

Identificación molecular de una población autóctona de *Trichogramma cacoeciae* Marchal, 1927 (Hym., Trichogrammatidae) capturada en La Rioja (España)

F. MORENO, C. MENÉNDEZ, I. PÉREZ-MORENO, V. MARCO

El género *Trichogramma* Westwood comprende parasitoides de huevos ampliamente utilizados como agentes de Control Biológico de numerosas plagas (principalmente Lepidoptera). La identificación de especies dentro de este género es difícil debido a su pequeño tamaño y reducida variabilidad morfológica. Una población de *Trichogramma* capturada en 2003 en La Rioja ha sido identificada hasta especie mediante amplificación y secuenciación de la región ITS-2 de su ADN ribosomal. También se llevó a cabo un análisis de restricción (RFLP). El tamaño del producto de PCR, el patrón de bandas obtenido en el RFLP y la secuencia del ITS-2 confirmaron que dicha población pertenecía a la especie *Trichogramma cacoeciae* Marchal (98% de homología). Esta es la primera cita de *T. cacoeciae* en España.

F. MORENO, C. MENÉNDEZ, I. PÉREZ-MORENO, V. MARCO. Unidad de Protección de Cultivos. Departamento de Agricultura y Alimentación. Universidad de La Rioja. C/ Madre de Dios, 51. 26006 Logroño (La Rioja). España. E-mail: ignacio.perez@unirioja.es

Palabras clave: ADN, ITS-2, primera cita.

INTRODUCCIÓN

La relevancia de la sistemática en *taxa* de importancia económica es obvia, siendo este hecho especialmente destacable en el caso del género *Trichogramma* Westwood 1833. El género *Trichogramma* comprende endoparasitoides de huevos de otros insectos (principalmente Lepidoptera), ampliamente utilizados en todo el mundo como agentes de control de varias plagas de diversos cultivos (LI, 1994; PINTO y STOUTHAMER, 1994). Todos los hábitats terrestres muestreados contienen especies o ecotipos nativos de este género (PINTO y STOUTHAMER, 1994). Por tanto, en cualquier programa de Control Biológico (CB) debemos ser capaces de identificar la fauna nativa y diferenciarla de la que es empleada en el programa de CB (ya sea exótica o no) para así contro-

lar la identidad del agente utilizado y poder evaluar el éxito del programa. Se evitan, de esta manera, confusiones en cuanto a la identidad de la especie liberada. La taxonomía de estos parasitoides es complicada debido a su pequeño tamaño y la ausencia de diferencias morfológicas claras entre especies próximas (NAGARKATTI y NAGARAJA, 1977). La identificación de especies está basada casi exclusivamente en la morfología de la genitalia masculina (NAGARKATTI y NAGARAJA, 1971) y, por lo tanto, las poblaciones telítocas (que sólo incluyen hembras), no pueden ser identificadas morfológicamente. La separación entre especies íntimamente relacionadas se ha llevado también a cabo mediante cruzamientos interespecíficos para determinar el grado de aislamiento reproductivo de las mismas (PINTUREAU, 1991; STOUTHAMER *et al.*, 2000b;

PINTO *et al.*, 2003) o mediante análisis discriminador de caracteres morfológicos (KOSTADINOV y PINTUREAU, 1991; BASSO *et al.*, 1999). Afortunadamente, las recientemente desarrolladas técnicas de biología molecular han ampliado el abanico de posibilidades y han resultado claves para el avance de la taxonomía dentro de este género (STOUTHAMER *et al.*, 1999). Existen dos grandes grupos de marcadores moleculares que han sido empleados en estudios con *Trichogramma*: proteicos y de ADN (LOXDALE y LUSHAI, 1998).

Las alozimas han sido los marcadores proteicos más amplia y extensamente usados. Varias familias de alozimas han sido utilizadas para la detección de diferencias entre especies de *Trichogramma*: esterases (BASSO *et al.*, 1999), tetrazolium oxidasas (RODRÍGUEZ *et al.*, 1996a; Rodríguez *et al.*, 1996b) y fosfoglucomutasas (PINTO *et al.*, 2003). Cuando las diferencias morfológicas son mínimas y tampoco los marcadores de ADN permiten distinguir las especies con fiabilidad, los alozimas pueden ayudar en esa distinción. Este es el caso, por ejemplo, entre *T. minutum* Riley y *T. platneri* Nagar-katti (PINTO *et al.*, 2003).

En cuanto a los marcadores de ADN se refiere, su utilización ha crecido notablemente con el paso del tiempo. Dentro del género *Trichogramma*, las regiones ITS (Internal Transcribed Spacer) del ADN ribosomal han sido las más analizadas y estudiadas con vistas a su empleo como herramienta taxonómica. Su utilidad ha sido demostrada en numerosas ocasiones, tanto en el caso del ITS-1 (ORREGO y AGUDELO-SILVA, 1993; CHANG *et al.*, 2001) como en el del ITS-2 (SILVA *et al.*, 1999; STOUTHAMER *et al.*, 1999; CIOCIOLA *et al.*, 2001; PINTO *et al.*, 2002; DE ALMEIDA y STOUTHAMER, 2003). Por otra parte, se ha comprobado que la variabilidad intraespecífica en cuanto a la secuencia del ITS-2 es baja (STOUTHAMER *et al.*, 1999), lo que lo convierte en un marcador idóneo para la discriminación de individuos a nivel de especie. La secuencia del ITS-2 ha sido empleada incluso en la des-

cripción de nuevas especies (TAYLOR *et al.*, 2005). No obstante, se conocen ejemplos en los que esta región carece de utilidad (STOUTHAMER *et al.*, 2000a).

En este trabajo se llevaron a cabo muestreos en ecosistemas vitícolas de La Rioja con objeto de capturar poblaciones autóctonas de *Trichogramma* con vistas a su estudio como potenciales agentes de control biológico de *Lobesia botrana* Denis & Schiffermuller y se han empleado técnicas de biología molecular para identificar la especie capturada, utilizando para ello la región ITS-2 del ADN ribosomal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Captura en campo de *Trichogramma*

Los individuos identificados provenían de una población capturada en Hormilleja (La Rioja) en 2003 y mantenida en laboratorio sobre un huésped de sustitución (*Ephestia kuehniella* Zeller) desde entonces. Para su captura, se emplearon tarjetas de cartulina amarillas (10 x 10,5 cm) en las que se adherían un número suficientemente alto de huevos de *E. kuehniella* esterilizados con luz UV. En todos los casos los huevos se pegaron a las cartulinas mediante un adhesivo comercial (Pritt®).

Las tarjetas se colocaban tanto en el interior de viñedos como en la vegetación espontánea presente en los bordes y eran reemplazadas semanalmente por otras nuevas. Las tarjetas así recogidas se trasladaban al laboratorio. Una vez allí, los huevos se introducían en recipientes cilíndricos de plástico transparente, de 5 cm de altura y 12 cm de diámetro. En la cara interna de la tapa se colocaban varias gotas de miel con el propósito de servir como alimento para los adultos que pudieran emerger. Dichos recipientes eran trasladados a una cámara de crecimiento con condiciones controladas: temperatura de 24±1 °C, humedad relativa del 65±5% y fotoperíodo de 16/8 (L/O). Periódicamente se examinaban los recipientes y

su contenido en busca de huevos parasitados o individuos de *Trichogramma* emergidos. Los recipientes se mantenían bajo observación unos 15-20 días.

Los individuos emergidos fueron identificados hasta familia por medio de claves taxonómicas y hasta género y especie, gracias a los caracteres señalados por PINTO y STOUTHAMER (1994) y por medio de técnicas de biología molecular, respectivamente.

Identificación específica de *Trichogramma* por medio de técnicas de biología molecular

Extracción del ADN

Tras una serie de pruebas preliminares se extrajo ADN de los individuos de *Trichogramma* por medio del protocolo de extracción químico descrito por REINEKE *et al.* (1998), seguido de un lavado con etanol frío al 70%. Adicionalmente, también se extrajo el ADN de individuos de *T. brassicae* Bezdenko adquiridos comercialmente, como control de comparación de sus productos de PCR.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador GeneAmp[®]PCR System 9700 (Applied Biosystems). Cada reacción estaba compuesta por 8 ml de ADN, 4 ml de MgCl₂ (Applied Biosystems, 25 mM), 5 ml de tampón de PCR (Applied Biosystems, 10X), 4 ml de BSA (Amersham Biosciences; 2,8 mg/ml), 0,4 ml de polimerasa (5U/ml, AmpliTaq Gold, Applied Biosystems), 4 ml de dNTPs (2,5 mM cada uno, Applied Biosystems), 2 ml de cada uno de los cebadores (Invitrogen) y 20,6 ml de agua mili-Q esterilizada. La región ITS-2 se amplificó utilizando los cebadores siguientes (PINTO *et al.*, 2002): ITS2 FORW (5'-TGT-

GAAGTGCAGGACACATG-3') e ITS2 REV (5'-GTCTTGCCTGCTCTGAG-3').

El programa de PCR consistía en un primer paso a 95 °C de 8 minutos de duración, seguido por 33 ciclos de tres etapas cada uno (92 °C, 45 segundos; 53 °C, 45 segundos y 72 °C, 45 segundos), y, después del último ciclo, un paso final de 3 minutos de duración a 72 °C.

Los productos de la PCR se corrían en geles de agarosa (al 2,5%, D-1 Low EEO, Pronadisa), junto con un marcador de peso molecular 100-1.000 pares de bases (Bio-Rad), para verificar la presencia de bandas de ADN del tamaño adecuado. Los geles se sometían a un voltaje de 60V durante unas dos horas y se empleó TBE (1X) como tampón. Tras la electroforesis, el gel se revelaba durante 20 minutos en bromuro de etidio (Sigma[®], 10 mg/ml) y, seguidamente, se determinaba la presencia y el tamaño de las bandas gracias a un sistema informático ChemiGenius (GenSnap, Syngene), bajo luz UV.

Análisis de restricción (Restriction Fragment Length Polymorphisms)

Las enzimas utilizadas fueron las utilizadas por STOUTHAMER *et al.* (1999) y PINTO *et al.* (2002): Eco R1, Mse 1 y Bsm 1 (5U/ml, New England Biolabs). Mse 1 precisaba de BSA (Amersham Biosciences; 2,8 mg/ml) para un correcto funcionamiento y ésta se añadió a la concentración requerida de 100 mg/ml. El Cuadro 1 muestra los volúmenes utilizados para cada reactivo.

Las reacciones de restricción se incubaron durante una hora a 37 °C (para Mse 1 y Eco R1) y a 65 °C (en el caso de Bsm 1), en un bloque térmico TB1 (Biometra[®]). Una vez realizadas las reacciones correspondientes los tubos con el resultado se cargaron en un gel de agarosa. Las condiciones de la electroforesis, el revelado del gel y la posterior visualización de las bandas se realizó de manera análoga a la descrita en el apartado anterior.

Cuadro 1. Volúmenes (μl) empleados de cada reactivo en las reacciones de restricción

	MSE 1	ECO R1	BSM 1
Muestra PCR	8	8	8
Enzima	0,5	0,25	0,5
Tampón enzima (1X)	1	1	1
BSA	0,15	–	–
Agua mili-Q	5,35	5,75	5,5

Secuenciación

Los productos de PCR enviados a secuenciar procedían de una PCR realizada expresamente para tal fin. Para correr el gel correspondiente (y verificar el éxito de la PCR), se utilizó agarosa de bajo punto de gelificación (“low melting/gelling point”, LM-SIEVE, Pronadisa), que facilita el proceso posterior de purificación, y se tiñó el gel directamente con bromuro de etidio (añadiéndolo al gel mientras se estaba solidificando, a una concentración de 0,5 mg/ml). Debido a las características de la agarosa empleada, las condiciones de electroforesis también fueron diferentes a las de los gels anteriores (25V). Asimismo, su resolución es mayor que la de la agarosa estándar, por lo que el gel se construyó al 1%. Tras correr el gel, se comprobó bajo luz UV que la banda adecuada estaba presente.

Para su secuenciación directa, se enviaron las muestras a la Unidad de Biología Molecular de la Universidad de Alcalá de Henares (Madrid), donde existe un servicio de secuenciación.

Una vez secuenciada la región ITS-2, se analizó y comparó ésta por medio de un BLAST con las incluidas en la base de datos del GenBank (BENSON *et al.*, 2000). Para realizar los alineamientos de varias secuencias ITS-2 relacionadas se empleó el programa CLUSTALW 1.83 a partir de la página web del EMBL Nucleotide Sequence Database (BAKER *et al.*, 2000).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura 1 muestra los productos de PCR obtenidos utilizando los cebadores ITS2 FORW e ITS2 REV. Se obtuvieron productos de PCR en todas las muestras. La obtención de fragmentos amplificados corroboró, además, la pertenencia al género *Trichogramma* de los individuos empleados en la reacción, puesto que los cebadores utilizados son específicos de dicho género.

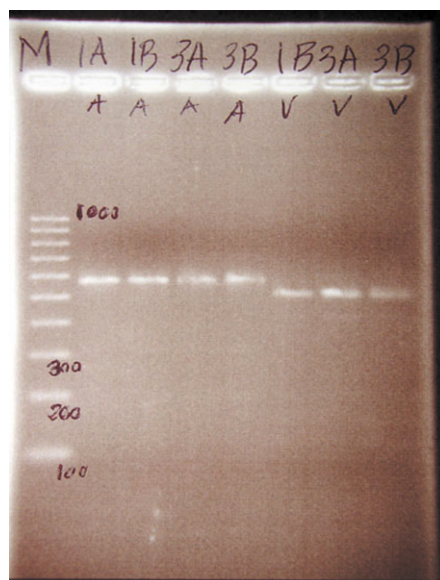


Figura 1. Productos de PCR obtenidos a partir de muestras de ADN genómico de *Trichogramma cacoe-ciae* (A) y *T. brassicae* (V)

Los fragmentos amplificados de *Trichogramma* fueron de mayor tamaño que los obtenidos en el caso de *T. brassicae* (casi 600 pb frente a poco más de 500 pb, respectivamente).

En cuanto al análisis RFLP (Figura 2), los tres enzimas utilizados cortaron la región blanco dando lugar a dos bandas, pero de diferentes tamaños según la enzima. El patrón de bandas obtenido (número y tamaño) se corresponde con el ya descrito por PINTO *et al.* (2002) para *Trichogramma cacoeciae*.

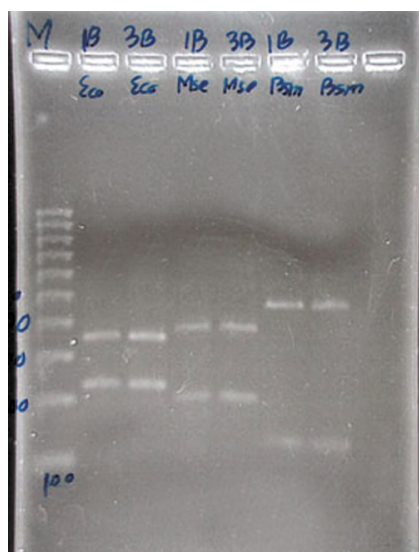


Figura 2. Fragmentos de restricción obtenidos en el análisis RFLP de la región ITS-2 de *Trichogramma cacoeciae*

El amplicón obtenido tras la PCR tuvo un tamaño de 585 pares de bases. Al comparar nuestra secuencia con aquéllas que disponían de la región ITS-2 completa, se observó una elevada homología (98%) con dos secuencias depositadas en el GenBank (con números de acceso AF408654 y AF408653), correspondientes ambas a la especie *Trichogramma cacoeciae* Marchal. La Figura 3 ilustra las semejanzas halladas entre éstas y nuestra secuencia.

Cuando el amplicón producto de la PCR se comparó con las secuencias depositadas en el GenBank, se obtuvo una gran homología (97%) con una secuencia perteneciente a *T. embryophagum* (Hartig). Ésta es una especie estrechamente relacionada con *T. cacoeciae* (PINTUREAU, 1997) y que ya ha sido citada en España (LÓPEZ-SEBASTIÁN *et al.*, 2003). Sin embargo, cuando únicamente la región ITS-2 se tuvo en consideración, la mayor homología observada se correspondió con *T. cacoeciae*.

La secuenciación de la región ITS-2 no debe ser utilizada como único medio en la identificación de especies de *Trichogramma* (CIOCIOIA *et al.*, 2001). En nuestro caso, el resultado de la secuenciación corroboró otras evidencias (biológicas, ecológicas y genéticas) que también apuntaban hacia *T. cacoeciae*. Una de esas evidencias era el modo de reproducción. *T. cacoeciae* es siempre partenogénica telitoca, mientras que *T. embryophagum* a menudo se reproduce arrenotocamente. La telitocia en *T. cacoeciae* es genética, no estando inducida por bacterias del género *Wolbachia*. Se llevaron a cabo una serie de pruebas con la población capturada para intentar romper esa telitocia utilizando altas temperaturas (30 °C) y antibióticos (clorotetraciclina), sin resultado positivo. Además, *T. embryophagum* suele estar asociada a ecosistemas forestales (LÓPEZ-SEBASTIÁN *et al.*, 2003), mientras que *T. cacoeciae* lo está a ecosistemas agrícolas. Por último, el tamaño del producto de PCR y el resultado del RFLP eran similares a los descritos por PINTO *et al.* (2002) para *T. cacoeciae* (utilizando los mismos cebadores y enzimas de restricción).

T. cacoeciae es una especie prácticamente cosmopolita, que se encuentra tanto en la región Neártica como en la Paleártica (excepto el Extremo Oriente) y la Neotropical. En Europa ha sido citada en multitud de países: Portugal, Francia, Suiza, Italia, Alemania, Holanda, Dinamarca, Inglaterra, antigua Checoslovaquia, Polonia, Rusia, Estonia, Lituania, Ucrania, Bielorrusia, Bulgaria, antigua Yugoslavia y Grecia (PINTUREAU, 1997;

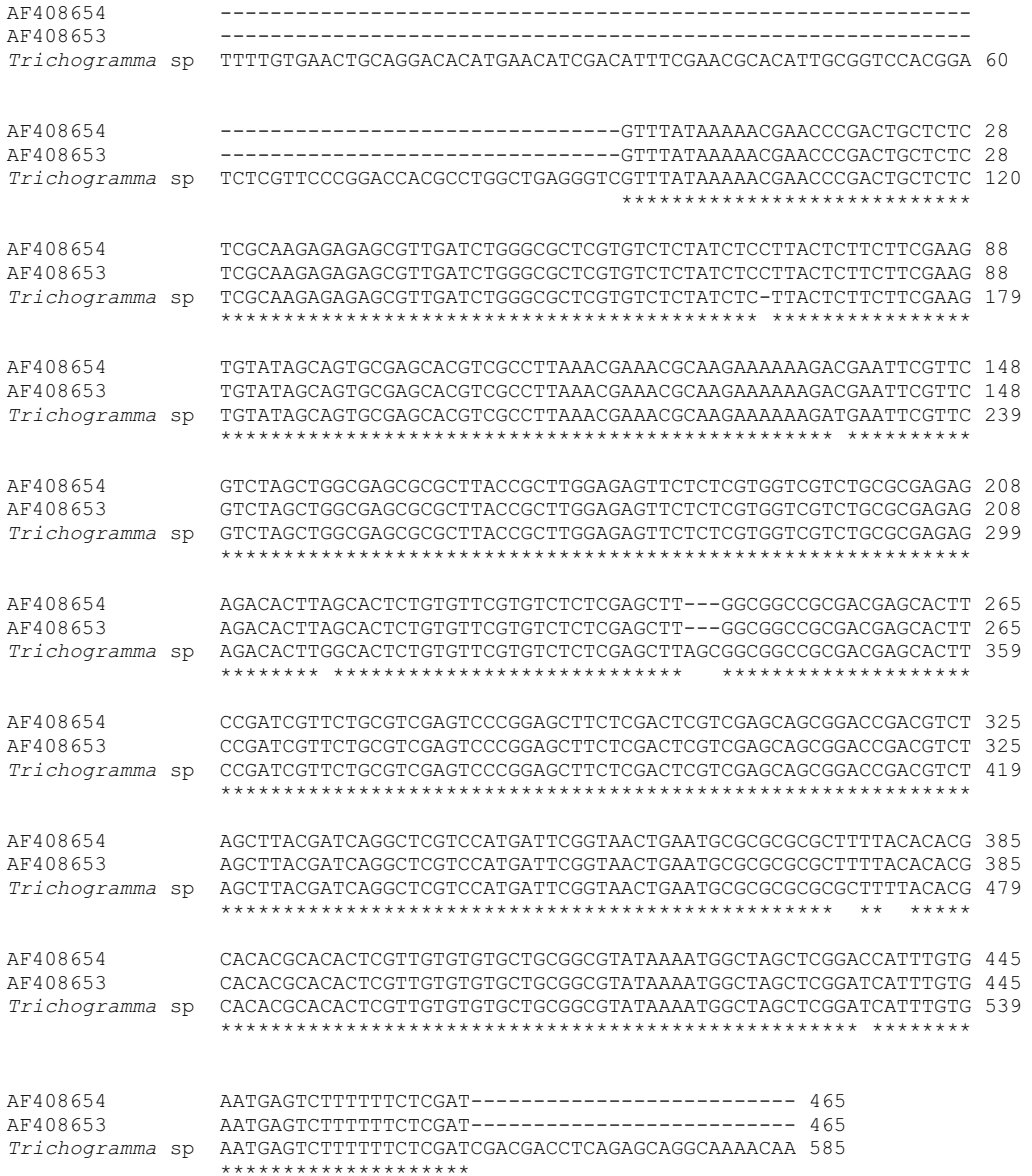


Figura 3. Alineamiento de las secuencias ITS-2 del *Trichogramma* capturado y AF408654 y AF408653 de *T. cacoeciae*. Los asteriscos (*) indican identidad entre las tres secuencias. La ausencia de asteriscos es debida a la presencia de deleciones o inserciones (-) o a mutaciones

FURSOV y PINTUREAU, 1999; HERZ *et al.*, 2007). También se encuentra en el Oriente Próximo y el Norte de África (HERZ *et al.*, 2007). Los trabajos referentes a la fauna de

Trichogramma en España son escasos. Así, CEBALLOS (1956) cita sólo *T. evanescens* Westwood y *T. semblidis* Aurivillius como especies presentes en nuestro país. Por su

parte, en el muestreo llevado a cabo en Andalucía por CABELLO (1986) se recolectaron individuos de *T. evanescens*, *T. cordubensis* Vargas & Cabello, *T. pinto* Voegelé y *T. urquijoi* Cabello. Otras dos especies, *T. minutum* Riley y *T. pretiosum* Riley, habrían sido importadas desde EE.UU. y liberadas para el control de *Cydia pomonella* (Linnaeus), pero no hay constancia de su posible establecimiento (URQUIJO y DADIN, 1942 y 1943). Recientemente, se han realizado sueltas de *T. achaeae* Nagaraja & Nagarkatti para el control de la polilla minadora del tomate, *Tuta absoluta* (Meyrick), en invernaderos de Almería (CABELLO *et al.*, 2009). Por tanto, los individuos de *T. cacoeciae* capturados en este trabajo constituyen la primera cita de

esta especie para nuestro país. Este amplio rango de distribución aumenta su potencialidad como agente de control biológico. Así, en Europa, se ha planteado su uso contra *L. botrana* (VOLKOFF *et al.*, 1995), mientras que en Alemania ya se comercializa contra *L. botrana* y *Eupoecilia ambiguella* Hübner en vid, y *Cydia pomonella* y *Adoxophyes orana* (Fischer v. Roslerstamm) en frutales (ZIMMERMANN, 2004). Este parasitoides también ha sido utilizado en la antigua URSS, Bulgaria y Polonia contra *Eupoecilia ambiguella*, *Cydia pomonella*, *Orgyia antiqua* (Linnaeus) y varias especies de *Lobesia* y *Laspeyresia* (LI, 1994) y en EE.UU. contra el tortrícido *Enarmonia formosana* (Scopoli) (BREEDVELD & TANIGOSHI, 2007).

ABSTRACT

MORENO, F., C. MENÉNDEZ, I. PÉREZ-MORENO, V. MARCO. 2010. Molecular identification of a local population of *Trichogramma cacoeciae* Marchal, 1927 (Hym., Trichogrammatidae) collected in La Rioja (Spain). *Bol. San. Veg. Plagas*, **36**: 91-99.

Trichogramma Westwood are tiny egg parasitoids which are widely used as biological control agents against many pests (mainly Lepidoptera). They are also known to lack of morphological distinctiveness making species identification in his group problematic. A *Trichogramma* population captured in 2003 was identified to species level by amplifying and sequencing its ITS-2 ribosomal DNA sequence. A restriction analysis (RFLP) was also performed. Size of PCR product, RFLP pattern and ITS-2 sequence confirmed that our *Trichogramma* strain belonged to *Trichogramma cacoeciae* Marchal species (98% homology). This is the first record of *T. cacoeciae* for Spain.

Key words: DNA, ITS-2, first record.

REFERENCIAS

- BAKER, W., VAN DEN BROEK, A., CAMON, E., HINGAMP, P., STERK, P., STOEßER, G., TULI, M. A. 2000. The EMBL Nucleotide Sequence Database. *Nucleic Acids Research*, **28** (1): 18-23.
- BASSO, C., PINTUREAU, B., GRILLE, G. 1999. Taxonomic study of two *Trichogramma* species from Uruguay (Hym.: Trichogrammatidae). *Bol. San. Veg. Plagas*, **25**: 373-382.
- BENSON, D. A., KARSCH-MIZRACHI, I., LIPMAN, D. J., OSTELL, J., RAPP, B. A., WHEELER, D. L. 2000. GenBank. *Nucleic Acids Research*, **28** (1): 15-18.
- BREEDVELD, K. G. H., TANIGOSHI, L. K. 2007. Seasonal phenology of *Enarmonia formosana* (Lepidoptera: Tortricidae) and egg parasitism by *Trichogramma cacoeciae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in Washington State, USA. *J. Pest. Sci.*, **80**: 15-19.
- CABELLO, T. 1986. Especies de *Trichogramma* (Hym.: Trichogrammatidae) parásitas de *Heliothis armigera* Hub. (Lep.: Noctuidae) en Andalucía (I). *Bol. San. Veg. Plagas*, **12** (2): 323-333.
- CABELLO, T., GALLEGO, J. R., VILA, E., SOLER, A., DEL PINO, M., CARNERO, A., HERNÁNDEZ-SUÁREZ, E., POLASZEK, A. 2009. Biological control of the South American Tomato Pinworm, *Tuta absoluta* (Lep.: Gelechiidae), with releases of *Trichogramma achaeae* (Hym.: Trichogrammatidae) in tomato greenhouses of Spain. *IOBC/WPRS Bulletin*, **49**: 225-230.
- CEBALLOS, G. 1956. *Catálogo de los himenópteros de España*. Instituto Español de Entomología, CSIC. 554 pp.
- CHANG, S. C., HU, N. T., HSIN, C. Y., SUN, C. N. 2001. Characterization of differences between two *Tricho-*

- gramma wasps by molecular markers. *Biol. Control*, **21**: 75-78.
- CIOCIOLA, A. I., QUERINO, R. B., ZUCCHI, R. A., STOUTHAMER, R. 2001. Molecular tool for identification of closely related species of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae): *T. rojasi* Nagaraja and Nagarkatti and *T. lasallei* Pinto. *Neotrop. Entomol.*, **30**: 575-578.
- DE ALMEIDA, R. P., STOUTHAMER, R. 2003. Molecular identification of *Trichogramma cacoeciae* Marchal (Hymenoptera: Trichogrammatidae): a new record for Peru. *Neotrop. Entomol.*, **32**: 269-272.
- FURSOV, V. N., PINTUREAU, B. 1999. Discovery of *Trichogramma cacoeciae* Marchal (Hymenoptera: Trichogrammatidae) new to England, at Chelsea physic garden, London. *Bulletin of Irish Biogeographical Society*, **23**: 124-127.
- HERZ, A., HASSAN, S. A., HEGAZI, E., KHAFAGI, W. E., NASR, F. N., YOUSSEF, A. I., AGAMY, E., BLIBECH, I., KSENTINI, I., KSANTINI, M., JARDAK, T., BENTO, A., PEREIRA, J. A., TORRES, L., SOULIOTIS, C., MOSCHOS, T., MILONAS, P. 2007. Egg parasitoids of the genus *Trichogramma* (Hymenoptera, Trichogrammatidae) in olive groves of the Mediterranean region. *Biol. Control*, **40**: 48-56.
- KOSTADINOV, D., PINTUREAU, B. 1991. A possibility to discriminate females of three closely related species of *Trichogramma* with special purpose analysis of the type *Trichogramma evanescens* Westwood. *Annales de la Société Entomologique de France*, **27**: 393-400.
- LI, Y. L. 1994. Worldwide use of *Trichogramma* for biological control on different crops: a survey. En: *Biological control with egg parasitoids*. WAJNBURG, E. y HASSAN, S. A. (eds.). CAB International. Wallingford, UK, pp. 37-53.
- LÓPEZ-SEBASTIÁN, E., PINTUREAU, B., SELFA, J., PUJADE-VILLAR, J., GUARA, M. 2003. Sobre la presencia de *Trichogramma embryophagum* (Hartig, 1838) (Hymenoptera, Chalcidoidea, Trichogrammatidae) en la Península Ibérica. *Bol. R. Soc. Esp. Hist. Nat. (Sec. Biol.)*, **98**: 97-102.
- LOXDALE, H. D., LUSHAI, G. 1998. Molecular markers in Entomology. *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.
- NAGARKATTI, S., NAGARAJA, H. 1977. Biosystematics of *Trichogramma* and Trichogrammatoidea species. *Annu. Rev. Entomol.*, **22**: 157-176.
- ORREGO, C., AGUDELO-SILVA, F. 1993. Genetic variation in the parasitoid wasp *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) revealed by DNA amplification of a section of the nuclear ribosomal repeat. *Florida Entomol.*, **76**: 519-524.
- PINTO, J. D., STOUTHAMER, R. 1994. Systematics of the Trichogrammatidae with emphasis on *Trichogramma*. En: *Biological control with egg parasitoids*. WAJNBURG, E. y HASSAN, S. A. (eds.). CAB International. Wallingford, UK, pp. 1-36.
- PINTO, J. D., KOOPMANSCHAP, B., PLATNER, G., 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. *Biol. Control*, **23**: 134-142.
- PINTO, J. D., PLATNER, G., STOUTHAMER, R. 2003. The systematics of the *Trichogramma minutum* species complex (Hymenoptera: Trichogrammatidae), a group of important North American biological control agents: the evidence from reproductive compatibility and allozymes. *Biol. Control*, **27**: 167-180.
- PINTUREAU, B. 1991. Indices d'isolement reproductif entre espèces proches de Trichogrammes. *Annales de la Société Entomologique de France*, **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 Zoologica*, **20** (2): 11-18.
- REINEKE, A., KARLOVSKY, P., ZEBITZ, C. P. W. 1998. Preparation and purification of DNA from insects for AFLP analysis. *Insect Mol. Biol.*, **7**: 95-99.
- RODRÍGUEZ, J., PINTUREAU, B., GALÁN, M. 1996a. Polimorfismo genético y morfológico de poblaciones de *Trichogramma fuentesi* Torre en Cuba (Hym.: Trichogrammatidae). *Investigación Agraria: Producción y Protección vegetales*, **11**: 323-343.
- RODRÍGUEZ, J., PINTUREAU, B., GALÁN, M. 1996b. Esclarecimiento de la identidad taxonómica de algunos registros cubanos de *Trichogramma* Westwood (Hym.: Trichogrammatidae). *Bol. San. Veg. Plagas*, **22**: 585-599.
- SILVA, I., HONDA, J., VAN KAN, F., HU, J., NETO, L., PINTUREAU, B., STOUTHAMER, R. 1999. Molecular differentiation of five *Trichogramma* species occurring in Portugal. *Biol. Control*, **16**: 177-184.
- STOUTHAMER, R., HU, J., VAN KAN, F., PLATNER, G., PINTO, J. D. 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.
- STOUTHAMER, R., GAI, Y., PLATNER, G., PINTO, J. D. 2000a. ITS-2 sequences do not differ for the closely related species *Trichogramma minutum* and *T. platneri*. *Entomol. Exp. Appl.*, **95**: 105-111.
- STOUTHAMER, R., JOCHENSEN, P., PLATNER, G. R., PINTO, J. D. 2000b. Crossing incompatibility between *Trichogramma minutum* and *T. platneri* (Hymenoptera: Trichogrammatidae): implications for application in biological control. *Environ. Entomol.*, **29**: 832-837.
- TAYLOR, L., YASHIRO, N., HIROSE, Y., HONDA, J. Y. 2005. A new species of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) parasitic on *Ivera auripes* (Lepidoptera: Lymantriidae) from Hokkaido, Japan. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, **98**: 291-294.
- URQUIJO, P., DADIN, J. M. 1942. Ensayos de los parasitoides útiles *Trichogramma minutum* y *pretiosum* en la lucha contra la *Cydia pomonella*. *Mem. Est. Fitop. Agr. de la Coruña, INIA*, **23**: 7-18.
- URQUIJO, P., DADIN, J. M. 1943. Ensayo de los parasitoides útiles *Trichogramma minutum* y *T. pretiosum* en la lucha biológica contra la *Cydia pomonella*. *Bol. Pat. Veg. Ent. Agr.*, **12**: 411-425.
- VOLKOFF, A.-N., DAUMAL, J., BARRY, P., FRANÇOIS, M. C., HAWLITZKY, N., ROSSI, M. M. 1995. Deve-

velopment of *Trichogramma cacoeciae* Marchal (Hymenoptera: Trichogrammatidae): time table and evidence for a single larval instar. *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, **24**: 459-466.

ZIMMERMANN, O. 2004. Der Einsatz von *Trichogramma*-Schlupfwespen in Deutschland. Zum aktuellen Stand

der Forschung und Nutzung von Eiparasitoiden gegen Schadlepidopteren im biologischen Pflanzen- und Vorratsschutz. *Gesunde Pflanzen*, **56** (6): 157-166.

(Recepción: 11 marzo 2010)

(Aceptación: 9 abril 2010)

