

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE ESPECIES CRÍPTICAS
DE *TRICHOGRAMMA WESTWOOD*
(HYMENOPTERA: TRICHOGRAMMATIDAE)
DE IMPORTANCIA AGRÍCOLA EN MÉXICO**

**Martha Patricia ESPAÑA-LUNA¹, Alejandro GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ¹,
Omar G. ALVARADO-GÓMEZ² & Julio LOZANO-GUTIÉRREZ³**

¹ Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.
Av. Universidad y Pedro de Alba s/n Ciudad Universitaria.
San Nicolás de los Garza, N. L. MÉXICO

² Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

³ Unidad Académica de Agronomía de la Universidad Autónoma de Zacatecas, MÉXICO
mpesp24@yahoo.com, agonzale@fcb.uanl.mx,
omarguadalupe@intercable.net, jlozano_75@yahoo.mx.

RESUMEN

La identificación de las avispas parasitoides del género *Trichogramma* es difícil debido a su tamaño pequeño y a la plasticidad de sus características morfológicas. La morfología de genitales y antenas de los machos es de utilidad para determinar las especies, sin embargo esto representa un problema en particular cuando las especies se reproducen por partenogénesis. El objetivo del presente trabajo fue identificar a nivel molecular especies crípticas de *Trichogramma* de importancia agrícola en México. Se identificó a las especies crípticas *T. pretiosum*, *T. fuentesi* y *T. exiguum*, así como a las no crípticas *T. atopovirilia* y *T. pintoi*. Se construyó una clave dicotómica de identificación, basada en el tamaño del espaciador transcrito interno 2 (ITS2) del DNA ribosomal amplificado por PCR, y el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción entre las especies. Las regiones ITS2 fueron secuenciadas y comparadas con secuencias de GenBank, se calcularon los porcentajes de similitud y divergencia entre las especies. Esta herramienta molecular puede resolver la identificación de especies crípticas presentes en México.

Palabras clave: *Trichogramma*, especies crípticas, identificación, PCR-RFLP, ITS2.

ABSTRACT

Trichogramma parasitic wasps often are cryptic species and can not be distinguished because of their small size and the plasticity of their morphological traits. The species identity of *Trichogramma* has been based on the morphology of the male genitalia and flagellar structures, this presents a particular problem for parthenogenetic forms. The objective here was to identify by molecular methods cryptic species of *Trichogramma* occurring in agricultural fields of Mexico. We identified the cryptic species *T. pretiosum*, *T. fuentesi* y *T. exiguum*, and the non cryptic species *T. atopovirilia* y *T. pintoi*. A identification dichotomous key to species was constructed using as taxonomic characters the size of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) region of ribosomal DNA and the

difference in restriction length polymorphism of species. Also the ITS2 regions were sequenced coupled with ITS2 sequences from GenBank and the percents of similarity and divergence were calculated between species. This molecular tool can solve identification of cryptic species of *Trichogramma* from Mexico.

Key words: *Trichogramma*, cryptic species, identification, PCR-RFLP, ITS2.

INTRODUCCIÓN

Los parasitoides del género *Trichogramma* son avispas diminutas de aproximadamente 0.5-1.5 mm de longitud, que parasitan huevos de diversas ordenes de insectos (Pinto 1998). Actualmente, las especies de *Trichogramma* son los parasitoides más usados como agentes de control biológico de plagas agrícolas en el mundo, debido a su fácil reproducción y su rango amplio de hospederos (Knutson 1998), entre los que destacan las plagas del orden Lepidoptera en diversos cultivos agrícolas (Sappal *et al.* 1995). Nueve especies de *Trichogramma* se reproducen en insectarios privados o gubernamentales alrededor del mundo, y se estima que son liberadas sobre 33 millones de hectáreas de cultivos agrícolas y forestales en 30 países. Los países de la Unión Soviética ocupan el primer lugar como productores y liberadores de *Trichogramma*, seguidos por China y México (Knutson 1998).

En México estas avispitas se liberan anualmente en 1.5 millones de hectáreas (van Lenteren & Bueno 2003). Al respecto, Rodríguez-del-Bosque & Arredondo (1999) reportaron que las principales especies que se reproducen masivamente bajo condiciones de laboratorio son *T. pretiosum*, *T. exiguum*, *T. minutum*, *T. atopovirilia*, *T. platneri* y *T. pintoi*; mientras que García-González *et al.* (2005) mencionan que las especies que se comercializan actualmente son *T. exiguum*, *T. fuentesi*, *T. pintoi* y *T. pretiosum*.

La identificación de las especies de *Trichogramma* es difícil debido a su tamaño pequeño, a la existencia de numerosos ecotipos, además de la carencia de características de diagnóstico suficientes (Pinto 1998). Nagarkatti & Nagaraja (1971) identificaron a las especies a través de la genitalia de los machos, sin embargo, estas características no son confiables debido a que existen especies con genitalias similares, además esta técnica no procede cuando las poblaciones se reproducen por partenogénesis (Pinto 1998). Entre las especies crípticas más frecuentes está *T. pretiosum* que comúnmente se confunde con *T. ostrinae*, *T. interius*, *T. deion*, *T. platneri* y *T. minutum*. Asimismo, *T. exiguum* es comúnmente identificada como *T. fuentesi*, *T. minutum* y *T. platneri*.

Vanlerberghe-Massuti (1994) señala la importancia de contar con métodos rápidos y confiables para la caracterización de especies crípticas de *Trichogramma* y enfatiza la utilidad de los métodos basados en marcadores moleculares. Así mismo, Pinto (1998) menciona que la identificación de las especies crípticas de

Trichogramma, mediante métodos moleculares, es de gran utilidad ya que asegura la liberación de las especies adecuadas para cada plaga en particular.

Un marcador importante usado para diferenciar especies y biotipos de *Trichogramma*, son los espaciadores transcritos internos (ITS 1 y 2) del DNA ribosomal (DNAr) (Pinto *et al.* 1997, Stouthamer *et al.* 1999, Ciciola Jr. *et al.* 2001, Pinto *et al.* 2002, Thompson *et al.* 2003, Li *et al.* 2004), debido principalmente a que el DNAr está conservado en la naturaleza a través de la evolución, en tanto que los espacios intergénicos son regiones que evolucionan más rápido (Coleman 2003), lo que los hace variables entre especies (Pinto *et al.* 1997). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP) se pueden utilizar para distinguir especies y biotipos de *Trichogramma* (Sappal *et al.* 1995, Thompson *et al.* 2003). Esta técnica se basa en el uso de una o más enzimas de restricción que cortan los enlaces fosfodiéster en secuencias específicas de productos amplificados por PCR, posteriormente se detectan los fragmentos de DNA de distinto peso molecular en geles de agarosa o poliacrilamida (Avisé 2004), Pinto *et al.* (2002) y Silva *et al.* (1999) emplearon este procedimiento, para elaborar claves dicotómicas para identificar especies de *Trichogramma*.

La secuenciación del ITS2 del DNAr se ha empleado para identificar especies de *Trichogramma* (van Kan *et al.* 1997, Stouthamer *et al.* 1999, Pinto *et al.* 2002, Ciciola Jr *et al.* 2001, Li *et al.* 2004), así como en otros organismos: hongos, plantas y animales, incluyendo otros insectos (Loxdale & Lushai 1998). El objetivo de esta investigación fue identificar a nivel genético especies crípticas de importancia agrícola en México.

MATERIAL Y MÉTODOS

Colecta de muestras. Se obtuvieron 45 muestras de campo de regiones agrícolas localizadas en los siguientes estados: Aguascalientes, Chiapas, Coahuila, Durango, Guanajuato, Nayarit, Nuevo León, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Veracruz y Zacatecas. Asimismo se analizaron 23 muestras procedentes de laboratorios de reproducción masiva, de los estados: Chihuahua, Coahuila, Colima, Guanajuato, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Veracruz y Zacatecas.

Las muestras de campo fueron tomadas mediante la colecta manual de masas huevos de lepidopteros. Además se tomaron muestras con red de golpe y los especímenes se colocaron en alcohol etílico 100%. Para las muestras de los laboratorios se solicitaron 20 pulgadas cuadradas de cartoncillo con huevos de la palomilla *Sitotroga cerealella* (Lepidoptera: Gelechiidae) parasitados por *Trichogramma*. Las muestras se colocaron en cámaras de emergencia durante 48 horas, posteriormente los adultos se conservaron en alcohol al 100% para preservarlos.

Identificación morfológica de las especies. Con el objetivo de determinar la presencia de especies crípticas en las muestras de campo y de insectarios de reproducción comercial, se hizo una identificación inicial por análisis morfológico en la Colección de Insectos Benéficos Entomófagos (CIBE) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, utilizando la clave de Pinto (1998), y fue confirmada por el Dr. Richard Stouthamer de la Universidad de California en Riverside, quien utilizando especímenes de las mismas muestras, amplificó por PCR la región ITS2 del DNAr e hizo la secuenciación y alineamientos con las secuencias de especies conocidas.

Extracción de DNA. El DNA se extrajo mediante el procedimiento descrito por Pinto *et al.* (2002), modificado de la siguiente manera: un espécimen de cada muestra se agitó en 0.5 ml de TAE durante 30 minutos, posteriormente se incubó en 100 µl de Chelex-100 al 5% (Bio-Rad Corp.), con 3 µl de proteinasa K (Promega) (20 mg/ml) para desintegrar las proteínas extracelulares. La incubación se llevó a cabo durante una hora a 56°C, con agitación en vortex cada 15 minutos. Finalmente se incubó a 95°C durante de 10 min.

Amplificación por PCR. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó en volúmenes de 25 µl. Se utilizó un termociclador marca ThermoHybaid, 2.5 µl de DNA, 2.5 µl de buffer PCR, 0.5 µl de una mezcla de dNTP's (desoxinucleótidos trifosfatados) (10 mM cada uno), 0.3 µl de cada oligo (10 ng), 0.3 µl de enzima Taq DNA polimerasa (5 unidades/ µl), y 17.5 µl de agua destilada estéril (Pinto *et al.* 2002). La región ITS2 se amplificó mediante los oligos citados por Campbell *et al.* (1993) con la modificación de Ciciola Jr *et al.* (2001), por ser específicos para *Trichogramma*: 5'-TGTGAAGTGCAGGACACATG-3' localizado en la región 5.8S del DNAr, y 5'-GTCTTGCCTGCTCTGAG-3' localizado en la región 28S del DNAr. El programa térmico usado fue de 3 min a 95°C seguidos por 33 ciclos de 45 s a 92°C, 45 s a 53°C, y 45 s a 72°C con 3 min a 72°C después del último ciclo. Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en geles de agarosa 1%, con un marcador de peso molecular ladder 100 (Promega). Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio, visualizados en un transiluminador de luz UV y fotografiados con una cámara Polaroid.

Análisis de restricción. El análisis se realizó con las enzimas *EcoRI* y *AluI* (Promega). Las digestiones se realizaron en volúmenes de 20 µl conteniendo 15 µl de producto de PCR, 2 µl de bufer de restricción, 0.1 mg/ml de albúmina de suero de bovino (BSA) y 1 µl de cada enzima. Las reacciones se incubaron a 37°C durante toda la noche. Los fragmentos se separaron por electroforesis en geles de Poliacrilamida 5%, utilizando un marcador de peso molecular ladder 100 (Promega),

teñidos con bromuro de etidio, visualizados en un transiluminador de luz UV y fotografiados con una cámara Polaroid. Los fragmentos de restricción se compararon por la distancia de migración en el gel.

Clave molecular. La clave molecular para la identificación de las especies de *Trichogramma* en estudio fue construida con base en el tamaño de los productos de PCR de la región ITS2 del DNAr, las especies con tamaños similares en los productos de PCR fueron distinguidas por los patrones de bandeo de los fragmentos de restricción originados con las enzimas *EcoRI* y *AluI*. Además, debido a su presencia en México, en la clave se incluyeron a las especies *T. minutum* y *T. platneri*, las secuencias del ITS2 fueron obtenidas de Genbank (claves de acceso AY374439 y AF408657 respectivamente), y analizadas en el paquete DNA strider 1.0 (Christian Marck).

Análisis de secuencias. Se enviaron productos de PCR de todas las muestras, para ser secuenciados en el Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados (CINVESTAV) Unidad Irapuato. Los productos de PCR fueron directamente purificados con el sistema de Wizard® PCR prep, (Promega) y secuenciados por el método de Sanger, “Método del Dideoxi Terminal”, en un secuenciador ABI PRISM, 3700 DNA ANALIZER de Applied Biosystems. Las secuencias se editaron con el programa Editseq y alinearon con el programa MegAlign, ambos del paquete Winstar (DNASTAR Inc., Madison, Wis.). Se calcularon los porcentajes de similitud y divergencia entre ellas y con las secuencias reportadas para especies de *Trichogramma* en GenBank (<http://www.ncbi.nih.gov/>) (Cuadro 1).

Cuadro 1

Claves de acceso de secuencias del ITS2 de *Trichogramma* obtenidas en GenBank, comparadas con las secuencias obtenidas durante este estudio.

Especie	Clave de las secuencias de Genbank
<i>T. pretiosum</i>	AY182772, AY187260, AY187259
<i>T. fuentesi</i>	AY182765
<i>T. exiguum</i>	AY182769
<i>T. atopovirilia</i>	AY182758, AY182759
<i>T. pintoii</i>	AF043622, AY182757, DQ137262, DQ137261

RESULTADOS

Las especies crípticas obtenidas tanto de campo como de laboratorios de reproducción masiva, fueron *T. pretiosum*, *T. fuentesi* y *T. exiguum*. Asimismo, se encontró a las especies no crípticas *T. atopovirilia* solamente en campo y *T. pintoii* de una muestra de laboratorio (Cuadro 2).

Cuadro 2

Especies de *Trichogramma* de Campo (C) y Laboratorios (L) de la República Mexicana.

Estado	<i>T. pretiosum</i>		<i>T. fuentesi</i>		<i>T. exiguum</i>		<i>T. atopov.</i>	<i>T. pintoii</i>
	C	L	C	L	C	L	C	L
Aguascalientes	X							
Chiapas							X	
Chihuahua		X						
Coahuila	X			X		X	X	
Colima		X		X				
Durango	X							
Guanajuato	X	X						X
Jalisco		X						
Michoacán		X						
Morelos		X						
Nuevo León	X	X				X	X	
Nayarit	X	X	X					
San Luis P.	X							
Sinaloa		X					X	
Sonora	X	X						
Tamaulipas		X				X		
Veracruz	X	X				X	X	
Zacatecas	X		X	X				

Las especies fueron identificadas por un primer criterio que fue la longitud de los productos amplificados por PCR de la región ITS2 del DNAr, *T. pintoi* presentó el tamaño mayor con un producto amplificado de 698 pb, mientras que el producto menor fue para la especie *T. exiguum* con 493 pb. Las especies *T. pretiosum*, *T. fuentesi* y *T. atopovirilia* presentaron productos de PCR de 520, 553 y 669 respectivamente (Fig. 1).

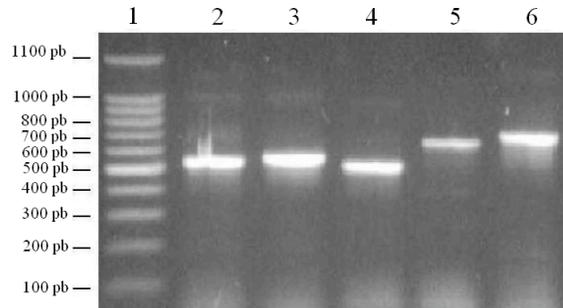


Figura 1

Gel de agarosa 1% con los productos de la amplificación por PCR de la región ITS2 del DNAr de las especies (1) marcador de peso molecular, (2) *T. pretiosum*, (3) *T. fuentesi*, (4) *T. exiguum*, (5) *T. atopovirilia* y (6) *T. pintoi*.

El segundo criterio de identificación de las especies, fue la discriminación basada en el análisis de restricción con las enzimas *EcoRI*, y *AluI* cuyos perfiles de mostraron que *T. pretiosum*, *T. exiguum* y *T. atopovirilia* no presentan sitio de corte con *EcoRI*, mientras que los ITS2 de *T. fuentesi* y *T. pintoi* son cortados originando dos fragmentos de tamaños diferentes, la digestión con la enzima *AluI* originó fragmentos de diferentes tamaños para cada una de las especies (Fig. 2).

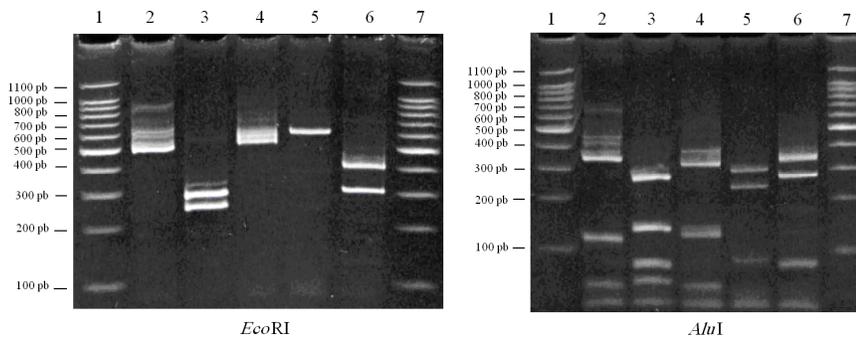


Figura 2

Geles de poliacrilamida 5% de electroforesis de los fragmentos de restricción de la región ITS2 del DNAr de las especies. (1 y 7) marcador de peso molecular, (2) *T. pretiosum*, (3) *T. fuentesi*, (4) *T. exiguum*, (5) *T. atopovirilia* y (6) *T. pintoi*, con las enzimas de restricción *EcoRI* y *AluI*.

El análisis de restricción con el paquete DNA strider 1.0, de las secuencias de *T. minutum* y *T. platneri*, evidenció un sitio de corte con *EcoRI* en las secuencias de ambas especies, con fragmentos de 281 y 249 pb, mientras que con *AluI* se obtuvieron cuatro fragmentos (Cuadro 3). En el cuadro 4 se muestra la clave de identificación de las especies de *Trichogramma* en estudio; la discriminación que se originó con el tamaño de los productos amplificados por PCR, y por la longitud de los fragmentos en el análisis de restricción.

Cuadro 3

Tamaños de los fragmentos originados por la digestión de la región ITS2 del DNAr, con las enzimas de restricción *EcoRI* y *AluI*. Y 4

Especie	Producto de PC R	<i>EcoRI</i>	<i>AluI</i>
<i>T. pretiosum</i>	520	-----	350, 106, 34, 20, 10
<i>T. fuentesi</i>	553	290, 263	270, 136, 82, 45, 20
<i>T. exiguum</i>	493	-----	315, 122, 44, 12
<i>T. atopovirilia</i>	669	-----	310, 250, 89, 20
<i>T. pintoii</i>	698	400, 298	342, 270, 83
<i>T. minutum</i> y <i>T. platneri</i>	530	281, 249	264, 82, 126, 58

Las secuencias obtenidas de *T. fuentesi* fueron 100% similares a la única secuencia reportada para esta especie en Genbank, mientras que las demás especies variaron de 85.7 a 99.8% de similitud con las secuencias correspondientes. Los porcentajes de divergencia fueron de 0% con *T. fuentesi*, hasta 6.2% con *T. atopovirilia* (Cuadro 5)

Al analizar las secuencias de la región ITS2 del DNAr, se observó que a nivel intra-especie *T. fuentesi* fue la más similar con un 100% de similitud entre las secuencias comparadas, para *T. pretiosum* los porcentajes variaron de 96.0 a 99.8, para *T. exiguum* los valores fueron de 97.5 a 99%, mientras que *T. atopovirilia* presentó los porcentajes mayores de divergencia, que variaron desde 1.0 a 6.2%, con una similitud de 84.8 a 97.4%.

Los porcentajes de similitud inter-especie variaron, *T. atopovirilia* presentó la menor similitud con respecto a las demás especies con porcentajes de 30.8 a 43.7%, lo que coincide al ver que esta especie presentó datos de divergencia superiores al 50% con *T. pretiosum*, *T. fuentesi*, *T. exiguum* y en tanto que *T. pretiosum* y *T. fuentesi* son las más similares entre ellas, con un 84.5% (Cuadro 6).

Cuadro 4

Clave de identificación de las especies de *Trichogramma*, con base en los tamaños de los productos de PCR del ITS2, y los fragmentos de restricción con las enzimas EcoRI y AluI.

Clave a especies con base en la región ITS2 del DNAr

1 Producto PCR > 553 pb -----	2
Producto PCR ≤ 553 pb -----	3
2 Producto de PCR sin digestión con <i>EcoRI</i> -----	<i>T. atopovirilia</i>
Fragmentos con <i>EcoRI</i> (400 y 298 pb) -----	<i>T. pintoi</i>
3 Producto de PCR con un sitio de corte con <i>EcoRI</i> -----	4
Producto de PCR sin digestión con <i>EcoRI</i> -----	5
4 Fragmentos con <i>EcoRI</i> (290 y 263 pb) -----	<i>T. fuentesi</i>
Fragmentos con <i>EcoRI</i> (281 y 249), y con la enzima	
<i>AluI</i> (264, 82, 126 y 58 pb) -----	<i>T. minutum</i> o <i>T. platneri</i>
5 Producto de PCR de 520 o 522 pb-----	<i>T. pretiosum</i>
Producto de PCR de 493 pb-----	<i>T. exiguum</i>

DISCUSIÓN

La región ITS2 del DNAr es de utilidad para la identificación de especies crípticas (Stouthamer *et al.* 1999), las secuencias y el análisis de restricción resuelven las limitaciones que existen en la identificación morfológica, principalmente porque se puede llevar a cabo en machos y hembras, sin importar la dificultad que tiene el observar las diminutas características morfológicas (Pinto *et al.* 2002). En este estudio se identificó mediante la comparación de las secuencias y análisis de restricción del ITS2 del DNAr a las especies crípticas *T. pretiosum*, *T. fuentesi* y *T. exiguum*, así mismo, se propone una clave para identificar a estas especies, y donde se incluye a *T. minutum* y *T. platneri*. La reproducción comercial de *T. minutum* y *T. platneri* en México, así como el reporte de Pinto (1998) sobre la presencia bajo condiciones naturales de *T. minutum* en nuestro país, fue importante en la decisión de incluir a estas dos especies en la clave. Pinto (1998) menciona que *T. minutum* y *T.*

Cuadro 5

Porcentajes de similitud y divergencia entre las secuencias de la región ITS2 del DNAr de las cinco especies identificadas, con secuencias reportadas en el Genbank.

Especie	Claves de acceso Genbank	Porcentajes de similitud	Porcentajes de divergencia
<i>T. pretiosum</i>	AY182772	96.0–96.0	1.0–1.5
	AY187260	98.0–98.8	1.0–1.7
	AY187259	99.2–99.8	0.2–0.7
<i>T. fuentesi</i>	AY182765	100–100	0–0
<i>T. exiguum</i>	AY182769	97.5–97.9	1.0–1.3
<i>T. atopovirilia</i>	AY182758	85.7–90.1	3.8–6.2
	AY182759	86.2–97.4	0.8–4.0
<i>T. pinto</i>	AF043622	98.2	1.4
	AY182757	99.0	0.7
	DQ137262	98.2	0.7
	DQ137261	98.0	0.3

Cuadro 6

Porcentajes de similitud y divergencia inter-especie de las secuencias de la región ITS2 del DNAr.

Especie	Similitud	Divergencia
<i>T. pretiosum</i>	33.3 (<i>T. atopov</i>)–84.5 (<i>T. fuente</i>)	10.5 (<i>T. exiguu</i>)–51.7 (<i>T. atopov</i>)
<i>T. fuentesi</i>	32.9 (<i>T. atopov</i>)–84.5 (<i>T. pretio</i>)	11.1 (<i>T. exiguu</i>)–53.4 (<i>T. atopov</i>)
<i>T. exiguum</i>	31.0 (<i>T. atopov</i>)–81.7 (<i>T. fuente</i>)	10.5 (<i>T. pretio</i>)–53.5 (<i>T. atopov</i>)
<i>T. atopovirilia</i>	30.8 (<i>T. exiguu</i>)–43.7 (<i>T. pinto</i>)	49.7 (<i>T. pretio</i>)–53.5 (<i>T. exiguu</i>)
<i>T. pinto</i>	40.4 (<i>T. atopov</i>)–47.0 (<i>T. fuente</i>)	36.3 (<i>T. pretio</i>)–53.5 (<i>T. exiguu</i>)

platneri son morfológicamente iguales. Con respecto a la identificación molecular de estas especies, Stouthamer *et al.* (2000) no encontraron diferencias en las secuencias del ITS2, razón por la cual en la clave propuesta no se pueden separar. Borghuis *et al.* (2004) pudieron diferenciarlas gracias a la variación que presenta la secuencia del gen Citocromo Oxidasa II del DNA mitocondrial.

Durante esta investigación, también se identificó a *T. pinto* y *T. atopovirilia*. Ambas especies presentan características morfológicas relativamente fáciles de diferenciar, aunque *T. pinto* puede ser confundida con las especies europeas *T. buesi* y *T. bourarachae*, mientras que *T. atopovirilia* es morfológicamente distinta y fácilmente diferenciada de todas las especies descritas (Pinto 1998), sin embargo, fue importante incluir a estas dos especies en los análisis moleculares realizados, debido a su presencia en México.

El uso de la clave molecular elaborada con base en los tamaños de los productos de PCR de la región ITS2 del DNAr, así como su digestión con las enzimas de restricción *EcoRI* y *AluI* puede incrementar la precisión en las especies liberadas. Pinto *et al.* (2002) elaboraron una clave dicotómica basada en los tamaños del ITS2 amplificados por PCR, y digeridos con las enzimas de restricción *EcoRI* y *MseI*, logrando identificar a diez especies entre las que incluye a *T. pretiosum* y *T. exiguum*. Para la elaboración de la clave aquí presentada, fue suficiente utilizar *EcoRI*, para identificar a *T. fuentesi* y *T. pinto*, mientras que *T. pretiosum*, *T. exiguum* y *T. atopovirilia* no presentan el sitio de digestión de esta enzima, lo que se convierte en una característica más de identificación, en combinación con el tamaño del producto inicial de PCR.

Almeida & Stouthamer (2004) emplearon los tamaños de los productos de PCR del ITS2, y las enzimas de restricción *EcoRI*, *MseI* y *MaeI* para elaborar la clave molecular de identificación de las especies *T. esalqueanum*, *T. exiguum*, *T. pretiosum*, *T. dendrolimi*, *T. brassicae*, *T. fuentesi*, *T. galloi*, *T. cacoeciae*, *T. lasallei*, *T. lopezandinensis*, *T. iracildae*, *T. rojasi*, *T. bruni*, *T. nerudai*, *T. pinto*, *T. acaoci* y *T. atopovirilia*, sin embargo resulta de poca aplicación debido a que incluye diez especies que no están presentes en México, y el uso de más enzimas de restricción, lo que la hace poco práctica para su aplicación con especies mexicanas.

Investigación similar fue realizada por Silva *et al.* (1999), quienes elaboraron una clave molecular con los tamaños del ITS2 del DNAr, y la digestión con la enzima de restricción *MnII* para identificar a las especies presentes en Portugal *T. cordubensis*, *T. evanescens*, *T. turkestanica*, *T. pinto* y *T. bourarachae*. Silva *et al.* (1999) mencionaron que los análisis de restricción originaron resultados confiables y repetibles, lo que facilita el uso de las claves dicotómicas basadas en productos de PCR y fragmentos de restricción.

Otro de los criterios de identificación de las especies de *Trichogramma*, fueron los porcentajes de divergencia y similitud entre las secuencias del ITS2 del DNAr, al

respecto Ciciola *et al.* (2001), mencionaron la importancia de tener disponibles las secuencias de las especies, para determinar la presencia de especies nuevas por la comparación de secuencias de la población. En este estudio los porcentajes de divergencia inter e intra especie (10.5 a 53.5% y 0.0 a 6.2% respectivamente) fueron de utilidad para identificar a las especies de *Trichogramma*. Los porcentajes de divergencia entre las secuencias, inter e intra-especie obtenidos en esta investigación fueron similares al resultado de Walker *et al.* (2005), quienes analizaron las secuencias del ITS2 del DNAr de los tricogramatidos *Aphelinoidea anatolica*, *A. turanica*, *A. roja* y *A. zarehi*, los porcentajes de divergencia inter-especies que obtuvieron fueron de 31 a 54%, mientras que a nivel intra-especie no hubo divergencia.

Thompson *et al.* (2003) mencionaron que el ITS2 es de utilidad para identificar especies de *Trichogramma* debido a que la variación en las secuencias intra-especie es relativamente pequeña en comparación con la variación inter-especie, y además porque la mayoría de las especies crípticas presentan variación suficiente en el ITS2 para ser distinguidas.

Ciciola *et al.* (2001) enfatizaron la importancia de realizar la identificación morfológica de las especies de *Trichogramma*, previo a la identificación a través de métodos moleculares; Silva *et al.* (1999), mencionan al respecto que los métodos moleculares no reemplazan a los métodos de identificación tradicionales basados en la morfología, sin embargo, son importantes como herramientas útiles para identificar a las especies principalmente cuando son crípticas; cuando se tiene el conocimiento de cuales especies están presentes en cierta área; cuando es necesario complementar la identificación con otros métodos; así mismo, son de utilidad para determinar posibles contaminaciones o mezclas de especies en los laboratorios de reproducción masiva y estudios sobre dispersión y evaluación de parasitoides liberados en campo o nativos de una región.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó con apoyo financiero de SEP-CONACYT a través del proyecto No. UA 5527-Z, así como del Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT) Clave CN889-04 de la Universidad Autónoma de Nuevo León. A la Dra. Adriana E. Flores Suárez y al Dr. José María Viader Salvadó por sus observaciones y comentarios a este escrito.

LITERATURA CITADA

Almeida, R.P. & R. Stouthamer. 2004. ITS-2 sequences-based identification of *Trichogramma* species in South America. In: *Trichogramma* and its relationship with *Wolbachia*: Identification of *Trichogramma* species, phylogeny, transfer and costs of

- Wolbachia* symbionts. Almeida, R.P. de (2004) Ph.D. Thesis. Chapter 3. Wageningen University, The Netherlands.
- Avise, J.C.** 2004. Molecular Markers, Natural History, and Evolution. Second Edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts. University of Georgia.
- Borghuis, A., J.D. Pinto, G.R. Platner, & R. Stouthamer** 2004. Partial cytochrome oxidase II sequences distinguish the sibling species *Trichogramma minutum* Riley and *Trichogramma platneri* Nagarkatti. *Biological Control* 30:90-94.
- Campbell, B.C., J.D. Steffen-Campbell, & J.H. Werren.** 1993. Phylogeny of the *Nasonia* species complex (Hymenoptera: Pteromalidae) inferred from an internal transcribed spacer (ITS2) and rDNA sequences. *Insect Mol. Biol.* 2:225-237.
- Ciciola, A.I.Jr., R.B. Querino, R.A. Zuchi, & R. Stouthamer.** 2001. Systematics, morphology and physiology. Molecular tool for identification of closely related species of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae): *T. rojasi* Nagaraja & Nagarkatti and *T. lasallei* Pinto. *Neotr. Entomol.* 30(4):575-578.
- Coleman, A.W.** 2003. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. *Trends Genet.* 19(7): 370-375.
- García-González, F., A. González-Hernández, & M.P. España-Luna.** 2005. Especies de *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) presentes en Centros reproductores de México. *Acta Zool. Mex. (n.s.)* 21(3): 125-135.
- Knutson, A.** 1998. The *Trichogramma* manual. Texas Agricultural Extension Service report no. B-6071; 5-98. Agricultural Communications, The Texas A&M University System, College Station, TX.
- Li, Z. X., L. Zheng, & Z. R. Shen.** 2004. Using internally transcribed spacer 2 sequences to re-examine the taxonomic status of several cryptic species of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Europ. J. Entomol.* 101(3):347-358
- Loxdale, H.D. & G. Lushai.** 1998. Molecular markers in entomology. Review article. *Bull. Entomol. Res.* 88:577-600.
- Nagartti, S. & H. Nagaraja.** 1971. Redescription of some known species of *Trichogramma* (Hym., Trichogrammatidae), showing the importance of the male genitalia as a diagnostic character. *Bull. Entomol. Res.* 61:13-21.
- Pinto, J.D.** 1998. Systematics of the North American species of *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae). In: Memoirs of the Entomological Society of Washington. Number 22.
- Pinto, J.D., A.B. Koopmanschap, G.R. Platner, & R. Stouthamer.** 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. *Biol. Cont.* 23:134-142.
- Pinto, J.D., R. Stouthamer, & G.R. Platner** 1997. A new cryptic species of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) from the Mojave dessert of California as determined by morphological, reproductive and molecular data. *Proc. of the Entomol. Soc. of Wash.* 99:238-247.
- Rodríguez-del-Bosque, L.A. & H.C.B. Arredondo.** 1999. Quien es quien en el control biológico en México. INIFAP-CIRNE. Campo Experimental Río Bravo. Folleto Técnico No. 23 Tamaulipas, México. 147 p.

- Sappal, N.P., R.S. Jeng, M. Hubbes, & F. Liu.** 1995. Restriction fragment length polymorphisms in polymerase chain reaction amplified ribosomal DNAs of three *Trichogramma* (Hymenoptera, Trichogrammatidae) species. *Genome* 38:419-425.
- Silva, I.M.M.S., J. Honda, F. Van Kan, J. Hu, L. Neto, B. Pintureau, & R. Stouthamer.** 1999. Molecular differentiation of five *Trichogramma* species occurring in Portugal. *Biol. Cont.* 16:177-184.
- Stouthamer, R., J. Hu, F. Van Kan, G.R. Platner & J.D. Pinto.** 1999. The utility of internally transcriber spacer 2 DNA secuencias of nuclear ribosomal gene for distinguishing sibling species of *Trichogramma*. *BioCont.* 43:421-440.
- Stouthamer, R., Y. Gai, A.B. Koopmanschap, G.R. Platner & J.D. Pinto.** 2000. ITS-2 sequences do not differ for the closely related species *Trichogramma minutum* and *T. platneri*. *Entomol. Exp. Et Applicata* 95:105-111.
- Thompson, J.L., J.R. Bradley, M.E. Carew, & A.H. Ary.** 2003. Identification and characterization of *Trichogramma* species from south-eastern Australia using the internal transcribed spacer (ITS-2) region of the ribosomal gene complex. *Entomol. Exp. Et Applicata* 106:235-240.
- van Kan F.J.P.M., J. Honda, J.D. Pinto, & R. Stouthamer.** 1997. Molecular based techniques for *Trichogramma* identification. *Proc. Exper. and Appl. Entomol. N.E.V. Amsterdam* Vol 8:59-62.
- Van Lenteren, J. & V.H.P. Bueno.** 2003. Augmentative biological control of arthropods in Latin America. *Biocont.* 48(2):123-139.
- Vanlerberghe-Masutti, F.** 1994. Molecular identification and phylogeny of parasitic wasp species (Hymenoptera: Trichogrammatidae) by mitochondrial DNA RFLP and RAPD markers. *Insect Mol. Biol.* 3:229-237.
- Walker, G.P., I.M. Bayoun, S.V. Triapitsyn, & J.Y. Honda.** 2005. Taxonomy of *Aphelinoidea* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) species attacking eggs of the beet leafhopper, *Circulifer tenellus* (Hemiptera: Cicadellidae), in California. *Zootaxa* 1068:1-25.

Recibido: 14 de junio de 2006

Aceptado: 10 de octubre de 2007