

**SUSCEPTIBILIDAD DE LARVAS DE ANASTREPHA OBLIQUA
MACQUART (DIPTERA: TEPHRITIDAE) A HETERORHABDITIS
BACTERIOPHORA (POINAR) (RHABDITIDA: HETERORHABDITIDAE)
EN CONDICIONES DE LABORATORIO**

JORGE TOLEDO^{1,2}, CONCEPCIÓN PÉREZ^{1,2}, PABLO LIEDO¹ & JORGE E. IBARRA³

¹ Departamento de Entomología Tropical. El Colegio de la Frontera Sur. Apartado Postal 36. Tapachula, Chiapas, 30700. México. jtoledo@tap-ecosur.edu.mx

² Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma de Chiapas, Huehuetán, Chiapas, 31,006. México

³ CINVESTAV-IPN, Irapuato, Guanajuato 36500. México

RESUMEN En el presente trabajo se describe el efecto de la temperatura, la textura del suelo y la profundidad del hospedero sobre la capacidad de infección del nemátodo *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar) en larvas de tercer estadio de *Anastrepha obliqua* Macquart, bajo condiciones de laboratorio. En el primer estudio, el mayor porcentaje de infección se registró en larvas de tercer estadio inicial y tardío en los recipientes con menor profundidad que contenían suelo de textura arenosa con 10% de humedad, mientras que las larvas de tercer estadio inicial fueron más susceptibles que las larvas de tercer estadio tardío en las tres profundidades. De las tres texturas de suelos evaluadas (arenosa, areno-arcillosa y arenolimososa), la mayor mortalidad larval de ambas edades ocurrió en suelo de textura areno-arcillosa con 15% de humedad. En cuanto a la temperatura, el mayor porcentaje de infección ocurrió en larvas que permanecieron en una temperatura de $24\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ y la mortalidad larval fue menor a una temperatura de $18\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ en suelo de textura areno-arcillosa con 15% de humedad. La infección causada por *H. bacteriophora* ocurrió durante 17 días en suelo de textura areno-arcillosa con 16% de humedad inicial, aunque después de 5 días de inoculados en el suelo, el nivel de mortalidad larval fue decreciendo a medida que la humedad fue disminuyendo. Para considerar a este entomopatógeno como posible agente de control biológico de *A. obliqua* es necesario realizar más estudios para profundizar en el conocimiento de su interacción con dicha plaga en condiciones de campo.

DESCRIPTORES: Mortalidad larval, control microbiano, *A. obliqua*, factores abióticos, *H. bacteriophora*.

ABSTRACT The present work describes the effect of temperature, soil texture and depth of the host on the infectivity of *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar) against third instar (early and late stadium) larvae of *Anastrepha obliqua* Macquart, under laboratory conditions. In the first study, the highest infectivity was registered both on early and late third instar larvae in the shallowest containers with sandy soil at 10% moisture. In the three container depths, early third instars were more susceptible than late third instars. Of the three soil textures evaluated (sandy, sand-loam, and sand-clay), the highest infectivity on both larval ages occurred in sand-clay soil at 15% moisture. As for the temperature, the highest infectivity was observed on larvae kept at $24\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ and the lowest infectivity at $18\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ in sand-clay soil at 15% moisture. Infectivity of *H. bacteriophora* was observed during 17 days in sand-clay soil at 16% moisture, although after 5 days of inoculation, larval mortality decreased as the soil moisture declined. In order to consider this nematode as a possible biological control agent for *A. obliqua*, more studies are required to increase the basic knowledge of its interaction with this pest under field conditions.

KEYWORDS: Larval mortality, microbial control, *A. obliqua*, abiotic factors, *H. bacteriophora*.

INTRODUCCIÓN

La mosca de la fruta de las Indias Occidentales, *Anastrepha obliqua* Macquart (Diptera: Tephritidae), representa para México y otros países de América tropical la principal limitante para la comercialización y movilización del mango (APHIS 1970; Aluja 1994). Su distribución es muy amplia, ya que comprende desde el sur de Estados Unidos hasta el sur de Brasil, en donde se localiza atacando frutos de importancia agrícola tales como mango (*Mangifera indica* L.), ciruela mexicana (*Spondias mombin* L.) y guayaba (*Psidium guajava* L.) (Norrbom & King 1988; Hernández-Ortiz & Aluja 1993; Aluja 1994). Las pérdidas directas en la producción de mango, ocasionada por dicha plaga, fluctúan entre 10 y 25% (Enkerlin et al. 1989; Aluja et al. 1996). Además, su presencia en los huertos es motivo de rigurosas restricciones cuarentenarias por parte de algunos países compradores de fruta como Estados Unidos, Australia y Japón, que regulan la movilización de fruta fresca, impidiendo su comercialización en los mercados internacionales (APHIS 1970). Es por eso que dicha especie de mosca de la fruta está considerada como una plaga de interés público (SARH 1991).

Una vez que actividades como el trapeo indican la presencia y abundancia de la plaga, que pone en riesgo la producción de fruta sana, se realizan diversas prácticas de control con un enfoque integral. Entre estas prácticas de control está incluido el uso de cebos con insecticidas para eliminar adultos (SARH 1991; Aluja et al. 1996). Adicionalmente, las aplicaciones al suelo de diazinon y otros insecticidas se han considerado como una táctica que puede contribuir al manejo integrado de otras especies de moscas de la fruta (Mohamad et al. 1979; Saul et al. 1983; Penrose 1993), y podrían ser adoptadas para aplicarse contra *A. obliqua* y otras especies del género *Anastrepha* de importancia económica. Sin embargo, tanto las aspersiones en follaje

como las aplicaciones dirigidas al suelo ponen en riesgo a los artrópodos en general, y principalmente los que son benéficos. Por eso, sigue siendo prioritaria la búsqueda de métodos alternativos que sean efectivos para el control de dicha plaga con menor impacto ambiental. Destaca entre esas alternativas el uso de microorganismos entomopatógenos, incluyendo a los nemátodos.

El nemátodo *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar) es un habitante natural del suelo, donde persiste debido a su capacidad de infectar una gran variedad de hospederos, constituidos principalmente por insectos propios de este hábitat. Su principal ruta de infección es a través de aberturas naturales como son los espiráculos (Triggiani & Poinar 1976), la boca y el ano (Woodring & Kaya 1988), aunque también puede penetrar por las partes suaves de las uniones intersegmentales.

Los nemátodos entomopatógenos están considerados como organismos reguladores de poblaciones de larvas de insectos plagas de los órdenes Lepidoptera, Coleoptera, Isoptera y en menor frecuencia de Diptera (Woodring & Kaya 1988). En los dípteros se ha comprobado su efectividad en larvas de la mosca doméstica, *Musca domestica* L. (Mullens et al. 1987); del mosquito patón, *Tipula paludosa* Miegen (Peters & Ehlers 1994); de la mosca de la remolacha, *Tetanops myopaeformis* von Röder (Wozniak et al. 1993); de la mosca del champiñón, *Megaselia halterata* Wood (Scheepmaker et al. 1998); y de varias especies de moscas de la fruta (Beavers & Calkins 1984; Lindegren & Vail 1986; Lindegren et al. 1990; Lezama-Gutiérrez et al. 1996; Patterson-Stark & Lacey 1999; Gazit et al. 2000; Toledo et al. 2001, 2005; Yee & Lacey 2003).

En los últimos años se ha hecho énfasis en la búsqueda y evaluación de microorganismos entomopatógenos con el propósito de seleccionar aquellos que podrían tener potencial para desarrollarlos como bioinsecticidas e incluirlos en los programas de manejo integrado de moscas de la fruta (Toledo 2002). Sin embar-

go, el conocimiento de estas interacciones aún es limitado, por lo que es necesario profundizar en su estudio. Esta investigación tuvo como objetivo evaluar el potencial del nemátodo entomopatógeno *H. bacteriophora* para infectar y matar larvas de tercer estadio inicial y tardío de *A. obliqua* (estado fisiológico en que abandonan el fruto hospedero para pupar), en suelos con diferentes texturas y temperaturas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico y condiciones ambientales. El material biológico en estado larvario se obtuvo del Laboratorio de Cría de la Planta Moscafrut (SAGARPA-IICA) de Metapa de Domínguez, Chiapas, México, para lo cual se utilizó una dieta larvaria artificial para su desarrollo, de acuerdo al proceso y condiciones ambientales descritas por Domínguez et al. (2000). El nemátodo *H. bacteriophora* fue colectado en Costa Rica, utilizando como “trampas” a larvas de la palomilla de la cera, *Galleria mellonella* L., en muestras de suelo colectadas en una región de clima cálido lluvioso (Castillo & Marbán-Mendoza 1996). La cría y reproducción se realizó en larvas de la palomilla de la cera, *G. mellonella* y la colecta de los estados infectivos se hizo con trampas White (Woodring & Kaya 1988). Después de la colecta, los juveniles infectivos (JI) fueron cuantificados (≈ 10 conteos por cosecha) y ajustada 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 & Kaya 1988). Estas suspensiones se utilizaron para preparar las concentraciones requeridas en los diferentes tratamientos de cada experimento. El tiempo de almacenamiento antes de su uso fue aproximadamente de cuatro semanas y la mortalidad que se observó durante ese tiempo fue mínima ($< 1.0\%$ de mortalidad). Las condiciones bajo

las cuales se llevaron a cabo las fases experimentales en el laboratorio fueron de $26 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 5\%$ HR y un fotoperíodo de 12 h de luz: obscuridad. A excepción del experimento en donde se evaluó la actividad del nemátodo a diferentes temperaturas.

Efecto de la edad larval y la profundidad del suelo. Este estudio tuvo como objetivo determinar la concentración letal media (CL_{50}) en cada edad larval bajo estudio (tercer estadio inicial y tardío) en base a la profundidad del suelo. Los bioensayos se realizaron en unidades de experimentación elaboradas con tubos de PVC de 5 cm de diámetro (19.63 cm^2 de superficie), utilizando-se tres profundidades (2, 5 y 8 cm), con una capacidad de 30, 70 y 120 g de arena, respectivamente. Como sustrato 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 *A. obliqua* de la edad que correspondiera, las cuales se introdujeron rápidamente en la arena (10 min). Se utilizaron larvas de dos edades: las que se consideraron larvas jóvenes (tercer estadio inicial) fueron de seis días y las que se consideraron como larvas maduras (tercer estadio tardío) fueron de ocho días. Las diferentes profundidades se probaron tanto en larvas jóvenes como en larvas maduras, con un mínimo de cinco repeticiones por edad y por profundidad de recipiente. Las concentraciones de nemátodos probadas en los bioensayos fueron de 0, 6, 13, 25, 51, 76, 102, 127, 178 y 204 JI/cm^2 (juveniles infectivos por cm^2 cuadrado de la superficie del recipiente), agregándose cada concentración en 1 ml de suspensión que se distribuyó con una pipeta uniformemente sobre la superficie de la arena de cada recipiente. Siete días después se tamizó (malla 18) la arena de cada unidad para separar las larvas y/o pupas y posteriormente se cuantificó la mortalidad debida al ataque e

infección de los JI del nemátodo, mediante observaciones hechas al microscopio estereoscópico.

Efecto del tipo de suelo sobre la actividad del nemátodo. Con el objeto de cuantificar la actividad del nemátodo en diferentes tipos de suelo, las concentraciones letales medias (CL_{50} 's) que se determinaron en el experimento anterior fueron evaluadas en tres diferentes texturas de suelo con 15% de humedad. Las categorías de los suelos en base a su textura fueron: suelo areno-arcilloso (arena, 74%; limo, 14%; arcilla, 12%; materia orgánica (MO), 2.0%, y pH 6.36); suelo areno-limoso (arena, 80%; limo, 14%; arcilla, 6%; MO, 11.4%, y pH 6.28); y suelo arenoso (arena, 96%; limo, 1%; arcilla, 3%; MO, 0.18%, y pH 6.63), utilizando los recipientes que previamente fueron descritos como unidades de experimentación. Se realizó un experimento independiente por cada edad larval, considerando la combinación de las tres profundidades (2, 5 y 8 cm) y las tres texturas de suelo (areno-arcillosa, limosa y arena), con un total de 9 tratamientos por edad larval. La unidad de ensayo también fue de 25 larvas de *A. obliqua*, tanto de tercer estadio inicial como tardío, las cuales fueron inoculadas con la concentración letal media correspondiente de JI, es decir, para las larvas de tercer estadio inicial fueron 470, 450 y 393 JI para recipientes de 2, 5 y 8 cm de profundidad, respectivamente. Para las larvas de tercer estadio tardío se inocularon 490, 725 y 960 JI para los recipientes de 2, 5 y 8 cm de profundidad, respectivamente. Por cada tratamiento se realizaron cinco repeticiones, y en total fueron 45 unidades experimentales, cuya distribución en la cámara bioclimática fue completamente al azar. Por cada textura de suelo, profundidad de los recipientes y edad larval se manejó como testigo el mismo número de recipientes al utilizado con suelo inoculado con JI. Siete días posteriores a la inoculación se tamizó (malla 18) el suelo de cada unidad experimental para

separar las larvas y/o pupas y después se cuantificó la mortalidad debida al ataque e infección de los JI del nemátodo, mediante observaciones realizadas al microscopio estereoscópico.

Efecto de la temperatura sobre la actividad del nemátodo. La densidad de juveniles infectivos que originalmente provocó el 50% de mortalidad (CL_{50}) en larvas de las dos edades en arena con 10% de humedad a $26\pm 1^\circ\text{C}$, fue evaluada en suelo de textura areno-arcillosa con 15% de humedad a tres diferentes temperaturas. Por cada edad larval se realizó un experimento, considerando la combinación de las tres profundidades (2, 5 y 8 cm) con tres temperaturas (18 ± 0.5 , 24 ± 0.5 y $30\pm 0.5^\circ\text{C}$), sumando un total de nueve tratamientos. Para mantener la temperatura constante en donde permanecieron las unidades de infección durante el experimento, se utilizó una cámara bioclimática de 81 x 73 x 177 cm (ancho, fondo y alto, respectivamente) (Lab-Line Instruments Inc., IL, USA). La unidad de ensayo también fue de 25 larvas de *A. obliqua*, tanto de tercer estadio inicial como tardío, las cuales fueron inoculadas con la concentración letal media de JI determinada en el primer experimento para cada edad larval y profundidad del contenedor. Por cada tratamiento se realizaron cinco repeticiones, y en total fueron 45 unidades experimentales, cuya distribución en la cámara bioclimática fueron completamente al azar. Por cada profundidad, temperatura, y edad larval se manejó como testigo el mismo número de recipientes al utilizado con suelo tratado con JI. Siete días posteriores a la inoculación fue tamizado el suelo de cada unidad experimental para separar las larvas y/o pupas y después se cuantificó la mortalidad larval de manera similar a los experimentos anteriores.

Persistencia del nemátodo en base a la humedad del suelo. La persistencia de la densidad de juveniles infectivos que original-

mente provocó el 50% de mortalidad (CL_{50}) en larvas de tercer estadio inicial (seis días de edad) en recipientes de 5 cm de profundidad de arena con 10% de humedad a $26\pm 1^\circ C$, fue evaluada en suelo de textura areno-arcillosa expuesto a pérdida de humedad continua. Inicialmente, 250 recipientes fueron preparados con suelo de textura areno-arcillosa con 15% de humedad y posteriormente se inocularon con la densidad de JI correspondiente. Luego se cubrieron con tapas de caja de Petri de 6 cm de diámetro y se acomodaron en el laboratorio a una temperatura de $26\pm 1^\circ C$. Diariamente se seleccionaron al azar cinco recipientes y en cada uno se colocaron 25 larvas de *A. obliqua* de tercer estadio inicial, por ser más susceptible; actividad que se realizó consecutivamente hasta que no se observó mortalidad larval. En el testigo se utilizó la misma cantidad de recipientes pero en este caso el suelo no fue inoculado con los JI. Diariamente se colocaron las larvas de la misma edad y en el mismo número de recipientes que fueron inoculados con los JI, actividad que se realizó hasta que no se observaron larvas infectadas en los recipientes tratados con JI. Simultáneamente al desarrollo del experimento, se fueron tomando al azar tres recipientes por día para extraer una muestra de 100 g de suelo para determinar la humedad del mismo. Siete días posteriores a la inoculación con larvas de cada grupo de unidades, el suelo fue tamizado para separar las larvas y/o pupas y posteriormente cuantificar la mortalidad de manera similar a los experimentos anteriores.

Análisis de datos. En el primer experimento, las larvas que estaban infectadas por los JI y no registraron emergencia de adultos fueron consideradas 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 1999), siguiendo los requisitos estadísticos

recomendados por Ibarra & Federici (1987). Los datos del segundo y tercer experimento fueron transformados a $\sqrt{x + 0.5}$, y posteriormente sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) (SAS Institute 1999). La separación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey ($P > 0.05$) (SAS Institute 1999). Para determinar la relación entre la mortalidad larval (variable dependiente) y la pérdida de la humedad del suelo (variable independiente), los datos de mortalidad del cuarto experimento fueron transformados a logaritmo natural y posteriormente sometidos a análisis de regresión utilizando un paquete estadístico (SAS Institute 1999).

RESULTADOS

Efecto de la edad larval y la profundidad del suelo. Al establecerse las relaciones entre las diversas concentraciones de JI del nemátodo y la mortalidad causada en las larvas de las dos edades, se observó una amplia variación, debido principalmente a la edad y a la profundidad de las unidades de evaluación. Primero, y como era de esperarse, las larvas de tercer estadio inicial (seis días de edad) mostraron mayor susceptibilidad que las larvas de tercer estadio tardío (ocho días de edad). Sin embargo, la mayor diferencia entre las CL_{50} 's se observó entre las profundidades de los recipientes utilizados (Cuadro 1). Solamente las CL_{50} 's estimadas en las larvas de estadio tardío mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre ellas. La CL_{50} estimada con las larvas de tercer estadio tardío en 2 cm de profundidad fue estadísticamente igual a las determinadas con larvas de tercer estadio inicial a 2 y 5 cm de profundidad, y contrario a lo esperado, la CL_{50} que se determinó a 8 cm de profundidad fue menor (Cuadro 1). Las larvas de tercer estadio tardío (ocho días de edad) tuvieron una respuesta similar, aunque se requirió de mayor cantidad de JI para alcanzar la CL_{50} en cada profundidad (Cuadro 1).

Cuadro 1. Susceptibilidad de larvas de dos edades de *A. obliqua* al nemátodo *H. bacteriophora* a tres profundidades en arena con 10% de humedad y una temperatura de 26±1°C.

Densidad larval y profundidad del contenedor ¹	N (repeticiones)	CL ₅₀ ± error est. (JI/cm ²) (Límites fiduciales 95%)	χ ²	CL ₉₅ (JI/cm ²)	Ecuación de la línea de regresión
<i>Larvas de tercer estadio inicial</i>					
0.16 (8 cm)	391 (3)	20 ± 1.1 (15 - 26)	5.67	512	Y = 3.47 + 1.17x
0.26 (5 cm)	420 (3)	23 ± 2.6 (18 - 27)	4.79	432	Y = 3.33 + 1.25x
0.64 (2 cm)	612 (4)	24 ± 2.8 (20 - 29)	4.96	334	Y = 2.98 + 1.45x
<i>Larvas de tercer estadio tardío</i>					
0.16 (8 cm)	472 (3)	49 ± 7.4 (38 - 69)	0.80	1294	Y = 3.05 + 1.15x
0.26 (5 cm)	474 (3)	37 ± 1.4 (30 - 45)	1.67	481	Y = 2.68 + 1.48x
0.64 (2 cm)	410 (3)	25 ± 4.2 (20 - 31)	5.02	298	Y = 2.85 + 1.53x

¹ Densidad expresada como larvas/cm³ de suelo.

Cuadro 2. Mortalidad de larvas de tercer estadio inicial y tardío de *A. obliqua* por el nemátodo *H. bacteriophora* a tres profundidades en diferentes suelos con 15% de humedad y a 26±1°C. (N = 125 larvas / tratamiento).

Profundidad (cm)	Mortalidad de larvas (%±error est.) ¹	
	Tercer estadio inicial	Tercer estadio tardío
<i>Suelo areno-arcilloso</i>		
2	85.0 ± 5.0 a	77.8 ± 1.2 a
5	74.8 ± 5.1 ab	44.7 ± 7.7 b
8	65.0 ± 3.8 bc	39.4 ± 5.7 c
<i>Suelo areno-limoso</i>		
2	59.8 ± 4.2 c	59.6 ± 6.5 c
5	43.3 ± 6.8 d	23.4 ± 1.0 d
8	24.1 ± 2.3 e	16.0 ± 1.5 de
<i>Suelo arenoso</i>		
2	39.9 ± 2.8 d	21.0 ± 1.7 def
5	20.2 ± 2.6 e	13.7 ± 0.9 ef
8	17.2 ± 0.6 e	8.3 ± 0.2 f

¹ Los valores promedio (%±error est.) en cada columna seguidos por una misma letra no son diferentes significativamente (ANOVA, prueba de Tukey, P > 0.05).

Así se tiene que la CL_{50} estimada en los recipientes de 5 cm de profundidad se obtuvo con 50% más de JI que la CL_{50} estimada en los recipientes de 2 cm de profundidad. Asimismo, la CL_{50} en los recipientes de 8 cm de profundidad fue el doble al de los recipientes de 2 cm de profundidad. En las unidades experimentales que se manejaron los testigos no se observaron larvas infectadas por los nemátodos y la mortalidad natural fue muy baja (<1.6% en promedio).

Efecto del tipo de suelo sobre la actividad del nematodo. La mayor mortalidad larval de ambas edades se registró en los recipientes que contenían suelo de textura areno-arcillosa y la menor mortalidad se observó en los recipientes con suelo de textura arenosa, observándose una mortalidad intermedia en los recipientes con suelo de textura areno-limosa (Cuadro 2). Con respecto a la profundidad, la mayor mortalidad ocurrió en los recipientes de 2 cm, le siguieron los recipientes con 5 cm, y la menor mortalidad se observó en los recipientes con 8 cm de profundidad. Los porcentajes de mortalidad observados en larvas de tercer estadio inicial presentaron una diferencia estadísticamente significativa entre ellos ($F=10.1$; $gl=8, 36$; $P<0.001$). En la mortalidad de larvas de tercer estadio tardío también se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los valores promedios ($F=12.1$; $gl=8, 32$; $P<0.001$) (Cuadro 2).

Efecto de la temperatura sobre la actividad del nematodo. La mayor mortalidad larval de ambas edades se registró en los recipientes que se incubaron a $24\pm 0.5^{\circ}\text{C}$. La menor mortalidad causada por los JI del nematodo en larvas de tercer estadio inicial se observó en los recipientes que se incubaron a $18\pm 0.5^{\circ}\text{C}$, y en el caso de las larvas de tercer estadio tardío la menor mortalidad se observó en los recipientes que estuvieron a una temperatura de $30\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ (Cuadro 3). Similar a

los casos anteriores, la mayor mortalidad ocurrió en los recipientes de 2 cm, le siguieron los recipientes con 5 cm, y la menor mortalidad se observó en los recipientes con 8 cm de profundidad, a excepción de las larvas de tercer estadio tardío en donde fue menor la mortalidad a 5 cm que a 8 cm de profundidad. Los porcentajes de mortalidad observados en larvas de tercer estadio inicial presentaron una diferencia estadísticamente significativa entre ellos ($F=12.5$; $gl=8, 36$; $P<0.001$). Para el caso de la mortalidad en larvas de tercer estadio tardío, la diferencia que se observó entre ellos también fue estadísticamente significativa ($F=14.6$; $gl=8, 35$; $P<0.001$) (Cuadro 3).

Persistencia del nematodo en base a la humedad del suelo. En suelo areno-arcilloso con 15% de humedad y que correspondió al primer día de haberse aplicados los JI, se observó la mortalidad larval más alta (70.8%). Después de siete días de aplicados los JI, la humedad del suelo decreció a 13.9% y la mortalidad larval disminuyó a 29.9%. A los 17 días post aplicación la humedad del suelo fue 10.4% y la mortalidad larval observada fue de 5.0%. El análisis de regresión reveló una tendencia positiva significativa [$y=5.02+0.57x$] ($r^2=0.908$; $P<0.001$) (Fig. 1), indicando que la capacidad infectiva de los JI dependió más de la humedad del suelo que del tiempo después de haber sido aplicados.

DISCUSIÓN

En pruebas realizadas en condiciones de laboratorio, se demostró el potencial del nematodo *H. bacteriophora* para infectar y matar larvas de *A. obliqua*. Sin embargo, fue evidente que existió una diferencia importante en la susceptibilidad de las larvas de tercer estadio inicial (seis días de edad), comparadas con las de tercer estadio tardío (ocho días de edad). Las observaciones realizadas a los ocho días posteriores a la inoculación mostraron que

Cuadro 3. Mortalidad de larvas de tercer estadio inicial y tardío de *A. obliqua* por el nemátodo *H. bacteriophora* a tres profundidades y temperaturas en suelo areno-arcilloso con 15% de humedad. ($N = 125$ larvas / tratamiento).

Profundidad (cm)	Mortalidad de larvas (% \pm error est.) ¹	
	Tercer estadio inicial	Tercer estadio tardío
<i>Temperatura 18 \pm 0.5 °C</i>		
2	39.5 \pm 8.4 def	30.5 \pm 2.5 bc
5	30.9 \pm 4.7 ef	26.7 \pm 4.3 cd
8	28.6 \pm 4.6 f	24.4 \pm 2.4 cd
<i>Temperatura 24 \pm 0.5 °C</i>		
2	75.2 \pm 3.0 a	42.1 \pm 1.3 a
5	65.8 \pm 3.6 ab	40.9 \pm 6.7 a
8	60.5 \pm 3.3 bc	36.2 \pm 3.3 ab
<i>Temperatura 30 \pm 0.5 °C</i>		
2	50.1 \pm 5.1 cd	17.3 \pm 0.9 de
5	43.6 \pm 4.5 de	13.3 \pm 1.1 e
8	42.8 \pm 4.9 def	17.5 \pm 4.5 de

¹ Los valores promedio (% \pm error est.) en cada columna seguidos por una misma letra no son diferentes significativamente (ANOVA, prueba de Tukey, $P > 0.05$).

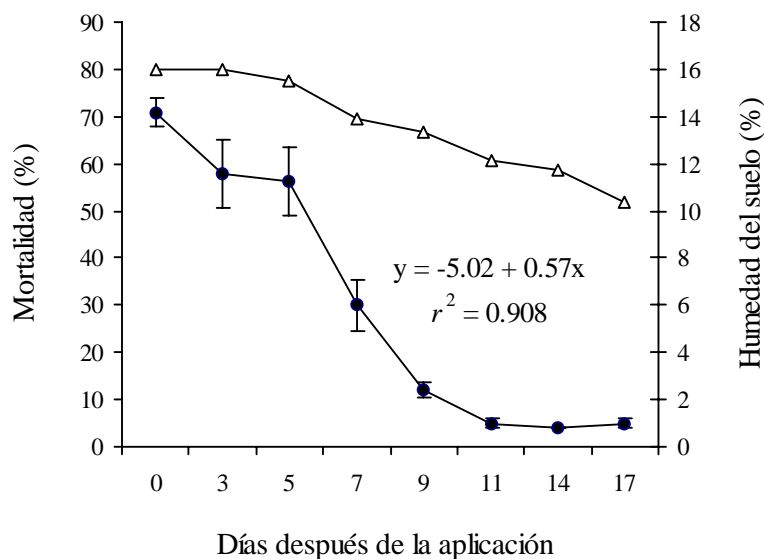


Fig. 1. Mortalidad (% \pm error est.) de larvas de *A. obliqua* por *H. bacteriophora* en base a los días postaplicación y al grado de humedad del suelo de textura areno-arcillosa. (● = Mortalidad larval; Δ = Humedad del suelo).

todas las larvas que murieron en dicha fase biológica así como las que lograron transformarse en pupas, después de haber sido atacadas y aniquiladas, estaban infectadas por los nemátodos.

La susceptibilidad de las larvas más jóvenes se debió muy probablemente a que transcurrió más tiempo para transformarse en pupas, por lo que estuvieron durante más tiempo expuestas a la acción de estos organismos. En cambio las larvas de mayor edad se transformaron en pupas en un lapso menor de tiempo y, una vez que ha ocurrido el proceso de pupación, a pesar de que el pupario posee espiráculos, este actúa como una barrera que impide la penetración de los nemátodos. Si los juveniles infectivos no penetran al interior del hospedero antes de que el hospedero puepe, después no pueden hacerlo ya que sólo penetran por aberturas naturales de las larvas (espiráculos, ano y boca) como previamente se ha reportado (Woodring & Kaya 1988).

La mayor mortalidad larval de ambas edades se registró en recipientes de 2 cm de profundidad, lo cual resultó obvio, pues estuvieron más expuestas a la acción de los JI en donde el encuentro patógeno-hospedero fue más propicio. Sin embargo, en recipientes de 8 cm de profundidad la CL₅₀ se obtuvo con menor densidad de JI probablemente porque las larvas fueron retenidas a menor profundidad para pupar y la concentración de nemátodos que se inoculó fue mayor que la aplicada en recipientes de 2 y 5 cm de profundidad. Hubo una marcada reducción en la mortalidad a medida que las larvas de tercer estadio tardío se localizaron a mayor profundidad, a pesar que los JI de *H. bacteriophora* tienen mayor capacidad de desplazamiento en forma vertical que los JI de *Steinernema feltiae* (Toledo et al. 2001). Es importante hacer notar que la profundidad está íntimamente relacionada al volumen del suelo donde se distribuyen los JI, por lo que el efecto de la profundidad también implicó el grado de "dilución" de los JI por unidad de volumen de suelo.

La textura del suelo juega un papel fundamental en el desempeño de los JI. En algunos casos, se ha reportado que los suelos con alto contenido de arcilla interfieren con el desplazamiento de los JI debido a que el tamaño del poro entre las partículas es menor que el diámetro del cuerpo de los nemátodos (Wallace 1961). La textura, la humedad y la compactación del suelo también influyen en el comportamiento de las plagas, como es el caso de varias especies de moscas de la fruta en donde la profundidad para pupar está relacionada con dichos factores (Eskafi & Fernández 1990; Aluja 1994; Jackson et al. 1998; Alyokhin et al. 2001), y este hecho limita fuertemente la capacidad infectiva de los JI (Portillo-Aguilar et al. 1999). Además, la textura está estrechamente asociada con el contenido de humedad, en el caso de suelo con textura arenosa la humedad adecuada es de 10%, y para suelos con textura areno-arcillosa debe ser del 15% (Toledo 2002; Toledo et al. 2005). Se observó que la mortalidad disminuyó cuando esa misma densidad de JI fue aplicada en recipientes con arena cuya humedad fue del 15%. Una tendencia similar fue reportada por Toledo et al. (2005) con la misma especie de nemátodo cuando fue evaluado contra larvas de *A. ludens*, en arena con diferentes porcentajes de humedad. Por el contrario, en suelo de textura areno-arcillosa con 15% de humedad, la mortalidad larval tendió a incrementarse. Este hecho indicó que para cada textura de suelo existe una humedad adecuada para que los nemátodos actúen con mayor eficiencia.

Por otro lado, la temperatura es un factor determinante para la movilización de los JI, y debido a que el huésped requiere de las condiciones óptimas que le permitan alcanzar su desarrollo, entonces depende que esté mayor o menor tiempo expuesto al ataque de dichos agentes bioreguladores. En nuestro trabajo se pudo observar que cuando la temperatura fue mayor o menor a los 24°C, la mortalidad larval por infección de los JI

disminuyó. Una posible explicación puede ser que a temperaturas altas se acelera el desarrollo larval y se transformen en pupas en menor tiempo, escapando de esta forma al ataque e infección de los JI; por otro lado, cuando la temperatura es baja el proceso de pupación no se acelera pero sí se ve afectada la movilidad los JI del nemátodo. Los resultados de nuestra investigación fueron similares en parte a los obtenidos por Kaya et al. (1993), quienes reportaron que la mortalidad en larvas del gorgojo negro de la vid, *Otiorynchus sulcatus* F. por el nemátodo *H. bacteriophora* se redujo a medida que la temperatura fue menor.

Las variaciones en los niveles de mortalidad observados en varios estudios, han obedecido en cierta forma a la diversidad de cepas de nemátodos evaluadas, como sucedió con las larvas de *A. suspensa* expuestas a diferentes especies y cepas de nemátodos (Beavers & Calkins 1984). En forma similar, en larvas de *M. domestica* se estimó una CL_{50} de 5 y 38 juveniles infectivos de *S. feltiae* /cm² de estiércol de bovinos para las cepas SN y UNK 36, respectivamente (Taylor et al. 1998). Sin embargo, la edad del hospedero también juega un papel importante, ya que se ha demostrado que hay una marcada diferencia en la infección inducida por los JI de los nemátodos (Lindegren & Vail 1986), y generalmente las larvas con menor edad han sido más susceptibles (Toledo et al. 2005). Si las condiciones ambientales son favorables, los JI de *H. bacteriophora* pueden permanecer activos durante seis días después de haber sido aplicados. Por ejemplo la actividad infectiva de los JI de *S. riobrave* decreció un 40% después de 10 días de haber sido aplicados en suelo areno-arcilloso (Gazit et al. 2000). Por el contrario, la efectividad de *S. feltiae* se redujo drásticamente (~50%) después de 6 h de aplicado en una mezcla de suelo (1 vermiculita: 1 arena: 1 limo) (Yee & Lacey 2003). Este hecho indica que se puede prolongar la vida activa de dichos organismos, pero es necesario realizar más estudios en condiciones de campo

para comprobarlo, tomando en consideración que las condiciones favorables para los nemátodos pueden incrementarse si se utiliza algún tipo de riego en los huertos o su aplicación coincida con un período de precipitación.

La susceptibilidad de las larvas de tercer estadio inicial dio una idea clara de la eficiencia de los nemátodos y la variabilidad que puede ocurrir en su capacidad infectiva para eliminar a los hospederos con menor susceptibilidad como son las larvas que están finalizando el tercer estadio, aunque obviamente los JI serán más efectivos para atacar y matar larvas de tercer estadio inicial. Sin embargo, quedó demostrado que los JI de *H. bacteriophora* tienen potencial como agentes de control biológico y amerita que se continúe estudiando su desempeño y eficiencia bajo las condiciones ambientales de las regiones agroecológicas en donde están establecidos los huertos de mango.

AGRADECIMIENTOS

A Patricia Stock (University of Arizona, USA), por la identificación de la especie de nemátodo. Se agradece el apoyo técnico de Azucena Oropeza y Gustavo Rodas (El Colegio de la Frontera Sur, ECOSUR). A Javier Valle (ECOSUR), por su asesoría con los análisis de datos. Al laboratorio del Programa Moscafrut (SAGARPA-IICA) por el material biológico proporcionado. El presente trabajo se llevó a cabo con el apoyo financiero del Sistema de Investigación Benito Juárez (SIBEJ), a través del proyecto A-024.

LITERATURA CITADA

- Abbott, W. S. 1925.** A method for computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.*, 18: 265-267.
- 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 & E. Ríos. 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.
- Alyokhin, A. V., C. Mille, R. H. Messing & J. J. Duan. 2001.** Selection of pupation habitats by oriental fruit fly larvae in the laboratory. *J. Insect Behav.*, 14: 57-67.
- [APHIS] Animal and Plant Health Inspection Service. 1970.** Foreign quarantine notices, pp. 217-260. U. S. D. A. Code of Federal Regulations. Title 7. Agriculture. Chapter III. Part 319. Washington, D. C.
- Beavers, J. B. & C. O. Calkins. 1984.** Susceptibility of *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae) to Steinernematid and Heterorhabditid nematodes in laboratory studies. *Environ. Entomol.*, 13: 137-139.
- Castillo, A. & N. Marbán-Mendoza. 1996.** Evaluación en laboratorio de nemátodos steinernemátidos y heterorhabdítidos para el control biológico de la broca del café, *Hypothenemus hampei* Ferr. *Nematropica*, 26: 100-109.
- Domínguez G., J. C., D. Castellanos H., E. Hernández-Ortiz & A. Martínez G. 2000.** Métodos de cría masiva de moscas de la fruta, pp. 399-414. *In: XIII Curso Internacional sobre Moscas de la Fruta.* Centro Internacional de Capacitación en Moscas de la Fruta. Metapa de Domínguez, Chiapas, México.
- Enkerlin, D., L. Garcia R. & F. Lopez M. 1989.** México, Central and South America, pp. 83-90. *In: A. S. Robinson & G. Hooper (eds.), Fruit flies: Their biology, natural enemies and control.* Vol. 3 A. World Crop Pests. Elsevier, Amsterdam.
- Eskafi, F. M. & A. Fernández. 1990.** Larval-pupal mortality of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) from interaction of soil, moisture, and temperature. *Environ. Entomol.*, 19: 1666-1670.
- Gazit, Y., Y. Rössler & I. Glazer. 2000.** Evaluation of entomopathogenic nematodes for the control of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Biocontr. Sci. Technol.*, 10: 157-164.
- Hernández-Ortiz, V. & 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.
- Ibarra, J. E. & B. A. Federici. 1987.** An alternative bioassay employing neonate larvae for determining the toxicity of suspended particles to mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 3: 187-192.
- Jackson, C. G., J. P. Long & L. M. Klungness. 1998.** Depth of pupation in four species of fruit flies (Diptera: Tephritidae) in sand with and without moisture. *J. Econ. Entomol.*, 91: 138-142.
- Kaya, H. K., T. M. Burlando & G. S. Thurston. 1993.** Two entomopathogenic nematode species with different search strategies for insect suppression. *Environ. Entomol.*, 22: 859-864.
- Lezama-Gutiérrez, R., J. Molina O., O. L. Contreras-Ochoa, M. González-Ramírez, A. Trujillo-de la Luz & 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. & 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 & 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.
- Mohamad, R., Y. Ibrahim & S. Saud. 1979.** Laboratory and field effectiveness of selected insecticides in preventing adult emergence of *Dacus dorsalis* Hendel (Diptera: Tephritidae). *Pertanika*, 2: 27-50.
- Mullens, B. A., J. A. Meyer & 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.
- Norrbom, A. L. & 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.
- Patterson-Stark, J. E. & L. A. Lacey. 1999.** Susceptibility of western cherry fruit fly (Diptera: Tephritidae) to five species of entomopathogenic nematodes in laboratory studies. *J. Invertebr. Pathol.*, 74: 206-208.
- Penrose, D. 1993.** The 1989/1990 Mediterranean fruit fly eradication program in California, pp. 441-406. *In: M. Aluja & P. Liedo (eds.). Fruit flies: Biology and management.* Springer-Verlag, N.Y.
- Peters, A. & 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.
- Portillo-Aguilar, C., M. G. Villani, M. J. Tauber, C. A. Tauber & J. P. Nyrop. 1999.** Entomopathogenic nematode (Rhabditida: Heterorhabditidae and Steinernematidae) response to soil texture and bulk density. *Environ. Entomol.*, 28: 1021-1035.
- SAS Institute. 1999.** SAS/STAT user's guide, version 8 ed. SAS Institute, Cary, N.C.
- Saul, S. H., D. Tsuda & T. T. Y. Wong. 1983.** Laboratory and field trials of soil applications of methoprene and other insecticides for control of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *J. Econ. Entomol.*, 76: 174-177.
- [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.
- Scheepmaker, J. W. A., F. P. Geels, L. J. L. D. Van Griensven & 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.
- Taylor, D. B., A. L. Szalanski, B. J. Adams & R. D. Peterson. 1998.** Susceptibility of house fly (Diptera: Muscidae) larvae to entomopathogenic nematodes (Rhabditidae: Heterorhabditidae, Steinernematidae). *Environ. Entomol.*, 27: 1514-1519.
- Toledo A., J. 2002.** Evaluación de algunos agentes entomopatogénos para el control microbiano de tres especies de moscas de la fruta (Diptera: Tephritidae) de importancia económica. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 124 p.
- Toledo, J., J. L. Gurgúa, P. Liedo, J. E. Ibarra & A. Oropeza. 2001.** 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*, 8: 27-36.
- Toledo, J., J. E. Ibarra, P. Liedo, A. Gómez, M. A. Rasgado & T. Williams. 2005.** Infection of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) larvae by *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) under laboratory and field conditions. *Biocontr. Sci. Technol.*, 15: 627-634.
- Triggiani, O. & G. O. Poinar, Jr. 1976.** Infection of adult Lepidoptera by *Neoapectana carpocapsae* (Nematoda). *J. Invertebr. Pathol.*, 27: 413-414.
- Wallace, H. R. 1961.** The bionomics of the freeliving stages of zooparasitic and phyt parasitic nematodes, a critical survey. *Helmintol. Abstracts*. 30: 1-22.
- Woodring, J. L. & H. K. Kaya. 1988.** Steinernematid and Heterorhabditid nematodes: A handbook of biology and techniques. Arkansas Agricultural Experiment Station. Southern Cooperative Series, Bulletin 331.
- Wozniak, C. A., G. A. Smith, D. T. Kaplan, W. J. Schroeder & L. G. Campbell. 1993.** Mortality and aberrant development of the sugarbeet root maggot (Diptera: Otitidae) after exposure to Steinernematid nematodes. *Biol. Contr.*, 3: 221-225.
- Yee, W. L. & L. A. Lacey. 2003.** Stage specific mortality of *Rhagoletis indifferens* (Diptera: Tephritidae) exposed to three species of *Steinernema* nematodes. *Biol. Contr.*, 27: 349-356.

Recibido: 31 de enero del 2005

Aceptado: 30 de septiembre del 2005