

## Recientes avances en la aplicación de técnicas moleculares al control biológico de plagas: de la PCR convencional a la secuenciación masiva

Nuria Agustí y Rosa Gabarra (IRTA Entomología, Cabriels (Barcelona), profesores invitados del máster de Protección Integrada de Cultivos)

Hace seis años publicamos un artículo en PHYTOMA España explicando la utilidad de los métodos moleculares para analizar la depredación y el parasitismo en programas de control integrado de plagas mediante técnicas moleculares (AGUSTÍ y GABARRA, 2006). Desde entonces estas técnicas han ido evolucionando y creemos interesante introducir los últimos avances en el ámbito del control biológico. A lo largo de estos años la utilización de herramientas moleculares ha ido ganando terreno especialmente en el estudio de los enemigos naturales (depredadores y parasitoides) utilizados en programas de control biológico, tanto en referencia a su correcta identificación como al estudio de sus relaciones tróficas.

El éxito de un programa de control de plagas basado en el control biológico por conservación radica en la correcta identificación de los actores que intervienen, tanto las plagas como sus enemigos naturales. Las relaciones tróficas presentes en un agroecosistema requieren de una identificación correcta no solo de los adultos presentes, sino también de sus estadios preimaginales. Estas especies depredadoras, muchas de ellas polífagas, pueden alimentarse no solo de especies plaga presentes en el cultivo, sino también de otras especies que no constituyen necesariamente una plaga en el ecosistema, de otros depredadores o incluso de parasitoides, es decir, de otros enemigos naturales. La depredación sobre estos enemigos naturales, conocida como depredación intragremial, puede tener un efecto (tanto positivo como negativo) sobre el control biológico ejercido por el depredador sobre las especies plaga, y por tanto es muy importante conocerla y tenerla en cuenta.

Durante los últimos años se han desarrollado técnicas y se han puesto a punto diversos marcadores moleculares para la correcta identificación de enemigos naturales. Por ejemplo, algunas de las aportaciones más recientes de nuestro grupo ha sido la puesta a punto marcadores moleculares que permiten diferenciar dos especies de míridos depredadores muy abundantes en



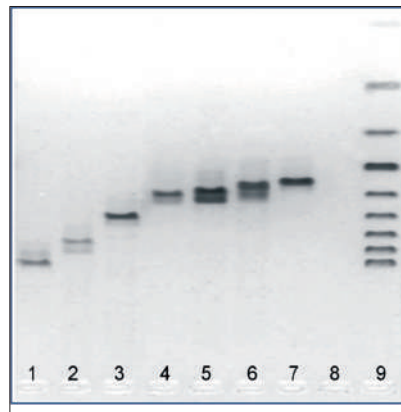
Las técnicas moleculares son herramientas que nos permiten estudiar y comprender las relaciones tróficas presentes en nuestros agroecosistemas.

cultivos hortícolas, *Macrolophus melanotoma* y *M. pygmaeus* (CASTAÑÉ y col. 2013). La gran similitud morfológica de estas dos especies (especies crípticas) hizo que se confundieran durante años, con el consiguiente riesgo a la hora de identificar las plantas hospederas de las que provenían

sus poblaciones naturales. También, hemos diseñado marcadores moleculares que permiten la identificación de las siete especies más comunes en los cultivos hortícolas mediterráneos del género *Orius*, depredadores clave en el control de ciertas plagas (GÓMEZ-POLO y col., 2013a). Aunque los

adultos de algunas de estas especies pueden ser identificados mediante caracteres morfológicos, los de otras especies son difíciles de identificar de esta manera y ninguna de estas especies se puede caracterizar morfológicamente en la etapa ninfal. De igual manera ocurre con las larvas de los sírfidos, importantes depredadores polífagos utilizados en programas de control biológico. Por ello también desarrollamos recientemente marcadores moleculares para las especies de sírfidos más comunes en los cultivos mediterráneos (GÓMEZ-POLO y col. 2013b). En este caso se utilizó una técnica llamada PCR multiplex que permite diferenciar las larvas de sírfidos en una sola reacción de PCR, en lugar de tener que analizar cada especie por separado (lo que se conoce como PCR singleplex), con el consiguiente ahorro en tiempo y dinero.

Desde el inicio del estudio de las relaciones tróficas, es decir desde que se empezaron a identificar las especies ingeridas por un depredador polífago se han puesto a punto diversas técnicas (ya explicadas en AGUSTÍ y GABARRA 2006). Un ejemplo reciente realizado por nuestro grupo fue el desarrollo de marcadores moleculares que han permitido detectar las relaciones tróficas entre los míridos depredadores, las moscas blancas y sus parasitoides en cultivo de tomate (MORENO-RIPOLL y col., 2012). Sin embargo, la gran limitación de estas técnicas de detección de ADN siempre ha sido la necesidad de diseñar un par de cebadores (secuencias cortas de ADN necesarias para su detección mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)) específicos para cada especie a detectar. Es decir, es necesaria una información previa sobre las especies potencialmente presentes en el ecosistema a estudiar seguida de un diseño de cebadores específicos para cada una de las especies de presa potencial. La obtención de esta información no es inmediata, sino que requiere



**Marcadores moleculares utilizados para la identificación de las siete especies más comunes en los cultivos hortícolas mediterráneos del género Orius mediante PCR multiplex; 1): *O. minutus*, 2): *O. laevigatus*, 3): *O. majusculus*, 4): *O. laticollis*, 5): *O. horvathi*, 6): *O. albidipennis*, 7): *O. niger*, 8): Control negativo, 9): Marcador 100 pb.**

de una exhaustiva búsqueda bibliográfica o bien un muestreo de las especies presentes en el área de estudio. Esto, aparte de enlentecer mucho la obtención de resultados, también los limita, ya que solo es posible la detección de ADN de aquellas especies conocidas y para las cuales se hayan diseñado cebadores específicos, no dejando ningún margen a detectar otras posibles presas de alguna manera “inesperadas” o como mínimo “desconocidas”.

Con el inicio del siglo XXI han aparecido técnicas moleculares de última generación, como la secuenciación masiva, que en un principio fueron aplicadas únicamente a estudios de biomedicina y de diagnóstico clínico. A medida que esta tecnología se iba utilizando y por lo tanto bajando los costes, también empezaron a utilizarla los ecólogos para la construcción de redes tróficas. No es hasta el

día de hoy que estamos empezando a utilizar estas técnicas para el estudio de las relaciones tróficas en ecosistemas agrícolas. La gran ventaja de las técnicas de secuenciación masiva es que no es necesario el diseño de cebadores específicos para cada una de las especie de presa a detectar. En este caso se utilizan cebadores “universales” o “generales” que permiten la amplificación de grandes grupos, como “insectos”. Una vez obtenidas estas secuencias (miles de secuencias cortas pero características de cada especie) que pertenecen a todas las especies presentes dentro del depredador se comparan a través de análisis bioinformáticos con ciertas bases de datos, como GenBank, en los que están depositadas millones de secuencias de todas las especies secuenciadas hasta el momento. Por lo tanto, en este caso los resultados no están limitados únicamente a las presas conocidas, sino que mediante este método también es posible detectar otras especies presa “inesperadas”, ya que no se tenía constancia de su presencia en el área o el cultivo de estudio, o bien que no son plagas del cultivo (presas alternativas o enemigos naturales).

Estas recientes técnicas moleculares pueden llegar a ser poderosas herramientas que nos permitan estudiar y comprender las complejas relaciones tróficas presentes en nuestros agroecosistemas. Esperamos de ellas que nos permitan no solo identificar los enemigos naturales clave en nuestros cultivos, su potencial y sobre que plagas actúan, sino que también nos permitan comprender cómo interactúan entre ellos y así poder mejorar la aplicación del control biológico por conservación en nuestros cultivos.

## BIBLIOGRAFÍA

- AGUSTÍ N. y GABARRA R. 2006. *Utilización de métodos moleculares en programas de control integrado: aplicación a estudios de depredación y parasitismo*. PHYTOMA España, 180: 46- 51.
- CASTAÑÉ C, AGUSTÍ N, ARNÓ J, GABARRA R, RIUDAVETS J, COMAS-ANGELET J, ALOMAR O. 2013. *Taxonomic identification of Macrolophus pygmaeus and Macrolophus melanotoma based on morphometry and molecular markers*. Bulletin of Entomological Research, 103: 204-215.
- GÓMEZ-POLO P, O ALOMAR, C CASTAÑÉ, J RIUDAVETS y N AGUSTÍ. 2013a. *Identification of Orius spp. (Hemiptera: Anthocoridae) in vegetable crops using molecular techniques*. Biological Control, 67: 440-445.
- GÓMEZ-POLO P, TRAUGOTT, M, O ALOMAR, CASTAÑÉ C, ROJO S y N AGUSTÍ. 2013b. *Molecular identification of six common syrphid species of Mediterranean vegetable crops and their parasitism using multiplex PCR*. Journal of Pest Science (Aceptado).
- MORENO-RIPOLL R; GABARRA R, W O C SYMONDSON, R A KING y AGUSTÍ, N. 2012. *Trophic relationships between predators, whiteflies and their parasitoids in tomato greenhouses: a molecular approach*. Bulletin of Entomological Research, 102: 415-423.