

Las herramientas moleculares en el control biológico

Juan Manuel Álvarez¹
Fabián Menalled²
Marjorie A. Hoy³

RESUMEN. Las tecnologías moleculares que trabajan con ADN pueden ser de gran ayuda para las personas que trabajan en control biológico. A pesar de esto, son pocos los ecólogos y entomólogos que han incorporado herramientas moleculares en sus programas de investigación. En este trabajo, hacemos una breve introducción a las herramientas moleculares, describimos sus ventajas y desventajas, y presentamos ejemplos donde las herramientas moleculares han resuelto problemas. Se concluye que las herramientas moleculares prometen ser una gran ayuda para los investigadores en control biológico y deben ser utilizadas en aquellas situaciones donde no exista una forma más económica o sencilla para responder al problema.

Palabras clave: PCR, técnicas basadas en PCR, enemigos naturales, parasitoides.

ABSTRACT. Molecular tools in biological control. Molecular tools that work with DNA may be of great help to those working in biological control. However, few ecologists and entomologists have incorporated molecular tools into their research programs. In this paper, we make a brief introduction to molecular tools, we describe their advantages and disadvantages, and we show examples where molecular tools have solved problems. We conclude that molecular tools can be very helpful in biological control research and should be used whenever a cheaper or simpler way to solve the problem is nonexistent.

Key words: PCR, PCR-based techniques, natural enemies, parasitoids.

Introducción

Entre las áreas de manejo de plagas de artrópodos que podrían beneficiarse por la adopción de técnicas moleculares está el control biológico (Menalled *et al.* 2004). Las tecnologías moleculares que trabajan con ADN pueden ser de gran ayuda para las personas que trabajan en control biológico, en aspectos tan diversos como resolver problemas de sistemática inadecuada de enemigos naturales e insectos plaga; comprobar la pureza de las colonias de enemigos naturales criadas en laboratorio; detectar la presencia de simbiosis; evaluar la resistencia a insecticidas de enemigos naturales e insectos plaga; evaluar el éxito o fracaso en el establecimiento de enemigos naturales; estudiar los patrones de dispersión de enemigos naturales e insectos plaga; y documentar la divergencia genética

entre y dentro de poblaciones de enemigos naturales y plagas (Álvarez 2000). A pesar de esto, son pocos los ecólogos y entomólogos que han incorporado herramientas moleculares en sus programas de investigación (Snow y Parker 1998). En este trabajo, hacemos una breve introducción a las herramientas moleculares, describimos sus ventajas y desventajas, y presentamos ejemplos donde las herramientas moleculares han resuelto problemas en varios de los aspectos expuestos anteriormente.

Herramientas moleculares

Las alozimas son variantes de las enzimas, que representan diferentes alelos de un mismo locus. El análisis de la variación de alozimas (un reflejo de cambios en los genes que codifican por ellas) fue quizás el primer

¹ University of Idaho. Department of Plant Soil and Entomological Sciences, Aberdeen R & E Center, 1693 S. 2700 W. Aberdeen, ID 83210. **EUA.**
jalvarez@uidaho.edu

² Department of Land Resources and Environmental Sciences, 719 Leon Johnson Hall, Montana State University, Bozeman, MT 59717-3120. **EUA.**

³ Department of Entomology and Nematology, Bldg. 970, Natural Area Drive, P.O. Box 110620, University of Florida, Gainesville, FL 32611-0620. **EUA.**

método molecular usado en estudios entomológicos y, desde los años setenta, ha sido el principal método molecular usado en la ecología de insectos. El método conocido como “electroforesis de gel de almidón de proteínas alozímicas”, o simplemente “electroforesis de enzimas”, fue el primer sistema molecular realmente útil para trabajos ecológicos. Aunque la electroforesis de enzimas es barata y relativamente fácil, solamente investiga una pequeña variación en la clase más conservada de ADN —el ADN codificador—, subestimando la cantidad de variación genética en el ADN que no codifica (Álvarez 2000). Este ADN que no codifica, o cuya función desconocemos todavía, ha sido llamado ADN “basura”, “parasítico”, o “egoísta” y puede constituir entre el 30 y el 90% del genoma de un insecto (Hoy 2003). Además, no es una técnica efectiva en el análisis de variabilidad genética de insectos del orden Hymenoptera (donde se encuentran la mayoría de los parasitoides efectivos en agricultura), porque estos presentan una variabilidad excepcionalmente baja en sus alozimas.

La reciente llegada de nuevas técnicas moleculares para investigar directamente la variación en la molécula de ADN ha incrementado la precisión y resolución, facilitado el análisis de diferentes preguntas relevantes en el control biológico. Estas técnicas moleculares han sido y continúan siendo desarrolladas para proveer marcadores moleculares adecuados para analizar diferentes niveles de variación genética entre poblaciones, dentro de poblaciones, y entre especies (Caterino *et al.* 2000).

El número de técnicas moleculares disponibles para estudios entomológicos ha crecido enormemente desde la concepción de la reacción de polimerasa en cadena o PCR (sigla en inglés de *polymerase chain reaction*). Kary Mullins concibió la técnica de PCR en 1983 y recibió el premio Nobel en química por su invención. La presencia de regiones conservadas en las secuencias de ADN, tales como el ADN mitocondrial y el ADN ribosomal, hace posible amplificar fragmentos de organismos cuyo genoma se desconoce (Kocher *et al.* 1989).

Es posible comparar directa o indirectamente diferentes genes, segmentos de genes o segmentos de ADN en el genoma de insectos. Sin embargo, el nivel taxonómico en el cual los genes específicos o las regiones de nucleótidos son útiles varía con los taxones. Es decir, aunque un determinado gen puede ser útil para diferenciar especies cercanas, el mismo gen puede no prestar suficiente definición para separar razas de

insectos dentro de una especie. Por tanto, la parte específica del genoma por usarse dependerá del nivel de resolución que el investigador necesita. Por ejemplo, se han utilizado diferentes regiones mitocondriales (COI, COII, 16S) y nucleares (ITS1, ITS2, 28S, D2, D3 y EF-1) para la separación de especies de parasitoides, con resultados satisfactorios (Álvarez y Hoy 2002).

El número de técnicas moleculares basadas en PCR crece cada año. Entre las diferentes áreas que se han beneficiado por el uso de técnicas basadas en el PCR están la sistemática, la genética de poblaciones y los estudios de resistencia a insecticidas (Loxdale y Lushai 1998, Parker *et al.* 1998). Algunas de las técnicas moleculares basadas en PCR más comunes son el análisis de RFLP (*restriction fragment length polymorphism*), el análisis de microsatélites, el SSCP (*single-strand conformation polymorphism*), los RAPD (*random amplified polymorphic DNA*), y las huellas digitales de AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) (Hedrick 1992, Hughes y Queller 1993, Mueller *et al.* 1996, Symondson y Hemingway 1997). En el Cuadro 1, presentamos una lista de técnicas moleculares con sus respectivas sensibilidad, costo, eficacia, nivel de discriminación y aplicación potencial.

Ventajas y desventajas de las herramientas moleculares

Las técnicas moleculares basadas en PCR presentan varias ventajas, incluyendo la posibilidad de trabajar con insectos extremadamente pequeños, como muchos de los parasitoides más efectivos en el control biológico. Estas técnicas también tienen la ventaja de no verse afectadas por la edad o el estadio de los insectos. Asimismo, en algunos casos pueden ser utilizadas en insectos secos o almacenados en alcohol por algún tiempo, como en el caso de las muestras de museo. Al servir sobre cualquier etapa de la vida del insecto, las técnicas moleculares permiten diferenciar especies de huevos o larvas de parasitoides dentro de sus hospedantes, lo cual suele ser imposible mediante el análisis morfológico tradicional.

Actualmente la mayor desventaja de las técnicas moleculares es su costo, que puede exceder los US\$ 20000 para un equipo básico. Sin embargo, en menos de 20 años el costo de las herramientas moleculares ha bajado y hoy por hoy son más accesibles. Otra desventaja de las herramientas moleculares es la relativa facilidad de contaminación de las muestras. Debido a la sensibilidad de las técnicas que usan PCR, cualquier ADN contaminante puede ser amplificado.

Cuadro 1. Comparación de herramientas moleculares para investigar la variación en segmentos de ADN o en productos de PCR

Característica	PCR-RFLP ^(w)	Microsatélites	SSCP ^(x)	RAPD ^(y) -PCR	AFLP ^(z) -PCR
Sensitividad	Moderada	Alta	Alta-moderada	Moderada	Alta
Costo	Moderado	Moderado	Moderado	Bajo	Moderado
Eficiencia	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta
Nivel de discriminación / tipo de información obtenida (frecuencia de genes o cambios en pares de bases)	Diferencias de nucleótidos individuales en ADN nuclear y mitocondrial / frecuencia de genes.	Diferencias en individuos y poblaciones en ADN nuclear / No frecuencia de genes, tampoco cambios en pares de bases.	Diferencias de nucleótidos individuales en ADN nuclear / frecuencia de genes.	Diferencias de nucleótidos individuales en ADN nuclear / frecuencia de genes.	Diferencias entre individuos y poblaciones / frecuencia de genes.
Aplicación	Diversidad, variación geográfica, zonas de híbridos y límites de especies, filogenia.	Sistemas de apareamiento, diversidad, parentesco, relación.	Parentesco, relación.	Zonas de híbridos y límites de especies, e identificación de subespecies.	Identificación de subespecies.
Ventajas	Requiere poca cantidad de ADN. Puede visualizarse con bromuro de etidio.	Altos niveles de variación presentes en la mayoría de insectos.	Puede usar nuevos haplotipos para análisis adicionales.	Útil para especies con limitada información genética.	Más confiable que RAPD-PCR y más fácil de usar que RFLP y microsatélites. No requiere información de secuencias.
Desventajas	Requiere iniciadores específicos y dos procedimientos separados. Toma más tiempo y es más costoso que PCR de alelos específicos.	Bandas que migran en el gel al mismo tiempo pueden no ser alelos idénticos del mismo locus. Requiere cantidades grandes de ADN de alto peso molecular. Toma bastante tiempo identificar unidades repetidas.	No funciona con todos los productos de PCR. Puede requerir secuenciación.	Requiere poco ADN.	Requiere grandes cantidades de ADN limpio y además un largo protocolo.

Fuente: adaptado de Dowling *et al.* (1996) y Menalled *et al.* (2004).

^(w) Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism.

^(x) Single-strand conformation polymorphism.

^(y) Random amplified polymorphic DNA.

^(z) Amplified fragment length polymorphism.

Igualmente, cualquier contaminación con ADNasas puede degradar las muestras. Otra desventaja de las técnicas moleculares es la dificultad en la ejecución de los protocolos requeridos y en la interpretación de los resultados cuando el investigador no cuenta con suficiente formación en el campo genético.

La sección del genoma por investigar dependerá del nivel de variación que el investigador necesita resolver. Algunos genes son relativamente fáciles de amplificar usando PCR porque se repiten cientos y algunas veces miles de veces en el genoma de los insectos. Un ejemplo son las miles de copias

de los genes nucleares del ADN ribosomal organizados en secuencias. Cada secuencia consiste de regiones que codifican tres subunidades (18S, 5.8S y 28S). Estas subunidades están separadas por dos espaciadores transcritos internos (ITS por la sigla en inglés de *internal transcribe spacer*): el ITS1 y el ITS2. Usualmente, las diferencias entre los ITS de poblaciones y especies de parasitoides son expresadas como una filogenia, lo cual permite separar especies cercanamente relacionadas (Álvarez y Hoy 2002). Sin embargo, varios investigadores han demostrado que dentro de un mismo individuo existe variación en las secuencias de las diferentes copias del ITS (Onyabe y Conn 1999, Hugall *et al.* 1999, Harris y Crandall 2000). Esta variación puede resultar en la creación de filogenias erróneas si las variantes dentro de un individuo y entre individuos difieren tanto como las variantes entre poblaciones y especies (Rich *et al.* 1997). Por tanto, es importante asegurarse de que un número significativo de copias de ITS de cada individuo sea usado en los análisis filogenéticos. Desafortunadamente, esto puede acrecentar de modo significativo el costo de los experimentos.

La selección de la herramienta molecular depende del tipo de problema por resolver, el costo de la técnica, la dificultad del método, y el número de muestras por analizar. Una de las técnicas moleculares más populares en estudios entomológicos basadas en PCR es el análisis de RAPD-PCR, quizás porque no requiere información previa acerca de la secuencia de ADN, provee rápidamente marcadores moleculares, y es relativamente barata y fácil de usar (Williams *et al.* 1990, Álvarez 2000). Sin embargo, al principio los RAPD fueron criticados porque sus resultados eran difíciles de reproducir (Ellsworth *et al.* 1993); más recientemente, algunos investigadores han probado que la reproducción de los resultados puede mejorarse. Por ejemplo, Reineke *et al.* (1999) recomiendan amplificar el ADN en una segunda reacción para probar la reproducibilidad de los patrones de bandas obtenidos por esta técnica.

A pesar de los problemas asociados con las diferentes técnicas, las herramientas moleculares prometen ser útiles para resolver problemas entomológicos como los que presentamos a continuación.

Resolución de problemas de sistemática inadecuada

El éxito de un programa de control biológico depende en gran medida de la correcta identificación de la plaga o del enemigo natural. Los enemigos naturales más

efectivos presentan alta especificidad sobre sus insectos hospedantes (Álvarez *et al.* 1999, Menalled *et al.* 2004). Por tanto, la identificación correcta es especialmente importante cuando existen otras especies cercanamente relacionadas a la plaga o al enemigo natural. A pesar de que la evaluación de caracteres morfológicos es la herramienta predominante para distinguir especies de insectos, muchos grupos de enemigos naturales son morfológicamente indistinguibles (especies crípticas) a pesar de su diversidad genética. Rosen (1986), en su capítulo sobre control biológico y especies crípticas, presenta una serie de ejemplos donde la identificación incorrecta de la plaga o de los enemigos naturales fue la causa de costosos fracasos en la implementación de diferentes proyectos de control biológico.

Los investigadores en control biológico han descubierto un número creciente de especies crípticas de parasitoides. En los últimos 40 años, las herramientas bioquímicas y moleculares han permitido explorar las diferencias a nivel genético entre individuos de especies crípticas. Según De Bach (1969), todas las diferencias genéticas entre enemigos naturales pueden ser importantes, sin importar qué tan hábil sea el investigador separando estas especies morfológicamente.

En los Estados Unidos, el minador asiático de los cítricos, *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae), se detectó por primera vez en el estado de la Florida en 1993 (Hoy y Nguyen 1997). En seguida comenzó un programa de control biológico clásico en contra de esta plaga y se introdujeron dos poblaciones del parasitoide *Ageniaspis* (Hymenoptera: Encyrtidae). Una población provenía de Australia y la otra de Taiwán; no se podía distinguir morfológicamente entre ellas y los taxónomos especialistas identificaron a ambas poblaciones como *Ageniaspis citricola* Logvinoskaya, un parasitoide de color negro extremadamente pequeño (hasta 1 mm de longitud). Álvarez (2000) determinó que las poblaciones de *A. citricola* de distinta proveniencia geográfica presentaban algunas diferencias biológicas y de comportamiento. Estas diferencias sugirieron la necesidad de conducir un estudio de las dos poblaciones con métodos moleculares. Hoy *et al.* (2000) utilizaron RAPD y determinaron que las poblaciones eran genéticamente diferentes. Álvarez y Hoy (2002) confirmaron las diferencias genéticas por medio del análisis de secuencias del ITS2 del ADN ribosomal; después de analizar múltiples clones del ITS2, estos autores descubrieron que la variación en las secuencias dentro de individuos era mayor que la variación de las secuencias entre individuos. Esta gran

variabilidad en la secuencia y longitud de las diferentes copias del ITS2 entre individuos sugirió que la evolución concertada no ha homogenizado todas las copias de los genes del ARNr dentro de los individuos y poblaciones de *Ageniaspis*. Sin embargo, los segmentos de ITS2 fueron informativos filogenéticamente y separaron satisfactoriamente las poblaciones australianas y taiwanesas de *Ageniaspis* (Álvarez y Hoy 2002). Estos resultados sugieren la existencia de dos especies crípticas de diferente proveniencia geográfica.

Como las dos poblaciones de *Ageniaspis* fueron introducidas al estado de la Florida en los Estados Unidos casi al mismo tiempo, y los parasitoides se establecieron en los cultivos de cítricos, no se tenía certeza sobre cuál de las dos poblaciones se habían establecido o si ambas lo había logrado. En experimentos adicionales, Álvarez (2000) analizó individuos de *Ageniaspis* recolectados en 10 sitios distribuidos a lo largo de 7 condados de la Florida. Usando RAPD, el autor concluyó que todos los individuos provenían de Australia y que probablemente los individuos taiwaneses no pudieron establecerse en Florida. Estas conclusiones permitieron seleccionar individuos de *Ageniaspis* para exportarlos a diferentes sitios del Caribe, como las Bahamas y las Islas Bermudas (Hoy y Jessey 2004), y otros países como Brasil, Chile, España, Honduras, Italia, México, y Marruecos, que presentan condiciones climáticas similares a la Florida (Hoy, sin publicar).

Resolución de problemas de contaminación de colonias de parasitoides

El género *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) es bien conocido por todos los practicantes del control biológico. Los microhimenópteros de este género son criados comercialmente y utilizados ampliamente en programas de control biológico aumentativo, como parte de programas de manejo integrado de plagas de lepidópteros. Sin embargo, por causa de su tamaño diminuto y la dificultad de la separación visual (morfológica) entre especies y razas, es frecuente la contaminación en las colonias de crianza de los laboratorios que comercian con ellos. En consecuencia, también es frecuente obtener resultados desalentadores después de la liberación de los parasitoides (Dourojeanni 1990).

La taxonomía de estos y otros microparasitoides de otros géneros, tales como *Anaphes* (Hymenoptera: Mymaridae), se ha beneficiado por la utilización de herramientas moleculares. Landry *et al.* (1993) desarrollaron un sistema para separar especies de

Trichogramma y *Anaphes* basado en análisis de RAPD. También se han empleado secuencias de ADN del ITS2 y del COII para separar la mayoría de especies de *Trichogramma* y describir nuevas especies en este género (Silva *et al.* 1999, Stouthamer *et al.* 1999, Pinto *et al.* 2002, Borghuis *et al.* 2004).

Detección de la presencia de simbios

Los eucariontes presentan un genoma nuclear y un genoma mitocondrial. Las mitocondrias son consideradas generalmente como simbios microbiales que fueron modificados después de un largo proceso evolutivo dentro de las células de los eucariontes (Martin 1999). Además de la mitocondria, los insectos tienen una estrecha relación intra- y extra-celular con una gran diversidad de organismos, tales como virus, bacterias, levaduras, y rickettsias (Douglas 1992). En general, se desconocen los detalles de las relaciones entre estos microorganismos y sus hospedantes, pero gracias a las herramientas moleculares los investigadores están aprendiendo mucho más acerca de ellos (Hoy 2003).

Por ejemplo, es común encontrar en artrópodos un género de proteobacterias llamado *Wolbachia* (Jeyaprakash y Hoy 2002). Esta bacteria endosimbiote infecta los tejidos reproductivos de los artrópodos y se transmite por vía materna en el citoplasma (Hoy *et al.* 2003). Jeyaprakash y Hoy (2002) observaron que el 76% de 63 especies de artrópodos estaba infectado con esta bacteria, que afecta la reproducción de sus hospedantes en diferentes formas, causando la incompatibilidad reproductiva (Stouthamer 1997). Por esta razón, varios investigadores creen que esta bacteria está involucrada en procesos de especiación.

Álvarez (2000) utilizó la técnica conocida como "PCR largo" para detectar la presencia de *Wolbachia* en las dos especies crípticas de parasitoides previamente descritas del género *Ageniaspis* y en su insecto hospedante, el minador de los cítricos. La clonación y secuenciación del gen *wsp*, el cual codifica por una proteína de la superficie de *Wolbachia*, reveló diferentes tipos de *Wolbachia* que infectaban individuos de las dos especies crípticas de *Ageniaspis*. Estos resultados proveen evidencia adicional del aislamiento reproductivo o de la diferenciación genética entre las poblaciones australianas y taiwanesas de *Ageniaspis*.

Determinación de la presencia de endoparasitoides e hiperparasitoides

Algunos proyectos de control biológico requieren la determinación del parasitismo y la identificación

de los parasitoides en sus estados larvales dentro de sus hospedantes. En la mayoría de casos, esto requiere la disección del hospedante y montar sobre láminas de microscopía la larva del endoparasoide. Es imposible determinar la especie de algunos parasitoides cuando no existen claves morfológicas para sus estados larvales y, en estos casos, es necesario esperar hasta que los adultos emerjan del hospedante para identificarlos. Por ejemplo, Álvarez *et al.* (1999) determinaron la presencia de parasitismo del afelínido *Encarsia* sp. aff. *diaspidicola* (Silvestri) únicamente después de siete días de la oviposición del parasitoide en su hospedante, la escama de San José *Quadraspidiotus perniciosus* (Comstock). Siete días después de ser parasitadas, las escamas adquirían una apariencia brillante y oleácea y su color amarillo oscurecía. Las herramientas moleculares son de gran utilidad para determinar la presencia de endoparasitoides aun antes de poder verlos. Con la ayuda de las herramientas moleculares, la presencia del parasitoide adentro de su hospedante se puede detectar incluso horas después de la oviposición en lugar de esperar más de siete días para su detección visual.

En términos generales, los hiperparasitoides se consideran como algo negativo en el control biológico, porque pueden limitar las poblaciones de algunos parasitoides primarios. Sin embargo, es muy difícil predecir la influencia de los hiperparasitoides sobre los parasitoides primarios, porque la diversidad de especies de los primeros y la cantidad de individuos de los segundos puede variar mucho de un sitio a otro y de un año a otro (Sullivan 1987). En el caso del hiperparasitoide icneumonídeo *Mesochorus* sp. sobre el braconídeo *Peristenus* sp., el cual es un parasitoide primario de los míridos *Lygus* spp., es bastante difícil determinar los niveles de hiperparasitismo al diseccionar el hospedante mírido (Day 2002). La causa de esto es que la larva del hiperparasitoide está adentro del parasitoide, el cual a su vez se encuentra adentro del hospedante mírido. El tamaño de los hiperparasitoides y su ubicación dentro del parasitoide primario hacen que la determinación del hiperparasitismo mediante la disección sea poco práctica. Por tanto, la única opción que existía antes del uso de herramientas moleculares era la cría de los insectos y la determinación morfológica de las especies después de la emergencia de los adultos. Sin embargo, en este sistema de hiperparasitoide (*Mesochorus* sp.)-parasitoide (*Peristenus* sp.), ambos insectos tienen una diapausa obligatoria, la cual implica que los tiempos

de cría para obtener estimados acertados de los niveles de parasitismo y confirmar la identificación de las especies puede tomar más de ocho o nueve meses (Ashfaq *et al.* 2005).

Ashfaq *et al.* (2005) usaron secuencias del ITS para desarrollar iniciadores de PCR que pudieran detectar la presencia de *Mesochorus* sp. en el hospedante *Lygus* spp. Los análisis de PCR de individuos de *Lygus* spp. recolectados en el campo arrojaron resultados similares en los niveles de hiperparasitismo de *Mesochorus* sp. a los resultados obtenidos mediante la cría de los insectos en el laboratorio. De esta forma, los investigadores pudieron procesar un mayor número de insectos en un menor tiempo y con bastante certeza en la identificación de las especies. Adicionalmente, con el uso de las secuencias de ITS y CO1 y el subsiguiente análisis de enzimas de restricción sobre los productos de PCR del ITS de *Mesochorus* sp., Ashfaq *et al.* (2005) determinaron la posible presencia de especies crípticas en este hiperparasitoide.

Mayor eficiencia de los enemigos naturales

Se han utilizado tecnologías de ADN recombinante para estudiar insectos plaga y organismos benéficos. Algunos investigadores utilizan dichas tecnologías para mejorar la eficiencia de organismos benéficos y para disminuir el potencial dañino de insectos plaga. Por ejemplo, Sun *et al.* (2004) construyeron un baculovirus recombinante incrementando el potencial de este para infectar el gusano de la bellota de algodón (*Helicoverpa armigera*). Estos investigadores pudieron comprobar que el baculovirus recombinante (HaSNPV-AaIT) redujo el tiempo promedio de sobrevivencia del insecto plaga, e infectó más rápidamente que un genotipo silvestre del baculovirus que había sido aislado a través de un método de clonación *in vivo*. Como consecuencia del incremento en la eficiencia del baculovirus recombinante, el campo donde fue aplicado produjo una cosecha de fibra de algodón 22,1% mayor que donde se aplicó el genotipo silvestre. El empleo de tecnologías recombinantes para aumentar el potencial de los bioplaguicidas seguramente resultará en la formulación de productos comerciales más eficientes.

El futuro

Los métodos moleculares son herramientas que pueden ser utilizadas por investigadores en diferentes campos científicos, incluyendo el control biológico. La mayoría de profesionales del control biológico reciben un

entrenamiento amplio en entomología y ecología, pero raramente en genética y, por tanto, no están al tanto de las técnicas disponibles (Hoy 1986). Asimismo, pocos genetistas están entrenados en control biológico y la mayoría no entiende la necesidad de los proyectos aplicados (Hoy 1986). Así, para progresar más en el uso de herramientas moleculares en un programa de control biológico de plagas, es necesaria una colaboración estrecha entre taxónomos, ecólogos, entomólogos, genetistas y biólogos moleculares.

Las herramientas moleculares no siempre son apropiadas y en la mayoría de los casos son más costosas que otras técnicas. Sin embargo, tienen bastante potencial y pueden resolver interrogantes que probablemente no se pueden resolver de ninguna otra forma. Sin duda, la utilización de herramientas moleculares en la producción masiva de enemigos naturales ayudará a mantener y mejorar la calidad de dichos insectos, la cual es crítica en el éxito de cualquier programa de control biológico.

En los últimos años, el número de taxónomos especializados en algunos grupos de insectos ha disminuido considerablemente. Las herramientas moleculares incrementan la precisión en la identificación de enemigos naturales y plagas y serán especialmente importantes en la separación de especies crípticas con diferentes requerimientos ambientales y atributos biológicos, cuando los taxónomos no estén disponibles o simplemente cuando la morfología no baste para diferenciar entre dichas especies.

Algunos investigadores han propuesto utilizar herramientas moleculares para mejorar la eficiencia de los enemigos naturales. La idea no es nueva y ya en 1985 Beckendorf y Hoy (1985) proponían alterar la proporción de machos y hembras para obtener más hembras que parasitaran sus hospedantes, y además incrementar la longevidad, fecundidad y especificidad de los enemigos naturales. Otros investigadores han propuesto modificar genéticamente algunas plantas por medio de técnicas de transformación genética, de tal manera que provean mejor alimentos suplementarios para algunos enemigos naturales, como los parasitoides himenópteros, y de esta manera puedan mejorar su eficiencia como enemigos naturales. Una vez que los investigadores obtengan los medios para introducir genes dentro de los cromosomas de plantas e insectos, podemos esperar una explosión de estudios básicos y aplicados.

En resumen, las herramientas moleculares prometen ser una gran ayuda para los investigadores en

control biológico y deben ser utilizadas en aquellos problemas donde no exista una forma más económica o sencilla para responder al problema.

Literatura citada

- Álvarez, JM. 2000. Use of molecular tools for discriminating between two populations of the citrus leafminer parasitoid *Ageniaspis* (Hymenoptera: Encyrtidae). Ph.D. dissertation. Gainesville, FL, US, Department of Entomology and Nematology, University of Florida. 90 p.
- _____; Hoy, MA. 2003. Molecular markers in classical biological control of the citrus leafminer: taxonomic and ecological evaluations. In VanDriesche, RG, ed. International Symposium of Biological Control (1, 2002). Morgantown, WV, US, USDA Forest Service Publication FHTET. p. 75-89.
- _____; Hoy, MA. 2002. Evaluation of the ribosomal ITS2 DNA sequences in separating closely related populations of the parasitoid *Ageniaspis* (Hymenoptera: Encyrtidae). *Annals of the Entomological Society of America* 95:250-256.
- _____; Van Driesche, RG; Cornell, J. 1999. Effect of *Encarsia* nr. *diaspidicola* (Hymenoptera: Aphelinidae) parasitism on *Cybocephalus* nr. *nipponicus* (Coleoptera: Cybocephalidae) egg laying choices. *Biological Control* 15:57-63.
- Ashfaq, M; Erlandson, M; Braun, L. 2005. Hyperparasitism by *Mesochorus* spp. (Hymenoptera: Ichneumonidae) in *Peristenus* sp. (Hymenoptera: Braconidae) and development of PCR primers for hyperparasitoid detection. *Biological Control* 32:371-377.
- Beckendorf, SK; Hoy, MA. 1985. Genetic improvement of arthropod natural enemies through selection, hybridization or genetic engineering techniques. In Hoy, MA; Herzog, DC. eds. *Biological control in agricultural IPM systems*. New York, US, Academic Press. p. 167-187.
- Borghuis, A; Pinto, JD; Platner, GR; Stouthamer, R. 2004. Partial cytochrome oxidase II sequences distinguish the sibling species *Trichogramma minutum* Riley and *Trichogramma platneri* Nagarkatti. *Biological Control* 30:90-94.
- Caterino, MS; Cho, S; Sperling, FAH. 2000. The current state of insect molecular systematics: a thriving tower of Babel. *Annual Review of Entomology* 45:1-54.
- DeBach, P. 1969. Uniparental, sibling and semi-species in relation to taxonomy and biological control. *Israel Journal of Entomology* 4:11-28.
- Douglas, AE. 1992. Symbiotic microorganisms in insects. *Encycl. Microbiol.* 4:165-178.
- Dourojeanni, MJ. 1990. Entomology and biodiversity conservation in Latin America. *American Entomologist* 36:88-93.
- Ellsworth, DL; Rittenhouse, KD; Honeycutt, RL. 1993. Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. *BioTechniques* 14:214-217.
- Harris, DJ; Crandall, KA. 2000. Intra-genomic variation within ITS1 and ITS2 of freshwater crayfishes (Decapoda: Cambaridae): implications for phylogenetic and microsatellite studies. *Mol. Biol. Evol.* 17, 284-291.
- Hedrick, P. 1992. Shooting the RAPDs. *Nature* 355:679-680.
- Hughes C.R. y Queller, D.C. 1993. Detection of highly polymorphic microsatellite loci in a species with little allozyme polymorphism. *Molecular Ecology* 2:131-137.

- Hoy, MA. 1986. Use of genetic improvement in biological control. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 15:109-119.
- _____. 2003. Insect molecular genetics. An introduction to principles and applications. 2 ed. Orlando, FL, US, Academic Press. 544 p.
- _____; Nguyen, R. 1997. Classical biological control of the citrus leafminer *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae): theory, practice, art, and science. *Tropical Lepidoptera* 8 (Suppl. 1):1-19.
- _____; Jessey, C. 2004. *Ageniaspis citricola* (Hymenoptera: Encyrtidae) established in Bermuda. *Florida Entomologist* 87:229-230.
- _____; Jeyaprakash, A; Morakote, R; Lo, PKC; Nguyen, R. 2000. Genomic analyses of two populations of *Ageniaspis citricola* (Hymenoptera: Encyrtidae) suggest that a cryptic species may exist. *Biological Control* 17:1-10.
- _____; Jeyaprakash, A; Álvarez, JM; Allsopp, M. 2003. *Wolbachia* is present in the honeybees *Apis mellifera capensis*, *A.m. scutellata* and their hybrids in Southern Africa. *Aphidology* 34:53-60.
- Hugall, A, Stanton, J; Moritz, C. 1999. Reticulate evolution and the origins of ribosomal internal transcribed spacer diversity in apomictic *Meloidogyne*. *Mol. Biol. Evol.* 16:157-164.
- Jeyaprakash, A; Hoy, MA. 2002. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: *wsp* sequences found in 76% of 63 arthropod species. *Insect Molecular Biology* 9:393-405.
- Kocher, TD; Thomas, WK; Meyer, A; Edwards, SV; Pääbo, S; Villablanca, FX; Wilson, AC. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Science* 86:6196-6200.
- Landry, BS; Dextraze, L; Boivin, G. 1993. Random amplified polymorphic DNA markers for DNA fingerprinting and genetic variability assessment of minute parasitic wasp species (Hymenoptera: Mymaridae and Trichogrammatidae) used in biological control programs of phytophagous insects. *Genome* 36:580-587.
- Loxdale, HD; Lushai, G. 1998. Molecular markers in entomology. *Bulletin of Entomological Research* 88:577-600.
- Martin, W. 1999. A briefly argued case that mitochondria and plastids are descendants of endosymbionts, but that the nuclear compartment is not. *Proceedings of the Royal Society London B* 266:1387-1395.
- Menalled, F; Álvarez, JM; Landis, D. 2004. Molecular techniques, habitat management and parasitoid conservation in annual cropping systems. *In* Gurr, G; Wratten, S; Altieri, MA. eds. *Ecological Engineering: Advances in habitat manipulation for arthropods* 6:103-117.
- Mueller, UG; Lipari, SE; Milgroom, MG. 1996. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) fingerprinting of symbiotic fungi cultured by the fungus-growing ant *Cyphomyrmex minutus*. *Molecular Ecology* 5:119-122.
- Onyabe, DY; Conn, JE. 1999. Intragenomic heterogeneity of a ribosomal DNA spacer (ITS2) varies regionally in the neotropical malaria vector *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae). *Insect Molecular Biology* 8:435-442.
- Parker, P.G., Snow, A.S., Schug, M.D., Booton G.C. y Fuerst, P.A. 1998. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology* 79:361-382.
- Pinto, JD; Koopmanschap, AB; Platner, GR; Stouthamer, R. 2002. The North American *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) parasitizing certain Tortricidae (Lepidoptera) on apple and pear, with ITS2 DNA characterizations and description of a new species. *Biological Control* 21:134-142.
- Reineke, A; Karlovsky, P; Zebitz, CPW. 1999. Suppression of randomly primed polymerase chain reaction products (random amplified polymorphic DNA) in heterozygous diploids. *Molecular Ecology* 8:1449-1455.
- Rich, SM; Rosenthal, BM; Telford, SR III; Spielman, A; Hartl, DL; Ayala, FJ. 1997. Heterogeneity of the internal transcribed spacer (ITS-2) region within individual deer ticks. *Insect Molecular Biology* 6:123-129.
- Rosen, D. 1986. The role of taxonomy in effective biological control programs. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 15:121-129.
- Silva, IMMS; Honda, J; Kankan, F; Hu, J; Neto, L; Pintureau, B; Stouthamer, R. 1999. Molecular differentiation of five *Trichogramma* species occurring in Portugal. *Biological Control* 16:177-184.
- Snow, AA; Parker, PG. 1998. Molecular markers for population biology. *Ecology* 79:359-360.
- Stouthamer, R. 1997. *Wolbachia*-induced parthenogenesis. *In* O'Neill, SL; Hoffmann, AA; Werren, JH. eds. *Influential passengers, inherited microorganisms and arthropod reproduction*. Oxford, Oxford University Press. p. 102-124.
- _____; Hu, J; van Kan, F; Platner, GR; Pinto, JD. 1999. The utility of internally transcribed spacer 2 DNA sequences of the nuclear ribosomal gene for distinguishing sibling species of *Trichogramma*. *BioControl* 43:421-440.
- Sullivan, DJ. 1987. Insect hyperparasitism. *Annual Review of Entomology* 32:49-70.
- Sun, X; Wang, H; Sun, X; Chen, X; Peng, C; Pan, D; Jehle, JA; van der Werf, W; Vlak, JM; Hu, Z. 2004. Biological activity and field efficacy of a genetically modified *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus expressing an insect-selective toxin from a chimeric promoter. *Biological Control* 29:124-137.
- Symondson, WOC; Hemingway, J. 1997. Biochemical and molecular techniques. *In* Dent, DR; Walton M.;P. (eds.) *Methods in Ecological and Agricultural Entomology*. CAB International, Oxon. p. 293-350.
- Williams, JGK; Kubelik, AR; Livak, KJ; Rafalski, JA; Tingey, SV. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18:6531-6535.