

SECCIÓN V. HERRAMIENTAS PARA EL CONTROL BIOLÓGICO CLÁSICO

CAPÍTULO 13: EXPLORACIÓN EN EL EXTRANJERO

Este capítulo presenta información dirigida a científicos que están llevando a cabo exploración en el extranjero, junto con los antecedentes sobre el diseño y la operación de las instalaciones de cuarentena para el manejo del material colectado. Para información adicional sobre estas actividades, ver Bartlett y van den Bosch (1964), Boldt y Drea (1980), Klingman y Coulson (1982), Schroeder y Goeden (1986), y Coulson y Soper (1989). Trabajar en el sitio nativo durante la exploración en el extranjero puede ayudar a seleccionar a los enemigos naturales potencialmente más efectivos y a tener un conocimiento más preciso acerca del rango de hospederos de los agentes encontrados (Goolsby et al. 2006a). Los exploradores extranjeros deben familiarizarse ellos mismos con dichas oportunidades y definir una estrategia para maximizar el valor del tiempo de colecta utilizado en la exploración en el extranjero.

PLANEACIÓN Y CONDUCCIÓN DE LA EXPLORACIÓN EN EL EXTRANJERO

SELECCIÓN DE LAS LOCALIDADES DE INSPECCIÓN

Dependiendo de qué tanto se conozca acerca de una especie invasora, la selección de áreas de colecta de enemigos naturales puede ser completamente simple o extremadamente incierta. La invasión del oeste de los Estados Unidos por la mosca blanca del fresno, *Siphoninus phillyreae* (Halliday), fue seguida inmediatamente por colectas en Europa y en el Oriente Medio, donde la mosca blanca y sus enemigos naturales eran bien conocidos. En contraste, los esfuerzos para coleccionar enemigos naturales del helecho acuático gigante (*Salvinia molesta* Mitchell), el piojo harinoso de la yuca (*Phenacoccus manihoti* Matile-Ferrero), la escama de la haya (*Cryptococcus fagisuga* Lindinger), el trips del aguacate (*Scirtothrips perseae* Nakahara) y el picudo del plátano *Cosmopolites sordidus* (Germar) fueron todos fallidos, al menos inicialmente, porque las plagas eran nuevas para la ciencia o porque su área de origen era desconocida.

Para las plantas invasoras, la especie misma puede ser bien conocida pero puede tener un rango extremadamente extenso, sin relaciones genéticas claras entre las poblaciones geográficas, haciendo difícil la selección de las áreas de mayor prioridad para la colecta de enemigos naturales. Por ejemplo, los cedros salados (*Tamarix* spp.) invasores en el suroeste de los Estados Unidos, son cuatro especies y sus híbridos (DeLoach et al., 2003). La especie progenitora de las poblaciones de la plaga tiene un rango nativo que se extiende

desde el norte de África hasta China (Milbrath y DeLoach, 2006). Los análisis moleculares (ver el Capítulo 15) pueden aclarar tales relaciones y ayudar a identificar cuáles localidades podrían ser mejores para buscar enemigos naturales.

Para tratar con casos difíciles, algunas fuentes de información pueden ayudar, incluyendo la literatura sobre la plaga (o sus parientes), contactos profesionales en el extranjero, correspondencia climática (ver el Capítulo 14) y para los insectos plaga estenófagos, la biografía de la planta hospedera. Si la plaga es inicialmente conocida en muchas áreas dispersas, las herramientas moleculares pueden ser utilizadas para determinar cuál localidad es más probable de ser la fuente de la población invasora (p. ej., Williams *et al.*, 1994; Biron *et al.*, 2000; Gaskin, 2003; Goolsby, 2004). La población del adélgido lanudo del falso abeto (*Adelges tsugae* Annand) invasor en el este de los Estados Unidos, por ejemplo, podría haber venido potencialmente desde al menos tres áreas (el oeste de los Estados Unidos, Japón y China), pero los análisis moleculares demostraron concluyentemente que el origen era Japón (Havill *et al.*, 2006). Tales comparaciones moleculares pueden también indicar si la infestación de la plaga se deriva de una o de varias fuentes independientes (p. ej., Carter *et al.*, 1996), lo cual indica que colectas separadas de los enemigos naturales podrían ser deseables para las subpoblaciones de la plaga en la zona invadida.

Cuando la plaga invasora es desconocida afuera del área invadida, el encontrar el rango nativo dependerá de las inspecciones, guiadas por inferencias taxonómicas, biogeográficas y climáticas. Tales inspecciones podrían explorar áreas donde especies cercanas taxonómicamente a la plaga son conocidas o donde la planta hospedera ha evolucionado (para insectos invasores). Después de que poblaciones de la plaga hayan sido localizadas, su diversidad genética puede ser medida para determinar dónde es mayor, siendo esta su probable área de origen. Las áreas de origen también se pueden predecir donde los enemigos naturales de la plaga sean más diversos. Éstos y otros conceptos son útiles para la generación de hipótesis acerca del origen de la plaga, pero ninguno proporciona un mecanismo infalible para localizar el rango nativo. Más adelante se discutirá la aplicación de estos conceptos.

- (1) Dónde se presenten las especies más cercanas de la especie plaga. Si una plaga es desconocida fuera de su rango invasor, su rango nativo de distribución podría ser donde se presenten los mayores números de congéneres y, específicamente, donde se encuentren las especies emparentadas más cercanas. El minador de la hoja de la castaña del caballo (*Cameraria ohridella* Dschka y Dimic), una especie invasora en Europa, es desconocido en otras partes del mundo. Europa no es considerada como su rango nativo por su reciente dispersión explosiva y por su carencia de parasitoides específicos. Ya que otros miembros de *Cameraria* son de América y de Asia, no de Europa, estas áreas son consideradas como las áreas potenciales de origen (Kenis *et al.*, 2005).
- (2) Dónde evolucionaron las plantas hospederas de la plaga. Para los insectos con alta especificidad de plantas hospederas, el centro de evolución de esas plantas, si es conocido, puede ser el área de origen del insecto. Por ejemplo, se cree que algunas plagas cítricas como ciertas escamas, se originaron en el sureste de la China, el área de origen del género *Citrus*. El árbol de aguacate, que es un hospedero específico de algunos insectos, es probable que haya evolucionado en Centroamérica (Hoddle *et al.*,

2002b). También, si la historia del movimiento de las plantas es conocida, esto puede proporcionar evidencia de dónde una población de un insecto llegó. Por ejemplo, el minador de la hoja del café, *Leucoptera coffeella* (Guérin-Méneville), una plaga importante en las Américas, se sospecha que es un invasor, pero su origen es desconocido. Una pista respecto a su origen incluye la presencia poco notada de este insecto en cafetales en Madagascar y la Isla Reunión, la presencia de algunas especies nativas del cafeto en Reunión y el arribo de *Coffea arabica* var. *bourbon* a las Américas de la isla de Reunión. Colectivamente, esos hechos apuntan a Reunión como el rango nativo posible de esta polilla (Green, 1984).

- (3) El rango nativo es donde la especie plaga muestra mayor diversidad genética. La avispa de las agallas *Megastigmus transvaalensis* Hussey (Torymidae), en África, se alimenta de plantas del género *Rhus*, pero en el resto del mundo está asociada con *Schinus*. Scheffer y Grissell (2003) analizaron la variación genética en una secuencia de la oxidasa del citocromo mitocondrial y encontraron una variación extensa en las poblaciones africanas pero ninguna variación en otras partes. Por lo cual concluyeron que el insecto era de origen africano. Gwiazdowski *et al.* (2006) usaron el mismo enfoque para evaluar la probabilidad de que el origen de una escama Eriococcidae (*C. fagisuga*), fuera en el oeste de Europa o que fuera del sureste de Europa o el oeste de Asia. Esta escama es una plaga forestal invasora en Norteamérica.
- (4) Dónde son más diversos los enemigos naturales de la plaga. Si una plaga es conocida en diferentes áreas y los análisis genéticos no separan poblaciones resultantes de localidades ancestrales, la diversidad de la fauna de enemigos naturales asociados podría ser de utilidad. Pschorn-Walcher (1963), en sus trabajos con varias avispas sierra, sugirió que el área de origen podría estar asociada con grandes complejos de parasitoides especializados. Sugirió que Europa Central probablemente fuera el origen de la avispa sierra *Pristiphora erichsonii* (Hartig), donde su complejo de parasitoides es grande y distintivo, no el Reino Unido, donde la avispa sierra tiene relativamente pocos parasitoides. Similarmente, Kfir (1998) usó este concepto para argumentar que Sudáfrica, no Europa, era probablemente el origen de la polilla del repollo *Plutella xylostella* (L.), la cual se alimenta de crucíferas; previamente se había pensado que era Europa por ser el área de origen de las crucíferas *Brassica* cultivadas a las cuales ataca comúnmente esta plaga.

PLANEACIÓN DE UN VIAJE DE COLECTA AL EXTRANJERO

La planeación de un viaje de exploración en el extranjero empieza con la acumulación de toda la información relevante disponible, incluyendo la información taxonómica pertinente, la identidad de especímenes relevantes en colecciones de museos y las notas de previos viajes de colecta en las áreas de búsqueda. Esta información, junto con la correspondencia reciente con los colaboradores, es utilizada para determinar la estación y las localidades más disponibles para las inspecciones de enemigos naturales. Además de elegir las localidades para la búsqueda, la planeación de un viaje de colecta al extranjero debe incluir la obtención de los permisos y visas necesarios, el encuentro con un colector y colaborador local competente en la zona de búsqueda y el montaje del equipo necesario.

PERMISOS

El primer paso en la organización de un viaje de colecta al extranjero es obtener los permisos necesarios para coleccionar y exportar material vivo, de los países a ser visitados, y también los permisos necesarios para importar el material coleccionado al país importador. La planeación de la importación requiere el desarrollo de un acuerdo con una instalación autorizada de cuarentena para recibir y procesar el material importado. La exportación de especímenes muertos, coleccionados para estudio o como especímenes en préstamo, también está regulada en algunos países. Ya que las leyes pueden variar en cada país y cambiar con el tiempo, los trabajadores en control biológico podrían buscar la información local actualizada preguntando directamente a un colega local. El colector deberá proporcionar a las instalaciones de cuarentena las copias de los permisos de importación, fechas esperadas de envíos, arreglos para la autorización del material enviado en las aduanas locales y planes claros para el establecimiento de colonias de los enemigos naturales importados. En apoyo al desarrollo de estas colonias, deben hacerse los arreglos con los laboratorios de cuarentena receptores para que el material hospedero necesario esté disponible para usarlo en la cría.

El permiso de importación para cuarentena no implica el permiso para la liberación en el medio ambiente. Típicamente, cualquier agente de control biológico plausible puede ser importado a la cuarentena para su estudio. La liberación de la cuarentena requiere del desarrollo de datos adecuados para evaluar los riesgos potenciales del agente a la fauna o a la flora local (ver el Capítulo 17).

CREDENCIALES DEL COLECTOR/EXPLORADOR

Las personas que coleccionan enemigos naturales en países extranjeros deben ser buenos planeadores, altamente flexibles y adaptables, y viajeros con experiencia. Deben tener un amplio conocimiento de la plaga a controlar, sus enemigos naturales potenciales y, de ser posible, de sus plantas hospederas. La colecta en el extranjero puede requerir trabajo en áreas difíciles de llegar y carentes de infraestructura y servicios eficientes. Un asistente local bilingüe, familiarizado con las aduanas locales, frecuentemente es necesario para lograr acceso seguro a los sitios de colecta potenciales. La colaboración con instituciones de investigación locales frecuentemente incrementa la efectividad de las inspecciones. Las inspecciones también pueden ser subcontratadas a organizaciones especializadas en la inspección y colección de enemigos naturales, como los laboratorios de control biológico USDA-ARS en el extranjero, CABI Bioscience (Reino Unido), CSIRO (Australia) u otras agencias regionales o nacionales con experiencia apropiada.

EQUIPO

Antes de partir, deben hacerse algunos arreglos para todo el equipo necesario (**Tabla 13-1**). En casos donde el trabajo será conducido en conjunto con un laboratorio en el país extranjero, algunos artículos como microscopios pueden estar disponibles allá. El *equipo de colecta* puede incluir herramientas de cosecha de plantas o cavadoras de suelo, jamas de colección (redes entomológicas) y bandejas de golpeo, cajas de

Tabla 13-1. Lista de equipo y materiales para la exploración en busca de enemigos naturales.

(a) Equipo de colecta

jamas entomológicas de colección, mapas, cámara
picos, palas, niveladores, tijeras de poda, sierras, guantes
bolsas para coleccionar (papel, plástico), hielera o refrigerador portátil

(b) Equipo de identificación y manejo

microscopio y lámpara, lupas, lentes
textos de referencia de la flora local, etc.
pequeños frascos para aislamiento de especímenes, etiquetas
tubos de sílice para colecta de especímenes para análisis del ADN
tarjetas para etiquetado de grupos de frascos
cuaderno o formas de registro, tijeras, regla
alfileres entomológicos, pinzas (finas y grandes), alcohol, miel de abeja

(c) Suministros para empaque y envío

cajas de envío (cartón o madera)
recipientes externos aislantes o de icopor
empaques fríos o calientes
etiquetas de dirección, etiquetas de cuarentena
copias de los permisos de envío, cinta, cuerda

cría, viales o bolsas para almacenamiento de las muestras, mapas y guías de viaje, cuadernos y aparatos de posicionamiento geográfico (GPS por su sigla en inglés) para registrar las localidades de colecta, y hieleras u otros recipientes de almacenamiento aislantes para evitar el sobrecalentamiento del material colectado. Las cámaras digitales son esenciales para registrar la condición de las localidades de colecta y para registrar las identidades iniciales de los candidatos a enemigos naturales y de las plantas hospederas. El *equipo de manejo e identificación* puede incluir pinzas, pinceles finos de pelo de camello, escalpelos, navajas de afeitar, podadoras de plantas, probetas, microscopios, lupas de mano, visores ópticos, lámparas, tubos de sílice para muestras de ADN o para almacenar enemigos naturales colectados para el establecimiento de colonias, parafilm para sellar los frasquitos, miel de abeja para alimentar a los enemigos naturales (si lo permite el país hospedero), cajas Petri con medio de cultivo preparado para la inoculación de patógenos y la literatura pertinente para la identificación de plantas hospederas, insectos hospederos y enemigos naturales. Los *suministros de empaque y envío* incluyen recipientes externos primarios, recipientes con aislantes internos, paquetes de gel congelado, material de envoltura, material amortiguador, cajas de envío, cinta, etiquetas de envío, sobres de etiquetas transparentes y los permisos.

COLECCIÓN DE ESPECÍMENES Y REGISTRO DE DATOS DE CAMPO

Durante las inspecciones, debe ser colectado tanto material como sea posible. Los científicos locales o sus estudiantes graduados pueden ser de utilidad, localizando hábitats nativos o plantaciones agrícolas disponibles para la colecta. Deben tomarse notas de campo que incluyan fechas de todas las colectas, nombres de los contactos, villas, granjas, áreas naturales o parques nacionales visitados (con coordenadas y altitudes tomadas con GPS y fotografías digitales de los sitios), notas sobre los patrones de clima estacionales en los sitios de colecta, tipos de hábitats, comunidades vegetales, especies de plantas hospederas y especies hospederas localizadas, así como los enemigos naturales encontrados. Las colectas deben realizarse en áreas no sujetas a la aplicación de plaguicidas, evitando los cultivos comerciales (los cuales probablemente carecen de enemigos naturales), favoreciendo a los cultivos orgánicos, plantas de jardín no tratadas y jardines públicos o botánicos.

Ya que los sitios de colecta pueden estar lejos de los aeropuertos, es necesario mantener el material vivo mientras se viaje por muchos días. Los estados de los insectos activos deben ser alimentados con alimento apropiado, provistos con agua y mantenidos frescos. La humedad en los recipientes de colecta debe estar en el rango del 40 – 75% para evitar la muerte por deshidratación. Similarmente, deben evitarse las altas humedades que podrían promover el desarrollo de hongos patógenos, y el agua libre, en la cual los insectos pueden ahogarse. Siempre que sea posible, los insectos colectados en campo deben ser transportados en hieleras con aislante, las cuales pueden mantenerse frescas al recargarlas con hielo. Alternativamente, existe un tipo más sofisticado de hielera que usa baterías o corriente directa para enfriar la hielera, eliminando la preocupación por el sobrecalentamiento o el daño por el agua (del hielo derretido). El etiquetado correcto de las muestras colectadas es muy importante, como la etiqueta que acompaña al material a las instalaciones de cuarentena; el colector no debe limitarse a las notas de campo sino que debe proporcionar toda la información importante con los especímenes. Cada colecta debe ser etiquetada con un número de acceso único que pueda ser usado para llevar la cuenta de la colecta de campo, para la cuarentena y para la liberación eventual como un agente de control biológico.

Debe contarse con el tiempo adecuado, al final de cada día, para separar, etiquetar y procesar el material para almacenaje o envío; esto puede exceder el tiempo utilizado en la colecta. Frecuentemente, es posible permanecer dos días en cada localidad, para colectar tanto en la mañana como en la tarde, cuando la actividad de los insectos es más grande. El acceso a las instalaciones de los laboratorios locales puede proporcionar espacio de trabajo y equipo pero, en general, el explorador debe estar preparado para procesar las colecciones en un cuarto de hotel o en un alojamiento similar.

El material colectado debe ser enviado tan frecuentemente como sea posible, para asegurar que los insectos lleguen vivos a la instalación de cuarentena en el país receptor. Los envíos más frecuentes y más pequeños son ventajosos porque cualquier envío puede perderse por demora o por error. Los envíos deben ser hechos al inicio de la semana de trabajo para evitar que se demoren innecesariamente durante los fines de semana. Las colectas hechas al final de un viaje deben ser llevadas a la mano hacia el país de importación, si se permite. Debe permitirse hacer cualquier inspección requerida por el país exportador,

antes de la autorización final para el envío. El estado de vida más durable del enemigo natural, si está disponible, debe ser seleccionado para el envío. Tal estado debe incluir las pupas de los insectos, estados en diapausa o huevecillos. Para los patógenos, los cadáveres del hospedero, esporas o colonias de hifas de hongos en agar deben ser los estados escogidos para el envío.

ENVÍO DE LOS ENEMIGOS NATURALES

El envío de enemigos naturales vivos (**Figuras 13-1**) es una parte crítica de la mayoría de los programas de control biológico clásico (Bartlett y van den Bosch 1964; Boldt y Drea 1980; Bellows y Legner 1993) y muchas pérdidas ocurren en este paso. El envío debería ser efectuado a través de un servicio de envío rápido, por carga aérea, o correo aéreo de alta prioridad y los colectores probablemente tendrían que regresar a las principales ciudades para tener acceso a tales servicios. Si es posible, elegir el día de envío para que los paquetes arriben al país receptor a principios de la semana de trabajo, para facilitar un rápido manejo del paquete y para evitar la demora común de los fines de semana. El personal en el puerto de entrada y de



Figuras 13-1. Un contenedor para el envío internacional de enemigos naturales; note el uso del aislamiento con espuma plástica y el empaque de hielo artificial (en el centro) para enfriamiento (la espuma plástica de la parte superior de la caja fue removida para la fotografía) (a, b); el paquete ensamblado y las etiquetas de envío asociadas. (Fotografías cortesía de USDA/BIRL, M. Heppner [a], S. R. Bauer [b], y R. M. Hendrickson [c]); reimpresso de Van Driesche, R. G. and T. S. Bellows, *Biological Control*, 1996. Kluwer, con permiso).

la cuarentena debería ser informado por correo electrónico, fax o teléfono de los detalles de cada envío (nombre de la compañía, información de la ruta, tiempo de arribo y número de registro del envío). El material de empaque externo debería mostrar los permisos necesarios y las etiquetas con la dirección para facilitar el reconocimiento y el manejo por el personal de aduana y de inspección agrícola, para evitar la demora en el puerto de entrada, la cual es una causa común de muerte de los enemigos naturales enviados.

Algunas recomendaciones generales para el envío de insectos incluyen:

- (1) Envíe por la ruta más rápida disponible, usando un plan bien definido para la rápida autorización en las aduanas y para el reenvío a la cuarentena.
- (2) Envíe materiales en hieleras aisladas o recipientes de espuma plástica, colocados en forma ajustada en el interior de cajas de cartón.
- (3) Evite materiales de plástico fresco (lo cual puede expedir gases tóxicos) y cápsulas de gelatina (las cuales se ablandan con humedad alta).
- (4) Selle bien las cajas y los frasquitos (el parafilm es útil); use un número más grande de recipientes pequeños en lugar de unos pocos más grandes, y no llene en exceso los paquetes con el material.
- (5) Marque las cajas o los frasquitos con un número de accesión, fecha de colecta, localidad, y, si está disponible, el nombre o el grupo del agente de control (el cual debe coincidir con el del permiso).
- (6) Evite el sobrecalentamiento en la ruta, colocando paquetes de gel congelado en el interior de los paquetes.
- (7) Evite la condensación al mínimo en los paquetes por material vegetal extra, usando bolsas de tela, no plásticas, y frasquitos ventilados o cajas Petri, y agregue materiales absorbentes en el interior de los frasquitos.
- (8) Para insectos herbívoros, proporcione una gran cantidad de material vegetal como alimento. El uso de bolsas Ziploc infladas con aire funciona bien para huevecillos y primeros estados de vida, los que son susceptibles de ser aplastados.
- (9) Evite la resequedad excesiva, si es necesario, agregando una caja Petri llena con una solución salina saturada y después séllela con una membrana semipermeable (tal como Opsite Wound[®], disponible con los suministradores médicos) (Hendrickson *et al.*, 1987).
- (10) Empaque los enemigos naturales colectados del suelo en musgo sphagnum o excelsior humedecido (si lo permiten las condiciones del permiso).
- (11) Proporcione a los adultos enviados, material húmedo, absorbente, como el papel de toalla, como sustrato de descanso.
- (12) Alimente a los parasitoides adultos, colocando gotas pequeñas de miel en el interior de los recipientes. Proporcione a las polillas adultas o a las moscas acceso a agua azucarada, Gatorade[®] o miel, ya sea en el interior de los recipientes de vidrio o en bolas de algodón o en esponjas (nota: la importación de miel puede estar prohibida en algunos países, como Australia y Nueva Zelanda, pero puede ser comprada al llegar).

Las uvas pasas humedecidas también pueden usarse (Bartlett y van den Bosch, 1964). Para alimentar a los ácaros depredadores, debe proporcionarse polen.

- (13) Limite el desarrollo de organismos saprófagos sobre los artrópodos enfermos o el tejido vegetal, transfiriendo los patógenos a un medio artificial antes de enviar o dividir las muestras de patógenos en pequeños lotes para limitar la contaminación originada de cualquier espécimen en particular.

OPERACIÓN DE UN LABORATORIO DE CUARENTENA

Una instalación de cuarentena está diseñada para ser una área altamente segura, en la cual pueden ser abiertos los envíos de organismos del extranjero, excluidos los contaminantes y criados los enemigos naturales deseados mientras se determina su seguridad para la liberación en el país receptor.

DISEÑO Y EQUIPO

Los cuartos para el manejo de artrópodos benéficos deben estar sellados al ambiente externo a través de detalles especiales en la construcción, el control de entrada a través de puertas múltiples y el ocultamiento de los ductos de intercambio de aire (Leppla y Ashley, 1978). El personal debe usar batas de laboratorio y cubrirse los zapatos mientras esté en el laboratorio de cuarentena, quitárselos cuando salga y dejarlos en el laboratorio. Los cuartos diseñados para usarse con patógenos requieren de precauciones adicionales, debido al tamaño de los organismos bajo estudio (ver Melching *et al.* [1983] y Watson y Sackston [1985]). Las áreas de manejo de patógenos deben de estar selladas y el aire debe recircular a través de filtros dobles, capaces de remover partículas menores de 0.5 μm y de remover las esporas de hongos y bacterias que vuelan en el aire. Un extractor de aire debe pasar a través de un tercer filtro de fondo profundo, antes de ser ventilado. La presión del aire dentro del laboratorio debe ser menor que la del exterior para evitar el intercambio de aire desde el interior del laboratorio hacia el exterior. Los espacios de trabajo dentro del área de cuarentena típicamente están divididos en pequeños cubículos para limitar la contaminación entre las áreas de estudio.

La identificación de los artrópodos importados típicamente requiere de un microscopio de disección binocular (10-120X) con lámpara de fibra óptica de alta calidad. Un microscopio compuesto es necesario para investigar los cultivos de artrópodos benéficos para entomopatógenos y para identificar a los patógenos importados. La literatura taxonómica necesaria para identificación de especies introducidas debería estar disponible en la instalación de cuarentena o ser accesible a través de conexiones de Internet. Otro equipo necesario en los laboratorios de cuarentena incluye: (1) cajas de cría o recipientes para separar y alojar a los enemigos naturales, (2) una fuente de agua y otros materiales para preparar medios de cultivo de microorganismos, (3) autoclaves u hornos para esterilizar o quemar contaminantes no deseados o materiales de envío, (4) áreas para el mantenimiento de plantas, (5) refrigeradores o cuartos fríos para mantener organismos en estado de diapausa, (6) cámaras de crecimiento para mantener enemigos naturales a

las temperaturas deseadas para la cría, (7) dióxido de carbono para anestesiar artrópodos, y (8) diversas herramientas, desde martillos y destornilladores para reparar y ajustar cajas, hasta pinzas y probetas para manejar artrópodos diminutos.

EL PERSONAL Y LOS PROCEDIMIENTOS OPERATIVOS

La administración y las políticas operativas firmes y comprensibles son básicas para la seguridad y la operación efectiva de un laboratorio de cuarentena seguro. Debería haber un solo supervisor de cuarentena responsable de todos los aspectos de seguridad para un laboratorio. La consolidación de la responsabilidad incrementa la seguridad, aseverando que cada organismo sea manejado apropiadamente y que sean mantenidos los registros adecuados de todos los organismos recibidos, enviados o procesados de otra manera. El supervisor de cuarentena debe estar familiarizado con las regulaciones y las leyes que gobiernan el manejo del laboratorio, desarrolla y mantiene contacto con el personal regulador en los puertos locales de entrada, a través del cual llegan los envíos, procesar todos los envíos entrantes, mantener los registros necesarios y supervisar el funcionamiento del laboratorio de cuarentena.

El oficial de cuarentena también es responsable de mantener contacto con todas las personas involucradas en la colecta y envío de los enemigos naturales al laboratorio de cuarentena. El personal de cuarentena debe estar familiarizado con los conceptos y prácticas del control biológico y saber cómo se aplican a proyectos específicos y a los organismos con los que están involucrados. Los científicos que conducen proyectos de investigación en cuarentena deben tener conocimiento de la taxonomía y del ciclo de vida de las plagas a controlar y de los posibles enemigos naturales. Tal información puede ser crítica en la planeación de los estudios de especificidad de hospederos y en la verificación de la naturaleza de la relación entre el presunto enemigo natural primario y sus hospederos.

Todos los trabajadores en el laboratorio de cuarentena deben estar familiarizados con la operación física de las instalaciones de contención y de su equipo, particularmente de la ventilación, energía y de los servicios, así como del funcionamiento del autoclave u otro tipo de esterilizador. Los nombres y los números de teléfono del personal de mantenimiento y de reparación, para ser contactados en casos de reparaciones necesarias, deben estar disponibles para los días de trabajo normal así como para fines de semana y días festivos. Las necesidades de empleados de limpieza dentro del laboratorio de cuarentena deben ser manejadas por personal del laboratorio de cuarentena. El personal de reparación o servicio del laboratorio y del equipo debe conocer la importancia de la seguridad de la cuarentena y deben ser acompañados por personal del laboratorio de cuarentena cuando estén trabajando en la zona de seguridad. Los científicos visitantes y el personal regulador también deben ser acompañados en el laboratorio. Las visitas casuales por individuos o grupos no deben ser permitidas en la zona de contención.

Incendios, temblores, vandalismo y enfermedades pueden interrumpir las operaciones de cuarentena. Deben colocarse instrucciones en las puertas de entrada, advirtiendo al personal de emergencia los procedimientos de entrada y salida para hacer menos probable una falla en la seguridad de la cuarentena. Los números de teléfono para contactar

al oficial de cuarentena y su asistente, durante horas de trabajo y de descanso, deben ser colocados en la entrada del laboratorio de cuarentena.

MANEJO DE COLONIAS DE INSECTOS EN CUARENTENA

Después de que los enemigos naturales han sido colectados y enviados a un laboratorio de cuarentena, deben crearse colonias sostenibles de los agentes de control. Esto requiere (1) la recuperación exitosa de los enemigos naturales de los envíos de otras partes del mundo, (2) el mantenimiento del material hospedero para la cría, y (3) la reproducción exitosa del agente bajo condiciones de cuarentena.

PROCESAMIENTO DE LOS ENVÍOS DESDE EL EXTRANJERO

Los envíos de organismos vivos deberían ser abiertos en el interior de una caja de transferencia (una caja de observación con una tapa de vidrio y los lados cerrados, que tengan una o dos mangas de tela, a través de las cuales el material puede ser manipulado). Esta precaución permite la separación inicial segura de cualquier contaminante potencial de los enemigos naturales que están siendo enviados. Los organismos vivos son colectados en frasquitos de vidrio, los materiales de empaque son tratados con calor en un horno seco o en autoclave y desechados. Los organismos vivos entonces son investigados taxonómicamente, los que se sabe que son indeseables (hiperparasitoides o artrópodos fitófagos no deseados) son eliminados y preservados en alcohol 75-95% como respaldo de identificación. Si hay congeladores de ultra-baja temperatura disponibles, las muestras congeladas también deben ser almacenadas para preservar el material para estudios moleculares. Los organismos potencialmente benéficos son separados por especie, planta hospedera y localidad de colecta, observados en cópula y colocados en cajas de aislamiento con el hospedero apropiado para su propagación. A cada colonia en cuarentena se le debe asignar un número específico que podría referirse a la fuente de acceso original del material.

Si el envío consiste de patógenos de plantas, las precauciones contra las liberaciones no autorizadas son las mismas de un laboratorio microbiológico e incluyen requerimientos de filtración de aire como se discutió anteriormente y la esterilización del agua y de los suministros del suelo (tanto en la entrada como en la salida del laboratorio de cuarentena), típicamente en autoclave, antes de descargarlos dentro del área. El personal debe tomar un baño antes de dejar el laboratorio, dejando sus prendas de trabajo en el interior del laboratorio de cuarentena.

MANEJO DE COLONIAS DE HOSPEDEROS Y DE ENEMIGOS NATURALES

El establecimiento de candidatos a enemigos naturales y sus plantas hospederas u hospederos necesarios para los cultivos de laboratorio, libres de contaminación, es un objetivo primordial de las operaciones de cuarentena. Algunas colonias en cuarentena, particularmente las mantenidas en plantas, pueden ser infestadas por artrópodos plaga, como áfidos, moscas blancas, trips, piojos harinosos y ácaros. El control de estos organismos debe ser efectuado con cuidado y un objetivo particular debe ser evitar el uso de plaguicidas donde

sea posible. Si es posible, las plantas usadas para la propagación de enemigos naturales (o sus hospederos) deben ser desarrolladas desde semilla en un invernadero de cuarentena. Si se usan plantas compradas o recolectadas en campo (como las especies leñosas necesarias en algunos proyectos de escamas), deberían de ser tratadas con un plaguicida no residual y colocadas en un área separada para verificar que están libres de plagas antes de usarlas. Los requerimientos para la persistencia de los plaguicidas y la selectividad, dependerá de que plaga deba eliminarse y cuales enemigos naturales deban ser criados. La liberación de enemigos naturales comerciales, como los ácaros depredadores para controlar a otros ácaros o a trips, pueden ser de utilidad cuando los plaguicidas no puedan ser usados. Sin embargo, las plantas donde se usaron depredadores generalistas deberían ser cuidadosamente revisadas y ser eliminados, antes de colocarlas en las colonias.

Las colonias en cuarentena también pueden estar sujetas a la infestación por parasitoides (para los enemigos naturales fitófagos), hiperparasitoides, parásitos (tales como ácaros o nemátodos) y por patógenos. Puede ocurrir la contaminación cruzada entre colonias (especialmente de parasitoides) que son criadas en cuarentena. El cuidado por el personal de cuarentena es crítico en la identificación oportuna de esos problemas, aislando los cultivos afectados y eliminando los organismos no deseados. La codificación molecular de barras del material parental, al tiempo de la importación, puede ser usada para asegurar que las generaciones subsecuentes de la colonia permanezcan puras (Goolsby *et al.*, 1998). La eliminación de patógenos de las colonias de artrópodos está basada en una mezcla de la destrucción de los materiales infectados, junto con la esterilización y el cambio frecuente de los recipientes (Etzel *et al.*, 1981). La esterilización de la superficie de los huevos, por ejemplo, puede ser exitosa también al desinfectarlos brevemente en una solución blanqueadora (solución de hipoclorito de sodio) en agua (Briese y Milner, 1986).

La protección de la contaminación a las líneas de patógenos importados requiere de un sitio adecuado para el aislamiento de los cultivos microbiales. Si los microbios son cultivados en medios artificiales, el aislamiento puede realizarse manteniendo los cultivos en recipientes sellados, en diferentes cámaras de crecimiento o en diferentes cuartos. Si los cultivos son mantenidos en hospederos vivos, debe tenerse en cuenta el mantenimiento del material hospedero no infectado (plantas o artrópodos), en el exterior del laboratorio de cuarentena. Cuando biotipos particulares de patógenos o artrópodos están siendo estudiados, las herramientas para identificación de cepas confiablemente deben estar disponibles, ya sea usando marcadores moleculares (ver el Capítulo 15) u otros métodos. Los especímenes representativos deben ser mantenidos en almacenamiento criogénico para su comparación con las introducciones posteriores, para su recuperación o para evaluar líneas aisladas para determinar si deriva genética o contaminación han ocurrido.

Antes de que se apruebe la liberación de los enemigos naturales de cuarentena, debe demostrarse la especificidad adecuada sobre el hospedero para indicar la seguridad para la biota del país donde será liberado. La información de las solicitudes de liberación puede venir de varias fuentes (registros de literatura, inspecciones de campo en la región de origen y pruebas del rango de hospederos). Las colonias de los enemigos naturales criados en cuarentena son usadas para llevar a cabo pruebas de rango de hospederos en laboratorio, mientras que el agente está todavía en cuarentena. El Capítulo 17 incluye una discusión de cómo conducir estas pruebas. Las preocupaciones que el laboratorio de

cuarentena debe resolver son (1) cómo criar los candidatos a enemigos naturales en cantidades suficientes por muchas generaciones, (2) cómo asegurarse que las colonias retengan su integridad (libres de contaminantes o invasiones de especies similares), y (3) cómo retener las características genéticas de la cepa original, sin selección para su adaptación a las condiciones de laboratorio.

DESARROLLO DE SOLICITUDES PARA LA LIBERACIÓN EN EL MEDIO AMBIENTE

AGENTES DE BIOCONTROL DE MALEZAS

Para solicitar la liberación de nuevos agentes que se alimentan en plantas, debe seguirse un proceso formal en los Estados Unidos y en otros países desarrollados involucrados en el control biológico de malezas. Una vez que las colonias del agente de control de malezas han sido establecidas en el laboratorio de cuarentena, empiezan las interacciones con un comité de gobierno encargado de la supervisión del desarrollo y evaluación de los datos del rango de hospederos y de la evaluación del riesgo/beneficio resultante. Este comité revisor conformado por representantes de varias agencias (Grupo Asesor Técnico – GAT) debe aprobar la lista de otras especies (distintas a la maleza problema) que van a ser incluidas en las pruebas de rango de hospederos, para asegurar que esté completa. Los resultados, cuando estén disponibles, deben ser enviados al GAT junto con un análisis. Si el GAT está de acuerdo con que no es probable que el agente represente un peligro significativo para las plantas nativas, este pasa su recomendación a APHIS (o a las agencias reguladoras similares en otros países) para que los nuevos agentes de control sean aprobados para su liberación. El grado de aceptación de la extensión del rango de hospederos para un nuevo agente no es fijo, puede variar de un programa a otro, aún cuando sean las mismas especies de maleza a eliminar o de enemigos naturales, dependiendo de las circunstancias en el área de liberación. Generalmente, los enemigos naturales son aceptados para liberación si no ponen en riesgo a las especies valiosas o deseables, ya sea en el sitio de liberación o en áreas dentro de la dispersión natural probable del agente de control. Sin embargo, la alimentación incidental sobre otras plantas usualmente no es un impedimento prohibitivo para su liberación y las especies de enemigos naturales no necesitan ser estrictamente monófagas para ser aceptables.

AGENTES DE BIOCONTROL DE ARTRÓPODOS PLAGA

Para los insectos parásitos y depredadores, algunos países (Nueva Zelanda, Australia) tienen requerimientos legales formales que exigen las pruebas del rango de hospederos y estipulan un procedimiento a cumplir. Los Estados Unidos, sin embargo, no tiene tales requerimientos hasta la fecha. En su lugar, el proceso ocurre en dos pasos: primero debe solicitarse al USDA-APHIS-PPQ tomar una decisión de que la especie a ser liberada no es una plaga de plantas en el contexto de la ley. Generalmente, éste es el caso para la mayoría de los insectos depredadores y parásitos. Segundo, en los Estados Unidos una

Evaluación Ambiental (EA) es escrita por el investigador que solicita la liberación, describiendo el rango de hospederos del agente, en relación con los insectos nativos del área de liberación (a menos que tal evaluación ya exista, como es el caso de ciertos géneros que son usados comúnmente en el control biológico de insectos). La Evaluación Ambiental proporciona también un análisis de las consecuencias riesgo/beneficio, en relación con la liberación propuesta. USDA-APHIS envía la solicitud de liberación al panel de control biológico de la Organización Norteamericana de Protección a las Plantas (NAPPO, por sus siglas en inglés) para su revisión y recomendación. La revisión de la NAPPO es enviada a revisores anónimos y se pasa una recomendación al USDA-APHIS. Las solicitudes para la liberación de agentes de control en Canadá o en México, también son enviadas a la NAPPO y las recomendaciones son enviadas a los representantes de los tres países. Si una revisión de esta evaluación emite un juicio de impacto no significativo, la liberación puede proceder.

BALANCEAR LOS RIESGOS Y LOS BENEFICIOS ESTIMADOS

Cuando se evalúa la conveniencia de un enemigo natural candidato para su liberación en el medio ambiente, el riesgo de ataque a otras especies debe ser comparado con el daño esperado al ambiente si la plaga permanece sin control. Esto se realiza usando primero la estimación del rango de hospederos del agente de control y el conocimiento de la fauna o flora local, para estimar el grado de riesgo que podría acarrear una introducción. Entonces se compara con los beneficios económicos o ecológicos que se están buscando. Esta comparación permite a los científicos del proyecto describir los beneficios probables: la proporción del costo para las introducciones propuestas. La meta es solamente introducir los agentes cuando exista una necesidad real para que la plaga sea suprimida y cuando el agente parezca razonablemente específico. Pero, en último paso, juiciosa decisión acerca de los riesgos estimados y los beneficios proyectados llega a ser una decisión política tomada en nombre de la comunidad por su gobierno. Este proceso debería ser un proceso abierto que solicite la participación pública y actúe con la consulta continua a los biólogos conservacionistas.

CAPÍTULO 14: SIMILITUD CLIMÁTICA

Una herramienta importante en los proyectos de control biológico clásico es la similitud del clima entre las áreas invadidas y el rango nativo de las especies invasivas o de otras áreas de colecta de enemigos naturales. Esto permite que la investigación para los enemigos naturales sea dirigida hacia áreas con la mejor similitud climática, lo cual debería producir enemigos naturales con la mejor oportunidad de establecimiento en el país receptor, después de la liberación (Bartlett y van den Bosch, 1964; González y Gilstrap, 1992; Hoelmer y Kirk, 2005). Esta es una herramienta que debe ser usada durante la planeación inicial de un proyecto para guiar las actividades de exploración.

Para establecer poblaciones viables, los insectos requieren de condiciones climáticas adecuadas para su reproducción y desarrollo. La temperatura, en particular, es uno de los factores climáticos claves que afecta el establecimiento y la dispersión, junto con la cantidad de lluvia, los patrones de precipitación, la humedad y el pH del suelo, y el fotoperíodo. Los agentes establecidos exitosamente deben resistir los extremos climáticos locales (por ejemplo, excesivo frío o humedad) y explotar las condiciones intermedias favorables para el desarrollo y el crecimiento de la población.

Con esto en mente, el capítulo tiene tres objetivos:

- (1) Buscar la aplicación de la *similitud climática* entre la zona donante de enemigos naturales o de la plaga (p. ej., de donde son los organismos) y la del rango de distribución planeado para su recepción (donde ellos han invadido o van a ser liberados) para determinar donde en la zona donante sería la mejor parte para buscar enemigos naturales bien adaptados.
- (2) Discutir el uso de *modelos inductivos* para inferir el clima del rango de origen de una especie (a) si podría dispersarse a cualquier área dada de interés, (b) si una población establecida es probable que se disperse mas, y (c) si es así, si las expansiones del rango de distribución serán temporales o permanentes. El potencial de dispersión y establecimiento de poblaciones permanentes de plagas es de especial interés porque tiene implicaciones sobre cómo pudiesen ser manejados los riesgos de las introducciones de enemigos naturales para otras especies nativas diferentes a las que se piensan controlar. Tales predicciones traen un mejor énfasis sobre qué otras especies pudiesen estar en contacto con los enemigos naturales introducidos conforme la plaga se disperse, conociendo que los enemigos naturales introducidos están también adaptados al clima de las áreas en las cuales la plaga se está dispersando.
- (3) Ilustrar el uso de los datos climáticos en *modelos deductivos*, que consisten en la aplicación de las estadísticas demográficas de población derivadas de laboratorio y la estimación de los

días-grado para el desarrollo de los enemigos naturales. Programas computacionales son entonces configurados apropiadamente con datos de las estaciones climáticas pertinentes para proporcionar estimaciones de la fuerza de crecimiento de la población del enemigo natural en áreas donde se espera la dispersión, para determinar dónde es probable la incursión, y qué intensidad de impacto esperada pudiese tener sobre las poblaciones plaga.

SIMILITUD CLIMÁTICA

La similitud climática puede incrementar la posibilidad de selección de los agentes más apropiados, antes de conducir una exploración costosa en el extranjero en un vasto rango de distribución de origen y antes de empezar las importaciones y dispendiosas evaluaciones de seguridad de agentes de control que no pueden estar bien coordinados climáticamente, pueden incrementar la posibilidad de seleccionar agentes más apropiados (Goolsby *et al.*, 2005a; Hoelmer y Kirk, 2005). Tal enfoque del área de búsqueda, a través de la similitud climática, a menudo es necesario porque muchas plagas tienen rangos geográficos extremadamente extensos, los cuales incluye muchas zonas ecológicas y climáticas. (Es conveniente indicar, sin embargo, que las plagas dañinas en su rango nativo tendrán rangos más grandes y mejor conocidos, mientras que las especies que no son plagas en sus rangos nativos tendrán distribuciones pobremente conocidas, quizá rangos falsamente más pequeños). Para estrechar el rango conocido de una plaga hacia una región de tamaño manejable, donde los enemigos naturales investigados puedan ser buscados, puede ser útil determinar primero cuáles partes del rango de origen de la plaga corresponden mejor al rango invadido, donde los enemigos naturales liberados son deseados.

Se presume que una similitud climática errónea entre las áreas muestreadas en el rango de origen y el rango de introducción es un factor limitante del establecimiento y del impacto de los enemigos naturales, y ha sido probablemente la causa del fracaso en algunos programas de control biológico (Bartlett y van den Bosch, 1964; Beirne, 1975). Por ejemplo, los enemigos naturales de la hierba de San Juan (*Hypericum perforatum* L.) liberados en Australia, fueron colectados inicialmente en Inglaterra en los años 1920s y 1930s. Solamente uno de los cinco agentes de Inglaterra se estableció en Australia. En contraste, cinco de los seis agentes colectados posteriormente en el sur de Francia, en áreas con un clima mediterráneo más parecido al del sitio de liberación y se establecieron, incluyendo al agente más exitoso, el crisomélido *Chrysolina quadrigemina* (Suffrian). Éste es uno de los primeros ejemplos donde las tasas de establecimiento de enemigos naturales se mejoraron a través de la búsqueda cuidadosa del clima correspondiente entre el rango de origen y el rango donde se planeó la introducción (Syrett *et al.*, 2000).

La determinación de que tan similares son las condiciones entre las localidades seleccionadas en el rango de origen y el rango de introducción puede ser hecha usando programas de correspondencia climática (e.g., CLIMEX, bioSIM, BIOCLIM, DOMAIN, y HABITAT [Baker, 2002]). Esos programas han sido desarrollados para identificar y realizar mapas de áreas del mundo con climas similares, usando los registros históricos del clima de numerosas localidades a través del mundo. Los programas permiten sopesar factores ambientales específicos (por ejemplo, la precipitación y la temperatura) si se desea cuando se calcula el grado

de similitud climática y cuando se trazan distribuciones potenciales de las especies. Alternativamente, los programas de computador pueden ser usados para relacionar los datos del clima con la información sobre cómo puede afectar el clima la fenología o distribución de una especie dada (por ejemplo, reacciones al estrés por calor o estrés al frío-humedad, etc.) (Hoddle, 2004a; Hoelmer y Kirk, 2005). CLIMEX es un programa usado comúnmente para estos tipos de análisis y fue diseñado pensando en su aplicación al control biológico (Sutherst y Maywald, 1985; Sutherst *et al.*, 2004). CLIMEX será usado para ilustrar puntos importantes en este capítulo, cuando sea relevante.

La interpretación de los resultados de CLIMEX está basada en mapas producidos por el programa. Los puntos en los mapas resultantes pueden ser colocados para representar una variedad de posibles variables climáticas (por ejemplo, temperatura promedio, temperatura máxima promedio, humedad relativa, etc. o un índice producido por una combinación de esas y otras variables). Mientras más grande sea el punto en una localidad específica, será mejor el promedio de condiciones climáticas prevalecientes en esa localidad para la especie de interés (**Figura 14-1**).

Un análisis retrospectivo de la correspondencia climática para los afelínidos parasíticos liberados en Estados Unidos para el control biológico de la mosca blanca *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring (Hemiptera: Aleyrodidae), demuestra la importancia de la similitud climática como un indicador para predecir el establecimiento de las especies (Goolsby *et al.*, 2005a). El porcentaje de similitud climática entre las áreas puede ser determinado usando la función de “Correspondencia de climas” en CLIMEX. Esta función puede ser usada para comparar el promedio de las condiciones climáticas (por ejemplo, temperaturas máximas y mínimas, precipitación total, patrón de precipitación, humedad relativa, humedad del suelo y combinaciones de esos factores) en la zona de origen de los enemigos naturales con aquellos en la zona de introducción. El componente de los índices puede estar en un rango de 0 a 100, siendo 100 la correspondencia exacta entre las dos localidades para el parámetro de interés. En el estudio de Goolsby *et al.* (2005a), el promedio del valor del índice de similitud climática para el establecimiento de parasitoides en una nueva área fue aproximadamente 75%, mientras que para los parasitoides que fallaron en su establecimiento, el promedio fue de cerca de 67% (datos promediados de la Tabla 2 en Goolsby *et al.*, 2005a). Sin embargo, los altos índices de correspondencia climática no garantizan el establecimiento, y algunas especies de parasitoides con índices de similitud climática del 80% no se establecieron, indicando que otros factores diferentes al clima pueden ser muy importantes en el establecimiento, una vez que son identificados los agentes idóneos con buena tolerancia climática (Goolsby *et al.*, 2005a). El impacto en la plaga fue más grande cuando el enemigo natural con una similitud climática cercana exhibió un rango estrecho de hospederos y una tasa alta de ataque (Goolsby *et al.*, 2005a). Los resultados claros de esos análisis permitieron la recomendación de una especie parasítica específica, *Eretmocerus hayati* Zolnerowich & Rose (Hymenoptera: Aphelinidae) de Pakistán, escogida entre una lista larga de especies potenciales, como la prioridad de liberación en Australia para el control de *B. argentifolii* en áreas productoras de algodón (Goolsby *et al.*, 2005a). *Eretmocerus hayati* está ahora establecida en muchas localidades en Queensland, Australia y está dispersándose rápidamente (Goolsby, 2007).

La efectividad de la similitud climática en la predicción del establecimiento de razas de enemigos naturales, colectadas en diferentes localidades dentro del rango de origen, está



Figura 14-1. La función de CLIMEX “Correspondencia de climas” ilustra qué tan similares son los promedios climáticos en Auckland, Nueva Zelanda, a localidades en Norteamérica. El nivel de similitud es dado por el parámetro del “Índice de correspondencia”, el cual es un promedio de hasta siete índices que lo componen, incluyendo las temperaturas máximas y mínimas, precipitación (cantidad y estacionalidad), humedad relativa y humedad del suelo. Mientras más grande es el punto negro en el mapa, será más cercana la correspondencia climática entre Auckland y las localidades en Norteamérica. La elipse delinea el rango de origen de una plaga hipotética nativa de Norteamérica y que se ha establecido en Auckland. CLIMEX sugiere que el promedio anual alrededor de las condiciones climáticas en el rango de origen de la plaga que son más similares a Auckland, están en el oeste y suroeste de las áreas costeras del rango conocido y que la exploración en el extranjero para buscar enemigos climáticamente preadaptados para su liberación potencial en Nueva Zelanda, debería ser iniciado ahí y no en los extremos norteros del rango, donde los puntos son más pequeños. Los ejercicios de la correspondencia climática de esta naturaleza pueden tener importante utilidad práctica para la exploración en el extranjero y para la selección de enemigos naturales (mapa dibujado por M. Hoddle).

siendo evaluada retrospectivamente con técnicas moleculares (Iline y Phillips, 2004). En algunas instancias, la similitud climática de un área dentro del rango de origen de un enemigo natural no ha previsto correctamente el desempeño de los enemigos naturales, en la zona de introducción, donde el clima era similar. Cuando estos fracasos ocurren, puede ser de utilidad investigar otros factores desfavorables a los enemigos naturales. Algunos factores que podrían evitar el establecimiento de enemigos naturales de sitios climáticamente similares, incluyen el ataque por depredadores generalistas como las hormigas, la carencia de diversidad genética (en especies uniparentales) necesaria para la adaptación post-liberación, endogamia por largo tiempo en el laboratorio antes de su liberación, y las fluctuaciones en la humedad relativa (van Klinken *et al.*, 2003).

El uso de un proceso basado científicamente para escoger especies de enemigos naturales de artrópodos para la discriminación preliminar del rango de hospederos es importante, porque (1) las pruebas de especificidad de hospederos en cuarentena consumen tiempo, son difíciles y costosas. La categorización de los enemigos naturales candidatos puede apresurar las evaluaciones y reducir la dependencia en la liberación de números mayores de especies, de las que se conoce menos. Se ahorra dinero y puede incrementarse la tasa de éxito para el control biológico, en términos de establecimiento y de impacto; y (2) la acumulación de aplicaciones exitosas de esas técnicas apoya el desarrollo de la teoría del control biológico.

MODELOS INDUCTIVOS: PREDICCIÓN DEL ÉXITO EN LA DISPERSIÓN Y LA INCURSIÓN

En muchas instancias, hay poca información detallada disponible sobre la respuesta climática o la biología reproductiva y de desarrollo a varias temperaturas de la plaga a controlar o de sus enemigos naturales. A pesar de este impedimento, es posible hacer estimaciones acertadas de cómo un organismo responderá al promedio de las condiciones climáticas prevaletentes en una nueva área, a través de la aplicación de modelos inductivos, también referidos como modelos inversos o inferenciales (Sutherst y Maywald, 2005). Esto es efectuado al inferir las respuestas de un organismo a condiciones climáticas basadas sobre su distribución en el rango de origen y al extrapolar esas respuestas a la zona invadida. Puede ser hecho en forma muy simple en CLIMEX; una plantilla climática del rango de origen es escogida de un menú por defecto (por ejemplo, un clima subtropical o mediterráneo), el cual es más representativo de las condiciones climáticas en el rango de origen. Los parámetros climáticos que afectan las respuestas de los organismos y que definen la plantilla elegida son “ajustados” hasta que los mapas de distribución resultantes en su mayoría se asemejan más cercanamente al rango conocido de origen de la plaga o del enemigo natural. Se asume que los ajustes de parámetros que definen las respuestas climáticas del organismo de interés, son entonces estimaciones cercanas a los parámetros reales que afectan su distribución. CLIMEX y otros programas no incluyen el conocimiento del impacto de la disponibilidad de la planta hospedera, la competencia interespecífica, la actividad de los enemigos naturales, etc, sobre la distribución de las especies en su rango de origen. Los programas con los modelos solamente usan datos de estaciones climáticas para describir la distribución resultante de los organismos de interés. Consecuentemente, se asume que las condiciones climáticas son responsables principalmente de la distribución observada que define el rango de origen.

La chicharrita de alas cristalinas, *Homalodisca coagulata* (Say) (Hemiptera: Cicadellidae) es una plaga importante en California (EU) por ser vectora de la bacteria patógena, *Xylella fastidiosa* Wells *et al.*, la cual mata una variedad de especies ornamentales y agrícolas (por ejemplo, uvas y almendras) al obstruir el xilema e impedir la conducción del agua. Esta plaga es nativa del sureste de los Estados Unidos y el noreste de México e invadió California a finales de los años 1980's. Después de un substancial período de tiempo, las poblaciones de *H. coagulata* aumentaron demasiado y la plaga empezó a moverse rápidamente desde el sur de California hacia el norte, causando un daño substancial económico por el vector *X. fastidiosa* en los viñedos. Aunque ninguna información sobre el efecto de diferentes temperaturas

sobre la biología de desarrollo y reproductiva están disponibles, el modelo de inferencia fue conducido para tratar de definir los límites climáticos de *H. coagulata* en su rango de origen conocido (**Figura 14-2**) y después este modelo fue aplicado para determinar su nuevo rango potencial en California y globalmente (**Figura 14-3**). Esta plaga subsecuentemente ha invadido la Polinesia Francesa, Hawaii y la Isla Easter, tal como lo predijo el modelo deductivo (Hoddle, 2004a). Tal enfoque ayuda a alertar a los practicantes de control biológico del posible rango geográfico de los enemigos naturales que podría requerirse para operar, y también proporciona sugerencias acerca de otras áreas donde la plaga puede ocurrir naturalmente pero que no se habían registrado. Por ejemplo, la Península de Yucatán y el Caribe pueden producir poblaciones de *H. coagulata* con complejos de parasitoides desconocidos que podrían ser de utilidad en proyectos de control biológico contra la plaga.

Ya que los datos de respuesta climática típicamente no existen para muchas plagas importantes (y sus enemigos naturales), hay necesidad de incrementar el uso de modelos inductivos para estimar los riesgos que presentan dichas plagas. Tales predicciones de los modelos pueden proporcionar estimaciones generales de riesgos de esas plagas que podrían establecerse y entonces amenazar a las empresas agrícolas o a la naturaleza en varias áreas bajo climas actuales y potenciales (por ejemplo, cambios debido al calentamiento global) (Sutherst y Maywald, 2005). El modelo inductivo ha sido usado para valorar el riesgo de varios insectos plaga exóticos que invaden nuevas áreas (MacLeod *et al.*, 2002; Vera *et al.*, 2002; Hoddle, 2004a; Sutherst y Maywald, 2005;), la dispersión global de enfermedades de plantas importantes (Paul *et al.*, 2005), la valoración del riesgo para el establecimiento y el rango de expansión de ácaros depredadores transgénicos (McDermott y Hoy, 1997), el rango esperado de enemigos naturales de malezas en áreas introducidas (Mo *et al.*, 2000), y los factores climáticos y edáficos que limitan la dispersión de ácaros plaga del suelo (Robinson y Hoffmann, 2002). Con un número siempre en incremento de las publicaciones que usan programas de modelos del clima, especialmente CLIMEX, para investigar las hipótesis relacionadas al clima acerca de la dispersión e impacto de la plaga y los enemigos naturales, está siendo recomendada la colaboración global y el compartir información a través de comunidades de investigación internacional vía Internet (Sutherst *et al.*, 2000).

MODELOS DEDUCTIVOS: PREDICCIÓN DEL ÉXITO EN LA DISPERSIÓN Y LA INCURSIÓN

La predicción precisa de la capacidad de un insecto para acumular suficientes días-grado para completar el desarrollo y empezar la reproducción en una nueva área, puede indicar qué tan vulnerable es esa región a la invasión por un organismo exótico (Sutherst, 2000; Baker, 2002) y si la incursión será temporal, debido a condiciones desfavorables por períodos prolongados (Jarvis y Baker, 2001; Hatherly *et al.*, 2005) o potencialmente permanente debido a condiciones favorables a través del año para el desarrollo y la reproducción (Sutherst, 2000; Baker, 2002). Consecuentemente, la sobrevivencia es influenciada no sólo por las temperaturas críticas (p. ej., umbrales superiores e inferiores de temperaturas letales) sino también por la magnitud de tiempo de la exposición. Todos los artrópodos mueren cuando son expuestos a períodos prolongados de excesivo calor, a menos que tengan adaptaciones únicas para tratar

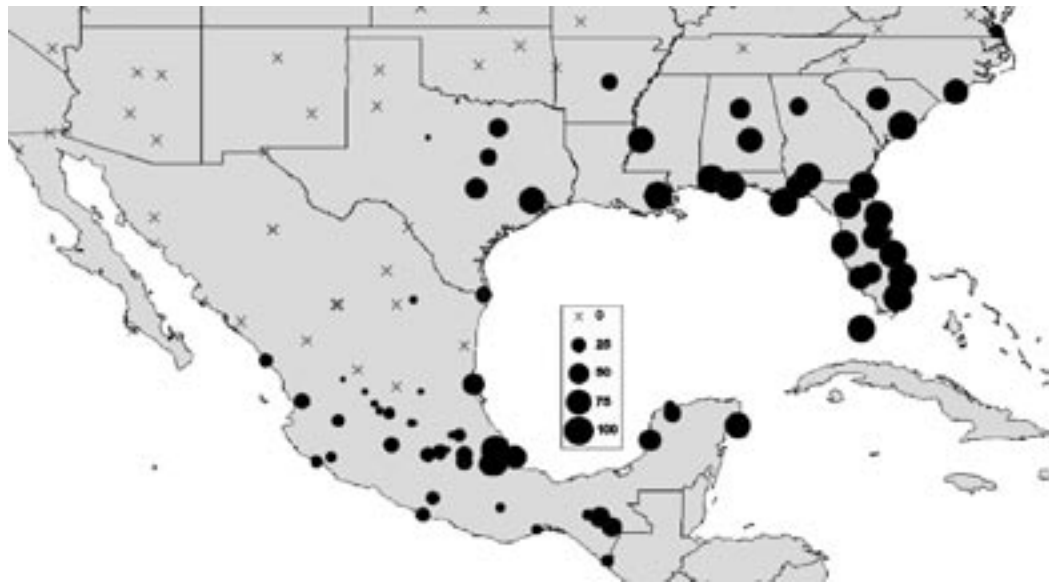


Figura 14-2. Mapa de la distribución de *Homalodisca coagulata* en su rango de origen generado en CLIMEX por un modelo inductivo. Los parámetros del modelo en la "plantilla templada" fueron interactivamente ajustados hasta que la distribución observada fue obtenida. Los puntos negros grandes indican una alta adecuación climática para *Homalodisca coagulata*. Las abreviaciones para los estados de los Estados Unidos son: AL = Alabama, AR = Arkansas, FL = Florida, GA = Georgia, LA = Louisiana, MS = Mississippi, NC = Carolina del Norte, SC = Carolina del Sur, TX = Texas y VA = Virginia. Para detalles completos sobre cómo fue preparado el modelo, ver Hoddle (2004a).

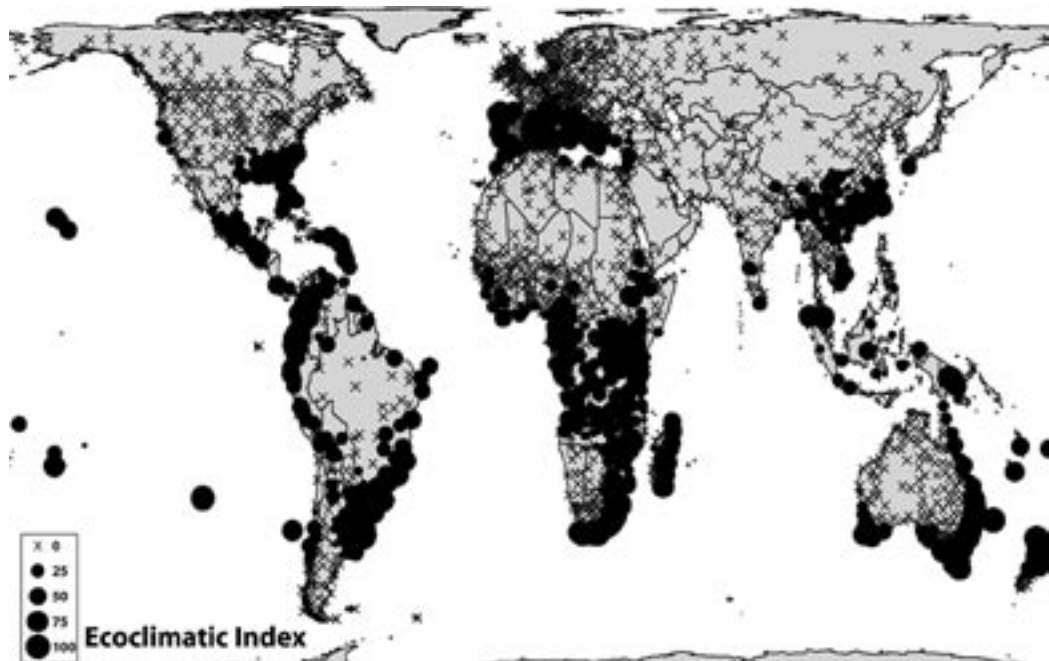


Figura 14-3. Distribución global predicha de *Homalodisca coagulata* a partir de un modelo inductivo. Las cruces indican áreas no adecuadas para *H. coagulata* y los puntos negros indican áreas de adecuación climática variable (Según Hoddle 2004a).

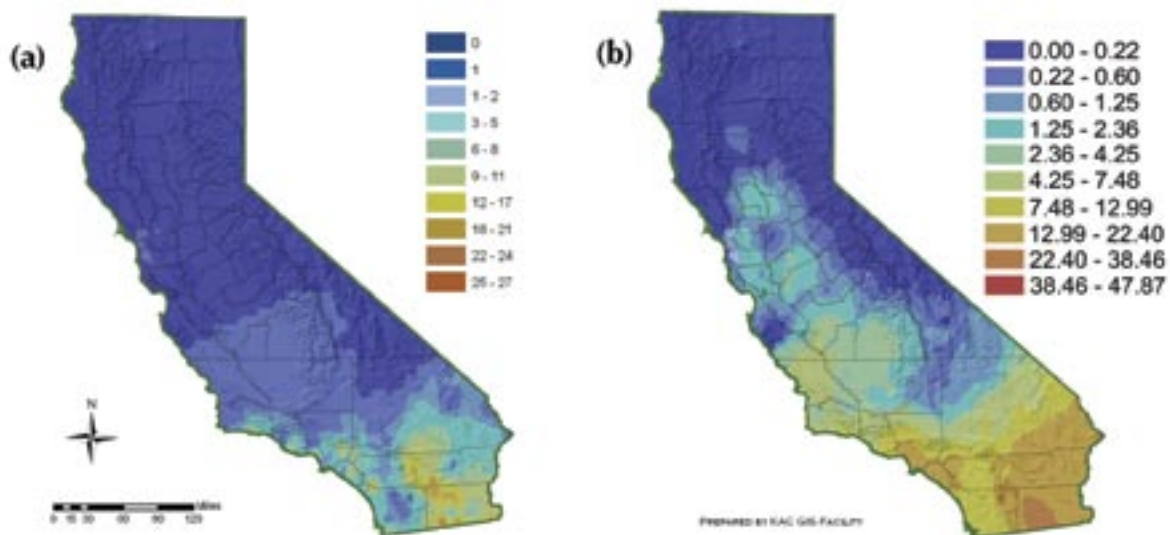
con ese estrés. Para ayudar a la predicción de la sobrevivencia en invierno en áreas inhabitadas, la mayoría de las investigaciones se ha enfocado a la capacidad de los insectos para sobrevivir a períodos prolongados de frío.

Dos parámetros que pueden predecir confiablemente la sobrevivencia del invierno cuando se usan en combinación son $LT_{Tiempo_{50}}$ y $LT_{Temperatura_{50}}$, la longitud del tiempo de exposición o la temperatura experimentada, respectivamente, en la cual el 50% de los insectos del experimento mueren (Leather *et al.*, 1993). La sobrevivencia al invierno de algunas especies de plagas, como trips, polillas y moscas blancas en el Reino Unido, se correlaciona cercanamente con la cantidad del tiempo que estos insectos están a -5°C (Bale y Walters, 2001). Estudios similares para agentes de control biológico, incluyendo chinches depredadoras, ácaros, coccinélidos y parasitoides de moscas blancas, han demostrado una fuerte correlación entre $LT_{Tiempo_{50}}$ en el laboratorio a 5°C y la sobrevivencia del invierno en el Reino Unido (Hatherly *et al.*, 2005). Esos tipos de datos para enemigos naturales pueden ser usados para valorar la invasión y el riesgo de establecimiento en nuevas áreas y puede ser un componente importante de los estudios de valoración del riesgo ambiental, antes de las liberaciones de enemigos naturales, donde el establecimiento permanente no es deseado (p. ej., en el control aumentativo) (Hatherly *et al.*, 2005). La utilidad de este trabajo ha sido demostrado por la investigación del ácaro fitoseido *Neoseiulus californicus* (McGregor). Esta es una especie disponible comercialmente que es usada en Europa y en otras regiones para el control de ácaros plaga en invernaderos y sus poblaciones establecidas inesperadamente en el exterior de ambientes protegidos (Hart *et al.*, 2002). Las especies tropicales o subtropicales que son incapaces de sobrevivir cortos períodos de exposición al frío, pueden sobrevivir en invernaderos u otros ambientes protegidos (por ejemplo, en arboretos). Algunos trips plaga (p. ej., *Thrips palmi* Karny y *Frankliniella occidentalis* Pergande) pueden pasar el invierno en invernaderos europeos. Esas fuentes de poblaciones pueden invadir los cultivos en campos al aire libre cada primavera y verano, y si las temperaturas son adecuadamente cálidas por un período suficientemente largo, puede resultar en el rápido desarrollo de la población, causando daño económico (Morse y Hoddle, 2006). Para plagas y enemigos naturales con diapausa obligatoria, el conocimiento de la temperatura y la longitud del día que señalan el comienzo y el final del estado de descanso es requerido para determinar con precisión cuándo los ciclos de vida empiezan y terminan en una área determinada.

Para que cualquier población de insectos sobreviva en una área, ésta no debe solamente ser capaz de tolerar los extremos prevalecientes de calor y frío sino también de acumular suficientes unidades térmicas para completar el desarrollo del inmaduro y funcionar adecuadamente como adulto. Para determinar si las temperaturas en una área dada permanecen arriba del umbral mínimo crítico lo suficientemente para ser capaces de completar el desarrollo, se necesita un número estimado de días-grado requeridos para la maduración. El modelo de días-grado está basado en observaciones empíricas sobre la tasa de desarrollo en relación con la temperatura y también en que durante la mayoría de esta relación ocurra una interacción lineal (Campbell *et al.*, 1974). Cuando la tolerancia a los extremos de frío y calor se aproxima, la relación se convierte en curvilínea (Lactin *et al.*, 1995). La aplicación de los resultados de los análisis de los días-grado derivados de temperaturas constantes está llena de dificultades cuando se valoran las condiciones reales del medio ambiente, donde se experimentan temperaturas fluctuantes impredecibles (Baker, 2002). Además de controlar el desarrollo, la

temperatura influye en otros procesos fisiológicos que son críticos para la sobrevivencia de las poblaciones de enemigos naturales. Por ejemplo, las temperaturas que permiten el desarrollo más rápido de los estados inmaduros de los parasitoides pueden resultar en la disminución de la tasa de sobrevivencia y en la reducción de la fecundidad de la progenie (Pilkington y Hoddle, 2006). La incorporación de datos más detallados (por ejemplo, los requerimientos de días-grado) en programas como CLIMEX, potencialmente puede contrarrestar predicciones inadecuadas acerca del establecimiento de los enemigos naturales y de su impacto, cuando son usados solamente los parámetros de similitud climática para estimar el éxito (van Klinken *et al.*, 2003).

A pesar de las desventajas potenciales de los modelos de días-grado, estos han sido muy útiles para determinar la fenología de la plaga y de los enemigos naturales en el campo, y para ayudar en las decisiones sobre dónde son necesarias las intervenciones para el control de plagas. En esta instancia, los datos de estaciones climáticas son usados para valorar la acumulación de los días grado para la plaga o para los enemigos naturales, y los programas están disponibles en el Internet para plagas específicas (UC-IPM, 2006). Sin embargo, las estaciones meteorológicas con frecuencia están dispersas, pueden no estar cercanas a los sistemas de cultivo, ser afectadas por efectos de microclimas no representativos o carecer de datos en suficientes años para un análisis significativo. Tales inconsistencias pueden ser aliviadas hasta cierto punto por la interpolación de datos de varias estaciones climáticas en la zona de interés. Los datos del clima interpolados pueden ser combinados con la fenología o con los modelos demográficos y ser analizados con programas de Sistemas de Información Geográfica (SIG) para generar mapas coloreados que muestren varias estimaciones de, por ejemplo, el número de generaciones en un área dada, o el resultado de la reproducción neta (Figuras 14-4).



Figuras 14-4a,b. Mapeo por Sistemas de Información Geográfica de las estimaciones estadísticas de la tabla de vida, tasa reproductiva neta (R_0) para los parasitoides de huevecillos de *Homalodisca coagulata* (a) *Gonatocerus ashmeadi* Girault y (b) *G. triguttatus* Girault en California, EU. R_0 y la temperatura fueron determinadas y modeladas en SIG, usando datos de 260 estaciones climáticas en California. Los resultados son sorprendentes: puede esperarse que *G. ashmeadi* se distribuya en la mayor parte de California y reproducirse anualmente, mientras que *G. triguttatus* puede estar severamente restringida a regiones localizadas del sur de California (mapas dibujados por M. Hoddle).

CONCLUSIONES

El clima es un factor muy importante que afecta el éxito del establecimiento y la reproducción de especies invasoras (p. ej., plagas y enemigos naturales introducidos deliberadamente) en nuevas áreas. Los practicantes de control biológico han estado de acuerdo en gran medida en que la similitud entre los climas de la región donante y la de introducción, debería ser cuidadosamente considerada y utilizada para elegir las áreas con mayor similitud para los prospectos de enemigos naturales. A pesar de la importancia tácita de la similitud del clima, muy pocas evaluaciones empíricas han sido conducidas para explorar explícitamente esta hipótesis básica. Sin embargo, esta situación parece estar cambiando y el número limitado de análisis retrospectivos que han sido efectuados, apoyan tentativamente la importancia de la correspondencia climática y el establecimiento e impacto del éxito de los enemigos naturales. Los modelos de computador, combinados con datos ecológicos de los enemigos naturales y de las plagas a controlar, son de gran ayuda en las investigaciones sobre la influencia del clima en el desarrollo de la población y la dispersión geográfica de los organismos. Debería recordarse que el clima no puede ser el único factor que afecta el establecimiento y dispersión de un organismo. La disponibilidad de los hospederos, los sitios para resguardarse del invierno, los competidores residentes y los enemigos naturales generalistas, por ejemplo, interactuarán todos con el clima en diferentes formas para afectar el éxito del establecimiento, la proliferación, la dispersión e impacto.

CAPÍTULO 15: HERRAMIENTAS MOLECULARES

RICHARD STOUTHAMER

El rápido desarrollo en la biología molecular ha permitido la disponibilidad de técnicas nuevas (**Figura 15-1**) para la caracterización genética de poblaciones de animales y plantas. La ecología molecular ha permitido muchos descubrimientos en la ecología y genética de poblaciones, de especies y de taxa superiores. Esas técnicas pueden ayudar a responder preguntas de importancia para los programas de control biológico. Por ejemplo, ¿En cuál área del rango nativo se originó una especie invasora? ¿Está la plaga parasitada por la especie de parasitoide A o B? ¿Son diferentes especies estas dos poblaciones de enemigos naturales que son morfológicamente similares?.

Hasta ahora, el impacto más grande de los métodos moleculares sobre control biológico, ha sido el aumento en la precisión sobre el reconocimiento de biotipos y especies. Muchos enemigos naturales son extremadamente pequeños, con un solo grupo de caracteres morfológicos limitados útiles para su identificación. La aplicación de técnicas moleculares ha simplificado sustancialmente la identificación de algunas de esas especies. Especies de enemigos naturales identificados incorrectamente han conducido al fracaso de algunos programas de control biológico (Gordh, 1977). Por ejemplo, la liberación aumentativa de especies de *Trichogramma* identificadas incorrectamente, en algunos casos ha permitido la reducción del control natural por especies residentes de *Trichogramma* (Stouthamer *et al.*, 2000).

Las secuencias de ADN son también extensivamente usadas como caracteres adicionales para determinar las relaciones filogenéticas entre diferentes taxa. Las filogenias bien determinadas de un enemigo natural y de la plaga a controlar pueden ser muy útiles en predecir las características de los ciclos de vida de especies relacionadas, y esto puede ayudar a la selección



Figura 15-1. Extracción de muestras para secuencias de ADN (Fotografía cortesía de M. Hoddle).

de los enemigos naturales más prometedores y con más especificidad sobre sus hospederos (Briese y Walker, 2002).

Otra aplicación de estos métodos es la determinación del área de origen de una población invasora. La delimitación de un área más pequeña, dentro de un vasto rango de origen, puede hacer posible la colecta de enemigos naturales que han co-evolucionado con la población invasora. Los enemigos naturales adaptados a la población plaga original pueden estar mejor sincronizadas con la plaga y, consecuentemente, controlar a la plaga más eficientemente en el nuevo sitio (Goolsby *et al.*, 2006b).

Este capítulo no intenta ser una revisión exhaustiva de los métodos moleculares que pueden ser usados en control biológico. En cambio, presenta un resumen de los marcadores moleculares más usados comúnmente, incluyendo una explicación de cada método, cómo podrían ser aplicados a un proyecto de control biológico, y cómo estas herramientas han sido usadas para responder interrogantes relacionados con el control biológico. En la segunda parte de este capítulo se incluye una revisión corta de las técnicas más apropiadas para responder un grupo de interrogantes que pueden ser relevantes para los proyectos de control biológico. La mayoría de los ejemplos son del control biológico de artrópodos, sin embargo, muchas de estas técnicas son aplicables similarmente al control biológico de malezas. Poca atención es dada en este capítulo a los métodos usados para analizar algunas de las aplicaciones más avanzadas de los marcadores moleculares. Esos análisis son críticos y frecuentemente son sólo aplicables si ciertas condiciones son encontradas; se aconseja a los nuevos estudiantes de este campo que lean cuidadosamente la literatura más reciente y, si es posible, consulten con genetistas poblacionales, antes de comprometerse a hacer un análisis de genética avanzada de poblaciones. Para los detalles técnicos acerca de las técnicas del ADN, ver Hoy (1994) o Hoelzel (1998). Para una revisión de los principios generales de la ecología molecular, consulte las publicaciones de Avise (2004), Beebe & Rowe (2004) y Freeland (2005).

TIPOS DE DATOS MOLECULARES

Los datos moleculares pueden ser clasificados de varias formas. (1) Los datos pueden ser secuencias de nucleótidos, fragmentos de ADN o proteína de varios pesos moleculares que formen bandas visibles en diferentes posiciones sobre geles apropiados. (2) El ADN usado en los análisis puede ser del núcleo, el cual representa la herencia de ambos padres en la mayoría de los casos, de organelos como las mitocondrias o los cloroplastos, heredados solamente a través de la línea materna o de endosimbiontes como *Wolbachia*, también heredados a través de la madre. (3) El material genético puede ser obtenido de fuentes de copias simples o múltiples. Por ejemplo, genes que codifican para ARN ribosomal están presentes como muchas copias en una célula. Tales genes multicopia tienen la ventaja que más plantillas de ADN están presentes en una célula y, consecuentemente, tales genes podrían ser más fáciles de amplificar en la Reacción de Polimerasa en Cadena (PCR por su sigla en inglés). Los genes de copia simple (una copia del gen por gameto) son generalmente genes que codifican por proteínas.

ANÁLISIS DE FRAGMENTOS

ISOZIMAS

Las isozimas son enzimas diferentes que catalizan tipos similares de reacciones en la célula. Frecuentemente, estas isozimas están relacionadas una con otra porque se originaron a través de la duplicación de genes. Para el propósito de este capítulo, el análisis de alozimas es el más relevante, donde las alozimas son las formas alélicas diferentes de las mismas enzimas de un locus codificador, incluyendo una isozima en particular. Durante los 1970's y 80's, el uso de marcadores de alozimas fue común. Dos métodos son usados para separar diferentes alozimas: (1) electroforesis por geles y (2) el enfoque isoeléctrico. En la electroforesis por geles, las diferentes alozimas son separadas al atravesar un gel. La velocidad del movimiento de las alozimas es determinada por el tamaño de la proteína y la forma en que está doblada. En un enfoque isoeléctrico, un gradiente de puntos isoeléctrico es creado en una solución neutralizante encima de una membrana. Cada alozima variante se acumulará en la posición de su punto isoeléctrico (por ejemplo, la posición en el gel en la cual la proteína no tiene carga eléctrica neta) entre el gradiente. Una vez que las enzimas han sido separadas se hacen visibles al usar tinciones indicadoras. Estas tinciones cambiarán de color en presencia de los sustratos apropiados y los cofactores para la enzima de la isozima particular.

¿CÓMO ENCONTRAR ALOZIMAS PARA ANÁLISIS?

Un gran número de diferentes isozimas están presentes en los insectos. Para encontrar las isozimas que muestran el nivel apropiado de variación muchas isozimas diferentes deben ser probadas. Una revisión de recetas y técnicas para muchas de las diferentes isozimas es dada por Richardson *et al.* (1986). Para la aplicación de electroforesis de enzimas, los especímenes necesitan haber sido preservados en forma tal que sus proteínas no hayan sido degradadas. Esto significa que se usen individuos recién muertos o que los especímenes necesitan haber sido congelados rápidamente después de haber muerto. Los individuos son entonces homogenizados en una solución neutralizante y la solución resultante se pone en un gel para electroforesis de almidones o se coloca encima de una membrana, si se usa el enfoque isoeléctrico. Los detalles de esos métodos pueden ser encontrados en Unruh *et al.* (1983) y Kazmer (1991). La electroforesis de enzimas, tal como se describió anteriormente en breve, ya no es usada mucho para estudios de población, habiendo sido sustituida por los métodos moleculares basados en PCR. Los métodos PCR han probado ser más prácticos, principalmente por la facilidad con la cual el ADN puede ser preservado para análisis posteriores (por ejemplo, especímenes colectados en el campo se pueden matar y preservar en alcohol al 95-100% y mantener en frío). Aún cuando las técnicas de electroforesis de proteínas tenían algunas desventajas comparadas con los estudios basados en PCR, las alozimas tienen una ventaja importante en que el mismo protocolo puede ser usado para determinar la composición genética de muchas especies diferentes.

¿PARA QUÉ SON USADAS LAS ALOZIMAS EN EL CONTROL BIOLÓGICO?

La electroforesis de alozimas puede ser usada para el reconocimiento de especies o biotipos, los estudios de genética de poblaciones, el análisis del contenido intestinal de los depredadores para determinar cuál especie de presa ha sido consumida, o para determinar si están parasitados insectos hospederos particulares.

EJEMPLOS DE ALOZIMAS QUE ESTÁN SIENDO USADAS EN CONTROL BIOLÓGICO.

Unruh *et al* (1983) usaron electroforesis de gel de almidón para demostrar los efectos de la cría masiva prolongada en la variación genética de los enemigos naturales usados para el control biológico. Como un sistema modelo, examinaron crías de laboratorio de *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera: Braconidae) y, basándose en la disminución en la heterocigosidad como se midió en la electroforesis de gel de almidones, concluyeron que aún en colonias donde 100 hembras fueron usadas para la cría en cada generación, cuatro de los ocho loci que inicialmente tenían dos alelos, quedaron fijos por una u otra de las formas alélicas. Mientras más pequeño era el número de hembras usado en cada generación, más rápido se perdía la diversidad alélica, sugiriendo que la calidad y diversidad genética de los enemigos naturales producidos en generaciones sucesivas estaban siendo reducidas, a pesar de los intentos por disminuir los efectos adversos causados por la endogamia.

Kazmer y Luck (1995) usaron alozimas manipuladas por enfoque isoeléctrico como marcadores para medir experimentalmente el efecto del tamaño del parasitoides en la capacidad de encontrar a su hospedero en el campo. El parasitoides de huevecillos *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) fue usado como la especie de enemigo natural experimental. El tamaño de esos parasitoides es principalmente determinado por el tamaño del hospedero en la cría (por ejemplo, el huevo en el que se desarrollaron). Los parasitoides criados en huevecillos de *Sitotroga* son más pequeños mientras que los criados en huevecillos más grandes de *Heliothis*, son sustancialmente más grandes y presumiblemente más aptos. Kazmer y Luck (1995) determinaron primero la composición genética de la población de *T. pretiosum* ya presente en el campo y encontraron dos alelos de la enzima fosfoglucomutasa (PGM por su sigla en inglés). En los cultivos de laboratorio de *T. pretiosum*, dos variantes adicionales de la fosfoglucomutasa (A y B) estuvieron presentes. Esas dos variantes de alozimas fueron cruzadas en una línea colectada en campos de tomate, donde los autores llevaron a cabo los estudios de *T. Pretiosum*. Por medio de repetidos retrocruzamientos dos nuevas líneas de *T. pretiosum* fueron creadas las cuales fueron casi idénticas genéticamente a la línea de campo de tomate, excepto que una línea fue homocigota para la alozima PGM-A y la otra línea para la alozima PGM-B. Enseguida, los individuos de estas líneas marcadas fueron liberados juntos en el campo, comparando los individuos pequeños PGM-A con los individuos grandes PGM-B o viceversa. El desempeño relativo de avispas grandes contra avispas pequeñas podría entonces ser directamente probado determinando cuántos de los huevos del hospedero colocados artificialmente que fueron parasitados, resultaron en crías que contenían cualquier marcador, lo cual indicaba si la madre era una avispa grande o una pequeña. Ka-

zmer y Luck (1995) demostraron que las avispas más grandes de *T. pretiosum* fueron más eficientes encontrando los huevecillos del hospedero en el campo, confirmando que el tamaño del parasitoide es un buen indicador de su vigor.

En algunos estudios, las alozimas han sido usadas como marcadores para distinguir especies o subpoblaciones de insectos diminutos (Pintureau, 1990, 1993; Pinto *et al.*, 1992; Ram *et al.*, 1995; Burks y Pinto, 2002; Iline y Phillips, 2004). Las alozimas han sido también estudiadas para determinar la identidad del alimento consumido por varios depredadores (Vennila y Easwaramoorthy, 1997; Greenstone, 1999; Harwood Y Obrycki, 2005). Finalmente, los marcadores de alozimas han sido usados para determinar la presencia de larvas inmaduras de mimáridos parasíticos en el interior de los huevecillos de la chicharrita de alas cristalinas, *Homalodisca coagulata* (Say) (Hemiptera: Cicadellidae) (Byrne y Toscano, 2006).

MARCADORES RAPDs

¿QUÉ SON LOS RAPDs?

Los RAPDs (ADN polimórfico amplificado aleatoriamente, por su sigla en inglés) son marcadores que pueden ser obtenidos por PCR usando iniciadores RAPD. Los iniciadores RAPD generalmente son de sólo 10 bp (pares de bases) de largo (en reacciones PCR “normales”, tienen alrededor de 20-30 pb de largo) y por reacción PCR sólo un iniciador RAPD es usado, el cual funciona tanto como el iniciador hacia adelante y de reversa. Ya que el iniciador es de sólo 10 pb de largo, puede haber muchos lugares en el genoma de un organismo en donde puede fijarse. El PCR RAPD solamente dará un producto PCR si los dos lugares de fijación (uno por la cadena hacia adelante y otra por la cadena de reversa del ADN) en el genoma, están lo suficientemente cerca para que puede ser polimerizado, dentro de un ciclo de PCR en la sección de ADN, entre los dos iniciadores. Toma tiempo para que la enzima polimerasa lea y copie el ADN. Si los dos sitios donde se fijan los iniciadores están lejos el uno del otro, la polimerasa puede no ser capaz de copiar la longitud completa del ADN entre los dos iniciadores. Por ejemplo, si los dos sitios donde se fijan los iniciadores, uno sobre la cadena hacia adelante y el otro sobre la cadena de reversa, están menos de 2,000 pares de bases alejados uno de otro, es seguro que sea formado un producto PCR. Pero si la distancia es de 10,000 pares de bases ninguna amplificación exponencial de las 10,000 pares de bases tomará lugar. Los RAPDs son marcadores dominantes, queriendo decir que el marcador está o no está presente. Consecuentemente, los individuos que son homocigotos o heterocigotos para el marcador serán indistinguibles uno del otro.

¿CÓMO ENCONTRAR RAPDs?

Los iniciadores RAPD se pueden comprar fácilmente en paquetes de proveedores especializados o pueden ser ordenados individualmente. Para uso general, la compra de los paquetes comerciales es la mejor decisión y la más barata. Para determinar cuál de los iniciadores funcionara con el enemigo natural o plaga de interés, muchos deberán

ser probados hasta que se encuentren los que muestren el nivel de variación necesario para el problema en estudio (ver más adelante). El uso de iniciadores de RAPD generalmente resulta en varias secuencias de ADN diferentes amplificadas. Cuando estos productos PCR son visualizados en un gel de electroforesis, varias bandas de diferentes tamaños serán visibles. Para algunas aplicaciones es deseable que existan bastantes diferencias entre individuos en el patrón de bandas, mientras que para otras aplicaciones es mejor una menor variación. Por ejemplo, una alta variación es lo mejor para el análisis de paternidad porque si varios machos pueden potencialmente ser el padre de una cría en particular, entonces la paternidad es más fácil determinada si los padres potenciales difieren sustancialmente en sus huellas de RAPDs. Sin embargo, si los RAPDs se van a usar para distinguir entre dos especies cercanamente emparentadas, sería mejor si todos los individuos dentro de cada especie muestran el mismo patrón de bandas, pero que estos patrones difieran entre las especies. Luego de haber identificado iniciadores efectivos para la prueba determinada, es posible que se necesite ordenar iniciadores adicionales con las secuencias específicas requeridas de un proveedor comercial. Ya que los iniciadores RAPD son muy cortos, es importante optimizar las condiciones de reacción PCR para obtener resultados consistentes. Los PCR RAPD pueden ser optimizados para las condiciones de un laboratorio específico, pero con frecuencia este mismo protocolo presenta problemas en otro laboratorio (van Belkum *et al.*, 1995). Consecuentemente, las condiciones de reacción que trabajan bien en un laboratorio no necesariamente trabajan bien en otros laboratorios y esto es una de las razones por las que este método dejado de ser usado por muchos investigadores. Un método que tiene muchas de las ventajas de las RAPDs, y además mayor consistencia de un laboratorio a otro es el de los Polimorfismos de longitud de Fragmento Amplificado (AFLP por su sigla en inglés: Amplified Fragment Length Polymorphisms) (Vos *et al.*, 1995). Brevemente, el método se basa en primero cortar el ADN de un espécimen en fragmentos, usando enzimas de restricción específicas, y luego se usan acoplamientos de ADN a los fragmentos. Esto es seguido por un paso donde los fragmentos con acoplamientos unidos a ellos son amplificados en una reacción PCR, usando iniciadores que se unan a los acoplamientos. Subsecuentemente, esta mezcla es usada como la plantilla para reacciones posteriores de PCR, ahora usando los iniciadores compuestos de la secuencia de los acoplamientos mas algunas bases adicionales unidas sobre el 3' final. El producto de estas reacciones PCR es pasado por un gel de electroforesis para entonces poder analizar el patrón de bandas. Los AFLPs son usados extensivamente en estudios de mapeo de genomas, sin embargo, también pueden ser usados en estudios poblacionales. Comparado con otros métodos, el protocolo usado para este método requiere de un gran número de pasos en el laboratorio, haciéndolo menos atractivo.

¿PARA QUÉ SE USAN LOS RAPDs?

El PCR RAPD es usado como una técnica de huellas dactilares para determinar la paternidad de la progenie, para diferenciar entre especies o biotipos, y para el mapeo genético de características. El PCR RAPD es una técnica particularmente popular para el reconocimiento de biotipos de hongos (Dodd and Stewart, 2003; Dodd *et al.*, 2004; Pujol *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2005).

EJEMPLOS DE RAPDs QUE SE USAN EN CONTROL BIOLÓGICO.

Kazmer *et al.* (1995), en un estudio muy cuidadoso, demostraron algunos de los problemas del uso de los marcadores RAPD. Este artículo es una lectura recomendada para cualquiera que considere el uso de RAPDs. El objetivo del trabajo de Kazmer *et al.* (1995) fue usar marcadores RAPD para distinguir entre algunas razas cercanamente emparentadas del parasitoide de áfidos *Aphelinus asychis* Walker (Hymenoptera: Aphelinidae). Ellos estudiaron la repetibilidad del patrón de bandas RAPD en réplicas de la misma muestra de ADN y encontraron que el 25% de las bandas de un gel, generadas en una reacción PCR, no fueron encontradas en otra réplica de la misma reacción PCR. Este problema fue se complicó aun más porque la progenie híbrida de dos líneas de parasitoides algunas veces no mostró el patrón de bandas esperado, y los geles contenían bandas de tamaños ligeramente diferentes.

La huella dactilar de ADN basada en RAPD PCR es usada frecuentemente para confirmar qué individuos o razas pertenecen a especies particulares o biotipos. El biotipo B de *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae), por ejemplo, puede ser reconocido usando RAPD PCR (De Barro y Driver, 1997). Aunque los RAPDs pueden ser usados frecuentemente para tales propósitos, algunas veces la variabilidad dentro de las especies o biotipos de interés hacen difícil el asignar individuos al grupo correcto. Este problema fue encontrado por Gozlan *et al.* (1997) cuando trataron de usar marcadores RAPD para distinguir entre poblaciones geográficas de una especie de *Orius* (Hemiptera: Anthocoridae). La meta de su investigación fue encontrar marcadores que pudiesen ser usados para asignar individuos a distintas poblaciones geográficas para determinar el éxito de una población liberada de *Orius* en relación a la población local de la misma especie. Sin embargo, ellos encontraron que los patrones RAPD eran demasiado variables dentro de las poblaciones geográficas para ser de utilidad.

Los marcadores RAPD fueron usados exitosamente por Edwards y Hoy (1995) para seguir el destino de una población tolerante a insecticidas seleccionada en el laboratorio, en relación con la población natural de campo de un parasitoide del áfido del nogal *Chromaphis juglandicola* (Kaltenbach). Utilizando la frecuencia de los diferentes marcadores RAPD en ambas poblaciones, usaron una función estadística discriminante para distinguir las poblaciones y asignar individuos a la población de laboratorio o a la de campo. Enseguida, permitieron que las dos poblaciones se cruzaran en laboratorio y siguieron con el tiempo la composición genética de la población cruzada, en cajas con y sin aplicación de insecticidas. Sus resultados demostraron que, sin importar el tratamiento con insecticidas, los marcadores asociados con la línea resistente a insecticidas persistieron mucho mejor en el laboratorio que los marcadores asociados con la línea colectada en el campo. Esto conduce a la conclusión que la línea seleccionada, tolerante a insecticidas, se había adaptado a las condiciones de laboratorio.

MARCADORES ISSR

¿QUÉ SON LOS MARCADORES ISSR?

Los marcadores ISSR, secuencia repetida inter-simple (por su sigla en inglés: inter-simple sequence repeat), están relacionados a los marcadores RAPDs en que son el resultado de una amplificación PCR de partes desconocidas del genoma del organismo en estudio. Los patrones ISSR pueden ser obtenidos al amplificar el ADN de los organismos, usando los iniciadores ISSR disponibles comercialmente. Los iniciadores ISSR consisten de una serie de dinucleótidos repetidos, seguidos por dos bases no repetidas. Por ejemplo, un iniciador ISSR podría ser CTCTCTCTCTTG o $[CT]_6TG$. Con frecuencia, las dos últimas bases (por ejemplo, TG) son degeneradas, lo cual significa que durante la manufactura del iniciador en una misma posición dentro de este, dos o más bases pueden ocurrir. La degeneración de una posición en la secuencia es indicada con las siguientes letras Y = C / T, R = A / G. Por ejemplo, el iniciador degenerado $(CT)_6RT$ consistirá de una mezcla de los iniciadores $(CT)_6AT$ y $(CT)_6GT$. La ventaja del uso de iniciadores degenerados es que permiten el reconocimiento y la amplificación de una variedad de secuencias de ADN relacionadas.

Los iniciadores ISSR hacen uso de secuencias de microsatélites del ADN (ver más adelante) dispersas a través del genoma de los organismos. Ya que generalmente hay muchas secuencias diferentes de microsatélites hipervariables en el genoma de los organismos, los marcadores ISSR amplifican probablemente muchas regiones de ADN diferentes. Los iniciadores de ISSR son tratados como marcadores dominantes, por tanto una banda particular está presente o ausente. Comúnmente es ignorado el hecho de que en un locus individual varios alelos pueden resultar en bandas de un tamaño algo diferentes.

¿CÓMO ENCONTRAR ISSRS?

Los iniciadores de ISSR pueden ser comprados en grupos a compañías comerciales. Al igual que los iniciadores RAPD, una optimización extensiva de esos iniciadores es requerida para que trabajen en una forma repetible y confiable.

¿PARA QUÉ SE USAN LOS ISSR?

Pueden usarse para los mismos propósitos experimentales que los iniciadores RAPD.

EJEMPLOS DE ISSR QUE ESTÁN SIENDO USADOS EN CONTROL BIOLÓGICO

Los ISSR han sido usados principalmente en el estudio de poblaciones de malezas invasoras para determinar su nivel de variabilidad genética y de hibridación potencial con las especies nativas. Ash *et al.* (2004) usaron los ISSRs para estudiar el plátano acuático de hojas de lanza, una planta invasora en Australia. Sus análisis de los marcadores de ISSR mostraron que poblaciones diferentes de esta planta en áreas diferentes ocurrieron probablemente debido a importaciones separadas de esta maleza y que es probable que las semillas de esta planta hayan sido transportadas entre las áreas infestadas. El hecho de que haya habido dos importaciones genéticamente distintas

de esta maleza (muy probablemente de áreas diferentes en el rango de origen de las plantas) puede tener implicaciones importantes para futuros esfuerzos en el control biológico contra esta maleza, usando hongos fitopatógenos. Las pruebas para determinar la eficiencia de los hongos contra esa maleza deberían incluir especímenes de ambas poblaciones y cualquier híbrido, ya que la eficiencia de los patógenos puede variar entre los genotipos.

Los iniciadores RAPD e ISSR han sido usados para identificar y distinguir biotipos del cardo ruso (*Salsola tragus* L.) encontrado en California (Sobhian *et al.*, 2003). Ambos marcadores dieron el mismo resultado, mostrando que había dos biotipos (A y B) y que en pruebas de campo en Uzbekistán, un agente potencial de control biológico (una mosquita de las agallas) fue capaz de atacar ambos biotipos, aunque el biotipo A fue preferido.

En Nueva Zelanda, la plaga de la alfalfa *Sitona discoideus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae) es controlada exitosamente por el parasitoide *Microctonus aethiopoidea* Loan (Hymenoptera: Braconidae). La población de este parasitoide usado en Nueva Zelanda se originó muy probablemente en Marruecos aunque fue importada de una población previamente establecida en Australia (Phillips *et al.*, 2002). Una segunda plaga de la alfalfa, *Sitona lepidus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae), fue posteriormente descubierta en Nueva Zelanda pero no fue parasitada por *M. aethiopoidea*. En Europa, algunos biotipos de *M. aethiopoidea* son conocidos por poder parasitar exitosamente ambas especies de *Sitona*. De los experimentos quedó claro que la población de Nueva Zelanda de *M. aethiopoidea* originaria de Marruecos no fue capaz de reproducirse exitosamente en el *S. lepidus* europeo mientras que la raza de Francia de *M. aethiopoidea* pudo reproducirse tanto en el *S. lepidus* europeo como en el de Nueva Zelanda. Usando marcadores ISSR, fueron comparadas las poblaciones de Nueva Zelanda (de Marruecos) de *M. aethiopoidea* y los autores concluyeron que había diferencias genéticas entre ellas. Esas diferencias fueron suficientemente menores para que dichas poblaciones no pudieran ser consideradas especies diferentes, pero aun así las poblaciones diferían en formas importantes para su uso como agentes de control biológico. En un siguiente estudio, Vink *et al.* (2003) usaron métodos filogenéticos para determinar las relaciones entre algunas poblaciones de *M. aethiopoidea* y determinaron que había una clara diferencia entre los especímenes de parasitoides colectados en *S. discoidea* y en *S. lepidus*.

Los iniciadores ISSR también han sido usados para diferenciar entre especies y poblaciones de algunas especies de *Gonatocerus* (Hymenoptera: Mymaridae) usadas en el control biológico clásico de *H. coagulata* (de Leon *et al.*, 2004; de Leon y Jones, 2005).

Cuando poblaciones diferentes son comparadas con microsatélites o ISSRs, es importante estar seguro que los individuos colectados en el campo son comparados en lugar de individuos de una colonia de laboratorio, la cual pudo haber empezado con un número limitado de individuos y por tanto no incluye la variación genética completa de la población de campo. Además, para los parasitoides que colocan sus huevecillos en hospederos que están ocultos o que son gregarios, es importante notar que toda la descendencia de un solo grupo de hospederos es más probable que

sea la de una sola hembra copulada, por lo que serían genéticamente muy similares. Para muestrear apropiadamente las especies con esas características, deberían tomarse muestras de especímenes individuales, partiendo de muchos grupos (por ejemplo, de masas de huevecillos).

Los individuos originados de colonias de laboratorio están muy emparentados, y cuando dos colonias de laboratorio de una especie son comparadas, no se está muestreando adecuadamente la cantidad de variación genética que está presente en la población completa. Tal comparación es probable que encuentre erróneamente que la mayor variación ocurra entre subpoblaciones (colonias) y que muy poca variación genética esté presente dentro de las colonias, conduciendo a la conclusión incorrecta que las colonias representan distintos biotipos o subespecies.

MICROSATÉLITES

¿QUÉ SON LOS MICROSATÉLITES?

Microsatélites, repeticiones de secuencias simples (SSR por su sigla en inglés) o repeticiones cortas en secuencia (STR por su sigla en inglés) son nombres diferentes para el mismo tipo de marcador. Los microsatélites son secuencias de ADN repetidas una tras otra, donde la unidad repetida consiste de sólo 1 a 6 pares de bases y la región repetitiva completa abarca menos de 150 pares de bases. El locus de un marcador microsatélite puede tener muchos alelos diferentes, cada uno con un diferente número de repeticiones. Se piensa que los muchos diferentes alelos en un locus de microsatélite se producen por errores en la replicación de cadenas de ADN que contienen muchas unidades repetidas (Schlotterer, 2000). Los microsatélites son típicamente neutrales y codominantes, haciéndolos muy útiles como marcadores moleculares en estudios poblacionales.

¿CÓMO ENCONTRAR MICROSATÉLITES?

El encontrar los microsatélites de un organismo en particular puede ser un proceso largo y costoso (Zane *et al.*, 2002). Generalmente, el ADN genómico es extraído del organismo y cortado en piezas más cortas (~500 pares de bases), usando diferentes enzimas de restricción. Enseguida, esos fragmentos de ADN son ligados directamente a los plásmidos. Comúnmente, antes de la ligación los fragmentos de ADN son enriquecidos por cadenas de ADN que contienen secuencias de ADN microsatélites usando hibridación selectiva para sacar los fragmentos de ADN que contienen las repeticiones de microsatélites. Subsecuentemente, los plásmidos con los fragmentos de ADN son usados para transformar bacterias, las cuales son aisladas usando medios selectivos que favorecen a las bacterias que contienen una inserción. Si el ADN no enriquecido es usado para la transformación, entonces las colonias de bacterias con inserciones necesitarán ser clasificadas para determinar cuáles contienen una inserción microsatélite. Enseguida, aquellos plásmidos que contienen una inserción son secuenciados. Las secuencias que contienen tanto repeticiones microsatelitales como las secuencias de ADN a ambos lados de la repetición, pueden ser usadas para diseñar iniciadores PCR. Los iniciadores PCR son entonces diseñados y ensayados sobre dife-

rentes individuos de las especies de interés para determinar sin duda cuáles amplifican un producto del tamaño esperado. Los iniciadores que amplifican un locus de microsatélite necesitan ser muestreados para determinar (1) que el locus microsatélite es polimórfico (incluyendo cuando existen varios alelos en el locus microsatélite) y (2) que ningún alelo nulo está presente. Los alelos nulos son casos donde los iniciadores son incapaces de amplificar el locus microsatélite (Selkoe y Toonen, 2006). Las mutaciones en las regiones donde los iniciadores se unen a las secuencias complementarias para los locus microsatélites son la causa de la falla de los iniciadores para amplificar. Los alelos nulos deberían ser evitados porque muchos de los métodos estadísticos usados para analizar el ADN de microsatélites asumen que, dentro de las poblaciones, los alelos estarán en un equilibrio Hardy Weinberg. Si los alelos nulos están presentes, entonces los individuos que son heterocigotos para uno de los alelos nulos serán marcados como homocigotos (Selkoe y Toonen, 2006).

¿PARA QUÉ SON USADOS LOS MICROSATÉLITES?

Los microsatélites son usados para responder preguntas como: ¿De cuál población se originó este individuo? ¿Cuáles son las relaciones genéticas entre los individuos? ¿Cuál es la estructura de apareamiento de una población?

EJEMPLOS DE MICROSATÉLITES QUE SE ESTÁN USANDO EN CONTROL BIOLÓGICO.

Los microsatélites no han sido comúnmente utilizados en estudios de control biológico. Un estudio de la literatura muestra que los iniciadores microsatélite han sido desarrollados para muchos organismos de interés en el control biológico (Bon *et al.*, 2005; Brede y Beebe, 2005; Slotta *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 2005; Lozier *et al.*, 2006). Los microsatélites han sido usados para determinar el origen probable de poblaciones de especies invasoras (Bohonak *et al.*, 2001; Tsutsui *et al.*, 2001; Augustinos *et al.*, 2002; Facon *et al.*, 2003; Baliraine *et al.*, 2004; Hufbauer *et al.*, 2004; Clarke *et al.*, 2005; Grapputo *et al.*, 2005). Sin embargo, muy pocos estudios han sido publicados aún sobre el uso de microsatélites para resolver otras preguntas de importancia para el control biológico.

Dos estudios han usado marcadores microsatélite para determinar la estructura genética de la población de parasitoides de áfidos. Baker *et al.* (2003) estudiaron a *Diaeretiella rapae* MacIntosh (Hymenoptera: Aphidiidae), un parasitoide que ha sido distribuido mundialmente, incluyendo Australia, para varios proyectos de control biológico de áfidos. La diversidad genética de *D. rapae* en el oeste de Australia fue baja, lo que fue indicativo de la pérdida de diversidad genética durante el proceso de importación y colonización. Los autores especulan sobre las implicaciones de esta baja diversidad genética sobre la capacidad potencial de esta población de *D. rapae* para controlar la invasión esperada del áfido ruso del trigo, *Diuraphis noxia* (Kurdjumov) (Hemiptera: Aphididae), dado que no todas las poblaciones de *D. rapae* son capaces de controlar esta plaga.

Hufbauer *et al.* (2004) usaron ADN mitocondrial y microsátélites para reconstruir la historia de la introducción a los Estados Unidos del parasitoide *A. ervi* (Hymenoptera: Braconidae), el cual fue propuesto para el control del áfido de la arveja, *Acyrtosiphon pisum* (Harris) (Hemiptera: Aphididae). Aproximadamente 1,000 pupas de parasitoides fueron importados desde Francia en 1959 y criados por varias generaciones antes de que fueran liberados en el campo. Cuando se comparó la población presente en los Estados Unidos con la población de *A. ervi* de Francia y Hungría, quedó claro que durante su introducción esta especie experimentó un ligero estrechamiento genético. También las poblaciones han tenido alguna diferenciación post-liberación ya que la separación geográfica y la caracterización genética fueron correlacionadas positivamente entre las poblaciones de los Estados Unidos.

Los marcadores microsátélite también han sido usados para distinguir diferentes clones de la especie *Trichogramma cacoeciae* Marchal (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Este parasitoide de huevecillos es una especie completamente partenogénica que consiste de varios clones diferentes (Vavre *et al.*, 2004; Pizzol *et al.*, 2005). Los marcadores microsátélite pueden ser usados para probar el desempeño relativo de diferentes clones de esta especie contra plagas de interés.

SECUENCIA DE GENES

Existen tres tipos de secuencias de genes que serán considerados aquí: (1) secuencias de ADN que codifican por proteínas, (2) secuencias de ARN ribosomal, y (3) genes mitocondriales.

(1) SECUENCIAS DE ADN DE GENES CODIFICADORES DE PROTEÍNAS.

Las secuencias de ADN son transcritas para formar la transcripción del ARN primario, el cual es subsecuentemente procesado antes de llegar a ser el ARN mensajero maduro. Durante el proceso, son removidas las partes de la secuencia que no codifican para aminoácidos. Esas partes no codificadoras del ADN son llamadas intrones mientras que las partes del ADN que codifican para proteínas que terminan en el ARN mensajero son llamadas exones. El ARN mensajero es subsecuentemente trasladado hacia una proteína en los ribosomas. Muchos genes codificadores de proteínas tienen solamente una copia simple en el genoma del organismo.

¿CÓMO ENCONTRAR SECUENCIAS DE ADN?

Han sido desarrollados los iniciadores para muchos genes codificadores de proteínas, (Brower y Desalle, 1994). Una comparación de la utilidad de algunos genes que codifican por proteínas con propósitos filogenéticos en insectos es efectuada por Danforth *et al.* (2005). Muchos iniciadores para genes que codifican para proteínas son discutidos en las referencias citadas de este libro.

¿PARA QUÉ SON USADAS LAS SECUENCIAS DE ADN?

El uso más común de las secuencias de ADN es la determinación de las relaciones filogenéticas entre diferentes especies. Para los estudios filogenéticos que usan

secuencias de ADN es esencial ser capaz de alinear las secuencias de ADN con bastante certeza. El utilizar las secuencias de ADN que codifican por proteínas simplifica el problema de la alineación.

EJEMPLOS DE SECUENCIAS DE ADN USADAS EN CONTROL BIOLÓGICO

Ningún estudio de importancia directa para el control biológico que use secuencias de ADN de genes codificadores de proteínas ha sido publicado. En general, los genes codificadores de proteínas nucleares no son muy usados en estudios de poblaciones, por su bajo nivel de variación. Es mucho más simple usar microsatélites para esos propósitos. Intrones de diferentes tamaños en genes codificadores de proteínas han sido usados en estudios para determinar el origen de algunas invasiones de moscas de la fruta (Villablanca *et al.*, 1998), usando lo que ha sido llamado EPIC PCR (por su sigla en inglés: Exon Primed Intron Crossing). En esas reacciones PCR, el intrón es amplificado y ya que los intrones tienen tasas de mutación más altas que los exones, la variación de la población en alelos intrones puede ser sustancial. En algunas especies existe una variación sustancial en el tamaño de los intrones (Gasperi *et al.*, 2002). Las secuencias de intrones son potencialmente muy útiles para determinar los orígenes de las poblaciones de especies invasoras que han limitado su variación genética por el represamiento durante el proceso de invasión. En muchas especies de moscas de la fruta, la variación genética de muchos marcadores es muy baja porque la población ha pasado por estrechamientos genéticos secuenciales, cuando una población invasora con variación genética reducida en un área, es el origen poblacional de la invasión secundaria.

(2) SECUENCIAS DE ARN RIBOSOMAL

Los ribosomas son las estructuras de las células donde el ARN mensajero es traducido a proteínas. Los ribosomas en los insectos consisten de tres partes, llamadas 5.8S, 18S y 28S. Los genes codificadores para esas partes se presentan en unidades repetidas en el genoma y cada unidad repetida consiste del gen para 18s rARN, un espaciador ITS1, un gen para 5.8s rARN, un segundo espaciador ITS2, y el gen 28s rARN seguido por el espaciador intergenico. Mientras la secuencia de los genes ribosomales es muy conservada entre las especies, las secuencias para las regiones espaciadoras pueden variar sustancialmente aun entre las especies cercanamente relacionadas. Aunque existen muchas copias de las repeticiones ribosomales por genoma nuclear, la secuencias de los 18s, 5.8s y 28s generalmente son todas idénticas dentro de un individuo, incluyendo el 28s-D2, el cual es altamente conservado y usado como un identificador de especies muy conservado. Diferentes secuencias D2 indican diferentes especies, pero la misma secuencia D2 no garantiza que dos individuos sean coespecíficos. Sin embargo, para las regiones espaciadoras ITS1 y ITS2, pueden existir varias secuencias diferentes dentro de un individuo. Aunque las diferencias generalmente son pequeñas, esto imposibilita la secuenciación directa de las regiones ITS. Las copias de las regiones ITS frecuentemente difieren en el número de repeticiones de microsatélites encontrados en sus secuencias. Esto ocasiona que las secuencias difieran en un par de

bases y el secuenciador leerá bases diferentes en la misma posición en la secuencia. Consecuentemente, los productos ITS PCR necesitan ser clonados antes de poder obtener las secuencias (ver Stouthamer *et al.*, 1999).

¿CÓMO ENCONTRAR SECUENCIAS DE ARN RIBOSOMAL?

Como las secuencias de genes ribosomales son muy conservadas, los iniciadores localizados en estas áreas conservadas pueden utilizarse para amplificar el ADN de muchos organismos diferentes. Para una descripción de cómo obtener secuencias de ARN ribosomal y para listas de secuencias de iniciadores, ver Gillespie *et al.* (2005) y Hillis y Dixon (1991).

¿PARA QUÉ SE USAN LAS SECUENCIAS DE ARN RIBOSOMAL?

Las secuencias de ADN de los genes codificadores de ARN ribosomal son usados para estudios filogenéticos. Ya que las secuencias de los 18s, 5.8s y 28s evolucionan muy lentamente, son frecuentemente usadas para determinar la clasificación de insectos al nivel taxonómico más alto, tal como relaciones entre órdenes. Sin embargo, ciertas áreas en los genes codificadores de ARN ribosomal son de utilidad a niveles taxonómicos más bajos. Esas secuencias incluyen varias regiones de extensión de los 28s rARN (Gillespie *et al.*, 2005). Las regiones ITS no son fácilmente usadas en estudios filogenéticos porque su alineación es incierta. Las regiones ITS, sin embargo, son usadas extensivamente para el reconocimiento de especies, principalmente las crípticas o los biotipos. Muchos casos diferentes que usaron espaciadores ITS se encuentran en la literatura del control biológico.

EJEMPLOS DEL USO DE SECUENCIAS RIBOSOMALES EN CONTROL BIOLÓGICO

Tanto la secuencia de los espaciadores D2 y las secuencias ITS han sido usadas para identificar especies que carecen de características morfológicas claras que puedan separarlas. La región de extensión D2 del 28s rRNA es muy útil para determinar si dos individuos pertenecen a la misma especie, pero las diferencias entre especies cercanamente relacionadas son pequeñas. Los D2 han sido usados para la identificación de muchas especies diferentes del muy importante género de parasitoides *Encarsia* (Hymenoptera: Aphelinidae) (Babcock y Heraty, 2000; Schmidt *et al.*, 2001; Manzari *et al.*, 2002; Pavis *et al.*, 2003).

Las secuencias ITS1 e ITS2 han sido usadas en muchos proyectos de control biológico para el reconocimiento de especies. Las regiones ITS de especies cercanamente relacionadas, frecuentemente difieren no sólo en la secuencia del ADN sino también en su tamaño (el número de pares de bases). Esas dos características hacen a las regiones ITS muy apropiadas para el reconocimiento confiable y económico de especies. Por ejemplo, en el género *Trichogramma*, muchas especies pueden ser diferenciadas simplemente por el tamaño del producto PCR después de la amplificación con iniciadores ITS2 (Stouthamer *et al.*, 1999). Especies diferentes, con productos PCR de tamaño similar, pueden ser distinguidas frecuentemente por el patrón de fragmentos de restricción, por ejemplo, el polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (incluyendo los RFLP por su

sigla en inglés: Restriction Fragment Length Polymorphism), después de digerir el producto PCR con diferentes enzimas de restricción. El tamaño del producto PCR y los fragmentos de restricción que siguen a la digestión con enzimas de restricción han sido usados para producir claves para identificar las especies de *Trichogramma* (Silva *et al.*, 1999; Stouthamer *et al.*, 1999; Ciociola *et al.*, 2001; Pinto *et al.*, 2002).

Si están presentes sólo unas pocas especies en un área en particular, entonces iniciadores pueden ser diseñados para amplificar el ADN de una sola especie. Davies *et al.* (2006) usaron este método en Australia para distinguir entre las dos especies de *Trichogramma* que se encuentran en algodón, construyendo iniciadores específicos de especies. Esos iniciadores fueron diseñados para esas partes de la secuencia de ITS2, donde la secuencia de ambas especies difería. Los iniciadores fueron entonces probados para verificar que solamente amplificaban el ADN de la especie seleccionada. Además, los iniciadores fueron también construidos en tal forma que el tamaño del producto PCR específico difería entre las especies. La identidad de las especies de un individuo desconocido, perteneciente a la especie A o a la B, podría ser determinada por una reacción PCR múltiple. En esta reacción, se adiciona un iniciador ITS2 general en el sentido hacia adelante y los dos iniciadores de reversa específicos para identificar a las dos especies. Una de las ventajas de tal enfoque es que resulta en una identificación positiva de las especies. El espécimen analizado pertenece a la especie A o la B. Si ningún producto PCR es obtenido, entonces el individuo desconocido pertenece a otra especie, la cual puede luego ser identificada simplemente amplificando y secuenciando la ITS2 completa.

Los iniciadores específicos de especies, basados en secuencias de ITS, también son usados para determinar si los hospederos están parasitados por una especie específica. Zhu *et al.* (2000) diseñaron iniciadores específicos para dos parasitoides comunes del áfido ruso del trigo. Usando esos iniciadores específicos, ellos fueron capaces de (1) identificar los adultos de los dos parasitoides a nivel especie y (2) determinar la especie del parasitoide en un hospedero parasitado por extracción del ADN del parasitoide de los áfidos. Este método fue tan perceptivo que ellos pudieron detectar larvas de los parasitoides en el interior de los áfidos hospederos que eran sólo de 1/1000 del tamaño del parasitoide adulto, y el parasitoide podía ser detectado dentro del áfido tan rápidamente como un día después de ocurrir el parasitismo. Muchos otros estudios han usado enfoques similares (Greenstone, 2006).

(3) GENES MITOCONDRIALES

Los genes mitocondriales difieren de los genes localizados en los cromosomas en que ellos tienen una transmisión puramente maternal. Esto significa que toda la descendencia hereda todas sus mitocondrias de la madre; las mitocondrias del padre no son transmitidas. El genoma de las mitocondrias es pequeño comparado al genoma nuclear.

¿CÓMO ENCONTRAR GENES MITOCONDRIALES?

Muchos detonadores diferentes están disponibles comercialmente para identificar los genes mitocondriales. Pueden comprarse paquetes que contienen diferentes grupos de iniciadores para varios genes mitocondriales (Simon *et al.*, 1994).

¿PARA QUÉ SE USAN LOS GENES MITOCONDRIALES?

A través de los últimos años, el gen de la oxidasa del citocromo mitocondrial (COXI o COI), ha sido usado para propósitos de identificación en proyectos de “código de barras” de especies. La idea detrás del “código de barras” es secuenciar el gen COI de tantas especies diferentes como sea posible y luego usarlas para identificar especímenes desconocidos a partir de secuencias analizadas de especies previamente catalogadas. Este enfoque permite que los especímenes desconocidos (tanto estado larval como el adulto) sean caracterizados y se les asigne una identificación o una etiqueta con el nombre. Muchos artículos han sido publicados oponiéndose por diferentes razones a la idea de que organismos tengan un código de barras. En algunos casos, el gen COI de dos especies cercanamente relacionadas no difiere, y aun así las especies son reconocidas como diferentes (Moritz y Cicero, 2004; Hurst y Jiggins, 2005). También, la estadística usada para delinear especies no descritas, usando genes COI, ha sido criticada (Will y Rubinoff, 2004). A pesar de esas deficiencias, el método parece tener su utilidad y puede ser particularmente conveniente en combinación con la secuenciación de genes adicionales o cuando las características biológicas y morfológicas sean también estudiadas para suplementar los datos COI.

Las secuencias de ADN mitocondrial han sido usadas más comúnmente en filogeografía, la cual es el estudio de los procesos que gobiernan la distribución geográfica de linajes genealógicos, especialmente dentro de especies y entre especies cercanamente relacionadas (Avice, 2000). Tales métodos analíticos filogeográficos pueden ser de uso sustancial para determinar el origen de especies invasoras o de enemigos naturales introducidos.

EJEMPLOS DE GENES MITOCONDRIALES QUE ESTÁN SIENDO USADOS EN PROYECTOS DE CONTROL BIOLÓGICO

El código de barras que usa genes COI todavía no ha sido muy usado en control biológico. Sin embargo, se piensa que tienen un gran potencial para ayudar a identificar a las especies invasoras potenciales (Scheffer *et al.*, 2006) y a los enemigos naturales (Greenstone *et al.*, 2005). Greenstone *et al.* (2005) determinaron las secuencias COI para muchos escarabajos carábidos y arañas que se encuentran en cultivos en el campo. Usaron estas secuencias para crear iniciadores específicos de especies que les permitieron identificar todas las especies estudiadas, sin importar el estado de vida colectado. Indicaron que la densidad de los estados larvales de esas especies es frecuentemente más alta en el campo que el número de adultos, y el impacto de los estados inmaduros sobre el control de la plaga es raramente estudiado, en parte, por las dificultades en su identificación. Agustí *et al.* (2003) usaron la secuencia COI del psílido de la pera *Cacopsylla pyricola* (Förster) (He-

miptera: Psyllidae) para diseñar los iniciadores específicos de las especies y para poder detectar el ADN de *C. pyricola* en las tripas del depredador. Después de ocho horas, todos los depredadores que habían comido de 1 a 5 psílicos aun salían positivos para la plaga. Perdakis *et al.* (2003) usaron secuencias de ADN mitocondrial para distinguir entre dos hemípteros depredadores, cercanamente relacionados, que encontraron en estudios de campo. Finalmente, Borghuis *et al.* (2004) usaron análisis PCR-RFLP de COI mitocondrial para distinguir entre dos especies de parasitoides cercanamente relacionados, *Trichogramma minutum* Riley y *Trichogramma platneri* Nagarkatti (ambos Hymenoptera: Trichogrammatidae). Estas dos especies no pudieron ser distinguidas usando sólo sus secuencias ITS2 (Stouthamer *et al.*, 2000b).

Las secuencias de ADN mitocondrial han sido usadas en muchos estudios para determinar el origen de una especie invasora. En el rango nativo de una plaga invasora, frecuentemente existe una asociación clara entre secuencias mitocondriales particulares y una sub-área del rango nativo total. Esta asociación entre el patrón de la secuencia y la localización geográfica puede ser usada para determinar el origen de una invasión. Un ejemplo es el estudio por Havill *et al.* (2006) para determinar el origen del adélgido lanudo del pino (genero *Tsuga*), *Adelges tsugae* Annand (Hemiptera: Adelgidae), el cual ha invadido el este de Norteamérica. Basado en la secuencia del gen COI, la población invasora podría ser trazada hasta Japón. Los resultados de este análisis significan que, tanto China como Taiwán podrían ser excluidos como origen de la población del este de Norteamérica. Estudios similares han indicado el origen de invasiones de *Phylloxera* en el mundo (Downie, 2002), de la mosca de la fruta de la calabaza, *Bactrocera depressa* (Shiraki), en Japón (Mun *et al.*, 2003) y del cangrejo mitón chino, *Eriocheir sinensis* H. Milne Edwards, en Norteamérica (Haenfling *et al.*, 2002). Hufbauer *et al.* (2004) usaron algunas técnicas moleculares para estudiar el origen de la población del parasitoide norteamericano *A. ervi*. Esta especie fue introducida desde el oeste de Europa en 1957 y Hufbauer *et al.* (2004) demostraron que la mayoría de *A. ervi* de Norteamérica, sin duda tienen secuencias mitocondriales en común con la población de *A. ervi* europea y del Medio Oriente, confirmando su supuesta área de origen. En la región del noroeste del Pacífico de los Estados Unidos, se encontró una segunda secuencia mitocondrial que fue más similar a las secuencias encontradas en *A. ervi* de Japón, indicando que probablemente una segunda introducción ocurrió en esta área.

PROBLEMAS IMPORTANTES DEL CONTROL BIOLÓGICO QUE LAS TÉCNICAS MOLECULARES PUEDEN ATENDER

IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES

En los programas de control biológico, la identidad de la plaga o de los enemigos naturales potenciales puede ser desconocida o sólo pobremente entendida en relación a otras

taxa similares. Bajo tales circunstancias, se necesita el trabajo de un taxónomo competente para resolver preguntas taxonómicas críticas. Sin embargo, con la amplia disponibilidad de los métodos moleculares y su simplicidad relativa y facilidad de uso, ahora es factible para los trabajadores en control biológico caracterizar taxa de interés y de ese modo permitir a un taxónomo identificar posteriormente la especie. Este enfoque significa que los proyectos no se posponen por la incertidumbre taxonómica, lo cual es referido con frecuencia como el impedimento taxonómico para el control biológico. Una mayor atención ha sido dada al método del código de barras, donde la secuencia del gen COI es usada para identificar las especies aún si el nombre de las especies no está disponible o la identidad real es incierta. Mientras que este método tiene desventajas, discutidas anteriormente, la caracterización inicial de un taxón a través del código de barras puede ser de utilidad. La determinación de la secuencia COI es relativamente fácil, los iniciadores generales que trabajan en muchas especies diferentes están disponibles comercialmente, y el producto PCR resultante puede ser secuenciado directamente, así que el costo de caracterizar un espécimen es bajo. Uno de los principales problemas desde el punto de vista aplicado, es que dentro de una especie, existen varias secuencias de ADN COI, a veces substancialmente diferentes. La región D2 del gen 28s ribosomal parece ser muy adecuada para el reconocimiento de especies. Dentro de una especie parece haber muy poca variación en esta secuencia, mientras que entre especies existen diferencias que ayudan a hacer más fácil la identificación (Heraty, 2004). La reacción PCR que usan los iniciadores D2 trabaja muy confiablemente, y el producto PCR puede también ser secuenciado directamente. Finalmente, la secuencia de los ITS2 es usada en varios géneros para la identificación de especies (Stouthamer *et al.*, 1999; Stouthamer *et al.*, 2000b; Alvarez y Hoy, 2002). ITS2 es una secuencia que puede ser fácilmente amplificada usando iniciadores publicados que trabajan en una amplia variedad de organismos. La desventaja del ITS es que es un gen multicopia que tiene variación dentro de los individuos. Esto hace necesario la clonación del ADN antes de secuenciar, lo que hace a esta técnica un proceso más costoso que la secuenciación de los 28s D2 o el COI.

DIFERENCIACIÓN ENTRE ESPECIES

Otro problema donde los métodos moleculares pueden jugar un papel vital en el control biológico, es en la diferenciación entre especies. Algunas veces las especies que se esperan encontrar en una muestra de campo son conocidas, pero la identidad de estas especies puede ser difícil de determinar. Esta situación puede ocurrir si:

- Sólo un sexo de las especies puede ser identificado morfológicamente
- Los estados inmaduros no se pueden identificar a nivel de especie.
- Se necesitaría mantener vivos por un período de cría largo a los huevecillos o estados larvales de los parasitoides en el interior de sus hospederos antes de que el estado adulto identificable emerja.
- La identificación morfológica requiere de una extensiva preparación del espécimen que consume tiempo y los servicios de un limitado número de taxónomos expertos son limitados.

MÉTODO 1

El método más barato para el reconocimiento de especies es desarrollar un protocolo PCR que amplificará productos de diferentes tamaños de las diferentes especies de interés. Esto puede ser acompañado por la amplificación de una región de un gen donde las especies de interés difieran en el tamaño de sus productos PCR. El tamaño de los espaciadores transcritos internos (ITS1 e ITS2 por sus siglas en inglés) de la repetición ribosomal, frecuentemente difieren entre especies. Las especies pueden ser distinguidas amplificando sus regiones ITS y determinando el tamaño del producto sobre un gel. Cualquier otro gen donde un grupo de espaciadores particular resulta en un producto con un tamaño específico de la especie, podría ser usado como una herramienta de identificación.

MÉTODO 2

Algunas veces, dos o más especies pueden ser distinguidas por el patrón de restricción específico de especies de un gen particular. En este caso, los productos PCR del gen seleccionado para las especies de interés son idénticos, pero una enzima de restricción corta los productos PCR para cada especie en diferentes tamaños de fragmentos. La electroforesis en gel puede realizarse sobre este ADN cortado y la identidad de las especies para especímenes desconocidos puede ser asignada.

MÉTODO 3

Desarrollar espaciadores específicos de especies que amplifiquen un producto PCR de un tamaño diferente para cada especie. Para desarrollar esta técnica, típicamente se usa un gen individual con suficiente variabilidad en su secuencia para poder distinguir las especies pertinentes. Los espaciadores ribosomales, ITS1 e ITS2, son muy convenientes para dicho propósito. Para usar esta técnica, la secuencia de ADN necesita ser conocida para cada especie; esas secuencias son entonces alineadas para determinar las partes conservadas (incluyendo las partes de la secuencia que están presentes en todas las especies) y las partes variables (incluyendo las secuencias encontradas sólo en una especie). Enseguida, para cada especie, un espaciador de reversa (o hacia adelante) es diseñado para que reconozca solo el ADN de la especie en cuestión y pueda ser usado con el espaciador hacia adelante (o de reversa) para esa región del gen. El grupo de espaciadores para cada especie es revisado primero para estar seguros de que amplifican la región del gen sobre esa especie. Enseguida son probadas sobre las otras especies para estar seguros de que los espaciadores no amplifican también el ADN de esas especies. Una vez que ha sido establecido que los espaciadores específicos de las especies trabajan sin duda sobre las especies de interés, entonces pueden ser probados en una reacción PCR múltiple para determinar su efectividad en la identificación. En una reacción PCR múltiple, algunos espaciadores son usados, en este caso podría ser el espaciador general hacia adelante y los espaciadores de reversa específicos de las especies. Si un espécimen pertenece a la especie A en el PCR múltiple, el producto específico de la especie para la especie A será amplificado.

¿DÓNDE SE ORIGINARON LAS ESPECIES INVASORAS?

Los marcadores más usados para determinar el origen de las poblaciones invasoras son generalmente secuencias de ADN mitocondrial. Con frecuencia, en el área donde una especie se origina se encuentran diferentes tipos mitocondriales (por ejemplo, secuencias) en una mayor frecuencia o quizá están restringidos exclusivamente a una sub-área particular dentro del rango nativo de distribución. Comparando el tipo mitocondrial de la población invasora con las muestras de la plaga a través del rango nativo, algunas áreas del rango nativo pueden ser excluidas como el origen de la población porque no hubo similitud genética. Después de esta prueba, una determinación más precisa del origen de la población puede ser obtenida usando marcadores de ADN microsátélites. Las secuencias mitocondriales pueden ser muy informativas si la invasión se originó en el rango nativo de la plaga, sin embargo, para algunas plagas de amplia distribución, nuevas áreas son colonizadas frecuentemente desde áreas que han sido colonizadas anteriormente. Con cada invasión subsiguiente, la variación genética se pierde y muy pocos tipos mitocondriales subsisten. Bajo tales circunstancias, llega a ser imposible usar las secuencias mitocondriales para determinar el origen de las invasiones secundarias y terciarias (Bohonak *et al.*, 2001) pero el análisis de los datos microsátélites puede dar luz sobre el proceso de invasión.

DETERMINACIÓN DE LO QUE UN DEPREDADOR COME EN EL CAMPO

La especie de las partes de la presa presentes en el vientre de un depredador puede ser identificada usando PCR en un período de tiempo de 1 a 2 días después del consumo. El ADN que está presente en el vientre del insecto generalmente se degrada con el tiempo. Consecuentemente, es importante usar una región del gen que se presente en muchas copias del genoma de la presa (genes ribosomales, genes mitocondriales) y diseñar iniciadores específicos de la presa que amplifiquen un producto PCR relativamente corto. La razón de esto es que, cuando el ADN está degradado, es cortado repetidamente en tramos más cortos. Para que el PCR funcione, ambos sitios donde se fusionan los iniciadores deben estar presentes en una porción contigua de ADN, lo cual es más probable para las secuencias cortas. Después que los iniciadores específicos de las especies de las presas han sido diseñados y probados en la especie de la presa de la que se originaron, estos deben ser probados para asegurarse que son específicos de la especie de presa y no amplifican el ADN propio del depredador. Una vez que la especificidad ha sido determinada, los iniciadores específicos de la presa son probados con los depredadores que se han alimentado sobre un número variado de especies presa (1) para asegurar que los iniciadores trabajan en una presa consumida y (2) para determinar la relación entre la detectabilidad de la parte de la presa en el vientre y el tiempo desde que se alimentó. Una revisión de todos los métodos posibles para medir la depredación, usando técnicas moleculares, fue publicada por Symondson (2002).

¿CUÁL RAZA DE UN ENEMIGO NATURAL ES MÁS EFECTIVA?

Los marcadores microsátélites son herramientas excelentes para determinar la importancia relativa de las liberaciones aumentativas de los enemigos naturales en poblaciones ya existentes. Debido a que los microsátélites son tan variables, muchos alelos diferentes de

un locus de microsatélite en particular estarán presentes en las poblaciones de campo. Por ejemplo, se asumen que en una población del enemigo natural, existen tres diferentes alelos con una frecuencia de 0.33 cada uno para el locus A y el locus B. Considerando que la población esté en el equilibrio de Hardy-Weinberg, el genotipo A1A1B1B1 en el campo ocurrirá en la frecuencia de 1 individuo en 81. Si una raza es creada en laboratorio que es A₁A₁B₁B₁, tal raza puede entonces ser usada para determinar el efecto de las liberaciones aumentativas en el campo. Si se liberan parasitoides que son A1A1B1B1, como las hembras que han copulado con sus hermanos (lo que es común en muchos enemigos naturales himenópteros), entonces se puede determinar el efecto de las liberaciones aumentativas sobre el parasitismo con hospederos colectados en el campo, y determinar la frecuencia de A1A1B1B1 en la descendencia de esos hospederos. Si la liberación no tuvo ninguna influencia, entonces se podría esperar solamente 1 en 81 individuos fuera A1A1B1B1. Sin embargo, si una frecuencia sustancialmente más alta de individuos A1A1B1B1 emerge de los hospederos parasitados después de la liberación, el número incrementado de este genotipo entonces refleja la descendencia de los parasitoides liberados en forma aumentativa. Debido a que muchos genotipos diferentes que se presenten en baja frecuencia en el campo pueden ser criados en el laboratorio, algunas poblaciones marcadas pueden ser liberadas en sucesión y después de cada liberación será obvio cuáles individuos son la descendencia de la liberación aumentativa. Tales estudios pueden ser usados para determinar el tiempo óptimo y el número de enemigos naturales necesarios para las liberaciones aumentativas. Este enfoque ya ha sido usado para determinar la importancia del tamaño de la población de los enemigos naturales en su eficiencia como agentes de control biológico (Kazmer y Luck, 1995).

A veces, varias razas de un enemigo natural son colectadas y podrían ser liberadas para el control biológico clásico de una plaga. La pregunta es ¿cuál de ellas puede ser más eficaz para el control de la población de la plaga? Frecuentemente, es posible usar marcadores neutrales (por ejemplo, ISSR's, microsatélites, etc.) para distinguir entre las diferentes poblaciones de enemigos naturales. Sin embargo, si esas poblaciones son capaces de cruzarse, entonces los marcadores neutrales no son muy útiles para determinar cuál de esas poblaciones es más eficiente a largo plazo porque la asociación entre el marcador neutral y la población original se perderá rápidamente. En general, solamente será posible probar el comportamiento a corto plazo de las diferentes líneas, tal como se describió en el ejemplo anterior para el desempeño relativo en las liberaciones aumentativas.

¿ESTÁN LA PLAGA O EL ENEMIGO NATURAL INFECTADOS CON SIMBIOTES?

En los últimos 20 años ha llegado a ser obvio que muchos insectos están infectados con simbioses. Se ha estimado que hasta el 76% de todas las especies de insectos está infectada por *Wolbachia* (Jeyaprakash y Hoy, 2000). En muchos casos, estos simbioses son necesarios para la sobrevivencia y reproducción del hospedero. Sin embargo, muchos insectos también son infectados con simbioses secundarios que no son vitales para el funcionamiento normal del insecto. Algunas poblaciones son polimórficas para la infección con simbioses secundarios. Los simbioses secundarios pueden tener efectos inusuales

en sus hospederos. Por ejemplo, algunos simbioses secundarios de los áfidos confieren resistencia al parasitismo (Oliver *et al.*, 2003; 2005).

Los simbioses que son clasificados como parásitos reproductivos también son extremadamente comunes y pueden causar incompatibilidad cruzada entre los individuos infectados y los no infectados. Es particularmente importante conocer el estado de la infección de diferentes poblaciones cuando están mezcladas ya sea en el laboratorio para la producción masiva o cuando son liberados en el campo, donde una población está ya establecida (Mochiah *et al.*, 2002). Poblaciones mezcladas infectadas y no infectadas pueden resultar en la disminución del crecimiento poblacional de los enemigos naturales. Varios parásitos reproductivos diferentes son conocidos (e.g., *Wolbachia*, *Cardinium* y *Rickettsia*) y todos pueden ser fácilmente detectados por PCR (Weeks *et al.*, 2003; Zchori-Fein y Perlman, 2004; Hagimori *et al.*, 2006). Algunos otros parásitos reproductivos manipulan la relación sexual de la descendencia de sus hospederos. Por ejemplo, en muchos Hymenoptera, la partenogénesis completa (teliotokia) es causada por una infección con una especie de *Wolbachia*, *Cardinium* o de *Rickettsia* (Stouthamer *et al.*, 1990; Zchori-Fein *et al.*, 2001; Hagimori *et al.*, 2006). Tales infecciones pueden ser benéficas para las aplicaciones del control biológico porque los parasitoides hembra infectados producen solamente hijas, y entonces se promueve un más rápido crecimiento poblacional y consecuentemente la supresión de la plaga. La teliotokia también permite superar problemas asociados con el encuentro de la pareja a bajas densidades, lo cual puede resultar en el fracaso en la persistencia de los enemigos naturales en un área determinada (Stouthamer, 1993). Finalmente, existe un número de parásitos reproductivos que causan la muerte de los machos producidos por una hembra infectada. Tales infecciones son comúnmente encontradas en Coccinellidae (Hurst y Jiggins, 2000). Lo mejor es probablemente remover de las poblaciones de enemigos naturales, tales infecciones que matan a los machos, antes de su liberación.

CONCLUSIONES

Muchas nuevas herramientas moleculares han sido desarrolladas en los últimos veinte años y tienen una aplicación práctica para la identificación de especies para el control biológico, la determinación de las áreas de origen de la plaga, el estudio de la eficiencia de los biotipos de los enemigos naturales, la determinación de la magnitud de los impactos indeseables y la infiltración en el hábitat. Estas herramientas pueden ayudar a mejorar la eficiencia del control biológico, reducir los riesgos indeseados del impacto en otros organismos y aumentar el conocimiento de cómo las estructuras genéticas de las poblaciones de los enemigos naturales y de la plaga, afectan la regulación y la estabilidad de la plaga.

Algunas áreas están todavía poco exploradas con estas técnicas. Por ejemplo, se puede regresar a los viejos proyectos “fallidos” de control biológico, en los cuales los enemigos naturales se establecieron pero no lograron el control económico de la plaga. Se puede determinar si la población de los enemigos naturales experimentó una fuerte disminución en la variabilidad genética, lo que pudo causar problemas en la capacidad de la población para desarrollarse y adaptarse a las condiciones locales. Se pueden usar algunos de los marcadores discutidos an-

teriormente para determinar el nivel de la variación genética presente en la población. Si son detectadas poblaciones genéticamente deficientes de enemigos naturales, la variación genética adicional puede ser importada para aumentar la eficiencia del control biológico de esas poblaciones ya establecidas. Se pueden esperar beneficios de la variación genética adicional. Uno de los ejemplos más dramáticos es el trabajo de Spielman y Frankham (1992). En experimentos para determinar cómo la adición de variación genética afectó a las poblaciones parcialmente pequeñas de *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae), se demostró que la adición de un simple macho inmigrante a esas poblaciones, logró doblar el vigor reproductivo relativo de esas poblaciones. Ejemplos adicionales de los cambios que siguen a la introducción de individuos genéticamente divergentes en las poblaciones, han sido publicados por Tallmon *et al.* (2004).

Con la capacidad aumentada para determinar el origen de las plagas invasoras, ahora también es posible probar varias hipótesis acerca de las mejores áreas para coleccionar enemigos naturales, dentro del rango nativo de distribución de una plaga.

En el control biológico aumentativo, ahora es posible usar líneas marcadas genéticamente para determinar el tiempo óptimo y el número de enemigos naturales a liberar. También es posible determinar si las liberaciones de enemigos naturales contribuyen al control de la plaga.

Similarmente, se puede expandir el trabajo de Kazmer y Luck (1995) para determinar cuáles rasgos de los enemigos naturales son importantes para su actuación en el campo. ¿Es mejor criar enemigos naturales más grandes, más costosos o es más importante la cantidad que es liberada? ¿Es mejor para su funcionamiento en campo liberar parasitoides recién emergidos y sin experiencia con sus hospederos o es mejor permitirles a estos adquirir experiencia en oviposición para mejorar su rendimiento en campo? ¿el alimentar a los parasitoides con miel antes de su liberación mejora su funcionamiento en el control biológico? ¿Qué tan importante es la composición genética de una línea para su funcionamiento e impacto en control biológico? Frecuentemente se asume que la composición genética es importante, sin embargo, esto nunca ha sido probado experimentalmente en un sistema de control biológico (Hopper *et al.*, 1993). La liberación de diferentes líneas genéticas de la misma especie, reconocibles por diferentes marcadores genéticos, pueden responder estos tipos de preguntas fundamentales.

La capacidad para distinguir fácilmente especies de parasitoides diminutos ahora hace posible la determinación exacta de la eficiencia relativa de estas especies en el control biológico inundativo. Por ejemplo, algunas especies de *Trichogramma* pueden ser liberadas simultáneamente en la misma parcela. En el pasado habría sido muy difícil determinar la identidad de las especies parasíticas que emergen de sus hospederos, ahora existe la capacidad para identificar individuos fácilmente con pruebas que pueden ser efectuadas con relativamente poco esfuerzo y con una alta confiabilidad en los resultados.

En el control biológico, el mejoramiento genético selectivo de enemigos naturales para mejorar los rasgos asociados con su eficiencia no ha sido practicado significativamente. Las excepciones notables incluyen la selección de enemigos naturales para la resistencia a plaguicidas (Hoy, 1990), para mejorar la proporción sexual de la descendencia (Wilkes, 1947) y para aumentar la tolerancia a la temperatura (White *et al.*, 1970). Aunque en el pasado era difícil distinguir diferentes líneas genéticas (cuantificar el rendimiento relativo de estas líneas,

por necesidad involucraba probar cada línea en parcelas separadas para evitar problemas con la identificación), usando algunos de los marcadores moleculares discutidos anteriormente, ahora es posible probar líneas seleccionadas diferentes de los enemigos naturales, en la misma parcela de campo.