



El empleo de *Trichogramma* en control biológico de plagas: problemas taxonómicos

Fernando Moreno Grijalba & Ignacio Pérez Moreno

Departamento de Agricultura y Alimentación.
Universidad de La Rioja.
c/ Madre de Dios, 51.
26006 – Logroño (La Rioja)

Sección coordinada y dirigida por
Ignacio Pérez Moreno
Departamento de Agricultura y
Alimentación. Universidad de
La Rioja. c/ Madre de Dios, 51.
26006 – Logroño (La Rioja)
ignacio.perez@daa.unirioja.es

Introducción

El género *Trichogramma* constituye un grupo de himenópteros parasitoides de huevos de insectos muy utilizado en programas de control biológico de plagas, principalmente contra lepidópteros. Es conocido desde hace más de 150 años (fue descrito como género por Westwood en 1833) y actualmente comprende alrededor de 150 especies (YOUSUF Y SHAFEE, 1986).

Como en el caso de otros taxones de importancia económica, la sistemática y taxonomía del grupo tienen gran relevancia. De entre todos los Chalcidoidea, superfamilia a la que pertenece (formada enteramente por parasitoides), las especies del género *Trichogramma* probablemente han sido y son las más utilizadas a nivel mundial en control biológico de plagas, especialmente *T. evanescens*, *T. dendrolimi*, *T. pretiosum*, *T. brassicae* (= *maidis*) y *T. nubilale* (SMITH, 1996). Debido a su importancia, han sido bastante más estudiados que cualquier otro parasitoide. Asimismo, no se conoce hoy en día ningún hábitat terrestre no polar que carezca de representantes de este género, siendo por tanto un género cosmopolita. Este hecho tiene una gran influencia en los programas de control biológico, sea cual sea la estrategia elegida para llevarlo a cabo y especialmente si se trata de la inoculativa, ya que la tendencia actual en este sentido gira en torno al empleo de especies nativas siempre que sea posible, puesto que se supone que están mejor adaptadas al medio que las exóticas. En cualquier programa bien concebido, debemos ser capaces de identificar taxonómicamente esa fauna nativa y distinguirla de la que es empleada en el programa de control biológico (sea exótica o no). De esta manera es posible controlar la identidad de la población introducida y evaluar el éxito del programa.

Desafortunadamente, *Trichogramma* es también conocido por ser un género de taxonomía muy difícil. La buena noticia es que en ese siglo y medio largo de historia, la ciencia y la tecnología han avanzado enormemente y actualmente disponemos de una batería de herramientas para discriminar, separar e identificar géneros, especies, ecotipos, etc. Las últimas incorporaciones a esta serie de técnicas han sido los marcadores moleculares y las técnicas de biología molecular, que constituyen, sin duda, potentes “armas” en el campo que nos ocupa (taxonomía y sistemática). Prueba de esto último es la importante proliferación de marcadores y técnicas moleculares ocurrida en los últimos años (LOXDALE & LUSHAI, 1998), que con el tiempo serán de uso generalizado en muchos de los campos que componen las ciencias biológicas, especialmente las basadas en el ADN.

Problemas taxonómicos

El primer problema que aparece a la hora de identificar especies de *Trichogramma* es la notable homogeneidad morfológica del género. Es decir, no hay *a priori* caracteres morfológicos que permitan separar especies claramente. La necesidad de identificación de especies en los trabajos aplicados (control biológico) ha conducido al empleo de caracteres no tradicionales para su separación. NAGARKATTI & NAGARAJA (1971) observaron que la genitalia masculina variaba notablemente y que esas diferencias encontradas se correlacionaban bastante bien con datos reproductivos. Hasta ese momento no existían caracteres, morfológicos o no, que se estuvieran relacionados adecuadamente con otros datos o rasgos sistemáticos, como el modo de reproducción o la incompatibilidad reproductiva, por lo que su validez era escasa. Hoy en día, la genitalia masculina sigue teniendo un gran peso en la sistemática de *Trichogramma*. Sin embargo, esto no nos sirve de nada si los ejemplares que queremos determinar son hembras o si estamos trabajando con especies o poblaciones partenogénicas telitocas, compuestas exclusivamente por hembras.

Otra característica del género que dificulta su identificación es su tamaño. Muchos entomólogos consideran a los Chalcidoidea como un grupo de taxonomía engorrosa debido a su diminuta talla (entre 0,2 y 1,5 mm) y suelen desecharlos sistemáticamente del material recolectado (NOYES, 1982). Lógicamente, el tamaño también tiene implicaciones negativas en aspectos como la captura, la conservación y el montaje de los ejemplares.

Además de la homogeneidad morfológica que presenta este género, existen otros factores que han contribuido a agravar su compleja sistemática. Varios de los tipos de *Trichogramma* se han perdido, están destruidos, dañados o son hembras (PINTO & STOUTHAMER, 1994). Como consecuencia de la pérdida o inutilidad de estas valiosas referencias, ha aumentado considerablemente la confusión en cuanto a la nomenclatura del género, de tal forma que muchos de los nombres de las especies se aplican incorrectamente, produciéndose gran confusión entre los propios especialistas. Para solucionar este embrollo hay que definir claramente los tipos existentes en la actualidad, sustituir aquellos que estén dañados y designar neotipos en el caso de que el tipo original se haya perdido o destruido.

Herramientas Sistemáticas

En los estudios actuales sobre la sistemática de *Trichogramma*, la genitalia sigue teniendo un peso determinante. Sin embargo, debido a las razones ya comentadas, en el caso de especies cercanas filogenéticamente o de especies o poblaciones telitocas, resulta insuficiente o inservible. Es por ello que actualmente se emplean, con mayor o menor frecuencia, cuatro grupos de herramientas para la identificación de esos casos más complejos: datos morfológicos (excluyendo la genitalia masculina), datos reproductivos (tipo de reproducción, compatibilidad, etc), marcadores proteicos (alozimas, esterazas, etc.) y marcadores de ADN (ADNmt, ADNr y RAPDs).

1.- Datos morfológicos

Cuando entre dos organismos hay diferencias morfológicas notables, asumimos que dichas diferencias tienen una base genética y por tanto consideramos que se trata de especies distintas. Sin embargo, conforme las diferencias se hacen más pequeñas, la frontera entre origen genético y origen ecofenotípico (ambiental) se hace más difusa. Basar la definición de especies en diferencias morfológicas mínimas requiere un amplio conocimiento de la plasticidad de los caracteres y de la variabilidad intraespecífica del taxon, algo aún no muy trabajado en *Trichogramma* (PINTO & STOUTHAMER, 1994).

Muchos de los caracteres que se emplearon inicialmente para separar especies de *Trichogramma* resultaron ser poco fiables debido a su plasticidad. Todavía actualmente podemos encontrar en la bibliografía ejemplos de estudios morfométricos y de relaciones alométricas. Los datos obtenidos de esta manera se procesan mediante análisis multivariante para discriminar anatómicamente especies cercanas. BASSO *et al.* (1999) separaron dos morfotipos de *Trichogramma* en base a las medidas de seis caracteres morfológicos: *T. pretiosum* y *T. exiguum*. RODRÍGUEZ *et al.* (1996) intentaron establecer o aclarar la identidad taxonómica de algunas poblaciones de *Trichogramma*. Para ello emplearon, entre otros métodos, datos morfológicos. Sobre los ejemplares seleccionados realizaron un total de 21 medidas, correspondientes a tres estructuras diferentes (ala anterior, pata posterior y genitalia) llegando a la conclusión de que para la separación fiable de especies no basta con el empleo de los caracteres morfológicos sino que son también necesarias técnicas de biología molecular.

2.- Datos reproductivos

Los datos reproductivos suelen referirse al tipo de reproducción o a la compatibilidad reproductiva entre individuos. En cuanto al tipo de reproducción, la mayoría de las especies de *Trichogramma* son partenogenéticas arrenotocas. Es decir, las hembras ponen huevos tanto fecundados (que darán hembras) como no fecundados (que darán machos). Sin embargo, algunas especies o determinadas poblaciones de especies normalmente arrenotocas, son telitocas. Por tanto, todos los huevos que se desarrollan

producen hembras, no existiendo machos en estos casos. Dada la poca disponibilidad de caracteres morfológicos que permitan identificar fiablemente a las hembras de este género, las especies y poblaciones telitocas constituyen un problema taxonómico considerable. Se conocen dos causas que pueden originar esta telitocia: la hibridación entre individuos de diferentes especies y la infección por determinados microorganismos. En ocasiones, esta telitocia desaparece de forma natural, mientras que en otras se puede forzar su desaparición mediante tratamientos antibióticos o térmicos, con lo que vuelven a aparecer machos. De esta forma se puede llegar a determinar su identidad. PINTUREAU (1997) utilizó el tipo de reproducción de dos especies de *Trichogramma* (*T. embryophagum* y *T. cacoeciae*) para diferenciarlas. *T. cacoeciae* siempre es telitoca, mientras que *T. embryophagum* es arrenotoca, aunque existen poblaciones telitocas. La telitocia de *T. embryophagum* es debida a la bacteria *Wolbachia trichogrammae*, mientras que en el caso de *T. cacoeciae* parece ser genética, como resultado de hibridaciones sucesivas.

Otra opción muy empleada es el cruzamiento experimental interespecífico, a partir del cual se establece el grado de incompatibilidad reproductiva (PINTUREAU, 1991). Aunque los datos reproductivos suelen tener un gran peso en la separación de las especies, es interesante señalar que un resultado de incompatibilidad completa no es un prerequisite para el reconocimiento de especies. STOUTHAMER *et al.* (2000) llevaron a cabo un estudio acerca de la incompatibilidad reproductiva entre *T. minutum* y *T. platneri*, así como sus repercusiones en control biológico. Entre ambas especies no hay claras diferencias morfológicas, ni moleculares. Su *status* de especies diferentes se basa en la ausencia de hembras en la progenie de los cruces entre ellas. La causa de la ausencia de hembras es debida a la muerte de los huevos fertilizados. Además, encontraron que las hembras no mostraban preferencia alguna a la hora de aparearse con los machos de su especie, es decir, se aparean indistintamente con machos de su especie y con los machos de la otra. Este hecho plantea importantes consecuencias en control biológico de plagas, ya que en caso de llevar a cabo un programa de control con cualquiera de estas especies en un área donde la otra especie esté presente de forma natural, se produciría una disminución en la eficacia del control.

Una desventaja de este grupo de caracteres es que un taxon sólo puede ser definido como especie con respecto a otro taxon (con el que se cruza). La definición de especie no se basa en características propias (como podrían ser las morfológicas) que lo hacen único y lo distinguen del resto de especies, sino en datos que solamente permiten separarlo de otro taxon.

3.- Marcadores moleculares

Podemos distinguir claramente dos grandes tipos de marcadores moleculares: los marcadores proteicos y los basados en el ADN. Inicialmente, los marcadores proteicos eran los que se usaban en la mayoría de los estudios. Sin embargo, muchos de ellos se han visto superados y sustituidos por los marcadores de ADN en los últimos 10-15 años. A este auge y proliferación de los marcadores basados en el ADN ha contribuido de manera decisiva la puesta a punto de revolucionarias técnicas de biología molecular, de las que la más "sonada" es, sin duda alguna, la PCR (reacción en cadena de la polimerasa). El desarrollo de esta herramienta y sus innumerables variantes permitió, a su vez, el desarrollo de otra serie de técnicas más recientes (RFLPs, RAPDs, VNTRs, SSRs, AFLPs, DALPs, etc.).

Los marcadores proteicos se siguen usando debido a que resultan más baratos y más fáciles de aislar, desarrollar y utilizar que los basados en el ADN. Dan lugar a patrones de bandeos simples o multi-locus, generalmente de naturaleza mendeliana (fáciles de analizar e interpretar). Su análisis estadístico está claramente establecido y muy desarrollado, puesto que se lleva trabajando con ellos muchos años. Por su parte, los marcadores de

ADN resultan notablemente más caros, requieren protocolos más complejos, equipos y aparataje muy específicos, su aislamiento y desarrollo puede ser considerablemente lento y costoso en tiempo y, en ocasiones, su repetibilidad no es fácil de conseguir. Al igual que los marcadores proteicos, pueden ser simples o multi-locus. Sin embargo, algunos producen complejos patrones multi-locus de naturaleza no mendeliana (RAPDs). La estadística que se emplea en su análisis ha sido recientemente desarrollada y publicada. La enorme ventaja que tienen con respecto a los primeros es su mayor resolución, ya que analizan directamente el material genético y sus características, mientras que los marcadores proteicos analizan el material genético de una muestra indirectamente, a través de las proteínas (que son producto de los genes), con lo que la sensibilidad y resolución obtenidas es menor (LOXDALE & LUSHAI, 1998).

3.1.- Marcadores proteicos

De todos de los marcadores proteicos, los más utilizados e importantes son las alozimas. SILVA *et al.* (1999) emplearon esta técnica para caracterizar y diferenciar molecularmente cinco especies del género *Trichogramma*: *T. cordubensis*, *T. evanescens*, *T. turkestanica*, *T. pintoi* y *T. bourarachae*. Obtuvieron una serie de bandas agrupadas en cuatro loci. A partir del análisis de las mismas se elaboró una clave dicotómica para la diferenciación de esas cinco especies.

BASSO *et al.* (1999) utilizaron también esta técnica para hacer un estudio taxonómico de dos especies, *T. pretiosum* y *T. exiguum*, pero analizando la familia enzimática de las esterasas. Observaron importantes diferencias entre ellas, pudiendo ser utilizadas como carácter de diagnóstico.

Por su parte, RODRÍGUEZ *et al.* (1996) utilizaron las esterasas y las superóxido dismutasas para tratar de identificar correctamente ciertas poblaciones de *Trichogramma*, lo que les permitió distinguir tres especies (*T. pretiosum*, *T. pintureaui* y *T. deion*), aunque sólo en el caso de las esterasas. Las superóxido dismutasas se revelaron incapaces de discriminar las especies citadas. También, observaron la presencia de bandas que dependiendo de los individuos aparecían o no (polimorfismo intraespecífico), especialmente en el caso de las esterasas.

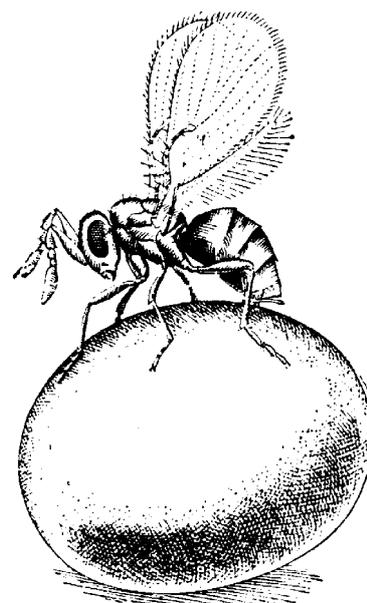
3.2. Marcadores de ADN

Varios trabajos han demostrado el potencial discriminatorio de los marcadores de ADN en la clasificación taxonómica de parasitoides oófagos. Los marcadores utilizados han sido principalmente de ADN ribosómico y mitocondrial (VANLERBERGHE-MASUTTI, 1994; SAPPAL *et al.*, 1995), así como secuencias polimórficas amplificadas al azar (RAPDs) (LANDRY *et al.*, 1993; KAZMER *et al.*, 1995; LAURENT *et al.*, 1998).

La extraordinaria variabilidad genética presente a nivel intrapoblacional en *Trichogramma* (PINTO Y STOUTHAMMER, 1994) hace necesario recurrir a regiones altamente conservadoras del ADN para la determinación taxonómica a nivel de especie. Utilizando marcadores de ADN mitocondrial y ribosómico se han llegado a identificar nueve especies: *T. pretiosum*, *T. dendrolimi*, *T. turkestanica*, *T. evanescens* (= *T. brassicae*), *T. cordubensis*, *T. pintoi*, *T. bourarachae*, *T. minutum*, y *T. sibiricum* (ORREGO & AGUDELO-SILVA, 1993; SILVA *et al.*, 1999; SAPPAL *et al.*, 1995).

La caracterización genética a nivel intraespecífico se puede realizar con marcadores resultantes del polimorfismo de productos de PCR amplificadas al azar o RAPDs (WILLIAMS *et al.*, 1990; WELSH & MCCLELLAND, 1990). Laurent *et al.* (1998) usaron marcadores de este tipo para construir mapas de ligamiento del genoma en *Trichogramma*, llegando a la conclusión de que la técnica constituye una prometedora herramienta en el mapeo genético de especies haplo-

Hembra adulta de *Trichogramma* depositando un huevo en el interior del huevo de su hospedador (de PEDIGO, 1996).



diploides (como la mayoría de los Trichogrammatidae). El mapeo genético juega también un importante papel en control biológico, mejorando los programas de cría de las especies parasitoides, puesto que permite identificar genes que controlan rasgos implicados en la eficiencia del control.

Conclusiones y expectativas

Los marcadores de ADN han resultado ser, sin duda, los más revolucionarios para las ciencias biológicas y los que han experimentado un mayor desarrollo, constituyendo una herramienta muy potente en el campo de la sistemática y la taxonomía de *Trichogramma*. Su avance sólo puede verse retrasado por el escaso conocimiento que se tiene todavía de la genética de este grupo de insectos (SMITH, 1996). Cuantos más estudios de este tipo se lleven a cabo, mejor podrán ser entendidas sus características, ventajas y desventajas, mejorando considerablemente estas técnicas.

A todo esto hay que añadir un cambio necesario de actitud. Si bien la sistemática y el control biológico deberían cooperar estrechamente, algunos investigadores dudan de que esto realmente ocurra (PINTO & STOUTHAMER, 1994). La sistemática es una disciplina orientada hacia los taxones y estudia éstos desde una perspectiva global. Por su parte, el control biológico se interesa por las diferencias entre enemigos naturales desde una perspectiva local, de forma que los problemas taxonómicos se resuelven de una manera *ad hoc* y a menudo por investigadores poco formados en el campo de la sistemática o con poco interés en ella. El resultado de esta actitud es la tendencia a describir formas similares como especies y a caracterizarlas sin primero estimar los límites de su variabilidad intraespecífica. La solución pasa por enfocar la sistemática de *Trichogramma* globalmente y no localmente y por realizar más estudios acerca de la variabilidad intraespecífica del género y la plasticidad de sus caracteres, lo cual proporcionaría una idea de qué caracteres son más importantes a la hora de separar especies. Otra posible solución puede consistir en la integración de taxónomos en los programas de control biológico, los cuales se encargarían de realizar estudios rigurosos en ese campo.

Es también esencial emplear todas estas herramientas discriminatorias conjuntamente, de tal forma que las conclusiones finales a las que se llegue sean el resultado del análisis de los datos proporcionados por todas ellas. Así, se complementan entre sí y lo que no parece evidente con una, sí lo es utilizando otra (y viceversa). De hecho, esta es la metodología que adoptan la

mayoría de los estudios que se ocupan de estos temas. En dichos trabajos, no se emplea una única técnica para la identificación taxonómica de la muestra problema, sino como mínimo tres de los cuatro tipos de herramientas comentadas.

Referencias Bibliográficas

- BASSO, C., PINTUREAU, B. & GRILLE, G. 1999. Taxonomic study of two *Trichogramma* species from Uruguay (Hym: Trichogrammatidae). *Bol. San. Veg. Plagas*, **25**(3): 373-382.
- KAZMER, D., HOPPER, K. R., COUTINOT, D. M. & HECKEL, D. G. 1995. Suitability of Random Amplified Polymorphic DNA for Genetic Markers in the Aphid Parasitoid *Aphelinus asychis* Walker. *Biological Control*, **5**: 503-512.
- LANDRY, B.S., DEXTRAZE, L. & BOIVIN, G. 1993. Random amplified polymorphic DNA markers for DNA fingerprinting and genetic variability assessment of minute parasitic wasp species used in biological control programs of phytophagous insects. *Genome*, **36**: 580-587.
- LAURENT V., WAJNBERG, E., MANGIN, B., SCHIEX, T., GASPIN, C. & VANLERBERGHE-MASUTTI, F. 1998. A Composite Genetic Map of the Parasitoid Wasp *Trichogramma brassicae* Based on RAPD Markers. *Genetics*, **150**: 275-282.
- LOXDALE, H. D. & LUSHAI, G. 1998. Molecular markers in entomology (review article). *Bull. Entomol. Res.*, **88**: 577-600.
- NAGARKATTI, S. & NAGARAJA, H. 1971. Redescriptions of some known species of *Trichogramma*, showing the importance of male genitalia as a diagnostic character. *Bull. Entomol. Res.*, **61**: 13-31.
- NOYES, J. 1982. Collecting and preserving chalcid wasps (Hymenoptera: Chalcidoidea). *Journal of Natural History*, **16**: 315-334.
- ORREGO, C. & AGUDELO-SILVA, F. 1993. Genetic variation in the parasitoid wasp *Trichogramma* (Hym: Trichogrammatidae) revealed by DNA amplification of a section of the nuclear ribosomal repeat. *Florida Entomologist*, **76**(3): 519-524.
- PEDIGO, L.P. 1996. *Entomology and pest management*. Prentice-Hall Inc. New Jersey. 679 págs.
- PINTO, J. D. & STOUTHAMER, R. 1994. Systematics of the Trichogrammatidae with emphasis on *Trichogramma*. En: *Biological control with eggs parasitoids*. E. Wajnberg & S.A Hassan (ed.). CAB International.
- PINTUREAU, B. 1991. Indices d'isolement reproductif entre espèces proches de *Trichogramma*. *Ann. Soc. Entomol. Fr.*, **27**: 379-392.
- PINTUREAU, B. 1997. Systematic and genetical problems revised in two closely related species of *Trichogramma*, *T. embryophagum* and *T. cacoeciae* (Hym., Trichogrammatidae). *Miscellanea Zoológica*, **20**(2): 11-18.
- RODRÍGUEZ, J., PINTUREAU, B. & GALÁN, M. 1996. Esclarecimiento de la identidad taxonómica de algunos registros cubanos de *Trichogramma* Westwood (Hym: Trichogrammatidae). *Bol. San. Veg. Plagas*, **22**: 585-599.
- SAPPAL, N.P., JENG, R.S., HUBBES, M. & LIN, F. 1995. Restriction fragment length polymorphisms in polymerase chain reaction amplified ribosomal DNAs of three *Trichogramma* especies. *Genome*, **38**: 419-425.
- SILVA, I., HONDA, J., KAN, F. VAN, HU, J., NETO, L., PINTUREAU, B. & STOUTHAMER, R. 1999. Molecular differentiation of five *Trichogramma* species occurring in Portugal. *Biological Control*, **16**: 177-184.
- SMITH, S. 1996. Biological control with *Trichogramma*: advances, successes and potential of their use. *Annu. Rev. Entomol.*, **41**: 375-406.
- STOUTHAMER, R., JOCHEMSEN, P., PLATNER, G. & PINTO, J. D. 2000. Crossing incompatibility between *Trichogramma minutum* and *T. platneri* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Implications for application in biological control. *Environmental Entomology*, **29**(4): 832-837.
- VANLERBERGHE-MASUTTI, F. 1994. Molecular identification and phylogeny of parasitic wasp species (Hymenoptera: Trichogrammatidae) by mitochondrial DNA RFPL and RAPD markers. *Insect Molecular Biology*, **3-4**: 229-237.
- WILLIAMS, J., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A. & TINGEY, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, **18**(22): 6531-6535.
- WELSH, J. & MCCLELLAND, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, **18**(22): 7213-7217.
- YOUSUF, M. & SHAFEE, S. A. 1986. Checklist of species and bibliography of the world Trichogrammatidae (Hymenoptera). *Indian Journal of Systematic Entomology*, **3**(2): 29-82.



entomología aplicada es una sección abierta a la colaboración.

Los manuscritos deben ser remitidos al coordinador de la sección. Preferentemente consistirán en síntesis y puestas al día de temas aplicados relacionados con los artrópodos.

Es conveniente comunicar al coordinador de la sección el tema propuesto antes de enviar el manuscrito definitivo.

Los manuscritos deben reunir los requisitos generales establecidos para artículos en las normas de publicación de la revista.

Sección coordinada y dirigida por
Ignacio Pérez Moreno
Departamento de Agricultura y
Alimentación. Universidad de
La Rioja. c/ Madre de Dios, 51.
26006 – Logroño (La Rioja)
ignacio.perez@daa.unirioja.es