

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 microsatélites 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 microsatélite 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 microsatélite 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 SIMBIONTES?

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.