGAATATTTATTGGATCTGGGACTGGTACAGGTTGAACTGTATATCCTCCATTATCTTCAA  
ATTTGTCTCATGCAGGACCTTCAGTTGATTTATCTATTTTTTCTTTGCATATTGCAGGTGCTAGATCAATTATGG  
GTTCAATTAATTTTATTACTACAATTTTAAATATAAAAATTATTTAAAATTAAAATTATCCATTATTTGCTTGAT  
CAATATTATTGACTGCAATTTTATTATTATTATCATTACCTGTGTTA

>H22

CATGCTTTTGTAATAATTTTTTTTTTGTATACCTGTAATAATAGGGGGATTGGGAATTTTTTAATCCCTATA  
TTTTAGGTGTTCCCTGACATAGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGGTTTTGATTATTACCTCCTAGAATTAC  
TTTATTAATTTCTAGAATATTTATTGGATCTGGAACAGGTTGAACTGTATACCCACCTCTATCTTCAA  
ATTTGTCTCATGCTGGTCCCTTCAGTTGATTTATCTATTTTTTCTTTACATATTGCAGGTGCAAGATCAATTATGG  
GTTCAATTAATTTTATCACCACAATTTTAAATATAAAAATTATTTAAAATTGAAATTATCCATTATTTGCTTGG  
TCAATATTGTTGACTGCAATTTTATTATTATTATCATTACCTGTGTTA

>H23

CATGCTTTTGTAATAATTTTTTTTTTGTAAATACCTGTGATAATAGGGGGATTGGAACTTTTTAATCCCTATA  
TTTTAGGTGTACCTGATATAGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGGTTTTGGTTATTACCTCCTAGAATTAC  
TTTATTAATTTCTAGAATATTTATTGGATCTGGGACGGGGACAGGTTGAACTGTGTACCCGCTTTATCTTCAA  
ATTTGTCTCATGCTGGACCCTCAGTTGATTTATCTATTTTTTCTTTACATATCGCAGGTGCCAGATCAATTATA

GGTTC AATTAATTTTATTACTACAATTTTAAATATAAAAATTATTTAAAATCAA AATTATCCCATTATTTGCTTG  
GTCAATATTATTGACTGCAATTTTATTATTATTATCATTACCTGTGTTA

>H24

CATGCTTTTGTAATAATTTTTTTTTTTGTTATACCCGTAATAATAGGGGGATTGGGAATTTTTTAATCCCTATA  
TTTTAGGTGTTCCCTGATATAGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGGTTTTGGTTATTACCCCCTAGAATTAC  
TTTATTAATTTCTAGGATATTTATTGGATCTGGGACTGGGACAGGTTGAACTGTATATCCCCCTTTATCTTCAA  
ATTTGTCTCATGCTGGCCCTCAGTTGATTTATCTATTTTTTTCTTTACATATTGCAGGTGCAAGATCAATTATGG  
GTTCAATTAATTTTATTACTACAATTTTAAATATAAAAATTATTTAAAATTGAAATTATCCCATTATTTGCTTGA  
TCAATATTATTGACTGCAATTTTATTATTATTATCATTACCTGTGTTA

>H25

CATGCTTTTGTAATAATTTTTTTTTTTGTTATACCTGTAATAATAGGAGGATTGGGAATTTTTTAATCCCTATA  
TTTTAGGTGTTCCCTGATATAGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGGTTTTGGTTATTACCCCCTAGAATCAC  
TTTATTAATTTCTAGAATATTTATTGGGTCTGGAACCTGGGACAGGTTGAACTGTATATCCACCTTTATCTTCAA  
ATTTGTTTCATGCTGGCCCTCAGTTGATTTATCTATTTTTTTCTTTACATATTGCAGGTGCGAGATCAATTATGG  
GTTCAATTAATTTTATTACCACAATTTTAAATATAAAAATTATTTAAAATTGAAATTATCCCATTATTTGCTTGG  
TCAATATTGTTGACTGCAATTTTATTATTATTATCATTACCTGTGTTA

>H26

CATGCTTTTGTAATAATTTTTTTTTTTGTAATACCAGTGATAATAGGTGGATTGGGAATTTTTTAATCCCTATA  
TTTTAGGGGTACCAGATATAGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGGTTTTGATTATTACCACCTAGAATTAC  
TTTATTAATTTCTAGAATATTTATTGGATCTGGGACTGGTACAGGTTGAACTGTATATCCCTCCCTTATCTTCAA  
ATTTGTCTCATGCAGGACCTCAGTTGATTTATCTATTTTTTTCTTTACATATTGCAGGTGCTAGATCAATTATAG  
GTTCAATTAATTTTATTACAACAATTTTAAATATAAAAATTATTTAAAATTGAAATTATCCCATTATTTGCTTGA  
TCAATATTATTGACTGCAATTTTATTATTATTATCATTACCTGTGTTA

>H27

CATGCTTTTGTAATAATTTTTTTTTTTGTTATACCTGTAATAATAGGAGGATTGGGAATTTTTTAATCCCTATA  
TTTTAGGTGTTCCCTGATATAGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGGTTTTGGTTATTACCCCCTAGAATCAC  
TTTATTAATTTCTAGAATATTTATTGGGTCTGGAACCTGGAACAGGTTGAACTGTATACCCCCTTTATCTTCAA  
ATTTGTCTCATGCTGGCCCTCAGTTGATTTATCTATTTTTTTCTTTACATATTGCAGGTGCGAGATCAATTATGG  
GTTCAATTAATTTTATTACCACAATTTTAAATATAAAAATTATTTAAAATTGAAATTATCCCATTATTTGCTTGG  
TCAATATTGTTGACTGCAATTTTATTATTATTATCATTACCTGTGTTA

>H28

CATGCTTTTGTAATAATTTTTTTTTTTGTTATACCTGTAATAATAGGAGGATTGGGAATTTTTTAATCCCTATA  
TTTTAGGTGTTCCCTGATATAGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGGTTTTGGTTATTACCCCCTAGAATTAC  
TTTATTAATTTCTAGAATATTTATTGGGTCTGGAACCTGGGACAGGTTGAACTGTATATCCACCTTTATCTTCAA  
ATTTATCTCATGCTGGCCCTCAGTTGATTTATCTATTTTTTTCTTTACATATTGCAGGTGCAAGATCAATTATGG  
GTTCAATTAATTTTATTACTACAATTTTAAATATAAAAATTATTTAAAATTGAAATTATCCCATTATTTGCTTGG  
TCAATATTGTTGACTGCAATTTTATTATTATTATCATTACCTGTGTTA

>H29

CATGCTTTTGTAATAATTTTTTTTTTTGTTATACCTGTAATAATAGGAGGATTGGTAATTTTTTAATCCCTATA  
TTTTAGGTGTTCCCTGATATAGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGGTTTTGGTTATTGCCCCCTAGAATTAC  
TTTATTAATTTCTAGAATATTTATTGGGTCTGGAACCTGGAACAGGTTGAACTGTATACCCACCTTTATCTTCAA  
ATTTGTCTCATGCTGGTCCCTCAGTTGATTTATCTATTTTTTTCTTTACATATTGCAGGTGCGAGATCAATTATGG  
GTTCAATTAATTTTATTACCACAATTTTAAATATAAAAATTATTTAAAATTGAAATTATCCCATTATTTGCTTGG  
TCAATATTGTTGACTGCAATTTTATTATTATTATCATTACCTGTGTTA

>H30

CATGCTTTTGTAATAATTTTTTTTTTTGTTATACCTGTGATAATAGGAGGATTTGGGAATTTTTTAATCCCTATA  
TTTTAGGTGTTCCCTGACATAGCTTTTCCTCGAATAAATAATATAAGGTTTTGGTTATTACCTCCTAGAATTAC  
TTTATTAATTTCTAGAATATTTATTGGATCTGGAACCTGGAACAGGTTGAACTGTATACCCACCTTTATCTTCAA  
ATTTGTCTCATGCTGGTCCCTCAGTTGATTTATCTATTTTTCTTTACATATTGCAGGTGCAAGATCAATTATGG  
GTTCAATTAATTTTATTACTACAATTTTAAATATAAAAATTATTTAAAATTAAAATTATTCCATTATTTGCTTGGT  
CAATATTGTTGACTGCAATTTTATTATTATTATCATTACCTGTGTTA

>H31

CATGCTTTTGTAATAATTTTTTTTTTTGTTATACCTGTAATAATAGGGGGATTTGGAAATTTTTTAATCCCTATA  
TTTTAGGTGTTCCCTGATATAGCTTTTCCTCGAATAAATAATATAAGGTTTTGGTTATTACCTCCTAAAATTAC  
TTTATTAATTTCTAGAATATTTATTGGATCTGGAACGGGAACAGGTTGAACTGTATACCCCTTTTATCTTCAA  
ATTTGTCTCATGCTGGACCTCAGTTGATTTATCTATTTTTCTTTACATATTGCAGGTGCCAGATCAATTATAG  
GTTCAATTAATTTTATTACTACAATTTTAAATATAAAAATTATTTAAAATCAAATTATCCATTATTTGCTTGA  
TCAATATTATTGACTGCAATTTTATTATTATTATCATTACCTGTGTTA

>H32

CATGCTTTTGTAATAATTTTTTTTTTTGTAATACCTGTGATAATAGGAGGATTTGGAAATTTTTTAATCCCTATA  
TTTTAGGTGTTCCCTGATATAGCTTTTCCTCGAATAAATAATATAAGGTTTTGGTTATTACCCCTAGAATTAC  
TTTATTAATTTCTAGAATATTTATTGGATCTGGGACGGGGACAGGTTGAACTGTGTATCCACCTTTTATCTTCAA  
ATTTGTCTCATGCCGGCCCTCAGTTGATTTATCTATTTTTCTTTACATATTGCAGGTGCCAGATCAATTATAG  
GTTCAATTAATTTTATTACTACAATTTTAAATATAAAAATTATTTAAAATTAAAATTATCCATTATTTGCTTGA  
TCAATATTATTGACTGCAATTTTATTATTATTATCATTACCTGTGTTA

>H33

CATGCTTTTGTAATAATTTTTTTTTTTGTTATACCTGTAATAATAGGGGGATTTGGGAATTTTTTAATCCCTATA  
TTTTAGGTGTTCCCTGATATAGCTTTTCCTCGAATAAATAATATAAGGTTCTGGTTATTACCCCTAGAATTAC  
TTTATTAATTTCTAGGATATTTATTGGATCTGGAACCTGGGACAGGTTGAACTGTATATCCACCTTTTATCTTCAA  
ATTTGTCTCATGCCGGCCCTCAGTTGATTTATCAATTTTTCTTTACATATTGCAGGTGCAAGATCAATTATA  
GGTTCAATTAATTTTATTACTACAATTTTAAATATAAAAATTATTTAAAATTAAAATTATTCCATTATTTGCTTG  
ATCAATATTATTGACTGCAATTTTATTATTATTATCATTACCTGTGTTA

>H34

CATGCTTTTGTAATAATTTTTTTTTTTGTAATACCTGTAATAATAGGTGGATTTGGAAATTTTTTAATCCTATA  
TTTTAGGGGTTCCCTGATATAGCTTTTCCCGAATAAATAATATAAGGTTTTGATTATTACCCCTAGAATTAC  
TTTATTAATTTCTAGAATATTTATTGGATCTGGGACTGGAACAGGTTGAACTGTATATCCACCTTTTATCTTCAA  
ATTTGTCTCATGCCGGCCCTCAGTTGATTTATCTATTTTTCTTTACATATCGCAGGTGCTAGATCAATTATAG  
GTTCAATTAATTTTATTACTACAATTTTAAATATAAAAATTATTTAAAATTGAAATTATTCCATTATTTGCTTGAT  
CAATATTATTAAGTCAATTTTATTATTATTATCATTACCTGTGTTA

>H35

CATGCTTTTGTAATAATTTTTTTTTTTGTTATACCTGTAATAATAGGGGGATTTGGAAATTTTTTAATCCCTATA  
TTTTAGGTGTTCCCTGATATAGCTTTCCCCGAATAAATAATATAAGGTTTTGGTTATTACCCCTAGAATTAC  
TTTATTAATTTCTAGAATATTTATTGGATCTGGAACCTGGAACAGGTTGAACTGTATACCCACCTTTTATCTTCAA  
ATTTGTCTCATGCTGGCCCTCAGTTGATTTATCTATTTTTCTTTACATATTGCAGGTGCAAGATCAATTATGG  
GTTCAATTAATTTTATTACTACAATTTTAAATATAAAAATTATTTAAAATTGAAATTATTCCATTATTTGCTTGGT  
CAATATTGTTGACTGCAATTTTATTATTATTATCATTACCTGTGTTA

>H36

CATGCTTTTGTAATAATTTTTTTTTTTGTTATACCTGTGATAATAGGAGGATTTGGGAATTTTTTAATCCCTATA  
TTTTAGGTGTTCCCTGATATAGCTTTTCCTCGAATAAATAATATAAGGTTTTGGTTATTACCCCTAGAATTAC  
TTTATTAATTTCTAGAATATTTATTGGATCTGGGACTGGAACAGGTTGAACTGTATATCCACCTTTTATCTTCAA  
ATTTGTCTCATGCTGGTCCCTCAGTTGATTTATCTATTTTTCTTTACATATTGCAGGTGCAAGATCAATTATGG  
GTTCAATTAATTTTATTACTACAATTTTAAATATAAAAATTATTTAAAATTGAAATTACCCATTATTTGCTTGG  
TCAATATTGTTGACTGCAATTTTATTATTATTATCATTACCTGTGTTA

>H37

CATGCTTTTGTAATAATTTTTTTTTTCGTTATACCTGTGATAAATAGGGGGATTGGGAATTTTTTAATCCAATA  
TTTTAGGGGTTCCCTGATATAGCTTTCCACGAATAAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCAAGAATTAC  
ATTATTAATTTCTAGAATATTTATTGGTTCTGGTCTGGCACTGGATGGACAGTATATCCTCCTTTGTCATCAA  
ATTTATCACATGCTGGTCCATCAGTTGATTTATCAATTTTTTCATTACATATTGCTGGGGCAAGATCGATTATA  
GGTCAATTAATTTTATTACTACAATTTTAAATATAAAAATTGTTTAAAATTGAAATTATTCCATTATTTGCTTG  
GTCTATGTTATTAAGTCAATTTTGTTATTATTATCATTACCTGTGTTA

>H38

CATGCTTTTGTAATAATTTTTTTTTTGTATACCTGTAATAAATAGGGGGATTGGGAATTTTTTAATCCCTATA  
TTTTAGGTGTTCCCTGATATAGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGGTTCTGGTTATTACCCCTAGAATTAC  
TTTATTAATTTCTAGGATATTTATTGGATCTGGAACCTGGGACAGGTTGAACTGTATATCCACCTTTATCTTCAA  
ATTTGTCTCATGCTGGTCCCTCAGTTGATTTATCAATTTTTCTTTACATATTGCAGGTGCAAGATCAATTATAG  
GTTCAATTAATTTTATTACTACAATTTTAAATATAAAAATTATTTAAAATTAAAATTATTCCATTATTTGCTTGGT  
CAATATTATTGACTGCAATTTTATTATTATTATCATTACCTGTGTTA

>H39

CATGCTTTTGTAATAATTTTTTTTTTGTATACCTGTGATAAATAGGAGGATTGGGAATTTTTTAATCCCTATA  
TTTTAGGTGTTCCCTGATATAGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGGTTTTGGTTATTACCCCTAGAATTAC  
TTTATTAATTTCTAGAATATTTATTGGATCTGGGACTGGAACAGGTTGAACTGTATATCCACCTTTATCTTCAA  
ATTTGTCTCATGCTGGTCCCTCAGTTGATTTATCTATTTTTCTTTACATATTGCAGGTGCAAGATCAATTATGG  
GTTCAATTAATTTTATTACTACAATTTTAAATATAAAAATTATTTAAAATTAAAATTATCCATTATTTGCTTGG  
TCAATATTGTTGACTGCAATTTTATTATTATTATCATTACCTGTGTTA

>H40

CATGCTTTTGTAATAATTTTTTTTTTGTATACCTGTAATAAATAGGAGGATTGGGAATTTTTTAATCCCTATA  
TTTTAGGTGTTCCCTGATATAGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGGTTTTGGTTATTACCCCTAGAATCAC  
TTTATTAATTTCTAGAATATTTATTGGGTCTGGAACCTGGAACAGGTTGAACTGTATACCCACCTTTATCTTCAA  
ATTTGTCTCATGCTGGCCCTCAGTTGATTTATCTATTTTTCTTTACATATTGCAGGTGCGAGATCAATTATGG  
GTTCAATTAATTTTATTACCACAATTTTAAATATAAAAATTATTTAAAATTGAAATTATCCATTATTTGCTTGG  
TCAATATTGTTGACTGCAATTTTATTATTATTATCATTACCTGTGTTA

>H41

CATGCTTTTGTAATAATTTTTTTTTTGTATACCTGTAATAAATAGGGGGATTGGGAATTTTTTAATCCCTATA  
TTTTAGGTGTTCCCTGACATAGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGGTTTTGATTATTACCTCCTAGAATTAC  
TTTATTAATTTCTAGAATATTTATTGGATCTGGAACCTGGAACAGGTTGAACTGTATACCCACCTCTATCTTCAA  
ATTTGTCTCATGCTGGCCCTCAGTTGATTTATCTATTTTTCTTTACATATTGCAGGTGCAAGATCAATTATGG  
GTTCAATTAATTTTATCACCACAATTTTAAATATAAAAATTATTTAAAATTGAAATTATTCCATTATTTGCTTGG  
TCAATATTGTTGACTGCAATTTTATTATTATTATCATTACCTGTGTTA

>H42

CATGCTTTTGTAATAATTTTTTTTTTGTATACCTGTAATAAATAGGAGGATTGGGAATTTTTTAATCCCTATA  
TTTTAGGTGTTCCCTGATATAGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGGTTTTGGTTATTACCCCTAGAATCAC  
TTTATTAATTTCTAGAATATTTATTGGGTCTGGAACCGGAACAGGTTGAACTGTATACCCACCTTTATCTTCAA  
ATTTGTCTCATGCTGGCCCTCAGTTGATTTATCTATTTTTCTTTACATATTGCAGGTGCGAGATCAATTATGG  
GTTCAATTAATTTTATTACCACAATTTTAAATATAAAAATTATTTAAAATTGAAATTATCCATTATTTGCTTGG  
TCAATATTGTTGACTGCAATTTTATTATTATTATCATTACCTGTGTTA

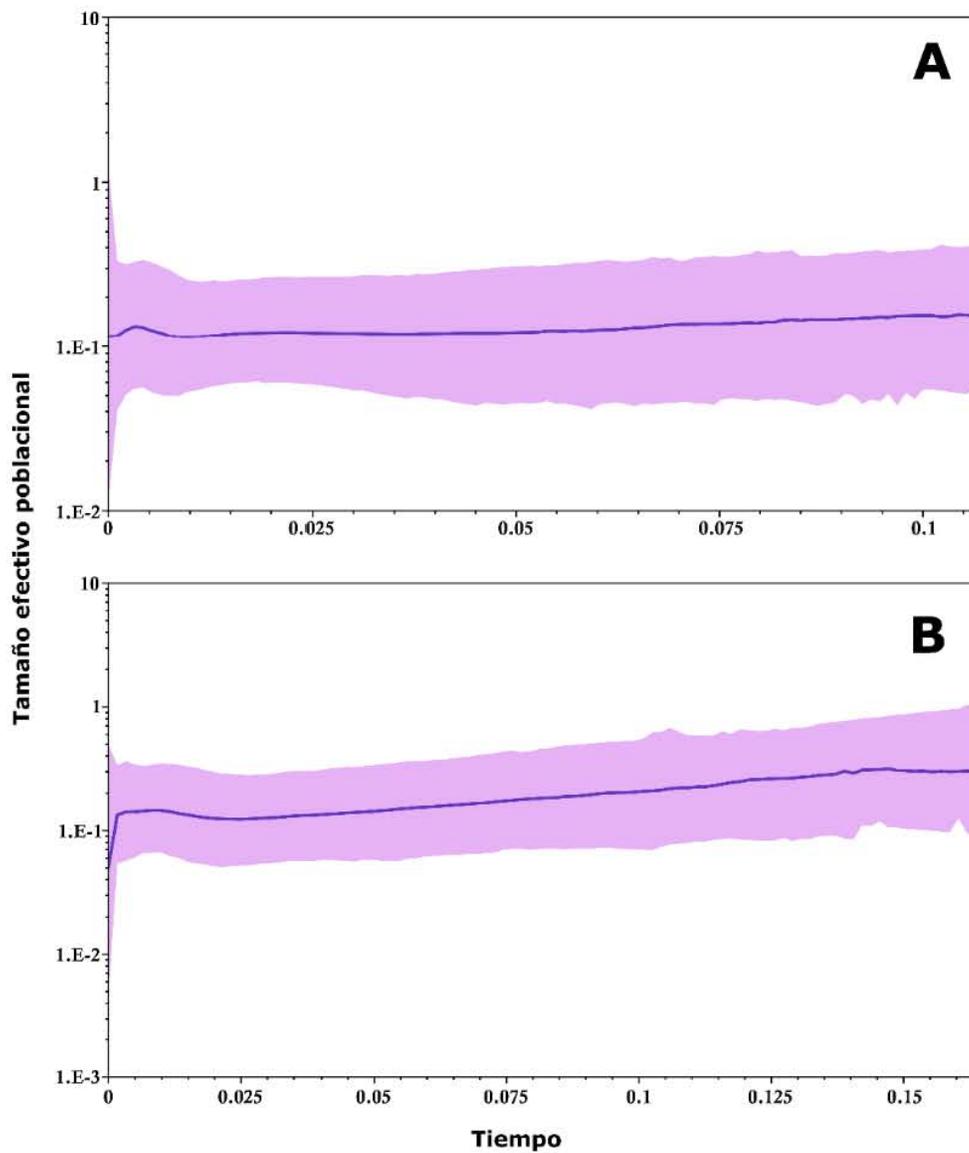
**Anexo 4.** Valores de  $F_{ST}$  entre poblaciones de *Emersonella lemae* correspondientes al gen *Cyt-b*.

Población	Ber	Dol	Ped	Pro	Tlax	Req	San	Teo	Tex	Tol	Tzin	Val
<b>Bernal</b>	-											
<b>Dolores</b>	0.0896	-										
<b>Pedregal</b>	-0.019	-0.006	-									
<b>Progreso</b>	0.1334	0.0679	-0.045	-								
<b>Tlaxiaca</b>	0.1333	0.0632	0.0875	0.1760	-							
<b>Requena</b>	0.0164	0.005	-0.060	-0.047	0.1459	-						
<b>San Martín</b>	1	-0.297	-0.357	-0.267	-0.019	-0.323	-					
<b>Teotihuacán</b>	0.2994	0.0876	-0.002	0.0424	0.2314	0.0344	-0.291	-				
<b>Texcoco</b>	0.0727	0.0212	-0.044	-0.044	0.1483	-0.029	-0.162	0.0893	-			
<b>Toluca</b>	0.8181	0.2203	0.1602	0.2360	0.4373	0.1891	0.6	0.2560	0.2720	-		
<b>Tzintzuntzan</b>	-0.168	0.0169	-0.047	-0.018	0.0775	-0.046	-0.456	0.0175	0.0039	0.1712	-	
<b>Valsequillo</b>	0.2554	0.1177	0.2078	0.2501	0.2952	0.1921	-0.028	0.2928	0.2487	0.3894	0.1508	-

**Anexo 5.** Valores de  $F_{ST}$  entre poblaciones de *Emersonella lemae* correspondientes al gen *COI*.

Población	Dol	Ped	Pro	Req	San	Teo	Tex	Tlax	Tol	Tzin	Val
<b>Dolores</b>	-										
<b>Pedregal</b>	0.2601	-									
<b>Progreso</b>	-0.024	0.0540	-								
<b>Requena</b>	-0.047	0.0913	-0.048	-							
<b>San Martín</b>	0.3877	-0.149	0.0535	-0.042	-						
<b>Teotihuacán</b>	0.4	-0.048	0.1053	0.0922	-0.333	-					
<b>Texcoco</b>	0.0228	0.0360	-0.031	0.0129	0.0982	0.1535	-				
<b>Tlaxiaca</b>	0.4392	0.0497	0.0066	0.0380	1	0.5454	0.0558	-			
<b>Toluca</b>	0.2307	-0.201	-0.183	-0.158	1	-0.052	-0.158	1	-		
<b>Tzintzuntzan</b>	0.1386	-0.057	0.0277	0.0224	-0.297	-0.120	0.0389	-0.058	-0.355	-	
<b>Valsequillo</b>	0.7916	0.5510	0.5419	0.4672	1	0.8578	0.5459	1	1	0.4548	-

**Anexo 6.** Gráficos de *Skyline* bayesiano representando la trayectoria demográfica de *Emersonella lemae* para Cyt-*b* (A) y COI (B).



**Anexo 7.** Pruebas de neutralidad para *Cyt-b* y COI de *Emersonella lemae* a nivel poblacional.

Población	Cyt- <i>b</i>		COI	
	<i>D</i> de Tajima	<i>F<sub>s</sub></i> de Fu	<i>D</i> de Tajima	<i>F<sub>s</sub></i> de Fu
<b>Pedregal</b>	0.32768	-0.84038	0.04114	-0.11700
<b>Teotihuacán</b>	-0.54105	2.67925	0	2.30259
<b>Tlaxiaca</b>	2.29133	7.09022	0	0
<b>Valsequillo</b>	-0.45139	6.35097	0	0
<b>Texcoco</b>	0.83076	-0.08533	0.39175	-0.15360
<b>Tzintzuntzan</b>	-0.37325	-1.44451	-0.48164	-1.33055
<b>Bernal</b>	0	0	-	-
<b>Requena</b>	0.48636	-2.87546	0.77684	0.61088
<b>Progreso</b>	0.99644	-0.32964	-0.05696	-1.12728
<b>Dolores</b>	0.79730	0.13005	0	1.13943
<b>Toluca</b>	-0.79684	2.59805	0	0
<b>San Martín</b>	0	0	0	0