

SECCIÓN V. HERRAMIENTAS PARA EL CONTROL BIOLÓGICO CLÁSICO

CAPÍTULO 13: EXPLORACIÓN EN EL EXTRANJERO

Este capítulo presenta información dirigida a científicos que están llevando a cabo exploración en el extranjero, junto con los antecedentes sobre el diseño y la operación de las instalaciones de cuarentena para el manejo del material colectado. Para información adicional sobre estas actividades, ver Bartlett y van den Bosch (1964), Boldt y Drea (1980), Klingman y Coulson (1982), Schroeder y Goeden (1986), y Coulson y Soper (1989). Trabajar en el sitio nativo durante la exploración en el extranjero puede ayudar a seleccionar a los enemigos naturales potencialmente más efectivos y a tener un conocimiento más preciso acerca del rango de hospederos de los agentes encontrados (Goolsby et al. 2006a). Los exploradores extranjeros deben familiarizarse ellos mismos con dichas oportunidades y definir una estrategia para maximizar el valor del tiempo de colecta utilizado en la exploración en el extranjero.

PLANEACIÓN Y CONDUCCIÓN DE LA EXPLORACIÓN EN EL EXTRANJERO

SELECCIÓN DE LAS LOCALIDADES DE INSPECCIÓN

Dependiendo de qué tanto se conozca acerca de una especie invasora, la selección de áreas de colecta de enemigos naturales puede ser completamente simple o extremadamente incierta. La invasión del oeste de los Estados Unidos por la mosca blanca del fresno, *Siphoninus phillyreae* (Halliday), fue seguida inmediatamente por colectas en Europa y en el Oriente Medio, donde la mosca blanca y sus enemigos naturales eran bien conocidos. En contraste, los esfuerzos para coleccionar enemigos naturales del helecho acuático gigante (*Salvinia molesta* Mitchell), el piojo harinoso de la yuca (*Phenacoccus manihoti* Matile-Ferrero), la escama de la haya (*Cryptococcus fagisuga* Lindinger), el trips del aguacate (*Scirtothrips perseae* Nakahara) y el picudo del plátano *Cosmopolites sordidus* (Germar) fueron todos fallidos, al menos inicialmente, porque las plagas eran nuevas para la ciencia o porque su área de origen era desconocida.

Para las plantas invasoras, la especie misma puede ser bien conocida pero puede tener un rango extremadamente extenso, sin relaciones genéticas claras entre las poblaciones geográficas, haciendo difícil la selección de las áreas de mayor prioridad para la colecta de enemigos naturales. Por ejemplo, los cedros salados (*Tamarix* spp.) invasores en el suroeste de los Estados Unidos, son cuatro especies y sus híbridos (DeLoach et al., 2003). La especie progenitora de las poblaciones de la plaga tiene un rango nativo que se extiende

desde el norte de África hasta China (Milbrath y DeLoach, 2006). Los análisis moleculares (ver el Capítulo 15) pueden aclarar tales relaciones y ayudar a identificar cuáles localidades podrían ser mejores para buscar enemigos naturales.

Para tratar con casos difíciles, algunas fuentes de información pueden ayudar, incluyendo la literatura sobre la plaga (o sus parientes), contactos profesionales en el extranjero, correspondencia climática (ver el Capítulo 14) y para los insectos plaga estenófagos, la biografía de la planta hospedera. Si la plaga es inicialmente conocida en muchas áreas dispersas, las herramientas moleculares pueden ser utilizadas para determinar cuál localidad es más probable de ser la fuente de la población invasora (p. ej., Williams *et al.*, 1994; Biron *et al.*, 2000; Gaskin, 2003; Goolsby, 2004). La población del adélgido lanudo del falso abeto (*Adelges tsugae* Annand) invasor en el este de los Estados Unidos, por ejemplo, podría haber venido potencialmente desde al menos tres áreas (el oeste de los Estados Unidos, Japón y China), pero los análisis moleculares demostraron concluyentemente que el origen era Japón (Havill *et al.*, 2006). Tales comparaciones moleculares pueden también indicar si la infestación de la plaga se deriva de una o de varias fuentes independientes (p. ej., Carter *et al.*, 1996), lo cual indica que colectas separadas de los enemigos naturales podrían ser deseables para las subpoblaciones de la plaga en la zona invadida.

Cuando la plaga invasora es desconocida afuera del área invadida, el encontrar el rango nativo dependerá de las inspecciones, guiadas por inferencias taxonómicas, biogeográficas y climáticas. Tales inspecciones podrían explorar áreas donde especies cercanas taxonómicamente a la plaga son conocidas o donde la planta hospedera ha evolucionado (para insectos invasores). Después de que poblaciones de la plaga hayan sido localizadas, su diversidad genética puede ser medida para determinar dónde es mayor, siendo esta su probable área de origen. Las áreas de origen también se pueden predecir donde los enemigos naturales de la plaga sean más diversos. Éstos y otros conceptos son útiles para la generación de hipótesis acerca del origen de la plaga, pero ninguno proporciona un mecanismo infalible para localizar el rango nativo. Más adelante se discutirá la aplicación de estos conceptos.

- (1) Dónde se presenten las especies más cercanas de la especie plaga. Si una plaga es desconocida fuera de su rango invasor, su rango nativo de distribución podría ser donde se presenten los mayores números de congéneres y, específicamente, donde se encuentren las especies emparentadas más cercanas. El minador de la hoja de la castaña del caballo (*Cameraria ohridella* Dschka y Dimic), una especie invasora en Europa, es desconocido en otras partes del mundo. Europa no es considerada como su rango nativo por su reciente dispersión explosiva y por su carencia de parasitoides específicos. Ya que otros miembros de *Cameraria* son de América y de Asia, no de Europa, estas áreas son consideradas como las áreas potenciales de origen (Kenis *et al.*, 2005).
- (2) Dónde evolucionaron las plantas hospederas de la plaga. Para los insectos con alta especificidad de plantas hospederas, el centro de evolución de esas plantas, si es conocido, puede ser el área de origen del insecto. Por ejemplo, se cree que algunas plagas cítrícolas como ciertas escamas, se originaron en el sureste de la China, el área de origen del género *Citrus*. El árbol de aguacate, que es un hospedero específico de algunos insectos, es probable que haya evolucionado en Centroamérica (Hoddle *et al.*,

2002b). También, si la historia del movimiento de las plantas es conocida, esto puede proporcionar evidencia de dónde una población de un insecto llegó. Por ejemplo, el minador de la hoja del café, *Leucoptera coffeella* (Guérin-Méneville), una plaga importante en las Américas, se sospecha que es un invasor, pero su origen es desconocido. Una pista respecto a su origen incluye la presencia poco notada de este insecto en cafetales en Madagascar y la Isla Reunión, la presencia de algunas especies nativas del cafeto en Reunión y el arribo de *Coffea arabica* var. *bourbon* a las Américas de la isla de Reunión. Colectivamente, esos hechos apuntan a Reunión como el rango nativo posible de esta polilla (Green, 1984).

- (3) El rango nativo es donde la especie plaga muestra mayor diversidad genética. La avispa de las agallas *Megastigmus transvaalensis* Hussey (Torymidae), en África, se alimenta de plantas del género *Rhus*, pero en el resto del mundo está asociada con *Schinus*. Scheffer y Grissell (2003) analizaron la variación genética en una secuencia de la oxidasa del citocromo mitocondrial y encontraron una variación extensa en las poblaciones africanas pero ninguna variación en otras partes. Por lo cual concluyeron que el insecto era de origen africano. Gwiazdowski *et al.* (2006) usaron el mismo enfoque para evaluar la probabilidad de que el origen de una escama Eriococcidae (*C. fagisuga*), fuera en el oeste de Europa o que fuera del sureste de Europa o el oeste de Asia. Esta escama es una plaga forestal invasora en Norteamérica.
- (4) Dónde son más diversos los enemigos naturales de la plaga. Si una plaga es conocida en diferentes áreas y los análisis genéticos no separan poblaciones resultantes de localidades ancestrales, la diversidad de la fauna de enemigos naturales asociados podría ser de utilidad. Pschorn-Walcher (1963), en sus trabajos con varias avispas sierra, sugirió que el área de origen podría estar asociada con grandes complejos de parasitoides especializados. Sugirió que Europa Central probablemente fuera el origen de la avispa sierra *Pristiphora erichsonii* (Hartig), donde su complejo de parasitoides es grande y distintivo, no el Reino Unido, donde la avispa sierra tiene relativamente pocos parasitoides. Similarmente, Kfir (1998) usó este concepto para argumentar que Sudáfrica, no Europa, era probablemente el origen de la polilla del repollo *Plutella xylostella* (L.), la cual se alimenta de crucíferas; previamente se había pensado que era Europa por ser el área de origen de las crucíferas *Brassica* cultivadas a las cuales ataca comúnmente esta plaga.

PLANEACIÓN DE UN VIAJE DE COLECTA AL EXTRANJERO

La planeación de un viaje de exploración en el extranjero empieza con la acumulación de toda la información relevante disponible, incluyendo la información taxonómica pertinente, la identidad de especímenes relevantes en colecciones de museos y las notas de previos viajes de colecta en las áreas de búsqueda. Esta información, junto con la correspondencia reciente con los colaboradores, es utilizada para determinar la estación y las localidades más disponibles para las inspecciones de enemigos naturales. Además de elegir las localidades para la búsqueda, la planeación de un viaje de colecta al extranjero debe incluir la obtención de los permisos y visas necesarios, el encuentro con un colector y colaborador local competente en la zona de búsqueda y el montaje del equipo necesario.

PERMISOS

El primer paso en la organización de un viaje de colecta al extranjero es obtener los permisos necesarios para coleccionar y exportar material vivo, de los países a ser visitados, y también los permisos necesarios para importar el material coleccionado al país importador. La planeación de la importación requiere el desarrollo de un acuerdo con una instalación autorizada de cuarentena para recibir y procesar el material importado. La exportación de especímenes muertos, coleccionados para estudio o como especímenes en préstamo, también está regulada en algunos países. Ya que las leyes pueden variar en cada país y cambiar con el tiempo, los trabajadores en control biológico podrían buscar la información local actualizada preguntando directamente a un colega local. El colector deberá proporcionar a las instalaciones de cuarentena las copias de los permisos de importación, fechas esperadas de envíos, arreglos para la autorización del material enviado en las aduanas locales y planes claros para el establecimiento de colonias de los enemigos naturales importados. En apoyo al desarrollo de estas colonias, deben hacerse los arreglos con los laboratorios de cuarentena receptores para que el material hospedero necesario esté disponible para usarlo en la cría.

El permiso de importación para cuarentena no implica el permiso para la liberación en el medio ambiente. Típicamente, cualquier agente de control biológico plausible puede ser importado a la cuarentena para su estudio. La liberación de la cuarentena requiere del desarrollo de datos adecuados para evaluar los riesgos potenciales del agente a la fauna o a la flora local (ver el Capítulo 17).

CREDENCIALES DEL COLECTOR/EXPLORADOR

Las personas que coleccionan enemigos naturales en países extranjeros deben ser buenos planeadores, altamente flexibles y adaptables, y viajeros con experiencia. Deben tener un amplio conocimiento de la plaga a controlar, sus enemigos naturales potenciales y, de ser posible, de sus plantas hospederas. La colecta en el extranjero puede requerir trabajo en áreas difíciles de llegar y carentes de infraestructura y servicios eficientes. Un asistente local bilingüe, familiarizado con las aduanas locales, frecuentemente es necesario para lograr acceso seguro a los sitios de colecta potenciales. La colaboración con instituciones de investigación locales frecuentemente incrementa la efectividad de las inspecciones. Las inspecciones también pueden ser subcontratadas a organizaciones especializadas en la inspección y colección de enemigos naturales, como los laboratorios de control biológico USDA-ARS en el extranjero, CABI Bioscience (Reino Unido), CSIRO (Australia) u otras agencias regionales o nacionales con experiencia apropiada.

EQUIPO

Antes de partir, deben hacerse algunos arreglos para todo el equipo necesario (**Tabla 13-1**). En casos donde el trabajo será conducido en conjunto con un laboratorio en el país extranjero, algunos artículos como microscopios pueden estar disponibles allá. El *equipo de colecta* puede incluir herramientas de cosecha de plantas o cavadoras de suelo, jamas de colección (redes entomológicas) y bandejas de golpeo, cajas de

Tabla 13-1. Lista de equipo y materiales para la exploración en busca de enemigos naturales.

(a) Equipo de colecta

jamas entomológicas de colección, mapas, cámara
picos, palas, niveladores, tijeras de poda, sierras, guantes
bolsas para coleccionar (papel, plástico), hielera o refrigerador portátil

(b) Equipo de identificación y manejo

microscopio y lámpara, lupas, lentes
textos de referencia de la flora local, etc.
pequeños frascos para aislamiento de especímenes, etiquetas
tubos de sílice para colecta de especímenes para análisis del ADN
tarjetas para etiquetado de grupos de frascos
cuaderno o formas de registro, tijeras, regla
alfileres entomológicos, pinzas (finas y grandes), alcohol, miel de abeja

(c) Suministros para empaque y envío

cajas de envío (cartón o madera)
recipientes externos aislantes o de icopor
empaques fríos o calientes
etiquetas de dirección, etiquetas de cuarentena
copias de los permisos de envío, cinta, cuerda

cría, viales o bolsas para almacenamiento de las muestras, mapas y guías de viaje, cuadernos y aparatos de posicionamiento geográfico (GPS por su sigla en inglés) para registrar las localidades de colecta, y hieleras u otros recipientes de almacenamiento aislantes para evitar el sobrecalentamiento del material colectado. Las cámaras digitales son esenciales para registrar la condición de las localidades de colecta y para registrar las identidades iniciales de los candidatos a enemigos naturales y de las plantas hospederas. El *equipo de manejo e identificación* puede incluir pinzas, pinceles finos de pelo de camello, escalpelos, navajas de afeitar, podadoras de plantas, probetas, microscopios, lupas de mano, visores ópticos, lámparas, tubos de sílice para muestras de ADN o para almacenar enemigos naturales colectados para el establecimiento de colonias, parafilm para sellar los frasquitos, miel de abeja para alimentar a los enemigos naturales (si lo permite el país hospeder), cajas Petri con medio de cultivo preparado para la inoculación de patógenos y la literatura pertinente para la identificación de plantas hospederas, insectos hospederos y enemigos naturales. Los *suministros de empaque y envío* incluyen recipientes externos primarios, recipientes con aislantes internos, paquetes de gel congelado, material de envoltura, material amortiguador, cajas de envío, cinta, etiquetas de envío, sobres de etiquetas transparentes y los permisos.

COLECCIÓN DE ESPECÍMENES Y REGISTRO DE DATOS DE CAMPO

Durante las inspecciones, debe ser colectado tanto material como sea posible. Los científicos locales o sus estudiantes graduados pueden ser de utilidad, localizando hábitats nativos o plantaciones agrícolas disponibles para la colecta. Deben tomarse notas de campo que incluyan fechas de todas las colectas, nombres de los contactos, villas, granjas, áreas naturales o parques nacionales visitados (con coordenadas y altitudes tomadas con GPS y fotografías digitales de los sitios), notas sobre los patrones de clima estacionales en los sitios de colecta, tipos de hábitats, comunidades vegetales, especies de plantas hospederas y especies hospederas localizadas, así como los enemigos naturales encontrados. Las colectas deben realizarse en áreas no sujetas a la aplicación de plaguicidas, evitando los cultivos comerciales (los cuales probablemente carecen de enemigos naturales), favoreciendo a los cultivos orgánicos, plantas de jardín no tratadas y jardines públicos o botánicos.

Ya que los sitios de colecta pueden estar lejos de los aeropuertos, es necesario mantener el material vivo mientras se viaje por muchos días. Los estados de los insectos activos deben ser alimentados con alimento apropiado, provistos con agua y mantenidos frescos. La humedad en los recipientes de colecta debe estar en el rango del 40 – 75% para evitar la muerte por deshidratación. Similarmente, deben evitarse las altas humedades que podrían promover el desarrollo de hongos patógenos, y el agua libre, en la cual los insectos pueden ahogarse. Siempre que sea posible, los insectos colectados en campo deben ser transportados en hieleras con aislante, las cuales pueden mantenerse frescas al recargarlas con hielo. Alternativamente, existe un tipo más sofisticado de hielera que usa baterías o corriente directa para enfriar la hielera, eliminando la preocupación por el sobrecalentamiento o el daño por el agua (del hielo derretido). El etiquetado correcto de las muestras colectadas es muy importante, como la etiqueta que acompaña al material a las instalaciones de cuarentena; el colector no debe limitarse a las notas de campo sino que debe proporcionar toda la información importante con los especímenes. Cada colecta debe ser etiquetada con un número de acceso único que pueda ser usado para llevar la cuenta de la colecta de campo, para la cuarentena y para la liberación eventual como un agente de control biológico.

Debe contarse con el tiempo adecuado, al final de cada día, para separar, etiquetar y procesar el material para almacenaje o envío; esto puede exceder el tiempo utilizado en la colecta. Frecuentemente, es posible permanecer dos días en cada localidad, para colectar tanto en la mañana como en la tarde, cuando la actividad de los insectos es más grande. El acceso a las instalaciones de los laboratorios locales puede proporcionar espacio de trabajo y equipo pero, en general, el explorador debe estar preparado para procesar las colecciones en un cuarto de hotel o en un alojamiento similar.

El material colectado debe ser enviado tan frecuentemente como sea posible, para asegurar que los insectos lleguen vivos a la instalación de cuarentena en el país receptor. Los envíos más frecuentes y más pequeños son ventajosos porque cualquier envío puede perderse por demora o por error. Los envíos deben ser hechos al inicio de la semana de trabajo para evitar que se demoren innecesariamente durante los fines de semana. Las colectas hechas al final de un viaje deben ser llevadas a la mano hacia el país de importación, si se permite. Debe permitirse hacer cualquier inspección requerida por el país exportador,

antes de la autorización final para el envío. El estado de vida más durable del enemigo natural, si está disponible, debe ser seleccionado para el envío. Tal estado debe incluir las pupas de los insectos, estados en diapausa o huevecillos. Para los patógenos, los cadáveres del hospedero, esporas o colonias de hifas de hongos en agar deben ser los estados escogidos para el envío.

ENVÍO DE LOS ENEMIGOS NATURALES

El envío de enemigos naturales vivos (**Figuras 13-1**) es una parte crítica de la mayoría de los programas de control biológico clásico (Bartlett y van den Bosch 1964; Boldt y Drea 1980; Bellows y Legner 1993) y muchas pérdidas ocurren en este paso. El envío debería ser efectuado a través de un servicio de envío rápido, por carga aérea, o correo aéreo de alta prioridad y los colectores probablemente tendrían que regresar a las principales ciudades para tener acceso a tales servicios. Si es posible, elegir el día de envío para que los paquetes arriben al país receptor a principios de la semana de trabajo, para facilitar un rápido manejo del paquete y para evitar la demora común de los fines de semana. El personal en el puerto de entrada y de



Figuras 13-1. Un contenedor para el envío internacional de enemigos naturales; note el uso del aislamiento con espuma plástica y el empaque de hielo artificial (en el centro) para enfriamiento (la espuma plástica de la parte superior de la caja fue removida para la fotografía) (a, b); el paquete ensamblado y las etiquetas de envío asociadas. (Fotografías cortesía de USDA/BIRL, M. Heppner [a], S. R. Bauer [b], y R. M. Hendrickson [c]); reimpresso de Van Driesche, R. G. and T. S. Bellows, *Biological Control*, 1996. Kluwer, con permiso).

la cuarentena debería ser informado por correo electrónico, fax o teléfono de los detalles de cada envío (nombre de la compañía, información de la ruta, tiempo de arribo y número de registro del envío). El material de empaque externo debería mostrar los permisos necesarios y las etiquetas con la dirección para facilitar el reconocimiento y el manejo por el personal de aduana y de inspección agrícola, para evitar la demora en el puerto de entrada, la cual es una causa común de muerte de los enemigos naturales enviados.

Algunas recomendaciones generales para el envío de insectos incluyen:

- (1) Envíe por la ruta más rápida disponible, usando un plan bien definido para la rápida autorización en las aduanas y para el reenvío a la cuarentena.
- (2) Envíe materiales en hieleras aisladas o recipientes de espuma plástica, colocados en forma ajustada en el interior de cajas de cartón.
- (3) Evite materiales de plástico fresco (lo cual puede expedir gases tóxicos) y cápsulas de gelatina (las cuales se ablandan con humedad alta).
- (4) Selle bien las cajas y los frasquitos (el parafilm es útil); use un número más grande de recipientes pequeños en lugar de unos pocos más grandes, y no llene en exceso los paquetes con el material.
- (5) Marque las cajas o los frasquitos con un número de accesión, fecha de colecta, localidad, y, si está disponible, el nombre o el grupo del agente de control (el cual debe coincidir con el del permiso).
- (6) Evite el sobrecalentamiento en la ruta, colocando paquetes de gel congelado en el interior de los paquetes.
- (7) Evite la condensación al mínimo en los paquetes por material vegetal extra, usando bolsas de tela, no plásticas, y frasquitos ventilados o cajas Petri, y agregue materiales absorbentes en el interior de los frasquitos.
- (8) Para insectos herbívoros, proporcione una gran cantidad de material vegetal como alimento. El uso de bolsas Ziploc infladas con aire funciona bien para huevecillos y primeros estados de vida, los que son susceptibles de ser aplastados.
- (9) Evite la resequedad excesiva, si es necesario, agregando una caja Petri llena con una solución salina saturada y después séllela con una membrana semipermeable (tal como Opsite Wound[®], disponible con los suministradores médicos) (Hendrickson *et al.*, 1987).
- (10) Empaque los enemigos naturales colectados del suelo en musgo sphagnum o excelsior humedecido (si lo permiten las condiciones del permiso).
- (11) Proporcione a los adultos enviados, material húmedo, absorbente, como el papel de toalla, como sustrato de descanso.
- (12) Alimente a los parasitoides adultos, colocando gotas pequeñas de miel en el interior de los recipientes. Proporcione a las polillas adultas o a las moscas acceso a agua azucarada, Gatorade[®] o miel, ya sea en el interior de los recipientes de vidrio o en bolas de algodón o en esponjas (nota: la importación de miel puede estar prohibida en algunos países, como Australia y Nueva Zelanda, pero puede ser comprada al llegar).

Las uvas pasas humedecidas también pueden usarse (Bartlett y van den Bosch, 1964). Para alimentar a los ácaros depredadores, debe proporcionarse polen.

- (13) Limite el desarrollo de organismos saprófagos sobre los artrópodos enfermos o el tejido vegetal, transfiriendo los patógenos a un medio artificial antes de enviar o dividir las muestras de patógenos en pequeños lotes para limitar la contaminación originada de cualquier espécimen en particular.

OPERACIÓN DE UN LABORATORIO DE CUARENTENA

Una instalación de cuarentena está diseñada para ser una área altamente segura, en la cual pueden ser abiertos los envíos de organismos del extranjero, excluidos los contaminantes y criados los enemigos naturales deseados mientras se determina su seguridad para la liberación en el país receptor.

DISEÑO Y EQUIPO

Los cuartos para el manejo de artrópodos benéficos deben estar sellados al ambiente externo a través de detalles especiales en la construcción, el control de entrada a través de puertas múltiples y el ocultamiento de los ductos de intercambio de aire (Leppla y Ashley, 1978). El personal debe usar batas de laboratorio y cubrirse los zapatos mientras esté en el laboratorio de cuarentena, quitárselos cuando salga y dejarlos en el laboratorio. Los cuartos diseñados para usarse con patógenos requieren de precauciones adicionales, debido al tamaño de los organismos bajo estudio (ver Melching *et al.* [1983] y Watson y Sackston [1985]). Las áreas de manejo de patógenos deben de estar selladas y el aire debe recircular a través de filtros dobles, capaces de remover partículas menores de 0.5 μm y de remover las esporas de hongos y bacterias que vuelan en el aire. Un extractor de aire debe pasar a través de un tercer filtro de fondo profundo, antes de ser ventilado. La presión del aire dentro del laboratorio debe ser menor que la del exterior para evitar el intercambio de aire desde el interior del laboratorio hacia el exterior. Los espacios de trabajo dentro del área de cuarentena típicamente están divididos en pequeños cubículos para limitar la contaminación entre las áreas de estudio.

La identificación de los artrópodos importados típicamente requiere de un microscopio de disección binocular (10-120X) con lámpara de fibra óptica de alta calidad. Un microscopio compuesto es necesario para investigar los cultivos de artrópodos benéficos para entomopatógenos y para identificar a los patógenos importados. La literatura taxonómica necesaria para identificación de especies introducidas debería estar disponible en la instalación de cuarentena o ser accesible a través de conexiones de Internet. Otro equipo necesario en los laboratorios de cuarentena incluye: (1) cajas de cría o recipientes para separar y alojar a los enemigos naturales, (2) una fuente de agua y otros materiales para preparar medios de cultivo de microorganismos, (3) autoclaves u hornos para esterilizar o quemar contaminantes no deseados o materiales de envío, (4) áreas para el mantenimiento de plantas, (5) refrigeradores o cuartos fríos para mantener organismos en estado de diapausa, (6) cámaras de crecimiento para mantener enemigos naturales a

las temperaturas deseadas para la cría, (7) dióxido de carbono para anestesiar artrópodos, y (8) diversas herramientas, desde martillos y destornilladores para reparar y ajustar cajas, hasta pinzas y probetas para manejar artrópodos diminutos.

EL PERSONAL Y LOS PROCEDIMIENTOS OPERATIVOS

La administración y las políticas operativas firmes y comprensibles son básicas para la seguridad y la operación efectiva de un laboratorio de cuarentena seguro. Debería haber un solo supervisor de cuarentena responsable de todos los aspectos de seguridad para un laboratorio. La consolidación de la responsabilidad incrementa la seguridad, aseverando que cada organismo sea manejado apropiadamente y que sean mantenidos los registros adecuados de todos los organismos recibidos, enviados o procesados de otra manera. El supervisor de cuarentena debe estar familiarizado con las regulaciones y las leyes que gobiernan el manejo del laboratorio, desarrolla y mantiene contacto con el personal regulador en los puertos locales de entrada, a través del cual llegan los envíos, procesar todos los envíos entrantes, mantener los registros necesarios y supervisar el funcionamiento del laboratorio de cuarentena.

El oficial de cuarentena también es responsable de mantener contacto con todas las personas involucradas en la colecta y envío de los enemigos naturales al laboratorio de cuarentena. El personal de cuarentena debe estar familiarizado con los conceptos y prácticas del control biológico y saber cómo se aplican a proyectos específicos y a los organismos con los que están involucrados. Los científicos que conducen proyectos de investigación en cuarentena deben tener conocimiento de la taxonomía y del ciclo de vida de las plagas a controlar y de los posibles enemigos naturales. Tal información puede ser crítica en la planeación de los estudios de especificidad de hospederos y en la verificación de la naturaleza de la relación entre el presunto enemigo natural primario y sus hospederos.

Todos los trabajadores en el laboratorio de cuarentena deben estar familiarizados con la operación física de las instalaciones de contención y de su equipo, particularmente de la ventilación, energía y de los servicios, así como del funcionamiento del autoclave u otro tipo de esterilizador. Los nombres y los números de teléfono del personal de mantenimiento y de reparación, para ser contactados en casos de reparaciones necesarias, deben estar disponibles para los días de trabajo normal así como para fines de semana y días festivos. Las necesidades de empleados de limpieza dentro del laboratorio de cuarentena deben ser manejadas por personal del laboratorio de cuarentena. El personal de reparación o servicio del laboratorio y del equipo debe conocer la importancia de la seguridad de la cuarentena y deben ser acompañados por personal del laboratorio de cuarentena cuando estén trabajando en la zona de seguridad. Los científicos visitantes y el personal regulador también deben ser acompañados en el laboratorio. Las visitas casuales por individuos o grupos no deben ser permitidas en la zona de contención.

Incendios, temblores, vandalismo y enfermedades pueden interrumpir las operaciones de cuarentena. Deben colocarse instrucciones en las puertas de entrada, advirtiendo al personal de emergencia los procedimientos de entrada y salida para hacer menos probable una falla en la seguridad de la cuarentena. Los números de teléfono para contactar

al oficial de cuarentena y su asistente, durante horas de trabajo y de descanso, deben ser colocados en la entrada del laboratorio de cuarentena.

MANEJO DE COLONIAS DE INSECTOS EN CUARENTENA

Después de que los enemigos naturales han sido colectados y enviados a un laboratorio de cuarentena, deben crearse colonias sostenibles de los agentes de control. Esto requiere (1) la recuperación exitosa de los enemigos naturales de los envíos de otras partes del mundo, (2) el mantenimiento del material hospedero para la cría, y (3) la reproducción exitosa del agente bajo condiciones de cuarentena.

PROCESAMIENTO DE LOS ENVÍOS DESDE EL EXTRANJERO

Los envíos de organismos vivos deberían ser abiertos en el interior de una caja de transferencia (una caja de observación con una tapa de vidrio y los lados cerrados, que tengan una o dos mangas de tela, a través de las cuales el material puede ser manipulado). Esta precaución permite la separación inicial segura de cualquier contaminante potencial de los enemigos naturales que están siendo enviados. Los organismos vivos son colectados en frasquitos de vidrio, los materiales de empaque son tratados con calor en un horno seco o en autoclave y desechados. Los organismos vivos entonces son investigados taxonómicamente, los que se sabe que son indeseables (hiperparasitoides o artrópodos fitófagos no deseados) son eliminados y preservados en alcohol 75-95% como respaldo de identificación. Si hay congeladores de ultra-baja temperatura disponibles, las muestras congeladas también deben ser almacenadas para preservar el material para estudios moleculares. Los organismos potencialmente benéficos son separados por especie, planta hospedera y localidad de colecta, observados en cópula y colocados en cajas de aislamiento con el hospedero apropiado para su propagación. A cada colonia en cuarentena se le debe asignar un número específico que podría referirse a la fuente de acceso original del material.

Si el envío consiste de patógenos de plantas, las precauciones contra las liberaciones no autorizadas son las mismas de un laboratorio microbiológico e incluyen requerimientos de filtración de aire como se discutió anteriormente y la esterilización del agua y de los suministros del suelo (tanto en la entrada como en la salida del laboratorio de cuarentena), típicamente en autoclave, antes de descargarlos dentro del área. El personal debe tomar un baño antes de dejar el laboratorio, dejando sus prendas de trabajo en el interior del laboratorio de cuarentena.

MANEJO DE COLONIAS DE HOSPEDEROS Y DE ENEMIGOS NATURALES

El establecimiento de candidatos a enemigos naturales y sus plantas hospederas u hospederos necesarios para los cultivos de laboratorio, libres de contaminación, es un objetivo primordial de las operaciones de cuarentena. Algunas colonias en cuarentena, particularmente las mantenidas en plantas, pueden ser infestadas por artrópodos plaga, como áfidos, moscas blancas, trips, piojos harinosos y ácaros. El control de estos organismos debe ser efectuado con cuidado y un objetivo particular debe ser evitar el uso de plaguicidas donde

sea posible. Si es posible, las plantas usadas para la propagación de enemigos naturales (o sus hospederos) deben ser desarrolladas desde semilla en un invernadero de cuarentena. Si se usan plantas compradas o recolectadas en campo (como las especies leñosas necesarias en algunos proyectos de escamas), deberían de ser tratadas con un plaguicida no residual y colocadas en un área separada para verificar que están libres de plagas antes de usarlas. Los requerimientos para la persistencia de los plaguicidas y la selectividad, dependerá de que plaga deba eliminarse y cuales enemigos naturales deban ser criados. La liberación de enemigos naturales comerciales, como los ácaros depredadores para controlar a otros ácaros o a trips, pueden ser de utilidad cuando los plaguicidas no puedan ser usados. Sin embargo, las plantas donde se usaron depredadores generalistas deberían ser cuidadosamente revisadas y ser eliminados, antes de colocarlas en las colonias.

Las colonias en cuarentena también pueden estar sujetas a la infestación por parasitoides (para los enemigos naturales fitófagos), hiperparasitoides, parásitos (tales como ácaros o nemátodos) y por patógenos. Puede ocurrir la contaminación cruzada entre colonias (especialmente de parasitoides) que son criadas en cuarentena. El cuidado por el personal de cuarentena es crítico en la identificación oportuna de esos problemas, aislando los cultivos afectados y eliminando los organismos no deseados. La codificación molecular de barras del material parental, al tiempo de la importación, puede ser usada para asegurar que las generaciones subsecuentes de la colonia permanezcan puras (Goolsby *et al.*, 1998). La eliminación de patógenos de las colonias de artrópodos está basada en una mezcla de la destrucción de los materiales infectados, junto con la esterilización y el cambio frecuente de los recipientes (Etzel *et al.*, 1981). La esterilización de la superficie de los huevos, por ejemplo, puede ser exitosa también al desinfectarlos brevemente en una solución blanqueadora (solución de hipoclorito de sodio) en agua (Briese y Milner, 1986).

La protección de la contaminación a las líneas de patógenos importados requiere de un sitio adecuado para el aislamiento de los cultivos microbiales. Si los microbios son cultivados en medios artificiales, el aislamiento puede realizarse manteniendo los cultivos en recipientes sellados, en diferentes cámaras de crecimiento o en diferentes cuartos. Si los cultivos son mantenidos en hospederos vivos, debe tenerse en cuenta el mantenimiento del material hospedero no infectado (plantas o artrópodos), en el exterior del laboratorio de cuarentena. Cuando biotipos particulares de patógenos o artrópodos están siendo estudiados, las herramientas para identificación de cepas confiablemente deben estar disponibles, ya sea usando marcadores moleculares (ver el Capítulo 15) u otros métodos. Los especímenes representativos deben ser mantenidos en almacenamiento criogénico para su comparación con las introducciones posteriores, para su recuperación o para evaluar líneas aisladas para determinar si deriva genética o contaminación han ocurrido.

Antes de que se apruebe la liberación de los enemigos naturales de cuarentena, debe demostrarse la especificidad adecuada sobre el hospedero para indicar la seguridad para la biota del país donde será liberado. La información de las solicitudes de liberación puede venir de varias fuentes (registros de literatura, inspecciones de campo en la región de origen y pruebas del rango de hospederos). Las colonias de los enemigos naturales criados en cuarentena son usadas para llevar a cabo pruebas de rango de hospederos en laboratorio, mientras que el agente está todavía en cuarentena. El Capítulo 17 incluye una discusión de cómo conducir estas pruebas. Las preocupaciones que el laboratorio de

cuarentena debe resolver son (1) cómo criar los candidatos a enemigos naturales en cantidades suficientes por muchas generaciones, (2) cómo asegurarse que las colonias retengan su integridad (libres de contaminantes o invasiones de especies similares), y (3) cómo retener las características genéticas de la cepa original, sin selección para su adaptación a las condiciones de laboratorio.

DESARROLLO DE SOLICITUDES PARA LA LIBERACIÓN EN EL MEDIO AMBIENTE

AGENTES DE BIOCONTROL DE MALEZAS

Para solicitar la liberación de nuevos agentes que se alimentan en plantas, debe seguirse un proceso formal en los Estados Unidos y en otros países desarrollados involucrados en el control biológico de malezas. Una vez que las colonias del agente de control de malezas han sido establecidas en el laboratorio de cuarentena, empiezan las interacciones con un comité de gobierno encargado de la supervisión del desarrollo y evaluación de los datos del rango de hospederos y de la evaluación del riesgo/beneficio resultante. Este comité revisor conformado por representantes de varias agencias (Grupo Asesor Técnico – GAT) debe aprobar la lista de otras especies (distintas a la maleza problema) que van a ser incluidas en las pruebas de rango de hospederos, para asegurar que esté completa. Los resultados, cuando estén disponibles, deben ser enviados al GAT junto con un análisis. Si el GAT está de acuerdo con que no es probable que el agente represente un peligro significativo para las plantas nativas, este pasa su recomendación a APHIS (o a las agencias reguladoras similares en otros países) para que los nuevos agentes de control sean aprobados para su liberación. El grado de aceptación de la extensión del rango de hospederos para un nuevo agente no es fijo, puede variar de un programa a otro, aún cuando sean las mismas especies de maleza a eliminar o de enemigos naturales, dependiendo de las circunstancias en el área de liberación. Generalmente, los enemigos naturales son aceptados para liberación si no ponen en riesgo a las especies valiosas o deseables, ya sea en el sitio de liberación o en áreas dentro de la dispersión natural probable del agente de control. Sin embargo, la alimentación incidental sobre otras plantas usualmente no es un impedimento prohibitivo para su liberación y las especies de enemigos naturales no necesitan ser estrictamente monófagas para ser aceptables.

AGENTES DE BIOCONTROL DE ARTRÓPODOS PLAGA

Para los insectos parásitos y depredadores, algunos países (Nueva Zelanda, Australia) tienen requerimientos legales formales que exigen las pruebas del rango de hospederos y estipulan un procedimiento a cumplir. Los Estados Unidos, sin embargo, no tiene tales requerimientos hasta la fecha. En su lugar, el proceso ocurre en dos pasos: primero debe solicitarse al USDA-APHIS-PPQ tomar una decisión de que la especie a ser liberada no es una plaga de plantas en el contexto de la ley. Generalmente, éste es el caso para la mayoría de los insectos depredadores y parásitos. Segundo, en los Estados Unidos una

Evaluación Ambiental (EA) es escrita por el investigador que solicita la liberación, describiendo el rango de hospederos del agente, en relación con los insectos nativos del área de liberación (a menos que tal evaluación ya exista, como es el caso de ciertos géneros que son usados comúnmente en el control biológico de insectos). La Evaluación Ambiental proporciona también un análisis de las consecuencias riesgo/beneficio, en relación con la liberación propuesta. USDA-APHIS envía la solicitud de liberación al panel de control biológico de la Organización Norteamericana de Protección a las Plantas (NAPPO, por sus siglas en inglés) para su revisión y recomendación. La revisión de la NAPPO es enviada a revisores anónimos y se pasa una recomendación al USDA-APHIS. Las solicitudes para la liberación de agentes de control en Canadá o en México, también son enviadas a la NAPPO y las recomendaciones son enviadas a los representantes de los tres países. Si una revisión de esta evaluación emite un juicio de impacto no significativo, la liberación puede proceder.

BALANCEAR LOS RIESGOS Y LOS BENEFICIOS ESTIMADOS

Cuando se evalúa la conveniencia de un enemigo natural candidato para su liberación en el medio ambiente, el riesgo de ataque a otras especies debe ser comparado con el daño esperado al ambiente si la plaga permanece sin control. Esto se realiza usando primero la estimación del rango de hospederos del agente de control y el conocimiento de la fauna o flora local, para estimar el grado de riesgo que podría acarrear una introducción. Entonces se compara con los beneficios económicos o ecológicos que se están buscando. Esta comparación permite a los científicos del proyecto describir los beneficios probables: la proporción del costo para las introducciones propuestas. La meta es solamente introducir los agentes cuando exista una necesidad real para que la plaga sea suprimida y cuando el agente parezca razonablemente específico. Pero, en último paso, juiciosa decisión acerca de los riesgos estimados y los beneficios proyectados llega a ser una decisión política tomada en nombre de la comunidad por su gobierno. Este proceso debería ser un proceso abierto que solicite la participación pública y actúe con la consulta continua a los biólogos conservacionistas.