

New species of sawfly of the genus *Zadiprion* Rohwer (Hymenoptera: Diprionidae) attacking *Pinus cembroides* (Zucc.) in Tamaulipas, Mexico

Nueva especie de mosca sierra del género *Zadiprion* Rohwer (Hymenoptera: Diprionidae) atacando *Pinus cembroides* (Zucc.) en Tamaulipas, México

Ernesto González-Gaona¹, Hugo E. Borja-Nava¹, Karla V. De Lira-Ramos^{1*}, Yahaira E. Rodríguez-Cruz¹, Víctor J. Arriola-Padilla²

¹Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Pabellón. km 32.5 carretera Aguascalientes-Zacatecas. C. P. 20660. Pabellón de Arteaga, Aguascalientes, México.

²Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Conservación y Mejoramiento de Ecosistemas Forestales. Av. Progreso núm. 5, Barrio Santa Catarina. C. P. 04010. Coyoacán, Ciudad de México, México.

*Corresponding author: ramos.vanessa@inifap.gob.mx; tel.: +52 449 223 5230.

Abstract

Introduction: *Zadiprion* Rohwer is a genus of sawflies including seven species that cause defoliations in coniferous forests.

Objective: To determine the species of *Zadiprion* sawflies infesting *Pinus cembroides* (Zucc.) in Miquihuana, Tamaulipas.

Materials and methods: Biological material was collected from sawfly larvae. Part of the material was preserved in 70 % alcohol for morphological description, another in 96 % anhydrous alcohol for molecular identification and another portion was placed in a Binder 720 KBW E5.1 to complete the biological cycle and obtain adults. The ovipositor of the female and phenology during five years were described.

Results and discussion: The sawfly larva has an orange-brown head with a small circular eyestalk, a longitudinal brown spot on the dorsum, two white lines on the sides and a dark subdorsal stripe. The female is light yellow with dark sutures on the thorax. The lancet of the ovipositor has nine rings; the first is inverted “U” shaped. Males are mainly black with yellowish legs and a yellowish-brown spot in the postocellar area; there is no yellowish-brown pronotum or tegula and the harpes are rounded and pale at the apex. The population is different from *Z. rohweri* (Middleton) and *Z. jeffreyi* (Smith), reported in GenBank; however, they are related.

Conclusions: The sawfly under study is a new species and was recorded as *Zadiprion borjai* sp. nov. (GenBank: ON181557).

Resumen

Introducción: *Zadiprion* Rohwer es un género de mosca sierra que incluye siete especies causantes de defoliaciones en bosques de coníferas.

Objetivo: Determinar la especie de la mosca sierra del género *Zadiprion* que está defoliando *Pinus cembroides* (Zucc.) en Miquihuana, Tamaulipas.

Materiales y métodos: Se recolectó material biológico de larvas de mosca sierra. Una porción se conservó en alcohol al 70 % para la descripción morfológica, otra en alcohol anhidro al 96 % para la identificación molecular y otra porción se colocó en una cámara Binder 720 KBW E5.1 para completar el ciclo biológico y obtener adultos. Se describió el ovipositor de la hembra y la fenología durante cinco años.

Resultados y discusión: A nivel larvario, la mosca sierra tiene cabeza café-anaranjado con oclario pequeño y circular, una mancha longitudinal café en el dorso, dos líneas blancas a los costados y una franja oscura a nivel subdorsal. La hembra es amarillo claro con suturas oscuras en el tórax. La lanceta del ovipositor tiene nueve anillos; el primero con forma de “U” invertida. Los machos son preponderantemente negros con patas amarillentas y una mancha café amarillenta en el área postocelar; no tiene pronoto o tegula café-amarillentos y las harpes son redondeadas y claras en el ápice. La población es diferente de *Z. rohweri* (Middleton) y *Z. jeffreyi* (Smith), reportadas en el GenBank; sin embargo, están relacionadas.

Conclusiones: La mosca sierra en estudio es una especie nueva y se registró como *Zadiprion borjai* sp. nov. (GenBank: ON181557).

Keywords: *Zadiprion borjai*;
Zadiprion rohweri; pinyon
pine; forest pest; phenology.

Palabras clave: *Zadiprion*
borjai; *Zadiprion rohweri*;
pino piñonero; plaga
forestal; fenología.

Introduction

Sawflies (Hymenoptera: Diprionidae) affect trees of the genera *Pinus*, *Picea*, *Pseudotsuga* and *Abies* in temperate coniferous forests in the United States of America, Mexico and Guatemala (Smith, 1988); they are considered important forest pests because they cause defoliations. Sometimes they reach epidemic levels and after repeated defoliations cause the death of trees in hundreds or thousands of hectares of forest. Mexico reports the genera *Zadiprion*, *Neodiprion* and *Monoctenus*, being *Zadiprion* the most numerous in species and with the widest distribution in the country.

Zadiprion Rohwer (Hymenoptera: Diprionidae: Diprioninae) is a group that originally comprised five species, although it was mentioned that the fauna of Mexico was not precisely known. In 2012, *Zadiprion ojedae* (Smith and Sánchez-Martínez) was added attacking *Pinus durangensis* (Martínez) in Chihuahua, Mexico (Smith, Sánchez-Martínez, & Ojeda-Aguilera, 2012). In 2019, *Zadiprion jeffreyi* (Smith) was described as a new species attacking *Pinus jeffreyi* Balf. in Parque Nacional San Pedro Mártir in Baja California, Mexico (Aguilera-Molina, Munguía-Ortega, López-Reyes, Martínez-Aquino, & Ceccarelli, 2019; Smith, 2019). The latter is closely related to *Zadiprion rohweri* (Middleton) considered a pest of pinyon pines characterized by an inverted “U” on the first lancet ring of the female ovipositor near the dorsum. However, larvae differ in mating and host (Aguilera-Molina et al., 2019; Smith, 2019).

In the Sierra de Miquihuana, Tamaulipas, Mexico, sawfly attacks were reported on *Pinus cembroides* (Zucc.) and the causal species was initially identified as *Z. rohweri*, due to the characteristics of the ovipositor lancet; however, upon close examination of the larvae, very noticeable differences were observed from both *Z. rohweri* from Coahuila (Smith, Monjarás-Barrera, Aguilar-Hernández, & Quiñones-Dena, 2016) and *Z. jeffreyi* from Baja California (Aguilera-Molina et al., 2019).

Therefore, it is necessary to corroborate whether the species that is attacking *P. cembroides* in Tamaulipas is a new species or an already reported species. This study shows information on the morphological description of larvae, adults and ovipositor of the female sawfly that attacks pinyon pine.

Materials and Methods

Study area

The study was carried out in “Mesa del Jarrillo”, ejido Servando Canales in Miquihuana, Tamaulipas (23° 38' 39.2” N, 99° 50' 37.2” W; 2 210 m). The predominant

Introducción

Las moscas sierra (Hymenoptera: Diprionidae) afectan árboles de los géneros *Pinus*, *Picea*, *Pseudotsuga* y *Abies* en bosques de coníferas de clima templado en Estados Unidos de América, México y Guatemala (Smith, 1988); se consideran plagas de importancia forestal, debido a que causan defoliaciones. En ocasiones alcanzan niveles epidémicos y después de repetidas defoliaciones provocan la muerte de los árboles en cientos o miles de hectáreas de bosques. En México se reportan los géneros *Zadiprion*, *Neodiprion* y *Monoctenus* siendo el género *Zadiprion* el más numeroso en especies y con mayor distribución en el país.

Zadiprion Rohwer (Hymenoptera: Diprionidae: Diprioninae) es un grupo que comprendía originalmente cinco especies, aunque se mencionaba que la fauna de México no se conocía con precisión. En 2012 se incorporó *Zadiprion ojedae* (Smith and Sánchez-Martínez) atacando *Pinus durangensis* (Martínez) en Chihuahua, México (Smith, Sánchez-Martínez, & Ojeda-Aguilera, 2012). En 2019 se describió a *Zadiprion jeffreyi* (Smith) como una nueva especie atacando *Pinus jeffreyi* Balf. en el Parque Nacional San Pedro Mártir en Baja California, México (Aguilera-Molina, Munguía-Ortega, López-Reyes, Martínez-Aquino, & Ceccarelli, 2019; Smith, 2019). Esta última está muy relacionada con *Zadiprion rohweri* (Middleton) considerada una plaga de pinos piñoneros que se caracteriza por presentar una “U” invertida en el primer anillo de la lanceta del ovipositor de la hembra, cerca del dorso. No obstante, las larvas difieren en la maculación y en el hospedero (Aguilera-Molina et al., 2019; Smith, 2019).

En la sierra de Miquihuana, Tamaulipas, México se detectaron ataques de moscas sierra sobre *Pinus cembroides* (Zucc.) y la especie causante se ubicó inicialmente como *Z. rohweri*, debido a las características de la lanceta del ovipositor; sin embargo, al revisar las larvas detenidamente se observaron diferencias muy notorias tanto de *Z. rohweri* de Coahuila (Smith, Monjarás-Barrera, Aguilar-Hernández, & Quiñones-Dena, 2016) como de *Z. jeffreyi* de Baja California (Aguilera-Molina et al., 2019).

Por lo anterior, es necesario corroborar si la especie que está atacando a *P. cembroides* en Tamaulipas se trata de una nueva especie o es una especie ya reportada. En el presente escrito se presenta información sobre la descripción morfológica de larvas, adultos y ovipositor de la hembra de la mosca sierra que ataca al pino piñonero.

Materiales y métodos

Área de estudio

climate is Aw_1 , warm sub-humid with rain in summer, mean annual temperature higher than 22 °C and temperature of the coldest month higher than 18 °C; vegetation is composed of thorny scrub with predominant species such as *Dasyliirion miquihuanensis* Bogler, *D. berlandieri* Watson, *Leucophyllum frutescens* [Berland] I. M. Johnston, *Pinus nelsonii* Shaw and oaks (*Quercus* spp.); the topography consists of mountains and hills and the soils are predominantly Lithosol and Xerosol (Gobierno de Tamaulipas, 2011).

On November 22, 2017, third instar larvae were collected. These were transferred in cool containers, with foliage of the host pine (*P. cembroides*), to the Forestry and Agricultural Health Laboratory at Campo Experimental Pabellón (CEPAB) in Aguascalientes. One group of larvae was used to complete the biological cycle and thus obtain new adults, another group was used for morphological identification and a third group for molecular identification.

From the group of larvae used to complete the biological cycle, cocoons were obtained. These were placed in 250 mL plastic containers with organza cover and placed in a Binder 720 KBW E5.1 chamber at a controlled temperature of 26 ± 2 °C with a photoperiod of 14:10 light and dark, respectively. Containers with pupae were monitored three times a week to record adult emergence.

Morphological identification of *Zadiprion* sp. larvae

Larvae were killed by immersing them in hot water at 70 °C for 3 min and then transferred to 70 % (v/v) alcohol (González et al., 2014). Larvae were described based on the writings of Ross (1955), Yuasa (1922), Wong and Szlabey (1986), and González et al. (2014) with the support of images taken with a cell camera through the objective of a Motic dissecting microscope at 40X magnification.

Morphological identification of *Zadiprion* sp. adults

Adults collected from cocoons kept under laboratory conditions were identified based on the descriptions of Smith et al. (2012), Smith (2019) and with the terminology of Goulet (1992).

The ovipositor lancet of the females and the genitalia of the male were removed after a cold maceration process. The abdomen was separated from the body and introduced into a 4 mL Eppendorf tube with 10 % KOH for 24 h. At the end of maceration, the abdomen was rinsed with distilled water and dehydrated in alcohol. The structures were temporarily mounted in glycerin and photographs were taken with

El estudio se realizó en el paraje “Mesa del Jarrillo”, ejido Servando Canales en Miquihuaná, Tamaulipas (23° 38' 39.2" LN, 99° 50' 37.2" LO; 2 210 m). El clima predominante es Aw_1 , cálido subhúmedo con lluvia en verano, temperatura media anual mayor de 22 °C y temperatura del mes más frío mayor de 18 °C; la vegetación es compuesta de matorral espinoso predominando las especies como sotol liso (*Dasyliirion miquihuanensis* Bogler), sotol chino (*D. berlandieri* Watson), cenizo (*Leucophyllum frutescens* [Berland] I. M. Johnston), piñón duro (*Pinus nelsonii* Shaw) y encinos rastreros (*Quercus* spp.); la topografía es montañosa y lomerío y predominan los suelos Litosol y Xerosol (Gobierno de Tamaulipas, 2011).

El 22 de noviembre de 2017 se recolectaron larvas de tercer estadio. Estas se trasladaron en hieleras, con follaje del pino hospedero (*P. cembroides*), al laboratorio de Sanidad Forestal y Agrícola del Campo Experimental Pabellón (CEPAB) en Aguascalientes. Un grupo de larvas se utilizó para completar el ciclo biológico y así obtener adultos, otro grupo se empleó para la identificación morfológica y un tercer grupo para la identificación molecular.

Del grupo de larvas utilizadas para completar el ciclo biológico se obtuvieron cocones. Estos se colocaron en recipientes de plástico de 250 mL con tapa de organza y se colocaron en una cámara Binder 720 KBW E5.1 con temperatura controlada de 26 ± 2 °C con un fotoperiodo de 14:10 luz y oscuridad, respectivamente. Los frascos con las pupas se monitorearon tres veces por semana para consignar la emergencia de los adultos.

Identificación morfológica de larvas de *Zadiprion* sp.

Las larvas se mataron al sumergirlas en agua caliente a 70 °C por 3 min y después se transfirieron a alcohol al 70 % (v/v) (González et al., 2014). La larva se describió con base en los escritos de Ross (1955), Yuasa (1922), Wong y Szlabey (1986), y González et al. (2014) con la ayuda de fotografías tomadas con una cámara de celular a través del objetivo de un microscopio de disección Motic a una amplificación de 40X.

Identificación morfológica de adultos de *Zadiprion* sp.

Los adultos obtenidos de los cocones mantenidos en el laboratorio se identificaron con base en las descripciones de Smith et al. (2012), Smith (2019) y con la terminología de Goulet (1992).

La lanceta del ovipositor de las hembras y la genitalia del macho se extrajeron después de un proceso de maceración en frío. El abdomen se separó del cuerpo y se introdujo a un tubo Eppendorf de 4 mL con KOH

a compound microscope (Motic BA 200); the female lancet was also photographed with a scanning electron microscope (ZEISS EVO® MA 15).

Molecular identification of *Zadiprion* sp.

DNA was extracted from a group of eight larvae in 96 % anhydrous alcohol. They were washed three times with sterile distilled water and placed in 1.5 mL Eppendorf tubes, where liquid nitrogen for maceration and 500 µL of lysis buffer were added. The tube rested at room temperature for 30 min and was subsequently centrifuged for one minute at 12 000 rpm. The supernatant was recovered in a new tube, adding 300 µL of phenol: chloroform (1:1), vortexed for 1 min, centrifuged at 12 000 rpm for 3 min. The new supernatant was transferred to another tube and 200 µL of phenol: chloroform (1:1) was added, then transferred to a new tube and 300 µL of isopropanol and 30 µL of ammonium acetate were added. The mixture was centrifuged for 5 min at 12 000 rpm; the supernatant was decanted, and the pellet was washed with 50 µL of 70 % ethanol. The precipitate was dried at room temperature and the pellet was resuspended in 50 µL of nuclease-free water. DNA quality was measured on a NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific). The product was stored at 4 °C.

Universal primers LCO1490 (5-GGTCAACAAATCATAAAG ATATTGG-3') and HCO2198 (5'TAAACTTCAGGGTGACC AAAAAATCA-3') (Folmer, Nilges, Folkers, Konings, & Hilbers, 1994) were used for amplification of ribosomal DNA regions, which recognize the Cytochrome Oxidase, Subunit I (COI) gene. PCR reactions were performed by addition of the reagents: PCR buffer (5X: 5.0 µL, concentration:amount respectively) MgCl₂ (25 nM: 0.75 µL), dNTP's (10 nM: 0.25 µL), primer 1 (10 nmol: 1.0 µL), primer 2 (10 nmol: 1.0 µL), DNA Taq polymerase (5U·µL⁻¹: 0.5 µL), blank DNA (20 ng·µL⁻¹: 3.0 µL) and 13.5 µL of PCR grade water.

Amplification was performed on a thermal cycler (T100™ Thermal Cycler, Bio-Rad) with the following program: 1) initial denaturation 1 cycle of 3 min at 95 °C; 2) denaturation 1 min at 95 °C; 3) alignment five cycles of 30 s at 51 °C; 4) extension 1 min at 70 °C, 5) denaturation 1 min at 94 °C, 6) alignment 35 cycles of 30 s at 51 °C, 7) extension 1 min at 72 °C, 8) final extension one cycle of 5 min at 72 °C and 9) storage at 4.0 °C. The amplified fragments were run on 1 % agarose gels with 0.4 µL of ethidium bromide and visualized on a photodocumenter (Infinity-ST5 VILBER Lourmat). The band of interest was cut for purification with the Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System kit following the supplier's protocol (Promega Corporation, 1999). Fifty µL of solution 1 was added to the agarose gel preserved in Eppendorf tubes and dissolved at 65 °C. The diluted gel mix was transferred

al 10 % por 24 h. Al término de la maceración, el abdomen se enjuagó con agua destilada y se deshidrató en alcohol. Se realizaron montajes temporales en glicerina y con un microscopio compuesto (Motic BA 200) se tomaron fotografías de las estructuras; de manera complementaria se fotografió la lanceta de la hembra con un microscopio electrónico de barrido (ZEISS EVO® MA 15).

Identificación molecular de *Zadiprion* sp.

El ADN se extrajo de un grupo de ocho larvas en alcohol anhidro al 96 %. Estas se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL, a los cuales se agregó nitrógeno líquido para su maceración y se adicionaron 500 µL de *buffer* de lisis. El tubo reposó a temperatura ambiente durante 30 min y posteriormente se centrifugó por un minuto a 12 000 rpm. El sobrenadante se recuperó en un tubo nuevo, al cual se adicionaron 300 µL de fenol: cloroformo (1:1), se colocó en el vórtex durante 1 min, se centrifugó a 12 000 rpm durante 3 min. El nuevo sobrenadante se transfirió a otro tubo y se agregaron 200 µL de fenol: cloroformo (1:1), luego se pasó a un tubo nuevo y se adicionaron 300 µL de isopropanol y 30 µL de acetato de amonio. La mezcla se centrifugó durante 5 min a 12 000 rpm; el sobrenadante se decantó y la pastilla se lavó con 50 µL de etanol al 70 %. El precipitado se secó a temperatura ambiente y la pastilla se resuspendió en 50 µL de agua libre de nucleasas. La calidad del ADN se midió en un NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific). El producto se conservó a 4 °C.

Los iniciadores universales LCO1490 (5-GGTCAACA AATCATAAAGATATTGG-3') y HCO2198 (5'TAAACTTCAGGGTGACC AAAAAATCA-3') (Folmer, Nilges, Folkers, Konings, & Hilbers, 1994) se utilizaron para la amplificación de regiones del ADN ribosomal, los cuales reconocen al gen Citocromo Oxidasa, Subunidad I (COI). Las reacciones de PCR se realizaron por medio de la adición de los reactivos: buffer PCR (5X: 5.0 µL, concentración:cantidad respectivamente), MgCl₂ (25 nM: 0.75 µL), dNTP's (10 nM: 0.25 µL), primer 1 (10 nmol: 1.0 µL), primer 2 (10 nmol: 1.0 µL), DNA Taq polimerasa (5U·µL⁻¹: 0.5 µL), DNA blanco (20 ng·µL⁻¹: 3.0 µL) y 13.5 µL de agua grado PCR.

La amplificación se realizó en un termociclador (T100™ Thermal Cycler, Bio-Rad) con el programa siguiente: 1) desnaturalización inicial 1 ciclo de 3 min a 95 °C; 2) desnaturalización 1 min a 95 °C; 3) alineamiento cinco ciclos de 30 s a 51 °C; 4) extensión 1 min a 70 °C, 5) desnaturalización 1 min a 94 °C, 6) alineamiento 35 ciclos de 30 s a 51 °C, 7) extensión 1 min a 72 °C, 8) extensión final un ciclo de 5 min a 72 °C y 9) conservación a 4.0 °C. Los fragmentos amplificados se corrieron en geles de agarosa al 1 % con 0.4 µL de bromuro de etidio y se visualizaron en

to a minicolumn inserted into a collecting tube, incubated at room temperature for 1 min, centrifuged at 14 000 rpm for 1 min and the supernatant was decanted. Subsequently, two washes were performed with 700 μ L of solution 2, centrifuged at 14 000 rpm for 3 min and the supernatant was decanted from the collecting tube. The minicolumn was transferred to a sterile Eppendorf tube and dried at room temperature. Fifty μ L of nuclease-free water were added, incubated at room temperature for 5 min and centrifuged at 14 000 rpm for 1 min; the minicolumn was discarded and the product was stored \pm 4 °C. The purified PCR products were sent for sequencing to Macrogen Korea in Seoul, Republic of Korea.

The sequences were assembled in the SeqMan Pro module of the DNASTAR Lasergene Molecular Biology 16 program. Each assembly was submitted to BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) homology analysis in the nucleotide database of the NCBI (National Center of Biotechnology Information, 2021) and analyzed in the BOLDSYSTEMS database (2021).

A phylogenetic analysis was carried out for *Zadiprion* where the sequencing assemblages of the collected specimens and the reference databases resulting from the Gen Bank search were included. Sequences were aligned using the clustering method with the CLUSTAL OMEGA 1.2.2 program (Sievers & Higgins, 2014) and the best nucleotide substitution model was searched with the ModelTest-NG program (Darriba et al., 2019). Phylogenetic reconstruction was performed with Bayesian inference using Markov Chains Monte Carlo (MCMC), implemented in the BEAST v1.10.4 program (Suchard et al., 2018) with 1 000 000 generations. It should be mentioned that the GenBank sequence HM114320, corresponding to *Sirex noctilio* Fabricius 1793, was used as an outgroup control (Hymenoptera: Siricidae).

Results and Discussion

Zadiprion borjai González et al., 2021 sp. nov.

Female

The female measures 9.3 mm in length, is light yellow with dark sutures on the thorax, has a yellow head with dark triangular spots around the ocelli, two dark longitudinal lines behind the lateral ocelli that continue to the occiput and presents a great number of long yellow hairs on the head. In frontal view, the head has a yellowish appearance with tentorial holes; the margins and apex of the clypeus are dark, and the mandibles are brown. The antennae are serrate with 20 light brown antennomeres and the apical antennomeres are dark brown. The thorax is yellowish, the median lobe of the mesoscutum has a light brown

un fotodocumentador (Infinity-ST5 VILBER Lourmat). La banda de interés se cortó para su purificación con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System siguiendo el protocolo del proveedor (Promega Corporation, 1999). Se adicionaron 50 μ L de la solución 1 al gel de agarosa conservado en tubos Eppendorf y se disolvió a 65 °C. El *mix* del gel diluido se transfirió a una minicolumna insertada en un tubo colector, se incubó a temperatura ambiente por 1 min, se centrifugó a 14 000 rpm durante 1 min y se decantó el sobrenadante. Posteriormente, se realizaron dos lavados con 700 μ L de la solución 2, se centrifugó a 14 000 rpm por 3 min y se decantó el sobrenadante del tubo colector. La minicolumna se transfirió a un tubo Eppendorf estéril y se dejó secar a temperatura ambiente. Se adicionaron 50 μ L de agua libre de nucleasas, se incubó a temperatura ambiente por 5 min y se centrifugó a 14 000 rpm por 1 min; la minicolumna se desechó y el producto se conservó \pm 4 °C. Los productos PCR purificados se enviaron a secuenciar a Macrogen Korea en Seúl, República de Korea.

Las secuencias se ensamblaron en el módulo SeqMan Pro del programa DNASTAR Lasergene Molecular Biology 16. Cada ensamble se sometió a un análisis de homología BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) en la base de datos de nucleótidos del NCBI (National Center of Biotechnology Information, 2021) y también se analizaron en la base BOLDSYSTEMS (2021).

Se realizó un análisis filogenético para el género *Zadiprion* donde se incluyeron los ensamblajes de la secuenciación de los ejemplares recolectados y las bases de datos de referencia resultado de la búsqueda en el Gen Bank. Las secuencias se alinearon con el método clustal con el programa CLUSTAL OMEGA 1.2.2 (Sievers & Higgins, 2014) y se buscó el mejor modelo de sustitución de nucleótidos con el programa ModelTest-NG (Darriba et al., 2019). La reconstrucción filogenética se realizó con inferencia bayesiana mediante Markov Chains Monte Carlo (MCMC), implementado en el programa BEAST v1.10.4 (Suchard et al., 2018) con 1 000 000 de generaciones. Cabe mencionar que la secuencia HM114320 del GenBank, correspondiente a *Sirex noctilio* Fabricius 1793, se utilizó como testigo fuera de grupo (Hymenoptera: Siricidae).

Resultados y discusión

Zadiprion borjai González et al., 2021 sp. nov.

Hembra

La hembra mide 9.3 mm de longitud, es de color amarillo claro con las suturas oscuras en el tórax, posee cabeza amarilla con manchas oscuras triangulares alrededor de los ocelos, dos líneas oscuras longitudinales posteriores a los ocelos laterales que continúan hasta

spot on the anterior portion and the central keel is dark brown. It has lateral lobes, each with two dark spots in parallel longitudinal lines with straight, but irregularly shaped sides. The mesoscutellum is yellowish white highlighted by dark sutures on the thorax. The mesopleuron is yellow with a light brown triangular spot on the mesial side; the margins and apex are dark. The wings are yellowish brown with brown stigma with two hyaline areas. The abdomen, in dorsal view, is yellowish with the junction of the tergites slightly brown; the basal segments have a larger brown area. The legs are yellowish with fine pubescence, the femurs have a brown inner portion, the tibiae have a yellowish basal third and the rest is brown like the tarsi (Figure 1).

el occipucio y presenta una gran profusión de pelos largos amarillos en la cabeza. En la vista frontal, la cabeza tiene un aspecto amarillento con los agujeros tentoriales; los márgenes y ápice del clípeo son oscuros y las mandíbulas son café. Las antenas son serradas con 20 antenómeros de color café claro y los apicales son café oscuro. El tórax es amarillento, el lóbulo medio del mesoescutum tiene una mancha tenue café claro en la porción anterior y la quilla central es café oscuro. Presenta lóbulos laterales, cada uno con dos manchas oscuras en líneas longitudinales paralelas con los costados rectos, pero de forma irregular. El mesoescutellum es blanco amarillento que resalta por las suturas oscuras del tórax. El mesopleuron es amarillo

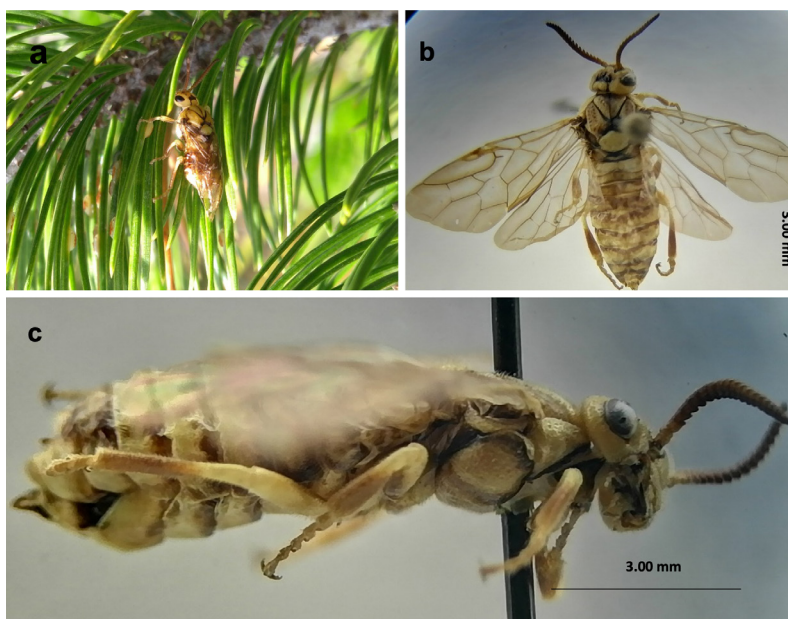


Figure 1. Female of *Zadiprion borjai* sp. nov. attacking *Pinus cembroides* in Miquihuana Tamaulipas, Mexico. Perched on host (a), dorsal view (b) and lateral view (c).

Figura 1. Hembra de *Zadiprion borjai* n. sp. que ataca *Pinus cembroides* en Miquihuana Tamaulipas, México. Posada en hospedero (a), vista dorsal (b) y vista lateral (c).

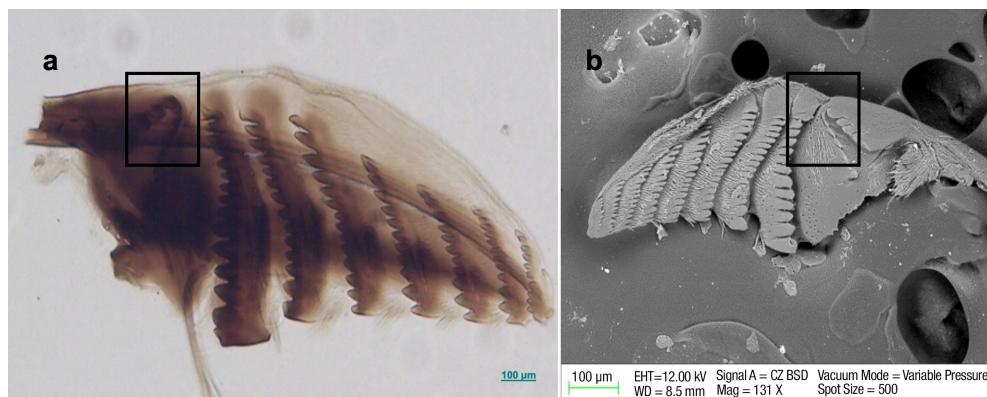


Figure 2. Lancet of the ovipositor of the female *Zadiprion borjai*. Mounting in glycerin and view with 10X objective (a) and electron microscope (b).

Figura 2. Lanceta del ovipositor de la hembra de *Zadiprion borjai*. Montaje en glicerina y vista con objetivo 10X (a) y microscopio electrónico (b).

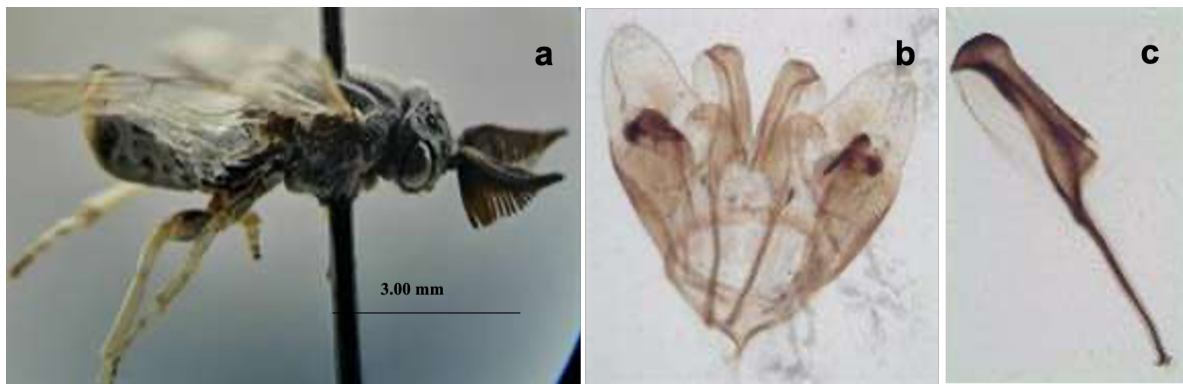


Figure 3. *Zadiprion borjai* sp. nov. male lateral view (a), entire genitalia (b) and penis valve (c).

Figura 3. Macho de *Zadiprion borjai* sp. nov. en vista lateral (a), genitalia completa (b) y válvula del pene (c).

The lancet of the ovipositor (Figure 2) has nine rings; the first ring is shaped like an inverted “U”. The teeth of the first complete ring are larger at the base, the first three serrulate are concave in the mesial part and the rest of the rings are straight.

Males

Males are 6.0 mm in length and look dark black with a yellow spot in the postocular area near the upper margin of each eye. They have bipectinate antennae except for the three terminal segments. The base of the antennomeres is light brown with black ramus. The face is almost entirely black with yellowish hairs. The labrum is light yellow; the mandibles are brown, and the palps are yellowish. The coxae and trochanters of the legs are black, the femurs black with yellow apical third, and yellowish tibiae and tarsi. The genitalia show rounded and clear harps at the tip with the inner part slightly curved and concave at the center (Figure 3b). The penis valve shows the apex straight in the front portion and rounded convex in the rest with two triangular projections in the middle part (Figure 3c).

In the case of smaller flies, the dark spot surrounding the ocelli is wider with no light portions between the ocelli and the spots on the lateral lobes of the mesoscutum merge and form a continuous dark line longitudinally.

Type material

Dry-mounted female holotype labeled Miquihuana, Tamaulipas, Mexico. “Mesa del Jarrillo” 23° 38’ 39.2” N - 99° 50’ 37.2” W and altitude of 2 210 m. Ernesto Gonzalez Gaona collector of March 16, 2019. Dry-mounted male with the same data as above. These specimens were deposited with record number INIT-1495 in the forest insect collection of the Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Conservación y Mejoramiento de Ecosistemas Forestales del Instituto

con una mancha triangular café claro en la parte mesial; los márgenes y ápice son oscuros. Las alas son café amarillento con estigma café con dos áreas hialinas. El abdomen, en vista dorsal, es amarillento con la unión de los tergitos ligeramente café; los segmentos basales presentan mayor área café. Las patas son amarillentas con fina pubescencia, los fémures tienen la porción interna café, las tibiae tienen el tercio basal amarillento y el resto es café igual que los tarsos (Figura 1).

La lanceta del ovipositor (Figura 2) presenta nueve anillos; el primer anillo con forma de una “U” invertida. Los dientes del primer anillo completo son más grandes en la base, las tres primeras serrulas son cóncavas en la parte mesial y el resto de los anillos son rectos.

Machos

Los machos miden 6.0 mm de longitud y son de apariencia negro oscuro con una mancha amarilla en el área postocular cerca del margen superior de cada ojo. Tienen antenas bipectinadas con excepción de los tres segmentos terminales. La base de los antenómeros es café claro con ramis negros. La cara es negra casi en su totalidad con pelos amarillentos. El labrum es amarillo claro; las mandíbulas son café y los palpos amarillentos. Las coxas y trocánter de las patas son negros, los fémures negros con el tercio apical amarillo y las tibiae y tarsos amarillentos. La genitalia muestra las harpes redondeadas y claras en la punta con la parte interior ligeramente curvada y cóncava en el centro (Figura 3b). La válvula del pene presenta el ápice recto en la porción delantera y convexa redondeada en el resto con dos proyecciones triangulares en la parte media (Figura 3c).

En las moscas de menor talla, la mancha oscura que rodea a los ocelos es más ancha sin porciones claras entre los ocelos y las manchas de los lóbulos laterales del mesoscutum se unen y forman una línea oscura continua longitudinal.

Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (CENID-COMEF-INIFAP), Viveros de Coyoacán, Mexico City.

Paratype

Three females and three males with the same collection data with record numbers 245 and 246, respectively, deposited in the forest insect collection of CEPAB-INIFAP, km 32.5 Aguascalientes-Zacatecas highway, Pabellón de Arteaga, Aguascalientes, Mexico.

Etymology

The name *Zadiprion borjai* has been assigned in honor of Hugo Enrique Borja Nava (health liaison of the Comisión Nacional Forestal [CONAFOR]), who in 2013 detected the epidemic outbreak attacking *P. cembroides* in the ejido Servando Canales, Miquihuana, Tamaulipas, Mexico, and has followed up on the study and phenology of the pest.

Material studied

Miquihuana, Tamaulipas, Mexico. "Mesa del Jarrillo" of the ejido Servando Canales (23° 38' 39.2" N, 99° 50' 37.2" W and elevation of 2 210 m). Infestation in a 12-year-old commercial production lot of *P. cembroides*. This type of plantation is carried out with the objective of having a source of economic income in low-income areas, which is why CONAFOR has encouraged planting, since the seed of *P. cembroides* is marketed in preference to *P. nelsonii* Shaw, which is considered a hard pine nut. In the area, *P. nelsonii* is found naturally and no attacks have been recorded.

Comments

In general, *Zadiprion* females are very similar since they are yellow. The species under study is closely related to *Z. jeffreyi* and *Z. rohweri* because the lancet of the ovipositor also has the first inverted U-ring (Smith et al., 2012). This suggests that *Z. rohweri* is not the only species with this characteristic, as mentioned by Smith et al. (2012), regarding the three species as a group. In this case, a noticeable difference is observed in the lateral lobes of the mesonotum: *Zadiprion borjai* sp. nov. has two lines of parallel longitudinal dark spots with straight but irregularly shaped sides, while *Z. jeffreyi* has a black spot (Aguilera-Molina et al., 2019; Smith, 2019) and *Z. rohweri* is all-yellow with no stain (Smith et al., 2012). The lancet most closely resembles that of *Z. jeffreyi* (Smith, 2019) in being short and robust, but *Z. borjai* has nine rings and rings two, three and four are slightly curved: the first one with larger base teeth. *Z. borjai* males are preponderantly black with yellowish legs and show a yellowish-brown spot in the postocellar area near the upper orbit of the compound eye, but

Material tipo

Holotipo hembra montada en seco etiquetada como Miquihuana, Tamaulipas, México. "Mesa del Jarrillo" 23° 38' 39.2" N - 99° 50' 37.2" O y altitud de 2 210 m. Colector Ernesto González Gaona del 16 de marzo de 2019. Macho montado en seco con los mismos datos que el anterior. Estos especímenes se depositaron con número de registro INIT-1495 en la colección de insectos forestales del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Conservación y Mejoramiento de Ecosistemas Forestales del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (CENID-COMEF-INIFAP), Viveros de Coyoacán, Ciudad de México.

Paratipo

Tres hembras y tres machos con los mismos datos de recolecta con número de registro 245 y 246, respectivamente, depositados en la colección de insectos forestales del CEPAB-INIFAP, km 32.5 carretera Aguascalientes-Zacatecas, Pabellón de Arteaga, Aguascalientes, México.

Etimología

El nombre *Zadiprion borjai* se ha asignado en honor a Hugo Enrique Borja Nava (enlace de Sanidad de la Comisión Nacional Forestal [CONAFOR]), quien en el 2013 detectó el brote epidémico que ataca *P. cembroides* en el ejido Servando Canales, Miquihuana, Tamaulipas, México, y ha dado seguimiento al estudio y fenología de la plaga.

Material examinado

Miquihuana, Tamaulipas, México. "Mesa del Jarrillo" del ejido Servando Canales (23° 38' 39.2" LN, 99° 50' 37.2" LO y 2 210 m). Infestación en lote de producción comercial de *P. cembroides* de 12 años. Este tipo de plantaciones se realizan con el objetivo de tener una fuente de ingreso económico en zonas de bajos recursos, por lo que la CONAFOR ha fomentado la plantación, ya que la semilla de *P. cembroides* se comercializa preferentemente con respecto a *P. nelsonii* Shaw que es considerado un piñón duro. En la zona, *P. nelsonii* se encuentra de forma natural en el cual no se ha registrado algún ataque.

Observaciones

En general, las hembras del género *Zadiprion* son muy parecidas, ya que son de color amarillo. La especie en estudio está muy relacionada con *Z. jeffreyi* y *Z. rohweri*, ya que la lanceta del ovipositor también presenta el primer anillo de U invertida (Smith et al., 2012). Lo anterior sugiere que *Z. rohweri* no es la única especie que presenta dicha característica, como lo mencionan

no yellowish-brown pronotum or tegula as *Z. rohweri*. Likewise, *Z. borjai* differs in the genitalia, as it has rounded, clear harps at the apex and in the other cases it is a bit sharp; the penis valve also differs from the other two species at the apex.

At the larval level, this group of insects has a very distinctive maculation and can be separated at this stage. Larvae affecting *P. cembroides* in Miquihuana, Tamaulipas (Figure 4c) are different from those attacking *P. jeffreyi* in Baja California, Mexico, identified as *Z. jeffreyi* (Figure 4b) (Aguilera-Molina et al., 2019), and from *Z. rohweri* attacking *P. cembroides* in Coahuila, Mexico (Figure 4a) (Smith et al., 2016).

Zadiprion borjai larvae are light with dark longitudinal stripes without glandules in clusters. Viewed dorsally they have a brown longitudinal spot with two thin white lines on the sides and a wide dark longitudinal stripe subdorsally. The head is orange-brown with a small circular eyelid. From the lateral view, and only on the abdominal segments, they show a broad dark spot extending from below the spiracle to the base of the false legs, leaving only the areas of the prepipleurite lobes light (Figure 4c).

Regarding molecular identification, in the NCBI taxonomy databases, the genus *Zadiprion* has only four sequences recorded that correspond to COI, and of these only two were identified to species as *Z. rohweri*.

A phylogenetic tree (Figure 5) with several clades was obtained. Homology analysis with BLAST and BOLDSYSTEMS placed the samples from Miquihuana, Tamaulipas (TAMPZR6) as different species from the populations of the specimens recorded in GenBank

Smith et al. (2012), considerando a las tres especies como un grupo. En este caso, una diferencia notoria se observa en los lóbulos laterales del mesonoto: *Zadiprion borjai* sp. nov. presenta dos líneas de manchas oscuras longitudinales paralelas con los costados rectos, pero de forma irregular, mientras que *Z. jeffreyi* tiene una mancha negra (Aguilera-Molina et al., 2019; Smith, 2019) y *Z. rohweri* es completamente amarillo sin mancha alguna (Smith et al., 2012). La lanceta se asemeja más a la de *Z. jeffreyi* (Smith, 2019) por ser corta y robusta, pero *Z. borjai* presenta nueve anillos y los anillos dos, tres y cuatro están ligeramente curvados; el primero de estos tres con los dientes de la base más grandes. Los machos de *Z. borjai* son preponderantemente negros con las patas amarillentas y muestran una mancha café amarillenta en el área postocelar cerca de la órbita superior del ojo compuesto, pero no tiene el pronoto o la tégula café-amarillentos como en *Z. rohweri*. Asimismo, *Z. borjai* difiere en la genitalia, ya que tiene las harpes redondeadas y claras en el ápice y en los otros es algo picuda; la válvula del pene también difiere de las otras dos especies en el ápice.

A nivel larvario, este grupo de insectos presenta una maculación muy distintiva y pueden ser separados desde esta etapa. Las larvas que afectan al pino piñonero *P. cembroides* en Miquihuana, Tamaulipas (Figura 4c) son diferentes a las que atacan a *P. jeffreyi* en Baja California, México, identificada como *Z. jeffreyi* (Figura 4b) (Aguilera-Molina et al., 2019), y a *Z. rohweri* que ataca a *P. cembroides* en Coahuila, México (Figura 4a) (Smith et al., 2016).

Las larvas *Z. borjai* son claras con franjas longitudinales oscuras sin glandubas en grupos. En vista dorsal presentan una mancha longitudinal café con dos

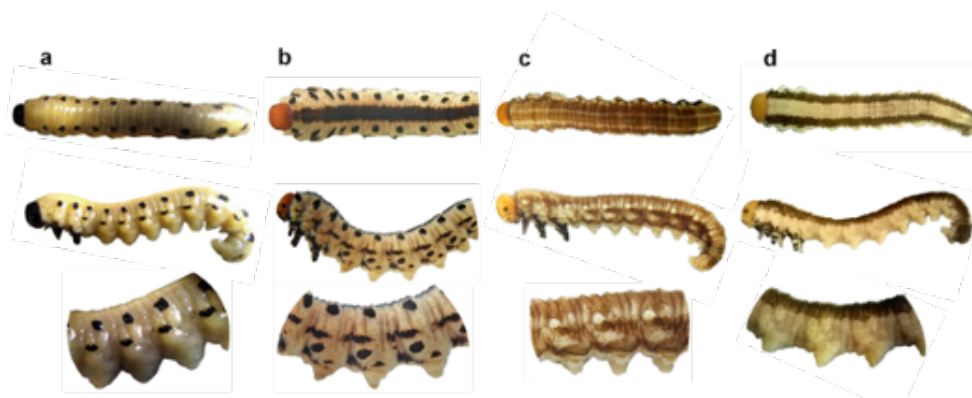


Figure 4. *Zadiprion* larvae of the *Z. rohweri* group affecting pines in Mexico: *Z. rohweri* in *Pinus cembroides* in Coahuila (a), *Z. jeffreyi* in *P. jeffreyi* in Baja California (b), *Z. borjai* sp. nov. in *P. cembroides* in Tamaulipas (c), *Zadiprion* sp. in *P. chiapensis* (d).

Figura 4. Larvas de *Zadiprion* del grupo *Z. rohweri* que afectan pinos en México: *Z. rohweri* en *Pinus cembroides* en Coahuila (a), *Z. jeffreyi* en *P. jeffreyi* en Baja California (b), *Z. borjai* sp. nov. en *P. cembroides* en Tamaulipas (c), *Zadiprion* sp. en *P. chiapensis* (d).

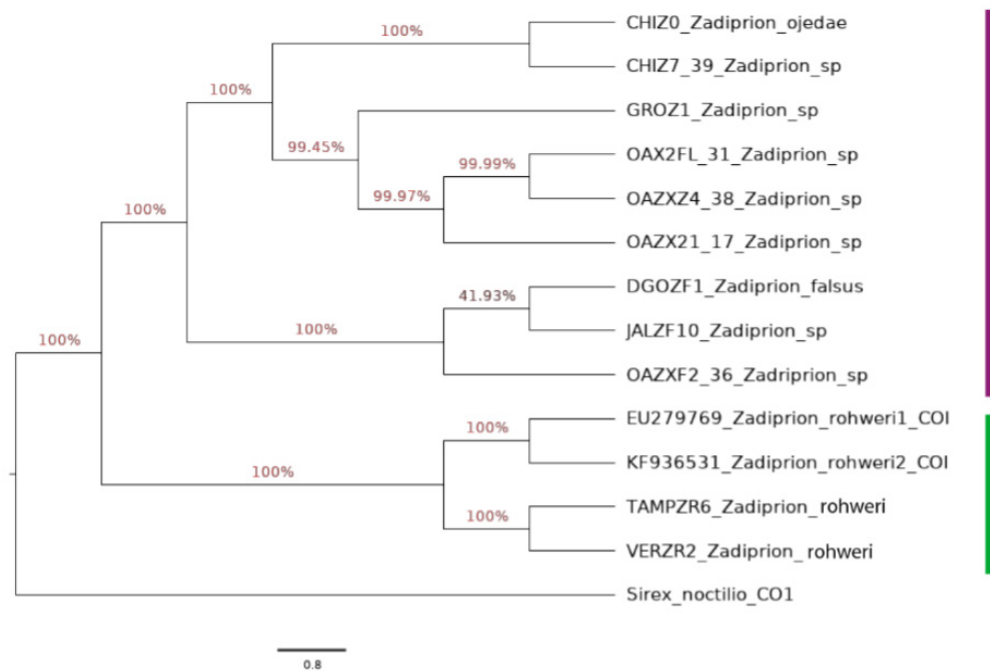


Figure 5. Phylogenetic tree of *Zadiprion* CONAFOR 2017 CO2 project number 291304 and Genbank databases. GenBank sequence HM114320, corresponding to *Sirex noctilio*, was used as outgroup control.

Figura 5. Árbol filogenético de especies de *Zadiprion* considerando las recolectas del proyecto CONAFOR 2017 CO2 número 291304 y las bases de datos del Genbank. La secuencia HM114320 del GenBank, correspondiente a *Sirex noctilio*, se utilizó como testigo fuera de grupo.

(ID KF936531) with 92.23 % and 93.72 % similarity, respectively, corresponding to *Z. rohweri*.

The sequence of the new *Zadiprion* species was recorded in GenBank under deposit number ON181557 dated 12 April 2022.

Conclusions

The pest that is affecting pinyon pine (*Pinus cembroides*) is different from *Z. rohweri* and *Z. jeffreyi*. The species was recorded as *Zadiprion borjai* sp. nov. (deposited in GenBank No. ON181557) with known distribution only in Miquihuana, Tamaulipas. In this region, *P. cembroides* has a better price than *P. nelsonii*; therefore, the identification of the pest is important considering that the planting of pinyon pine is being promoted to increase the resources of producers.

Acknowledgments

The authors thank the funding granted from the CONACYT-CONAFOR Sectorial fund, project CONAFOR 2017 CO2 no. 291304

líneas blancas delgadas a los costados y una franja longitudinal ancha oscura a nivel subdorsal. La cabeza es café anaranjado con oculario pequeño y circular. En vista lateral, y solo en los segmentos abdominales, muestran una mancha ancha oscura abarcando desde abajo del espiráculo hasta la base de las falsas patas, dejando claras solo las áreas de los lóbulos del prepipleurito (Figura 4c).

Respecto a la identificación molecular, en las bases de datos de taxonomía del NCBI, el género *Zadiprion* presenta solo cuatro secuencias registradas que corresponden a COI, y de estas solo dos fueron identificadas a especie como *Z. rohweri*.

Se obtuvo un árbol filogenético (Figura 5) con varios clados. El análisis de homología con BLAST y con BOLD SYSTEMS ubican a las muestras de Miquihuana, Tamaulipas (TAMPZR6) como especies diferentes a las poblaciones de los especímenes registrados en el GenBank (ID KF936531) con 92.23 % y 93.72 % de similitud, respectivamente, que corresponden a *Z. rohweri*.

La secuencia de la nueva especie de *Zadiprion* se registró en el GenBank con el número de depósito ON181557 con fecha del 12 de abril de 2022.

Conclusiones

La plaga que está afectando pino piñonero (*Pinus cembroides*) es diferente de *Z. rohweri* y *Z. jeffreyi*. La especie

End of English version

References / Referencias

- Aguilera-Molina, V. M., Munguía-Ortega, K. K., López-Reyes, E., Martínez-Aquino, A., & Ceccarelli, F. S. (2019). Climate change and forest plagues: assessing current and future impacts of diprionid sawflies on the pine forests of North-Western Mexico. *Peer J*, 7(5), e7220. doi: 10.7717/peerj.7220
- BOLDSYSTEMS. (2021). Barcode of life data system. Advancing biodiversity science through DNA-based species identification. Retrieved from <https://www.boldsystems.org/>
- Darriba, D., Posada D., Kozlov A. M., Stamatakis A., Morel B., & Flouri, T. (2019). ModelTest-NG: A new and scalable tool for the selection of DNA and protein evolutionary models. *Molecular Biology and Evolution*, 37(1), 291–294. doi:10.1093/molbev/msz189
- Folmer, R. H. A., Nilges, M., Folkers, P. J. M., Konings, R. N. H., & Hilbers, C. W. (1994). A model of the complex between single-stranded DNA and the single-stranded DNA binding protein encoded by gene V of filamentous bacteriophage M13. *Journal of Molecular Biology*, 240(4), 341–357. doi: 10.1006/jmbi.1994.1449
- González, G. E., Bonilla, T. F., Quiñonez, B. S., Sánchez, M. G., Tafoya, R. F., España, L. M. P., & Robles, U. S. (2014). Guía para la identificación de moscas sierra de la familia Diprionidae presentes en el centro norte de México. México: INIFAP. Retrieved from <https://docplayer.es/46918897-Guia-guia-para-la-identificacion-la-identificacion-moscas-sierra-la-familia-diprionidae-de-presentes-moscas-en-el-centro-norte-sierra.html>
- Gobierno de Tamaulipas. (2011). Atlas de riesgos del estado de Tamaulipas. Retrieved from <https://www.tamaulipas.gob.mx/proteccioncivil/wp-content/uploads/sites/36/2011/12/CAPITULO-VI-PARTE-2.pdf>
- Goulet, H. (1992). *The genera and subgenera of the sawflies of Canada and Alaska. Hymenoptera: Symphyta*. Canada: Research Branch Agriculture Canada. Retrieved from https://publications.gc.ca/collections/collection_2016/aac-aafc/agrhist/A42-42-1992-20-eng.pdf
- National Center of Biotechnology Information (NCBI). (2021). National Library of Medicine. Nucleotid BLAST. Retrieved from <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Promega Corporation. (1999). Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. Retrieved from <https://worldwide.promega.com/products/nucleic-acid-extraction/clean-up-and-concentration/wizard-sv-gel-and-pcr-clean-up-system/>
- Ross, H. H. (1955). The taxonomy and evolution of the sawfly genus Neodiprion. *Forest Science*, 1(3), 196–209. Retrieved from <https://www.cabi.org/ISC/abstract/19580500510>
- Sievers, F., & Higgins, D. G. (2014). Clustal omega, accurate alignment of very large numbers of sequences. In D. Russell (Ed.), *Multiple sequence alignment methods. Methods in molecular biology* (vol. 1079, pp. 105–116). se registró como *Zadiprion borjai* sp. nov. (depositada en GenBank núm. ON181557) con distribución conocida solo en Miquihuana, Tamaulipas. En esta región, *P. cembroides* tiene mejor precio que *P. nelsonii*; por lo que la identificación de la plaga es importante si se considera que la plantación de pino piñonero se está promoviendo para incrementar los recursos de los productores.
- Agradecimientos**
- Se agradece el apoyo económico del fondo Sectorial CONACYT-CONAFOR, proyecto CONAFOR 2017 CO2 núm. 291304.
- Fin de la versión en español*
- =====
- Totowa, NJ, USA: Humana Press. doi: 10.1007/978-1-62703-646-7_6
- Smith, D. R. (1988). A synopsis of the sawflies (Hymenoptera: Symphyta) of America south of the United States: Introduction Xyelidae, Pamphiliidae, Cimbicidae, Diprionidae, Xyphidriidae, Siricidae, Orussidae, Cephidae. *Systematic Entomology*, 13(2), 205–261. doi: 10.1111/j.1365-3113.1988.tb00242.x
- Smith, D. R. (2019). A new *Zadiprion* (Hymenoptera: Diprionidae) de Baja California, México on *Pinus jeffreyi*. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 121(4), 700–703. doi: 10.4289/0013-8797.121.4.700
- Smith, D. R., Sánchez-Martínez, G., & Ojeda-Aguilera, A. (2012). A new species of *Zadiprion* (Hymenoptera: Diprionidae) on *Pinus durangensis* from Chihuahua, Mexico, and a review of other species of the genus. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 114(2), 224–237. doi: 10.4289/0013-8797.114.2.224
- Smith, D. R., Monjarás-Barrera, J. I., Aguilar-Hernández, J. C. & Quiñones-Dena, H. (2016). New host and distribution records for *Zadiprion rohweri* (Middleton) (Hymenoptera: Diprionidae) a pinyon pine sawfly. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 118(2), 300–301. doi: 10.4289/0013-8797.118.2.300
- 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), 1–5. doi: 10.1093/ve/vey016
- Yuasa, H. (1922). A classification of the larvae of the Tenthredinoidea. Thesis Doctor in Philosophy in Entomology, University of Illinois, USA. doi: 10.5962/bhl.title.16767
- Wong, H. R., & Szlabey, D. L. (1986). Larvae of the North American genera of Diprionidae (Hymenoptera: Symphyta). *The Canadian Entomologist*, 118(6), 577–587. doi: 10.4039/Ent118577-6

