

00381
43



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EVALUACIÓN DE ALGUNOS AGENTES ENTOMOPATÓGENOS PARA
EL CONTROL MICROBIANO DE TRES ESPECIES DE MOSCAS DE LA
FRUTA (DIPTERA: TEPHRITIDAE) DE IMPORTANCIA ECONÓMICA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)

P R E S E N T A

JORGE TOLEDO ARREOLA

DIRECTOR DE TESIS: DR. JORGE EUGENIO IBARRA RENDÓN

2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A MIS PADRES

A MIS HERMANOS

A MI PEQUEÑA LYZ

A MIS HIJOS JORGE ALEJANDRO Y DANIEL

(Los Pichiches)

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme la oportunidad de superación.

A El Colegio de la Frontera Sur, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y al Sistema de Investigación Benito Juárez (SIBEJ; proyecto A-024), por su apoyo logístico para alcanzar esta meta.

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I. P. N., Unidad Irapuato, por las facilidades otorgadas para llevar a cabo este proyecto.

A mi Comité Tutorial, especialmente al Dr. Jorge E. Ibarra Rendón (Director de Tesis), al Dr. Pablo Liedo (Asesor) y al Dr. Trevor Williams (Asesor), quienes con su paciencia, asesoría y constante apoyo fue posible la culminación de este trabajo.

También deseo expresar mi mejor reconocimiento a la Dra. Nora E. Galindo M., y a los Dres. Roberto M. Johansen N., Joaquín Bueno Soria y José G. Palacios Vargas, quienes formaron parte de mi Comité Académico y con sus críticas, sugerencias y generosa disponibilidad contribuyeron a elevar la calidad de este trabajo. Gracias por permitirme aprender de ustedes.

A la Campaña Nacional contra Moscas de la Fruta (SAGARPA-IICA) y al Programa Moscamed (SAGARPA), por el apoyo brindado durante el desarrollo de esta investigación.

A la Dra. Raquel Alatorre R. y al Dr. Nahúm Marbán M. del Colegio de Postgraduados, por el apoyo en la determinación de una de las especies de nemátodos utilizadas en este estudio.

A la Ing. Azucena Oropeza C., a los Ings. Ricardo González L. y José L. Gúrgua L., así como a la M. en C. Concepción Pérez M., por los diversos apoyos que me brindaron y sus constantes palabras de ánimo.

Al M. en C. Jorge M. Valdez C. del Colegio de Postgraduados, por su asesoría en la realización de los estudios histológicos.

Al M. E. Javier Valle Mora, por su asesoría y constante apoyo con los análisis estadísticos.

Al Ing. Julio Domínguez (paisano), de la planta Moscafrut (SAGARPA-IICA), por su colaboración con el material biológico.

Al Lic. Asdrúbal Muñoz Campero, por permitir hacer uso de su huerto para llevar a cabo la fase de campo de este proyecto.

A la M. en C. Guadalupe Nieto, por el apoyo brindado en Microscopia Electrónica.

Al Tec. Gustavo Rodas, por su invaluable apoyo durante la realización de los diferentes trabajos experimentales.

A mis compañeros, amigos y demás personas que de una u otra manera colaboraron en el desarrollo y culminación de este trabajo.

CONTENIDO

Capítulos	Página
CONTENIDO	i
ÍNDICE DE CUADROS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
RESUMEN	viii
SUMMARY	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. LITERATURA REVISADA	4
2.1. Biología y ecología de las moscas de la fruta.	4
2.2. Importancia económica de las moscas de la fruta.	5
2.3. Métodos de detección y de control.	6
2.4. Microorganismos entomopatógenos con potencial para el control de moscas de la fruta.	9
2.5. La bacteria <i>Bacillus thuringiensis</i> .	10
2.5.1. La β -exotoxina y la δ -endotoxina.	11
2.5.2. Modo de acción de la β -exotoxina y de la δ -endotoxina.	12
2.5.3. Usos comerciales.	14
2.5.4. Efecto sinergista de la β -exotoxina y la δ -endotoxina.	15
2.5.5. Efecto en organismos no blanco.	16
2.5.6. Antecedentes de su uso en el control de dípteros y tefrítidos.	17
2.5.7. Patología de larvas de dípteros tratadas con β -exotoxina.	19
2.6. Los nemátodos <i>Steinernema feltiae</i> y <i>Heterorhabditis indica</i> .	20
2.6.1. Biología, ecología y modo de acción de los nemátodos <i>Steinernema feltiae</i> y <i>Heterorhabditis indica</i> .	21
2.6.2. Potencial de los nemátodos como agentes de control biológico de moscas de la fruta.	23
2.6.3. Interacción de los nemátodos con sus hospederos y con	

algunos factores abióticos y bióticos.	24
III. MATERIALES Y MÉTODOS	26
3.1. Material biológico y condiciones ambientales.	26
3.2. Toxicidad de la β -exotoxina de <i>Bacillus thuringiensis</i> hacia larvas de moscas de la fruta y efectos subletales en adultos.	27
3.2.1. Toxicidad de la β -exotoxina.	27
3.2.2. Efecto de las concentraciones subletales sobre adultos.	28
3.2.3. Efecto patotóxico de la β -exotoxina en la cutícula de larvas de tres especies de moscas de la fruta.	29
3.2.4. Efecto de la CL ₅₀ y la CL ₉₅ de β -exotoxina en larvas de dos edades de la mosca mexicana de la fruta.	33
3.3. Efecto de la δ -endotoxina de <i>Bacillus thuringiensis</i> en adultos de moscas de la fruta.	34
3.4. Parasitismo en larvas de moscas de la fruta por dos especies de nemátodos entomopatógenos en condiciones de laboratorio y de campo.	35
3.4.1. Efecto de la edad larval y la profundidad del suelo sobre las CL ₅₀ 's.	35
3.4.2. Parasitismo en larvas maduras de <i>Anastrepha ludens</i> por el nemátodo <i>Steinernema feltiae</i> , en suelo de textura areno-arcillosa.	36
3.4.3. Parasitismo de pupas de <i>Anastrepha ludens</i> por <i>Steinernema feltiae</i> , en suelo de textura areno-arcilla.	37
3.4.4. Impacto de la β -exotoxina y dos especies de nemátodos entomopatógenos sobre larvas de moscas de la fruta y algunos artrópodos no blanco, bajo condiciones de campo.	38
3.4.5. Parasitismo de larvas de <i>Anastrepha ludens</i> por dos especies de nemátodos entomopatógenos en condiciones de campo.	43

3.5. Factores abióticos que afectan el parasitismo de <i>Steinernema feltiae</i> sobre larvas de <i>Anastrepha obliqua</i> en condiciones de laboratorio.	44
3.5.1. Capacidad parasítica del nemátodo en función de la edad y la profundidad del hospedero.	44
3.5.2. Efecto de la textura del suelo en la capacidad parasítica de <i>Steinernema feltiae</i>	45
3.5.3. Efecto de la temperatura en la capacidad parasítica del nemátodo.	45
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
4.1. Toxicidad de la β -exotoxina de <i>Bacillus thuringiensis</i> hacia larvas de moscas de la fruta y sus efectos subletales en adultos.	47
4.1.1. Toxicidad de la β -exotoxina sobre larvas.	47
4.1.2. Efecto de concentraciones subletales sobre adultos.	48
4.1.3. Efecto patotóxico de la β -exotoxina en la cutícula de larvas de tres especies de moscas de la fruta.	54
4.1.4. Efecto de la CL ₅₀ y la CL ₉₅ de β -exotoxina en larvas de dos edades de la mosca mexicana de la fruta.	54
4.2. Efecto de la δ -endotoxina de <i>Bacillus thuringiensis</i> en adultos de moscas de la fruta.	56
4.3. Parasitismo de larvas de moscas de la fruta por dos especies de nemátodos entomopatógenos, en condiciones de laboratorio y de campo.	59
4.3.1. Efecto de la edad larval y la profundidad del hospedero sobre las CL ₅₀ 's.	59
4.3.2. Parasitismo de larvas de <i>Anastrepha ludens</i> de tercer estadio por el nemátodo <i>Steinernema feltiae</i> , en suelo de textura areno-arcillosa.	68
4.3.3. Parasitismo de pupas de <i>Anastrepha ludens</i> de cinco y doce días de edad.	69

4.3.4. Impacto de la β -exotoxina y dos especies de nemátodos entomopatógenos en larvas de <i>Anastrepha ludens</i> y otros artrópodos, bajo condiciones de campo.	71
4.3.5. Parasitismo de larvas de <i>Anastrepha ludens</i> de tercer estadio por dos especies de nemátodos entomopatógenos, en condiciones de campo.	76
4.4. Factores abióticos que afectan el parasitismo de <i>Steinernema feltiae</i> sobre larvas de <i>Anastrepha obliqua</i> en condiciones de laboratorio.	78
4.4.1. Capacidad parasítica del nemátodo en función de la edad y la profundidad del hospedero.	78
4.4.2. Efecto de la textura del suelo sobre la capacidad parasítica de <i>Steinernema feltiae</i> .	80
4.4.3. Efecto de la temperatura en la capacidad parasítica del nemátodo <i>Steinernema feltiae</i> .	83
V. DISCUSIÓN GENERAL	87
5.1. Toxicidad de la β -exotoxina y la δ -endotoxina de <i>Bacillus thuringiensis</i> hacia larvas y adultos de moscas de la fruta.	87
5.2. Parasitismo de larvas de moscas de la fruta por dos especies de nemátodos entomopatógenos en condiciones de laboratorio y de campo.	93
VI. CONCLUSIONES	100
VII. REFERENCIAS CITADAS	103

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Proceso secuencial de la deshidratación e inclusión en parafina de los cortes de larvas de tres especies de <i>Anastrepha</i> tratadas con β -exotoxina de <i>B. thuringiensis</i> .	30
2. Secuencias a seguir durante la eliminación de parafina, hidratación y desalcoholización de las muestras histológicas de larvas tratadas con β -exotoxina de <i>B. thuringiensis</i> .	32
3. Características físico-químicas y contenido de arcillas de los tipos de suelos utilizados como sustrato para larvas de <i>A. obliqua</i> expuestas al parasitismo de <i>Steinernema feltiae</i> . (M. O. = Materia orgánica; C. E. = Conductividad eléctrica).	45
4. Toxicidad de la β -exotoxina de <i>Bacillus thuringiensis</i> a larvas de tercer estadio de tres especies de moscas de la fruta.	47
5. Longevidad, fecundidad y fertilidad de adultos de <i>Anastrepha ludens</i> obtenidos de larvas tratadas con diferentes concentraciones de β -exotoxina de <i>Bacillus thuringiensis</i> .	50
6. Longevidad, fecundidad y fertilidad de adultos sobrevivientes de larvas de tres especies de moscas de la fruta tratadas con la CL ₅₀ de β -exotoxina de <i>Bacillus thuringiensis</i> .	51
7. Respuesta toxicológica de larvas de <i>A. ludens</i> de dos edades, expuestas a las CL ₅₀ y CL ₉₅ de β -exotoxina de <i>B. thuringiensis</i> determinadas para larvas de tercer estadio (maduras).	55
8. Porcentaje de mortalidad acumulada durante 10 días en tres especies de moscas de la fruta después de haberse alimentado con proteína hidrolizada y cristales de <i>Bacillus thuringiensis</i> . (N = 60 moscas/muestra.	57

9. Parasitismo de larvas jóvenes de tres especies de moscas de la fruta por el nemátodo <i>Heterorhabditis indica</i> a tres profundidades en suelo de textura arenosa con 10% de humedad.	60
10. Parasitismo de larvas maduras de tres especies de moscas de la fruta por el nemátodo <i>Heterorhabditis indica</i> a tres profundidades en suelo de textura arenosa con 10% de humedad.	62
11. Parasitismo de larvas jóvenes de tres especies de moscas de la fruta por el nemátodo <i>Steinernema feltiae</i> a tres profundidades en suelo de textura arenosa con 10% de humedad.	64
12. Parasitismo de larvas maduras de tres especies de moscas de la fruta por el nemátodo <i>Steinernema feltiae</i> a tres profundidades en suelo de textura arenosa con 10% de humedad.	64
13. Parasitismo de larvas de <i>Anastrepha ludens</i> de tercer estadio por el nemátodo <i>Steinernema feltiae</i> , en suelo de textura areno-arcillosa con 15% de humedad.	68
14. Parasitismo de pupas de <i>A. ludens</i> de 5 días de edad por <i>S. feltiae</i> , en suelo de textura areno-arcillosa a 5 cm de profundidad.	70
15. Parasitismo de pupas de <i>A. ludens</i> de doce días de edad y/o adultos emergidos y que salieron a través del suelo tratado con <i>S. feltiae</i> .	71
16. Recuperación de larvas de <i>A. ludens</i> (normales y parasitadas) y otros organismos de las cajas experimentales, después de exponerse por 8 días a la acción de algunos agentes entomopatógenos e insecticida en condiciones de campo.	72
17. Emergencia (%) de adultos <i>Anastrepha ludens</i> , <i>Diachasmimorpha longicaudata</i> y estratiómidos, y sobrevivencia de lombriz de tierra después de exponerse durante 8 días a la acción de algunos agentes entomopatógenos e insecticida en condiciones de campo.	74
18. Porcentaje de parasitismo por <i>Heterorhabditis indica</i> y <i>Steinernema feltiae</i> en larvas de <i>Anastrepha ludens</i> en condiciones de campo. ($N = 800$ larvas/tratamiento).	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Unidades de parasitación utilizadas en los experimentos con nemátodos en condiciones de laboratorio (A) y de campo (B).	40
2. Pupas normales (A) y larvas y pupas (B) de <i>A. ludens</i> después de exponerse a la acción de la β -exotoxina de <i>Bacillus thuringiensis</i> .	49
3. Parasitismo de larvas jóvenes (A) y larvas maduras (B) de tres especies de moscas de la fruta por el nemátodo <i>H. indica</i> en tres profundidades en suelo de textura arenosa con 10% de humedad.	63
4. Parasitismo de larvas jóvenes (A) y larvas maduras (B) de tres especies de moscas de la fruta por el nemátodo <i>S. feltiae</i> en tres profundidades en suelo de textura arenosa con 10% de humedad.	65
5. Pupas de <i>Anastrepha ludens</i> normales (A) y parasitadas (B) por el nemátodo <i>Steinernema feltiae</i> . Estados infectivos (C) de <i>Heterorhabditis indica</i> saliendo de una pupa parasitada.	66
6. Parasitismo de <i>Steinernema feltiae</i> en larvas de dos edades de <i>Anastrepha obliqua</i> .	79
7. Parasitismo en larvas de <i>Anastrepha obliqua</i> de 6 (A) y de 8 (B) días de edad por <i>Steinernema feltiae</i> en suelos con diferentes texturas.	81
8. Parasitismo de larvas de <i>Anastrepha obliqua</i> de 6 (A) y de 8 (B) días de edad por <i>Steinernema feltiae</i> en suelo de textura arcillosa a diferentes temperaturas.	84

RESUMEN

Las interacciones entre los organismos forman parte de la ecología aplicada, y su entendimiento es fundamental en la solución de problemas referentes a plagas. Debido a que las moscas de la fruta representan una seria limitación para el desarrollo de la fruticultura, se investigó la interacción de dos agentes entomopatógenos, sobre diversos estados de desarrollo de las moscas de la fruta y otros organismos no blanco. Tuvo como objetivo fundamental desarrollar nuevas alternativas de control, basadas en principios más sustentables. Los aspectos abordados fueron: (i) el efecto tóxico y patológico de las toxinas de *Bacillus thuringiensis* Berliner en larvas y adultos, (ii) el efecto del parasitismo de los nemátodos *Heterorhabditis indica* (Poinar) y *Steinernema feltiae* (Filipjev) en larvas, pupas y adultos emergiendo a través del suelo tratado con nemátodos, (iii) el efecto de las características físicas del suelo y otros factores abióticos en la capacidad parasítica del nemátodo *S. feltiae*, (iv) el impacto de estos agentes entomopatógenos y el insecticida Diazinón sobre organismos no blanco presentes en el suelo bajo condiciones de campo.

Se determinó que la β -exotoxina de *B. thuringiensis* es altamente tóxica a las larvas de las tres especies de moscas de la fruta. La concentración letal cincuenta (CL₅₀) fue de 0.641, 0.512 y 0.408 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de papel filtro para *Anastrepha ludens* (Loew), *A. obliqua* (Macquart) y *A. serpentina* (Wied.), respectivamente. A medida que se incrementó la concentración de la toxina, disminuyó la formación de pupas normales, pero no se observó daño a nivel cuticular y los adultos obtenidos de larvas tratadas no registraron efecto negativo aparente en su longevidad y capacidad reproductiva. En cambio, la δ -endotoxina registró poca actividad biológica sobre los adultos de las mismas especies.

Con respecto a los nemátodos, cuando se aplicaron en suspensión sobre la superficie del suelo, el mayor parasitismo tanto de larvas jóvenes como maduras ocurrió en recipientes de 2 cm de profundidad en arena con 10% de humedad. Las larvas jóvenes fueron más susceptibles que las maduras. El parasitismo por *H.*

indica fue más uniforme en las tres profundidades evaluadas (2, 5 y 8 cm), comparado con *S. feltiae*, que disminuyó a medida que la profundidad del hospedero fue mayor. No hubo diferencia en la mortalidad larvaria de *A. ludens* cuando los estados infectivos de *S. feltiae* se aplicaron antes o después de las larvas, en suelo de textura areno-arcillosa con 15% de humedad. Las pupas de *A. ludens* de 5 y 12 días de edad no fueron susceptibles al ataque de *S. feltiae*, aunque se registró 10% de parasitismo en adultos emergidos y que salieron a través del suelo tratado con 204 nemátodos/cm².

Cuando se aplicó la CL₅₀ previamente calculada en suelo de textura arenosa, la mortalidad en las dos edades larvales de *A. obliqua* se incrementó en suelo de textura areno-arcillosa, observándose una interacción significativa entre la profundidad del hospedero y el tipo de suelo.

Con respecto a la temperatura, el parasitismo fue mayor a 25±1°C y a 19±1°C fue menor, en larvas de *A. obliqua* de 6 y 8 días de edad. La temperatura óptima para el parasitismo de larvas de ambas edades se estimó en 26°C a una profundidad de 7.9 cm con lo que se puede obtener el 91.4 y 61.2% de parasitismo en larvas de 6 y 8 días de edad, respectivamente.

En condiciones de campo, el parasitismo de los nemátodos en larvas de *A. ludens* fue ligeramente menor al observado en laboratorio con la misma cantidad por superficie, y fue más eficiente *S. feltiae* que *H. indica*, sin que los organismos de prueba se vieran afectados por la presencia de ellos y de la β-exotoxina. En cambio, el Diazinón resultó altamente tóxico a las larvas de *A. ludens* y al parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead), y fue moderadamente tóxico a las larvas de estratiómidos y a la lombriz de tierra.

Los resultados indicaron que la β-exotoxina de *B. thuringiensis* y estas especies de nemátodos tienen potencial como agentes de control para larvas de moscas de la fruta, especialmente en ecosistemas tropicales con temperaturas cálidas y alta humedad.

SUMMARY

The interactions between organisms are an essential part in applied ecology and its understanding is very important to give solutions to problems with pests. Due to fruit flies are a serious threat to the fruit culture, the interaction between two entomopathogens agents and several developmental stages of fruit flies, and other non-target organisms, was investigated. The main objective of this research was to develop new strategies of control, based in sustainable principles. The following aspects were studied: (i) the pathological and toxic effects of *Bacillus thuringiensis* (Berliner) toxins on fruit fly larvae and adults, (ii) the effect of parasitism by the nematodes *Heterorhabditis indica* (Poinar) and *Steinernema feltiae* (Filipjev) in larvae, pupae and adults following treatment of the soil with preparasitic nematodes, (iii) the effect of abiotic factors and physical soil characteristics on the parasitic capacity of *S. feltiae*, and (iv) the impact of these biological entities and the synthetic insecticide Diazinon on non-target soil organisms under field conditions.

The β -exotoxin was observed to be highly toxic to three species from the genus *Anastrepha*. The lethal concentration (LC_{50}) was 0.641, 0.512 and 0.408 μg of toxin/ cm^2 of filter paper for third instar *Anastrepha ludens* (Loew), *A. obliqua* (Macquart) and *A. serpentina* (Wied.), respectively. Increasing concentration of β -exotoxin was associated with a decrease in the proportion of normally formed pupae, although no pathological effects were observed in the histology of the pupal cuticle and no adverse sublethal effects were detected in the longevity and reproductive capacity of adult survivors from β -exotoxin treatments. In contrast, the δ -endotoxin showed little biological activity towards the adult stages of the same species.

Following surface application of a suspension of preparasitic nematodes, the greatest prevalence of parasitism was observed in early and late instar larvae held in containers with a 2 cm depth of sand and a 10% moisture content. Early instars were more susceptible to parasitism than older instars. The prevalence of

parasitism by *H. indica* was more uniform at the three soil depths tested (2, 5 and 8 cm) for compared to *S. feltiae* for which parasitism decreased markedly with increasing soil depth.

The prevalence of mortality of *A. ludens* larvae did not change significantly when the infective nematode stages were applied before or after infestation of soil (sandy-clay soil, 15% moisture) by host larvae. Five and 12-day old pupae of *A. ludens* were not susceptible to attack by *S. feltiae* although 10% parasitism was observed in adults that emerged from soil previously treated with 204 nematodes/cm².

Following application of the LC₅₀ concentration of nematodes previously calculated for sandy soil, the mortality of two larval ages increased in sandy-clay soil and a significant interaction between host depth and soil type was detected.

The prevalence of parasitism was highest at 25±1 °C and lowest at 19±1 °C in 6 and 8-day old larvae. The optimal temperature for parasitism was calculated as 26°C at a soil depth of 7.9 cm, wherein the prevalence of parasitism was predicted to be 91.4 and 61.2% for 6 and 8-day old larvae, respectively.

In the field, parasitic activity was slightly lower than that observed in the laboratory and *S. feltiae* was found to be more efficient than *H. indica*. Experimental organisms were not affected by the presence of one another or the presence of β-exotoxin from *B. thuringiensis*. In contrast, the insecticide Diazinon proved to be highly toxic to *A. ludens* larvae and to the fruit fly endoparasitoid, *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead), and was moderately toxic to larvae of soldier flies (Stratiomyidae) and earthworms.

The results indicate that the β-exotoxin of *B. thuringiensis* and these species of nematodes have potential for the biological control of *Anastrepha* fruit flies, especially in tropical agroecosystems with high temperatures and high humidity.

I. INTRODUCCIÓN

El género *Anastrepha* Schiner (Diptera: Tephritidae) es nativo del continente americano e incluye a numerosas especies de moscas de la fruta cuyos hospederos primarios son frutos silvestres. Después de la introducción a América de especies exóticas de frutales tales como los cítricos y el mango, las moscas de la fruta se han convertido en plagas de considerable importancia, por lo que en México son consideradas de interés público (SARH, 1991). Las larvas de las moscas de la fruta abandonan el fruto y están en contacto con el suelo por un lapso de hasta de 24 h antes de pupar, y el período de pupación lo realizan en el suelo en un tiempo de 15 días aproximadamente, dependiendo en gran medida de las condiciones ambientales (Aluja, 1984).

Se han puesto en práctica diversos métodos de control, incluyendo el uso de cebos con insecticidas para matar adultos en follaje o la aplicación al suelo para matar larvas o adultos recién emergidos. Las aplicaciones de insecticidas al suelo como el Diazinón, se han considerado como una táctica que puede contribuir al manejo integrado de las moscas de la fruta (Penrose, 1993). Sin embargo, esta práctica pone en riesgo la microbiota del suelo debido al amplio espectro de éste y otros insecticidas que se utilicen, por lo que surge como prioridad la búsqueda de métodos alternativos que sean efectivos para el control de dichas plagas y con menor impacto ambiental.

Entre los productos bioracionales más prometedores se encuentran la β -exotoxina y la δ -endotoxina producidas por la bacteria *Bacillus thuringiensis* Berliner, y los nemátodos entomopatógenos. La β -exotoxina es producida y secretada al medio de cultivo durante la fase activa del crecimiento vegetativo de la bacteria. Cabe aclarar que no todas las cepas tienen la capacidad de producirla, y se reporta su asociación con los plásmidos que codifican para la δ -endotoxina (Levinson *et al.*, 1990). Se caracteriza por ser estable al calor, soluble en agua, dializable y no se degrada fácilmente ante la presencia de la luz ultravioleta (Hitchings, 1967). Además se ha comprobado que es tóxica a varias especies de insectos en diversos órdenes (Bugerjon, 1974), aunque su efectividad es mayor contra larvas de dípteros en donde actúa por contacto,

pero también puede actuar por vía oral y por inyección (Sebesta *et al.*, 1981). En cambio, para que la δ -endotoxina tenga un efecto patotóxico es necesario que el insecto la ingiera, una vez que el cristal se encuentra en la parte del intestino medio es disuelto por la alta alcalinidad del líquido que ahí se encuentra.

Los géneros de nemátodos entomopatógenos *Steinernema* y *Heterorhabditis* son organismos que habitan y persisten en el suelo, efectivos en ambientes húmedos contra una gran gama de plagas del suelo (Kaya, 1985). Ejercen un excelente nivel de parasitismo en larvas de varias especies del orden Lepidoptera, principalmente defoliadores, cuando se han aplicado en ambientes con alta humedad y temperaturas moderadas como los invernaderos (Glazer y Navon, 1990). En algunos experimentos realizados con larvas de algunas especies de moscas de la fruta se ha comprobado que inducen buenos niveles de parasitación, por lo que no se descarta la posibilidad de que reúnan los atributos como agentes alternativos para el control de larvas de moscas de la fruta, tomando en consideración que parte de su ciclo biológico la pasan en el suelo.

Por las razones anteriormente expuestas, el presente trabajo se realizó para cumplir los siguientes objetivos:

- 1.- Evaluar los niveles de toxicidad y algunos efectos subletales que la β -exotoxina presenta sobre larvas de tercer estadio y adultos de *Anastrepha ludens*, *A. obliqua* y *A. serpentina*, así como el efecto a nivel de cutícula.
- 2.- Determinar la patogenicidad de δ -endotoxina en adultos de *A. ludens*, *A. obliqua* y *A. serpentina*.
- 3.- Estudiar el potencial de dos especies de nemátodos entomopatógenos para parasitar larvas, pupas y adultos de las mismas tres especies de moscas de la fruta.
- 4.- Observar el comportamiento de estos agentes de control sobre la mosca mexicana de la fruta en condiciones de campo.
- 5.- Cuantificar el impacto de estas toxinas y de los nemátodos entomopatógenos sobre organismos no blanco en condiciones de campo.

- 6.- Estimar el nivel de parasitación de las dos especies de nemátodos bajo condiciones de campo.
- 7.- Determinar el efecto de algunos factores abióticos como son la temperatura y la textura del suelo sobre la capacidad parasítica del nemátodo *S. feltiae*.

II. LITERATURA REVISADA

2.1. Biología y ecología de las moscas de la fruta

La familia Tephritidae es una de las familias más grande de los dípteros acaliptrados, actualmente cuenta con más de 500 géneros y alrededor de 4,000 especies descritas (White y Elson-Harris, 1992). Las larvas se alimentan, sin excepción, de los tejidos vivos de las plantas, utilizando como refugio y alimento diversas estructuras como son frutos, semillas, flores en desarrollo y tallos. Esta familia comprende seis géneros de importancia económica por la asociación que tienen con plantas cultivadas, éstos son: *Anastrepha*, *Ceratitis*, *Rhagoletis*, *Dacus*, *Toxotripa* y *Bactrocera*.

El género *Anastrepha* es uno de los grupos más grandes, diversos y de mayor importancia económica de moscas de la fruta en América (Aluja, 1994). Actualmente cuenta con 197 especies descritas (Norrbom *et al.*, 2000). De este complejo de moscas de la fruta, en México destacan cinco especies (Hernández-Ortiz y Aluja, 1993) por la relación que presentan con cultivos de alto valor comercial, éstas son: *Anastrepha ludens* (Loew), *A. obliqua* (Macquart), *A. serpentina* (Wiedemann), *A. striata* (Schiner) y *A. fraterculus* (Wied.). La distribución de estas especies va desde el sur de Estados Unidos de América hasta el norte de Brasil. En México se localizan en las regiones tropicales y subtropicales de ambas planicies costeras, así como en algunas regiones templadas de algunos estados de la región central, en donde están atacando a diferentes especies de frutales de importancia económica (Norrbom y Kim, 1988; Hernández-Ortiz y Aluja, 1993). Estos dípteros presentan una gran capacidad de adaptación al medio, lo que les permite proliferar en cualquier área frutícola y ampliar constantemente su rango de hospederos.

Durante su ciclo de vida pasan por las fases de huevo, larva, pupa y adulto. La duración de cada una de ellas depende directamente de las condiciones ambientales de cada lugar. Los principales factores bióticos y abióticos que influyen en el ciclo de vida de los tefrítidos son el alimento, temperatura, luz, substrato de oviposición y pupación, vegetación nativa,

enemigos naturales y humedad (Bateman, 1972; Aluja, 1994). El ciclo de vida se desarrolla de la siguiente manera: una hembra fecundada inserta su ovipositor en un fruto adecuado y oviposita una serie de huevos por debajo de la cáscara, en el mesocarpio. Del huevo eclosiona una larva que se alimenta de la pulpa hasta completar tres estadios larvarios, el último conocido como larva madura. Al completar esta fase de su desarrollo, la larva está en condiciones de transformarse en pupa para lo cual sale del substrato de alimentación y se entierra en el suelo a profundidades que varían entre los 2 y 5 cm cubriéndose con la última muda que es lo que se conoce como pupario. El tiempo que transcurre desde huevo hasta el nuevo adulto es de 40 a 45 días, aunque depende en gran medida de las condiciones ambientales que prevalezcan en la región (Celedonio-Hurtado *et al.*, 1988; Aluja, 1994).

2.2. Importancia económica de las moscas de la fruta

Los daños causados por las moscas de la fruta pueden ser directos, como la presencia de larvas en el interior del fruto y efectos por la ovipostura, o indirectos, limitando la comercialización de la fruta debido a las restricciones cuarentenarias que imponen los países importadores. En la mayoría de los países latinoamericanos y del Caribe, las pérdidas en la producción frutícola varían alrededor del 25%. En algunas épocas del año, el daño puede ser hasta del 80% (Enkerlin *et al.*, 1989), pero algunas especies, como *A. ludens* y *Ceratitis capitata* Wied. pueden llegar a causar daños que varían de 10 al 40% (Gutiérrez, 1995). En el caso del mango, los daños directos por *A. obliqua* pueden ser extremadamente altos si no se realiza ninguna medida de control (Aluja *et al.*, 1996).

En México se cultivan alrededor de 1.3 millones de hectáreas que corresponde a 32 especies de frutales con una producción anual superior a los once millones de toneladas. De dicha superficie, aproximadamente 700,000 hectáreas están cultivadas con especies frutícolas que constituyen los hospederos más importantes para las moscas de la fruta. Destacan por su importancia económica los siguientes cultivos: naranja dulce (*Citrus sinensis* L.),

toronja (*C. decamana* L.), mandarina (*C. reticulata* L.), mango (*Mangifera indica* L.), guayaba (*Psidium guajava* L.), durazno (*Prunus persica* Natsh), chicozapote (*Achras sapota* Mill.), mamey (*Calocarpum sapote* Merr.) y ciruela mexicana (*Spondias mombin* L.), frutales que resultan susceptibles de ser atacados frecuentemente por *A. ludens*, *A. obliqua* y *A. serpentina*. Por tal motivo este complejo de plagas siempre está sujeto a exhaustiva investigación con el objeto de desarrollar e incorporar tecnologías que permitan hacer un manejo integrado que minimice el daño y reduzca los costos, tanto económicos como de salud y ambientales.

2.3. Métodos de detección y de control

Algunas especies causan serios daños en frutales de importancia económica como es el caso del mango y los cítricos, por lo que es fundamental conocer su presencia y abundancia oportunamente (Celedonio-Hurtado *et al.*, 1995; Aluja *et al.*, 1996). Para capturar adultos de moscas del género *Anastrepha* se utiliza la trampa McPhail de vidrio, cebada con un atrayente líquido de tipo alimenticio (235 cc de agua, 10 cc de proteína hidrolizada y 5 g de bórax) (Gutiérrez *et al.*, 1992). La inspección se debe hacer cada 7 días y no más de 14 ya que un mayor tiempo de exposición provoca la descomposición de las moscas o la disminución del poder atrayente de la trampa (Aluja, 1984); además, en climas calurosos el líquido se evapora y se seca rápidamente. Una vez identificadas las moscas de la fruta capturadas, se cuantifican por especie (o especies) de moscas que son plagas reales del cultivo. Esta cantidad de moscas por especie o plaga se divide entre el número de trampas revisadas y el número de días que estuvieron expuestas, para proporcionar un índice llamado MTD (Mosca/Trampa/Día). Sin embargo, el uso de la trampa McPhail tiene como inconveniente la dificultad para incorporar elementos visuales que incrementen la atracción de las moscas, además de lo laborioso que resulta la inspección y recebado, y su fragilidad, lo que trae como consecuencia un mayor costo de esta actividad y menor eficiencia para iniciar las acciones de control. Lo anterior hace prioritario la búsqueda de nuevos diseños que sean más

prácticas, de fácil manejo y el desarrollo de atrayentes que sean más eficientes para la captura de moscas de la fruta (Paxtián *et al.*, 2001). A pesar esos inconvenientes, se sigue utilizando en el monitoreo de poblaciones de moscas de la fruta.

Las acciones de control se inician después de que el sistema de monitoreo refleja la presencia y abundancia de la plaga, principalmente de aquellas poblaciones que ponen en riesgo el nivel de infestación de las frutas relativamente sanas. Esta actividad se realiza mediante un programa de manejo integrado puesto en práctica por la Campaña Nacional Contra Moscas de la Fruta (SARH, 1991). En este programa se contemplan diversas actividades como el control cultural y/o mecánico, basado principalmente en la recolección, cosecha y destrucción de los frutos sin valor comercial que sean hospederos de dichas plagas. El objetivo es eliminar huevos y larvas, para evitar que la población alcance niveles que pongan en riesgo la sanidad de la fruta (Aluja, 1984; Toledo, 1993).

Dentro de las actividades del manejo agronómico de los cultivos con fines de reducir la presencia de moscas de la fruta se considera el manejo de las arvenses, el rastreo del suelo, la poda de los árboles después de la cosecha y la selección de variedades de frutales a cultivar (Aluja, 1984; Toledo *et al.*, 2001).

El control biológico se aplica a través de liberaciones inundativas, tanto en huertos comerciales como en zonas marginales, de adultos del parasitoide *Dichasmimoprha longicaudata* Ashmead (Hymenoptera: Braconidae), de esta forma se reduce de manera significativa la emergencia de adultos de la plaga (Wong *et al.*, 1991; Montoya *et al.*, 2000).

La eficiencia de la Técnica del Insecto Estéril (T. I. E.) se ha comprobado en el control y erradicación de otras especies de moscas de la fruta (Shiga, 1989; Schwarz *et al.*, 1989; Rull, 1997). Por tal motivo y ante la necesidad de contar con métodos eficientes de control de plagas en áreas extensas, para las moscas de la fruta de importancia económica en México como *A. ludens*, *A. obliqua*, *A. striata* y *A. serpentina*, se construyó una planta de producción de moscas estériles que junto con la planta de producción de la mosca del

Mediterráneo (*Ceratitis capitata* Wied.) en el mismo sitio conforman el complejo bioindustrial más grande del mundo (SARH, 1995). Actualmente este método de control se aplica en varios estados de la República Mexicana (Reyes *et al.*, 2000).

En todo programa de manejo de plagas, el control legal juega un papel importante. Éste se lleva a cabo mediante leyes o normas para regular el movimiento de productos agropecuarios factibles de ser infestados por moscas de la fruta. Se aplica mediante cuarentenas, permisos para movilizar frutas (guías fitosanitarias), certificado de origen, certificado de huertos libres de la plaga, programas de control obligatorios, etc. Su rango de acción es muy amplio, pues comprende acuerdos internacionales, regionales y locales (Aluja, 1984). Con la expedición de la Norma Oficial Mexicana NOM-029-FITO-1996, se establecieron los requisitos y especificaciones para la movilización de frutos hospederos de moscas de la fruta (SAGAR, 1996). La colaboración de las autoridades federales, estatales, municipales y la unión de voluntades de todos los ciudadanos incluyendo los comercializadores de fruta, es fundamental para que este método de control de resultados positivos.

Debido a las restricciones en la comercialización de los frutos, el control químico sigue siendo una de las principales herramientas en el manejo de las moscas de la fruta. Se lleva a cabo mediante aspersiones aéreas o terrestres de cebos-tóxicos constituidos a base del insecticida malatión 57% C. E. + proteína hidrolizada para matar adultos en follaje (Howell *et al.*, 1975; Aluja, 1984), o aplicados al suelo contra larvas o adultos recién emergidos (Penrose, 1993).

Los huertos comerciales orientados a la producción de fruta sana y de óptima calidad para concursar tanto en el mercado nacional como internacional, deberán alertarse y aplicar los métodos de control antes mencionados, al obtener 0.08 de MTD o más, para impedir que la población de la plaga alcance niveles de daño arriba del 5%. Además, es importante fomentar los mecanismos de control para las moscas de la fruta, ya que la erradicación o supresión de ellas, le permitirá a México ser más competitivo en materia frutícola ante un libre mercado (Gutiérrez, 1995). Por tal motivo es importante buscar alternativas de control que sean eficientes contra la plaga y que tengan

un menor impacto ambiental, actualmente están en estudio los modificadores del comportamiento del insecto, la aplicación de feromonas disuasivas de oviposición (Papaj y Aluja, 1993), el posible uso de la ciromacina como reductor de la fecundidad y fertilidad (Díaz *et al.*, 1994; Moreno *et al.*, 1994; Pérez *et al.*, 1999), el empleo del ácido giberélico para reducir la sensibilidad de los frutos (Greany *et al.*, 1994), fomentar la aplicación del control biológico con parasitoides (Montoya *et al.*, 2000), y desarrollo del control microbiano (Lindegren *et al.*, 1990; Trujillo, 1995; Martínez *et al.*, 1997; Alberola *et al.*, 1999; Castillo *et al.*, 2000). De estas alternativas, las que se incorporen contribuirán al manejo de dichas plagas de manera más racional.

2.4. Microorganismos entomopatógenos con potencial para el control de moscas de la fruta

Debido a que el uso de insecticidas ha sido el motivo de muchas controversias por los daños que ocasionan a organismos benéficos y a la salud del hombre (Ehler *et al.*, 1984; Gary y Mussen, 1984; Troetschler, 1984), aunado a los problemas sociales que se generan cuando se aplica en grandes extensiones frutícolas (Hawkes y Stiles, 1986), existe la necesidad de buscar agentes de control eficientes contra la plaga y con menor toxicidad para el ambiente. En los últimos años, tanto la industria y como las agencias gubernamentales han enfatizado su interés por el uso de microorganismos entomopatógenos a manera de bioinsecticidas. Estos patógenos se pueden utilizar de la misma forma como se encuentran en la naturaleza, así como también habiendo sido manipulados genéticamente para mejorar su actividad biológica (Federici, 1991). Dentro de los entomopatógenos más estudiados y prometedores para el control de las moscas de la fruta se encuentran las bacterias (Robacker *et al.*, 1996), los hongos (Castillo *et al.*, 2000) y los nemátodos (Gazit *et al.*, 2000). Hasta el momento únicamente se cuenta con resultados experimentales, ya que ninguno de estos organismos se aplica en programas de manejo integrado de las moscas de la fruta, pero es de esperarse que con los conocimientos que se generen se pueda recomendar un producto

para el control de las moscas de la fruta, cuyo ingrediente activo se derive de algún microorganismo entomopatógeno (Toledo, 2000).

2.5. La bacteria *Bacillus thuringiensis*

Dentro de las bacterias de mayor importancia como alternativa para el control de insectos se encuentra a *Bacillus thuringiensis* (Berliner), que con su acelerada diversificación de productos a base de ella, es de esperar que dichos productos dominen el mercado mundial de este tipo de agente de control (Fietelson *et al.*, 1992). De acuerdo al manual de Bergey's de Bacteriología Sistemática (Krieg y Holt, 1984), pertenece a la familia Bacillaceae por su forma de bastón o barra, y se caracteriza por la presencia de endosporas ovales, estructura que determinan su resistencia a las condiciones adversas, lo que les permite preservar su viabilidad durante varios años. Cuando las esporas son introducidas a un ambiente favorable germinan a una forma activa de producción que representa el estado vegetativo o de multiplicación (Angus, 1971), las cuales poseen propiedades saprofitas bien desarrolladas por lo que puede multiplicarse fuera de los insectos (Krieg, 1981).

Las células vegetativas de *B. thuringiensis* son Gram-positivas, unicelulares y baciliformes, de extremos redondeados con un tamaño promedio de 1 μm de diámetro por 2 μm de largo. Poseen flagelos peritríticos que la proveen de motilidad y se reproducen por fisión binaria, llegando a formar cadenas de 2 a más células en cultivos de crecimiento vigoroso. Al final del proceso de multiplicación produce una spora y un cuerpo parasporal o cristal dentro de las células, tanto la spora como el cristal quedan libres al ocurrir la autólisis (Pendleton, 1969). Pueden multiplicarse en una gran variedad de medios de cultivos bacteriológicos, con un rango de temperatura de 20 a 30° C que se clasifica como el óptimo para la incubación. Si las células son ingeridas por el insecto, el crecimiento de éstas es inhibido por las condiciones alcalinas del intestino, pero si son introducidas al hemocele se multiplican con facilidad y llevan a cabo una septicemia (Angus, 1971).

2.5.1. La β -exotoxina y la δ -endotoxina

De las toxinas producidas por *B. thuringiensis*, las más ampliamente utilizadas en el control de plagas en cultivos agrícolas son la β -exotoxina y la δ -endotoxina. La actividad biológica de dichas toxinas es muy variada, pues difiere de acuerdo a la especie de insecto de que se trate.

La presencia de la β -exotoxina en *B. thuringiensis* generalmente se determina por medio de bioensayos con insectos susceptibles o mediante el uso de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPCL, por sus iniciales en inglés) (Campbell *et al.*, 1987). El primer reporte que se tuvo acerca de su toxicidad fue hecho por MacConell y Richards en 1959 (Bond *et al.*, 1971), quienes inyectaron el sobrenadante de cultivos bacterianos centrifugados en la región pleural de larvas de *Galleria melonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae), indicando que la actividad comienza al parecer en la fase exponencial del crecimiento de la bacteria y que además esa actividad no se pierde al someterla a una temperatura de 120° C durante 15 minutos en autoclave. También Burgerjon y de Barjac (1960) reportaron que el sobrenadante fue tóxico a varias especies de lepidópteros, a *Leptinotarsa decemlineata* (Say) y a *Pristiphora pallipes*. Las características de producción y toxicidad fueron muy similares a la que describieron MacConell y Richard en 1959. Es común encontrarla en la literatura con los siguientes sinónimos: "MacConell and Richard's factor", "Heat-stable toxin", "thermoestable toxin", *Bacillus thuringiensis* exotoxin", Thuringiensin, "fly factor" o "fly toxin" (Bond *et al.*, 1971).

Es un producto extracelular soluble en agua, termoestable a 120° C por 15 minutos, tolerante a la luz ultravioleta y actúa por contacto, es decir, atraviesa la cutícula de los insectos y tiene la característica de ser mutagénica en insectos de los órdenes Coleoptera, Diptera, Lepidoptera y Orthoptera principalmente. Su efecto se ha detectado tanto por vía oral como por inyección y su actividad biológica se manifiesta principalmente en larvas, pupas y ocasionalmente en adultos en donde causa deformaciones teratogénicas (Bond *et al.*, 1969; Dulmage, 1981; Sebesta *et al.*, 1981).

La actividad de la β -exotoxina, según Bond *et al.* (1971) se diferencia de la del cristal porque su actividad persiste después de someterla a un proceso de esterilización a 120°C durante 15 minutos, además el espectro de insectos afectados es diferente al del cristal, y porque los insectos afectados presentan una particular sintomatología que se manifiesta en deformaciones o presencia de vesículas de las partes afectadas.

En cambio la δ -endotoxina se encuentra contenida en el cristal parasporal que es termolábil y soluble a pH alcalino. Su formación se inicia a la par del proceso de esporulación, el cual está dividido en 7 etapas (I-VII). Aparece por primera vez durante el estado III de la esporulación y posee un arreglo cristalino (Bechtel y Bulla, 1976). El cristal alcanza casi en su totalidad la forma final en el estado IV de la esporulación, junto a la aparición del exosporium. La proteína del cristal representa entre un 30 y 40% de la proteína total de la bacteria. La espora alcanza su madurez y es liberada al medio junto con el cristal parasporal a través de la acción de enzimas líticas que destruyen la pared celular (Lûthy *et al.*, 1982). Se observan varias formas de cristales pero el más común es el cristal bipiramidal (Lambert y Peferoen, 1992).

2.5.2. Modo de acción de la β -exotoxina y de la δ endotoxina

El modo de acción de la β -exotoxina fue estudiado por Sebesta y Horska (1968) y Sebesta *et al.* (1981), quienes observaron que la β -exotoxina inhibe la síntesis del RNA interfiriendo con la RNA polimerasa dependiente del DNA. Para ello se une al sitio específico del ATP del complejo enzima-DNA, compitiendo así exclusivamente con el ATP y previniendo el paso de polimerización de la reacción enzimática, no afecta directamente la ruta de biosíntesis de DNA y proteínas. Es un inhibidor específico de la RNA polimerasa dependiente de DNA, tanto de origen procariótico como eucariótico; su acción se debe a que compete con el ATP por el sitio de unión de la enzima, debido a la similitud que existe en la estructura tridimensional de ambas moléculas.

En este aspecto se caracteriza porque retarda o inhibe la pupación de varias especies de Diptera, entre las que se encuentran *Musca domestica* L.,

Haematobia irritans L., *Stomoxys calcitrans* L. (las tres, especies de la familia Muscidae), *Drosophila melanogaster* Meigen (Drosophilidae), y otros dípteros ciclórrafos (Ignoffo y Gard, 1970; Gingrich y Eschle, 1971; Wasti *et al.*, 1973; Haufler y Kunz, 1985). También puede afectar larvas de especies de otros órdenes, tales como son: Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera e Isoptera (Sebesta *et al.*, 1981).

En algunos casos también afecta la aptitud (menor longevidad, fecundidad y fertilidad) de los insectos adultos obtenidos de larvas tratadas. También puede inducir un efecto crónico en los adultos obtenidos a partir de larvas tratadas, cuando emergen presentan efectos mutagénicos como: antenas anormales, alas deformes, vesículas en la cabeza, antenas atrofiadas, etc. (Cantwell *et al.*, 1964; Sebesta *et al.*, 1981).

Un aspecto importante e inesperado de los efectos teratológicos producidos por la β -exotoxina es la habilidad de transmitir a la descendencia efectos mutagénicos. Burgerjon (1972 y 1974) descubrió este fenómeno en la catarinita de la papa (*Leptinotarsa decemlineata*). En esta especie los adultos deformes se pueden reproducir normalmente pero las anomalías que presentan en las patas, partes bucales y antenas son heredadas a la progenie; es decir, los caracteres transmisibles pueden reproducirse, con algunas diferencias para el caso de las antenas y las patas. Sin embargo, los efectos hereditarios producidos por la β -exotoxina no es general, a este respecto Marek *et al.* (1989) reportan que cuando realizaron una prueba de mutación somática y de recombinación genética en larvas de *D. melanogaster* con β -exotoxina, los resultados indicaron que dicha sustancia no exhibe ninguna actividad genotóxica, aunque mostró un efecto distinto en cada sexo de las moscas por arriba de la DL_{50} . Al parecer el efecto fue más drástico en las hembras que en los machos.

En cambio, para que la δ -endotoxina tenga un efecto patotóxico, es necesario que sea ingerida por el insecto, ya que la bacteria es incapaz de invadir a su hospedero sin el cristal (Ibarra, 1995). Una vez que el cristal (o complejo spora-cristal) es ingerido por un insecto susceptible, éste es disuelto por la alta alcalinidad del líquido presente en el intestino medio. Una vez

disuelto, las proteínas del cristal sufren proteólisis por las proteasas digestivas del insecto, aunque su degradación no es completa, ya que queda una proteína intacta de aproximadamente 65 kilodaltons llamada δ -endotoxina, la cual adquiere una conformación tridimensional que les confiere gran especificidad para acoplarse a un componente glicoproteico de la membrana de las células epiteliales, comúnmente llamado receptor. Esta unión desequilibra la estructura de la membrana y conduce a la formación de poros, que permiten el ingreso de grandes cantidades de cationes y agua a la célula. El exceso de agua en el citoplasma de las células epiteliales provoca una distensión excesiva de los organelos membranosos y de la propia célula en su totalidad hasta que estalla, lo que permite la entrada de líquido alcalino al hemocele, el cual se mezcla con la hemolinfa y le cambia el pH. Esto ocasiona que la conducción nerviosa cese y la larva del insecto intoxicado deje de alimentarse a causa de una parálisis del intestino y de las partes bucales, además hay descenso en el pH del intestino medio, un incremento en el pH de la hemolinfa y posteriormente ocurre la muerte del insecto (Cooksey, 1971; Gill *et al.*, 1992).

2.5.3. Usos comerciales

Los bioinsecticidas a base de *B. thuringiensis* se producen en gigantescos fermentadores (biorreactores), cuyos medios artificiales se basan en el uso de diversas materias orgánicas baratas (ej. harina de soya, sangre en polvo, harina de semillas de algodón, etc.), aunque la formulación completa de cada medio representa un secreto de cada compañía. Una vez que la fermentación ha llegado a su fase de autólisis (cuando la pared del esporangio se degrada y libera a la spora y al cristal, separadamente), el fermento se concentra por centrifugación y/o secado atomizado. Este concentrado se homogeniza, se estandariza (normalmente por medio de bioensayos, para determinar la actividad de cada lote de fermentación), y se formula, de acuerdo a su presentación comercial (polvo humectable, suspensión, gránulos, croquetas, etc.). Normalmente la concentración de los productos varía entre 2 y 10%, dependiendo de la actividad de la cepa y de la potencia que se requiera del

producto. Su formulación normalmente permite el uso del equipo convencional para su aplicación (Ibarra, 1995). Actualmente se producen bioinsecticidas basados en *B. thuringiensis* en 13 países, por diversas compañías tanto de carácter privado como aquellas que funcionan con carácter gubernamental. Los nombres comerciales varían: Javelin, Dipel, Biotrol, Moskitur, Futura, etc.

La β -exotoxina es altamente tóxica y tiene un espectro amplio de acción a larvas de dípteros y de muchos otros insectos. Este nucleótido análogo de la adenina bloquea la mitosis propiciando efectos teratogénicos. Por su misma toxicidad, es menos selectiva que la δ -endotoxina y como consecuencia de ello en los Estados Unidos de América no está permitido su uso para el control de plagas en los cultivos. Sin embargo, a pesar de los efectos que produce en mamíferos y probablemente en el hombre, la β -exotoxina mezclada con la δ -endotoxina es producida y utilizada en la ex Unión Soviética y algunos países del Este de Europa, para el control de la catarinita de la papa (*Leptinotarsa decemlineata*) (Coleoptera: Crysomelidae) (Sebesta *et al.*, 1981). En Estados Unidos la β -exotoxina también está siendo estudiada como una alternativa en el control de dicha plaga. Se ha encontrado que en condiciones de campo se ha logrado reducir entre el 98 y 100% de las larvas del último estadio, cuando aplican el producto con un intervalo de siete días.

En la actualidad no existe duda que con la β -exotoxina, es posible controlar muchas especies plagas de Coleoptera y algunas de Diptera. Sin embargo, el modo de acción no selectivo hace que se considere como un producto reservado, como son los insecticidas químicos (Keller y Lagenbruch, 1993).

2.5.4. Efecto sinergista de la β -exotoxina y la δ -endotoxina

Con respecto al sinergismo que presenta la β -exotoxina con otros compuestos producidos por la misma bacteria, existen diferentes opiniones como resultados de las diversas investigaciones que se han realizado. Por ejemplo, Morris (1988) evaluó el efecto tóxico de cinco formulaciones de δ -endotoxina, tres de turingiensina (β -exotoxina) y mezclas de δ -endotoxina y

tingiensina, contra larvas de cuarto estadio del gusano de betabel (*Mamestra configurata* Walker) (Lepidoptera: Noctuidae). En términos generales las mezclas de turingiensina y δ -endotoxina presentaron efectos sinérgicos. También Benz (1975) observó un incremento en la efectividad de la β -exotoxina con una cepa de Bt serotipo H1 mezclada con la formulación comercial Thuricide, en donde se apreció que la β -exotoxina no presenta efectos tóxicos significativos de manera individual, ya que sólo indujo aproximadamente el 60% de mortalidad, mientras que mezclada con el producto comercial, la mortalidad se incrementó a más del 80% sobre *Zeiraphera diniana* (Gueneé). Resultados similares fueron reportados por Mueller y James (1987) cuando evaluaron una formulación comercial de BT y la β -exotoxina, aplicada de manera individual y mezcladas sobre larvas recién emergidas del gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae). Para el caso de la mosca mexicana de la fruta *Anastrepha ludens*, se reportó que 1 mg de δ -endotoxina ocasionó el 80% de mortalidad de adultos, mientras que la β -exotoxina resultó inocua, pero cuando se proporcionó la mezcla de las dos toxinas la mortalidad se incrementó a 90%, por lo que se concluyó que existe un efecto sinergista (Domínguez, 1990). Sin embargo, en otros estudios se demostró que la β -exotoxina no tiene efecto tóxico y no presenta sinergismo con alguna otra toxina de *B. thuringiensis* en adultos de *A. ludens* (Robacker *et al.*, 2000).

2.5.5. Efecto en organismos no blancos

El efecto tóxico de la β -exotoxina se ha observado en organismos de cuatro Phyla (Annelida, Arthropoda, Chordata y Nematelmintos), pero solamente incluyen organismos considerados como plagas (Faust, 1973).

De los organismos benéficos que afecta la β -exotoxina está la abeja europea, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) (Vanderberg y Shimanuki, 1986); el depredador, *Chrysoperla* sp., el gusano de seda, *Bombyx mori* (L.) (Lepidoptera: Bombycidae); y el parasitoide, *Bracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) (Sebesta *et al.*, 1981). Según López (1996, comunicación

personal), cuando evaluó el efecto de la β -exotoxina sobre nemátodos entomopatógenos de la especie *Steinernema feltiae*, observó que no fue tóxica. Pero esta aseveración hay que considerarla con reserva debido a que se ha reportado que es altamente tóxica para otros nematelmintos como es el caso del nemátodo de la soya, *Heterodera glycines* Ichinohe, principalmente a las hembras (Noel, 1990).

Se debe tener precaución si se utiliza como acaricida, ya que es eficiente para el control del ácaro *Tetranychus pacificus* McGregor (Acarida: Tetranychidae), pero también afecta a su depredador *Metaseiulus occidentalis* Nesbitt (Acarida: Phytoseiidae) (Hoy y Ouyang, 1987).

2.5.6. Antecedentes de su uso en el control de dípteros y tefritidos

Se ha reportado que las preparaciones comerciales a partir de β -exotoxina, suministradas en el alimento a los animales domésticos, principalmente ganado, inhiben el desarrollo larvario de algunas especies de dípteros en el excremento. Gingrich (1965), cuando realizó estudios para medir la efectividad en tres especies de moscas que causan problemas en el ganado: *Musca domestica*, *Haematobia irritans* y *Stomoxys calcitrans*, alimentando las larvas con excremento de animales que previamente habían ingerido alimento contaminado con diferentes productos comerciales de *B. thuringiensis*, se encontró en todos los casos que la bacteria no sufría alteraciones al pasar por el tracto digestivo del animal y que las cantidades contenidas en sus excrementos eran suficientes para inhibir el desarrollo larvario, así como evitar que se transformaran en pupas. Resultados muy similares fueron reportados después de haberse adicionado el producto comercial Biotrol a la dieta alimenticia del ganado para el control de la mosca de la cara de los bovinos (*Musca autumnalis* De Geer) (Hower y Hsi Cheng, 1968). En otro estudio más, también se reportó que después de haberse aplicado a la dieta del ganado, sobrenadantes que contenían β -exotoxina, que los resultados fueron excelentes en el control de *M. autumnalis* y *H. irritans* (Yendol y Miller, 1967; Gingrich y Eschle, 1971).

Para el caso de larvas de *Anastrepha ludens* se reportó que después de haberse probado tanto el "pellet" como el sobrenadante de diferentes cepas de *B. thuringiensis*, de las dos presentaciones, los mejores resultados fueron con el sobrenadante, pues se observó una mortalidad máxima de 63%, aunque los precipitados de dos cepas obtenidas de muestras de suelo colectadas en Guatemala, causaron mayor mortalidad en estado de pupa (Robacker *et al.*, 1996). Por otro lado, después de haberse evaluado 440 cepas mediante bioensayos con larvas de *Musca domestica* con el fin de detectar aquellas cepas que producen cantidades letales de β -exotoxina que ocasionaran una mortalidad >80% y cuantificar la producción de turingiensina mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), se sugirió que existe un gran potencial con las cepas productoras de β -exotoxina para el control de larvas de la mosca del mediterráneo, *Ceratitis capitata*, pero aún no se desarrolla un procedimiento seguro para utilizarlas en nuestro país, pues la toxicidad que presenta esta toxina hacia los vertebrados la coloca dentro de las sustancias prohibidas, aún cuando se ha demostrado que sólo es letal al ser inyectada y no cuando es ingerida (Guerrero, 1995).

Cuando se evaluó el sobrenadante que contenía la β -exotoxina de *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* en hembras adultas de *Drosophila melanogaster* y observaron la viabilidad, fecundidad y fertilidad. Suministrando diariamente la toxina a las moscas por diferentes métodos de ingestión, los resultados indicaron que los extractos de la bacteria causaron una reducción en la longevidad de las moscas y que además afectó el tamaño de los huevos (David y Vago, 1967).

El producto Thuringiensin al 20%, evaluado sobre la viabilidad de la mosca mexicana de la fruta, resultó ser tóxico a partir de los 12 días de exposición a la dosis de 1,000 ppm (Borbolla, 1984). En cambio, cuando se evaluó la δ -endotoxina y la β -exotoxina, tanto separadas y en mezclas, se observó que 1 mg de δ -endotoxina ocasionó el 80% de mortalidad en adultos de *A. ludens*, y la β -exotoxina resultó inocua cuando se les proporcionó sola, y cuando se mezcló con la δ -endotoxina la mortalidad se incrementó a 90% (Domínguez, 1990). Sin embargo, cuando se alimentaron adultos de *A. ludens*

con el precipitado que contenía el complejo espora-cristal de *B. thuringiensis* de la cepa obtenida de muestras de suelo colectado en Guatemala, a los 10 días se registró el 80% de mortalidad, en cambio en el testigo la mortalidad fue del 2% (Robacker *et al.*, 1996). Las investigaciones que se han realizado son con respecto al uso del complejo espora-cristal aplicado en adultos y los resultados que se han obtenido son muy inconsistentes, por lo que es necesario continuar con las investigaciones (Borbolla, 1984; Gingrich, 1987, Montoya, 1989).

2.5.7. Patología de larvas de dípteros tratadas con β -exotoxina

La β -exotoxina actúa principalmente por contacto, es decir, que atraviesa la cutícula de los insectos y tiene la característica de ser mutagénica, además puede ser tóxica por vía oral así como por inyección (Sebesta *et al.*, 1981). El efecto varía en gran medida de acuerdo a la dosis, modo de acción y tiempo de aplicación. Dicho efecto es más marcado durante los estados de desarrollo críticos del insecto (Burgerjon y Biache, 1967). El efecto principal en las larvas es la muerte o puede impedir que alcance el próximo estado biológico (pupa o adulto). Los adultos en muchas ocasiones son estériles o tienen una fecundidad y longevidad reducida (David y Vago, 1967). Aunque las estructuras afectadas varían ligeramente entre los diferentes órdenes, los efectos usualmente se observan como deformaciones en las partes bucales, en las antenas, en las alas de los adultos y malformaciones de las pupas.

En algunos dípteros, como *D. melanogaster*, el período de desarrollo larvario se alarga por efecto de la toxina, además ocurre una alta mortalidad larvaria especialmente en aquellas que darán origen a hembras. Los adultos emergidos a partir de larvas que sobrevivieron al efecto de β -exotoxina, fueron de tamaño más pequeño aunque de apariencia normal, pero con una fecundidad y longevidad menor (Sebesta *et al.*, 1981). Además, la interrupción de la ovogénesis pudo haber sido el resultado de la penetración de la β -exotoxina a la hemolinfa y ocasionar algún efecto sobre los ovarios (David y Vago, 1967).

Algunos adultos de la especie antes citada pueden presentar los ovarios atrofiados con los folículos más o menos normales, mientras que los ovarios de *M. domestica* estuvieron tumefasiado con huevos retenidos. También se ha observado una marcada necrosis en los discos imaginales durante el desarrollo (Sebesta *et al.*, 1981).

Cuando se evaluó la toxina sobre larvas de *Haematobia irritans* la mortalidad fue de 12.8, 44.6 y 81.5% con las concentraciones de 1, 3 y 5 $\mu\text{g/g}$ de dieta, respectivamente, aplicado como tratamiento del substrato larvario. También se observó que con dosis más altas la pupación se redujo y la mayor mortalidad ocurrió en la transformación de pupa a adulto. Además, reportaron que las pupas afectadas fueron de menor tamaño y con una coloración más clara, comparadas con las del testigo (Haufler y Kunz, 1985).

Después de haberse evaluado la β -exotoxina sobre larvas de *M. domestica*, se observó que en algunas cepas hubo hasta el 60% de mortalidad larvaria mientras que en otras fue de cero. Después de haberse seleccionado las cepas con actividad tóxica para esta especie de mosca y se volvió a ensayar sobre las larvas de tercer estadio, se registró cero porciento de formación de pupas normales y de emergencia de adultos. La mortalidad larvaria varió entre 40% en aquellas cepas con menor actividad tóxica hasta 100% en aquellas con una mayor actividad biológica (Guerrero, 1995).

2.6. Los nemátodos *Steinernema feltiae* y *Heterorhabditis indica*

Las especies de nemátodos entomopatógenos *Steinernema feltiae* (Filipjev) y *Heterorhabditis indica* (Poinar) son habitantes naturales del suelo, donde persisten a expensas de parasitar una amplia gama de hospederos de la clase Insecta y otros artrópodos, principalmente en ambientes húmedos (Kaya, 1985). Los estados juveniles infecciosos (larvas "dauer") de estos nemátodos penetran al hemocele del hospedero a través de aberturas naturales como son los espiráculos (Triggiani y Poinar, 1976), la boca y el ano (Woodring y Kaya, 1988) o directamente a través del integumento (Peters y Ehlers, 1994). Una vez dentro del insecto, las larvas "dauer" liberan a su bacteria simbiótica, la cual

causa septicemia y la muerte del insecto. Los nemátodos se alimentan de la bacteria y pueden ocurrir de dos a tres ciclos completos en el cadáver del hospedero.

Son efectivos para parasitar larvas de varias especies del orden Lepidoptera, principalmente defoliadores, cuando se han aplicado en ambientes húmedos y temperaturas moderadas (Glazer y Navon, 1990). También son buenos reguladores de poblaciones de algunas especies de larvas de los órdenes Coleoptera, Isóptera y Diptera (Sexton y Williams, 1981; Mullens *et al.*, 1987; Jansson *et al.*, 1993).

El desarrollo en la producción comercial a bajo costo y la fácil aplicación han hecho de ellos una alternativa económicamente atractiva sobre los métodos basados en el control químico (Friedman, 1990). Son específicos para muchos insectos y algunos artrópodos, no causan efectos adversos a mamíferos y plantas, producen una rápida mortalidad a su hospedero y tienen un amplio rango de hospederos, lo que ha generado gran interés en su uso como agentes de control biológico en los sistemas de manejo integrado de plagas (Woodring y Kaya, 1988; Gaugler *et al.*, 2000).

2.6.1. Biología, ecología y modo de acción de los nemátodos

Steinernema feltiae* y *Heterorhabditis indica

Estos nemátodos tienen un ciclo de vida simple, compuesto por los estados de huevo, cuatro estadios juveniles separados por mudas y el adulto. El tercer estadio juvenil es el infectivo, el cual lleva en su tracto digestivo células de una bacteria simbiótica.

Los estados juveniles conocidos como larvas "dauer", particularmente resistentes a las condiciones ambientales adversas, son los estados parasíticos de los insectos. Cada familia de nemátodos está asociada a un género de bacteria en particular: la familia Steinernematidae está relacionada con *Xenorhabdus* spp. y la familia Heterorhabditidae con la bacteria *Photorhabdus* spp. por lo tanto el nemátodo actúa como un vector de dicha bacteria (Kaya y Gaugler, 1993; Stok y Camino, 1996). El modo de acción de las especies de

ambas familias es muy parecido, empieza cuando los infectivos juveniles penetran en el hospedero a través de las aberturas naturales (boca, ano o espiráculos), luego llegan al intestino, tráqueas y por último al hemocele, donde liberan las bacterias simbióticas. Las bacterias se multiplican ahí y provocan la muerte del hospedero por septicemia, lo cual generalmente ocurre en 48 h después de la parasitación del insecto. Los nemátodos continúan ahí con su desarrollo y en pocas horas mudan al 4º estadio larval y posteriormente alcanzan el estado adulto (Kaya y Gaugler, 1993). Una diferencia con los miembros de la familia Heterorhabditidae, es que éstos, además de utilizar las aberturas naturales para penetrar al cuerpo del hospedero, también poseen un odontoestilete con el cual pueden penetrar activamente a través de la cutícula del insecto. Esta característica hace que en cierta forma tengan más ventajas comparados con los de la familia Steinernematidae (Bedding y Molyneux, 1982). Los juveniles infectivos emergen del cadáver del hospedero para buscar nuevos hospederos e iniciar un nuevo ciclo, el cual dura de 10 a 14 días para *S. feltiae* en larvas de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) (Jackson, 1985).

El control de insectos por nemátodos probablemente ocurre de manera natural en un ambiente dado, pero es muy difícil de cuantificarlo (Kaya, 1985). Cuando se hacen aplicaciones inundativas se ha comprobado que existe una persistencia de los mismos, pero se desconoce si sólo persisten o se reciclan. Esto se ha investigado mediante la adición de hospederos a ciertos intervalos de tiempo en macetas con suelo, y se ha comprobado una reducción de su población cuando las condiciones no son favorables después de 50 días de su aplicación (Kaya, 1990). La conservación e incremento de manera natural de las poblaciones de nemátodos, haciendo uso de un manejo adecuado de prácticas agrícolas, nos indica que podemos desarrollar una alternativa viable de control sostenible de insectos plagas (Brust, 1991).

2.6.2. Potencial de los nemátodos como agentes de control biológico de moscas de la fruta

Está demostrado que los nemátodos entomopatógenos son eficientes como organismos reguladores de poblaciones de larvas de insectos, principalmente de los órdenes Lepidoptera, Coleoptera, Isoptera y en menor frecuencia de Diptera. (Woodring y Kaya, 1988). En dípteros se ha comprobado su efectividad en larvas de la mosca doméstica, *M. domestica* L. (Muscidae) (Mullens *et al.*, 1987); del mosquito patón (cranefly), *Tipula paludosa* Miegen (Tipulidae) (Peters y Ehlers, 1994); de la mosca de la remolacha, *Tetanops myopaeformis* von Röder (Otitidae) (Wozniak *et al.* 1993); de la mosca del champiñón, *Megaselia halterata* Wood (Phoridae) (Scheepmaker *et al.*, 1998); así como de diferentes especies de moscas de la fruta (Tephritidae) (Beavers y Calkins, 1984; Lindegren y Vail, 1986; Lindegren *et al.*, 1990; Gazit *et al.*, 2000). Lezama-Gutiérrez *et al.* (1996) reportaron que cuando evaluaron varias especies de nemátodos, la especie de *Steinernema riobrave* (Cabanillas, Poinar & Raulston) provocó un alto porcentaje de parasitismo en larvas de tercer estadio de la mosca mexicana de la fruta, *A. ludens*. Por tales razones se pueden considerar como agentes importantes en los programas de manejo integrado de moscas de la fruta, principalmente en ecosistemas tropicales con ambientes húmedos. Pero es necesario aclarar que el parasitismo en la fase de pupas de Tephritidae es prácticamente nulo (Beavers y Calkins, 1984; Toledo *et al.*, 2002).

A pesar de los reportes que existen sobre el potencial que tienen algunas especies de nemátodos entomopatógenos, incluyendo a *S. feltiae* y a *H. indica*, para parasitar larvas de dípteros en general y específicamente de moscas de la fruta, el conocimiento de estas interacciones aún es limitado, por lo que es necesario profundizar en su estudio, principalmente para saber cómo influyen algunos factores, como la edad y la especie del hospedero, la profundidad a que se localiza o las propias condiciones ambientales, en la capacidad parasítica de estos organismos para considerarlos como parte de una estrategia de manejo integrado de moscas de la fruta.

2.6.3. Interacción de los nemátodos con sus hospederos y con algunos factores abióticos y bióticos

La eficiencia de estos organismos se empezó a estudiar en larvas de especies de Lepidoptera y Coleoptera, pero poco a poco se ha ido ampliando su rango de acción, principalmente porque una gran cantidad de insectos permanece al menos una etapa de su ciclo biológico en el suelo y el cual es un lugar excelente en cuanto a refugio y sobrevivencia de los nemátodos. Por tal motivo se dice que hay una interacción + -, en donde los nemátodos se ven favorecidos con la presencia de larvas de insectos en el suelo y los insectos se ven afectados por la presencia de nemátodos en el suelo.

Su eficiencia está relacionada directamente con la acción de varios factores tanto abióticos como bióticos. Entre los primeros tenemos principalmente a la temperatura, la textura, la humedad y el pH del suelo y el fotoperíodo (Gaugler y Boush, 1979; Gaugler, 1981) que son las principales limitantes de su uso, pero si son óptimas, podemos pensar en un uso eficiente y un control sustentable de aquellas plagas que utilizan el suelo como refugio para completar al menos alguna etapa de su ciclo biológico. A este respecto, Kung y Gaugler (1991) confirmaron que las temperaturas adversas (< 15° y > 35°C) afectan la biología, la respiración, la persistencia (sobrevivencia) y la dispersión de los nemátodos, lo que tiene un efecto directo sobre su capacidad y eficiencia como agentes de control. En ambientes con baja humedad y temperaturas extremas su aptitud se ve afectada (Georgis y Gaugler, 1991). Su desplazamiento está regido por la textura del suelo, por lo que su capacidad de búsqueda depende de las condiciones favorables del suelo dado por los tipos franco arcillosos (Gaugler, 1981). Por lo que podemos concluir que tanto la humedad, la temperatura, y la textura del suelo son factores importantes para el uso y establecimiento de los nemátodos.

El pH del suelo también juega un papel importante, ya que puede funcionar de manera adversa en la eficiencia y persistencia de los mismos. Si se desconocen las condiciones que prevalecen en el suelo, el uso de los nemátodos puede estar destinado al fracaso. La luz ultravioleta es otro factor

que afecta la supervivencia de los nemátodos, principalmente cuando éstos se localizan en la superficie del suelo (Gaugler y Boush, 1979).

Entre los principales factores bióticos que afectan la eficiencia de los nemátodos, los más importantes son los hongos y las bacterias que en presencia de algunos de ellos ocurre un efecto antagónico con los nemátodos al causarles enfermedades letales, reduciendo de esta manera la cantidad de nemátodos efectivos por superficie de suelo (Poinar y Jansson, 1986; Epsky *et al.*, 1988). También los organismos nematófagos como los ácaros y los insectos causan serios problemas (Mankau, 1980). La reducción en el número de juveniles infectivos y la poca dispersión que podrían presentar, ponen en duda la efectividad de estos organismos en los programas de control biológico, por lo que en algunas ocasiones sería necesario realizar nuevas aplicaciones para que exista un buen control de la plaga (Reed y Carne, 1967).

La presencia constante de hospederos es un factor importante para la persistencia de los nemátodos en el suelo. Por esta razón, los ambientes tropicales y subtropicales pueden proporcionar constantemente insectos hospederos para garantizar una población permanente de nemátodos (Capinera y Epsky, 1992). Partiendo de esta premisa, considerando que las larvas de las moscas de la fruta utilizan el suelo para pupar y que los huertos tanto de mango como de cítricos se localizan en regiones tropicales y subtropicales en donde las temperaturas son bastante uniformes y la humedad es alta, aunado a que predominan los suelos con textura franco arcillosas y areno arcillosas, se puede implementar un programa de control de dichas plagas utilizando, como una alternativa más, a los nemátodos como agentes de control, los cuales provocarían menor contaminación ambiental que la ocasionada por los pesticidas químicos convencionales que actualmente se utilizan.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se llevó a cabo en los laboratorios de El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Unidad Tapachula. Además, parte del trabajo se realizó en condiciones de campo en huertos comerciales de mango Cv. "Ataulfo" en la región del Soconusco, Chiapas. El desarrollo de la investigación se efectuó de manera seriada, de acuerdo al avance progresivo de la misma.

A continuación se hará una descripción de los elementos generales que se utilizaron en todos los experimentos, así como de las condiciones ambientales. Después se describirán los bioensayos de acuerdo al desarrollo de cada uno de ellos.

3.1. Material biológico y condiciones ambientales:- Las larvas de segundo y tercer estadio de las tres especies de *Anastrepha* spp., se obtuvieron de la planta de cría del Programa Moscafrut (SAGARPA-IICA), en donde se desarrollaron en una dieta larvaria artificial de acuerdo al proceso y condiciones ambientales descritas por Domínguez *et al.* (1996), Moreno (1996) y Pinson (1998) para *A. ludens*, *A. obliqua* y *A. serpentina*, respectivamente.

La β -exotoxina que se utilizó es un producto experimental (ABG-6277A, lote No. 28-037-BR) de la compañía Abbot, formulado como polvo humectable al 25% (peso/volumen) de la turingiensina. La δ -endotoxina de las diferentes cepas de *Bacillus thuringiensis* se obtuvo del cepario que posee el laboratorio de Bioinsecticidas, del Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del I. P. N. (CINVESTAV), Unidad Irapuato. Para el cultivo de las bacterias se utilizó el inóculo de acuerdo a la metodología descrita por López (1993), y la separación del complejo espora-cristal se realizó siguiendo la metodología propuesta por Dulmage *et al.* (1970) y López (1993).

En el caso de los nemátodos entomopatógenos, la especie *Steinernema feltiae* (Filipjev) se obtuvo de la colección de entomopatógenos del mismo CINVESTAV. El nemátodo *Heterorhabditis indica* (Poinar) es una especie

procedente de Costa Rica, la cual se colectó a partir de larvas de "gallina ciega", *Phyllophaga* sp. (Coleoptera: Melolonthidae). La cría y reproducción de ambas especies se realizó en larvas de *Galleria mellonella* L. y la colecta de los estados infectivos se realizó utilizando trampas White (Woodring y Kaya, 1988). Después de la colecta, los estados infectivos se cuantificaron y se ajustó su densidad a 800 nemátodos/ml de agua destilada estéril, para luego ser refrigerados ($10\pm 2^{\circ}\text{C}$) hasta su eventual utilización (Woodring y Kaya, 1988). Estas suspensiones se utilizaron para preparar las concentraciones requeridas en los diferentes tratamientos de cada bioensayo.

Las condiciones bajo las cuales se llevaron a cabo las fases de laboratorio fueron de $26\pm 1^{\circ}\text{C}$, $70\pm 5\%$ H. R. y 12 h de fotoperíodo. En las pruebas de campo la temperatura del suelo fluctuó entre 25 y 29°C .

3.2. TOXICIDAD DE LA β -EXOTOXINA DE *Bacillus thuringiensis* HACIA LARVAS DE MOSCAS DE LA FRUTA Y EFECTOS SUBLETALES EN ADULTOS

3.2.1. Toxicidad de la β -exotoxina:- Los bioensayos se llevaron a cabo en cajas Petri en donde se colocaron discos de papel filtro impregnados con 1 ml de solución de la toxina, o agua destilada para los testigos. Se seleccionaron larvas de tercer estadio próximas a pupar, utilizándose 30 por concentración y 90 para el testigo. Las larvas del testigo también se colocaron a la densidad de 30 larvas por caja Petri. Las concentraciones ensayadas fueron: 0.091, 0.152, 0.253, 0.421, 0.702, 1.169, 1.949 y $3.248 \mu\text{g}$ de β -exotoxina por cm^2 de papel filtro. El tiempo que permanecieron las larvas sobre el papel filtro fue de 24 h, para luego transferirse a pequeños recipientes de plástico con vermiculita húmeda para promover la pupación, ahí permanecieron por 12 días a una temperatura de $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ y una H. R. de $70\pm 5\%$. Al final de este tiempo se separaron las pupas con un tamiz, registrándose las pupas deformes y las normales, colocándose estas últimas en jaulas de vidrio de 27 dm^3 para la emergencia de los adultos. Se

cuantificó la emergencia y se observó el estado morfológico de los adultos para clasificarlos como moscas normales o deformes.

La relación dosis-mortalidad y la estimación de las CL_{50} 's se determinaron mediante análisis Probit (Proc Probit, SAS Institute, 1992). El número de bioensayos varió en cada especie, repitiéndose hasta obtener un mínimo de tres bioensayos que cumplieran con los requisitos estadísticos establecidos con anterioridad (Ibarra y Federici, 1987). Las CL_{50} 's de las repeticiones fueron sometidos a un análisis de varianza y de prueba múltiple de medias, donde las CL_{50} 's de cada especie de mosca se consideraron como tratamientos (SAS Institute, 1992).

3.2.2. Efecto de las concentraciones subletales sobre adultos:- El efecto de la β -exotoxina sobre la longevidad, fecundidad y fertilidad de los adultos obtenidos a partir de larvas tratadas, se estudió en dos fases: a) los adultos de *Anastrepha ludens* (la especie más tolerante a la toxina) que sobrevivieron a las diferentes concentraciones ensayadas en el estudio de toxicidad contra las larvas, y b) los adultos de las tres especies que sobrevivieron después de haberse expuesto como larvas a su correspondiente CL_{50} .

En el primer estudio, una vez que emergieron los adultos en cada concentración, fueron separados y 24 h después se confinaron 10 machos y 10 hembras en jaulas de vidrio de 27 dm³ a las cuales se les adaptó en unas de sus caras una malla. El alimento para estos adultos fue a partir de proteína hidrolizada enzimáticamente (ICN, Biomedical, Inc.) + sacarosa (1:3) y el agua se les proporcionó en tubos de ensaye cubiertos con torundas de algodón. A partir de los ocho días de edad, se colgaron de la parte superior de las jaulas tres esferas de 2 cm de diámetro, hechas de agar (3 l de agua: 80 g de agar), teñidas de color verde con colorante vegetal y envueltas en papel parafilm, como dispositivos de oviposición (Boller, 1968; Freeman y Carey, 1990). Las esferas fueron reemplazadas cada 24 h. Las que se retiraban de las jaulas eran disectadas para extraer y cuantificar el número de huevos ovipositados por día. La fertilidad se

cuantificó a partir de una muestra de 100 huevos seleccionada diariamente, luego se alineaban con un pincel de cerda suave sobre papel filtro negro humedecido dentro de una caja Petri. Las muestras se incubaron a $28\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ y $70\pm 5\%$ H. R. y después de 5 días se cuantificó el número de larvas eclosionadas. La longevidad se midió mediante el registro de la mortalidad diaria de los adultos, actividad que se realizó hasta que murió el último adulto. Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza y a una prueba múltiple de medias (SAS Institute, 1992).

En la segunda fase del estudio, las larvas de tercer estadio de cada especie fueron expuestas a sus respectivas CL_{50} de toxina y, después de 24 h, las larvas se transfirieron a contenedores con vermiculita húmeda para su pupación. Cuando los adultos emergieron se seleccionaron y se confinaron 10 parejas por especie por jaula. Para cada especie se manejó un testigo. Estos adultos fueron sujetos a las mismas observaciones descritas en la fase anterior del estudio. Los datos fueron sometidos a una prueba de t de Student (Steel y Torrie, 1993).

3.2.3. Efecto patotóxico de la β -exotoxina en la cutícula de larvas de tres especies de moscas de la fruta:- Con el objeto de estudiar el efecto de la β -exotoxina en la cutícula de larvas tratadas se llevó a cabo esta investigación. Las larvas (30 por caja Petri) de tercer estadio de *Anastrepha ludens*, *A. obliqua* y *A. serpentina* fueron expuestas a las concentraciones de 4.694, 2.560 y 3.652 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de papel filtro respectivamente, debido a que en los bioensayos de laboratorio se determinó como sus respectivas CL_{95} 's. Las larvas fueron divididas en dos subgrupos, un subgrupo de 300 larvas se expuso por 12 h y un segundo subgrupo de 300 larvas también se expuso por 24 h. Al transcurrir el tiempo de tratamiento de las larvas del primer subgrupo, de las 10 cajas Petri que contenían las larvas se seleccionó una muestra de 20 larvas y se colocaron en solución Dubosq-Brasil (150 ml de alcohol etílico 80%, 60 ml de formaldehído, 15 ml de ácido acético glacial y 1 g de ácido pícrico en cristales), siguiendo las técnicas histológicas descritas por Prado y Valdez (1985).

Las larvas del segundo subgrupo, después que completaron las 24 h de tratamiento con la β -exotoxina se transfirieron a un contenedor con vermiculita húmeda para promover la pupación y ahí cuantificar el efecto de la toxina sobre la mortalidad larvaria, formación de pupas y emergencia de adultos.

En el caso de las larvas que se colocaron en la solución Dubosq-Brasil, el tiempo de fijación fue por 24 h, luego se lavaron con alcohol 80% y se les cortó el extremo de la parte oral y se continuó con la fijación por 24 h más. Al concluir este tiempo, las larvas se lavaron con alcohol al 80% hasta eliminarles totalmente el fijador, después se guardaron en alcohol 80% en refrigeración ($10\pm 1^\circ\text{C}$) para proseguir con la deshidratación. Antes de iniciar el proceso de deshidratación, las larvas fueron seccionadas en tres partes, de ellas se seleccionó la parte intermedia a la cual se le realizó un corte longitudinal para separar la parte ventral y la dorsal, región en donde se hicieron las observaciones. El proceso de deshidratación consistió de varios pasos a través de diferentes alcoholes y por último el tratamien-

Cuadro 1.- Proceso secuencial de la deshidratación e inclusión en parafina de los cortes de larvas de tres especies de *Anastrepha* tratadas con β -exotoxina de *B. thuringiensis*.

Pasos	Tipo de alcohol	Tiempo (Minutos)
1	80°	120
2	90°	120
3	100°	120
4	100° (Se agregan unos granos de eritrosina)	120
5	Benceno (benzol)	60
6	(Benceno: parafina) (5 mm: 5 mm)	30
7	Parafina	20
8	Cambio a 2a. parafina	120

Nota: Parafina (Merk®) con un punto de fusión de 57-60°C.

to en parafina, esta actividad se describe de acuerdo a su secuencia y tiempo en el Cuadro 1.

Después siguió el proceso de inclusión de las muestras en bloques de parafina, utilizándose para este estudio moldes de plástico. Primero se llenó el molde con parafina líquida y se dejó a que empezara a solidificarse. Con una espátula caliente y una aguja de disección se pasó el material biológico contenido en la parafina que estaba en la estufa a la parafina del molde, siempre cuidando de orientar adecuadamente el material para el área de corte deseado a practicarle con el microtomo. Los bloques con la parafina y el material biológico se dejaron enfriar por 30 o 40 minutos, luego se desprendieron del molde de plástico y se acondicionaron para realizar los cortes con el microtomo. Para realizar los cortes se utilizó un microtomo de rotación y el espesor de los cortes fue de 5 micras.

Una vez hechos los cortes se procedió a adherirlos a los portaobjetos, lo cual se hizo de la siguiente manera: con la yema del dedo se colocó una minúscula gota de clara de huevo en el centro de un portaobjetos, luego se frotó y después se depositó una gota de agua destilada estéril. Posteriormente se separó de la banda de parafina una serie de cortes de aproximadamente 1 cm de longitud y se colocó sobre el portaobjetos, evitando que se formaran burbujas. Para extender totalmente las muestras y evitar que se formaran pliegues en los cortes, fue necesario colocar los portaobjetos en una placa metálica a 45°C por un lapso de tiempo de 30 a 60 segundos.

Después los portaobjetos se pusieron sobre una parrilla cuya temperatura fue de 35 a 40°C durante 24 h, tiempo en que se evaporó el agua, la albúmina se coaguló y el corte quedó firmemente adherido al portaobjetos.

Luego siguió el proceso de eliminación de parafina, hidratación y desalcoholización de las muestras, así como a la tinción de las muestras para lo cual se utilizó hemalumbre-eritrosina por su simpleza y rapidez, aplicabilidad general y colores permanentes. Las secuencias de este proceso se indican con mayor detalle para una mejor interpretación en el Cuadro 2. Una vez que finalizó este proceso, se colocó en cada portaobjeto un cubreobjeto, previo colocado de

una pequeña gota de Bálsamo de Canadá, con esto la muestra quedó lista para observarse al microscopio compuesto.

Cuadro 2.- Secuencias a seguir durante la eliminación de parafina, hidratación y desalcoholización de las muestras histológicas de larvas tratadas con β -exotoxina de *B. thuringiensis*.

Secuencias	Solución	Observaciones
1	Xilol-1	Lavar 2 min. (elimina la parafina)
2	Xilol-2	Lavar por 2 min.
3	Alcohol absoluto	Lavar 3 min. (para eliminar xilol)
4	Alcohol 96°	Lavar 3 min. (inicia la hidrat.)
5	Alcohol 70°	Lavar por 3 min.
6	Alcohol 50°	Lavar por 3 min.
7	Alcohol 30°	Lavar por 3 min.
8	Hemalumbre	10 segundos (tinción de núcleos)
9	Agua destilada	Lavar 2 min. (interrumpe la tinción)
10	Agua destilada	Lavar por 2 min.
11	Agua del grifo	Lavar por 2 min.
12	Alcohol 30°	Lavar por 3 min. (inicia deshidr.)
13	Alcohol 50°	Lavar por 3 min. (cont. la deshid.)
14	Alcohol 70°	Lavar por 3 min.
15	Alcohol 96°	Lavar por 3 min.
16	Eritrosina	30 segundos (tinción de citoplasma)
17	Alcohol absoluto	Lavar 3 min. (termina desh. y difer.)
18	Alcohol absoluto	Lavar 3 min. (elim. restos de color.)
19	Fen-xilol	Lavar 3 min. (int. decolor, elim. alc.)
20	Xilol-1	Lavar por 2 min. (elimina adhesivos)
21	Xilol-2	Lavar por 2 min.
22	Xilol	Lavar por 2 min.

Hemalumbre:

Solución A: 5 g de hematoxilina en 50 ml de alcohol etílico 96°.

Solución B: 10 g de sulfato de aluminio-potasio (alumbre) en 500 ml de agua destilada hirviendo.

Solución C: 1 g de yodato de sodio en 50 ml de agua destilada.

A la solución "B" caliente aún, se le añade 10 ml de la solución "A"; a la solución que resulte de esto se le agregan 5 ml de la solución "C". Se debe de filtrar antes de usar.

3.2.4. Efecto de la CL₅₀ y la CL₉₅ de β -exotoxina en larvas de dos edades de la mosca mexicana de la fruta:-

Con el objeto de cuantificar el efecto de la β -exotoxina en larvas jóvenes, se trataron larvas de *A. ludens* de siete y de nueve días de edad (denominadas como larvas jóvenes y maturas, respectivamente). Las larvas fueron expuestas a las concentraciones de 0.641 y 4.694 μg de β -exotoxina/cm² de papel filtro, debido a que en los bioensayos de laboratorio se determinaron como la CL₅₀ y CL₉₅ respectivamente, para larvas de nueve días de edad (tercer estadio) en esta especie. Las larvas fueron tratadas por 24 h, al transcurrir este tiempo se transfirieron a un contenedor con vermiculita húmeda para promover la pupación y cuantificar el efecto de la toxina sobre la mortalidad larval, formación de pupas (normales y deformes) y emergencia de adultos (normales, deformes y medio emergidos).

En este caso los datos de los parámetros evaluados se expresaron en porcentajes y después fueron sometidos a una prueba de *t* de Student (Steel y Torrie, 1993) para determinar si había o no diferencia del efecto tóxico sobre las edades larvales.

3.3. EFECTO DE LA δ -ENDOTOXINA DE *Bacillus thuringiensis* EN ADULTOS DE MOSCAS DE LA FRUTA

Uno de los objetivos de este estudio fue cuantificar la patogenicidad de la δ -endotoxina de *B. thuringiensis* en adultos de las mismas especies de moscas de la fruta. Las pupas de las tres especies se seleccionaron por su aspecto físico y tamaño, posteriormente se pesaron en una balanza analítica marca Sartorius. Las pupas seleccionadas para el estudio pesaron en promedio 15.1, 14.2, y 15.0 mg para *A. ludens*, *A. obliqua* y *A. serpentina*, respectivamente. Luego se colocaron en cajas Petri abiertas dentro de jaulas de vidrio de 27 dm³ para que emergieran los adultos. Una vez que los adultos emergieron se seleccionaron y se confinaron 15 parejas (relación 1:1) en otras jaulas con las mismas medidas y características antes descritas.

Las cepas que se evaluaron fueron: *Bacillus thuringiensis kurstaki* (Btk), *B. thuringiensis* cepa LBIT-414, *B. thuringiensis* cepa LBIT-312, *B. thuringiensis* cepa LBIT-63, *B. thuringiensis* cepa LBIT-113, *B. thuringiensis israelensis* (Bti), y *B. thuringiensis tenebrionis* (Btt), en total sumaron siete cepas y el estudio consistió de ocho tratamientos incluyendo el testigo. Como unidad experimental se consideró a la jaula de vidrio conteniendo las 15 parejas de moscas. Los cristales de cada cepa de *B. thuringiensis* fueron mezclados con proteína hidrolizada enzimáticamente [(ICN, Biomedical, Inc.) + sacarosa (1:3)] + agua, en la proporción de 1:1 (peso/volumen). Una vez realizada la mezcla se colocó la solución del cebo-tóxico en tubos Eppendorf, a cada tubo se le hizo una perforación de 2 mm de diámetro en la parte inferior, de tal forma que permitiera la salida de la solución, sin que llegara a escurrir. Los tubos ya listos con la solución se colgaron de la parte superior de cada jaula para que las moscas se alimentaran de la mezcla durante 48 h, después se retiraron los tubos y se les suministró el alimento estándar formulado a base de proteína hidrolizada enzimáticamente + sacarosa (proporción 1: 3) solamente, y el agua se les proporcionó en tubos de ensaye cubiertos con torundas de algodón. En el caso del

testigo, las moscas fueron alimentadas desde el inicio con una solución hecha a partir de proteína hidrolizada enzimáticamente [(ICN, Biomedical, Inc.) + sacarosa (1:3)] + agua, en la proporción de 1:1 (peso/volumen). Debido a la baja toxicidad que se observó en la δ -endotoxina hacia los adultos de las tres especies de moscas de la fruta, el estudio se repitió tres veces en el caso de *Anastrepha ludens* y dos veces para *A. obliqua* y *A. serpentina*.

La mortalidad de las moscas se registró cada 24 h durante 10 o 12 días después de haberse iniciado la prueba. Debido a la baja toxicidad que manifestó la δ -endotoxina de cada cepa, no se realizó ningún análisis estadístico, por lo que los resultados fueron expresados en porcentaje de mortalidad diaria y acumulada durante el tiempo de observación.

3.4. PARASITISMO DE LARVAS DE MOSCAS DE LA FRUTA POR DOS ESPECIES DE NEMÁTODOS ENTOMOPATÓGENOS EN CONDICIONES DE LABORATORIO Y DE CAMPO

3.4.1. Efecto de la edad larval y la profundidad del suelo sobre las CL_{50} 's: Este estudio tuvo como objetivo determinar las CL_{50} 's de cada especie de nemátodo, en larvas de cada especie de mosca en base a la edad y a la profundidad del suelo. Los bioensayos se realizaron en unidades de parasitación elaboradas con tubo de PVC de 5 cm diámetro (19.63 cm² de superficie), utilizándose 3 profundidades (2, 5 y 8 cm), con una capacidad de 30, 70 y 120 g de arena, respectivamente. Como substrato de pupación se utilizó arena previamente tamizada (Malla 18), lavada, esterilizada y ajustada a una humedad de 10% (peso/volumen). Con la arena así tratada se llenaron los diferentes recipientes, a los que se agregaron 25 larvas de la especie de mosca según correspondiera, que se introdujeron rápidamente en la arena (10 min). Las especies de nemátodos ensayadas fueron *S. feltiae* y *H. indica*.

Estas tres especies de moscas de la fruta tienen diferentes tiempos de desarrollo larvario (Celedonio-Hurtado *et al.*, 1988), por lo que se decidió utilizar

las siguientes edades. La edad de las larvas consideradas como jóvenes fue de 6 días para *A. obliqua*, y de 7 días para *A. ludens* y *A. serpentina*. Para las que se consideraron larvas maduras, la edad fue de 8 días para *A. obliqua*, y de 9 días para *A. ludens* y *A. serpentina*, con esto se buscó que las larvas estuvieran en la misma edad fisiológica al momento de realizar el estudio.

Las diferentes profundidades se probaron tanto en larvas jóvenes como en larvas maduras, con un mínimo de cinco repeticiones por especie de mosca de la fruta, por cada edad larval y por cada profundidad de recipiente, para cumplir con los requisitos estadísticos establecidos para este tipo de estudio (Ibarra y Federici, 1987). Las concentraciones probadas en cada bioensayo, por cada especie de nemátodo fueron: 0, 6, 13, 25, 51, 76, 102, 127, 178 y 204 nemátodos/cm², agregándose cada concentración en 1 ml de suspensión que se distribuyó con una pipeta uniformemente sobre la superficie de la arena de cada recipiente (Fig. 1A).

Siete días después se tamizó la arena de cada unidad para cuantificar la mortalidad debida al parasitismo del nemátodo, mediante observaciones al microscopio estereoscópico.

Las larvas parasitadas que no dieron origen a adultos se consideraron como insectos muertos, la mortalidad natural fue corregida usando la fórmula de Abbott (1925) y los resultados obtenidos fueron analizados usando un modelo Probit (Proc Probit, SAS Institute, 1992). Los valores de las CL₅₀'s determinados en cada bioensayo para cada edad de larvas fueron sometidas a un análisis de varianza (ANOVA) en donde las edades de las larvas y las especies de moscas se consideraron como tratamientos (SAS Institute, 1992).

3.4.2. Parasitismo en larvas maduras de *Anastrepha ludens* por el nemátodo *Steinernema feltiae*, en suelo de textura areno-arcillosa:- Para verificar si había o no diferencia en colocar los nemátodos en el suelo antes o después de las larvas se realizó el siguiente estudio, utilizando como sustrato suelo de textura areno-arcillosa. Los bioensayos se realizaron únicamente en las unidades de 5 cm de profundidad, cuya capacidad es de 70 g de suelo. En este

experimento se utilizó como substrato de pupación suelo de textura areno-arcillosa, previamente tamizado (Malla 18), esterilizado, y ajustado a una humedad de 15% (peso/volumen), debido a que se obtuvo mayor parasitismo en esta humedad, con este suelo se llenaron los recipientes a los que se agregaron 25 larvas de *A. ludens* de tercer estadio (9 días de edad). Se evaluaron las concentraciones de 0, 6, 13, 25, 51, 76, 102, 127 y 204 nemátodos/cm² de suelo; agregándose cada concentración en 1 ml de suspensión que se distribuyó uniformemente con una pipeta sobre la superficie del suelo de cada recipiente.

Las concentraciones se aplicaron de dos formas, en el primer caso se aplicaron primero los nemátodos y 10 minutos después se colocaron las larvas (A); en el segundo caso, se colocaron primero las larvas y 10 minutos después se aplicaron los nemátodos (D). El número de bioensayos varió en cada caso, se realizaron 13 bioensayos para el caso A y 11 para el caso B, de acuerdo a los requisitos estadísticos establecidos para este tipo de estudios (Ibarra y Federici, 1987). Siete días después se tamizó el suelo de cada unidad para cuantificar la mortalidad debida al parasitismo del nemátodo, mediante observaciones al microscopio estereoscópico.

Las CL₅₀'s para larvas de tercer estadio en este experimento fueron estimadas usando el mismo modelo Probit (Proc Probit, SAS Institute 1992), a partir de la mortalidad registrada en cada bioensayo y corregida con la fórmula de Abbott (1925). Las CL₅₀'s determinadas en cada forma de aplicación de los nemátodos, fueron sometidas a un análisis mediante la prueba *t* de Student (Steel y Torrie, 1993) para verificar si había o no diferencia en colocar los nemátodos en el suelo antes o después de las larvas.

3.4.3. Parasitismo de pupas de *Anastrepha ludens* por *Steinernema feltiae*, en suelo de textura areno-arcillosa:- Con el objeto de estudiar la capacidad parasítica de esta especie de nemátodo a pupas se realizó el siguiente estudio. Los bioensayos se realizaron únicamente con las unidades de 5 cm de profundidad y con el mismo manejo antes descrito. Una vez que se llenaron los

tubos con el suelo tratado y ajustado a una humedad de 15% (peso/volumen), se procedió a colocar en cada uno de ellos 25 larvas de *A. ludens* de tercer estadio y se esperó a que se transformaran en pupas (24 h), una vez que puparon y alcanzaron en estado de pupa la edad de 5 ó de 12 días según fuera el caso, se aplicaron los estados infectivos del nemátodo. Las concentraciones probadas en cada bioensayo fueron de 0, 6, 13, 25, 51, 76, 102, 127 y 204 nemátodos/cm² de suelo, agregándose cada concentración en 1 ml de suspensión que se distribuyó con una pipeta uniformemente sobre la superficie del suelo de cada recipiente. La humedad del suelo al momento en que se aplicaron los nemátodos fue de 15% (peso/volumen). El número de bioensayos por cada edad de pupa, y cuando se observó el parasitismo en adultos recién emergidos que salieron a través del suelo tratado con nemátodos varió entre 12 y 15 bioensayos.

En el caso de las pupas de 5 días de edad, el suelo se tamizó a los siete días después de haberse aplicados los nemátodos para cuantificar la mortalidad debida al parasitismo del nemátodo mediante observaciones al microscopio estereoscópico. Para las pupas de 12 días de edad, en la mitad de las unidades (de 12 a 15 bioensayos) se tamizó el suelo y se cuantificó la mortalidad debida al parasitismo del nemátodo; en la otra mitad (de 12 a 15 bioensayos), se dejó a que emergieran los adultos para observar el parasitismo ocasionado en adultos recién emergidos que salieron a través del suelo tratado con nemátodos.

Los datos de este experimento se expresaron en porcentajes debido al bajo grado de parasitismo.

3.4.4. Impacto de la β -exotoxina y dos especies de nemátodos entomopatógenos sobre larvas de moscas de la fruta y algunos artrópodos no blanco, bajo condiciones de campo:-

Este fue un estudio de campo cuyo objetivo fue evaluar la eficiencia de las CL₅₀'s de la β -exotoxina y de los nemátodos entomopatógenos sobre larvas de tercer estadio y cuantificar el impacto sobre organismos no blanco. El estudio consistió en un experimento de campo con distribución en bloques al azar, realizándose un bloque cada 5 días.

Para realizar el estudio se seleccionaron 48 árboles de mango, en el huerto "El Mirador" ubicado a la altura del km 18 de la carretera del aeropuerto de Tapachula a Cd. Hidalgo, Chis. En el área de goteo de los árboles se delimitó una área de 50 x 50 cm como unidad experimental. En cada una de estas unidades el suelo se removió en una cavidad de 10 cm de profundidad aproximadamente, eliminando todo material indeseable que estuviera presente (hojas secas, madera, raíces, piedras, etc.). La superficie de la cavidad fue nivelada y después se colocó un cuadro de madera de 50 x 50 x 25 cm (2,500 cm² de superficie), en el fondo de esta estructura se colocó un cedazo de tela organza resistente a fin de evitar la fuga de los organismos, no permitir la entrada de depredadores y que a la vez permitiera la salida de agua. Después se procedió a colocar el suelo, cuya textura fue de tipo franco-arenosa, previamente tamizado (Malla 18).

Una vez que se aplicaron los agentes entomopatógenos, los organismos no blanco y el insecticida en las respectivas unidades experimentales registró una humedad de 10% (peso/volumen). El espesor del suelo fue de 8 cm con un peso aproximado de 9 kg por unidad experimental (Fig. 1B).

En total se manejaron 7 tratamientos y el testigo, cada uno con 6 repeticiones, con un total de 48 unidades experimentales. Para los productos evaluados se tomó como base la CL₅₀ determinada en los bioensayos realizados en condiciones de laboratorio para larvas de *A. ludens* de tercer estadio. Los tratamientos fueron:

- a) Testigo.
- b) La CL₅₀ de *S. feltiae* (*Sf*).
- c) La CL₅₀ de *H. indica* (*Hi*).
- d) La ½ de la CL₅₀ de β-exotoxina + la ½ de la CL₅₀ de *Hi*.
- e) Insecticida.
- f) La CL₅₀ de β-exotoxina.
- g) La ½ de la CL₅₀ de *Hi* + la ½ de la CL₅₀ de *Sf*.
- h) La ½ de la CL₅₀ de β-exotoxina + la ½ de la CL₅₀ de *Sf*.

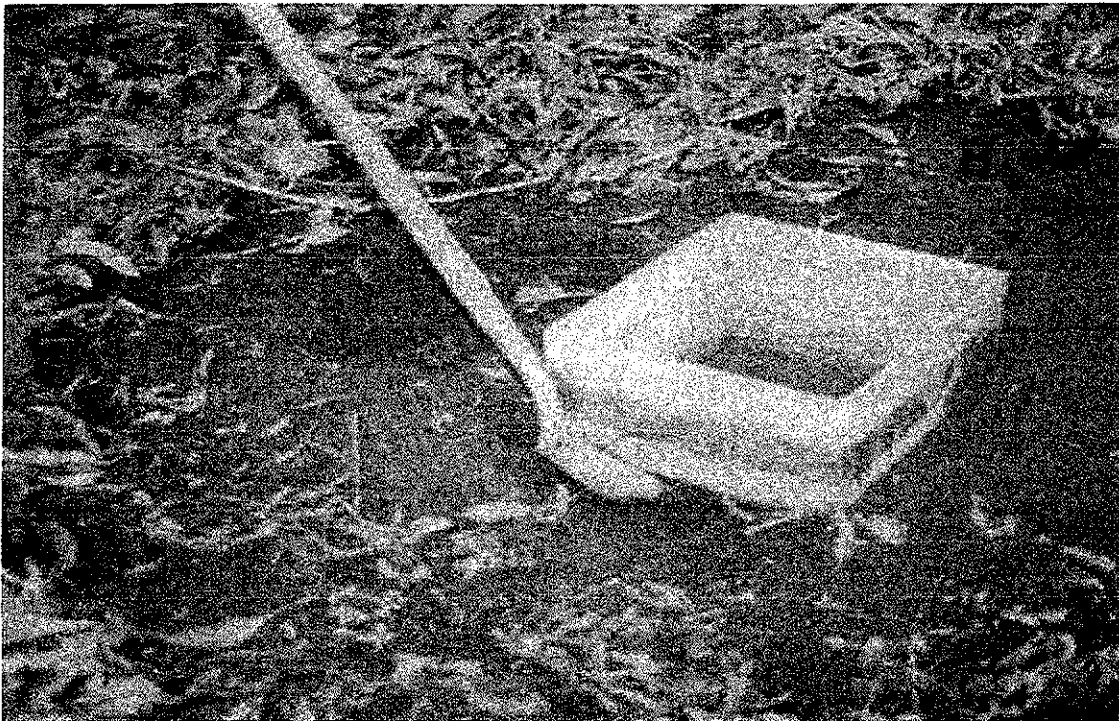


Fig. 1.- Unidades de parasitación utilizados en los experimentos con nemátodos en condiciones de laboratorio (A) y de campo (B).

Con base a este arreglo y distribución se utilizaron las siguientes cantidades de los siguientes productos: en donde se utilizó la CL₅₀ de la β -exotoxina, se aplicó 5.251 mg de i. a. del producto que contenía la turingiensina (21 mg de producto experimental) por parcela. En los tratamientos en donde se aplicó la mitad de la CL₅₀, se utilizaron 10.5 mg del producto por parcela.

En las parcelas tratadas con *S. feltiae* se aplicaron 406,250 nemátodos, tomando en consideración que la CL₅₀ calculada en los bioensayos de laboratorio fue de 162 nemátodos/cm² de superficie de suelo. En las parcelas que fueron tratadas con la mitad de la CL₅₀, se aplicaron 203,125 nemátodos.

Con el nemátodo *H. indica*, en cada parcela se aplicaron 289,211 nemátodos, de esta forma se utilizó una densidad de 116 nemátodos/cm² de superficie de suelo que correspondió a la CL₅₀ que se determinó en condiciones de laboratorio y se aplicaron 144,606 estados infectivos en donde sólo se utilizó la mitad de la CL₅₀.

El insecticida que se utilizó fue el Diazinón 25 E (del grupo de los organofosforados, formulado como concentrado emulsionable), por cada parcela tratada se aplicó la concentración de 0.01% por peso en agua (peso/volumen). Esta concentración se tomó como referencia debido a que Purcell y Schroeder (1996) reportaron que provocó una mortalidad del 50 y 60% en *Tetrastichus giffardianus* Silvestri y *D. longicaudata*, parasitoides de moscas de la fruta, cuando estaban en desarrollo dentro de su huésped, la larva de la mosca del melón (*Bactrocera curcubitae*) (Coquillett). Aunque se necesita 0.02% del i. a. de Diazinón para inducir una mortalidad correspondiente a la CL₅₀ en esta última especie.

En las parcelas en donde se aplicaron los nemátodos + la β -exotoxina, primero se adicionó al suelo 800 ml de agua y se homogenizó bien el suelo y posteriormente se aplicó sobre la superficie 140 ml de solución acuosa que contenía la β -exotoxina y otros 140 ml conteniendo los nemátodos, según fuera el caso. Cuando la parcela se trató con una sola especie de nemátodo, ésta se aplicó en 280 ml de agua. Para el caso del insecticida se aplicó toda la mezcla y se

homogenizó el suelo. La cantidad total de agua que se utilizó por parcela fue de 900 ml, de esta forma la humedad del suelo se ajustó a 10% (peso/volumen). En las parcelas en donde se aplicaron las dos especies de nemátodos, cada dosis de nemátodos fueron diluidas en 140 ml de agua. Las parcelas que se utilizaron como testigo fueron tratadas únicamente con agua.

Una vez que se terminaron de preparar las parcelas se procedió a colocar los organismos de prueba, estos fueron: 100 larvas de *A. ludens* de tercer estadio, 100 larvas de *A. ludens* parasitadas por *D. longicaudata*, 25 larvas de la familia Stratiomidae y 10 lombrices de tierra (*Lumbricus terrestris* L.) por cada unidad experimental.

Cuando se terminó de colocar a los organismos en todas las parcelas de cada bloque, se procedió a protegerlas de los depredadores terrestres (lagartijas, hormigas, aves, etc.) aplicando alrededor de la madera una franja de pegamento y la parte de arriba se cubrió con tela organza.

Ocho días después de haberse realizado el experimento, se retiró el suelo (incluyendo los organismos) de cada unidad experimental. El suelo de cada muestra se depositó en charolas de plástico de 60 cm de largo x 50 de ancho x 12 de alto y posteriormente se trasladaron al laboratorio. Después se tamizó el suelo (Malla 18). Las pupas, tanto normales como parasitadas, de las moscas de la fruta y las larvas y/o pupas de estratiómidos de cada muestra se colocaron sobre papel filtro humedecido dentro de una caja Petri en donde permanecieron hasta la emergencia de los adultos de moscas de la fruta, de parasitoides y de estratiómidos.

Durante el período experimental en condiciones de campo, se realizaron observaciones cada 24 h para verificar que no hubiera daños por depredadores. Además se hicieron muestreos del suelo para observar que no hubiera pérdida de la humedad menor al 10%. Para conservar la humedad uniforme en todas las unidades experimentales fue necesario aplicar, cada 24 h, volúmenes de 100 ml de agua con un atomizador.

La variable que se consideró fue el porcentaje de emergencia de adultos de *A. ludens*, de *D. longicaudata* y de estratiómidos en cada unidad experimental. Para el caso de la lombriz de tierra se cuantificó el número de sobrevivientes después de permanecer expuesto a la acción de los agentes entomopatógenos y del insecticida. Con el número de individuos emergidos por especie se realizó un análisis de varianza en bloques al azar. Las comparaciones de promedios en cada parámetro estudiado se realizaron utilizando la prueba de comparaciones múltiples de Tukey (SAS Institute, 1992).

3.4.5. Parasitismo de larvas de *Anastrepha ludens* por dos especies de nemátodos entomopatógenos en condiciones de campo:-

Este estudio tuvo como propósito estimar el máximo nivel de parasitismo en campo, utilizando densidades altas de nemátodos. El experimento se realizó con larvas de *A. ludens* de tercer estadio. El cual consistió en un experimento con distribución en bloques al azar de 6 tratamientos incluyendo el testigo, cada uno con 4 repeticiones, en total 24 unidades experimentales. La unidad experimental fue la misma caja de madera que se utilizó en el experimento anterior, de tal forma que se tuvo una superficie de 2,500 cm² de suelo de textura franco-arenosa ajustado a una humedad de 10% (peso/volumen), por tratamiento. Para cada especie de nemátodo se utilizó la CL₅₀ determinada en condiciones de laboratorio en larvas de *A. ludens* de 9 días de edad, en los recipientes de 8 cm de profundidad, tomando como referencia que ésta fue la especie que requirió la mayor cantidad de cada especie de nemátodo para alcanzar la CL₅₀. De esta manera los tratamientos fueron:

- a) La CL₅₀ de *H. indica* (Hi) = 116 nem/cm².
- b) La CL₅₀ de *S. feltiae* (Sf) = 162 nem/cm².
- c) 3 veces la CL₅₀ de *H. indica* = 348 nem/cm².
- d) 3 veces la CL₅₀ de *S. feltiae* = 486 nem/cm².
- e) La CL₅₀ de *H. indica* (116 nem/cm²) + La CL₅₀ de *S. feltiae* (162 nem/cm²).

Después que se aplicaron los nemátodos en cada parcela se procedió a colocar 200 larvas de *A. ludens* de tercer estadio. El manejo de las unidades experimentales durante el tiempo que permanecieron en el campo fue muy similar al descrito en el experimento anterior, a excepción de que aquí se verificó la mortalidad larval debida al parasitismo del nemátodo, mediante observaciones al microscopio estereoscópico.

A partir del número de larvas y/o pupas parasitadas en cada tratamiento se realizó un análisis de varianza en bloques al azar. Asimismo, las comparaciones de promedios se hizo utilizando la prueba de comparaciones múltiples de Tukey (SAS Institute, 1992).

3.5. FACTORES ABIÓTICOS QUE AFECTAN EL PARASITISMO DE *Steinernema feltiae* SOBRE LARVAS DE *Anastrepha obliqua* EN CONDICIONES DE LABORATORIO

3.5.1. Capacidad parasítica del nemátodo en función de la edad y la profundidad del hospedero.- El estudio tuvo como objetivo conocer la capacidad parasítica del nemátodo en función de la edad y la profundidad del hospedero en un substrato con mayor contenido de humedad. Las unidades de parasitación que se utilizaron fueron las mismas que se describieron en el punto 3.3.1. Como substrato de pupación se utilizó arena previamente tamizada (Malla 18), lavada, esterilizada y ajustada a una humedad del 15% (peso/volumen). Con la arena así tratada se llenaron los diferentes recipientes, a los que se le agregaron 25 larvas de *A. obliqua* que se introdujeron rápidamente en la arena (10 min). Las diferentes profundidades se probaron tanto en larvas de 6 como de 8 días de edad, con un mínimo de cinco repeticiones por cada edad larval y cada tamaño de recipiente. Las concentraciones probadas en cada bioensayo fueron de 0, 6, 13, 25, 51, 76, 102, 127 y 204 nemátodos/cm², agregándose cada concentración en 1 ml de suspensión que se distribuyó uniformemente con una pipeta sobre la superficie de cada recipiente. Siete días después se tamizó la arena de cada unidad

de parasitación para cuantificar la mortalidad debida al parasitismo del nemátodo, mediante observaciones al microscopio estereoscópico.

Las CL₅₀'s fueron estimadas usando un modelo Probit (Proc Probit, SAS Institute 1992), a partir de la mortalidad registrada en cada bioensayo y corregida con la fórmula de Abbott (1925).

3.5.2. Efecto de la textura del suelo en la capacidad parasítica de

Steinernema feltiae:- Con el objeto de cuantificar el efecto de la textura del suelo sobre la capacidad parasítica de *S. feltiae* hacia las larvas de *A. obliqua* se realizó este estudio. Para este propósito se utilizaron los mismos recipientes de parasitación utilizados anteriormente, con las mismas profundidades, a los cuales se le agregaron los suelos previamente tratados y ajustados a una humedad de 15% (peso/volumen), cuyas características físico-químicas se describen en el Cuadro 3. La unidad de ensayo también fue de 25 larvas de *A. obliqua*, tanto de 6 como de 8 días de edad, las cuales fueron inoculadas con la concentración correspondiente a la CL₅₀ estimada para cada edad y cada profundidad, en la fase anterior de este trabajo. A los siete días posteriores a la inoculación se tamizó el suelo de cada unidad de parasitación para cuantificar la mortalidad debida al parasitismo del nemátodo, mediante observaciones al microscopio estereoscópico.

El estudio fue analizado como un experimento trifactorial, cuyos factores fueron la edad de las larvas (6 y 8 días), la profundidad del hospedero (2, 5 y 8 cm) y el tipo de suelo (areno-arcilloso, arenoso y areno-limoso), de tal forma que sumaron 18 tratamientos diferentes, con 5 repeticiones cada uno. Los datos fueron sometidos a una análisis trifactorial (Montgomery, 1991).

3.5.3. Efecto de la temperatura en la capacidad parasítica del

nemátodo:- Este estudio tuvo como objetivo determinar la temperatura óptima para obtener el nivel máximo de parasitismo. Se probaron tres diferentes temperaturas sobre la capacidad parasítica de *S. feltiae* hacia las larvas de *A. obliqua*. Para este propósito se utilizaron los mismos recipientes de parasitación

Cuadro 3. Características físico-químicas y contenido de arcillas de los tipos de suelos utilizados como sustrato para larvas de *A. obliqua* expuestas al parasitismo de *Steinernema feltiae*. (M. O. = Materia orgánica; C. E. = Conductividad eléctrica).

Textura de suelo	Arena (%)	Limo (%)	Arcilla (%)	M. O. (%)	pH	C. E.
Areno-arcillosa	74.0	14.0	12.0	2.0	6.36	0.27
Areno-limosa	80.0	14.0	6.0	11.4	6.28	0.15
Arenosa	96.0	1.0	3.0	0.18	6.63	0.48

utilizados anteriormente, con las mismas profundidades, a los cuales se les agregó suelo de textura areno-arcillosa, esterilizado y ajustado a una humedad de 15% (peso/volumen), dado que fue la textura de suelo que mostró los máximos niveles de parasitismo en el experimento anterior. La unidad de ensayo también fue de 25 larvas de *A. obliqua*, tanto de 6 como de 8 días de edad, las cuales fueron inoculadas con la concentración correspondiente a la CL₅₀ estimada para cada edad y cada profundidad, en la primera fase del trabajo, de este experimento. Cada bioensayo se incubó en una cámara bioclimática, a la temperatura correspondiente. A los siete días posteriores a la inoculación se tamizó el suelo de cada unidad de parasitación para cuantificar la mortalidad debida al parasitismo del nemátodo, mediante observaciones al microscopio estereoscópico.

El estudio fue analizado como un experimento trifactorial, cuyos factores fueron la edad de las larvas (6 y 8 días), la profundidad del hospedero (2, 5 y 8 cm) y la temperatura (19±1, 25±1 y 30±1°C), de tal forma que sumaron 18 tratamientos diferentes, con 5 repeticiones cada uno. Para el análisis, los datos fueron transformados al arco seno de la raíz cuadrada del porcentaje de mortalidad y luego fueron sometidos a un análisis de superficies de respuesta (Montgomery, 1991). Las medias fueron comparadas usando el procedimiento de la prueba de diferencia mínima significativa (SAS Institute, 1992).

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. TOXICIDAD DE LA β -EXOTOXINA DE *Bacillus thuringiensis* HACIA LARVAS DE MOSCAS DE LA FRUTA Y SUS EFECTOS SUBLETALES EN ADULTOS

4.1.1. Toxicidad de la β -exotoxina sobre larvas:- De acuerdo a los resultados mostrados en el Cuadro 4, los promedios de las CL_{50} 's se estimaron en 0.641, 0.512 y 0.408 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de papel filtro para *Anastrepha ludens*, *A. obliqua* y *A. serpentina*, respectivamente. Estos niveles de toxicidad indicaron ligeras diferencias de susceptibilidad entre las especies; sin embargo, únicamente se detectó una diferencia estadística significativa entre *A. ludens*, y *A. serpentina*, en donde *A. ludens* es la especie más tolerante a dicho producto y *A. serpentina* la más susceptible. La primera resultó ser 1.6 veces más tolerante que la segunda.

Cuadro 4.- Toxicidad de la β -exotoxina de *Bacillus thuringiensis* a larvas de tercer estadio de tres especies de moscas de la fruta.

Especie de Mosca	N	$CL_{50} \pm SE \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Límites Fiduciales al 95%)	χ^2	CL_{95}	Ecuación de la línea de regresión
<i>A. ludens</i>	1 166	0.641 \pm 0.064 (0.471-0.878) a	3.392	4.694	Y = 5.424 + 2.157X
<i>A. obliqua</i>	840	0.512 \pm 0.033 (0.387-0.678) ab	3.366	2.560	Y = 5.701 + 2.433X
<i>A. serpentina</i>	1 110	0.408 \pm 0.019 (0.289-0.466) b	5.967	3.652	Y = 5.688 + 1.767X

Los valores de las CL_{50} 's seguidos por la misma letra no son diferentes significativamente (prueba de LSD, con $P < 0.05$).

Aunque se observó mortalidad larval, el mayor efecto tóxico ocurrió durante la transformación a los tejidos del adulto, impidiendo la formación de éstos. También se detectó que el porcentaje de pupas normales disminuyó a medida que se incrementó la concentración de la toxina, y que una gran cantidad de las pupas deformes mostró un color más claro, al compararlas con las del testigo. Las larvas muertas presentaron vesículas en diversas partes del cuerpo, además de que

algunas murieron con un cuerpo anormalmente alargado, o bien sólo pupó la mitad del cuerpo (Fig. 2).

4.1.2. Efecto de concentraciones subletales sobre adultos:- Cuando se probaron las diferentes concentraciones de β -exotoxina sobre los efectos subletales de los adultos de *A. ludens*, se observó que su longevidad no era afectada por el tratamiento con la toxina, al detectar respuestas sin diferencia estadística entre los tratamientos, incluyendo al testigo (Cuadro 5). Contrario a lo esperado, las hembras provenientes de los tratamientos con la toxina mostraron una fecundidad mayor en el número de huevos/hembra/día, al compararlas estadísticamente con los testigos. Sin embargo, se observó que la fecundidad fue mayor en las hembras obtenidas de las concentraciones bajas, registrándose una ligera disminución conforme se incrementó la concentración de la toxina. Similarmente, también la fertilidad (porcentaje de eclosión de los huevos) fue más alta en los huevos obtenidos de moscas provenientes de larvas tratadas que en los huevos de las moscas del testigo, observándose la misma tendencia al disminuir la fertilidad conforme se aumentaba la concentración de la toxina (Cuadro 5).

Por otro lado, cuando se probaron las CL_{50} 's de cada especie sobre el efecto subletal en los adultos de las tres especies de moscas de la fruta, se observó que la longevidad de las moscas tratadas era mayor que la de los testigos (Cuadro 6). Esta diferencia resultó ser estadísticamente significativa ($P < 0.05$). Similar a los resultados anteriores, la fecundidad de las moscas tratadas fue mayor que la de los testigos, aunque la diferencia fue tan ligera que estadísticamente no fue significativa ($P > 0.05$). Resultados similares se observaron en la fertilidad de los huevos de hembras tratadas, al compararlos con los testigos, ya que estos últimos mostraron fertilidades ligeramente menores a los tratados, detectándose nuevamente diferencias significativas ($P < 0.05$) sólo en *A. ludens*. En *A. obliqua* aunque hubo mayor eclosión en los huevos obtenidos de las hembras que sobrevivieron la diferencia, no fue significativa estadísticamente (Cuadro 6).

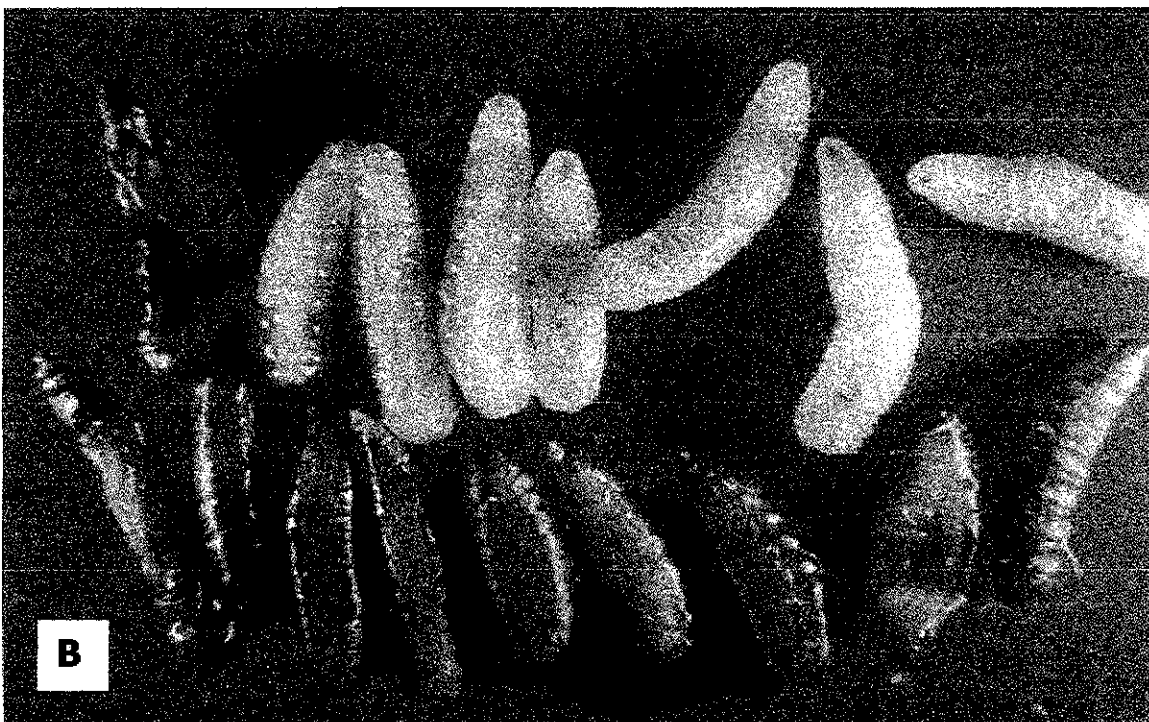
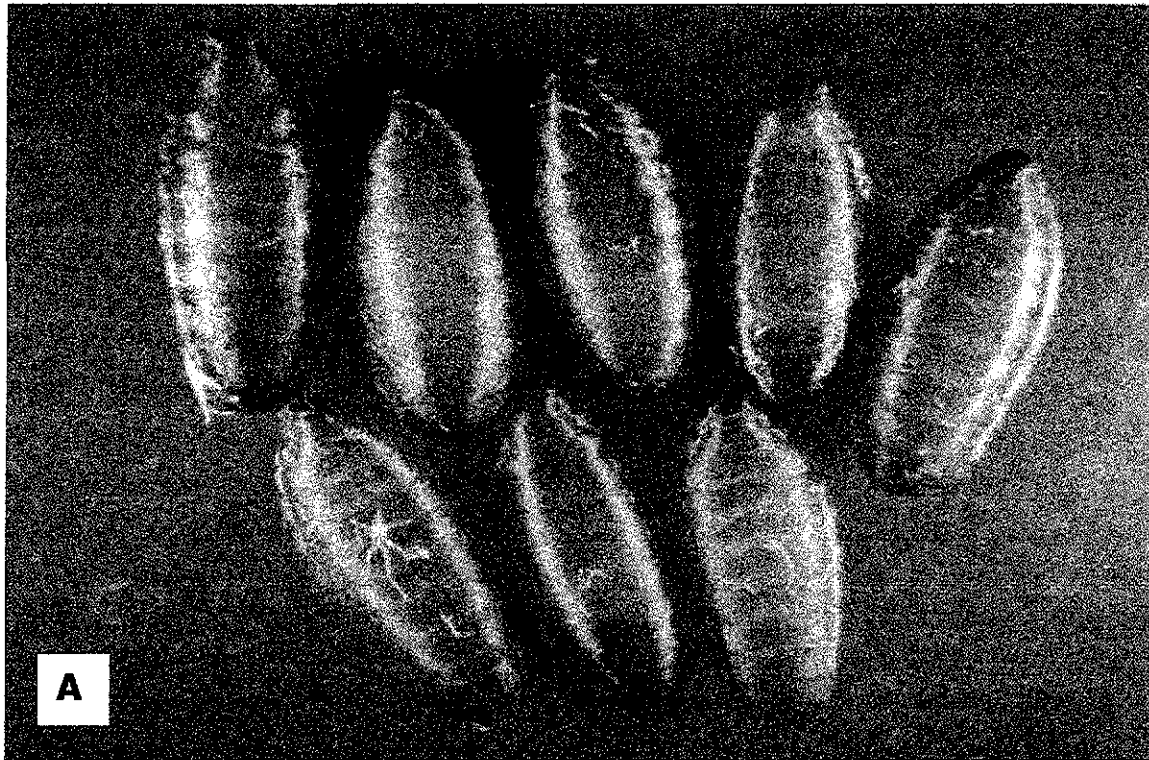


Fig. 2.- Pupas normales (A) y larvas y pupas (B) de *A. ludens* después de exponerse a la acción de la β -exotoxina de *Bacillus thuringiensis*.

Cuadro 5. Longevidad, fecundidad y fertilidad de adultos de *Anastrepha ludens* obtenidos de larvas tratadas con diferentes concentraciones de β -exotoxina de *Bacillus thuringiensis*.

Tratamientos ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Longevidad (días \pm SE)	Fecundidad (Huevos/hembra/día \pm SE)	Fertilidad (% \pm SE)
Testigo	66.6 \pm 10.9 a	14.95 \pm 1.36 d	34.36 \pm 2.85 c
0.091	56.2 \pm 5.5 a	43.40 \pm 1.74 a	66.00 \pm 3.40 a
0.152	79.5 \pm 8.6 a	28.06 \pm 1.52 c	58.08 \pm 2.79 b
0.253	69.7 \pm 8.6 a	27.42 \pm 1.94 c	43.94 \pm 3.22 c
0.421	57.7 \pm 7.2 a	33.70 \pm 1.67 b	52.04 \pm 3.55 b
0.702	65.7 \pm 6.3 a	34.17 \pm 2.39 b	54.63 \pm 4.19 b
1.169	56.5 \pm 6.3 a	24.63 \pm 1.65 c	41.21 \pm 3.61 c
1.949	68.9 \pm 8.1 a	23.34 \pm 1.98 c	41.03 \pm 3.62 c

Los valores en la misma columna seguido por la misma letra no son diferentes estadísticamente (prueba de LSD, con $P < 0.05$).

Los resultados indican que la β -exotoxina es altamente tóxica a las larvas de tercer estadio de las tres especies de moscas de la fruta. Si bien se registraron diferencias estadísticas entre las CL_{50} 's estimadas para cada especie, los niveles de susceptibilidad hacia la toxina son muy similares. Las diferencias detectadas probablemente se deban a diferencias en el grosor del exoesqueleto de las larvas, que constituye una capa de espesor con características físicas y químicas variables entre las especies (Hopkins y Kramer, 1992; Rabossi *et al.*, 1991), presentando cada una de ellas diferentes barreras a la penetración de la toxina. También, las diferencias interespecíficas en el estado de desarrollo fisiológico en el tercer estadio tardío podría ser la causa de la susceptibilidad diferencial encontrada (Celedonio-Hurtado *et al.*, 1988). De hecho, las anomalías registradas en las larvas muertas fueron muy inconsistentes debido probablemente a que cuando se expusieron a la toxina, el proceso de producción de la hormona de la muda ya

Cuadro 6.- Longevidad, fecundidad y fertilidad de adultos sobrevivientes de larvas de tres especies de moscas de la fruta tratadas con la CL₅₀ de β -exotoxina de *Bacillus thuringiensis*.

Especie de Mosca	Longevidad (días \pm SE)	Fecundidad (Huevos/hembra/día \pm SE)	Fertilidad (% \pm SE)
<i>A. ludens:</i>			
Tratada	74.9 \pm 7.6 a	46.6 \pm 2.7 a	86.4 \pm 2.1 a
Testigo	62.3 \pm 7.2 b	42.6 \pm 2.1 b	80.4 \pm 1.9 b
<i>A. serpentina:</i>			
Tratada	46.2 \pm 6.1 a	15.9 \pm 0.8 a	55.0 \pm 4.6 a
Testigo	38.5 \pm 6.0 b	16.1 \pm 1.1 a	57.1 \pm 4.3 a
<i>A. obliqua:</i>			
Tratada	30.5 \pm 3.7 a	24.2 \pm 4.4 a	91.2 \pm 3.3 a
Testigo	19.9 \pm 3.7 b	19.2 \pm 2.9 b	87.7 \pm 1.7 b

Los valores en la misma columna, por especie de mosca, seguido por la misma letra no son diferentes estadísticamente, de acuerdo a la prueba de LSD ($P < 0.05$).

había finalizado, por lo que el daño no fue tan drástico como posiblemente hubiera sucedido si se hubieran utilizado larvas más jóvenes. Tanigoshi *et al.* (1990) reportan que cuando trataron ninfas jóvenes, viejas y adultos de *Lygus hesperus* Knight (Heteroptera: Miridae), con β -exotoxina mediante aplicaciones tópicas, el efecto más drástico se observó sobre las ninfas jóvenes.

Los niveles de toxicidad encontrados en el presente estudio son comparables con otros obtenidos en diversas especies de insectos. A la mosca *H. irritans* se le estimó una CL₅₀ de 2.79 μ g/g de dieta larvaria, observando sintomatologías similares a las presentadas por las larvas de las moscas de la fruta (Haufler y Kunz, 1985). Asimismo, en los lepidópteros *Heliothis zea* (Boddie), *H. virescens* (F.), *Trichoplusia ni* (Hübner), *Pectinophora gossypiella* (Saunders) y *Spodoptera exigua* (Hübner), la emergencia de adultos se inhibió en un 100% con

una dosis de 0.540 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de dieta larvaria, aunque no mencionaron la etapa del desarrollo del insecto donde ocurrió la mayor mortalidad (Ignoffo y Gregory, 1972).

A pesar de que la β -exotoxina es uno de los componentes tóxicos de *B. thuringiensis*, su composición, origen y modo de acción son totalmente diferentes a las δ -endotoxinas, ampliamente usadas como bioinsecticidas. Los reportes sobre el uso de diversas cepas de esta bacteria sobre moscas de la fruta, han estado enfocados hacia la detección de δ -endotoxinas activas contra estas plagas. De esta forma, se ha probado la cepa mosquitocida *B. thuringiensis* var. *israelensis*, obteniéndose niveles de mortalidad importantes, tanto en larvas como en adultos, pero con dosis muy altas (Yamvrias y Anagnou, 1989; Robacker *et al.*, 1996). Asimismo, se han llevado a cabo programas de selección de cepas activas contra *A. ludens* y *Bactrocera oleae* (Gmelin), observándose mortalidades hasta del 80% (Karamanlidou *et al.*, 1991; Robacker *et al.*, 1996; Martínez *et al.*, 1997; Navrozidis *et al.*, 2000). Sin embargo, en ningún caso se ha probado si alguna de estas cepas contienen β -exotoxina (más bien se ha tratado de eliminar de las mezclas experimentales), ni se ha probado independientemente. Por lo que este es el primer reporte sobre la toxicidad de la β -exotoxina sobre un tefrítido.

Con respecto al efecto subletal de la β -exotoxina sobre los adultos sobrevivientes, cuando se probaron tanto las diferentes dosis de los bioensayos contra larvas de *A. ludens*, como también las CL_{50} 's contra las tres especies de moscas, los resultados fueron consistentes y contrarios a los esperados. Por un lado la longevidad de los adultos en ambas pruebas fue igual o mayor en los adultos provenientes de los tratamientos con la toxina. Asimismo, la fecundidad y fertilidad de los individuos tratados fueron significativamente mayores (a excepción de *A. serpentina*) a los testigos. Estos resultados se oponen a los reportes de otros autores con otras especies de insectos (Ignoffo y Gregory, 1972; Sebesta *et al.*, 1981). Hasta ahora, la explicación a este fenómeno sólo puede ser especulativa. Una hipótesis se basa en la eliminación de los individuos biológicamente más débiles por la toxina y la sobrevivencia sólo de aquellos más vigorosos y con mayor

potencial reproductivo (selección). Sin embargo, esto implicaría que los individuos sobrevivientes de las concentraciones más altas, deberían ser los más vigorosos y de mayor capacidad reproductora, lo cual no se observó. Otra hipótesis supondría que, debido a que la β -exotoxina inhibe principalmente la formación del tejido nuevo del imago, este efecto deletéreo de la toxina podría ser contrarrestado por un efecto homeostático del insecto hacia la formación de mayor masa tisular, que permitiría a los insectos sobrevivientes estar mejor dotados para reproducirse. Por otro lado, es importante hacer notar que los adultos sobrevivientes de los tratamientos no mostraron deformaciones evidentes, por lo que no presentaban impedimentos manifiestos, contrario a lo reportado por otros autores (Ignoffo y Gregory, 1972) en adultos de cinco especies de lepidópteros, donde los adultos sobrevivientes presentaron deformaciones evidentes de sus partes bucales y en las antenas, lo cual pudo estar directamente relacionado al efecto deletéreo sobre su fecundidad y longevidad.

En otros aspectos, los resultados obtenidos en el presente reporte indicaron que la β -exotoxina posee potencial para ser utilizado como alternativa de control para la mosca de la fruta, especialmente en aplicaciones en la zona de goteo de los árboles atacados; sin embargo, debido a que esta toxina ha presentado efectos tóxicos hacia algunos vertebrados, hasta ahora muchos países occidentales no han permitido su uso comercial, no sólo como insecticida formulado, sino hasta como un subproducto en las formulaciones de *B. thuringiensis*. Algunas compañías han desarrollado productos experimentales a base de esta toxina; sin embargo, las restricciones continúan vigentes. Es importante hacer notar que algunos productos basados en *B. thuringiensis* poseen en su formulación a la β -exotoxina (ej. Bitoxibacilin, producto ruso) que permite expandir el rango de actividad del bioinsecticida, o bien se ha utilizado la toxina en algunos países nórdicos para el control de moscas en porquerizas. También cabe mencionar que está comprobado el sinergismo existente entre la β -exotoxina y la δ -endotoxina, en su acción sobre algunas plagas importantes (Moar *et al.*, 1986), lo que permite expandir el rango de actividad de *B. thuringiensis* sobre algunos lepidópteros recalcitrantes (ej. *S.*

exigua). Adicionalmente, es claro que productos químicos como el Diazinón, utilizados para el control de larvas de moscas de la fruta, afectan a una gama más amplia de organismos y son más persistentes y tóxicos que la β -exotoxina de *B. thuringiensis*.

En conclusión, el presente trabajo muestra evidencia de la alta toxicidad de la β -exotoxina de *B. thuringiensis* para las larvas de tercer estadio de *A. ludens*, *A. obliqua* y *A. serpentina*. Los adultos que se obtuvieron de larvas expuestas a las diferentes concentraciones de β -exotoxina no sufrieron efecto negativo en su aptitud reproductiva.

4.1.3. Efecto patotóxico de la β -exotoxina en la cutícula de larvas de tres especies de moscas de la fruta:-

No se observó un daño drástico al nivel de cutícula de las larvas expuestas a la β -exotoxina. Sólo se observó un efecto ligeramente perceptible, el cual se manifestó en una separación o desprendimiento de la epicutícula con la hipodermis. A pesar de que las larvas fueron expuestas a su respectiva CL_{95} y que la cutícula de las larvas es una cutícula no diferenciada, aun así no sufrió tanto daño como se esperaba. Incluso las células se observaron en buen estado y ni siquiera la cutícula de la parte ventral, región que siempre estuvo expuesta a la acción de dicha sustancia. Esto demuestra que esta sustancia tiene una acción molecular y fisiológica más notoria que la que pudiera observarse a escala celular. Aunque el efecto para inhibir la emergencia de adultos se siguió observando de manera consistente, pues sólo emergió una mosca de *Anastrepha ludens* y de las otras especies sólo se registraron tres individuos medios emergidos, es decir que no alcanzaron a salir del pupario, en cambio en las muestras del testigo se observó un 93 % de emergencia de adultos.

4.1.4. Efecto de la CL_{50} y la CL_{95} de β -exotoxina en larvas de dos edades de la mosca mexicana de la fruta:-

Las larvas jóvenes fueron afectadas, tanto por la CL_{50} como por la CL_{95} , en mayor grado que las larvas de tercer estadio (maduras). El efecto tóxico se manifestó en mayor mortalidad larval, mayor

formación de pupas deformes y menor formación de pupas normales. Además, la sintomatología de las larvas muertas y las pupas deformes procedentes de las larvas jóvenes fue más acentuada, es decir que presentaron mayor formación de vesículas en el cuerpo y éste se alargó mucho más. También se incrementó el número de larvas en donde sólo pupó la mitad del cuerpo comparado con la respuesta que manifestaron las larvas de tercer estadio (maduras). En casi todos los parámetros hubo diferencia altamente significativa ($P < 0.05$), incluyendo la emergencia de adultos cuando fueron expuestas a la CL₅₀. Las larvas jóvenes que fueron tratadas con la CL₉₅ no dieron origen a adultos, es decir, la emergencia fue cero, en cambio las larvas de tercer estadio (maduras) registraron una emergencia de 4%. Asimismo, la emergencia registrada en las dos edades larvales que se utilizaron como testigo fue de 82.7 y de 86.2% para larvas jóvenes y maduras, respectivamente (Cuadro 7).

Cuadro 7.- Respuesta toxicológica de larvas de *A. ludens* de dos edades, expuestas a las CL₅₀ y CL₉₅ de β -exotoxina de *B. thuringiensis* determinadas para larvas de tercer estadio (maduras).

Tratamientos	N	Pupas formadas (% \pm SE)		Larvas muertas	Adultos deformes y medio emergidos	Emergencia (%)
		Normales	Deformes			
Larvas jóvenes:						
Testigo	225	95.3 \pm 1.3	2.3 \pm 0.9	2.4 \pm 1.1	0	82.7 \pm 3.0
CL ₅₀	405	71.4 \pm 1.6 a	22.0 \pm 1.9 a	6.5 \pm 1.5 a	4.2 \pm 1.1 a	20.9 \pm 4.3 a
CL ₉₅	341	49.4 \pm 4.4 a	26.1 \pm 1.1 a	24.0 \pm 3.9 a	0 a	0 a
Larvas maduras:						
Testigo	265	96.6 \pm 0.7	1.8 \pm 0.8	1.5 \pm 0.6	0	86.2 \pm 2.2
CL ₅₀	341	76.8 \pm 2.7 b	21.2 \pm 2.9 a	2.0 \pm 0.7 b	1.4 \pm 0.7 b	46.3 \pm 3.5 b
CL ₉₅	419	63.2 \pm 2.2 b	32.9 \pm 2.8 b	3.8 \pm 0.9 b	1.9 \pm 0.6 b	4.0 \pm 0.7 b

* Los valores seguidos por la misma letra para cada parámetro en cada columna no son estadísticamente diferentes (Prueba *t* de Student, $P < 0.05$).

La cutícula de las larvas es una cutícula no diferenciada, y a medida que las larvas tienen menor edad tienen mayor actividad celular, lo que probablemente las hace más susceptibles a dicha sustancia. Además, cuando se expusieron a la toxina, en las larvas jóvenes aún se encontraba en plena actividad el proceso de producción de la hormona de la muda y en las larvas maduras probablemente ya había finalizado, por lo que el daño no fue tan drástico. En especies de insectos de otros grupos también se han obtenido resultados parecidos a los de este estudio, por ejemplo, cuando trataron ninfas jóvenes, viejas y adultos de *L. hesperus*, con β -exotoxina mediante aplicaciones tópicas, el efecto más drástico se observó sobre las ninfas jóvenes (Tanigoshi *et al.*, 1990).

4.2. EFECTO DE LA δ -ENDOTOXINA DE *Bacillus thuringiensis* EN ADULTOS DE MOSCAS DE LA FRUTA

En el Cuadro 8 se reportan los porcentajes de mortalidad de las tres especies. Se puede observar que la mortalidad no fue tan marcada. Las cepas que mostraron cierto efecto letal sobre la viabilidad de las moscas fueron: las cepas LBIT 414, LBIT 113 y Btt. Con las otras cepas se puede decir que la respuesta fue prácticamente nula, pues la mortalidad fluctuó entre el 13 y 30%. La baja toxicidad de la δ -endotoxina probablemente se debió a las siguientes 3 razones, la primera es que se les suministró sólo durante los primeros dos días después de haber emergido, ya que según Domínguez (1990), después de haber evaluado 6 cepas de *B. thuringiensis* concluyó que cuando se suministró a moscas de 120 h de edad la mortalidad fue del 80%, pero cuando lo hizo con adultos de 24 a 72 h de edad el efecto fue mínimo, aunque no especificó a que se debió la diferencia. Por su parte Montoya (1989) reportó que después de haber evaluado varias cepas de B.t., la cepa GM 18 fue la que ocasionó la máxima mortalidad (59%, aproximadamente) después de un período de 96 h de alimentación continua, aunque este porcentaje de mortalidad todavía se considera de baja eficiencia.

Como ya se mencionó, el modo de acción de la δ -endotoxina es diferente al de la β -exotoxina y ya se han realizado varios estudios con diversas cepas de esta

Cuadro 8. Porcentaje de mortalidad acumulada durante 10 días en tres especies de moscas de la fruta después de haberse alimentado con proteína hidrolizada y cristales de *Bacillus thuringiensis*. (N = 60 moscas/muestra).

Cepas de <i>B. thuringiensis</i>	$\mu\text{g/ml}$	<i>A. ludens</i>	<i>A. serpentina</i>	<i>A. obliqua</i>
Testigo	-	10.0	13.3	6.7
LBIT 414	1.5	53.3	50.0	23.3
B. t. t.	1.2	33.3	33.3	33.3
LBIT 113	1.4	36.7	33.3	30.0
B. t. i.	1.5	35.6	16.7	16.7
LBIT 312	1.4	23.3	16.7	26.7
B. t. k.	1.4	30.0	13.3	16.7
LBIT 63	1.4	13.2	16.7	10.0

bacteria contra adultos de moscas de la fruta, enfocados siempre a la detección de alguna que sea activa contra estas plagas. De esta forma, se ha probado la cepa mosquitocida *B. thuringiensis* var. *israelensis*, obteniéndose niveles de mortalidad importantes, tanto en larvas como en adultos, pero con dosis muy altas (Yamvrias y Anagnou, 1989; Robacker *et al.*, 1996). Asimismo, se han llevado a cabo programas de selección de cepas activas contra *A. ludens* y *B. oleae*, observándose mortalidades hasta del 80% (Karamanlidou *et al.*, 1991; Robacker *et al.*, 1996; Martínez *et al.*, 1997; Navrozidis *et al.*, 2000). Sin embargo, en ningún caso se ha probado si alguna de estas cepas contienen β -exotoxina (más bien, se ha tratado de eliminar a dicha toxina de las mezclas experimentales), ni se ha probado independientemente. Aunque en aplicaciones que se han hecho de productos a

base de spora y del cristal de *B. thuringiensis* a nivel de laboratorio con otras cepas como la 114 A y GR 8, se reportaron excelentes resultados al ocasionar una mortalidad de 63.1 y de 70.4%, respectivamente, o en condiciones de campo al reducirse el daño con la cepa 114 A, de 70.6 a 24.7% en frutos de olivos por *B. oleae* (Alberola *et al.*, 1999; Navrozidis *et al.*, 2000). Si estas cepas han resultado efectivas contra adultos de *B. oleae*, entonces existe la posibilidad de localizar alguna cepa que sea patogénica a adultos del género *Anastrepha*.

La segunda causa de la baja mortalidad en adultos de moscas en esta investigación, pudo haber sido el poco tiempo de alimentación con la δ -endotoxina, ya que sólo se les proporcionó por 48 h. Ya que como lo han mencionado algunos autores (Robacker *et al.*, 1996), después de que evaluaron 55 aislados de B.t., reportaron que dos aislados obtenidos de muestras de suelos colectadas en Guatemala ocasionaron el 100% de mortalidad acumulada a los 10 días de edad, pero bajo un régimen de alimentación continua, aunque ellos no especificaron si fue sólo con la δ -endotoxina o combinada con la β -exotoxina, pues la mezcla de las dos toxinas presenta un efecto sinergista tanto para adultos de *A. ludens*, como para otras especies de insectos (Moar *et al.*, 1986; Domínguez, 1990). Otros autores opinan de que no existe un efecto sinérgico cuando los adultos de *A. ludens* consumen simultáneamente las dos toxinas de dicha bacteria (Robacker *et al.*, 2000).

En esta investigación, resulta interesante observar los porcentajes de mortalidad ocasionada por la cepa LBIT 414, los cuales fueron de 53.3, 50.0 y 23.3% para *A. ludens*, *A. serpentina* y *A. obliqua*, respectivamente, alimentándose durante 48 h con el alimento mezclado con los cristales, aunque el tiempo en que ocurrió esta mortalidad fue bastante prolongado, es decir durante 10 días. La mezcla de spora cristal de esta misma cepa (LBIT 414), cuando fue evaluada contra *B. oleae* ocasionó una mortalidad de 53.1 y del 48.2% en adultos de laboratorio y silvestres, respectivamente (Alberola *et al.*, 1999), con un tiempo de alimentación continua de 6 días, y el sobrenadante fue menos tóxico ya que sólo

ocasionó el 12.5% y 31% de mortalidad para adultos de laboratorio y silvestres, respectivamente.

La tercera explicación del bajo porcentaje de mortalidad en los adultos de las tres especies de moscas de la fruta, pudo haber sido el pH que posee su sistema digestivo, ya que se necesita de un pH alcalino para activar la toxina de la bacteria y el pH de las moscas de la fruta es ácido (Solferini, 1990). Pero esta aseveración es un poco aventurada, pues existen cepas de la bacteria con propiedades biocidas a insectos con pH ligeramente ácidos (Ej. *Leptinotarsa decemlineata*). Esto ha llevado a una intensa búsqueda de cepas, para ensayarlas y caracterizarlas con el objeto de encontrar alguna que tenga potencial y sea prometedora en el control de moscas de la fruta (Bel *et al.*, 1997).

Con el objeto de continuar estas investigaciones, se propone que se realicen estudios con productos que contengan la δ -endotoxina pero es necesario solubilizarla y digerirla externamente con una solución de tripsina y luego proporcionársela a las moscas para ver si se incrementa la mortalidad. Aún así se debe de seguir buscando y evaluando otras cepas con el objeto de encontrar alguna en que la δ -endotoxina ocasione algún efecto letal significativo en adultos de las moscas de la fruta.

4.3. PARASITISMO DE LARVAS DE MOSCAS DE LA FRUTA POR DOS ESPECIES DE NEMÁTODOS ENTOMOPATÓGENOS, EN CONDICIONES DE LABORATORIO Y DE CAMPO

4.3.1. Efecto de la edad larval y la profundidad del hospedero sobre las

CL₅₀'s:- Al establecerse las relaciones entre las diversas concentraciones de las dos especies de nemátodos y la mortalidad causada a las larvas de las tres especies de moscas de la fruta, se obtuvo una amplia variación en la capacidad parasitaria de cada nemátodo, debido principalmente a la edad de las larvas y a la profundidad de las unidades de parasitación. Primeramente, y como era de esperarse, las larvas jóvenes (6 y 7 días de edad) mostraron mayor susceptibilidad

que las larvas maduras (8 y 9 días de edad). Todas las CL₅₀'s estimadas mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las dos edades larvianas (Cuadros 9 y 10, Fig. 3). Sin embargo, la mayor diferencia de las CL₅₀'s se observó entre las profundidades de los recipientes utilizados con las dos especies de nemátodos y las dos edades larvales, aunque el nemátodo *Heterorhabditis indica* registró menor variabilidad en el parasitismo de las larvas de las tres especies de moscas de la fruta por efecto de la profundidad. Así tenemos que para el caso de *Anastrepha obliqua*, la CL₅₀ estimada con *H. indica* en larvas de 6 días en los recipientes de 5 cm resultó ser igual a la estimada en los recipientes menos profundos (2 cm), y la CL₅₀ estimada en los recipientes más profundos (8 cm) fue 30% menor que las dos dosis anteriormente indicadas. Las larvas de *A. serpentina* fueron las menos susceptibles al ataque del nemátodo, y las de *A. ludens* la que mayor susceptibilidad registró (Cuadro 9).

Cuadro 9.- Parasitismo de larvas jóvenes de tres especies de moscas de la fruta por el nemátodo *Heterorhabditis indica* a tres profundidades en suelo de textura arenosa con 10% de humedad.

Especie de mosca de la fruta	Profundidad (cm)	N	CL ₅₀ ± SE (nem/cm ² de arena) (Límites fiduciales al 95 %)	χ^2	CL ₉₅ (nem/cm ²)	Ecuación de la línea de regresión
<i>A. obliqua</i>	2	745	24 ± 2.8 (20 – 28)	5.335	300	Y = 2.94 + 1.49x
<i>A. obliqua</i>	5	593	24 ± 3.6 (19 – 29)	9.149	426	Y = 3.20 + 1.31x
<i>A. obliqua</i>	8	391	16 ± 1.1 (13 – 20)	7.860	201	Y = 3.20 + 1.49x
<i>A. ludens</i>	2	369	12 ± 1.0 (8 – 16)	0.398	381	Y = 3.82 + 1.09x
<i>A. ludens</i>	5	578	13 ± 1.5 (9 – 17)	4.244	370	Y = 3.75 + 1.12x
<i>A. ludens</i>	8	618	19 ± 2.4 (15 – 23)	2.659	357	Y = 3.35 + 1.29x
<i>A. serpentina</i>	2	475	65 ± 2.0 (52 – 82)	1.706	1295	Y = 2.72 + 1.26x
<i>A. serpentina</i>	5	517	80 ± 5.0 (64 – 109)	1.903	1377	Y = 2.47 + 1.33x
<i>A. serpentina</i>	8	959	75 ± 6.9 (62 – 90)	13.003	2109	Y = 2.89 + 1.13x

Las larvas maduras (8 y 9 días de edad) tratadas con el nemátodo *H. indica* registraron, en general, una tendencia similar. Aunque se requirió de una mayor dosis de nemátodos para alcanzar la CL₅₀ en cada profundidad (Cuadro 10). Así

tenemos que para las larvas de *A. obliqua*, la CL₅₀ estimada en los recipientes de 5 cm de profundidad se obtuvo con 30% más de la dosis que correspondió a la CL₅₀ estimada en los recipientes menos profundos (2 cm), la CL₅₀ estimada en los recipientes más profundos (8 cm) resultó ser el doble que ésta última.

En las larvas de *A. ludens* se registró una tendencia similar, aunque se requirió de una mayor dosis de nemátodos para alcanzar la CL₅₀ en cada profundidad comparada con las larvas de *A. obliqua*, pero también fueron más susceptibles que las larvas de *A. serpentina*. Las larvas de *A. serpentina* fueron menos susceptibles al parasitismo de *H. indica*, ya que para alcanzar las CL₅₀ en cada profundidad se requirió de 95, 95 y 144 nemátodos/cm² de arena para 2, 5 y 8 cm de profundidad, respectivamente (Cuadro 10).

Con respecto al nemátodo *Steinernema feltiae*, la tendencia fue similar a la observada con *H. indica*. De las larvas jóvenes, las más susceptibles fueron las de *A. obliqua*, seguidas de las de *A. ludens* y las menos susceptibles fueron las de *A. serpentina*. Por otro lado la respuesta del nemátodo en función de la profundidad para el caso de *A. obliqua*, la CL₅₀ estimada en larvas de 6 días en los recipientes de 5 cm resultó ser un poco más del doble que la del recipiente menos profundo (2 cm), la CL₅₀ estimada en los recipientes más profundos (8 cm) mostró ser más de seis veces mayor que esta última. Después le siguieron en susceptibilidad las larvas de *A. ludens*, para alcanzar la CL₅₀ a 8 cm de profundidad se requirió de aplicar dos veces la dosis estimada en los recipientes menos profundos (2 cm). Las larvas de *A. serpentina* fueron las menos susceptibles al nemátodo, y las larvas de *A. obliqua* fueron las que mayor susceptibilidad registraron (Cuadro 11, Fig. 4).

Para larvas maduras (8 y 9 días de edad) también fue similar la efectividad del nemátodo *S. feltiae*, es decir que las larvas que se localizaban en recipientes menos profundos (2 cm) fueron más susceptibles que las que estaban en recipientes más profundos (8 cm). Las larvas de *A. obliqua* fueron las más susceptibles, seguidas de la de *A. ludens* y por último las de *A. serpentina*, aunque en estas últimas no se pudo estimar la CL₅₀ cuando se encontraban en los recipientes más profundos (8 cm), ya que el máximo parasitismo que se obtuvo

fue de 40%, cuando se aplicó la dosis más alta que correspondió a 204 nemátodos/cm² de arena (Cuadro 12, Fig. 5).

En pruebas de laboratorio simulando diversas condiciones de campo, se comprobó el potencial de estas dos especies de nemátodos para parasitar larvas de moscas de la fruta antes de pupar. Fue evidente que existe una diferencia importante en la susceptibilidad de las larvas jóvenes (de 6 y 7 días de edad), comparada con las larvas maduras (de 8 y 9 días de edad). Las observaciones realizadas a los 8 días posteriores a la inoculación mostraron que todas las larvas muertas y las que lograron transformarse en pupa después de haber sido parasitadas estaban infectadas por los nemátodos (Fig. 5). En las unidades utilizadas como testigo no se observó parasitismo alguno y la mortalidad natural fue muy baja (1.6% en promedio).

Cuadro 10.- Parasitismo de larvas maduras de tres especies de moscas de la fruta por el nemátodo *Heterorhabditis indica* a tres profundidades en suelo de textura arenosa con 10% de humedad.

Especie de mosca de la fruta	Profundidad (cm)	N	CL ₅₀ ± SE (nem/cm ² de arena) (Límites fiduciales al 95 %)	χ ²	CL ₉₅ (nem/cm ²)	Ecuación de la línea de regresión
<i>A. obliqua</i>	2	410	25 ± 4.2 (20 - 31)	5.021	298	Y = 2.85 + 1.53x
<i>A. obliqua</i>	5	625	37 ± 1.4 (31 - 44)	5.870	569	Y = 2.82 + 1.39x
<i>A. obliqua</i>	8	472	49 ± 7.4 (38 - 69)	0.798	1294	Y = 3.05 + 1.15x
<i>A. ludens</i>	2	730	65 ± 0.0 (56 - 77)	5.105	971	Y = 2.45 + 1.40x
<i>A. ludens</i>	5	897	78 ± 0.0 (66 - 93)	10.822	1496	Y = 2.58 + 1.28x
<i>A. ludens</i>	8	709	113 ± 2.8 (96 - 131)	7.798	1197	Y = 1.75 + 1.59x
<i>A. serpentina</i>	2	874	95 ± 0.0 (83 - 112)	11.548	1228	Y = 2.07 + 1.48x
<i>A. serpentina</i>	5	998	95 ± 0.0 (80 - 115)	12.446	2040	Y = 2.56 + 1.23x
<i>A. serpentina</i>	8	883	144 ± 0.0 (123 - 175)	10.481	1438	Y = 1.45 + 1.64x

Se observó que las larvas jóvenes de las tres especies de moscas resultaron ser más susceptibles a las dos especies de nemátodos, que las larvas de mayor edad. Esto obedece sin duda alguna a que el tiempo a la pupación es mucho

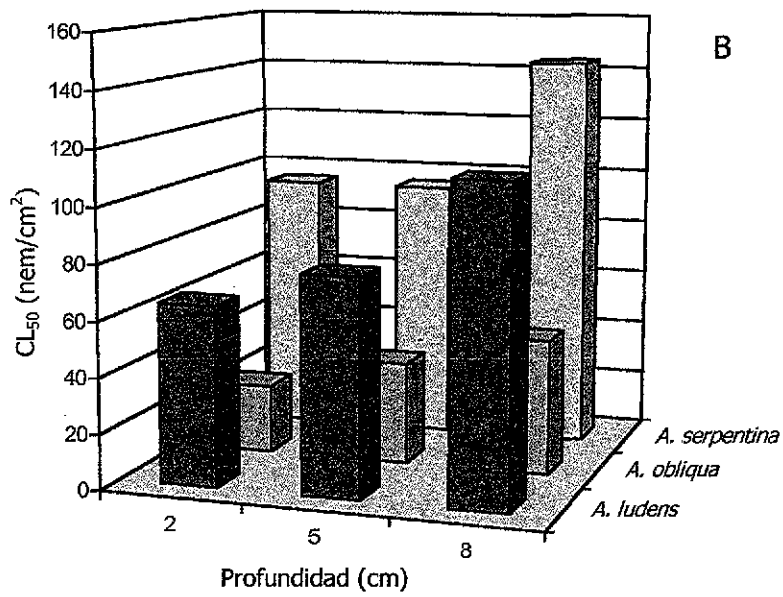
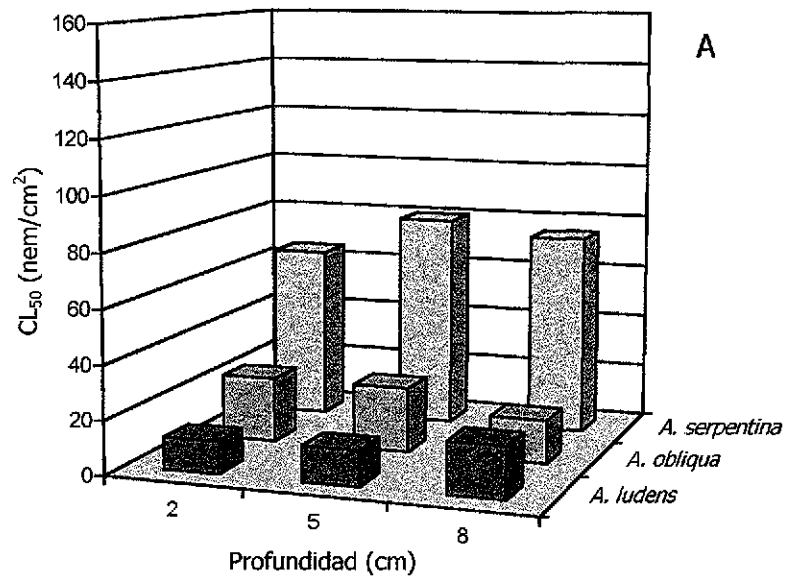


Fig. 3. Parasitismo de larvas jóvenes (A) y larvas maduras (B) de tres especies de moscas de la fruta por el nemátodo *H. indica* en tres profundidades en suelo de textura arenosa con 10% de humedad.

mayor en las larvas jóvenes, por lo que tienen mayor tiempo para estar expuestas a la acción de estos organismos. En cambio las larvas de mayor edad tienen menor tiempo para transformarse en pupa; una vez que ha ocurrido el proceso de

Cuadro 11.- Parasitismo de larvas jóvenes de tres especies de moscas de la fruta por el nemátodo *Steinernema feltiae* a tres profundidades en suelo de textura arenosa con 10% de humedad.

Especie de mosca de la fruta	Profundidad (cm)	N	CL ₅₀ ± SE (nem/cm ² de arena) (Límites fiduciales al 95 %)	χ ²	CL ₉₅ (nem/cm ²)	Ecuación de la línea de regresión
<i>A. obliqua</i>	2	535	9 ± 0.8 (6 – 11)	1.731	184	Y = 3.84 + 1.24x
<i>A. obliqua</i>	5	801	20 ± 1.6 (15 – 24)	3.842	825	Y = 3.70 + 1.00x
<i>A. obliqua</i>	8	650	59 ± 7.4 (44 – 98)	1 147	8890	Y = 3.80 + 0.67x
<i>A. ludens</i>	2	367	22 ± 2.2 (16 – 30)	3.225	572	Y = 3.42 + 1.17x
<i>A. ludens</i>	5	482	29 ± 3.0 (23 – 36)	3.241	630	Y = 2.88 + 1.46x
<i>A. ludens</i>	8	434	55 ± 8.3 (44 – 65)	3.044	674	Y = 3.04 + 1.49x
<i>A. serpentina</i>	2	643	67 ± 3.8 (53 – 82)	6.830	1596	Y = 2.86 + 1.18x
<i>A. serpentina</i>	5	482	83 ± 8.4 (70 – 102)	4.074	971	Y = 2.04 + 1.54x
<i>A. serpentina</i>	8	474	124 ± 12.3 (102 – 163)	7 990	1599	Y = 1.90 + 1.48x

Cuadro 12.- Parasitismo de larvas maduras de tres especies de moscas de la fruta por el nemátodo *Steinernema feltiae* a tres profundidades en suelo de textura arenosa con 10% de humedad.

Especie de mosca de la fruta	Profundidad (cm)	N	CL ₅₀ ± SE (nem/cm ² de arena) (Límites fiduciales al 95 %)	χ ²	CL ₉₅ (nem/cm ²)	Ecuación de la línea de regresión
<i>A. obliqua</i>	2	547	15 ± 2.6 (13 – 18)	4.258	106	Y = 2.68 + 1.96x
<i>A. obliqua</i>	5	575	36 ± 5.0 (29 – 43)	3.599	834	Y = 3 13 + 1.20x
<i>A. obliqua</i>	8	820	151 ± 5.8 (137 – 170)	3.414	803	Y = 0.05 + 2.27x
<i>A. ludens</i>	2	602	27 ± 2.0 (21 – 35)	6.895	962	Y = 3.46 + 1.07x
<i>A. ludens</i>	5	728	79 ± 4.0 (70 – 91)	3.036	612	Y = 1.48 + 1.85x
<i>A. ludens</i>	8	422	169 ± 9 6 (130-207)	3.049	1239	Y = 0.97 + 1.83x
<i>A. serpentina</i>	2	477	111 ± 0.0 (92 – 143)	4.064	1984	
<i>A. serpentina</i>	5	434	116 ± 0.0 (91 – 158)	4.202	3806	
<i>A. serpentina</i>	8		Indeterminada*			

* Por bajo parasitismo, a pesar de usar concentraciones altas.

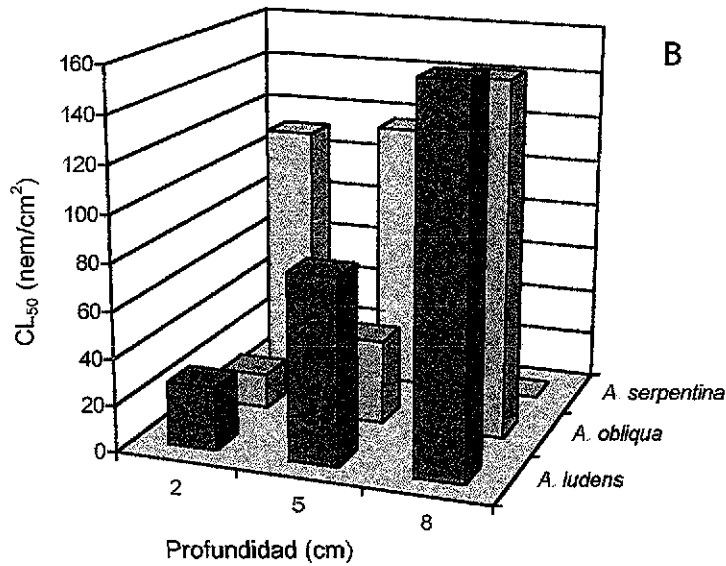
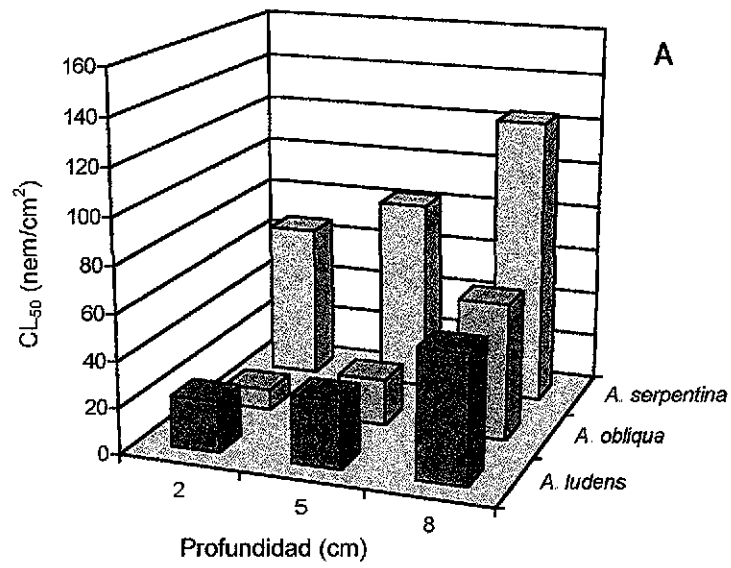


Fig. 4. Parasitismo de larvas jóvenes (A) y larvas maduras (B) de tres especies de moscas de la fruta por el nemátodo *S. feltiae* en tres profundidades en suelo de textura arenosa con 10% de humedad.

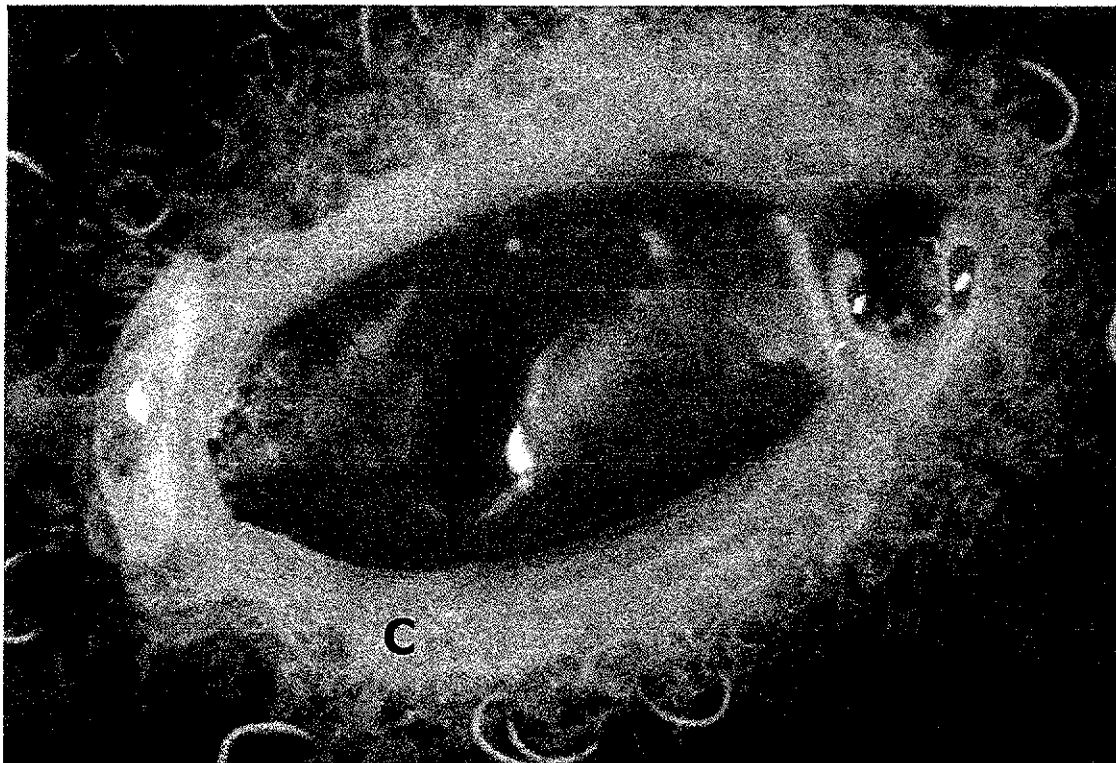


Fig. 5.- Pupas de *Anastrepha ludens* normales (A) y parasitadas (B) por el nemátodo *Steinernema feltiae*. Estados infectivos (C) de *Heterorhabditis indica* saliendo de una pupa parasitada.

pupación, el pupario, a pesar de poseer espiráculos, actúa como una barrera que impide la penetración de los nemátodos. Si éstos no logran penetrar antes de que la larva puepe, después no podrán hacerlo ya que sólo penetran por aberturas naturales (espiráculos, ano y/o boca) de larvas como lo reportan Woodring y Kaya (1988). El mayor parasitismo en larvas de las dos edades se registró en recipientes de 2 cm de profundidad, lo cual resulta obvio, pues están más expuestas a la acción de los nemátodos por lo cual el encuentro parásito-hospedero es más posible. El nemátodo *H. indica* ocasionó un parasitismo más uniforme en las tres diferentes profundidades. En cambio con *S. feltiae*, a medida que las larvas se localizaron en recipientes más profundos, el parasitismo fue menor. Esta última especie tiene un desplazamiento de manera horizontal por lo que coexiste más sobre la superficie, en cambio *H. indica* tiene un desplazamiento de manera vertical por lo que penetran más profundo en el suelo. De las tres especies de moscas de la fruta, con la mosca de las sapotáceas, *A. serpentina*, se requirió mayor cantidad de nemátodos para alcanzar la CL₅₀, tanto para larvas jóvenes como para larvas de tercer estadio. A pesar de que las larvas de menor edad son más susceptibles al ataque de los nemátodos, hubo variabilidad en la respuesta de cada grupo de larvas. En algunos casos, las variaciones en el grado de parasitismo que se han observado en varios estudios responden a la diversidad de cepas de nemátodos evaluadas, como sucedió con las larvas de *A. suspensa* a diferentes especies y cepas de nemátodos (Beavers y Calkins, 1984). Taylor *et al.* (1998) determinaron una CL₅₀ para larvas de *Musca domestica* de 5 y 38 nemátodos/cm² de estiércol de bovinos, respectivamente con *S. feltiae* cepas SN y UNK 36. Pero también la edad del hospedero juega un papel importante, pues se ha demostrado que puede haber diferencia en la susceptibilidad (Lindgren y Vail, 1986), en donde usualmente el estado joven es el más susceptible.

Es difícil que en condiciones naturales, las larvas de moscas de la fruta de menor edad al tercer estadio salgan del fruto hospedero para pupar, pero si se presenta este caso nos indica que las dos especies de nemátodos, son capaces de atacar a las larvas. Por otro lado también nos indicó, tomando como referencia la

susceptibilidad de las larvas jóvenes, qué tan eficientes son los nemátodos y qué tanta variabilidad hay en su capacidad parasítica para atacar a hospederos de mayor edad que son menos susceptibles, como sucede con las larvas maturas.

De acuerdo a estos resultados, es evidente la efectividad de los nemátodos para parasitar larvas de moscas de la fruta y por ello deben considerarse como agentes potenciales para el control de dicha plaga principalmente en ecosistemas tropicales con ambientes húmedos.

4.3.2.- Parasitismo de larvas de *Anastrepha ludens* de tercer estadio por el nemátodo *Steinernema feltiae*, en suelo de textura areno-arcillosa:-

Los datos de esta fase se presentan en el Cuadro 13. Se puede observar que cuando se colocaron en el suelo las larvas de tercer estadio de *A. ludens* antes que los nematodos, se determinó una CL_{50} de 66 ± 8 nemátodos/cm² de suelo, y cuando se colocaron después que los nemátodos la CL_{50} fue de 68 ± 5 nemátodos/cm² de suelo. Estas pequeñas diferencias en las CL_{50} 's no fueron significativas estadísticamente ($P > 0.05$), lo que indicó que se puede aplicar al suelo los nemátodos antes o después de las larvas.

Cuadro 13.- Parasitismo de larvas de *Anastrepha ludens* de tercer estadio por el nemátodo *Steinernema feltiae*, en suelo de textura areno-arcillosa con 15% de humedad.

Forma de aplicación	N	$CL_{50} \pm SE$ (nem/cm ² de suelo) (Límites fiduciales al 95 %)	χ^2	CL_{95} (nem/cm ²)	Ecuación de la línea de regresión
A	1,773	66 ± 8.3 (57-76) a*	2.7	2,459	$Y = 1.73 + 1.05x$
D	1,397	68 ± 5.5 (65-85) a	7.8	1,396	$Y = 1.14 + 1.22x$

* Los valores seguidos por la misma letra no son estadísticamente diferentes (Prueba de *t* de Student, $P < 0.05$). (A = se colocaron primero las larvas que los nemátodos en el suelo, D = se aplicaron primero los nemátodos que las larvas en el suelo).

Previamente, en otro estudio se había demostrado la susceptibilidad de larvas de 5 días de edad de *A. suspensa* (Loew) a tres cepas de *S. feltiae* (Mexicana, All y Breton), con una mortalidad de 90.7, 88.1 y 83.0% cuando inocularon con 1,000 estados infectivos por caja Petri (Beavers y Calkins, 1984). Sin embargo la efectividad del nemátodo pudo haber sido sobreestimada debido a que utilizaron larvas jóvenes que son más susceptibles que las larvas de mayor edad, como quedó demostrado en este estudio.

La emergencia de adultos de *Ceratitis capitata* se redujo en 52.0, 71.1 y 96.5% para el primero, segundo y tercer año respectivamente, cuando aplicaron el nemátodo *S. feltiae* a una concentración de 500 estados infectivos/cm² de suelo y colocaron larvas de tercer estadio en condiciones de campo. Dicha concentración es demasiado alta comparada con la que se determinó en este trabajo, lo cual refleja un ahorro si se utiliza a *S. feltiae* como agente de control de moscas de la fruta (Lindgren *et al.*, 1990).

En algunos casos, las variaciones en el grado de parasitismo que se han observado en varios estudios responden a la diversidad de cepas evaluadas, como sucedió con las larvas de *A. suspensa* a diferentes especies y cepas de nemátodos (Beavers y Calkins, 1984), pero también puede haber diferencia en la susceptibilidad de los diversos hospederos evaluados (Lindgren y Vail, 1986).

4.3.3. Parasitismo de pupas de *Anastrepha ludens* de cinco y doce días de edad:- Con el objeto de expresar los resultados en porcentajes de parasitismo se incluyen los cuadros 14 y 15. Las pupas de *A. ludens* no fueron susceptibles al parasitismo de *S. feltiae*, ya que el porcentaje más alto que se observó en las de 5 días de edad fue de 0.27% cuando se aplicaron 204 nemátodos/cm² de suelo, que correspondió a la concentración más alta. En pupas de 12 días de edad no se observó parasitismo en ninguna de las concentraciones ensayadas y sólo cuando los adultos emergieron y salieron a través del suelo tratado con los nemátodos, se registró un parasitismo que fluctuó entre 1 y 10% en las concentraciones de 6 a 204 nemátodos/cm² de suelo (Cuadro 15).

Cuadro 14. Parasitismo de pupas de *A. ludens* de 5 días de edad por *S. feltiae* en suelo de textura areno-arcillosa a 5 cm de profundidad.

Concentración (nemátodos/cm ² de suelo)	Pupas tratadas	Pupas Parasitadas	Parasitismo (%)
Testigo	375	0	0
6	366	0	0
13	373	0	0
25	371	0	0
51	377	0	0
76	365	0	0
102	366	0	0
127	370	0	0
204	363	1	0.27

El parasitismo en estado de pupa fue prácticamente nulo (0.27%), como otros resultados similares (<1%) que fueron reportados por (Beavers y Calkins, 1984). Los nemátodos no tienen la capacidad de atravesar el pupario, a pesar de que poseen espiráculos, éstos poseen estructuras de protección que actúan como una barrera impidiendo que los nemátodos penetren y lleguen al hemocele. En pupas de lepidópteros se ha reportado un parasitismo que fluctúa entre el 24 y 63% (Kaya y Hara, 1981), por lo que se puede afirmar que las pupas de dípteros ciclorrafos son menos susceptibles. Aunque Lezama-Gutiérrez *et al.* (1996) reportaron un excelente parasitismo ocasionado por diferentes especies de nemátodos, incluyendo a *S. feltiae* que parasitó el 47.5% de larvas y el 33.7% de pupas de *A. ludens*, cuando inocularon con 4,000 nemátodos por recipiente con 300 g de suelo, pero dichos resultados hay que considerarlos con reserva debido a que ellos expusieron las larvas y estimaron el parasitismo en larvas y pupas.

Cuadro 15. Parasitismo de pupas de *A. ludens* de doce días de edad y/o adultos emergidos y que salieron a través del suelo tratado con *S. feltiae*.

Concentración (nematodos/cm ² de suelo)	Pupas tratadas	Pupas parasitadas	Adultos Parasitados	Parasitismo en adultos (%)
Testigo	375	0	0	0
6	371	0	4	1.1
13	371	0	2	0.5
25	382	0	1	0.3
51	362	0	6	1.7
76	370	0	11	3.0
102	343	0	33	9.6
127	375	0	36	9.6
204	359	0	36	10.0

Los adultos de *A. ludens* fueron parasitados cuando emergieron y salieron a través del suelo tratado con nemátodos. El porcentaje de parasitismo alcanzado fue bajo comparado con el que se observó en larvas de tercer estadio, pero fue mayor que el parasitismo que se observó en pupas. Con esto se corroboró que *S. feltiae* puede parasitar adultos de moscas de la fruta, como ya se había reportado para *A. suspensa* (Loew) (Beavers y Calkins, 1984), aunque en otros estudios se reportó de que no fue capaz de parasitar a adultos de *C. capitata* (Lindegren y Vail, 1986). En cambio, en adultos de *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) se reportó un excelente parasitismo causado por *S. feltiae* (Kaya y Grieve, 1982).

4.3.4. Impacto de la β -exotoxina y dos especies de nemátodos entomopatógenos en larvas de *Anastrepha ludens* y otros artrópodos, bajo condiciones de campo:- En el Cuadro 16 se reportan los datos correspondientes al número de organismos recuperados después de tamizar el

suelo en donde se localizaban. El porcentaje de recaptura de pupas de *A. ludens* (tanto normales como parasitadas por *Diachasmimorpha longicaudata*) y de estratiómidos fue de 95 a 98% aproximadamente, lo que indicó que la pérdida de material biológico por depredación u otras causas fue mínima. En el caso de la lombriz de tierra, la recaptura fue del 70 al 95%.

Cuadro 16.- Recuperación de larvas de *Anastrepha ludens* (normales y parasitadas) y otros organismos de las cajas experimentales, después de exponerse por 8 días a la acción de algunos agentes entomopatógenos e insecticida en condiciones de campo.

Tratamientos	<i>A. ludens</i>		Stratiomidae		Lombriz de tierra	
	Total	(%)	Total	(%)	Total	(%)
Testigo	1155	96.2	147	98.0	57	95.0
<i>S. feltiae</i> (Sf)	1139	94.9	147	98.0	54	90.0
<i>H. indica</i> (Hi)	1168	97.3	146	97.3	52	87.0
½ CL ₅₀ β-exotoxina + ½ CL ₅₀ (Hi)	1182	98.5	143	95.3	45	75.0
CL ₅₀ de β-exotoxina	1186	98.8	146	97.3	46	77.0
½ CL ₅₀ (Hi) + ½ CL ₅₀ (Sf)	1145	95.4	145	96.7	51	85.0
½ CL ₅₀ β-exotoxina + ½ CL ₅₀ (Sf)	1160	96.7	145	96.7	48	80.0
Insecticida	1016	84.7	149	99.3	42	70.0

(Sf = *Steinernema feltiae*; Hi = *Heterorhabditis indica*).

Estos datos correspondieron únicamente a organismos sobrevivientes después de estar expuesto durante 8 días a la acción de los organismos entomopatógenos y del insecticida. Además, se pudo observar que en el tratamiento a base de insecticida fue donde hubo menor recuperación de pupas de *A. ludens* y de lombriz de tierra, lo cual resultó obvio, pues se tratan de

organismos que presentan una alta susceptibilidad a dicho producto y probablemente hubo mortalidad, pero que no se pudo observar.

En el Cuadro 17 se concentran los datos referente a los adultos de moscas y parasitoides emergidos, así como el de adultos de estratiómidos y la sobrevivencia de lombriz de tierra en cada uno de los tratamientos.

Con respecto a la emergencia de estratiómidos, no se observó ningún efecto negativo significativo por la acción de los diferentes agentes de control, ni tampoco por el insecticida, pues las diferencias entre los promedios de emergencia no fueron estadísticamente diferentes ($P > 0.05$). La poca acción que demostró el insecticida sobre las larvas de esta familia quizás se debió al grosor de la cutícula, pues se trata de un tipo de larva que posee una cutícula bastante gruesa que podría impedir la penetración de dicho producto, lo que indicó que es necesario incrementar la concentración para causar un efecto más drástico. Para el caso de los nemátodos no se tiene una explicación, pues a pesar de que las larvas de este grupo de insectos poseen espiráculos, no se observó ninguna larva parasitada.

En los tratamientos en donde se aplicó sólo el nemátodo *S. feltiae*, $\frac{1}{2}$ CL₅₀ *H. indica* + $\frac{1}{2}$ CL₅₀ *S. feltiae*, y $\frac{1}{2}$ CL₅₀ de β -exotoxina + $\frac{1}{2}$ CL₅₀ *S. feltiae*, se registró una emergencia de moscas de 46.3, 48.0 y 51.0%, respectivamente. Al hacer comparaciones múltiples por la prueba de Tukey ($P < 0.05$) se corroboró que no hubo diferencia estadística entre ellos, aunque resultaron diferentes al testigo, en donde se registró el 88.2% de emergencia de adultos de *A. ludens* (Cuadro 16). En los tratamientos en donde se aplicó solamente la especie de nemátodo *H. indica*, y *H. indica* + $\frac{1}{2}$ CL₅₀ de β -exotoxina, el porcentaje de emergencia fue de 63.3 y 61.7% respectivamente, valores que no resultaron significativamente diferentes ($P > 0.05$) a los valores observados en los tratamientos previamente indicados.

La emergencia de adultos en las parcelas tratadas con la β -exotoxina fue de 72.3%, que no fue diferente significativamente ($P < 0.05$) al porcentaje de emergencia que hubo en el testigo, pero diferente a los demás tratamientos. Las larvas sometidas al tratamiento con insecticida registraron el mayor porcentaje de

mortalidad larval, ya que sólo hubo 9.8% de emergencia de *A. ludens*, lo cual dejó ver la toxicidad del producto sobre la plaga y sin duda alguna sobre otros organismos no blanco que se localizaban en el suelo, a excepción de las larvas de estratiómidos (Cuadro 17).

Cuadro 17.- Emergencia (%) de adultos de *Anastrepha ludens*, *Diachasmimorpha longicaudata* y estratiómidos, y sobrevivencia de lombriz de tierra después de exponerse por 8 días a la acción de dos agentes entomopatógenos e insecticida en condiciones de campo.

Tratamientos	<i>A. ludens</i>	<i>D. longicaudata</i>	Stratiomideae	Lombriz de tierra
Testigo	88.2 a*	33.7 a	95.9 n. s.	95.0 a
CL ₅₀ de <i>S. feltiae</i> (Sf)	46.3 c	17.7 b	95.9 n. s.	90.0 ab
CL ₅₀ de <i>H. indica</i> (Hi)	63.3 bc	21.7 b	93.5 n. s.	87.0 ab
½ CL ₅₀ β-exotoxina + ½ CL ₅₀ (Sf)	51.0 c	18.5 b	87.3 n. s.	80.0 ab
½ CL ₅₀ β-exotoxina + ½ CL ₅₀ (Hi)	61.7 bc	21.7 b	97.8 n. s.	75.0 ab
CL ₅₀ de β-exotoxina	72.3 ab	32.5 a	97.2 n. s.	77.0 ab
½ CL ₅₀ (Hi) + ½ CL ₅₀ (Sf)	48.0 c	18.5 b	90.1 n. s.	85.0 ab
Insecticida	9.8 d	2.8 c	90.7 n. s.	70.0 b
C. V.	17.3	24.7	6.2	13.9

*Los valores seguidos por la misma letra en cada columna no son diferentes significativamente (prueba de Tukey, con $P < 0.05$). (Sf = *Steinernema feltiae*; Hi = *Heterorhabditis indica*; n. s. = no significativo).

Cabe aclarar que la emergencia de adultos a partir de larvas normales y parasitadas, en condiciones de laboratorio fue de 93% para *A. ludens* y de 39% para el caso del parasitoide, respectivamente. De las 100 larvas que correspondieron a la categoría de larvas parasitadas, sólo darían origen a parasitoides, pues fueron irradiadas para inhibir la emergencia de *A. ludens*.

Con respecto a la emergencia de parasitoides, no se observaron diferencias significativas en la respuesta a las dos especies de nemátodos ($P > 0.05$),

aplicados solos y combinados con la β -exotoxina (Cuadro 17), pero sí registraron diferencias comparados con el testigo. Esto indicó que los nemátodos son efectivos para atacar y matar larvas de moscas de la fruta, pero si las larvas están parasitadas por *D. longicaudata*, también este organismo puede sufrir daño y se reduciría el número de adultos emergidos. La β -exotoxina no resultó tóxica a los parasitoides en la dosis que se manejó en este estudio, la cual estuvo relacionada con la acción reducida que demostró sobre las larvas de moscas de la fruta; además, su efecto es por contacto (Sebesta *et al.*, 1981) y los parasitoides están protegidos por el pupario de su hospedero.

En cambio, en las parcelas tratadas con el insecticida, la emergencia de parasitoides fue severamente afectada ya que sólo se observó el 2.8% de emergencia (Cuadro 17). Este insecticida actúa por contacto y una de las características que se observó es que existe una alta formación de pupas deformes, afectando la emergencia de parasitoides o también puede ser que el insecticida penetró a través de la cutícula de la larva hasta donde se encontraban en desarrollo y les provocó la muerte.

Las lombrices de tierra resultaron ligeramente afectada por el insecticida, ya que la sobrevivencia en las parcelas tratadas con dicho producto fue menor, comparada con la que se observó en el testigo y los demás tratamientos cuyos valores no fueron significativamente diferentes ($P > 0.05$) (Cuadro 17). Sin embargo, se hace la aclaración de que en el bloque II, en donde se aplicaron estados infectivos del nemátodo *S. feltiae*, se encontraron 3 lombrices muertas. Estas fueron lavadas con agua destilada estéril y después se colocaron sobre papel filtro húmedo dentro de una caja de Petri. Tres días después se observó que tenían el cuerpo cubierto de nemátodos. Probablemente las lombrices murieron por otras causas y los nemátodos las utilizaron como substrato para su desarrollo, ya que las lombrices son capaces de ser portadoras internas pero no pueden ser parasitadas por *S. feltiae* (Shapiro *et al.*, 1993).

En las larvas, pupas y adultos de estratiómidos no se observó que hubiera parasitismo por los nemátodos o algún otro efecto negativo debido a la acción de los otros agentes evaluados (Cuadro 17).

El presente estudio corroboró la información preliminar obtenida de los bioensayos de laboratorio, y se concluye que estas dos especies de nemátodos (*S. feltiae* y *H. indica*) tienen potencial como agentes de control biológico de larvas de *A. ludens* y de otras especies de moscas de la fruta. El parasitoide *D. longicaudata* se ve más afectado por el insecticida que por los nemátodos cuando se encuentra en desarrollo dentro de su hospedero.

4.3.5. Parasitismo de larvas de *Anastrepha ludens* de tercer estadio por dos especies de nemátodos entomopatógenos, en condiciones de campo.-

En el cuadro 18 se presentan los resultados expresados en porcentajes de mortalidad larvaria ocasionada por el parasitismo de las dos especies de nemátodos. Se pudo observar que cuando se aplicaron las CL₅₀'s de cada especie se logró un porcentaje de mortalidad cercano al 50%, aunque si se considera la mortalidad natural ocurrida en el testigo, este porcentaje se reduce. Probablemente esta reducción en la eficiencia de los nemátodos se debió a que en este experimento se colocó un mayor número de larvas de *A. ludens* por parcela que en el experimento anterior. En cambio, cuando se aplicaron 3 veces la CL₅₀ de cada especie de nemátodo por unidad experimental, se observó un parasitismo de 70.1 y 71.3%, para *H. indica* y *S. feltiae*, respectivamente. A pesar de que el incremento de la mortalidad larval fue casi de 2 veces más de la que se observó cuando se aplicó únicamente la CL₅₀ de cada especie de nemátodo, para fines de control de la plaga es un porcentaje de mortalidad que resulta interesante y es necesario considerarlo para futuras investigaciones, principalmente aquellas que estén enfocadas a realizarse en campo.

Cuadro 18.- Porcentaje de parasitismo por *Heterorhabditis indica* y *Steinernema feltiae* en larvas de *Anastrepha ludens* en condiciones de campo ($N = 800$ larvas/tratamiento).

Tratamientos (nem./cm ² de suelo)	Parasitismo en larvas (% \pm SE)
CL ₅₀ de Hi (116)	38.7 \pm 4.6 b
3 veces la CL ₅₀ de Hi (348)	70.1 \pm 7.1 a
CL ₅₀ de Sf (162)	42.1 \pm 1.8 b
3 veces la CL ₅₀ de Sf (486)	71.3 \pm 6.5 a
CL ₅₀ de Hi + CL ₅₀ de Sf (278)	59.1 \pm 3.9 a
Testigo*	13.8 \pm 2.9 c

Los valores seguidos por la misma letra no son diferentes significativamente (prueba de Tukey, con $P < 0.05$). * Se refiere a la mortalidad larval por otras causas y no por el parasitismo de los nemátodos. (Sf = *Steinernema feltiae*; Hi = *Heterorhabditis indica*).

Cuando se aplicaron las CL₅₀'s de los dos tipos de nemátodos por parcela, se logró inducir un porcentaje de parasitismo que no fue significativamente diferente ($P > 0.05$) al ocasionado por cada una de las especies de nemátodos cuando se aplicaron tres veces sus respectivas CL₅₀'s. Esta respuesta probablemente se relacione a las estrategias de localización de sus hospederos que tiene cada especie, ya que una ellas tiene un desplazamiento en forma horizontal y en la otra es de tipo vertical. Ello puede incrementar el éxito para que los nemátodos localicen a su huésped. Por la dosis que se utilizó y el grado de parasitismo que se obtuvo, resulta más económico utilizar simultáneamente las dos especies de nemátodos, que hacer aplicaciones de altas densidades de cada uno por separado. De adoptarse esta última estrategia se corre el riesgo de generar un mayor costo en el uso de estos organismos en un programa de manejo integrado de dicha plaga.

La temperatura que prevaleció en el suelo durante el experimento (bajo la sombra de los árboles de mango) fue de 25 a 29°C. Es importante conocer este factor abiótico debido a que juega un papel relevante en la eficiencia de los

nemátodos, estableciéndose un rango favorable de temperatura entre 20 y 30°C y una temperatura óptima de 26°C, para obtener un alto porcentaje de parasitismo. De acuerdo a estos resultados, es clara la efectividad tanto de *S. feltiae* como de *H. indica* para parasitar larvas de moscas de la fruta y pueden ser considerados como agentes alternativos con potencial para el control de dichas plagas en ecosistemas tropicales húmedos. Pero es necesario conocer los factores abióticos presentes en el suelo (por ejemplo textura, temperatura, etc.) cuando y donde se apliquen. Además, productos químicos como el diazinón, utilizado para el control de moscas de la fruta, son más persistentes y tienen un amplio rango de toxicidad para artrópodos del suelo comparado con los nemátodos entomopatógenos.

4.4. FACTORES ABIÓTICOS QUE AFECTAN EL PARASITISMO DE *Steinernema feltiae* SOBRE LARVAS DE *Anastrepha obliqua* EN CONDICIONES DE LABORATORIO

4.4.1. Capacidad parasítica del nemátodo en función de la edad y la profundidad del hospedero.- Al establecerse las relaciones entre las diversas concentraciones de *S. feltiae* y la mortalidad causada a las larvas de *A. obliqua*, se obtuvo una amplia variación en su capacidad parasitaria, debida a la edad de las larvas y a la profundidad de las unidades de parasitación. Una vez más se observó, y como era de esperarse, las larvas más jóvenes (6 días) mostraron mayor susceptibilidad que las larvas maduras (8 días). Todas las CL₅₀'s estimadas mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las dos edades larvarias (Fig. 6). Sin embargo, la mayor diferencia en las CL₅₀'s se observó entre las profundidades de los recipientes utilizados. Mientras que la CL₅₀ estimada para larvas de 6 días en los recipientes de 5 cm resultó ser un poco más del doble que la del recipiente menos profundo (2 cm), y la CL₅₀ estimada en los recipientes más profundos (8 cm) mostró ser más de 10 veces mayor que esta última. Proporciones muy similares se observaron entre las CL₅₀'s estimadas con las larvas maduras (Fig. 6). Las observaciones realizadas a los 8 días posteriores a la

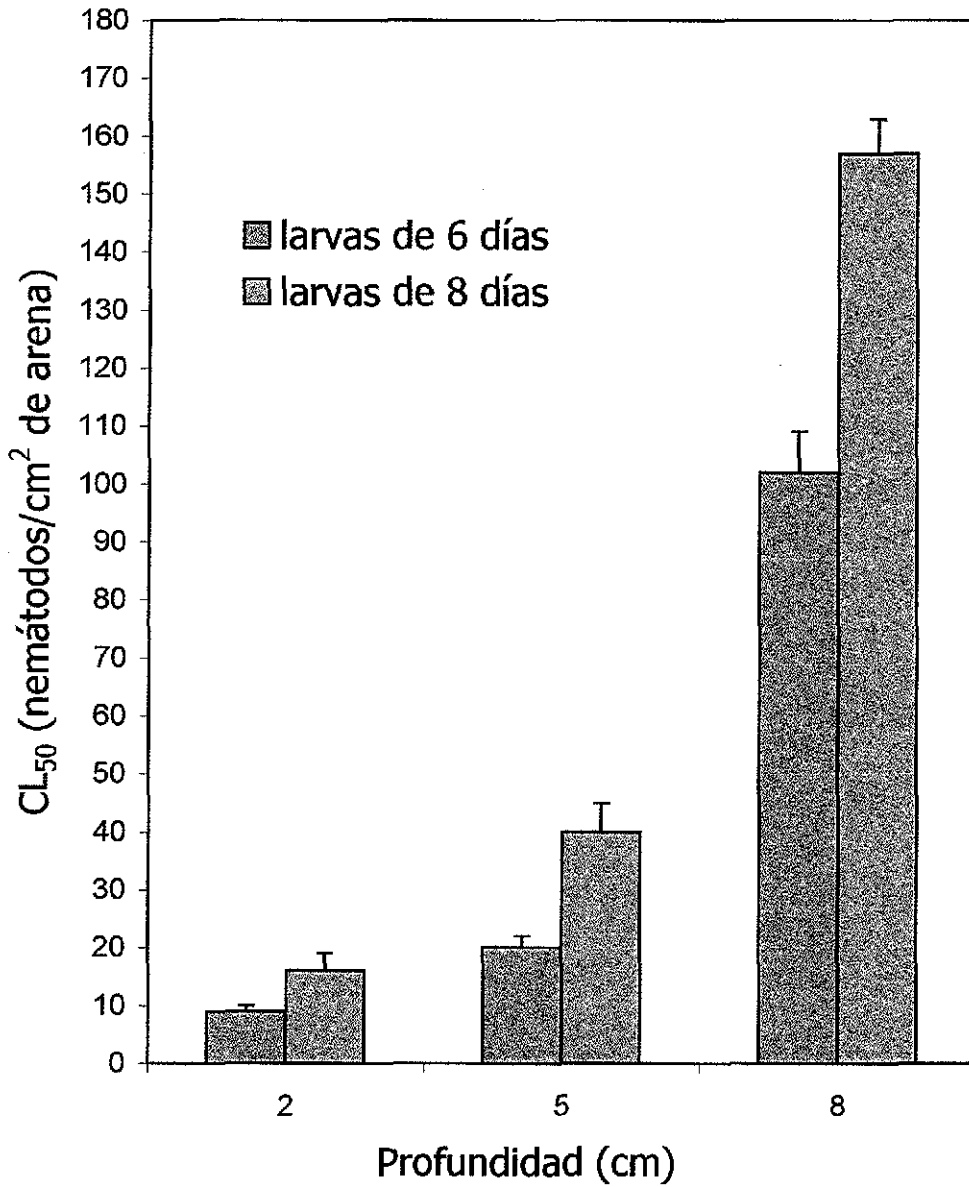


Fig. 6. Parasitismo de *Steinernema feltiae* en larvas de dos edades de *Anastrepha obliqua*.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

inoculación mostraron que todas las larvas muertas estaban infectadas por los nemátodos. En las unidades utilizadas como testigo no se observó parasitismo alguno y la mortalidad natural fue muy baja (1.6% en promedio).

La capacidad parasitaria del nemátodo fue mayor en ambas edades larvarias en recipientes de 2 cm de profundidad, cuando se utilizó sustrato arenoso, lo que podría deberse a que las larvas tienen menor espacio de refugio, ya que están más expuestas a la acción de los nemátodos. Cuando los bioensayos se llevaron a cabo en recipientes más profundos, la capacidad parasitaria del nemátodo disminuyó, lo cual resulta razonable especular que fue debido a que existe mayor distancia entre los nemátodos y el huésped, y hay mayores obstáculos para el desplazamiento de los nemátodos, por tal razón se requiere de una mayor cantidad de nemátodos para obtener la CL₅₀.

4.4.2. Efecto de la textura del suelo sobre la capacidad parasítica de

Steinernema feltiae.- Una vez establecida la capacidad parasítica de *S. feltiae* sobre larvas jóvenes y maduras de *Anastrepha obliqua*, bajo las condiciones antes mencionadas, se procedió a probar el efecto de diferentes texturas de suelo sobre la capacidad parasítica del nemátodo. El parasitismo más alto se registró con larvas jóvenes (82.2%), localizadas a 8 cm de profundidad en suelo de textura areno-arcillosa, seguido de las que estaban a 5 y 2 cm (63.2 y 60.2%, respectivamente) (Fig. 7A). Los porcentajes de parasitismo que siguieron fueron en suelo de textura arenosa, observándose 63.6, 45.4 y 53.6% a 2, 5 y 8 cm de profundidad, respectivamente. Los porcentajes menores de parasitismo se registraron en suelo de textura areno-limosa, éstos fueron de 30.1, 20.4 y 23.1% a 2, 5 y 8 cm de profundidad, respectivamente (Fig. 7A).

Los porcentajes de parasitismo observado en larvas maduras se presentan en la Fig. 7B y fueron menores que los registrados en larvas jóvenes, en los tres tipos de suelos, a las diferentes profundidades. Aunque la tendencia fue similar a lo observado en larvas jóvenes, es decir, que el porcentaje más alto se registró en

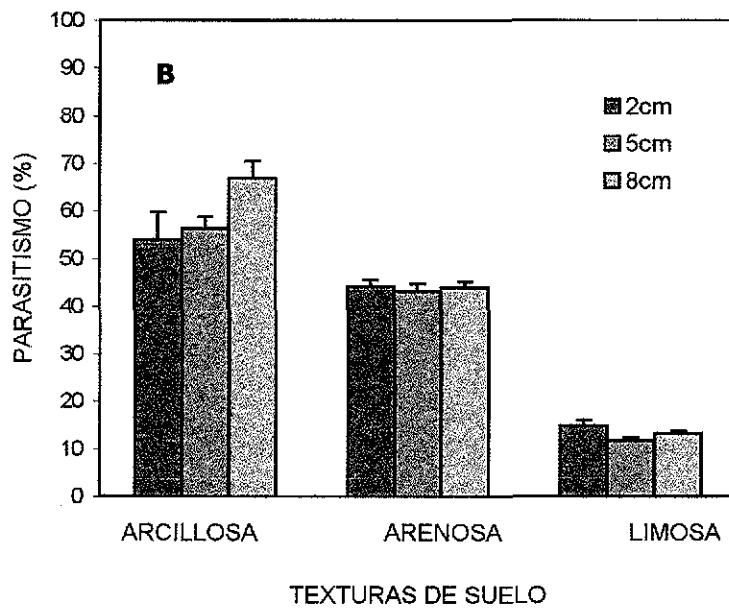
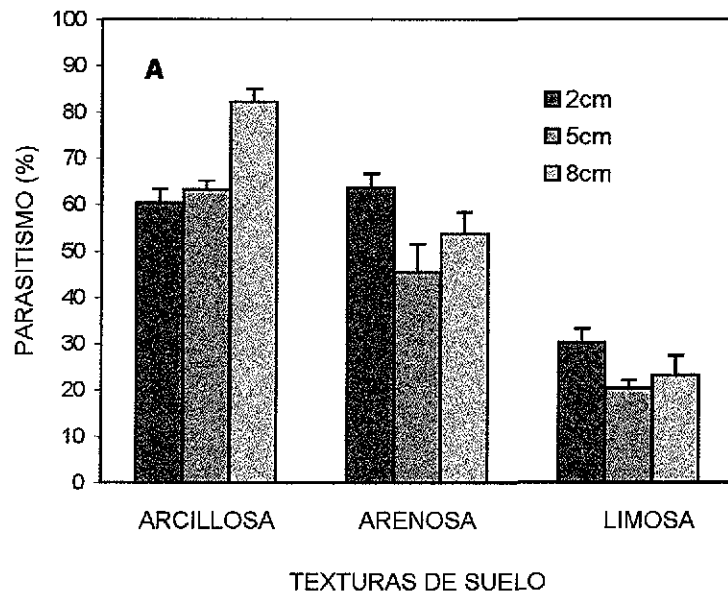


Fig. 7. Parasitismo en larvas de *Anastrepha obliqua* de 6 (A) y de 8 (B) días de edad por *Steinernema feltiae* en suelo con diferentes texturas.

suelo de textura areno-arcillosa, seguido por las que estaban en suelo de textura arenosa. El menor porcentaje se observó en las que estaban en suelo de textura areno- limosa (Fig. 7A y B).

Al efectuar el análisis trifactorial de los resultados de este experimento, se observó que existe una interacción significativa entre la textura del suelo y la profundidad del hospedero, por lo que ambos factores influyen de manera conjunta en la capacidad parasítica del nemátodo. Sin embargo, aunque se observó que la susceptibilidad del hospedero varía significativamente en función de la edad, ésta no interactúa con ninguno de los otros dos factores.

Cuando se evaluó el efecto de las tres diferentes texturas de suelo, contrario a lo esperado, se observaron mayores niveles de parasitismo en aquellos experimentos donde se utilizó el suelo de textura areno-arcillosa como sustrato, que en los bioensayos en suelos de textura arenosa. Frecuentemente se hace referencia a la facilidad de desplazamiento de los nemátodos en suelos arenosos y a su efectividad en programas de control de plagas, cuando se encuentran en este tipo de condiciones (Georgis y Poinar, 1983). Sin embargo, en este estudio se observó que el parasitismo se incrementó en un 20% en las larvas jóvenes, colocadas en suelo de textura areno-arcillosa a 2 y 5 cm de profundidad, que cuando se utilizó el suelo de textura arenosa, y en 40% en los recipientes de 8 cm de profundidad.

Es difícil aventurar una explicación a este fenómeno, pero el aumento del parasitismo en suelo de textura areno-arcillosa tal vez se debió a que este tipo de suelo retiene más la humedad, lo cual pudo haber favorecido el desplazamiento y la sobrevivencia de los nemátodos, como previamente lo indicaron Moyle y Kaya (1981). Se sabe que esta especie puede desplazarse hasta 14 cm en forma horizontal y hasta 12 cm en forma vertical, siempre y cuando el hospedero esté presente y las condiciones físicas del suelo sean favorables (Georgis y Poinar, 1983). También es posible que la pupación se retrase en un sustrato con más humedad (observaciones personales), por lo que las larvas están más tiempo expuestas a los nemátodos. Por otro lado, cabe hacer notar que el suelo de textura

areno-arcillosa utilizado en este estudio posee sólo 12% de arcilla y 14% de limo (ver cuadro 3), por lo que no se trata de un suelo de textura netamente arcillosa.

Por otro lado, los resultados en substrato arenoso obtenidos en esta investigación son comparables (hasta cierto punto) a los de Lindegren *et al.* (1990), donde reportaron que con 500 estados infectivos de *Steinernema feltiae* por cm² de vermiculita son suficientes para inhibir en ~90% la emergencia de adultos de la mosca del mediterráneo, *Ceratitis capitata*. Cuando los comparamos con el substrato areno-arcilloso corroboramos que se puede obtener un porcentaje alto de parasitismo en larvas de *A. obliqua* con mucho menor cantidad de inóculo. Además, esta variación entre texturas no se debió a un posible efecto adverso ocasionado por factores bióticos, como se ha reportado en otros estudios (Kaya, 1990), pues los tres tipos de suelos fueron sometidos a un proceso de esterilización para eliminar a los posibles organismos antagonistas ahí presentes. Finalmente, por razones que aún se desconocen, el suelo de textura areno-limosa mostró la menor efectividad en el parasitismo del nemátodo; sin embargo, esto podría estar relacionado con la mayor cantidad de materia orgánica encontrada en este tipo de suelo (ver cuadro 3), ya que podría influir en la movilidad de los nemátodos.

4.4.3. Efecto de la temperatura en la capacidad parasítica del nemátodo

Steinernema feltiae:- Los efectos de la temperatura sobre el parasitismo de *S. feltiae* se expresan en las Figs. 8A y B. El mayor porcentaje de parasitismo (91.3%) se registró en larvas jóvenes, localizadas a 8 cm de profundidad y a una temperatura de 30±1°C, seguidas por las larvas que se localizaron a 25±1°C, y por último las que se mantuvieron a 19±1°C (Fig. 8A). El análisis de superficie de estos tres factores indicó que la temperatura óptima de parasitismo es de 26.1°C y la profundidad óptima de 7.9 cm, con lo que se podría obtener un 91.4% de parasitismo.

El efecto sobre larvas maduras se ilustra en la Fig. 8B, en donde se observa que el parasitismo más alto y uniforme ocurrió a 25±1°C en las tres profundidades,

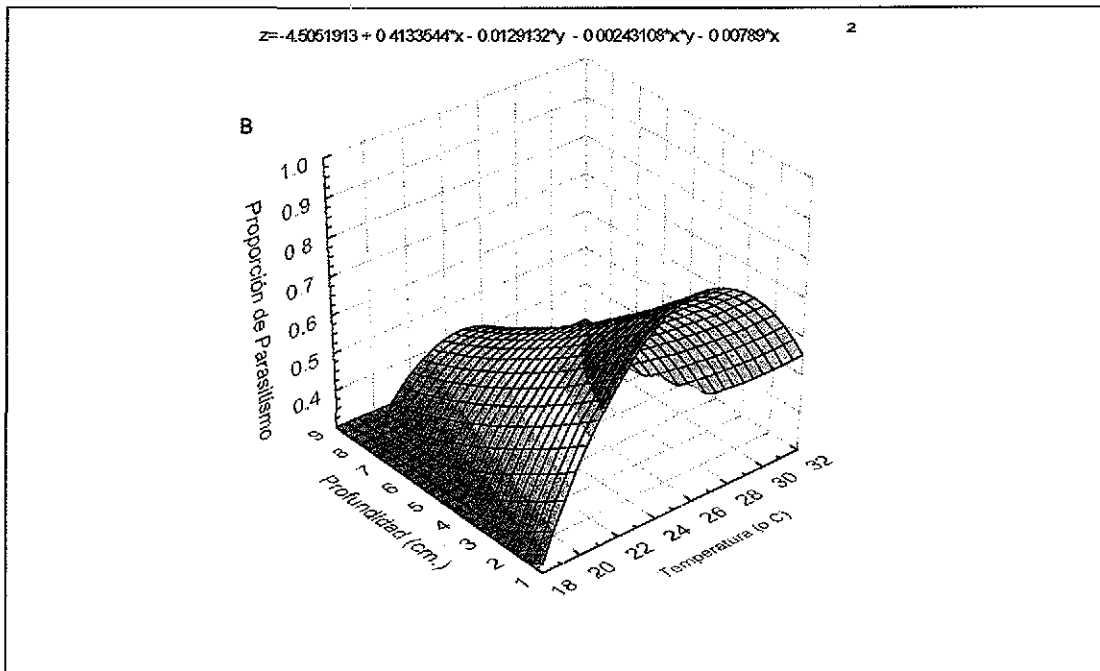
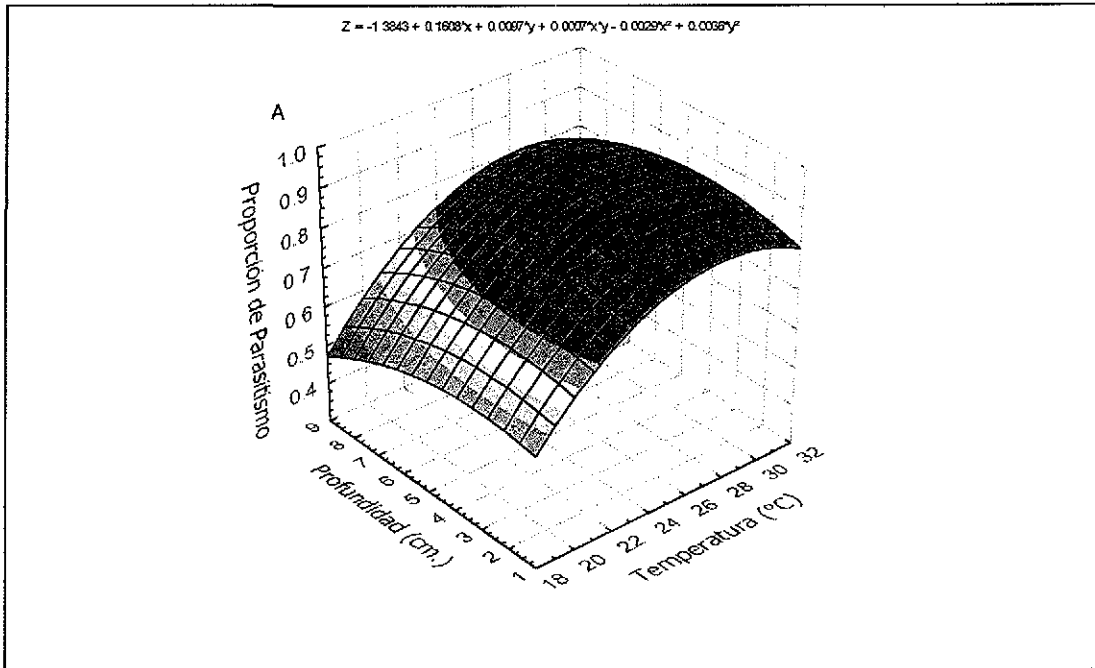


Fig.8. Parasitismo de larvas de *Anastrepha obliqua* de 6 (A) y de 8 (B) días de edad por *Steinernema feltiae* en suelo de textura arcillosa a diferentes temperaturas.

mientras que a $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ el parasitismo fue ligeramente menor. A $19\pm 1^{\circ}\text{C}$ el parasitismo que se observó fue aún menor, con valores de 19.9, 19.8 y 26.0% a 2, 5 y 8 cm de profundidad, respectivamente (Fig. 8B). Este bajo parasitismo puede estar influenciado por la temperatura, al disminuir la capacidad de desplazamiento del nemátodo, por lo que requiere de mayor tiempo para localizar a su hospedero. Sin embargo, fue evidente que la edad del hospedero influyó más en la eficiencia del parasitismo del nemátodo entomopatógeno, que la temperatura del ambiente en que se localiza. El análisis de superficie de estos tres factores sobre las larvas maduras de *Anastrepha obliqua* indicó que la temperatura óptima de parasitismo fue de 25.9°C y la profundidad óptima de 7.9 cm, con lo que se podría obtener hasta un 61.2% de parasitismo. En general, las CL_{50} 's que se utilizaron para las dos edades de larvas ocasionaron un parasitismo más uniforme a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ y $30\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Se observó que sólo la temperatura de $19\pm 1^{\circ}\text{C}$ en las larvas maduras disminuyó la tasa de parasitismo a menos de su CL_{50} , estimada en arena. Es posible que la tasa metabólica del nemátodo (y por ende su movilidad) disminuya a esta temperatura, por lo que requeriría de mayor tiempo para localizar a su hospedero, dándole oportunidad a que las larvas pupen y de esta forma escapen al ataque del nemátodo. Sin embargo, Geden y Axtell (1988) reportaron, después de haber aplicado al suelo *S. feltiae* para controlar larvas de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae), que el mayor porcentaje de parasitismo ocurrió a temperaturas de 20 a 24°C después de la segunda semana de aplicación. A 28 y 32°C hubo menor parasitismo e indican que la mayor persistencia se observó a 18°C y la menor a 32°C . Por otro lado, Gray y Johnson (1983) observaron que las temperaturas $>30^{\circ}\text{C}$ reducen la sobrevivencia y efectividad de *S. feltiae*, aunque Kaya (1977) indica que puede ser infectivo en un rango de 9 a 33°C . En nuestro estudio, se observó que *S. feltiae* ocasiona altos niveles de parasitismo a 25 y 30°C en larvas jóvenes y maduras de *Anastrepha obliqua*.

Los nemátodos entomopatógenos como agentes de control biológico han tenido buena aceptación por controlar de manera rápida a diversas plagas, por

poseer quimiorreceptores que promueven una buena movilidad y desplazamiento, por reproducirse fácilmente de manera masiva, por poderse aplicar por métodos convencionales y por ser seguros al ambiente (Kaya, 1985; Poinar, 1990). De acuerdo a estos resultados, es evidente la efectividad de esta especie de nemátodo para atacar y matar larvas de moscas de la fruta, y como ya se indicó anteriormente, puede ser un agente con potencial para el control de dicha plaga en ecosistemas tropicales con temperaturas de 20 a 30°C y ambientes húmedos, aunque es necesario continuar con más estudios para determinar su efectividad, así como la forma y frecuencia de aplicación en campo.

V. DISCUSIÓN GENERAL

5.1. Toxicidad de la β -exotoxina y δ -endotoxina de *Bacillus thuringiensis* hacia larvas y adultos de moscas de la fruta

En este apartado se incluye de manera integral la discusión expuesta en el apartado anterior con el objeto de tener una mejor comprensión de la misma y cabe hacer mención de que los resultados obtenidos cumplieron con los objetivos planteados al inicio del trabajo.

Las interacciones entre los organismos forman parte de la ecología aplicada, y su entendimiento es fundamental en la solución de problemas prácticos. Debido a que las moscas de la fruta representan una seria limitación para el desarrollo de la fruticultura, se investigó la interacción de dos tipos de organismos entomopatógenos, sobre diversos estados de las moscas de la fruta y en otros organismos no blanco, con el objetivo de que estas investigaciones sirvan como fundamento para el desarrollo de nuevas alternativas de control basadas en principios de la sustentabilidad.

Los resultados indicaron que la β -exotoxina es altamente tóxica hacia las larvas maduras de las tres especies de moscas de la fruta. Las cuales presentaron la sintomatología característica del efecto de la turingiensina que consiste en una quitinización defectuosa, en donde las pupas adquieren un aspecto elongado con una esclerotización débil, debido a que las larvas mueren antes de contraerse para formar la estructura ovoide típica del pupario. A pesar de que los niveles de susceptibilidad hacia la toxina fueron similares, un aspecto interesante y digno de considerar en este sentido es que las tres especies de *Anastrepha* spp. mostraron cierta diferencia en sus niveles de susceptibilidad a la β -exotoxina. Las diferencias detectadas, como ya se indicó anteriormente, probablemente se debieron al grosor del exoesqueleto de las larvas, que constituye una capa de espesor con características físicas y químicas variables entre las especies (Rabossi *et al.*, 1991; Hopkins y Kramer, 1992), pudiendo presentar cada una de ellas diferentes

barreras a la penetración de la toxina. Las diferencias interespecíficas que presentan las tres especies durante el estado de desarrollo fisiológico del tercer estadio larval, también pudo haber sido otra de las causas de la susceptibilidad diferencial encontrada (Celedonio-Hurtado *et al.*, 1988). De hecho, las anormalidades registradas en las larvas muertas fueron muy inconsistentes debido probablemente a que cuando se expusieron a la toxina, el proceso de producción de la hormona de la muda ya había finalizado, por lo que el daño no fue tan drástico como posiblemente hubiera sucedido si se hubieran tratado larvas más jóvenes, como sucedió con *Ligus hesperus* cuando se trataron ninfas jóvenes, viejas y adultos con β -exotoxina mediante aplicaciones tópicas, el efecto más drástico se observó sobre las ninfas jóvenes (Tanigoshi *et al.*, 1990). Por tal motivo es más confiable considerar como indicador de toxicidad la emergencia de adultos y no la mortalidad larval.

Los niveles de toxicidad encontrados en esta investigación son comparables con otros obtenidos en diversas especies de insectos. Así tenemos que a la mosca *Haematobia irritans* L. se le estimó una CL_{50} de 2.79 $\mu\text{g/g}$ de dieta larvaria, observando sintomatologías similares a las presentadas por las larvas de las moscas de la fruta (Haufler y Kunz, 1985). Asimismo, en los lepidópteros *Heliothis zea* (Boddie), *H. virescens* (F.), *Trichoplusia ni* (Hübner), *Pectinophera gossypiella* (Saunders) y *Spodoptera exigua* (Hübner), la emergencia de adultos se inhibió en un 100% con una dosis de 0.540 $\mu\text{g/cm}^2$ de dieta larvaria, aunque no se mencionó la etapa del desarrollo del insecto en donde ocurrió la mayor mortalidad (Ignoffo y Gregory, 1972).

Con respecto al efecto subletal de la β -exotoxina sobre los adultos sobrevivientes, cuando se probaron tanto las diferentes dosis de los bioensayos contra larvas de *Anastrepha ludens* (Loew), como también las CL_{50} 's contra las tres especies de mosca, los resultados fueron consistentes pero contrarios a los esperados. Por un lado, la longevidad de los adultos en ambas pruebas fue igual o mayor en aquellos adultos provenientes de los tratamientos con la toxina. Asimismo, la fecundidad y fertilidad de los individuos tratados fueron siempre

mayores (en casi todos los casos, con diferencias estadísticas) a los testigos. Estos resultados se oponen a los reportes de otros autores (Ignoffo y Gregory, 1972; Sebesta *et al.*, 1981). Como previamente se había indicado, la explicación a este fenómeno sólo puede ser especulativa. Una hipótesis se basa en la eliminación de los individuos biológicamente más débiles por la toxina y la sobrevivencia sólo de aquellos más vigorosos y con mayor potencial reproductivo. Sin embargo, esto implicaría que los individuos sobrevivientes de las concentraciones más altas; deberían ser los más vigorosos y de mayor capacidad reproductora, lo cual no se observó. Otra hipótesis supondría que, debido a que la β -exotoxina inhibe principalmente la formación del tejido nuevo del imago, este efecto deletéreo de la toxina podría ser contrarrestado por un efecto homeostático del insecto hacia la formación de mayor masa tisular, que permitiría a los insectos sobrevivientes estar mejor dotados para reproducirse. Por otro lado, es importante hacer notar que los adultos sobrevivientes de los tratamientos no mostraron deformaciones evidentes, por lo que no presentaban impedimentos manifiestos, contrario a lo observado en adultos de cinco especies de lepidópteros (Ignoffo y Gregory, 1972), donde los adultos sobrevivientes presentaron deformaciones evidentes de sus partes bucales y en las antenas, lo cual pudo estar directamente relacionado al efecto deletéreo sobre su fecundidad y longevidad.

La cutícula de las larvas es una cutícula no diferenciada, y a medida que las larvas tienen menor edad presentan una mayor actividad celular, lo que las hace más susceptibles a dicha sustancia. Es probable que las larvas de tercer estadio consideradas como maduras, cuando se expusieron a la toxina, el proceso de producción de la hormona de la muda ya había finalizado por lo que el daño no fue tan drástico; en cambio, en las larvas jóvenes aún se encontraba en plena actividad dicho proceso por lo que el efecto fue más severo, registrándose una diferencia altamente significativa de los parámetros observados entre larvas jóvenes y maduras.

En otros aspectos, los resultados obtenidos en el presente reporte indicaron que la β -exotoxina posee potencial para ser utilizado como alternativa de control

contra las moscas de la fruta, especialmente en aplicaciones en la zona de goteo de los árboles atacados, tomando en consideración que estable a la luz ultravioleta, al agua y a altas temperaturas. Sin embargo, debido a que esta toxina ha presentado efectos tóxicos hacia algunos vertebrados, hasta ahora muchos países occidentales han prohibido su uso, no sólo como insecticida formulado, sino hasta como un subproducto en las diversas formulaciones de *B. thuringiensis*. A pesar de que algunas compañías han desarrollado productos experimentales a base de esta toxina, las restricciones aún continúan vigentes. Pero es importante y vale la pena considerar que algunos productos a base de *B. thuringiensis* poseen en su formulación a la β -exotoxina (ej. Bitoxibacilin, producto ruso) que permite expandir el rango de actividad del bioinsecticida, o bien se ha utilizado la toxina en algunos países nórdicos para el control de moscas en porquerizas. También cabe mencionar que está comprobado el sinergismo existente entre la β -exotoxina y la δ -endotoxina, en su acción sobre algunos organismos considerados como importantes plagas agrícolas (Moar *et al.*, 1986), lo que permite expandir el rango de actividad de *B. thuringiensis* sobre algunos lepidópteros recalcitrantes (ej. *Spodoptera exigua*).

En conclusión, el presente trabajo muestra evidencia de la alta toxicidad de la β -exotoxina de *B. thuringiensis* hacia larvas maduras de las tres especies de moscas de la fruta del género *Anastrepha*, cuya presencia en los agroecosistemas hace que los países compradores de nuestra fruta impongan estrictas medidas cuarentenarias, de donde se deriva su importancia económica. Además, los adultos que se obtienen de larvas expuestas a las diferentes concentraciones de β -exotoxina no sufrieron un efecto negativo en su aptitud reproductiva. Adicionalmente, es claro que productos químicos como el Diazinón, utilizados para el control de larvas de moscas de la fruta, afectan a una gama más amplia de organismos y son más persistentes y tóxicos que la β -exotoxina de *B. thuringiensis*.

Por otro lado, a pesar de que la β -exotoxina es uno de los componentes tóxicos de *B. thuringiensis*, su composición, origen y modo de acción son

totalmente diferentes a las δ -endotoxinas, ampliamente usadas como bioinsecticidas. Los pocos reportes sobre las evaluaciones con algunas cepas de esta bacteria hacia moscas de la fruta, han estado enfocados a la detección de δ -endotoxinas tóxicas contra estas plagas. En los programas en donde se han llevado a cabo dichos estudios para seleccionar cepas activas contra *A. ludens* y la mosca del olivo, *Bactrocera oleae* (Gmelin), se han registrado mortalidades hasta del 80% (Karamanlidou *et al.*, 1991; Robacker *et al.*, 1996; Martínez *et al.*, 1997; Navrozidis *et al.*, 2000), pero en ningún caso se ha probado si alguna de estas cepas contienen β -exotoxina, ni se ha probado independientemente.

Una posible causa de la baja mortalidad en adultos de moscas en la presente investigación pudo haber sido el tiempo reducido de alimentación con la δ -endotoxina, ya que sólo se les proporcionó por un día (24 h). En adultos de *A. ludens* se reportó una mortalidad del 100% acumulada a los 10 días de suministrarle el alimento en forma continua, con dos aislados de *B. thuringiensis* obtenidos de muestras de suelos colectadas en Guatemala. Obviamente, esto nunca sucederá en un programa de manejo de estas plagas, además no especificaron si fue sólo con la δ -endotoxina o combinada con la β -exotoxina (Robacker *et al.*, 1996). La mezcla de las dos toxinas presenta un efecto sinergista en adultos de otras especies de insectos y en adultos de *A. ludens* (Moar *et al.*, 1986; Domínguez, 1990). Aunque también se reportó que no existe tal efecto sinérgico cuando los adultos de *A. ludens* consumen simultáneamente las dos toxinas de dicha bacteria (Robacker *et al.*, 2000).

En los resultados de nuestra investigación, es interesante observar los porcentajes de mortalidad provocada por la cepa LBIT 414, que fueron de 53.3, 50.0 y 23.3% para *A. ludens*, *A. serpentina* y *A. obliqua* respectivamente, proporcionándole la toxina a los adultos solamente por 24 h, aunque el tiempo en que ocurrió esta mortalidad fue bastante prolongado, es decir, durante 10 días.

En aplicaciones de productos a base del complejo espora-cristal de *B. thuringiensis* hechas a nivel de campo, se han reportado reducciones hasta del 60% del daño provocado por adultos de *B. oleae*, calificando a la cepa como

excelente (Alberola *et al.*, 1999; Navrozidis *et al.*, 2000). Si estas cepas han resultado efectivas contra adultos de esta plaga, entonces existe la posibilidad de localizar alguna cepa que posea propiedades patotóxica hacia adultos del género *Anastrepha*.

En otro estudio se observó que la mezcla de esporas y cristales de la cepa LBIT 414 ocasionó una mortalidad de 53.1 y del 48.2% en adultos de laboratorio y silvestres de *B. oleae*, respectivamente (Alberola *et al.*, 1999), con un tiempo de alimentación continua de 6 días, resultados muy similares a los nuestros con adultos de *A. ludens* cuando le suministramos dicha toxina por sólo 24 h. El sobrenadante de esa misma cepa fue menos tóxico ya que sólo provocó el 12.5% y 31% de mortalidad en adultos de laboratorio y silvestres de *B. oleae*, respectivamente. Según Domínguez (1990), después de que evaluó 6 cepas de *B. thuringiensis* concluyó que los adultos de *A. ludens* de mayor tiempo de emergidos (120 h) son más susceptibles (registraron una mortalidad ~80 %) que los adultos de menor edad (24 a 72 h de emergidos), en donde el efecto fue mínimo, aunque no existe una explicación sobre esa diferencia en la susceptibilidad. Sin embargo, en otro trabajo se reportó después de haberse evaluado varias cepas de *B. t.*, que la cepa GM 18 ocasionó el 56% de mortalidad después de un periodo de alimentación continua por 96 h, aunque este porcentaje de mortalidad sigue siendo bajo (Montoya, 1989).

Otra posible explicación del bajo porcentaje de mortalidad registrada en adultos de las tres especies de moscas de la fruta, pudo haber sido el pH que posee su sistema digestivo, ya que es necesario que el insecto posea un pH alcalino, como sucede en adultos de lepidópteros, para activar la toxina de la bacteria. El pH de las moscas de la fruta del género *Anastrepha*, como ya se indicó anteriormente, es ácido (Solferini, 1990), aunque esta aseveración es un poco aventurada, pues existen cepas de la bacteria con propiedades biocidas a coleópteros con contenido digestivo relativamente ácido y no se descarta la posibilidad de que se descubra alguna cepa que sea patogénica a adultos de tefrítidos.

A pesar de que en esta investigación se obtuvieron resultados interesantes y prometedores, pero por las razones antes expuestas es necesario e indispensable continuar con estas investigaciones, se propone que se realicen estudios con cepas productoras de la δ -endotoxina pero es necesario solubilizarla y digerirla externamente con una solución alcalina, seguida de una activación con tripsina, para luego proporcionársela a las moscas y observar si se incrementa la mortalidad. Además de seguir buscando y evaluando otras cepas con el objeto de encontrar alguna en que la δ -endotoxina, de manera natural, ocasione algún efecto letal significativo en los adultos de dichas plagas.

5.2. Parasitismo de larvas de moscas de la fruta por dos especies de nemátodos entomopatógenos en condiciones de laboratorio y de campo

Los resultados de esta parte de la investigación nos permitieron entender que las larvas jóvenes de las tres especies de moscas fueron más susceptibles que las larvas maduras, al ataque de las dos especies de nemátodos. Esta diferencia en la susceptibilidad sin duda alguna está relacionada al tiempo de pupación que requiere cada edad larval, pues las larvas jóvenes requieren de mayor tiempo para pupar, por lo que están más tiempo expuestas a la acción de estos organismos. En cambio las larvas maduras tienen menor tiempo para transformarse en pupa. Una vez que ha ocurrido el proceso de pupación, el pupario, a pesar de poseer espiráculos, actúa como una barrera que impide la penetración de los nemátodos. Entonces, si éstos no logran penetrar al hemocele antes de que la larva puepe, después no podrán hacerlo, pues generalmente utilizan las entradas naturales de los insectos como lo reportan Woodring y Kaya (1988). El mayor parasitismo en larvas de las dos edades se registró en recipientes de 2 cm de profundidad, lo cual se debió a están más expuestas a la acción de los nemátodos, propiciando el encuentro parásito-hospedero. La especie *Heterorhabditis indica* (Poinar) ocasionó un parasitismo más uniforme en las tres diferentes profundidades, en cambio el

nemátodo *Steinernema feltiae* (Filipjev), a medida que las larvas se localizaron en recipientes más profundos, el parasitismo fue menor. Esta última especie tiene un desplazamiento predominantemente horizontal, por lo que normalmente su presencia es más frecuente sobre la superficie. En cambio, en *H. indica* su desplazamiento es preferentemente de manera vertical, por lo que penetran más profundo en el sustrato. De las tres especies de moscas de la fruta, con la mosca de las sapotáceas, *A. serpentina* se requirió mayor cantidad de nemátodos para alcanzar la CL₅₀, tanto en larvas jóvenes como en larvas maduras.

A pesar de que las larvas jóvenes fueron más susceptibles al ataque de los dos especies de nemátodos, hubo variabilidad en el grado de parasitismo. Algunos autores afirman que dicha variabilidad se debe, en muchos casos, a la diversidad de cepas evaluadas, como se observó con los diferentes niveles de parasitismo en larvas de *Anastrepha suspensa* (Loew), utilizando diferentes especies y cepas de nemátodos (Beavers y Calkins, 1984). Pero también la edad del hospedero es importante, pues se ha demostrado que puede haber diferencia en la susceptibilidad (Lindgren y Vail, 1986), y usualmente el estado más joven es el más susceptible. Es difícil que en condiciones naturales las larvas jóvenes emerjan del fruto hospedero para pupar, pero los resultados de este estudio indican que si se presenta este caso, las dos especies de nemátodos son capaces de parasitarlas. Con esto, también se comprobó la eficiencia y la variabilidad que presentan al atacar a hospederos menos susceptibles como sucede con las larvas maduras.

Los resultados obtenidos confirmaron la eficiencia de *S. feltiae* hacia larvas maduras de *Anastrepha ludens* (Loew). Aunque hubo un ligero incremento en el parasitismo cuando se colocaron las larvas antes que los nemátodos, la diferencia no fue significativa ($P > 0.05$). En estudios previos a esta investigación, se había demostrado la susceptibilidad de larvas de 5 días de edad de *A. suspensa* a tres cepas de *S. feltiae* (Mexicana, All y Breton), con mortalidades de 90.7, 88.1 y 83.0% cuando inocularon con 1,000 estados infectivos por caja de Petri (Beavers y Calkins, 1984), pero la efectividad del nemátodo pudo haber sido sobreestimada debido a que utilizaron larvas sin sustratos y jóvenes que son más susceptibles

que las larvas de mayor edad, como se demostró en esta investigación cuando la profundidad del hospedero fue mínima.

La emergencia de adultos de *Ceratitis capitata* (Wied.) se redujo en 52.0, 71.1 y 96.5% para el primero, segundo y tercer año respectivamente, cuando inocularon con una concentración de 500 nemátodos/cm² de suelo y colocaron larvas maduras en condiciones de campo (Lindegren *et al.*, 1990). Sin embargo, dicha concentración es demasiado alta comparada con la que se determinó en nuestro trabajo, lo cual refleja un ahorro, si se utiliza al nemátodo *S. feltiae* para suprimir poblaciones de dicha plaga.

Las variaciones en el grado de parasitismo que se han observado en varios estudios responden, más que todo, a la diversidad de cepas evaluadas como ocurrió con las diferentes especies y cepas de nemátodos probadas contra larvas de *A. suspensa* (Beavers y Calkins, 1984). Esta variabilidad en la mortalidad se ha manifestado en otras especies de dípteros, así tenemos que cuando se evaluó el nemátodo *S. feltiae* contra larvas de *Musca domestica* L., se determinó una CL₅₀ de 5 y 38 nemátodos/cm² de estiércol de bovinos, para las cepas SN y UNK 36, respectivamente (Taylor *et al.*, 1998). Pero también puede haber diferencia en la susceptibilidad de los diversos hospederos evaluados (Lindegren y Vail, 1986).

Por los resultados aquí observados, se puede afirmar que los nemátodos no tienen la capacidad de atravesar el pupario, éste actúa como una barrera, debido a que no posee aberturas naturales (al menos, disponibles) que les permita la entrada al hemocele. En cambio, en pupas de lepidópteros se reportaron niveles de parasitismo que fluctúan entre el 24 y 63% (Kaya y Hara, 1981), por lo que se puede concluir que las pupas de dípteros ciclorrafos son menos susceptibles. Sin embargo, se han reportado altos niveles de parasitismo por diferentes especies de nemátodos, incluyendo a *S. feltiae* que parasitó el 47.5% de larvas y el 33.7% de pupas de *A. ludens*, cuando inocularon con 4,000 nemátodos por recipiente con 300 g de suelo, pero estos resultados hay que considerarlos con reserva debido a que ellos expusieron larvas, y estimaron el parasitismo en larvas y pupas (Lezama-Gutiérrez *et al.*, 1996).

Por otro lado, se observó que los adultos de *A. ludens* fueron parasitados cuando emergieron y salieron a través del suelo tratado con nemátodos, pero el porcentaje de parasitismo que se observó fue bajo, comparado con el que se registró en larvas maduras, aunque fue mayor al parasitismo que se observó en pupas. Con esto se corroboró que *S. feltiae* tiene potencial de parasitar los adultos de dichas plagas como previamente se había reportado para *A. suspensa* (Beavers y Calkins, 1984), aunque también se había reportado de que es incapaz de parasitar a adultos de *C. capitata* (Lindegren y Vail, 1986). En cambio, en adultos de *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) se han reportado excelentes niveles de parasitismo por dicha especie de nemátodo (Kaya y Grieve, 1982), lo que nos indica que los adultos del orden Lepidoptera son más susceptibles al ataque de los nemátodos que los de Diptera.

Las dos especies de nemátodos probadas en este estudio tienen potencial para utilizarse en el control biológico de larvas de moscas de la fruta en suelo de textura arenosa con 10% de humedad. La mortalidad larval aumentó considerablemente cuando el hospedero se localizó en suelo de textura arenarcillosa con 15% de humedad. Los porcentajes de parasitismo fueron mayores en larvas jóvenes que en larvas maduras, lo cual es obvio debido a que tardan más tiempo en transformarse a pupa por lo que el tiempo de exposición a los nemátodos fue mayor.

Con la CL_{50} estimada en los bioensayos de laboratorio y aplicada en las unidades de parasitación en condiciones de campo, se registró un porcentaje de parasitismo ligeramente menor (41.9 y 24.9% de parasitismo para *S. feltiae* y *H. indica*, respectivamente) al que se esperaba. Esta reducción probablemente se debió al efecto de la temperatura del ambiente sobre las larvas, pues a medida que ésta aumenta, el período de pupación se acorta (Aluja, 1984), y en condiciones de campo la temperatura fue más alta a la que prevaleció en el laboratorio, por lo que el tiempo de disponibilidad como larvas a los nemátodos fue menor, y como ya se mencionó anteriormente, los nemátodos no son eficientes para parasitar las pupas. En condiciones de campo, fue más eficiente el nemátodo

S. feltiae que *H. indica*, lo cual se confirmó cuando se aplicó la CL₅₀ de *S. feltiae* + la CL₅₀ de la β-exotoxina y la CL₅₀ de *S. feltiae* + CL₅₀ de *H. indica*.

Las larvas de las moscas de la fruta que se localizaron en un sustrato menos profundo fueron parasitadas fácilmente por los nemátodos, principalmente por *S. feltiae* que tienen un hábito de desplazamiento preferentemente horizontal (Woodring y Kaya, 1988). Es decir, que en la naturaleza se les localiza más sobre la superficie del suelo y a medida que las larvas se localizaron en recipiente con mayor profundidad, escaparon al ataque de los nemátodos.

El nemátodo *H. indica* ocasionó un parasitismo más homogéneo en las tres profundidades. Esta respuesta tal vez se debió a que cuando se aplicaron los nemátodos sobre las unidades de parasitación, no todas las larvas se habían introducido hasta el fondo del sustrato, y aquellas que lo hicieron fueron alcanzadas o localizadas debido a que esta especie tiene un eficiente desplazamiento en forma vertical, por lo que se mueve más hacia dentro del sustrato. Como ya se mencionó anteriormente, una vez que las larvas han pupado es difícil que sean parasitadas por cualquiera de las dos especies de nemátodos. Por lo que resulta más fácil que los adultos recién emergidos sean parasitados cuando emergen y salen a través del suelo, siempre y cuando existan nemátodos en el estado biológico infectivo. Aunque es necesario determinar la densidad de nemátodos adecuada para alcanzar mejores niveles de parasitismo en esta fase del insecto.

Estos agentes de control biológico son semejantes a los parasitoides en el sentido de que los inmaduros se desarrollan a expensas de un solo hospedero, también son ecológicamente similares a los parasitoides y depredadores en el sentido de que el hospedero eventualmente muere; sin embargo difieren de éstos en al menos dos aspectos: 1) los nemátodos están mutualísticamente asociados con un patógeno bacterial que mata al insecto huésped, y 2) la patogenicidad de la bacteria tiene una gran influencia en la eficiencia del sistema nemátodo-bacteria (Ehler, 1990).

Debemos considerar que el control biológico de insectos plaga es ecología aplicada mediada por la interacción entre dos organismos. Para hacer uso de una manera más eficiente de esta interacción es necesario generar conocimiento que nos permita entenderla y aplicarla. Los resultados de esta investigación son de mucha relevancia debido a que permitieron disponer de más y mejores estrategias para el manejo de estas plagas, principalmente si tomamos en consideración que son alternativas que están basadas en los principios de la sustentabilidad y además tienen aceptación en los sistemas de producción de frutas orgánicas, principalmente en ecosistemas tropicales húmedos. Además, la facilidad de su cría y la diversidad ecológica que existe en los huertos, son características que fortalecen su elección como candidatos primarios en programas de este tipo. Se puede afirmar que se ha dado el paso para incursionar en la exploración y el uso de agentes microbianos en el control moscas de la fruta. Con esto se abrieron nuevos horizontes para continuar en la búsqueda, identificación, caracterización y evaluación de organismos entomopatógenos, pero sobretodo hay que evaluar la efectividad de éstos en condiciones de campo.

El gran interés actual por el uso de los nemátodos entomopatógenos está en función de la habilidad que tienen para parasitar y matar a sus hospederos, principalmente especies de insectos plagas. Además, no muestran evidencia de patogenicidad para los mamíferos, razón por la cual la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos los ha exentado de los requerimientos de Registro Gubernamental. A pesar de que los nemátodos son susceptibles a factores abióticos adversos, son tolerantes a la mayoría de los agroquímicos y pueden ser aplicados con equipos convencionales sin pérdida de su viabilidad, ventaja que no ofrece ningún otro agente de control biológico.

Se corroboró que la temperatura y la textura del suelo ejercen un papel fundamental en la capacidad parasítica de las dos nemátodos. Con los resultados de esta investigación se estableció un rango favorable de temperatura entre 20 y 30°C y una temperatura óptima de 26°C para alcanzar altos niveles de parasitismo con estos nemátodos en las dos edades larvales. Pero también debemos de

considerar que tanto la textura como la temperatura del suelo cambian en función de la profundidad, por lo que es necesario ajustar la densidad óptima de nemátodos a aplicar por superficie. Si consideramos que la temperatura que prevaleció en el suelo durante el experimento de campo (bajo la sombra de los árboles de mango) fue de 25 a 29°C, se puede decir que es un hábitat adecuado para que ahí sean utilizados. Es importante conocer este factor abiótico, principalmente si se ha determinado que los nemátodos tienen potencial como agentes reguladores de estas plagas, el cual lo expresarán al máximo siempre y cuando las condiciones ambientales, la textura del suelo y el estado infectivo de los nemátodos sean adecuadas, pues cuando éstos son adversos, disminuyen significativamente la capacidad parasítica de estos organismos.

Además, productos químicos como el Diazinón, utilizado en el control de moscas de la fruta, son ligeramente más persistentes y tienen un amplio rango de toxicidad para artrópodos habitantes del suelo. Aunque resultó altamente tóxico a las larvas de la mosca mexicana de la fruta, *A. ludens* y a su parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead), fue moderadamente tóxica a la lombriz de tierra y no afectó la emergencia de estratiómidos.

Pero debido a que afectó en gran medida la emergencia del parasitoide de las moscas, resulta contraproducente utilizarlo como una estrategia de control en un programa de manejo integrado, principalmente en donde también se haga uso del control biológico a base de liberaciones de dicho parasitoide. Por otro lado, si se llegaran a incrementar las concentraciones del insecticida a la que se utilizó en este estudio, el impacto ambiental y en la microfauna que prevalece en el suelo puede ser mayor. Si se aplican densidades más altas de los estados infectivos de las dos especies de nemátodos a las que se utilizaron en esta investigación, se podrían alcanzar niveles más altos de parasitismo en la plaga y el impacto sobre la microfauna del suelo y al ambiente sería menor. En conclusión, las dos especies de nemátodos se pueden utilizar como tácticas de control biológico de moscas de la fruta, sobre todo si consideramos que el nivel de parasitismo se puede mejorar al incrementar la densidad por superficie.

VI. CONCLUSIONES

De acuerdo a las observaciones realizadas en esta investigación se concluye que:

- 1.- La β -exotoxina de *Bacillus thuringiensis* resultó altamente tóxica a las larvas de tercer estadio de *Anastrepha ludens*, *A. obliqua* y *A. serpentina*.
- 2.- Los adultos que se obtuvieron de larvas expuestas a las diferentes concentraciones de β -exotoxina no sufrieron un efecto negativo en su aptitud reproductiva.
- 3.- A pesar de que las larvas presentaron la sintomatología característica propia de la β -exotoxina, no se observó algún efecto significativo en los cortes histológicos de larvas tratadas con dicha toxina.
- 4.- La δ -endotoxina de las diferentes cepas *B. thuringiensis* evaluadas contra adultos de moscas de la fruta, la que provocó mayor mortalidad fue la cepa LBIT 414.
- 5.- Las larvas jóvenes de *A. ludens* sufrieron mayor daño con la β -exotoxina cuando fueron expuestas a la CL_{50} determinada en larvas maduras de la misma especie de mosca de la fruta.
- 6.- Las larvas jóvenes (de 6 días de edad para *A. obliqua*, y de 7 días de edad para *A. ludens* y *A. serpentina*) fueron más susceptibles que las larvas maduras (de 8 días de edad para *A. obliqua*, y de 9 días de edad para *A. ludens* y *A. serpentina*) a los nemátodos *Steinernema feltiae* y *Heterorhabditis indica*.

7.- El porcentaje más alto de parasitismo se registró en unidades de parasitación de 2 cm de profundidad en suelo de textura arenosa con 10% de humedad.

8.- El nemátodo *H. indica* ocasionó un parasitismo más uniforme en las tres diferentes profundidades de las unidades de parasitación, bajo condiciones de laboratorio. En cambio, el nemátodo *S. feltiae*, a medida que el hospedero se localizó a mayor profundidad, el parasitismo fue menor.

9.- No hubo diferencia en el parasitismo del nemátodo *S. feltiae* cuando se aplicó antes o después que las larvas de tercer estadio de *A. ludens*, en recipientes que contenían suelo de textura areno-arcillosa con 15% de humedad.

10.- Los nemátodos no son capaces de parasitar pupas de moscas de la fruta, aunque sí pueden parasitar adultos cuando emergen y salen a través del suelo tratado con nemátodos.

11.- El insecticida Diazinón afectó más al parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* cuando está en desarrollo dentro de su hospedero, *A. ludens*, que los nemátodos entomopatógenos.

12.- No se registró algún efecto adverso sobre las larvas de Stratiomidae y la lombriz de tierra por la β -exotoxina ni por los nemátodos entomopatógenos.

13.- Los niveles de parasitismo que se registraron cuando se aplicaron tres veces las CL₅₀'s en condiciones de campo fueron buenos. Aunque cuando se aplicaron las CL₅₀'s de las dos especies de nemátodos por unidad experimental se observó una alta mortalidad larval.

14.- En el suelo con textura areno-arcillosa con 15% de humedad y temperatura de 26±1°C fue en donde se observó al mayor parasitismo de larvas tanto de 6

como de 8 días de edad de *A. obliqua* con el nemátodo *S. feltiae* y el menor parasitismo se observó en suelo de textura areno-limosa.

15.- Tanto la textura del suelo como la profundidad del hospedero influyen de manera conjunta en la capacidad parasítica del nemátodo *S. feltiae*.

16.- La edad del hospedero influyó más en la eficiencia parasítica del nemátodo *S. feltiae* que la temperatura del ambiente en que se localice.

17.- La temperatura óptima es de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ para obtener niveles de parasitismo $>60\%$ con el nemátodo *S. feltiae* en larvas de 6 y 8 días de edad de *A. obliqua* en suelos de textura areno-arcillosa con 15% de humedad.

18.- La capacidad parasítica del nemátodo *S. feltiae* se ve afectada con temperaturas mayores de 30°C y menores a 20°C en suelo de textura areno-arcillosa con 15% de humedad.

19.- Tanto la β -exotoxina de *B. thuringiensis* como los nemátodos *S. feltiae* y *H. indica* tienen potencial como agentes de control biológico de larvas de moscas de la fruta, principalmente en agroecosistemas tropicales con ambientes húmedos.

VII. REFERENCIAS CITADAS

- Abbott, W. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.*, 18: 265-267.
- Alberola, T. M., S. Aptosoglou, M. Arsenakis, Y. Bel, G. Delrio, D. J. Ellar, J. Ferré, F. Granero, D. M. Guttmann, S. Koliais, M. J. Martínez-Sebastián, R. Prota, S. Rubino, A. Satta, G. Scarpellini, A. Sivropoulou and E. Vasara. 1999. Insecticidal activity of strains of *Bacillus thuringiensis* on larvae and adults of *Bactrocera oleae* Gmelin (Diptera: Tephritidae). *J. Invertebr. Pathol.*, 74: 127-136.
- Aluja S., M. 1984. Manejo integrado de las moscas de la fruta (Diptera: Tephritidae). Dir. Gral. San. Veg., Sec. Agric. y Rec. Hidráulicos. México. 241 p.
- Aluja, M. 1994. Bionomics and management of *Anastrepha*. *Annu. Rev. Entomol.*, 39: 155-178.
- Aluja, M., H. Celedonio-Hurtado, P. Liedo, M. Cabrera, F. Castillo, J. Guillén and E. Rios. 1996. Seasonal population fluctuations and ecological implications for management of *Anastrepha* fruit flies (Diptera: Tephritidae) in commercial mango orchards in Southern Mexico. *J. Econ. Entomol.*, 89: 654-667.
- Angus, T. A. 1971. *Bacillus thuringiensis* as a microbial insecticide, pp. 463-497. *En:* M. Jacobson and D. G. Crosby (eds.). Naturally occurring insecticides. Marcel Dekker. New York.
- Bateman, M. A. 1972. The ecology of fruit flies. *Annu. Rev. Entomol.*, 17: 493-518.

- Beavers, J. B. and C. O. Calkins. 1984. Susceptibility of *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae) to Steinernematid and Heterorhabditid nematodes in laboratory studies. *Environ. Entomol.*, 13: 137-139.
- Bedding, R. A. and A. S. Molyneux. 1982. Penetration of insect cuticle by infective juveniles of *Heterorhabditis* spp. (Heterorhabditidae: Nematoda). *Nematologica*, 28: 354-359.
- Bel, Y., F. Granero, T. M. Alberola, M. J. Martínez-Sebastián and J. Ferré. 1997. Distribution, frequency and diversity of *Bacillus thuringiensis* in olive tree environments in Spain. *Syst. Appl. Microbiol.*, 20: 652-658.
- Benz, G. 1975. Action of *Bacillus thuringiensis* preparation against larch bud moth, *Zeiraphera diniana* (Gn.), enhanced by β -exotoxin and DDT. *Experientia*, 31: 1288-1290.
- Betchel, D. B. and L. A. Bulla. 1976. Electron microscope study of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.*, 127: 1472-1481.
- Boller, E. F. 1968. An artificial oviposition device for the european cherry fruit fly, *Rhagoletis cerasi*. *J. Econ. Entomol.*, 61: 850-852.
- Bond, R. P. M., C. B. C. Boyce and S. J. French. 1969. A purification and some properties of an insecticidal exotoxin from *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Biochem. J.*, 114: 477-488.
- Bond, R. P. M., C. B. C. Boyce, M. H. Rogoff and T. R. Shieh. 1971 The thermostable exotoxin of *Bacillus thuringiensis*, pp. 275-303. *En: H. D. Burges and N. W. Hussey (eds.). Microbial control of insect and mites.* Academic Press. London.

- Borbolla, I. S. 1984. Estudio preliminar del efecto de diferentes cepas de *Bacillus thuringiensis* Berliner sobre la viabilidad y fertilidad de adultos de la mosca mexicana de la fruta, *Anastrepha ludens* Loew. Tesis de Maestría en Ciencias. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey. México. 72 p.
- Burgerjon, A. 1972. Quelques effets physiologiques de la toxine thermostable de *Bacillus thuringiensis* sur le doryphore *Leptinotarsa decemlineata*. Entomol. Exp. Appl., 15: 112-127.
- Burgerjon, A. 1974. Effets physiologiques et mutagènes sur les insectes d'la toxine thermostable de *Bacillus thuringiensis* Berliner. Ann. Parasitol. (Paris), 48: 835-844.
- Burgerjon, A. and H. de Barjac. 1960. Nouvelles données sur le rôle de la toxine soluble thermostable produite par *Bacillus thuringiensis* Berliner. C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. Ser. D. Sci. Nat. (Paris), 251: 911-912.
- Burgerjon, A. and G. Biache. 1967. Divers effets spéciaux et symptômes teratologiques de la toxine thermostable de *B. thuringiensis* en fonction d'la age physiologique des insectes. Ann. Soc. Entomol. Fr., 3: 329-352.
- Brust, G. E. 1991. Augmentation of an endemic entomogenous nematode by agroecosystem manipulation for control of a soil pest. Agric. Ecosystems Environ., 36: 175-184.
- Campbell, D. P., D. E. Dieball and J. M. Brakett. 1987. Rapid HPLC assay for the β -exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. J. Agric. Food. Chem., 35: 156-158.
- Cantwell, G. E., A. M. Heimpel and M. J. Thompson. 1964. The production of an exotoxin by various crystal-forming bacteria related to *Bacillus*

thuringiensis var. *thuringiensis* Berliner. J. Insect Pathology., 6: 466-480.

Castillo, M. A., P. Moya, E. Hernández and E. Primo-Yúfera. 2000. Susceptibility of *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) to entomopathogenic fungi and their extracts. Biol. Control., 19: 274-282.

Capinera, J. L. and N. D. Epsky. 1992. Potential for biological control of soil insects in the Caribbean basin using entomopathogenic nematode. Fla. Entomol., 75: 525-532.

Celedonio-Hurtado, H., P. Liedo, J. Guillén, D. Berrigan and J. Carey. 1988. Demography of *Anastrepha ludens*, *A. obliqua* and *A. serpentina* (Diptera: Tephritidae) in Mexico. Fla. Entomol., 71: 111-120.

Celedonio-Hurtado, H., M. Aluja and P. Liedo. 1995. Adult population fluctuations of *Anastrepha* species (Diptera: Tephritidae) in tropical orchard habitats of Chiapas, Mexico. Environ. Entomol., 24: 861-869.

Cooksey, K. E. 1971. The protein crystal toxin of *Bacillus thuringiensis*: Biochemistry and mode action, pp. 247-274. *En*: H. D. Burges and N. W. Hussey (eds.), Microbial control of insects and mites. Academic Press. London.

David, J. and C. Vago. 1967. Influence des toxines de *Bacillus thuringiensis* sur divers caracteres physiologiques de *Drosophiles* adults. Entomophaga, 12: 153-159.

Díaz, F., J. Toledo, W. Enkerlin and J. Hernández. 1994. Cyromazine: Effects on three species of *Anastrepha*, pp. 333-337. *En*: B. A. McPherson and G. J. Steck, (eds.). Fruit flies pests: A World assessment of their biology and management. St. Lucie Press. Fl.

- Domínguez, M. L. 1990. Susceptibilidad de adultos de la mosca mexicana de la fruta (*Anastrepha ludens* Loew.), a endotoxinas de diferentes cepas de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) suministradas individualmente y en mezcla con la toxina thuringiensin. Tesis de Maestría en Ciencias. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey. México. 73 p.
- Domínguez, J. C., J. L. Zavala, P. Moreno, Y. Gómez y J. Leshner G. 1996. Producción masiva de la mosca mexicana de la fruta: Optimización de métodos de cría, p. 80. *En*: A. Malavasi and R. Sugayama (eds.). Proceedings, 2nd. Meeting of the working group on fruit flies of the Western Hemisphere. Nov. 3-8, 1996. Viña del Mar, Chile.
- Dulmage, H. T., J. A. Correa and A. J. Martínez. 1970. Coprecipitation with lactose as a means of recovering the spore-crystal complex of *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.*, 15: 15-20.
- Dulmage, H. T. 1981. Insecticidal activity of isolates of *Bacillus thuringiensis* and their potential for pest control, pp. 193-222. *En*: H. D. Burges (ed.). Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980. Academic Press. New York.
- Ehler, L. E. 1990. Some contemporary issues in biological control of insects and their relevance to the use of entomopathogenic nematodes, pp. 1-19. *En*: R. Gaugler and H. K. Kaya (eds.). Entomopathogenic nematodes in biological control. CRC Press. Boca Raton, Fl.
- Ehler, L. P., P. C. Endicot, M. B. Herlein and B. Alvarado R. 1984. Medfly eradication in California: Impact of malathion bait sprays on an endemic gall midge and its parasitoids. *Entomol. Exp. Appl.*, 36: 201-208.

- Enkerlin, D., L. García R. and F. López M. 1989. Mexico, Central and South America, pp. 83-90. *En: A. S. Robinson and G. Hooper (eds.). Fruit flies: Their biology, natural enemies and control. Vol. 3A. World Crop Pests. Elsevier, Amsterdam.*
- Epsky, N. D., D. E. Walter and J. L. Capinera. 1988. Potential role of nematophagous microarthropods as biotic mortality factors of entomogenous nematodes (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae). *J. Econ. Entomol.*, 81: 821-825.
- Faust, R. M. 1973. The *Bacillus thuringiensis* β -exotoxin: Current status. *Bul. Entomol. Soc. Amer.*, 19: 153-156.
- Federici, B. A. 1991. Microbial insecticides. *Pesticide Outlook*, 2: 22-28.
- Fietelson, J. S., J. Payne and L. Kim. 1992. *Bacillus thuringiensis*: Insects and beyond. *Biotechnology*, 1: 271-273.
- Freeman, R. and J. R. Carey. 1990. Interaction of host stimuli in the ovipositional response of the mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Environ. Entomol.*, 19: 1075-1080.
- Friedman, M. J. 1990. Commercial production and development, pp. 153-172. *En: R. Gaugler and H. Kaya (eds.). Entomopathogenic nematodes in biological control. CRC. Press, Boca Raton, Fl.*
- Gary, N. E. and E. C. Mussen. 1984. Impact of mediterranean fruit fly malathion bait spray on honey bees. *Environ. Entomol.*, 13: 711-717.
- Gaugler, R. 1981. Biological control potential of neoaplectanid nematodes. *J. Nematol.*, 13: 241-249.

- Gaugler, R. and G. M. Boush. 1979. Laboratory tests on ultraviolet and protectants of an entomogenous nematode. *Environ. Entomol.*, 8: 810-813.
- Gaugler, R., P. Grewal, H. K. Kaya and D. Smith-Fiola. 2000. Quality assessment of commercially produced entomopathogenic nematodes. *Biol. Control*, 17: 100-109.
- Gazit, Y., Y. Rössler and I. Glazer. 2000. Evaluation of entomopathogenic nematodes for the control of mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Biocontr. Sci. Technol.*, 10: 157-164.
- Geden C. J. and R. C. Axtell. 1988. Effect of temperature on nematode (*Steinernema feltiae* [Nematoda: Steinernematidae]) treatment of soil for control of lesser mealworm (Coleoptera: Tenebrionidae) in turkey houses. *J. Econ. Entomol.*, 81: 800-803.
- Georgis, R. and R. Gaugler. 1991. Predictability in biological control using entomopathogenic nematodes. *J. Econ. Entomol.*, 84: 713-720.
- Georgis, R. and G. O. Poinar, Jr. 1983. Effect of soil texture on the distribution and infectivity of *Neoaplectana glaseri* (Nematoda: Steinernematidae). *J. Nematol.*, 15: 308-311.
- Gill, S. S., E. A. Cowles and P. V. Pietrantonio. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu. Rev. Entomol.*, 37: 615-636.
- Gingrich, R. E. 1965. *Bacillus thuringiensis* as a feed additive to control dipterous pests of cattle. *J. Econ. Entomol.*, 58: 363-364.
- Gingrich, R. and J. Eschle. 1971. Susceptibility of immature horn flies to toxins of *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.*, 64: 1183-1187.

- Gingrich, R. E. 1987. Demonstration of *Bacillus thuringiensis* as a potential control agent for the adult mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wied.). J. Appl. Entomol., 104: 378-385.
- Glazer, Y. and A. Navon. 1990. Activity and persistence of entomoparasitic nematodes tested against *Heliothis armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol., 83: 1795-1800.
- Gray, P. A. and D. T. Johnson. 1983. Survival of the nematode *Steinernema feltiae* in relation to soil temperature, moisture and time. J. Ga. Entomol. Soc., 18: 454-460.
- Greany, P. D., R. E. Donald, W. J. Schroder, P. E. Shaw, M. Aluja and A. Malavasi. 1994. Use of gibberellic acid to reduce citrus fruit susceptibility to fruit flies, pp. 40-48. En: P. A. Hedin (ed.). Bioregulators for crop protection and pest control. ACS Symposium. Series No. 557.
- Guerrero G., N. K. 1995. Selección de cepas de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) tóxicas a *Musca domestica* y cuantificación de sus niveles de producción de beta-exotoxina. Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. México. 70 p.
- Gutiérrez S., J. 1995. Importancia de la familia Tephritidae en la fruticultura, pp. 1-5. En: Memorias del IX Curso Internacional sobre Moscas de la Fruta. Centro Internacional de Capacitación en Moscas de la Fruta. Metapa de Domínguez, Chiapas, México.
- Gutiérrez S., J., J. Reyes F., A. Villaseñor C., W. Enkerlin H. y A. Pérez R. 1992. Manual para el control integrado de moscas de la fruta (Manual para el productor). Dir. Gral. San. Veg., Sec. Agric. y Rec. Hidráulicos. México. 34 p.

- Haufler, M. and S. E. Kunz. 1985. Laboratory evaluation of an exotoxin from *Bacillus thuringiensis* Subsp. *morrisoni* to horn fly larvae (Diptera: Muscidae) and mice. J. Econ. Entomol., 78: 613-616.
- Hawkes, G. R. and M. C. Stiles. 1986. Differential perceptions between citizens & scientists regarding pesticide use, pp. 79-96. *En:* M. Mangel, J. R. Carey and R. E. Plant (eds.). Pest control: Operations and systems analysis in fruit fly management. Springer-Verlag. New York.
- Hernández-Ortiz, V. y M. Aluja. 1993. Listado de especies del género neotropical *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) con notas sobre su distribución y plantas hospederas. Folia Entomol. Mex., 88: 89-105.
- Hitchings, D. L. 1967. *Bacillus thuringiensis*: A reproduction inhibitor for Southern armyworm. J. Econ. Entomol., 60: 596-597.
- Hopkins, T. L. and K. J. Kramer. 1992. Insect cuticle sclerotization. Annu. Rev. Entomol., 37: 273-302.
- Howell, J. F., M. Cheikh, E. J. Harris, H. B. Salah, S. Allaya and P. Crnjanski. 1975. Mediterranean fruit fly: Control in Tunisia by strep treatment with a bait spray of technical malathion and protein hidrolizate. J. Econ. Entomol., 68: 247-249.
- Hower, A. and Hsi Cheng. 1968. Inhibite effect of *Bacillus thuringiensis* on the development of face fly in cow manure. J. Econ. Entomol., 61: 26-30.
- Hoy, M. A. and Y. L. Ouyang. 1987. Toxicity of the β -exotoxin oh *Bacillus thuringiensis* to *Tetranychus pacificus* and *Metaseilus occidentalis* (Acari: Tetranychidae and Phytoseiidae). J. Econ. Entomol., 80: 507-511.

- Ibarra, J. E. 1995. Bacterias entomopatógenas, pp. 90-98. *En: Memorias del VI Curso Nacional de Control Biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico y El Colegio de la Frontera Sur. Tapachula, Chiapas, México.*
- Ibarra, J. E. and B. A. Federeci. 1987. An alternative bioassay employing neonate larvae for determining the toxicity of suspended particles to mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 3: 187-192.
- Ignoffo, C. M. and I. Gard. 1970. Use of an agar-base diet and house fly larvae to assay β -exotoxin activity of *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.*, 63: 1987-1989.
- Ignoffo, C. M. and B. Gregory. 1972. Effects of *Bacillus thuringiensis* β -exotoxin on larval maturation, adult longevity, fecundity, and egg viability in several species of Lepidoptera. *Environ. Entomol.*, 1: 269-272.
- Jackson, J. J. 1985. Parasitism of the western corn rootworm with the nematode *Steinernema feltiae*. Ph. D. Thesis. University of Minnesota. Minneapolis. 87 p.
- Jansson, R. K., S. H. Lecrone and R. Gaugler. 1993. Field efficacy and persistence of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae) for control of sweetpotato weevil (Coleoptera: Apionidae) in Southern Florida. *J. Econ. Entomol.*, 86: 1055-1063.
- Karamanlidou, G., A. F. Lambropoulos, S. I. Koliais, T. Manousis, D. Ellar and C. Kastritis. 1991. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to laboratory populations of the olive fruit fly (*Dacus oleae*). *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 2277-2282.

- Kaya, H. K. 1977. Development of the DD-136 strain on *Neoplectana carpocapsae* at constant temperatures. *J. Nematol.*, 9: 436-349.
- Kaya, H. K. 1985. Entomopatogenous nematodes for insect control in IPM systems, pp. 283-302. *En*: M. A. Hoy and D. C. Herzog (eds.), *Biological control in agricultural IPM systems*. Academic Press. New York.
- Kaya, H. K. 1990. Soil ecology, pp. 93-115. *En*: R. Gaugler and H. K. Kaya (eds.). *Entomopathogenic nematodes in biological control*. CRC Press, Boca Raton, Fl.
- Kaya, H. K. and A. H. Hara. 1981. Susceptibility of various species of lepidopterous pupae to the entomogenous nematode *Neoplectana carpocapsae*. *J. Nematol.*, 13: 291-294.
- Kaya, H. K. and B. J. Grieve. 1982. The nematode *Neoplectana carpocapsae* and beet armyworm *Spodoptera exigua*: Infectivity of prepupa and pupae in soil and adults during emergence from soil. *J. Invertebr. Pathol.*, 39: 192-197.
- Kaya, H. K. and R. Gaugler. 1993. Entomopathogenic nematodes. *Annu. Rev. Entomol.*, 38: 181-206.
- Keller, B. and G. A. Langenbruch. 1993. Control of coleopteran pests by *Bacillus thuringiensis*, pp. 171-187. *En*: P. F. Entwistle, J. S. Cory, M. J. Bailey and S. Higgs (eds.). *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: Theory and practice. John Wiley. England.
- Krieg, A. 1981. The genus *Bacillus*: Insects pathogens. *En*: The prokaryotes. Ed. Springer-Verlag. New York. Vol. II.

- Krieg, N. R. and J. G. Holt. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. II Edit. Board, Williams and Wilkins. Baltimore, U. S. A. Pp. 35, 36, 812 y 964.
- Kung, S. P. and R. Gaugler. 1991. Effects of soil temperature, moisture, and relative humidity on entomopathogenic nematode persistence. *J. Inverteb. Pathol.*, 57: 242-249.
- Lambert, B. and M. Peferoen. 1992. Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*. *Bioscience*, 42: 112-121.
- Levinson, B. L.; K. J. Kasyan; S. S. Chiu; T. Currier and J. M. González, Jr. 1990. Identification of β -exotoxin production, plasmids encoding β -exotoxin, and a new exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by using high-performance liquid chromatography. *J. Bacteriol.*, 172: 3172-3179.
- Lezama-Gutiérrez, R., J. Molina O., O. L. Contreras-Ochoa, M. González-Ramírez, A. Trujillo-De La Luz y O. Rebolledo-Domínguez. 1996. Susceptibilidad de larvas de *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) a diversos nemátodos entomopatógenos (Steinernematidae y Heterorhabditidae). *Vedalia*, 3: 31-33.
- Lindgren, J. E. and P. V. Vail. 1986. Susceptibility of mediterranean fruit fly, melon fly and oriental fruit fly (Diptera: Tephritidae) to the entomogenous nematode *Steinernema feltiae* in laboratory tests. *Environ. Entomol.*, 15: 465-468.
- Lindgren, J. E., T.T. Wong and D. O. McInnis. 1990. Response of mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) to the entomogenous nematode *Steinernema feltiae* in field tests in Hawaii. *Environ. Entomol.*, 19: 383-386.

- López M., J. E. 1993. Selección y caracterización de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* tóxicas a la palomilla dorso de diamante *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados. I. P. N. Irapuato, Guanajuato, México. 130 p.
- Lûthy, P., J. Cordier and H. Fisher. 1982. *Bacillus thuringiensis* as a bacterial insecticide: Basic considerations and applications, pp. 35-74. *En*: E. Kurstak (ed.). Microbial and viral pesticides. Marcel Dekker, New York.
- Mankau, R. 1980. Biological control of nematode pests by natural enemies. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 18: 415-440.
- Marek, F., V. Matha and J. Weiser. 1989. Analysis of the genotoxic activity of *Bacillus thuringiensis* β -exotoxin by means of the *Drosophila* wing spot test. *J. Invertebr. Pathol.*, 53: 347-353.
- Martinez, A. J., D. C. Robacker and J. A. Garcia. 1997. Toxicity of an isolate of *Bacillus thuringiensis* subspecies *darmstadiensis* to adults of the mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae) in the laboratory. *J. Econ. Entomol.*, 90: 130-134.
- Moar, W. J., W. L. A. Osbrink and J. T. Trumble. 1986. Potentiation of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* with Thuringiensin on beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.*, 79: 1443-1446.
- Montgomery, D. C. 1991. Diseño y análisis de experimentos. Edit. Grupo Editorial Iberoamericana. México. 589 p.
- Montoya G., P. 1989. Susceptibilidad de adultos de la mosca mexicana de la fruta, *Anastrepha ludens* (Loew) a diferentes cepas de *Bacillus*

thuringiensis Berliner. Tesis de Maestría en Ciencias. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey. México. 87 p.

Montoya, P., P. Liedo, B. Benrey, J. Cancino, J. F. Barrera, J. Sivinski and M. Aluja. 2000. Biological control of *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae) in mango orchards through augmentative releases of *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae). *Biol. Control*, 18: 216-224.

Moreno E., M. P. 1996. Procedimientos para la cría masiva de *Anastrepha obliqua* (Macq.), pp. 301-305. *Err: Memorias del X Curso Internacional sobre Moscas de la Fruta*. Centro Internacional de Capacitación en Moscas de la Fruta. Metapa de Domínguez, Chiapas, México.

Moreno, D. S., A. J. Martínez and M. S. Riviello. 1994. Cyromazine effects on the reproduction of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) in the laboratory and in the field. *J. Econ. Entomol.*, 87: 202-211.

Morris, O. N. 1988. Comparative toxicity of delta endotoxin and Thuringiensin of *Bacillus thuringiensis* and mixture of the two for the bertha armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.*, 81: 135-141.

Moyle, P. L. and H. K. Kaya. 1981. Dispersal and infectivity of the entomogenous nematode, *Neoaplectana carpocapsae* Weiser (Rhabditida: Steinernematidae), in sand. *J. Nematol.*, 13: 295-300.

Mueller, M. D. and D. H. James. 1987. Interactions between a commercial preparation of *Bacillus thuringiensis* and β -exotoxin in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *J. Invertebr. Pathol.*, 50: 201-206.

Mullens, B. A., J. A. Meyer and T. L. Cyr. 1987. Infectivity of insect-parasitic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae) for

larvae of some manure-breeding flies (Diptera: Muscidae). *Environ. Entomol.*, 16: 769-773.

Navrozidis, E. I., E. Vasara, G. Karamanlidou, G. K. Salpiggidis and S. I. Koliais. 2000. Biological control of *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) using a Greek *Bacillus thuringiensis* isolate. *J. Econ. Entomol.*, 93: 1657-1661.

Noel, G. R. 1990. Evaluation of Thuringiensin for control of *Heterodera glycines* on soybean. *Sup. J. Nematol.*, 22: 763-766.

Norrbom, A. L. and K. C. Kim. 1988. A list of the reported host plants of the species of *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). U. S. Dept. Agric. APHIS-PPQ 81. 52. 114 p.

Norrbom, A. L., R. A. Zucchi and V. Hernández-Ortiz. 2000. Phylogeny of the genera *Anastrepha* and *Toxotripa* (Trypetinae: Toxotrypanini) based on morphology, pp. 299-342. *En: M. Aluja and A. L. Norrbom (eds.). Fruit flies (Tephritidae): Phylogeny and evolution of behavior.* CRC Press, Boca Raton, Fl.

Papaj, D. R. and M. Aluja. 1993. Temporal dynamics of host-marking in the tropical tephritid fly, *Anastrepha ludens*. *Physiol. Entomol.*, 18: 279-284.

Paxtián, J., J. Toledo, P. Liedo, A. Oropeza y R. González. 2001. Captura de *Anastrepha ludens* (Loew) (Diptera: Tephritidae) utilizando tres tipos de trampas y cuatro fuentes de atracción. *Folia Entomol. Mex.*, (En prensa).

- Penrose, R. 1993. The 1989/1990 mediterranean fruit fly eradication program in California, pp. 401-406. *En*: M. Aluja and P. Liedo, (eds.). Fruit flies: Biology and management. Springer-Verlag, New York.
- Pendlenton, R. 1969. Insecticides of cristal-forming bacteria. *Process Biochemistry*. Pp. 29-33.
- Peters, A. and R. U. Ehlers. 1994. Susceptibility of leatherjackets (*Tipula paludosa* and *T. oleracea*; Tipulidae: Nematocera) to the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae*. *J. Invertebr. Pathol.*, 63: 163-171.
- Pérez M., C., P. Liedo y J. Toledo. 1999. Efecto de la ciromacina sobre la morfología y desarrollo de los ovarios de *Anastrepha obliqua* (Macquart) (Diptera: Tephritidae). *Folia Entomol. Mex.*, 105: 25-36.
- Pinson R., E. P. 1998. Caracterización de parámetros de adaptación en un proceso de cría masiva en laboratorio de *Anastrepha serpentina* (Wied.). Tesis de Doctor en Ciencias. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey. México. 130 p.
- Poinar, G. O. 1990. Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae, pp. 23-61. *En*: R. Gaugler and H. K. Kaya (eds.). Entomopathogenic nematodes in biological control. CRC Press, Boca Raton, Fl.
- Poinar, G. O. Jr. and H. B. Jansson. 1986. Infection of *Neoaplectana* and *Heterorhabditis* (Rhabditidae: Nematoda) with the predatory fungi, *Monacrosporium ellipsosporum* and *Arthrobotrys oligospora* (Moniliales: Deuteromyces). *Rev. Nematol.*, 9: 241-244.

- Prado B., E. y J. Valdez C. 1985. Introducción a la elaboración de preparaciones histológicas. Colegio de Postgraduados. Chapingo, Edo. de México. 26 p.
- Purcell, M. F. and W. J. Schroeder. 1996. Effect of Silwet L-77 and Diazinon on three tephritid fruit flies (Diptera: Tephritidae) and associated endoparasitoids. *J. Econ. Entomol.*, 89: 1566-1570.
- Rabossi, G., G. L. Boccaccio, P. Wappner and L. A. Quesada-Allué. 1991. Morphogenesis and cuticular markers during the larval-pupal transformation of the medfly *Ceratitis capitata*. *Entomol. Exp. Appl.*, 60: 135-141.
- Reed, E. M. and P. B. Carne. 1967. The suitability of nematode (DD-136) for the control of some pasture insects. *J. Invertebr. Pathol.*, 9: 196-204.
- Reyes F., J., G. Santiago M. and P. Hernández M. 2000. The mexican fruit fly eradication programme, pp. 377-380. *En: K. H. Tan (ed.). Area-wide control of fruit flies and other insect pests. Sinaran Bros. I. A. E. A.*
- Robacker, D. C., A. J. Martínez, J. A. García, M. Díaz and C. Romero. 1996. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae). *J. Econ. Entomol.*, 80: 104-110.
- Robacker, D. C., J. A. García and A. J. Martínez. 2000. Lack of toxicity to adults of the to mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae) of β -exotoxin in *Bacillus thuringiensis* endotoxin preparations. *J. Econ. Entomol.*, 93: 1076-1079.
- Rull, G., J. A. 1997. Integración de la TIE con otros métodos de control, pp. 451-455. *En: Memorias del Curso Regional sobre Moscas de la Fruta y su Control en Áreas Grandes con Énfasis en la Técnica del Insecto*

Estéril. Centro Internacional de Capacitación en Moscas de la Fruta.
Metapa de Domínguez, Chiapas, México.

SAS Institute. 1992. SAS user's guide, version 6.04. SAS Institute, Cary, N. C.

[SAGAR] Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. 1996. Norma Oficial Mexicana. NOM-EM-029-FITO-1996, p. 30. *En:* Diario Oficial de la Federación. México. D. F.

[SARH] Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. 1991. Campaña de erradicación de las moscas de la fruta mediante el uso del control integrado de plagas para el saneamiento y mejoramiento de la producción frutícola de México. Resumen Ejecutivo, Documento de la Campaña. México, D. F.

[SARH] Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. 1995. Planta de producción de moscas de la fruta estériles y parasitoides. México, D. F. 54 p.

Scheepmaker, J. W. A., F. P. Geels, L. J. L.D. Van Griensven and P. H. Smits. 1998. Susceptibility of larvae of the mushroom fly *Megaselia halterata* to the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* in bioassays. *BioControl*, 43: 201-214.

Shiga, M. 1989. Current programme in Japan, pp. 365-374. *En:* A. S. Robinson and G. Hooper (eds.). *Fruit flies: Their biology, natural enemies and control*. Vol. 3B. *World Crop Pests*. Elsevier, Amsterdam.

Shapiro, D. I., E. C. Berry and L. C. Lewis. 1993. Interactions between nematodes and earthworms: Enhanced dispersal of *Steinernema carpocapsae*. *J. Nematol.*, 25: 189-192.

- Sebesta, K., J. Farkas, K. Horska and J. Vankova. 1981. Thuringiensin, the beta exotoxin of *Bacillus thuringiensis*, pp. 249-281. *En: H. D. Burges (ed.). Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980. Academic Press. New York.*
- Sebesta, K. and K. Horska. 1968. Inhibition of DNA-dependent RNA polymerase by the exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *gelechiae*. *Biochem. Biophys. Acta*, 169: 281-281.
- Sexton, S. B. and P. Williams. 1981. A natural occurrence of parasitism of *Graphognathus luecoloma* (Boheman) by the nematode *Heterorhabditis* sp. *J. Aust. Entomol. Soc.*, 20: 253-255.
- Solferini, V. N. 1990. Interações entre bactérias e *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). Tesis de Doutor em Ciências. Universidade de São Paulo. Brasil. 71 p.
- Schwarz, A. J., J. P. Liedo and J. P. Hendrichs. 1989. Current programme in México, pp. 375-386. *En: A. S. Robinson and G. Hooper (eds.). Fruit flies: Their biology, natural enemies and control. Vol. 3B. World Crop Pests. Elsevier, Amsterdam.*
- Steel, R. G. D. y J. H. Torrie. 1993. Bioestadística: Principios y procedimientos. 2a. ed. McGraw-Hill, México. 622 p.
- Stock, S. P. y N. B. Camino. 1996. Nemátodos entomopatógenos, 105-118. *En: R. E. Lecuona (ed.). Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. Buenos Aires, Argentina.*
- Tanigoshi, L. K., D. F. Mayer, J. M. Babcock and J. D. Lunden. 1990. Efficacy of the β -exotoxin of *Bacillus thuringiensis* to *Lygus hesperus* (Heteroptera:

Miridae): Laboratory and field responses. *J. Econ. Entomol.*, 83: 2200-2206.

Taylor, D. B., A. L. Szalanski, B. J. Adams and R. D. Peterson. 1998. Susceptibility of house fly (Diptera: Muscidae) larvae to entomopathogenic nematodes (Rhabditidae: Heterorhabditidae, Steinernematidae). *Environ. Entomol.*, 27: 1514-1519.

Toledo, J. 1993. Intensive gathering of potential fruit fly hosts to obtain biological material and as a cultural control method, pp. 381-385. *En: M. Aluja and P. Liedo (eds.). Fruit Fly: Biology and Management. Springer-Verlag. New York.*

Toledo A., J. 2000. El control microbiológico en moscas de la fruta, p. 249-254. *En: Memorias del XIII Curso Internacional sobre Moscas de la Fruta. Centro Internacional de Capacitación en Moscas de la Fruta. Metapa de Domínguez, Chiapas, México.*

Toledo, J., P. Liedo, A. Oropeza y R. González. 2001. Manejo ecológico de las moscas de la fruta en agroecosistemas tropicales, pp. 125-132. *En: J. Pohlen (ed.), La fruticultura orgánica en el Cauca, Colombia-Un manual para el campesinado. Shaker Verlag. Germany.*

Toledo, J., J. L. Gurgúa, P. Liedo, A. Oropeza y J. E. Ibarra. 2002. Parasitismo de larvas y pupas de la mosca mexicana de la fruta (*Anastrepha ludens* Loew) (Diptera: Tephritidae) por el nemátodo *Steinernema feltiae* (Filipjev) (Rhabditida: Steinernematidae). *Vedalia*, (En prensa).

Triggiani, O. and G. O. Poinar, Jr. 1976. Infection of adult Lepidoptera by *Neoaplectana carpocapsae* (Nematoda). *J. Invertebr. Pathol.*, 27: 413-414.

- Troestchler, R. G. 1984. Effects on nontarget arthropods of Malathion bait sprays used in California to eradicate the mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). Environ. Entomol., 12: 1816-1822.
- Trujillo de la L., A. 1995. Virulencia de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sor., como agente de control biológico de *Anastrepha ludens* (Loew.). Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad de Colima. México. 69 p.
- Vandenberg, J. D. and H. Shimanuki. 1986. Two commercial preparations of the β -exotoxin of *Bacillus thuringiensis* influence the mortality of caged adult honey bees, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). Environ. Entomol., 15: 166-169.
- Wasti, S. S., C. R. Mahadeo and J. D. Knell. 1973. Larvicidal activity of the β -exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner against two species of flies. Z. Angew. Entomol., 74: 157-160.
- White, I. M. and M. M. Elson-Harris. 1992. Fruit flies of economic significance: Their identification and bionomics. CAB International and The Australian Centre for International Agricultural Research. UK. 601 p.
- Wong, T. T. Y., M. M. Ramadan, D. O. McInnis, N. Mochizuki, J. I. Nishimoto and J. C. Herr. 1991. Aumentative releases of *Diachasmimorpha tryoni* (Hymenoptera: Braconidae) to suppress a mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) population in Kula, Maui, Hawaii. Biol. Control, 1: 2-7.
- Woodring, J. L. and H. K. Kaya. 1988. Steinernematid and Heterorhabdit nematodes: A handbook of techniques. Southern Cooperative Series Bulletin 331. Arkansas Agricultural Experiment Station, Fayetteville. 29 p.

- Wozniak, C. A., G. A. Smith, D. T. Kaplan, W. J. Schroeder and L. G. Campbell. 1993. Mortality and aberrant development of the sugarbeet root maggot root maggot (Diptera: Otitidae) after exposure to Steinernematid nematodes. *Biol. Control*, 3: 221-225.
- Yamvrias, C. and M. Anagnou. 1989. Preliminary tests on the sensitivity of the larvae of *Dacus oleae* to *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, pp. 345-348. *En*: R. Cavalloro (ed.). Fruit flies of economic importance, 87. Balkema, Rotterdam.
- Yendol, W. G. and M. E. Miller. 1967. Susceptibility of the face fly to commercial preparations of *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.*, 60: 860-864.