



El Colegio de la Frontera Sur

Capacidad de inseminación, competitividad sexual y
dispersión en campo de machos estériles de *Anastrepha*
ludens tratados con *Beauveria bassiana*

TESIS

Presentada como requisito parcial para optar al grado de
Doctora en Ciencias en Ecología y Desarrollo Sustentable

por

Luisa Fernanda Novelo Rincón

2009

INDICE

Resumen.....	1
1.- Introducción.....	3
1.1.- Objetivo general.....	5
1.2.- Objetivos específicos.....	5
2.- Antecedentes.....	6
2.1.- El hongo <i>Beauveria bassiana</i>	6
2.1.1.- Mecanismos de acción.....	6
2.1.2.- Métodos de aplicación.....	7
2.1.3.- Evaluación contra moscas de la fruta.....	8
2.2.- Técnica del Insecto Estéril.....	9
3.- Materiales y Métodos.....	13
3.1.- Material biológico y sitio experimental.....	13
3.2.- Competitividad sexual de machos estériles tratados con <i>B. bassiana</i>	15
3.3.- Duración de la cópula y patrón de almacén de esperma.....	16
3.4.- Dispersión y longevidad de machos estériles tratados con <i>B. bassiana</i> de <i>A. ludens</i> en condiciones de campo.....	17
3.4.1.- Area de estudio.....	18
3.4.2.- Experimento de liberación y recaptura.....	19
3.5.- Análisis de datos.....	21
4.- Resultados.....	23
4.1.- Competitividad sexual de machos estériles tratados con <i>B.</i> <i>bassiana</i>	23
4.2.- Duración de la copula y patrón de almacén de esperma.....	24
4.3.- Recapturas de machos estériles de <i>A. ludens</i> tratados con conidios.....	27
5.- Discusión.....	36
6.- Literatura Citada.....	44

CUADROS

1.- Cópulas obtenidas por machos de <i>Anastrepha ludens</i> correspondientes a los cuatro tratamientos en competencia.....	23
2.- Intervalos de confianza para la probabilidad de obtener copulas por machos de <i>A. ludens</i> silvestres y estériles tratados y no tratados con <i>Beauveria bassiana</i>	24
3.- Cópulas exitosas, duración de la copula y número promedio y porcentaje de espermatozoides por espermateca transferidos por machos de <i>A. ludens</i> de cuatro tratamientos sin competencia.	25
4. Número de machos recapturados (estériles no tratados y estériles tratados con <i>Beauveria bassiana</i>) para cada liberación en un huerto de mango en Tapachula, Chiapas.	28
5.- Longevidad de machos estériles de <i>Anastrepha ludens</i> no tratados y tratados con <i>Beauveria bassiana</i> durante cinco liberaciones.....	34

FIGURAS

1.- Localización del huerto de <i>Mangifera indica</i> var. ataulfo El Carmen.....	19
2.- Distribución de 68 trampas en el huerto de <i>Mangifera indica</i> var. ataulfo	20
3.- Relación entre duración de la cópula y número total de espermatozoides para los cuatro tratamientos.	26
4. Número de machos recapturados por día en un huerto de mango en Tapachula, Chiapas.....	28
5.- Número de machos estériles de <i>Anastrepha ludens</i> capturados por 68 trampas en un huerto de mango en Tapachula, Chiapas.....	30

6.- Dispersión de machos estériles de <i>Anastrepha ludens</i> liberados en el punto central en un huerto de mango en Tapachula, Chiapas.....	32
7.- Distancia máxima de dispersión de machos estériles de <i>Anastrepha ludens</i> en un huerto de mango en Tapachula, Chiapas.....	33
8.- Intervalos de confianza para la longevidad de machos estériles de <i>Anastrepha ludens</i> no tratados y tratados con <i>Beauveria bassiana</i> en un huerto de mango en Tapachula, Chiapas.	35

ANEXOS

Normas editoriales Journal of Applied Entomology.....	57
---	----

RESUMEN

La mosca Mexicana de la fruta, *Anastrepha ludens* (Loew), es una plaga que ocasiona severos daños a la fruticultura, por lo que existe una búsqueda constante de métodos óptimos para su control. Por lo tanto, se evaluó la competitividad sexual, duración de la cópula, transferencia de esperma, dispersión y longevidad de machos estériles de *A. ludens* tratados con conidios de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. para determinar su potencial como agentes autodiseminadores de conidios. No hubo diferencias significativas en la competitividad sexual entre machos tratados con conidios y no tratados. Esto indicó que la presencia de conidios no afectó de forma significativa su desempeño sexual. Sin embargo, ambos tipos de machos tuvieron menor competitividad que los machos silvestres (tratados y no tratados). La duración de la cópula y la cantidad de espermatozoides para los tratamientos con machos estériles no difirieron significativamente y presentaron una correlación positiva. Se presentaron diferencias significativas respecto a la cantidad de espermatozoides almacenados en las espermatecas, pero no hubo diferencias en la forma en que las hembras almacenaron el esperma. La dispersión y la longevidad en campo se evaluaron liberando machos en un punto central de un huerto de mango (*Mangifera indica* cv. Ataulfo). Hubo diferencias significativas entre tratamientos en cuanto al número de recapturas. Ambos tratamientos presentaron un patrón similar de dispersión, desplazándose en dirección sur-sureste, pero no presentaron diferencias significativas en la distancia máxima de dispersión y de la longevidad. Estos resultados

proporcionaron los elementos requeridos para apoyar el uso de machos estériles como autodiseminadores de conidios de *B. bassiana* en el manejo integrado de moscas de la fruta, representando un avance importante en la búsqueda de nuevas opciones para el manejo de dicha plaga, con menor impacto para el ambiente y organismos no blanco.

Palabras clave: Mosca Mexicana de la fruta, *Beauveria bassiana*, control microbiano, Técnica del Insecto estéril, insectos autodiseminadores.

1. INTRODUCCIÓN

Entre los insectos catalogados como plagas de frutales se encuentran las comúnmente conocidas como moscas de la fruta (Diptera: Tephritidae), por su estrecha relación alimenticia de sus estados larvarios con frutos de diversas especies de plantas cultivadas (Christenson y Foote 1960). En este grupo se ubica el género *Anastrepha*, constituido por aproximadamente 200 especies, las cuales tienen una distribución eminentemente neotropical (Norrbon et al. 2000).

Solamente siete especies en este género son de gran interés desde el punto de vista agrícola, debido a que ocasionan severas pérdidas a los sistemas frutícolas de muchos países (Hernández-Ortiz 1996, Norrbom et al. 2000). Las pérdidas directas en la producción frutícola fluctúan entre 10 y 25% (Enkerlin et al. 1989) y su presencia en los huertos es motivo de rigurosas restricciones cuarentenarias por parte de algunos países importadores de frutas como Estados Unidos, Australia y Japón (APHIS 1970). Es por ello que en México, las moscas de la fruta están consideradas como plagas de interés público (SARH 1991); y destacan por su importancia económica *A. ludens* (Loew), *A. obliqua* (Macquart), *A. serpentina* (Wiedemann), y *A. striata* Schiner (Hernández-Ortiz, 1992, Hernández-Ortiz y Aluja 1993). Particularmente, la mosca Mexicana de la fruta, *A. ludens*, es una plaga que afecta a numerosos frutales cultivados en México y Centroamérica (Norrbon y Kim 1988). Además, es una amenaza para la citricultura en Estados Unidos, en donde la presencia de una sola mosca puede poner en marcha la aplicación de medidas extensivas y costosas para erradicar o controlar las poblaciones (Robacker et al. 2003).

El método más común para controlar esta plaga ha sido la aplicación aérea de insecticidas o la colocación de trampas-cebo. Aunque éste método ha sido efectivo, es una constante amenaza para el medio ambiente (Moreno y Mangan 2005), por lo que la búsqueda de métodos de control ambientalmente amigables continúa siendo una prioridad.

Una propuesta que tiene potencial para el manejo de moscas de la fruta es el control con microorganismos entomopatógenos como el hongo *Beauveria bassiana*. Estudios recientes indicaron que la combinación de este hongo con la Técnica del Insecto Estéril puede tener un efecto sinérgico al introducir un elemento más de mortalidad mediante la liberación de insectos estériles como autodiseminadores de conidios, lo que conducirá a un mejor control de dicha plaga (Toledo et al. 2007). Para esto, los machos liberados deben ser capaces de propagar los conidios y cumplir con los requerimientos de la TIE, por lo tanto, para el desarrollo de esta investigación se estableció lo siguiente:

1.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el desempeño de los machos estériles de la mosca Mexicana de la fruta, *A.* tratados con conidios de *B. bassiana* como autodiseminadores y su distribución en condiciones de campo.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar la competitividad sexual de machos estériles tratados con conidios de *B. bassiana*.

Determinar la capacidad de inseminación y duración de la copula de machos estériles utilizados como autodiseminadores de conidios de *B. bassiana*.

Determinar el rango de dispersión, la longevidad y la sobrevivencia en campo de machos estériles liberados para la autodiseminación de conidios de *B. bassiana*.

2. ANTECEDENTES

2.1. El hongo *Beauveria bassiana*

Dentro de los métodos probados para el control de moscas de la fruta, se han considerado el uso de varias cepas del hongo entomopatógeno *B. bassiana* (Bals.) Vuillemin (Samson y Evans 1982). Este hongo pertenece a la clase Deuteromycetes, orden Moniliales, Familia Moniliaceae. Habita de manera natural en el suelo, rastrojos de cultivos, estiércol, logrando un buen desarrollo en lugares frescos, húmedos y con poco sol; y forma parte del grupo de mayor importancia en el control biológico de insectos plaga (Monzón, 2001). Los insectos muertos por este hongo presentan una cubierta blanca algodonosa sobre el cuerpo, la cual está formada por el micelio y esporas del hongo.

2.1.1.- Mecanismos de acción

Sus principales rutas de infección son a través de la cutícula, vía oral, tráqueas y heridas, introduciendo directamente en el cuerpo el tubo germinativo, actividad mecánico-enzimática que se realiza en los primeros dos días de haber hecho contacto el conidio con el hospedero. Durante este proceso, la quitina es disuelta en forma total o parcial por la acción de varias enzimas del hongo (Madelin 1963). *B. bassiana* puede producir toxinas en el hemocele que provocan la muerte o anormalidades en la fisiología del hospedero infectado. Cuando la humedad ambiental disminuye los conidios del hongo pueden permanecer en latencia dentro del cuerpo de su hospedero

por largos períodos, y bajo condiciones óptimas de temperatura y humedad, éstas germinan y salen al exterior para llevar a cabo la producción de conidios (De la Rosa 1995).

La muerte del hospedero atacado ocurre en un tiempo promedio de tres días después de la infección. Las hifas del hongo atraviesan la cutícula ocurriendo la formación de conidióforos o esporóforos que dan origen a los conidios asexuales o conidios, que funcionan como unidades de dispersión e infección. Cada insecto infectado constituye un nuevo foco de infección para otros individuos sanos de la población de la plaga (Alatorre 2000).

2.1.2.- Métodos de aplicación

Se han evaluado cepas de *B. bassiana* de diversas regiones para determinar la cantidad y la concentración óptima a aplicar, así como las fases biológicas más susceptibles del insecto a la infección. Debido a la baja ocurrencia de la infección en poblaciones plaga en condiciones de campo, también es importante encontrar el método más efectivo para lograr que los conidios y los insectos entren en contacto. En condiciones de laboratorio, el método de evaluación más frecuente ha sido por inmersión de alguna fase biológica del insecto en solución de conidios (De la Rosa et al. 2002). También se ha utilizado la aplicación tópica mediante la introducción del insecto en tubos de ensayo que contienen conidios secos o por ingestión combinándolos con proteína hidrolizada como alimento (Toledo et al. 2003), y Al-mazra'awi et al. (2006), reportaron el uso de *Bombus impatiens* (Cresson) (Apidae) como vectores de conidios de *B. bassiana* para el control de *Lygus lineolaris* (Palisot de Beauvois) (Hemiptera:

Miridae) y *Frankiniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) en chile dulce (*Capsicum annuum* L.) en condiciones de invernadero.

Las especies plaga que han demostrado ser susceptibles a la infección por conidios de *B. bassiana* han sido la mosca doméstica, *Musca domestica* L. (Barson et al. 1994, Watson et al. 1995, 1996), la mosca tse tse *Glossina* spp. (Kaaya y Munyinyi 1995, Maniania y Odulaja 1998), y la broca del café, *Hypothenemus hampei* Ferrari (De la Rosa et al. 2000).

2.1.3.- Evaluación contra moscas de la fruta

También se ha demostrado que algunas cepas de *B. bassiana* pueden causar altos niveles de infección en moscas de la fruta, como la mosca del Mediterráneo, *Ceratitis capitata* (Wiedemann), otras especies de *Ceratitis* (Ekesi et al. 2002, Dimbi et al. 2003, Konstantopoulou y Mazomenos 2005), en la mosca del olivo, *Bactrocera oleae* (Gmelin), y la mosca Mexicana de la fruta, *A. ludens* (Castillo et al. 2000, De la Rosa et al. 2002).

Asimismo, se reportó que los machos de *A. ludens* tratados con conidios de *B. bassiana* fueron capaces de transmitir la infección hacia las hembras durante el cortejo y la cópula (Toledo et al. 2007). Este hecho indicó la posibilidad de combinar la Técnica del Insecto Estéril (TIE) con conidios del hongo, utilizando a los machos estériles de *A. ludens* como autodiseminadores, lo que permitirá introducir al hongo en la población silvestre como un nuevo factor de mortalidad. Por lo tanto, los machos que serán utilizados como autodiseminadores de conidios deberán cumplir con los parámetros de

calidad que poseen los machos liberados cuando se aplica la Técnica del Insecto Estéril.

2.2. Técnica del Insecto Estéril (TIE)

De acuerdo con Klassen (2005), la TIE es una estrategia de manejo de plagas inversamente denso-dependiente en la cual se requiere de la liberación de grandes cantidades de insectos estériles en campo para alcanzar una relación estéril:silvestre favorable. El objetivo es inducir altos niveles de esterilidad en la población silvestre, lo que resulta en una disminución eventual de la abundancia de la plaga. Esta estrategia ha sido aplicada exitosamente contra varias plagas como el gusano barrenador del ganado, *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel), diferentes especies de moscas de la fruta como *B. cucurbitae* (Coquillett) y *B. tryoni* (Froggatt), y *Ceratitis capitata* (Wiedemann), y varias especies de la mosca tsetse (*Glossina austenis*, *G. morsitans submorsitans* Newstead) (Klassen y Curtis 2005). El éxito de este método de control es altamente dependiente del desempeño sexual de los machos estériles liberados, ya que la disminución de la población usando la TIE está en función de los apareamientos alcanzados entre machos estériles y hembras silvestres, por lo que los machos deben ser competitivos sexualmente (McInnis et al. 1994). La competitividad sexual de los machos estériles depende de la propensión al apareamiento y de la compatibilidad para el apareamiento. La propensión al apareamiento es la tendencia para localizar pareja, copular e inseminarla y es el principal componente de la calidad del insecto estéril liberado (Calkins y Parker 2005). La compatibilidad para el apareamiento es una medida relativa que indica la capacidad de dos poblaciones de insectos para reproducirse entre sí, y en la TIE esto se refiere a poblaciones de insectos estériles y silvestres. Hendrichs

et al. 2002, señalan que aunque los machos estériles forman leks, compiten, se aparean, transfieren esperma e inducen el periodo refractorio en hembras (periodo que transcurre entre apareamientos) y la esterilidad en la progenie, los resultados indican claramente que son menos competitivos que los silvestres. Existen algunos reportes de incompatibilidad sexual en *C. capitata* (McInnis et al. 1996, 2002, Cayol 2000) y se ha encontrado que la dosis de irradiación reduce el desempeño de machos comparados con machos no irradiados (Moreno et al. 1991; Calcagno et al. 2002). En hembras de *A. ludens* y *C. capitata* se ha observado que el periodo de reapareamiento es más corto después de aparearse con machos estériles que después de hacerlo con un macho no irradiado (Bloem et al. 1993, Rull et al. 2005).

Otra condición importante dentro de la TIE es que las hembras deben aparearse una sola vez. Si se aparean en forma más frecuente, el esperma de los machos estériles debe ser producido en la misma cantidad y competir con el esperma de los machos silvestres. Para que la TIE sea efectiva, debe evitarse de manera permanente que las hembras de la población silvestre se reproduzcan y cualquier factor transferido por los machos liberados debería ser suficiente para alcanzar este objetivo (Robinson 2005). Los machos estériles liberados necesitan una producción viable de esperma; este esperma debe transferirse a la hembra durante el apareamiento y ser usado en la fertilización de huevos, además el cigoto fertilizado debe ser incapaz de completar su desarrollo. Las hembras de moscas de la fruta se reaparean (Miyatake y Haraguchi 1996, Robinson et al. 2002, Kraaijeveld et al. 2004) y se ha encontrado que utilizan el esperma del último apareamiento para la fertilización (Saul y McCombs 1993). Esto

puede afectar la efectividad de apareamientos entre machos estériles y hembras silvestres si la hembra se aparea con otros machos silvestres después de hacerlo con uno estéril. Esto se ha observado en *C. capitata*, donde las hembras apareadas por primera vez con un macho estéril tienen una tasa de reapareamiento más alta que las que lo hicieron con uno silvestre (Bloem et al. 1993, McInnis 1993, Vera et al. 2003).

Igualmente, el insecto debe ser capaz de dispersarse fácilmente en todo el ambiente de la plaga, de modo que los machos liberados tengan acceso a las hembras vírgenes en el ambiente natural y puedan competir con los machos silvestres. Los programas de liberación de insectos estériles se ven afectados por la distribución y dispersión de los individuos silvestres y estériles, parámetros que son influenciados por factores ecológicos y biológicos de la especie y que pueden favorecerlos o no (Lance y McInnis 2005). Por otro lado, debe entenderse bien como se distribuyen y dispersan las poblaciones de insectos silvestres y estériles para colocar de manera adecuada a los insectos liberados. En la TIE se desea que los insectos liberados sean capaces de desplazarse en el área de liberación y distribuirse en las áreas con mayor concentración de insectos silvestres, ya que es necesario que localicen alimento, sitios de apareamiento y parejas. En moscas de la fruta se ha encontrado que adultos silvestres presentan una distribución agrupada (Zalucki et al. 1984, Kovaleski et al. 1999) la cual está relacionada con la distribución de estos recursos. Si se desea hacer liberaciones en estos ambientes, la razón estéril-silvestre en estas áreas locales decrecería en relación a toda el área de liberación, ocasionando que la efectividad de las liberaciones disminuya (Barclay 1992). En este caso, se ha propuesto que una manera de atenuar este efecto es modificar la relación estéril:silvestre; sin embargo, antes de modificar

esta relación, se deben de conocer bien los patrones de distribución de los individuos estériles y silvestres y el grado de correlación entre ellos (Meats 2007). La capacidad de dispersión de los insectos liberados está estrechamente relacionada con su longevidad, y de esto depende la frecuencia de las liberaciones y el número de individuos por liberación (Lance y McInnis 2005). Una reducción en la longevidad puede ser efecto de la cría masiva, cepa, el método de esterilización, el manejo durante estos procesos y los métodos de liberación.

Experimentos de liberación y recaptura han demostrado que la esperanza de vida de los machos liberados es corta (Baker et al. 1986, Hendrichs et al. 1993, Thomas y Loera-Gallardo 1998, Hernández et al. 2007). También hay evidencia de que los machos estériles sufren una alta mortalidad debido a depredación por enemigos naturales (Hendrichs y Hendrichs 1998). Debido a esto, existe la hipótesis de que la efectividad de la TIE aumenta si los machos estériles, además de inducir esterilidad en la población silvestre, también se incrementa la mortalidad en la población silvestre mediante la transmisión horizontal de *B. bassiana*. Un punto clave en este enfoque es que la conducta durante el cortejo y el desempeño sexual de los machos estériles no deben ser afectados al estar tratados con conidios.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material biológico y sitio experimental

La colecta de material se realizó en diciembre de 2006 y los experimentos se realizaron entre febrero y abril del 2007. Las moscas silvestres (MS) fueron obtenidas como larvas de frutos infestados de naranja dulce (*Citrus sinensis* L.), los cuales se colectaron en zonas aledañas a Tapachula, Chiapas. Los frutos colectados fueron llevados al laboratorio donde se pesaron y se colocaron en charolas de plástico (75 x 40 x 5 cm) con vermiculita húmeda en donde se mantuvieron por 4 días a 28 ± 1 °C para permitir el desarrollo y la maduración de las larvas. Este periodo de incubación permitió a la mayoría de las larvas alcanzar la madurez óptima para pupación. Después, los frutos fueron disectados para remover las larvas de tercer estadio, las cuales se colocaron en contenedores de plástico de 0.5 L con vermiculita húmeda para promover la pupación y se cubrieron con malla # 18. Dos días antes de la emergencia del adulto, las pupas fueron separadas de la vermiculita con un tamiz fino (Malla 18) y se colocaron en jaulas de plástico de 30 x 30 x 30 cm. Una vez que los adultos emergieron fueron alimentados *ad libitum* con una mezcla de proteína hidrolizada (MP Biomedical, Irvine, CA) + azúcar a una proporción 1:3, y el agua fue proporcionada en viales cubiertos con torunda de algodón.

Las moscas estériles (ME) en estado de pupas fueron proporcionadas por la Planta de cría masiva MOSCAFRUT ubicada en Metapa, Chiapas, México, donde fueron criadas según el procedimiento descrito por Domínguez et al. (2000). Las pupas

fueron irradiadas a 80 Gray con Cobalto 60, 36 horas antes de la emergencia de adultos. Ambas cepas, MS y ME, fueron colocadas en jaulas de plástico de 30 x 30 x 30 cm, y los adultos fueron alimentados como se describió previamente.

Tres días después de la emergencia, las moscas fueron separadas por sexos y los machos de ambas cepas fueron mantenidas en laboratorio a 27 ± 2 °C y $80 \pm 5\%$ HR hasta que se utilizaron en las diferentes pruebas. Los machos fueron evaluados cuando alcanzaron la madurez sexual, en el caso de machos de laboratorio a los ocho días y los silvestres a los 14 días después de emerger. Las hembras fueron usadas a los 14 días de edad.

El hongo entomopatógeno *B. bassiana*, cepa CLSV, fue proporcionado como conidio seco por el Laboratorio de Producción de Organismos Entomopatógenos de la Junta Local de Sanidad Vegetal en Tapachula, Chiapas, México. La concentración fue de 3.5×10^9 conidios/g, con una viabilidad de 90%, y un tiempo letal medio (TL₅₀) de 4.2 días (Toledo et al. 2007).

Los experimentos fueron realizados en condiciones seminaturales usando jaulas de campo de malla de nylon (3 m diametro x 2 m alto). En el centro de cada jaula se colocaron dos árbolitos de mango (*Mangifera indica* L.) (1 m alto) y uno de café (*Coffea arabica* L.) (1.20 m de alto), de acuerdo a lo descrito por Calkins y Webb (1983). Las jaulas de campo se colocaron en los jardines de El Colegio de la Frontera Sur en Tapachula, Chiapas, México. En este sitio, la temperatura promedio anual es de 26 °C,

y el periodo de lluvias es de mayo a octubre, con una precipitación anual de 2400-5000 mm (García 2004). Durante el experimento, el fotoperiodo (luz-oscuridad) fue ~12:12 h.

3.2. Competitividad sexual de machos estériles tratados con *B. bassiana*

Este estudio se realizó en jaulas de campo usando una relación macho: hembra de 4:1. Para identificar a los machos de cada tratamiento, se marcaron adicionando 50 µl de colorante vegetal (McCormick) por 3 g de alimento (proteína hidrolizada + azúcar). Los colores usados para cada tratamiento fueron: a) machos silvestres no tratados = verde; b) machos silvestres tratados = azul; c) machos estériles no tratados = rosa; y d) machos estériles tratados = amarillo. El colorante natural se adicionó al alimento para facilitar la diferenciación de los machos debido a que el color se adhiere al sistema digestivo del insecto y es visible a través del abdomen, y ha sido demostrado que no causa un efecto adverso en el comportamiento (Liedo, com. pers.).

Para el tratamiento con conidios de *B. bassiana*, 30 minutos antes del experimento, 20 machos silvestres y 20 machos estériles fueron colocados por separado en tubos de ensayo y para facilitar su manejo durante el proceso de inoculación, los insectos fueron colocados en un rango de temperatura de 0-3 °C por 3 minutos. Posteriormente, los machos aletargados fueron tratados con conidios del hongo a una proporción de 1 g/1000 machos. Los tubos fueron agitados suavemente hasta que el cuerpo de los insectos quedó totalmente cubierto con conidios. Para el control, 20 machos silvestres no tratados y 20 machos estériles no tratados fueron sometidos al mismo proceso de enfriamiento antes de ser liberados en las jaulas.

Veinte machos de cada tratamiento y 20 hembras silvestres vírgenes (para un total de 100 moscas por jaula) fueron liberadas dentro de cada jaula de campo. Las parejas en copula fueron colectadas en viales cubiertos con torundas de algodón y retiradas de cada jaula, registrando el tratamiento al que pertenecía el macho. Considerando que la conducta de apareamiento de *A. ludens* es crepuscular (Aluja et al. 1983; Robacker 2003), todos los experimentos se realizaron por las tardes con una duración de 4 h, iniciando a las 16:00 y concluyendo a las 20:00, ya que oscurecía aproximadamente a las 19:30. Los registros fueron hechos en dos jaulas de campo por día durante seis días consecutivos, para un total de 12 replicas. Durante el experimento, la temperatura promedio fue 28.4 ± 0.46 °C y la humedad relativa fue $64 \pm 16.14\%$.

3.3. Duración de la cópula y patrón de almacén de esperma

Para esta prueba, cuatro jaulas de campo fueron acondicionadas como se describió previamente: una por tratamiento. Los tratamientos fueron: a) machos silvestres no tratados; b) machos silvestres tratados; c) machos estériles no tratados; y d) machos estériles tratados. Los machos fueron marcados y tratados con conidios de *B. bassiana* como se describió anteriormente. Después, 40 machos de cada tratamiento fueron liberados con 40 hembras silvestres en cada jaula de campo. Después de iniciado el apareamiento, cada pareja en cópula fue colectada en un tubo de ensayo, cubierto con una torunda de algodón, y se registró la duración de la cópula. Los experimentos iniciaron a las 16:00 h, y las observaciones terminaron a las 20:00 h (cuatro horas en total). Seis repeticiones fueron realizadas, con un total de 240 machos por tratamiento.

Doce horas después de cópula, se registró la cantidad y la distribución del esperma en las espermatecas de las hembras. Observando bajo un microscopio estereoscópico, el aparato reproductivo de las hembras fue separado del abdomen y se retiró el tejido graso para localizar las tres espermatecas. Cada espermateca fue colocada sobre un portaobjetos, se les aplicó 12.5 μ l de solución buffer salina de fosfatos (PBS), que consistió en 100 ml de destilada y deionizada y 0.05 M NaHPO_4 y 0.85 M NaCl (Moritz, 1984). Las espermatecas fueron perforadas con un alfiler entomológico #00 para permitir que el esperma saliera y después fue extendido sobre el portaobjetos. Posteriormente se colocó un cubreobjetos (20x20 mm), sellando la preparación con esmalte transparente para uñas. Los espermatozoides de cada espermateca fueron cuantificados utilizando un microscopio de contraste de fases a 100X, revisando la preparación completa para obtener el total de espermatozoides por cada espermateca por hembra.

3.4. Dispersión y longevidad de machos estériles tratados con *B. bassiana* en condiciones de campo

Se manejaron dos tratamientos: 1) Machos estériles tratados con conidios de *B. bassiana*, y 2) machos estériles sin tratar (testigo). Los machos estériles y los conidios de *B. bassiana* fueron obtenidos como se describió anteriormente.

Para cada tratamiento se manejó una muestra de 550 g de pupa (~ 27,000 pupas); para diferenciar a los adultos por tratamiento a una de las muestras se le adicionó colorante *dye glue* azul en polvo y a la otra *dye glue* rosa, posteriormente con

un movimiento suave se homogenizó para que las pupas quedaran impregnadas del colorante y los adultos quedaran marcados durante el proceso de emergencia. Las pupas fueron trasladadas al Centro de Empaque del programa MOSCAMED, donde se aplicó el siguiente procedimiento: cada muestra de pupa se dividió en cuatro submuestras que se colocaron en bolsas de papel de estraza de 20x15x40 cm, que fueron engrapadas en la parte media superior dejando abiertos los extremos para permitir la salida de los adultos al emerger. Estas submuestras se colocaron en cajas Parc, agregando como alimento una mezcla de proteína hidrolizada enzimáticamente (MP Biomedical, Irvine, CA) y azúcar en una relación 1:3 y agua *ad libitum* en una esponja.

Las cajas fueron cerradas y colocadas en una sala de emergencia a una temperatura de 21-23°C y una humedad relativa de 65-70%, en donde se mantuvieron por ocho días después de la emergencia para que los adultos alcanzaran su madurez sexual. Simultáneamente se manejó una muestra de 250 pupas para determinar el porcentaje de emergencia y calcular el número de machos utilizados por muestra en cada liberación.

3.4.1. Area de estudio

El experimento se realizó entre agosto y noviembre de 2006 en un huerto de mango cv. Ataulfo denominado “El Carmen”, ubicado en el km 21 de la carretera Tapachula-Huehuetán, Chiapas. Las coordenadas geográficas del huerto corresponden a 14°59'35" de Latitud N y 92°23'5" de Longitud W (Fig. 1). La temperatura promedio durante el experimento fue de 25 °C, y la precipitación registrada fue de 595.4 mm

(Datos proporcionados por la Estación Meteorológica de Tapachula, Chiapas, Comisión Nacional del Agua).

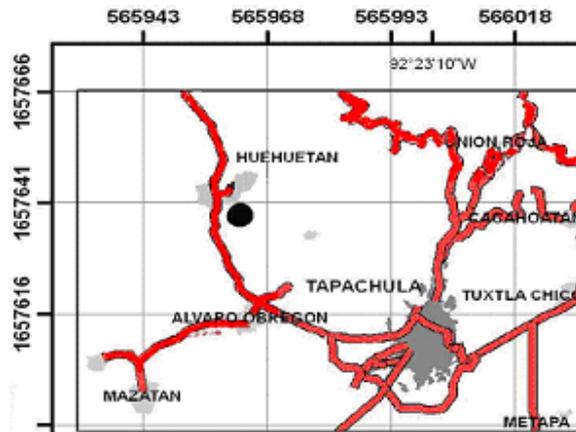


Figura 1. Localización del huerto de mango Cv. Aaulfo El Carmen, donde se realizó el experimento de dispersión de adultos autodiseminadores de conidios de *B. bassiana*.

3.4.2. Experimento de liberación y recaptura

Cuando los adultos alcanzaron la edad para ser liberados, las cajas con los machos de ambos tratamientos se colocaron en un cuarto frío a una temperatura de 2-3°C durante 20 minutos; esto permitió que los adultos quedaran inactivados para facilitar la inoculación con conidios. Después de esto, fueron colocados en bolsas de papel, inoculando con una concentración de 1 g de conidio/1,000 adultos solamente a las moscas que previamente quedaron marcadas con color rosa. Una vez que las moscas fueron tratadas, se trasladaron al huerto para su posterior liberación, actividad que se realizó a las 09:00 am en el punto central del huerto, previamente indicado. La densidad que se manejó fue 2,750 adultos por hectárea. Después de una hora de haberse realizado la liberación, se colocaban 68 trampas Multilure distribuidas en círculos concéntricos alrededor del punto de liberación (Fig. 2), registrando las

coordenadas X, Y de cada trampa y la distancia al punto de liberación. El rango de distancia de las trampas hacia el punto central fue de 20-195 m.

La primera revisión de las trampas se hizo 24 h después de la liberación y a partir de aquí se realizó cada día durante ocho días consecutivos. Las moscas capturadas fueron depositadas en un contenedor con alcohol al 70% y trasladadas al laboratorio para su identificación, cuantificación y registro por tratamiento. En total, se realizaron cinco liberaciones de aproximadamente 11,000 machos por tratamiento en cada una de ellas.

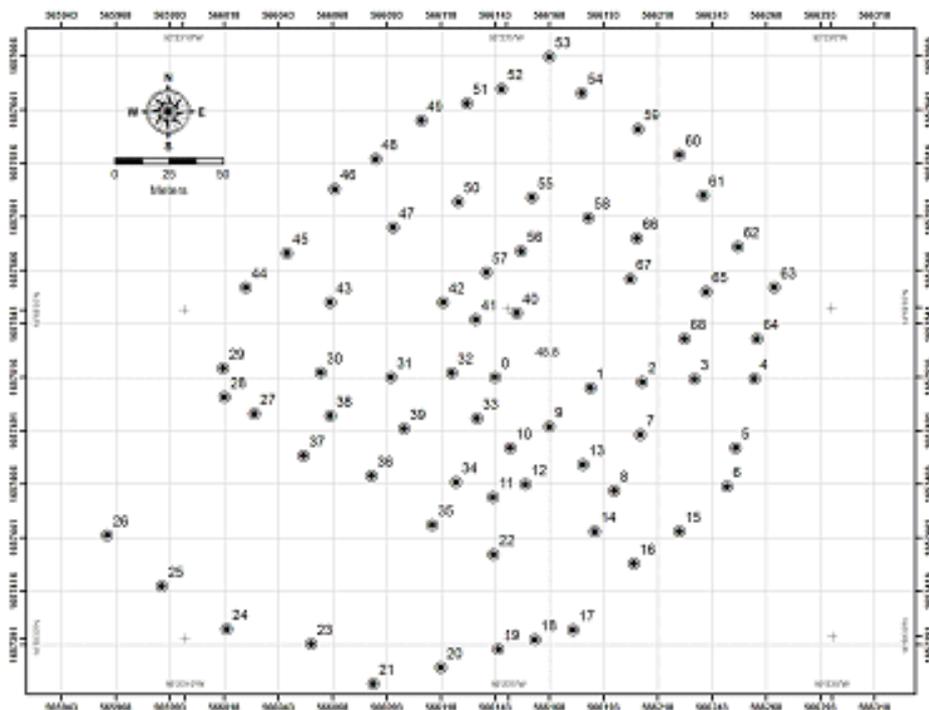


Figura 2. Distribución de las trampas para capturar adultos de *A. ludens* tratados y no tratados con conidios de *B. bassiana* liberados en un huerto de mango Cv. Ataulfo.

3.5. Análisis de datos

El número de copulas por tratamiento fue ajustado con una regresión logística usando el programa Splus v 7. Las diferencias entre machos estériles tratados y no tratados y entre machos silvestres tratados y no tratados fueron determinadas usando una prueba de ji-cuadrada. Las diferencias entre duración de la cópula y la cantidad total de espermatozoides transferidos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA). Posteriormente se aplicó una prueba de correlación de Spearman para la duración de la cópula y la cantidad total de espermatozoides por tratamiento. La cantidad de espermatozoides de machos tratados y no tratados transferidos a las tres espermatecas fue analizada usando una prueba de G mediante una tabla de contingencia, así como un análisis discriminante para identificar las relaciones entre los individuos de cada tratamiento y entre tratamientos. Los datos fueron analizados con el programa Statistica v. 6.0 (Statsoft 2003).

Para el experimento de dispersión, se realizó una transformación de los datos para cumplir el supuesto de normalidad. Para modelar la dispersión de los individuos través de la superficie, los datos fueron analizados geostatísticamente considerando el número de moscas capturadas y las coordenadas de cada trampa, utilizando el programa Geostatistical for environmental scientists (Webster y Oliver, 2000). La estructura espacial se analizó con la función de semivarianza (medida de la similitud entre observaciones a una distancia determinada), de acuerdo con la siguiente ecuación $Y(h) = \frac{1}{2}N (Z(x) - Z(x+h))$ (Vergara-Olaya *et al.* 2001) donde:

$Y(h)$ = Semivarianza

N = Número de pares de valores a una distancia dada

$Z(x)$ = Valor de la variable de Z en el sitio (x)

$Z(x+h)$ = Valor de la variable de Z a una distancia (h) del sitio x .

La longevidad se definió como el tiempo mínimo de recaptura, considerando los días transcurridos entre la liberación y la recaptura, donde los datos representaron las observaciones censadas. La sobrevivencia se modeló con la variable Weibull y los datos se procesaron con el programa Splus v. 7 (Insightful 2007).

4. RESULTADOS

4.1. Competitividad sexual de machos estériles tratados con *B. bassiana*

El mayor número de copulas fue para el tratamiento de machos silvestres no tratados, mientras que los machos silvestres tratados tuvieron el menor número (Cuadro 1). Las diferencias observadas fueron significativas entre machos silvestres tratados y no tratados ($\chi^2 = 22.5$, g.l. = 1, $P < 0.001$), y no hubo diferencias significativas entre machos estériles tratados y no tratados ($\chi^2 = 2.25$, g.l. = 1, $P = 0.13$). Los datos de número de copulas en condiciones de competencia se ajustaron a un modelo de regresión logística ($\chi^2 = 30.2$, g.l. = 3, $P < 0.001$), lo que indicó la influencia del tratamiento en la probabilidad de obtener cópulas ($\chi^2 = 26.07$, g.l. = 3, $P < 0.001$). Hubo diferencias significativas entre machos silvestres no tratados y los otros tres tratamientos (Cuadro 2).

Cuadro 1. Cópulas registradas por machos de *Anastrepha ludens* tratados y no tratados con conidios de *B. bassiana* en competencia ($N = 240$ machos/tratamiento).

Tratamientos	Cópulas	
	Promedio \pm EE	% obtenido del total de parejas liberadas
Machos silvestres no tratados	8.5 \pm 5.4 a	21.25
Machos silvestres tratados con <i>B. bassiana</i>	2.2 \pm 2.1 b	5.42
Machos estériles no tratados	6.3 \pm 4.0 ns	15.83
Machos estériles tratados con <i>B. bassiana</i>	4.3 \pm 3.7 ns	10.83

*Valores en la misma columna con la misma letra no son significativamente diferentes ($P > 0.05$).

Cuadro 2. Intervalos de confianza para la probabilidad de obtener copulas por machos de *A. ludens* silvestres y estériles tratados y no tratados con *Beauveria bassiana*.

Tratamientos	Probabilidad	Intervalos confianza 95%	
		Menor	Mayor
Machos silvestres no tratados	0.21 a	0.16	0.26
Machos silvestres tratados con <i>B. bassiana</i>	0.05 b	0.03	0.09
Machos estériles no tratados	0.16 b	0.12	0.21
Machos estériles tratados con <i>B. bassiana</i>	0.11 b	0.07	0.15

*Valores en la misma columna con la misma letra no son significativamente diferentes ($P > 0.05$).

4.2. Duración de la copula y patrón de almacén de esperma

Un total de 88 (36.7%) hembras se aparearon con machos silvestres no tratados, 25 (10.42%) se aparearon con machos silvestres tratados, 86 (35.8%) con machos estériles tratados, y 36 (15%) con machos estériles no tratados. El tratamiento con el mayor número de cópulas y cópulas exitosas (que resultaron en transferencia de esperma) fue obtenido por machos silvestres y estériles no tratados, respectivamente. Se registraron diferencias significativas entre los cuatro tratamientos en lo que se refiere al número total de cópulas ($\chi^2 = 55.4$, $P < 0.001$). No hubo diferencias entre tratamientos en relación al porcentaje de cópulas con transferencia de esperma ($\chi^2 = 58.5$, g.l. = 3, $P > 0.001$) (Cuadro 3).

Los machos estériles que no fueron tratados registraron la cópula de menor duración (2 min) y la cópula de mayor duración (280 min); no obstante, no hubo

Cuadro 3. Cópulas exitosas, duración de la copula y número promedio y porcentaje de espermatozoides por espermateca transferidos por machos de *A. ludens* de cuatro tratamientos sin competencia.

Tratamientos	Cópulas exitosas (con esperma)	Duración de cópula (min.)	Número y porcentaje de espermatozoides por espermateca *						Número total de espermatozoides
			1	%	2	%	3	%	
Machos silvestres no tratados	85	70.26 ± 5.55 a	263.19	35.51	233.93	31.57	244.03	32.92	741.15 ± 67.07 a
Machos silvestres tratados con <i>B. bassiana</i>	21	60.12 ± 7.82 a	104.8	31.01	103.96	30.78	129.12	38.21	337.88 ± 48.97 b
Machos estériles no tratados	81	65.00 ± 5.65 a	130.56	31.34	115.0	27.57	171.27	41.09	416.50 ± 24.65 b
Machos estériles tratados con <i>B. bassiana</i>	33	61.30 ± 6.56 a	104.0	35.37	83.44	28.45	106.02	36.18	294.52 ± 29.76 b

*Promedios ± EE en la misma columna con la misma letra no son significativamente diferentes ($P > 0.05$) de acuerdo con el ANOVA. * No hubo diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides por espermateca según la prueba de G ($G = 1.865$, d.f. = 6, $P = 0.932$).

diferencias significativas en duración de la cópula entre tratamientos ($F = 0.26$, g.l. = 3, 231, $P = 0.85$) (Cuadro 3). Los machos silvestres no tratados transfirieron la cantidad más alta de esperma y las diferencias observadas con respecto a los otros tratamientos sí fueron significativas ($F = 10.02$, g.l. = 3, 231, $P < 0.001$) (Cuadro 3). La duración de la cópula y el número total de espermatozoides exhibieron una correlación significativa positiva en los cuatro tratamientos (Fig. 3).

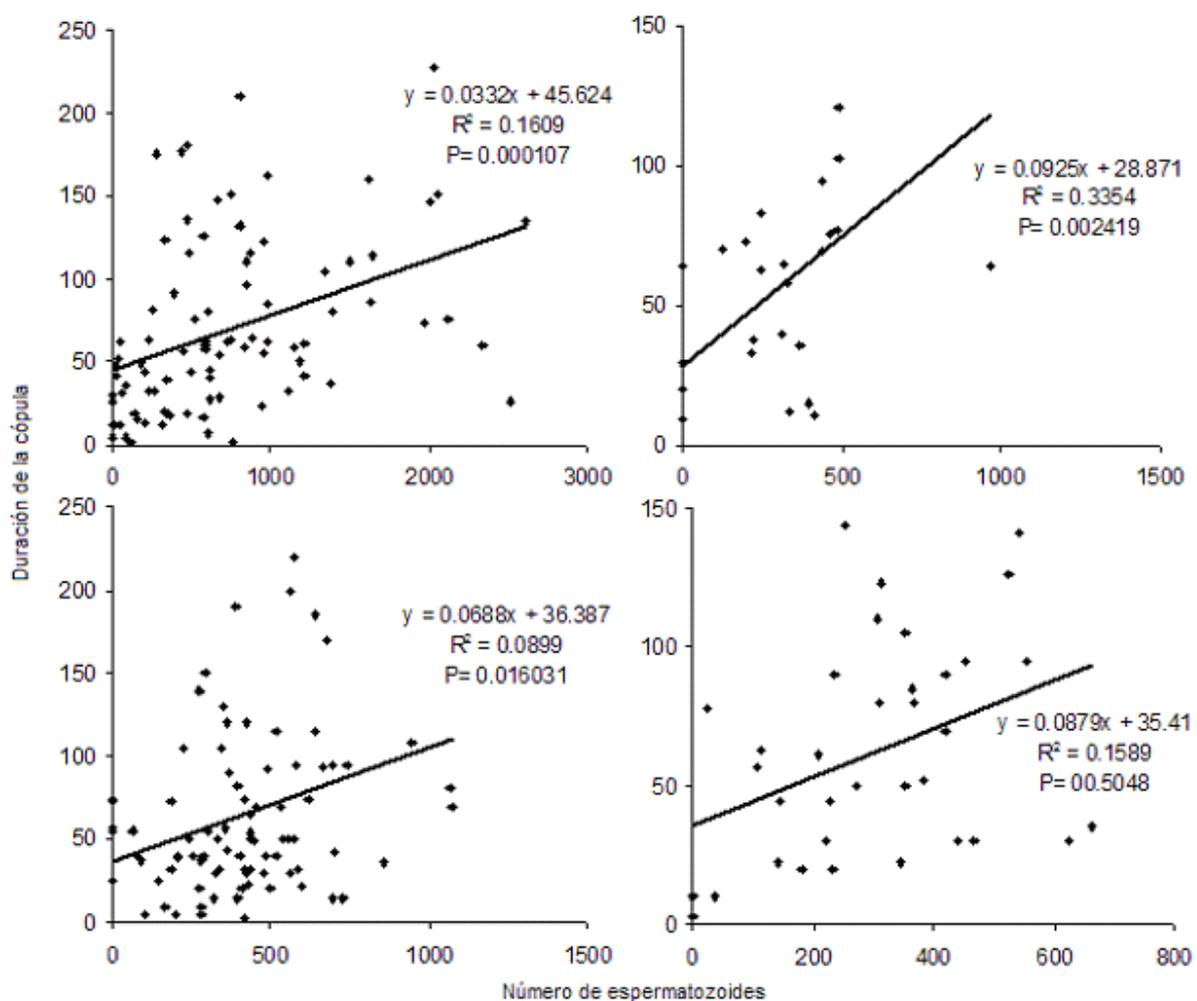


Figura 3. Relación entre la duración de la cópula y número total de espermatozoides transferidos por los machos de *A. ludens* de los cuatro tratamientos. a) Machos silvestres no tratados, b) Machos silvestres tratados, c) Machos estériles no tratados, d) Machos estériles tratados.

El análisis discriminante reveló diferencias significativas entre tratamientos para el número total de espermatozoides para cada espermateca ($F = 5.06$, g.l. = 9, 557, $P < 0.001$), la mayor distancia ocurrió entre machos silvestres no tratados y machos estériles tratados ($F = 1.14$, g.l. = 3, 229, $P < 0.001$). Estas diferencias fueron determinadas por la cantidad de espermatozoides almacenada por las hembras en las espermateca localizadas como 1 y 2 (λ de Wilks = 0.88 y 0.87, respectivamente; $P = 0.001$ y 0.004). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje del total de esperma almacenado en cada espermateca ($G = 1.86$, g.l. = 6, $P = 0.93$).

4.3. Recapturas de machos estériles de *A. ludens* tratados con conidios

De 55,000 machos liberados por tratamiento, se recapturaron 6,982 (12.97%) machos estériles no tratados y 4,245 (7.73%) machos estériles tratados con *B. bassiana*. Las diferencias observadas en las capturas entre ambos tratamientos sí fueron significativas ($X^2=133.45$, g.l. = 1, $P=0.00$) (Cuadro 4).

El análisis temporal de los datos de recaptura, reveló que más del 50% de las capturas ocurrió durante los días 1 y 2, observándose una disminución gradual durante los seis días que duró el trampeo (Fig. 4).

Cuadro 4. Número de machos (estériles no tratados y tratados con *Beauveria bassiana*), capturados por liberación en un huerto de mango cv. Ataulfo en Tapachula, Chiapas.

Liberación	Tratamiento			
	Machos no tratados	Captura (%)	Machos tratados	Captura (%)
1	209	1.9	100	0.90
2	2582	23.47	1486	13.50
3	2315	21.04	1801	16.37
4	910	8.27	576	5.23
5	966	8.78	282	2.56
Total	6982	12.69 a	4245	7.71 b
Promedio	1,396.4±31.78 a		849±27.44 b	

* Valores con letra diferente presentan diferencias significativas ($P<0.05$).

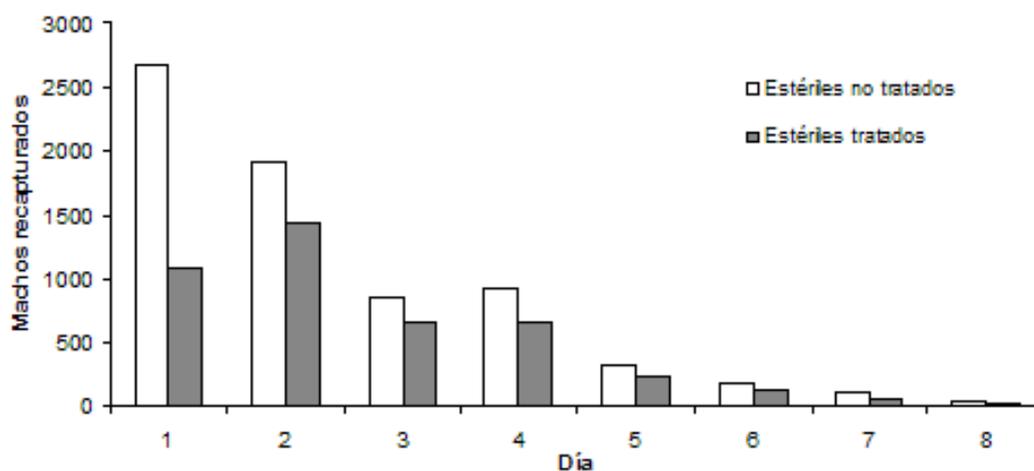


Figura 4. Número de machos recapturados por día en un huerto de mango cv. Ataulfo en Tapachula, Chiapas.

La dispersión de las moscas (basada en la captura de las trampas) se comportó de la siguiente manera: para el tratamiento con machos estériles no tratados, 67 de 68 trampas capturaron moscas, únicamente la trampa 26 no registró capturas para este tratamiento y estaba ubicada a una distancia de 193.5 m a partir del punto central de liberación en dirección suroeste. De las trampas que tuvieron captura, siete presentaron el 50.17% del total de machos capturados; cinco de ellas se ubicaron al sureste a distancias de 33, 35, 44, 52 y 56 m de distancia del punto central, y capturaron el 6.51, 6.53, 8.29, 4.92 y 5.87% del total de machos recapturados; respectivamente; una trampa se ubicó al oeste a 20 m del punto central con 8.16% de recapturas, y la otra al suroeste a 21 m del punto central con 9.86% de recapturas. Pero el 49.83% de las demás capturas se obtuvo en 60 trampas que estuvieron ubicadas hacia los 4 puntos cardinales (Fig. 5a).

En el caso de los machos estériles tratados con *B. bassiana*, el comportamiento de dispersión determinado por la captura fue de la siguiente manera: 67 de las 68 trampas que se instalaron, presentaron captura de moscas; la trampa que no tuvo captura fue la trampa # 52, ubicada a 135 m del punto de liberación, en dirección norte. 19 trampas capturaron el 80.65% de los individuos; estas trampas se localizaron de la siguiente manera: tres de ellas estuvieron en dirección sur a los 34, 56, y 83 m del punto central y capturaron 5.96, 5.24 y 2.89%, respectivamente del total de machos capturados. Tres trampas se localizaron en dirección noroeste a 28, 31 y 49 m del punto de liberación con una captura de 2.53, 2.41 y 2.89%, respectivamente. Dos trampas estaban ubicadas al oeste del punto de liberación a los 21 y 48 m del punto de liberación con el 6.85 y 2.86% de las capturas, respectivamente. Dos trampas se

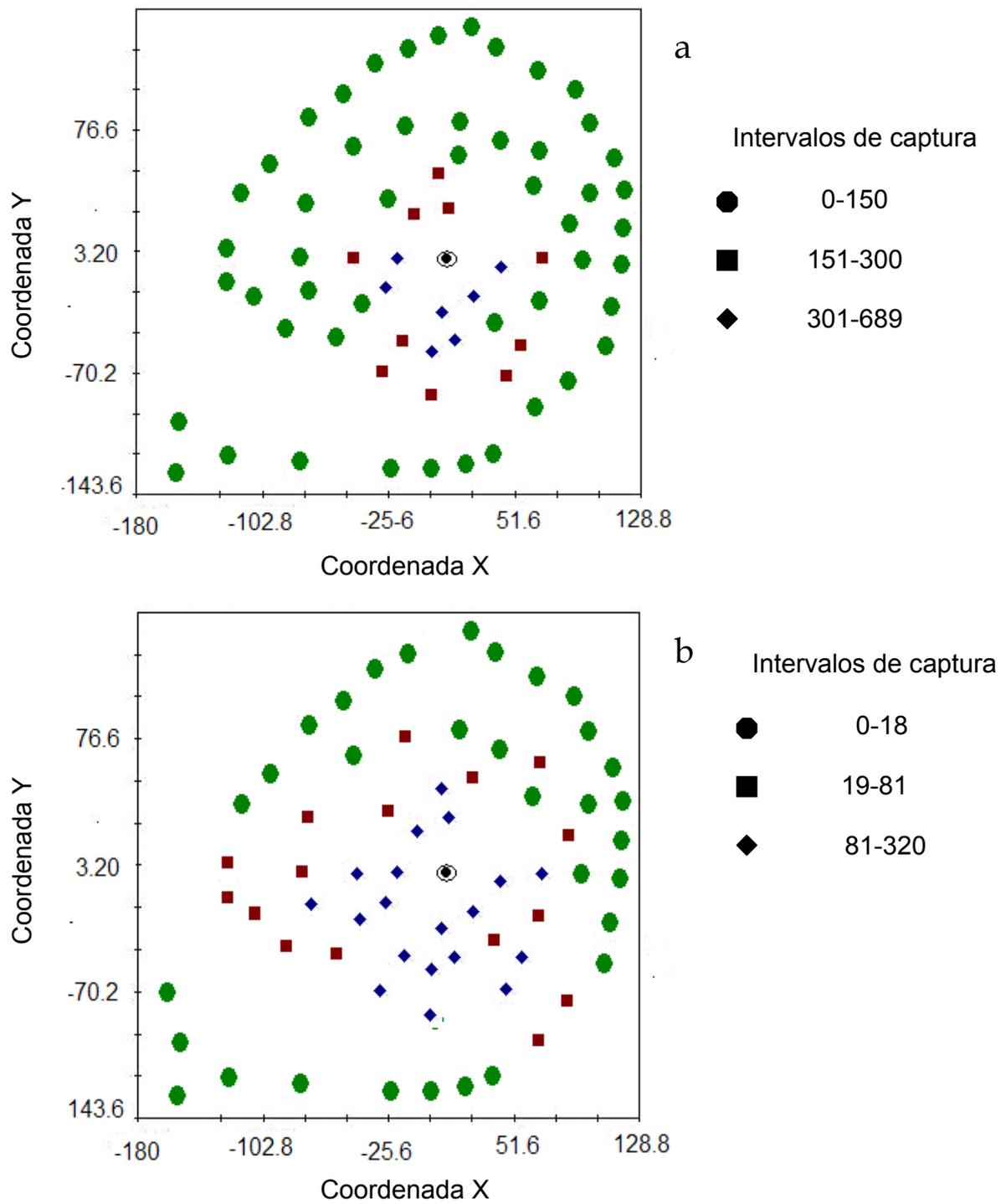


Figura 5. Número de machos estériles de *Anastrepha ludens* no tratados capturados por 68 trampas en un huerto de mango cv. Ataulfo en Tapachula, Chiapas. a) Machos no tratados, b) Machos tratados.

localizaron al este a los 44 y 67 m del punto de liberación con 6.76 y 3.40% del total de capturas. Cinco se localizaron al suroeste a los 21, 48, 51, 75 y 78 m de distancia del punto de liberación con 7.36, 2.41, 3.42, 3.17 y 1.93% de las capturas, y cuatro trampas se localizaron al sureste a los 34, 52, 76 y 85 m del punto de liberación con el 5.54, 5.29, 4.2 y 3.8% de las capturas, respectivamente. El 19.35% de los machos capturados fue en 49 trampas que estaban ubicadas hacia los cuatro puntos cardinales (Fig. 5b).

Las figuras 6a y 6b muestran el patrón de dispersión general para los machos de ambos tratamientos. Se puede observar que, aunque hubo dispersión hacia los cuatro puntos cardinales, la dirección con mayor abundancia de machos fue el sur-sureste del huerto.

De acuerdo con el semivariograma, la semivarianza aumentó a medida que se incrementó la distancia entre trampas para ambos tratamientos. Este hecho indicó que la probabilidad de capturar individuos disminuyó conforme aumentó la distancia. En este caso, la distancia máxima de dispersión para machos estériles no tratados fue 164.9 m (Fig. 7a) y para machos estériles tratados con *B. bassiana*, la mayor distancia fue de 192.4 m (Fig. 7b).

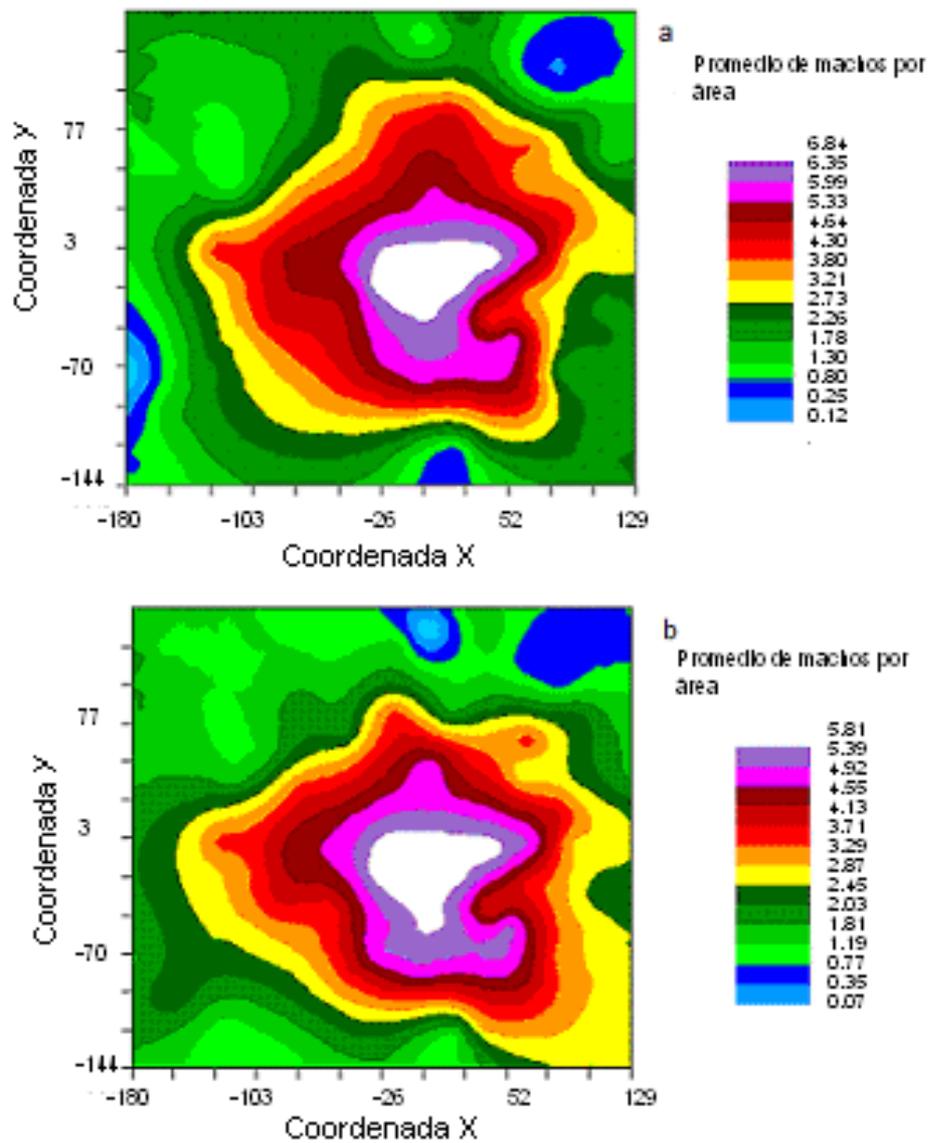
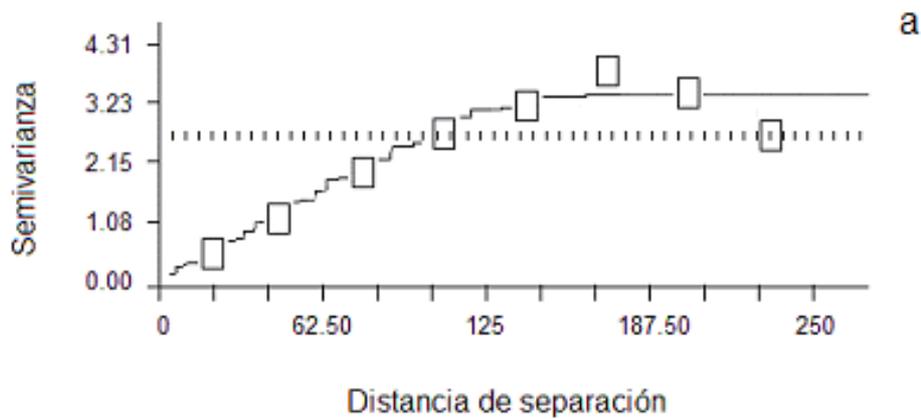
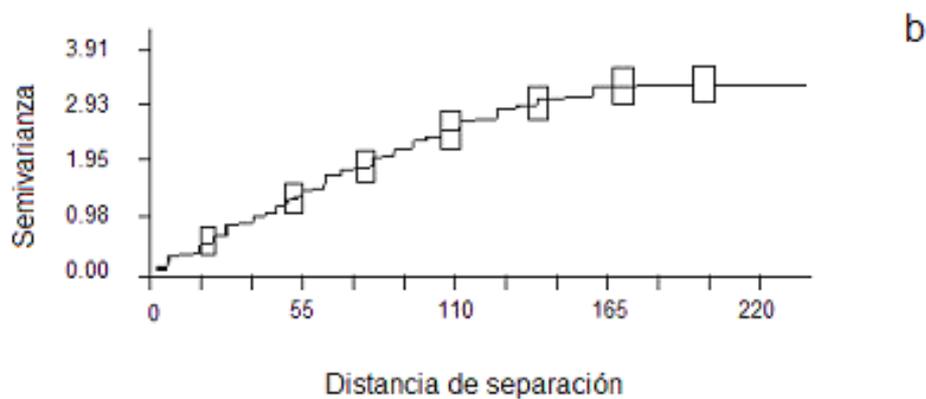


Figura 6. Dispersión de machos de *Anastrepha ludens* liberados en el punto central de un huerto de mango cv. Ataulfo en Tapachula, Chiapas. a) Machos no tratados, b) Machos tratados.



Modelo esférico ($C_0 = 0.010$; $C_0 + C = 3.813$; $A_0 = 164.90$; $r^2 = 0.923$; $RSS = 0.943$)



Modelo esférico ($C_0 = 0.010$; $C_0 + C = 3.756$ $A_0 = 164.90$; $r^2 = 0.983$ $RSS = 0.267$)

Figura 7. Distancia máxima de dispersión de machos estériles de *Anastrepha ludens* no tratados en un huerto de mango cv. Ataulfo en Tapachula, Chiapas. a) Machos no tratados, b) Machos tratados.

La longevidad de los machos tratados y no tratados fluctuó entre uno y tres días (Cuadro 5). Se observaron diferencias entre tratamientos para la sobrevivencia en las

liberaciones 1, 2, 3 y 5. Sin embargo, analizando cada liberación, se observó que las mayores diferencias estuvieron en las liberaciones 1 y 5 (Fig. 8).

Cuadro 5. Longevidad media de machos estériles de *Anastrepha ludens* no tratados y tratados con *Beauveria bassiana* liberados en un huerto de mango cv. Ataulfo en Tapachula, Chiapas.

Liberación	Tratamiento	Longevidad (días)
22-Ago	Machos estériles no tratados	2
	Machos estériles tratados con <i>B. bassiana</i>	2
19-Sep	Machos estériles no tratados	2
	Machos estériles tratados con <i>B. bassiana</i>	2
9-Oct	Machos estériles no tratados	3
	Machos estériles tratados con <i>B. bassiana</i>	3
23-Oct	Machos estériles no tratados	2
	Machos estériles tratados con <i>B. bassiana</i>	2
6-Nov	Machos estériles no tratados	2
	Machos estériles tratados con <i>B. bassiana</i>	1

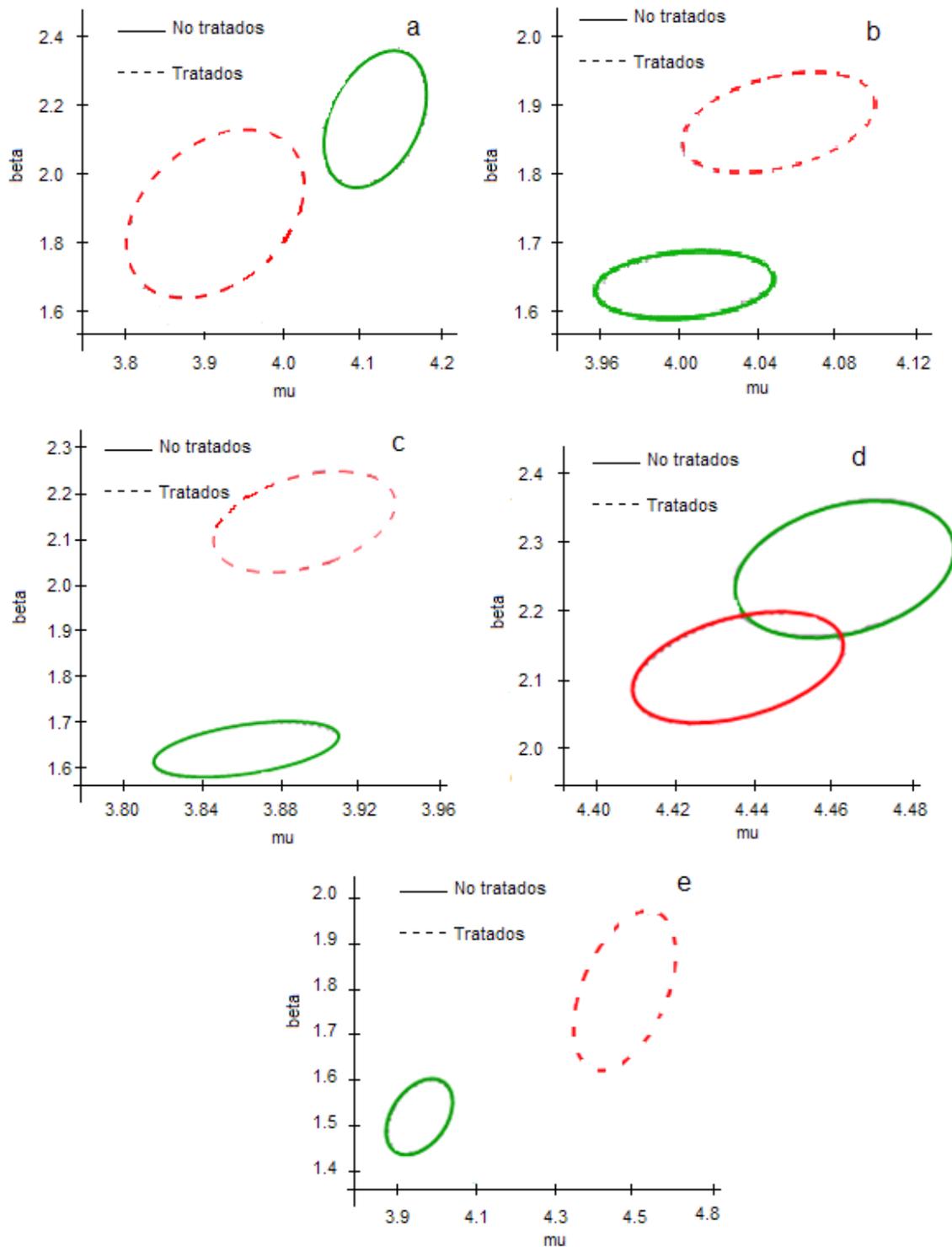


Figura 8. Intervalos de confianza para la sobrevivencia por liberación de machos estériles de *Anastrepha ludens* liberados en un huerto de mango cv. Ataulfo en Tapachula, Chiapas.

5. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en esta investigación sugieren que la liberación de insectos estériles como autodiseminadores de conidios de *B. bassiana* puede ser exitosa, a pesar de que se observó que los machos silvestres que no fueron tratados con conidios del hongo tuvieron un mayor desempeño sexual que los machos de los otros tratamientos. La respuesta de los machos silvestres en comparación con los machos estériles tratados y no tratados fue similar a lo reportado para varias especies de moscas de la fruta (Wong et al 1983, Cayol 2000, Lux et al. 2002, Allinghi et al. 2007, Orozco et al. 2007). Aunque los machos estériles forman leks, liberan feromona, cortejan a las hembras, compiten por apareamientos, se aparean, transfieren esperma e inducen el periodo refractorio (periodo entre apareamientos); siempre han exhibido una menor competitividad que los machos silvestres (Whittier et al. 1992; Hendrichs et al. 2002).

La presencia de conidios sobre el cuerpo de los machos ocasionó efectos diferenciales en la competitividad sexual. En el caso de machos silvestres tratados, se redujo su desempeño sexual en comparación con los machos silvestres no tratados los cuales presentaron el mejor desempeño. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en machos estériles tratados y no tratados. Esto sugiere que estos machos fueron menos susceptibles a la presencia de los conidios. Resultados similares fueron reportados por Dimbi et al. 2009, cuando trataron machos de *Ceratitis capitata*, *C. cosyra* y *C. fasciventris* con conidios de *M. anisopliae* y no encontraron diferencias en la competitividad de estos machos con respecto a machos no tratados; además no

registraron diferencias en el tiempo de duración del apareamiento y porcentaje de cópulas obtenidas hasta por dos días después de la inoculación.

El experimento para evaluar el desempeño de los machos se realizó bajo condiciones de fuerte competencia, ya que cada uno tuvo que competir simultáneamente con otros tres machos por cada hembra silvestre (es decir en una proporción de 4 machos: 1 hembra). Este hecho la hizo diferente de la prueba tradicional de competitividad que se realiza bajo los protocolos de control de calidad en las crías masivas de insectos estériles, en donde se utiliza una proporción estéril: fértil de 3: 1 (IAEA/FAO/USDA 2003), y es un parámetro fundamental en aquellos programas que tienen aplicación de la TIE (McInnis et al. 1994). La disminución de una población silvestre mediante la aplicación de esta técnica, también está en función de la densidad relativa de ambas poblaciones (relación estéril: fértil), la cual debe resultar claramente a favor de los primeros, de manera que se debe favorecer los apareamientos entre machos estériles y hembras silvestres (Hendrichs et al. 2005, Knipling 1955). De lo anterior podemos inferir que al inocular y liberar grandes cantidades de machos estériles tratados con conidios, se espera que estos insectos tendrán una proporción favorable en el campo con respecto a los machos silvestres, por lo tanto podrán competir en forma adecuada por cópulas con las hembras silvestres, y al mismo tiempo se estaría incorporando un nuevo elemento de mortalidad en la población silvestre de la plaga.

Los machos estériles tratados pueden tener tres efectos posibles en la población silvestre: 1) inducción de esterilidad (esto es, disminución en el número de huevecillos

como resultado de transferir esperma estéril a las hembras); 2) reducción en la probabilidad de un segundo apareamiento, debido a la muerte con mayor rapidez de la hembra por la infección del hongo; y 3) en caso de no copular o transferir esperma, la transmisión horizontal de *B. bassiana* resultaría en la mortalidad de la hembra silvestre, ya que en un estudio previo, Toledo et al. (2007) demostraron que la transmisión horizontal de conidios de *B. bassiana* fue posible mediante la cópula e intentos de cópula entre machos tratados y hembras sanas de *A. ludens*, y que las hembras infectadas sufrieron una reducción significativa en la sobrevivencia, fecundidad y fertilidad después del ataque del hongo y Quesada-Moraga et al. (2008), reportan resultados similares al tratar adultos de *C. capitata* con conidios de *Metarhizium anisopliae*, a los de Toledo et al. (2007).

El número de cópulas obtenidas puede ser usado como una aproximación del éxito reproductivo de los machos. Sin embargo, el hecho de que un macho obtenga cópulas, no es determinante para afirmar si es o no exitoso (Arita y Kaneshiro 1985). El éxito en la fertilización también puede variar en relación al número y/o distribución del esperma almacenado por las hembras (Eady 1995, Ward 1998), lo cual también puede estar relacionado positivamente con la duración de la cópula (Field y Yuval 1999; Field et al. 1999, Taylor y Yuval 1999, Taylor et al. 2000). Por lo tanto, se puede deducir que el éxito reproductivo puede resultar de la interacción entre la competencia por cópulas y la competencia por esperma.

El desempeño de los machos estériles utilizados como autidiseminadores de conidios no solo debe ser medido por la competencia, transferencia de espermatozoides

y lograr la transmisión del hongo, también la distribución en campo es importante. En este sentido, los porcentajes de recaptura de machos de ambos tratamientos fueron similares a los obtenidos en trabajos previos que estudian la dispersión y recaptura en moscas de la fruta estériles (Plant y Cunningham 1991, Barry et al. 2004, Peck et al. 2005, Hernández et al. 2007). Los porcentajes generales de captura estuvieron entre 0.02 y 19% del total liberado. Estos bajos porcentajes de recaptura puede ser un reflejo de que la población liberada disminuyó por otros factores como la depredación (Hendrichs y Hendrichs 1998); cebo de las trampas poco atractivo para machos (Liedo com. pers). También pudo haber mortalidad causada por la aplicación de insecticidas que se estaba realizando en zonas aledañas, lo cual es parte de las prácticas agrícolas que se realizan en el manejo de los huertos de esta región antes de la cosecha de mango. A este respecto, autores como Fletcher (1989), sugieren que las bajas recapturas se deben a que después de la emergencia o, en este caso, después de la liberación, ocurre un movimiento de amplia dispersión seguido de un movimiento más localizado después del descubrimiento de condiciones ambientales favorables. Otros autores como Steiner et al. (1961), reportan que la ausencia de hospederos maduros estimula que las moscas se dispersen más rápidamente.

Analizando la captura de las moscas, se observó que la mayor parte de estas (50 y 80%), ocurrió en las trampas que estaban más próximas al punto de liberación, lo que concuerda con lo mencionado por Peck et al. (2005), que reportan que el 95% de las capturas de machos de *B. cucurbitae* ocurrió en trampas cercanas al punto de liberación, indicando que la población liberada no se dispersa más allá de 500 m del punto de liberación durante los primeros días; asimismo, Hernández et al. (2007)

reportaron que los machos estériles de *A. ludens* se desplazaron cerca de 150 m durante los 15 días posteriores a la liberación.

La distancia máxima de desplazamiento en este trabajo, fue menor a la reportada en trabajos previos (Fletcher 1989, Kovaleski 1999, Peck et al. 2005); posiblemente debido a que el tamaño de la superficie y tiempo de trapeo fueron menores. En estudios previos se reportan como distancias máximas de 800 hasta 2,136 m; sin embargo, los insectos recapturados a estas distancias fueron pocos. Bressan y Teles (1991), Thomas y Loera-Gallardo (1998), Peck et al. (2005) atribuyeron este rango de vuelo tan corto a las condiciones favorables que se localizaron en el sitio de liberación; en donde probablemente los árboles les brindaron refugio y alimentación en forma adecuada.

La dispersión de los insectos estériles como es el caso de las moscas de la fruta no es un proceso de simple difusión, ya que también pueden adoptar alguna preferencia hacia una determinada zona (Hernández et al. 2007), como se observó en nuestro estudio, que conforme transcurrieron los días de captura, el mayor desplazamiento de los machos fue en dirección sur-sureste, lo cual coincidió con la localización de árboles de mayor porte y por lo tanto, era una área con mayor cobertura de sombra y la temperatura en ese microclima tuvo un menor efecto negativo para los insectos que en el resto del área del huerto. Pero en general, el desplazamiento se registró hacia los cuatro puntos cardinales.

La longevidad de los machos liberados fue similar a la reportada previamente para la misma especie en un huerto de mango con características ambientales similares a la descrita en nuestra investigación. Esta fue de dos días, determinada como esperanza de vida (Hernández et al. 2007), pero fue menor a la reportada en otros trabajos (Thomas y Loera-Gallardo, 1989). Cabe aclarar que durante las liberaciones se estuvieron realizando algunas prácticas agrícolas, como aplicaciones de productos químicos, dado a que estaba iniciando el periodo de fructificación y cosecha.

En este trabajo, los machos estériles con y sin presencia de conidios tuvieron un desempeño similar en cuanto a duración de la cópula y al número total de espermatozoides transferidos a las hembras silvestres. Además, la inoculación no tuvo efecto significativo en el desempeño sexual de machos estériles, y la duración de la cópula hace que la transmisión de conidios hacia la hembra sea eficaz. Contrario a lo establecido, en este caso una cantidad menor de espermatozoides transferida a la espermateca de las hembras podría aumentar indirectamente la eficiencia de este método, pues la hembra tratada con conidios tendría un periodo refractario menor (= una posibilidad de recópula mayor) y podría infectar a otros machos silvestres, ya que las hembras de *A. ludens* tienen un menor periodo de reapareamiento después de aparearse con machos estériles (Bloem et al. 1993; Rull et al. 2005).

Los resultados anteriores y el hecho de que machos estériles con y sin conidios tuvieran un comportamiento similar de dispersión en campo y longevidad, apoyan la alternativa de usar insectos estériles tratados con hongos para llevar a cabo la introducción de conidios como un elemento más de mortalidad en la población silvestre

de la plaga. Campos et al. (2008) reportaron datos preliminares indicando que, en condiciones naturales, 65% de hembras silvestres de *C. capitata* estuvieron infectadas con conidios de *B. bassiana* en cafetales sujetos a liberaciones de machos estériles portadores de conidios.

La recaptura de machos estériles puede considerarse como un indicador del número de insectos que sobreviven un mayor tiempo en el ambiente. En este experimento, fueron los machos estériles sin conidios los que prevalecieron un menor tiempo, factor que podría ser una limitante para esta nueva propuesta; sin embargo, la densidad de machos estériles liberados durante este experimento fue menor a la densidad que se maneja en forma convencional cuando se aplica la TIE contra la plaga, si se siguiera este mismo procedimiento con los insectos autodiseminadores se aumentaría el número de machos en el ambiente lo que podría hacer más eficiente dicha propuesta. Además, no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos de insectos liberados, registrándose un promedio en los días de vida similar (1-2 días).

La propuesta de liberar machos estériles de *A. ludens* como autodiseminadores de conidios de *B. bassiana* se ve reforzada con los resultados obtenidos, ya que los patrones de dispersión y longevidad para ambos grupos de machos fueron estadísticamente similares. En este sentido, se han realizado numerosos estudios con el objetivo de describir la dispersión de los adultos estériles de varias especies de moscas de la fruta, concluyendo que las moscas no se dispersan a grandes distancias

del sitio de liberación, principalmente si en el área donde fueron liberadas encuentran refugio y alimento.

La alternativa de usar machos estériles como autodiseminadores de hongos entomopatógenos tiene algunas restricciones por el momento, pero su aplicación representa un gran potencial en los programas de control de moscas de la fruta. Desde su concepción, esta propuesta se ha enfocado hacia áreas donde otros métodos de control no son compatibles con los métodos de producción o las condiciones existentes propias de la zona, tales como fincas orgánicas, áreas de difícil acceso para el personal de control, áreas con impedimentos de tipo social a métodos tradicionales de control como trampas-cebos, áreas urbanas y huertos familiares (Toledo et al. 2007). Además, se requiere conocimiento adicional acerca de la transmisión de conidios por los machos vectores en condiciones naturales de campo, así como el desarrollo de métodos óptimos de inoculación antes de realizar la liberación aérea, que permitan encontrar la combinación de dosis de conidios-desempeño-longevidad adecuadas para su buen funcionamiento. Estas son las áreas de conocimiento que deben mejorarse para fortalecer este enfoque innovador de control de plagas.

6. LITERATURA CITADA

- Alatorre R. 2000. Hongos entomopatógenos. Pp. 123-134. *En*: Ibarra, J., M. C. del Rincón, J. Leyva (Eds.). Memorias del XI Curso Nacional de Control Biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico. Guanajuato, Gto. México.
- Al-mazra'awi M. S, Shipp L, Broadbent B, Kevan P. 2006. Biological control de *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae) and *Frankiniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) by *Bombus impatiens* (Hymenoptera: Apidae) vectored *Beauveria bassiana* in greenhouse sweet pepper. *Biol. Control*. 37: 89-97.
- Allinghi A, Calcagno G, Petit-Marty N, Gómez Cendra P, Segura D, Vera T, Cladera J, Gramajo C, Willink E, Vilardi JC, 2007. Compatibility and competitiveness of a laboratory strain of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) after irradiation treatment. *Fla. Entomol*. 90: 27-32.
- Aluja M, Hendrichs J, Cabrera M. 1983. Behavior and interactions between *Anastrepha ludens* (Loew) and *A. obliqua* (Macquart) on a field caged mango tree – Lekking behavior and male territoriality. Pp. 122-133. *En*: R. Cavalloro (Ed.). Fruit flies of economic importance. A. Balkema. Róterdam, The Netherlands.
- [APHIS] Animal and Plant Health Inspection Service. 1970. Foreign quarantine notices. U. S. D. A. Code de Federal Regulations. Title 7. Agriculture. Chapter III. Part 319. Washington, D. C. pp. 217-260.
- Arita LH, Kaneshiro KY. 1985. The dynamics of the lek system and success in males of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata* (Wiedemann). *Proc. Hawaiian Entomol. Soc*. 25: 39-48.

- Baker PS, Chan AST, Jimeno-Zavala A. 1986. Dispersal and orientation of sterile *Ceratitis capitata* and *Anastrepha ludens* (Tephritidae) in Chiapas, México. J. Appl. Ecol. 23: 27-38.
- Barclay HJ. 1992. Modelling the effects of population aggregation on the efficiency of insect pest control. Res. on Popul. Ecol. 34: 131-134.
- Barry JD, Blessinger T, Morse JG. 2004. Recapture of sterile Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae) in California's preventative release program. J. Econ. Entomol. 97: 1554-1562.
- Barson G, Renn N, Bywater F. 1994. Laboratory evaluation de six species de entomopathogenic fungi for the control de the house fly (*Musca domestica* L.), a pest de intensive animal units. J. Invertebr. Pathol. 64: 107-113.
- Bloem K, Bloem S, Rizzo N, Chambers D. 1993. Female medfly refractory period: effect of male reproductive status. Pp. 189-190. En: Aluja, M. and P. Liedo (Eds.). Fruit flies: Biology, and management. Springer, New York, USA.
- Bressan S, Teles MC. 1991. Recaptura de adultos marcados de *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae) liberados em apenas um ponto do pomar. Rev. Brasileira Entomol. 35: 679-684.
- Calcagno GE, Manso F, Vilardi JC. 2002. Comparison of mating performance of medfly (Diptera: Tephritidae) genetic sexing and wild type strains: field cage and video recording experiments. Fla. Entomol. 85: 41-50.
- Calkins CO, Parker AG. 2005. Sterile insect quality. Pp. 269-296. In: Dyck, V. A., J. Hendrichs, A. S. Robinson (Eds.). Sterile Insect Technique. Principles and practice of area-wide integrated pest management. Springer, The Netherlands.

- Calkins CO, Webb JC. 1983. A cage and support framework for behavioral tests of fruit flies in the field. *Fla. Entomol.* 66: 512-514.
- Campos SE, Flores S, Espinoza E, Montoya P, Villaseñor A, Toledo J. 2008. Control de *Ceratitis capitata* en zonas cafetaleras mediante liberaciones de adultos estériles transmisores de conidios de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. P. 156. In: Proceedings of the 7th Meeting of the Working Group on Fruit Flies of the Western Hemisphere. Compiled by Montoya P, Diaz F, Flores S. Mazatlán, Sinaloa, Mexico.
- Castillo MA, Moya P, Hernández E, Primo-Yúfera E. 2000. Susceptibility of *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) to entomopathogenic fungi and their extracts. *Biol. Control*, 19: 274-282.
- Cayol JP. 2000. Changes in sexual behavior and in some life history traits of Tephritid species caused by mass-rearing processes. Pp. 843-860. En: Aluja, M., A. Norrbom (Eds.). *Fruit flies (Diptera: Tephritidae): Phylogeny and evolution and behavior*. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA.
- Christenson LD, Foote R. 1960. Biology de fruit flies. *Annu. Rev. Entomol.* 5: 171-192.
- De la Rosa W. 1995. Hongos entomopatógenos. Pp. 100-110. *En: Memorias del VI Curso Nacional de Control Biológico*. Sociedad Mexicana de Control Biológico y EL Colegio de la Frontera Sur. Tapachula, Chiapas, México.
- De la Rosa W, Alatorre R, Barrera JF, Toriello, C. 2000. Effect de *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) upon the coffee berry borer (Coleoptera: Scolytidae) under field conditions. *J. Econ. Entomol.* 93: 1409-1414.
- De la Rosa W, López FL, Liedo P. 2002. *Beauveria bassiana* as a pathogen de the Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae) under laboratory conditions. *J. Econ. Entomol.* 95: 36-43.

- Dimbi S, Maniania NK, Lux SA, Ekesi S, Mueke M. 2003. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin and *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, to three adult fruit fly species: *Ceratitis capitata* (Weidemann), *C. rosa* var. *fasciventris* Karsch and *C. cosyra* (Walker) (Diptera: Tephritidae). *Mycopathologia*, 156: 375-382.
- Dimbi S, Maniania NK, Ekesi S. 2009. Effect of *Metarhizium anisopliae* inoculation on the mating behaviour of three species of African Tephritid fruit flies, *Ceratitis capitata*, *Ceratitis cosyra* and *Ceratitis fasciventris*. *Biol. Control*. 50: 116-116.
- Domínguez J, Castellanos D, Hernández-Ortiz E, Martínez A. 2000. Métodos de cría masiva de moscas de la fruta, Pp. 399-414. 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.
- Eady PE. 1995. Why do males *Callosobruchus maculatus* beetles inseminate so many sperm?, *Behavioral, Ecol. Sociobiol.*, 36: 25-32.
- Ekesi S, Maniania NK, Lux SA. 2002. Mortality in three African tephritid fruit fly puparia and adults caused by the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *Biocon. Sci. Technol.* 12: 7-17.
- Enkerlin D, Garcia RL, Lopez MF. 1989. Mexico, Central and South America, Pp. 83-90. *In: A. S. Robinson, G. Hooper [eds.]. Fruit flies: Their biology, natural enemies and control. Vol. 3A. World crop pests. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.*
- [FAO/IAEA/USDA]. Food and Agriculture Organization/International of Atomic Energy Agency/United States Department of Agriculture. 2003. Manual for product quality

control and shipping procedures for sterile mass-reared Tephritid fruit flies, version 5.0. International Atomic Energy Agency. Vienna, 85.

Field SA, Yuval B. 1999. Nutritional status affects copula duration in the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Insecta: Tephritidae). *Ethol. Ecol. Evol.*, 11: 61-70.

Field SA, Taylor PW, Yuval B. 1999. Sources of variability in copula duration of Mediterranean fruit flies. *Entomol. Exp. Appl.* 92: 271-276.

Fletcher BS. 1989. Movement of tephritid fruit flies. Pp. 209-219. In: Robinson A. S., G. Hooper (Eds.), *Fruit flies: Their biology, natural enemies and control*. Vol. 3B. Elsevier. The Netherlands.

García AE. 2004. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen (Adaptado a las condiciones de la República Mexicana). Ed. por la Universidad Nacional Autónoma de México. 5a Ed. Mexico, D. F. 90 p.

Hernández E, Orozco D, Flores Breceda S, Domínguez J. 2007. Dispersal and longevity of wild and mass-reared *Anastrepha ludens* and *A. obliqua* (Diptera: Tephritidae). *Fla. Entomol.* 90: 123-135.

Hernández-Ortíz V. 1992. El género *Anastrepha* Schiner en México (Diptera:Tephritidae). Taxonomía, distribución y plantas huéspedes. Instituto de Ecología, A. C. y Soc. Mex. de Entomología. Publ. 33, Xalapa, México, D.F. 162 p.

Hernández-Ortíz V. 1996. Tephritidae: Diptera. Pp. 603-618. En: Llorente-Bousquets, J., A. N. García-Aldrete, E. González-Soriano (Eds.). *Biodiversidad, taxonomía y biogeografía de artrópodos de México: Hacia una síntesis de su conocimiento*. UNAM, CONABIO, México.

- Hernández-Ortíz V, Aluja M. 1993. Listado de especies del género neotropical *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) con notas sobre su distribución y plantas hospederas. *Folia Entomol. Mex.* 88: 89-105.
- Hendrichs MA, Hendrichs J. 1998. Perfumed to be killed: Interception of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) sexual signalling by predatory foraging wasps (Hymenoptera: Vespidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 91: 228-234.
- Hendrichs J, Robinson AS, Cayol JP, Enkerlin W. 2002. Medfly areawide sterile insect technique programmes for prevention, suppression or eradication: The importance of mating behavior studies. *Fla. Entomol.* 85: 1-13.
- Hendrichs J, Vreysen MJB, Enkerlin WR, Cayol JP. 2005. Strategic options in using sterile insects for area-wide integrated pest management. Pp. 563-600. En: Dyck, V. A., J. Hendrichs, A. S. Robinson (Eds.). *Sterile Insect Technique. Principles and practice of area-wide integrated pest management.* Springer, The Netherlands,
- Hendrichs J, Wornoayporn V, Katsoyannos BI, Gaggi K. 1993. First field assessment of dispersal and survival of mass reared Mediterranean fruit fly males of an embryonal, temperature sensitive genetic sexing strain. Pp. 453-462. In: *Management of Insect Pests: Nuclear and Related Molecular and Genetic Techniques.* IAEA/FAO, Vienna.
- Kaaya GP, Munyinyi DM. 1995. Biocontrol potential de the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisoplae* for tsetse flies (*Glossina* spp.) at development sites. *J. Invertebr. Pathol.* 66: 237-241.
- Klassen W. 2005. Area-wide integrated pest management and the Sterile Insect Technique. Pp. 39-68., In: Dyck, V. A, J. Hendrichs J, Robinson AS. (Eds.). *Sterile*

Insect Technique. Principles and practice of area-wide integrated pest management. Ed. by Springer. The Netherlands.

Klassen W, Curtis CF, 2005. History of the Sterile Insect Technique. In: Sterile Insect Technique. Pp. 3-38. In: Principles and practice of area-wide integrated pest management.. by Dyck, VA, Hendrichs J, Robinson AS. (Eds.). Springer, The Netherlands.

Knipling EF. 1955. Possibilities in insect control or eradication through the use of sexually sterile males. J. Econ. Entomol. 48: 459-462.

Konstantopoulou M, Mazomenos B. 2005. Evaluation of *Beauveria bassiana* and *B. brongniartii* strains and four wild-type fungal species against adults of *Bactrocera oleae* and *Ceratitis capitata*. BioControl, 50: 293-305.

Kovaleski A, Sugayama RL, Malavasi A. 1999. Movement of *Anastrepha fraterculus* from native breeding sites into apple orchards in Southern Brazil. Entomol. Exp. Appl. 91: 457:463.

Kraaijeveld K, Katsoyannos BI, Stavrinides M, Kouloussis NA, Chapman T. 2004. Remating in wild females on the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. Anim. Behaviour. 69: 771-776.

Lance DR, McInnis DO. 2005. Biological basis of the sterile insect technique. Pp. 69-94. In: Dyck, V. A., J. Hendrichs, A. S. Robinson (Eds.). Sterile Insect Technique. Principles and practice of area-wide integrated pest management. Springer. Dordrecht, The Netherlands.

Lux SA, Munyinyi FN, Vilardi JC, Liedo P, Economopoulos AP, Hasson O, Quilici S, Gagli K, Cayol JP, Rendon P. 2002. Consistency in courtship pattern among

populations of medfly *Ceratitis capitata*: comparison among wild strains and strains mass-reared for SIT operations. Fla. Entomol. 85: 113-125.

Madelin MF. 1963. Diseases caused by Hyphomyceteus fungi. Pp. 223-271. In: Stenhaus, E. A. (Ed.). Insect Pathology and Advanced. Vol. 2. Academic Press. London.

Maniania NK, Odulaja A. 1998. Effect de species, age and sex de tse tse on response to infection by *Metarhizium anisopliae*. Biocontrol. 43: 311-323.

McInnis DO, Tam SYT, Grace C, Miyashita D. 1994. Population suppression and sterility rates induced by variable sex-ratio, sterile insect releases of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in Hawaii. Ann. Entomol. Soc. Am. 87: 231-234.

McInnis DO, Lance DR, Jackson G. 1996. Behavioral resistance of the steriles insect technique by the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) in Hawaii. Ann. Entomol. Soc. Am. 89: 739-744.

McInnis DO, Shelly TE, Komatsu J. 2002. Improving male competitiveness and survival in the field for medfly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) SIT programmes. Genetica. 116: 117-124.

McInnis DO. 1993. Size differences between normal and irradiated sperm heads in mated female Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 88: 306-308.

Meats A. 2007. Dispersion of fruit flies (Diptera: Tephritidae) at high and low densities and consequences of mistmatching dispersions of wild and sterile flies. Fla. Entomol. 90: 136-146.

Miyatake T, Haraguchi D. 1996. Mating success in *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae) under different rearing densities. Ann. Entomol. Soc. Am. 89: 284-289.

- Monzón A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integrado de Plagas*. 63: 95-103.
- Moreno D, Mangan R. 2000. Novel insecticide strategies such as phototoxic dyes in adult fruit fly control and suppression programmes. Pp. 421-432. In: Area-wide control of fruit flies and other insect pests: Joint Proceedings of the International Conference on Area-Wide Control of Insect Pests and the 5th. International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance. Keng-Hong Tan (Ed.). Pulau Pinang, Malaysia.
- Moreno DS, Sánchez M, Robacker DC, Worley J. 1991. Sexual competitiveness of irradiated Mexican fruit fly (diptera. Tephritidae). *J. Econ. Entomol.* 84:1227-1234.
- Moritz RFA. 1984. The effect of different diluents on insemination success in the honeybee using mixed semen. *J. Apicul. Res.* 23: 164-167.
- Norrbom AL, Zucchi RA, Hernández-Ortiz V. 2000. Phylogeny of the genera *Anastrepha* and *Toxotrypana* (Trypetinae: Toxotrypanini) based on morphology. Pp. 299-342. In: M. Aluja, A. L. Norrbom (Eds.). *Fruitflies (Tephritidae): Phylogeny and evolution of the behaviour*. CRC Press. USA.
- Orozco-Davila D, Hernández R, Meza S, Domínguez J. 2007. Sexual competitiveness and compatibility between mass-reared sterile flies and wild populations of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) from different regions in Mexico. *Fla. Entomol.* 90: 19-26.
- Peck S, Mcquate LGT, Vargas RI, Seager DC, Revis HC, Jang EB, McInnis DO. 2005. Movement of sterile male *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae) in a hawaiian agroecosystem. *J. Econ. Entomol.* 98: 1539-1550.

- Plant RE, Cunningham R. 1991. Analyses de the dispersal de sterile Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae) released de a point source. *Environ. Entomol.* 20: 1493-1503.
- Quesada-Moraga E, Martin-Carballo I, Garrido-Jurado I, Santiago-Álvarez C. 2008. Horizontal transmission of *Metarhizium anisopliae* among laboratory populations of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). *Biol. Control*, 47: 115-124.
- Robacker DC, Mangan R, Moreno D, Tarshis Moreno A. M. 2003. Behavior and interactions de wild *Anastrepha ludens* Loew (Diptera: Tephritidae) males on a grapefruit tree. *Folia Entomol. Mex.* 42: 221-237.
- Robinson AS, Cayol JP, Hendrichs J. 2002. Recent findings on medfly sexual behavior: Implications for SIT. *Fla. Entomol.* 85: 171-181.
- Robinson AS. 2005. Genetic basis of the Sterile Insect Technique. pp. 95-114. In: Dyck, V. A., J. Hendrichs and A. S. Robinson (Eds.). *Sterile Insect Technique. Principles and practice of area-wide integrated pest management.* Springer, The Netherlands.
- Rull J, Brunel O, Méndez ME. 2005. Mass rearing history negatively affects mating success of male *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) reared for sterile insect technique programs. *J. Econ. Entomol.* 98: 1510-1516.
- Samson R.A, Evans LE. 1982. Two new *Beauveria* spp. de Southamerica. *J. Invert. Pathol.* 39: 93-97.
- [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.

- Saul SH, McCombs SD. 1993. Dynamics of sperm use in the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae): Reproductive fitness of multiple-mated females and sequentially mated males. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 86: 198-202.
- Statsoft, 2003. Statistica for Windows, Version 6.0. Statsoft Inc. Copyright 1984-2005.
- Steiner LF, Rohwer GG, Ayers EL, Christenson LD. 1961. The role of attractants in the recent Mediterranean fruit fly eradication in Florida. *J. Econ. Entomol.* 54: 30-35.
- Splus. 2007. Enterprise developer. Versión 7.0. Insightful Inc. Copyright 2000-2008.
- Taylor PW, Yuval B. 1999. Postcopulatory sexual selection in Mediterranean fruit flies: advantages for large and protein-fed males. *Anim. Behav.* 58: 247-254.
- Taylor PW, Kaspi R, Yuval B. 2000. Copula duration and sperm storage in Mediterranean fruit flies of a wild population. *Physiol. Entomol.* 25: 94-99.
- Thomas DB, Loera-Gallardo J. 1998. Dispersal and longevity of mass-released, sterilized Mexican fruit flies (Diptera:Tephritidae). *Environm. Entomol.* 27: 1045-1052.
- Toledo J. 2003. Control microbiano de moscas de la fruta: Avances y perspectivas. Pp. 105-110. *Memorias del XV Curso Internacional sobre Moscas de la Fruta*. Centro Internacional de Capacitación en Moscas de la Fruta. Metapa de Domínguez, Chiapas, México.
- Toledo J, Campos SE, Liedo P, Oropeza A. 2003a. Interacción de la bioelectrostática y los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* (Deutomycetes) sobre la mosca Mexicana de la fruta, *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). *El Colegio de la Frontera Sur. Informe Técnico.* 18 p.
- Toledo J, Campos SE, Flores S, Liedo P, Barrera JF, Villaseñor A, Montoya P. 2007. Horizontal transmission of *Beauveria bassiana* in the mexfly, *Anastrepha ludens*

- (Diptera: Tephritidae), under semi-natural conditions. J. Econ. Entomol. 100: 291-297.
- Vera MT, Cladera JL, Calcagno G, Vilardi JC, McInnis DO and Field Working Group. 2003. Remating of wild *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) females in field cages. Ann. Entomol. Soc. Am. 96: 563-570.
- Vergara-Olaya JD, Orozco HJ, Bustillo PAE, Chaves CB. 2001. Dispersión de *Phymasticus coffea* en un lote de café infestado de *Hypothenemus hampei*. Cenicafé. 52: 104-110.
- Ward PI. 1998. A possible explanation for cryptic female choice in the yellow dung fly, *Scathophaga stercoraria* (L.). Ethology, 104: 97-10.
- Watson DW, Geden CJ, Long SJ, Rutz DA. 1995. Efficacy de *Beauveria bassiana* for controlling the house fly and stable fly (Diptera: Muscidae). Biol. Control. 5: 405-411.
- Watson DW, Long SJ, Rutz DA. 1996. *Beauveria bassiana* and sawdust bedding for the management de the house fly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) in calf hutches. Biol. Control. 7: 221-227.
- Webster R, Oliver A. 2001. Geostatistics for environmental scientists. John Wiley and Sons, LTD. 271 pp.
- Whittier TSK, Kaneshiro Y, Prescott LD. 1992. Mating behavior of Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae) in a natural environment. Ann. Entomol. Soc. Am. 85: 214-218.
- Wong TTY, Nishimoto JI, Coury HH. 1983. Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae): Further studies on selective mating response of wild and unirradiated and irradiated laboratory-released flies in field cages. Ann. Entomol. Soc. Am. 76: 51-55.

Zalucki MP, Drew RAI, Hooper GHS. 1984. Ecological studies of eastern Australian fruit flies (Diptera: Tephritidae) in their endemic habitat. II. The spatial pattern of abundance. *Oecologia*. 64: 273-279.

Anexo 1. Normas editoriales Journal of Applied Entomology

The *Journal of Applied Entomology* publishes original articles on current research in applied entomology, including mites and spiders in terrestrial ecosystems. Research on stored product pests will be also accepted. The language of publication is English. All manuscripts are evaluated in a peer-review process.

Authors are requested to recommend at least 3 potential reviewers for their manuscript.

Pre-submission English-language editing

Authors, whose native language is not English, are requested to consult a native English speaker before submission of their manuscript. A list of independent suppliers of editing services can be found at www.blackwellpublishing.com/bauthor/english_language.asp.

All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

1. Manuscript submission

Go to the *Journal of Applied Entomology* Manuscript Central site at <http://mc.manuscriptcentral.com/jappent> and create an account. The submission must be done from the corresponding author's account.

If you encounter technical problems when submitting your manuscript, please contact:
Journal of Applied Entomology Manuscript Central Support

e-mail: Support@ScholarOne.com

phone: (434) 817-2040 ext.167 USA

2. Types of manuscripts

Original contributions

Short communications

Advances in methodology

Mini reviews

Perspectives

Book reviews

3. Manuscript requirements

Manuscripts that do not strictly adhere to the instructions will not be accepted for further processing.

External form

Original articles should not exceed 6,000 words

Short communications should not exceed 1,500 words.

The manuscript has to be submitted as **Microsoft Word** or **Rich Text Format**

The lines of the manuscript must be numbered consecutively throughout the entire manuscript.

The manuscript should be arranged as follows:

Manuscript title

Please limit the title to 16 words.

Manuscript short title

Please provide a short title (running head), a maximum of 8 words.

Abstract

The abstract should refer to the main hypotheses and results and emphasize the key findings of the research, indicating the generality and applicability of the results.

The abstract should not exceed 300 words.

Keywords

Provide a maximum of seven key words to the abstract. Avoid overlap with the title.

Text

The text body should be properly structured according to the requirements of the category (original articles: abstract, keywords, short title, introduction, material and methods, results, discussion, acknowledgements, references, figures and tables).

Scientific names of genus, species, and subspecies should be formatted in italics.

The full name of species and subspecies must be used when first mentioned in a paper, and its abbreviation used thereafter.

Abbreviations must be explained in the text.

Authors are requested to use the International System of Units (SI, *Système International d'Unités*)

References

References in Articles

We recommend the use of a tool such as EndNote or Reference Manager for reference management and formatting.

EndNote reference styles can be searched for here:

<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>

Reference Manager reference styles can be searched for here:

<http://www.refman.com/support/rmstyles.asp>

Each reference should conform to the examples given below, with author names separated only by a comma as shown. Full stops should not be used in the forename initials. The name of a journal should be given in the abbreviated form, strictly following the codes given in

<http://library.caltech.edu/reference/abbreviations/>

The references should be listed in alphabetical order according to the surname of the first author and should give the full title of the paper. Anonymous contributions should be cited at the beginning of the bibliography.

From journals:

a. Engels H, Sinha A, Schuphan I, Eber **S. 2008. Small-scale dispersal of the European corn borer and its relevance for resistance management in Bt maize. J. Appl. Entomol. 132, 675-680.**

b. From books or other non-serial publications:

Chapman RF, 1998. The insects - Structure and function. 4th edition. Cambridge University Press, Cambridge.

c. From reference book contributions:

Zlotkin E, 2001. Insecticides affecting voltage-gated ion channels. In: Biochemical site of insecticide action and resistance. Ed. by Ishaaya I, Springer, Berlin, Heidelberg, 43-76.

d. Unpublished work should only be cited when it has been accepted for publication, and then together with the name of the journal in which it has been accepted.

Ciosi M, Toepfer S, Li H, Haye T, Kuhlmann U, Wang H, Siegfried B, Guillemaud T. 2008. **European populations of *Diabrotica virgifera virgifera* are resistant to aldrin, but not to methyl-parathion.** *J. Appl. Entomol.* (in press).

e. online citation:

Beckleheimer J, 1994. How do you cite URLs in a bibliography? [WWW document]. URL <http://www.nrlssc.navy.mil/meta/bibliography.html>.

f. using the DOI (Digital Object Identifier) number

Nestel D, Papadopoulos NT, Miranda Chueca MA 2008. **Current advances in the study of the ecology of fruit flies from Europe, Africa and the Middle.** *J. Appl. Entomol.* DOI: 10.1111/j.1439-0418.2008.01378.x

In the running text, citations should be made as in the following examples: Beroks and Bode (1999), or (Richter 1991, 1993; Starck and Schneider 2001). Up to two authors, give the names; for more than two authors, give the name of the first author followed by "et al."

Tables

Tables must be uploaded separately. Please number tables consecutively in the order in which they occur in the text. Tables should be created using the table function in MS Word. Please mark the position of the tables in the text.

Figures

Figures must be uploaded separately. Please number figures consecutively in the order in which they occur in the text. All figures must be provided in **Microsoft Word, RTF, or JPEG**. Please mark the position of the figures in the text.

Line drawings should only be contour drawings without halftones (photo, shades of grey). Please do not use patterns; rough hatching is possible. Graphs with an x and y axis should not be enclosed in frames.

Colour figures (including photographs) must be accompanied by the Colour Work Agreement Form (CWA). The cost for colour printing must be paid by the author.

Even if you want them to be printed in black/white you have to send the CWA!

Make sure that the quality of coloured figures is provided allowing black/white printing.

4. Copyright Assignment

Authors are required to assign the Copyright Transfer Agreement (CTA) to publish their paper to Wiley-Blackwell and the *Journal of Applied Entomology*. **Publication cannot proceed without a signed copy of this agreement** (Papers subject to government or Crown copyright are exempt from this requirement). Please download the Copyright Transfer Agreement here.

5. Proof correction and offprints

The corresponding author will receive proofs via e-mail as an Acrobat PDF file which should be reviewed and returned without delay using the resubmission instructions at <http://mc.manuscriptcentral.com/jappent>

The corresponding author will receive a pdf file as an offprint. Additional offprints can be ordered on the form attached to the proofs. Offprints ordered at a later date will be subject to an extra charge.

6. Book reviews

Book reviews are usually published in the fields of ecology and entomology. At the beginning of each book review, precise bibliographic details must be given in the following form: Family name, followed by the Christian name initials of the author of the book; the book's title; which edition (if not the first); place of publication; name of

publisher; year of publication; number of pages, figures and tables; ISBN; binding and retail price.

7. Author Services

Online production tracking is now available for your article through Wiley-Blackwell's Author Services.

Author Services enables authors to track their article - Once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit www.blackwellpublishing.com/bauthor for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

Last update: December 2008