



El Colegio de la Frontera Sur

Interacción de *Beauveria bassiana* y *Coptera haywardi*
(Hymenoptera: Diapriidae) para la supresión de *Anastrepha*
obliqua (Diptera: Tephritidae)

Tesis

Presentada como requisito para optar al grado de
Doctorado en Ciencias en Ecología y Desarrollo Sustentable
Con Orientación en Ecología de Artrópodos y Manejo de Plagas.

Por

Olga Yaneth Martínez Barrera

2019



El Colegio de la Frontera Sur

Tapachula, Chis., 12 de agosto de 2019

Las personas abajo firmantes, miembros del jurado examinador de:

Olga Yaneth Martínez Barrera

hacemos constar que hemos revisado y aprobado la tesis titulada

Interacción de *Beauveria bassiana* y *Coptera haywardi* (Hymenoptera: Diapriidae) para la supresión de *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae)

Para obtener el grado de **Doctora en Ciencias en Ecología y Desarrollo Sustentable**

	Nombre	Firma
Director	Dr. Jorge Toledo Arreola	_____
Co-Director	Dr. Pablo Jesús Montoya Gerardo	_____
Asesor	Dr. José Pablo Liedo Fernández	_____
Asesor	Dr. Jorge Luis Cancino Díaz	_____
Asesor	Dr. Jaime Gómez Ruiz	_____
Sinodal adicional	Dr. Salvador Flores Breceda	_____
Sinodal adicional	Dra. Rebeca González Gómez	_____
Sinodal suplente	Dra. Ariane Liliane Jeanne Dor	_____

DEDICATORIA

*¡A **Dios**, por todo!*

Por todas las bendiciones, experiencias, oportunidades, personas, vivencias, retos, y la fuerza que me ha dado para seguir luchando y soñando día a día.

*A todos y cada uno de los miembros de mi **familia**, por sus oraciones y constante apoyo en la distancia. En especial a:*

*Mis padres **Maria Elena y Ramon Antonio**, por cada sacrificio, por cada lucha, por su ejemplo y amor de padres. Mi gran inspiración y apoyo incondicional.*

*Mis hermanos **Diana, Nury, Luz y Wilson** por todo su apoyo, ejemplo, guía y consejos.*

*Mis sobrinitos **Lauris, Sofi y Gabito**, son y serán siempre la sonrisita y la luz de mi alma.*

*Mis abuelitos, **Don Jose (†)** te me fuiste iniciando este sueño, te extraño mucho, pero sé que desde el cielo siempre me proteges. **Maria Adelina**, abuelita hermosa, guerrera, ustedes son mi guía, mi ejemplo a seguir y por quienes me enorgullezco de ser agrodendiente, mi gran inspiración y por quienes asumo día a día un gran compromiso profesional en el sector agropecuario.*

*A mis tios en especial a mi **Tia Claudia, Tio Carlos, Tia Carmenza, Tia Doris, Tio Neftalí y Tia Gladis** gracias por siempre estar pendiente de mi y por incondicional apoyo.*

*A mis primitos en especial **Alice, Jeimy, Arlette, Jenny** y mi ahijadita **Nayi**, gracias siempre por su amistad y apoyo.*

“Familia... Como las ramas de un árbol, crecemos en direcciones diferentes. Pero las raíces siguen siendo las mismas”. Autor desconocido

*A quienes a pesar de la distancia y el olvido se que podre contar con su valiosa amistad: **Diana Jennifer, Dianita Pabon, Maribel, América, Andres, Adri, Osquillar, Lili, Rafa, Luisitico, Pedrito Pico, Mayren, Everth y Angela**. Gracias siempre por su apoyo, ayuda y palabras de aliento.*

*A **José Eleazar Gómez Palacios**, a ti, por tu amor, por tu gran paciencia, consejos, regaños, amistad y comprensión. Que bueno fue coincidir en este camino.*

AGRADECIMIENTOS

En este momento, se torna tan difícil incluir en esta parte a todos los que formaron parte de este largo proceso, donde no se llega sólo, donde cada palabra, ayuda, experiencia y vivencia han contribuido a seguir cada paso en este camino hasta lograr la culminación de este objetivo... quisiera incluir a todos, pero creo que será algo difícil...

¡Diosito, Gracias por cada día de mi vida!

¡A México lindo y querido!

Por adoptarme y acogerme, por brindarme una excelente formación profesional y miles de vivencias personales y profesionales que me han permitido crecer día a día.

Al Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la valiosa formación y apoyo económico a estudiantes extranjeros.

A las grandes personas, profesionales e investigadores, con las que tuve la fortuna que pertenecieran en mi *Comité Tutorial* y que fueran mi guía en este trayecto de camino.

Dr. Pablo Montoya: Gracias por valiosa codirección, por todo su apoyo, confianza, paciencia, consejos y conocimientos. Por abrirme las puertas de Moscafrut, conceder todo lo necesario para que mi proyecto se pudiera realizar y así seguir aumentando mi gusto por el conocimiento en moscas de las frutas.

Dr. Pablo Liedo. Infinitas gracias por todo. Por su incondicional apoyo y ayuda, cada palabra de aliento, cada guía, por creer en mí, por sus conocimientos, por ser ese gran ejemplo de persona integral, por no permitir que bajara la guardia y siguiera adelante hasta concluir este proceso. ¡Muchas gracias sumercé!

Dr. Jorge Cancino: Gracias por toda su ayuda, apoyo, guía, consejos, conocimientos, aportes, espontaneidad, y veracidad.

Dr. Jaime Gómez: Gracias por todo el apoyo, guía, consejos y siempre buena disposición y ayuda incondicional.

Dr. Jorge Toledo: Por aceptar y asumir con responsabilidad la dirección de este proceso de formación.

A todo el personal de MOSCAFRUT, en especial:

Al Departamento de Detección y Control: Gracias Sergio por toda su gran ayuda y guía, fue muy valiosa en la realización de este trabajo, mi amiguita Florida, Dr. Salvador, Orlando, Carmen, Emigdio, Gustavo y en su momento al Ing. Enoc.

Al Departamento de Control Biológico: Dr. Jorge Cancino, Amanda, Erick, Don Veli, Paty Rosario y aunque ahora no están en esa área pero en su momento recibí su gran ayuda a Paty López y César Galvez.

Al *área administrativa*: Mi amiguita Conchi, Edgar, Paty Baneco y en su momento a la colaboración de Don Arévalo.

Al área de Producción de *Anastrepha obliqua*: En su momento a la Química Trinidad, al Ing. Rosendo y al Ing. Ovando.

A quienes siempre me brindaron una gran amabilidad, una gran sonrisa, su conocimiento y apoyo cuando fueron necesarios: Gracias Pepe, Marisol, Emilio, Salvador Mesa, Bióloga Flor, Bióloga Lia, Eneyda, Julio, Aracely, Luis Miguel... en fin... Muchas gracias a todos. Se les va a extrañar mucho.

A todos quienes conforman ECOSUR Unidad Tapachula.

Todos los investigadores, en especial de los que pude adquirir una parte de su gran conocimiento, y quienes en su momento pude recibir un apoyo y guía a lo largo de este proceso.

Infinitas gracias *Maestro Javier Valle Mora*, por su gran apoyo y ayuda, por sus conocimientos, paciencia y siempre su buena disposición a atender dudas, colaboración y explicación en toda la parte del análisis estadístico.

A quienes aceptaron la gran responsabilidad, con una gran disposición a ser sinodales de este trabajo. Por sus valiosos aportes, críticas, paciencia y ayuda: Dra. Rebeca González, Dra. Arianne Dor, y Dr. Salvador Florez (MOSCAFRUT).

Al Dr. Ernesto Sánchez por facilitarnos realizar nuestros experimentos en su predio y por el apoyo recibido.

Al personal del área administrativa, en especial a Lic. Beatriz, Paulina, Dr. Cristian, Dr. Edi Malo, y el personal de la Biblioteca SIBE, Lic. Ana María y Margarita, por todo el apoyo, la ayuda y guía durante este proceso.

Gracias por el compañerismo a todos los que pertenecieron a la Generación de la Maestría 2015- 2016 y de la generación del Doctorado 2015-2018, en especial a Mati, Pedrito, Sergio, Carla, Maeli, Jorge, Tony, Trini, Carito, Pascual y Franco.

A todas las amistades que fueron creciendo por los pasillos y laboratorios de Ecosur o rincones Tapachultecos: Mayren, Alma, Wero, Shakti, Cristian y enormemente a Doña Norma y Pedrito por tanto cariño y toda su gran ayuda.

A todas aquellas personas que me han brindado palabras, experiencias, consejos, ejemplos, y han sido parte de algún momento de mi vida.

A todos muchas gracias espero tener la fortuna de volver a coincidir nuevamente con ustedes en este largo caminar.

“Nunca te arrepientas de ningun día de tu vida...

Los buenos días te dan FELICIDAD.

Los malos días te dan EXPERIENCIA, ambos son esenciales para la vida.

La FELICIDAD te mantiene dulce.

Los intentos te mantienen FUERTE,

Las penas te mantienen HUMANO,

Las caídas te mantienen HUMILDE,

El éxito te mantiene BRILLANTE,

pero ... ¡solo Dios te mantiene caminando!”

Autor desconocido

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
OBJETIVOS	8
CAPITULO 1.....	9
Does <i>Beauveria bassiana</i> (Hypocreales: Cordycipitaceae) affect the survival and fecundity of the parasitoid <i>Coptera haywardi</i> (Hymenoptera: Diapriidae)?.....	9
CAPITULO 2.....	41
Discriminación de <i>Coptera haywardi</i> (Hymenoptera: Diapriidae) hacia pupas de <i>Anastrepha obliqua</i> (Diptera: Tephritidae) tratadas con <i>Beauveria bassiana</i> (Hypocreales: Cordycipitaceae)	41
CAPITULO 3.....	64
Interaction between <i>Beauveria bassiana</i> (Hypocreales: Cordycipitaceae) and <i>Coptera haywardi</i> (Hymenoptera: Diapriidae) for the management of <i>Anastrepha obliqua</i> (Diptera: Tephritidae)	64
CAPITULO 4.....	91
Discusión general y conclusiones	91
REFERENCIAS	99
ANEXOS.....	106

RESUMEN

La regulación de la población de una plaga se beneficia por la diversidad de sus enemigos naturales y el tipo de interacción intragremial que ocurra entre ellos. Se propuso conocer el tipo de interacción de *Beauveria bassiana* (*Bb*) y *Coptera haywardi* (*Ch*) que permita desarrollar una estrategia para la supresión de la mosca de la fruta *Anastrepha obliqua* (*Ao*). En laboratorio se determinó el efecto de *Bb* sobre el desarrollo, supervivencia y fecundidad de *Ch*, y se caracterizó la discriminación de *Ch* hacia pupas de *Ao* tratadas y no tratadas con *Bb*. En condiciones de campo semi-protegidas, se evaluó la interacción entre *Ch* y *Bb* cuando se usan secuencialmente para la supresión de *A. obliqua*. En laboratorio se inició con la aplicación de *Bb* en conidio seco sobre pupas de *Ao* parasitadas y en adultos de *Ch* de dos edades (1-4 d y 5-10 d). *Bb* no afectó el desarrollo de los estados inmaduros; en adultos, los machos fueron los más susceptibles, pero en las hembras, no afectó su fecundidad. La discriminación de *Ch* se caracterizó cuando a una hembra de *Ch* se expusieron 10 pupas de *Ao* sin tratar y tratadas con *Bb* en diferentes tiempos previos a la prueba y en tres diferentes opciones de elección, para observar su capacidad de discriminar pupas tratadas de las no tratadas. La interacción de *Ch* y *Bb* fue evaluada usando secuencialmente cada enemigo natural, se analizó mediante una tabla de vida de decremento múltiple que determinó que la mortalidad causada por *Ch* y *Bb* fue similar cuando sólo se liberó *Ch*. Se evidenció una interacción neutra, no sinérgica, ni aditiva, ni antagónica, ya que la presencia de *Bb* no afectó el control de *Ch* sobre *Ao*. Con ajustes en sus tiempos de aplicación y modos de uso, ambos agentes de biocontrol podrían usarse en campo.

Palabras clave: Control biológico múltiple, moscas de la fruta, interacciones intragremiales, susceptibilidad, discriminación.

INTRODUCCIÓN

El mundo atraviesa por una crisis ambiental por la pérdida de especies debido a los impactos ocasionados por los humanos (IPBES UN 2019), siendo los insectos entre los organismos vivos que han sufrido un mayor impacto negativo (Janzen y Hallwachs 2019; Simmons et al. 2019). Una de las principales causas de la pérdida de biodiversidad, así como del deterioro de los ecosistemas son las prácticas que se realizan en los sistemas de producción agrícola (Van Hook 1994, Kogan 1998). La adopción y recuperación de prácticas con principios ecológicos como el control biológico de plagas es una alternativa de solución. Este método contribuye a restaurar la biodiversidad funcional de los ecosistemas agrícolas, gracias a su principio de adicionar o incrementar el número poblacional de entomófagos mediante técnicas de introducción, conservación o incremento de enemigos naturales. Esto contribuye a “subsidiar” la sustentabilidad de los agroecosistemas (Nicholls y Altieri 1996, Montoya y Toledo 2010, Sánchez-Bayo y Wyckhuys 2019).

Según Nicholls (2008) el control biológico es “el uso de organismos benéficos (enemigos naturales) contra aquellos que causan daño (plagas)”. Los enemigos naturales se clasifican en parasitoides, depredadores y entomopatógenos (Eilenberg et al. 2001), los cuales pueden compartir un mismo recurso alimenticio (plaga). Es decir la plaga puede tener diferentes enemigos naturales, por lo cual se denomina que esos enemigos pertenecen a un gremio (Polis et al. 1989). Se considera que entre mayor sea la diversidad y abundancia del gremio, más eficaz será la regulación de las plagas (Martin et al. 2013).

Sin embargo, esta regulación también depende en parte del tipo de interacciones que ocurre entre los enemigos naturales, si ambos se favorecen, si la presencia de uno sólo beneficia la acción del control del otro, o si existe alguna interferencia entre ellos que pueda afectar la acción de uno o ambos enemigos, y adicionalmente el grado de supresión que cada uno de ellos ejerza sobre la plaga (Duffy et al. 2007, Straub et al. 2008, Thies et al. 2005). Una descripción de las interacciones intragremiales que se pueden presentar cuando se usan simultáneamente dos o más enemigos naturales, la reportan Fergurson y Stiling (1996) y las clasifican en tres tipos: sinérgicas, aditivas o

antagónicas (no aditivas). Dado la gran diversidad de enemigos naturales, es fundamental conocer en qué consisten estas interacciones y como pueden ocurrir, para optimizar las estrategias de control de una determinada plaga (Roy y Pell 2000, Straub et al. 2008). No obstante, su relevancia es un tema que poco ha sido estudiado (Baverstock et al. 2009).

A continuación, se hace una revisión sobre las interacciones intragremiales en el control biológico de plagas agrícolas y los factores que intervienen en esas interacciones.

1.1. Interacciones intragremiales en el control biológico de plagas agrícolas

Una interacción *sinérgica* se presenta cuando la mortalidad total de la población plaga es mayor que la esperada en el momento de integrar dos o más agentes de control en relación a la mortalidad que provoca cada uno por separado. Una interacción *aditiva* ocurre cuando la mortalidad total de la plaga es igual a la suma de la acción de las causas de mortalidad, no hay una interacción entre los enemigos naturales (Ferguson y Stiling 1996, Roy y Pell 2000).

El resultado de estas interacciones varía de acuerdo a la dinámica y efectos que se puedan presentar entre los enemigos naturales, que pueden favorecer o interferir la acción de control que ejercen sobre la plaga, donde también puede influir el ambiente donde se desarrollan. Dentro de los principales factores presentes en las interacciones sinérgicas se han estudiado con mayor detalle cuando los enemigos naturales empleados son la combinación de un microorganismo con un depredador o parasitoide. Algunos ejemplos de estos factores se mencionan a continuación:

- Capacidad de discriminación de hospederos: La avispa *Encarsia formosa* Gahan (Hymenoptera: Aphelinidae) tiene la capacidad de discriminar ninfas de la mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Hemiptera: Aleyrodiidae) infectadas por *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Hypocreales: Cordycipitaceae), de las sanas, lo que puede reducir la interferencia entre *E. formosa* y *B. bassiana* e incrementar el control de la plaga por la acción que ejerce cada enemigo natural (Labbé et al. 2009).

- Mayor movimiento de la plaga: El áfido *Acyrtosiphon pisum* (Harris) (Hemiptera: Aphididae), evita el ataque del parasitoide *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera: Aphidiidae) y del depredador *Coccinella septempunctata* Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae), aumentando su desplazamiento, de tal manera que aumenta la probabilidad que el áfido entre en contacto y sea infestado por el hongo *Pandora neoaphidis* (Zygomycetes: Entomophthorales) por lo que aumenta su mortalidad (Baverstock et al. 2009).
- Dispersión y transmisión de microorganismos por parte de los depredadores: El hongo entomopatógeno *B. bassiana* no afecta a los depredadores *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) y *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae), los cuales son capaces de transmitir el hongo favoreciendo su dispersión e incrementando la infección del áfido *Myzus persicae* (Zulzer) (Hemiptera: Aphididae) (Zhu y Jun 2012).

Se considera una relación *antagónica* cuando una de las dos especies no permiten que la otra actúe de forma eficaz, por lo que la supresión de la plaga es menor a la suma de las mortalidades causadas de manera independiente (Ferguson y Stiling 1996, Roy y Pell 2000). Los casos más frecuentes de antagonismo reportados han sido en la interacción entre hongos entomopatógenos y parasitoides, debido que el hongo puede tener una mayor ventaja de desarrollo y en algunas ocasiones puede afectar al insecto benéfico, pero esto depende directamente de la virulencia de cepa del hongo utilizada, de la dosis que se utilice y del tiempo en que ocurra la infección (Brodeur y Rosenheim 2000).

Algunos factores que se consideran causantes de interacciones antagónicas son:

- Susceptibilidad en las diferentes edades de los parasitoides: Un aspecto de gran importancia es identificar cual es el estado biológico del insecto que es más susceptible a la infección del hongo (Martins et al. 2014). El parasitoide *Phymastichus coffea* La Salle (Hymenoptera: Eulophidae) fue susceptible en sus estados juveniles al hongo entomopatógeno *B. bassiana* (Castillo et al. 2009). Un caso similar ocurrió cuando se estudió la susceptibilidad del primer estadio larval del parasitoide *Diaeretiella rapae* (McInstosh) (Hymenoptera:

Aphidiidae) (Martins et al. 2014). Por el contrario, el hongo *P. neoaphidis* afectó el estado adulto del parasitoide *A. ervi* cuando se combinaron para el control de áfido *A. pisum* (Baverstock et al. 2009).

- Capacidad de discriminación: El depredador *Dicyphus hesperus* Knight (Heteroptera: Miridae) discrimina ninfas de *T. vaporariorum* infestadas por *B. bassiana* y esto reduce su tasa de depredación y control de la plaga (Labbé et al. 2009), debido a su naturaleza polífaga, los depredadores cuando no encuentran una presa de su agrado busca otra fuente de alimentación (Nicholls 2008) y esto disminuye el control sobre la plaga objetivo.

A pesar que se presente una interacción antagónica, se considera que se puede lograr un control biológico eficaz y exitoso con la combinación de enemigos naturales, haciendo un aislamiento espacial y temporal de los biocontroladores. Es decir que se realizan liberaciones de los entomófagos en épocas distintas a la aplicación de los hongos entomopatógenos para permitir que cada enemigo ejerza al máximo su acción reguladora sobre la plaga, que a la vez reduzca su competencia y el riesgo de interferencia entre ellos. De esta forma se incrementa la mortalidad de la plaga y se reduce la infección del parasitoide (King y Bell 1978, Roy y Pell 2000). De igual manera, los factores ambientales son relevantes cuando se realiza la aplicación de dos agentes de control, debido a que éstos modifican el grado de susceptibilidad de cada organismo. Por ejemplo, Labbé et al. (2009) observaron que a baja humedad relativa reduce la mortalidad de parasitoides y depredadores de la mosca blanca *T. vaporariorum* en invernadero sin afectar la infección de la plaga por los hongos entomopatógenos.

En el Cuadro 1 ([Anexo 1](#)) se mencionan algunos ejemplos de las interacciones intragremiales que ocurren cuando se usan simultáneamente dos o más enemigos naturales para el control de una plaga.

1.2. Interacciones intragremiales en el control de moscas de la fruta

Las moscas de la fruta (Diptera: Tephritidae) son plagas que limitan el desarrollo de la fruticultura (Hernández-Ortíz 1992, Aluja 1996). En México, las cuatro especies de importancia económica son *Anastrepha obliqua* (Macquart), *A. ludens* (Loew), *A. striata*

Schiner y *A. serpentina* Wied. (Gutiérrez 2010). *Anastrepha obliqua* es una especie polífaga de gran importancia en países tropicales, asociada a frutos de género *Spondias* spp., pero de importancia económica por afectar frutos de mango (*Mangifera indica* L.) y carambola (*Averrhoa carambola*) (Birke et al. 2013, Castañeda et al. 2015). Para su control bajo el concepto del Manejo Integrado de Plagas (MIP) en áreas amplias, se utilizan tecnologías como trampas con atrayentes alimenticios para el monitoreo y detección de poblaciones, la aspersión de cebos tóxicos selectivos, la aplicación de la Técnica del Insecto Estéril (TIE) y el Control Biológico por Aumento (CBA) (Montoya y Toledo 2010).

El uso del control biológico para moscas de la fruta se perfila como una estrategia con mayor orientación ecológica que puede ser integrada en programas de control (Montoya y Cancino 2004), lo que permitirá mantener la biodiversidad y aumentar las interacciones en los agroecosistemas. Sin embargo, el éxito de este tipo de control depende de la evaluación y análisis de las potencialidades de los diferentes enemigos naturales que se van a usar (Montoya y Toledo 2010).

Existen algunos casos promisorios en la combinación de diferentes enemigos naturales, en este caso parasitoides que controlan el estado de huevo, larva y/o pupa de la mosca oriental de la fruta *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae) (Stark et al. 1991, Vargas et al. 1993, Bautista y Harris 1997, Wang y Messing 2003, Vargas et al. 2012), y de *A. ludens* (Cancino et al. 2012, 2014, Montoya et al. 2018). En estos estudios la capacidad de discriminar hospederos parasitados, juega un papel importante para el éxito de estas combinaciones. Sin embargo, a pesar que se ha avanzado en el uso de un control biológico simultáneo contra moscas de la fruta existe poco conocimiento sobre el uso simultáneo de hongos entomopatógenos y parasitoides.

Por su abundancia los parasitoides son el grupo de enemigos naturales de mayor importancia en el control de mosca de la fruta. El endoparasitoide *Coptera haywardi* (Oglobin) (Hymenoptera: Diapriidae) se destaca por su especificidad de ataque a tefrítidos, alta capacidad de búsqueda de pupas en suelo a diferentes profundidades, forrajeo eficiente (Sivinski et al. 1998, Guillén et al. 2001) y capacidad de discriminación a pupas previamente parasitadas por sus conoespecíficos y por *Diachasmimorpha longicaudata* (Ahsmad) (Hymenoptera: Braconidae) (Cancino et al. 2012), por lo que

puede realizar un control complementario que permite una mayor disminución en las poblaciones de *A. ludens* siendo una estrategia con potencial para el control en campo (Cancino et al. 2014).

En relación a los hongos entomopatógenos, *B. bassiana* es un microorganismo habitante natural del suelo que pertenece al grupo hyphomycetes, y se destaca por ser infectivo a una amplia gama de insectos de importancia agrícola, además posee la ventaja que se puede producir en laboratorio (Lacey et al. 1997, Yeo et al. 1998, Money 2016). Este microorganismo ha demostrado potencial para infectar y controlar diferentes fases biológicas de diversas especies de moscas de la fruta (De la Rosa et al. 2002, Dimbi et al. 2003, Konstantopoulou y Mazomenos 2005, Toledo et al. 2007, Sookar et al. 2008, Hernández Díaz-Ordaz et al. 2010, Toledo et al. 2010). En condiciones de campo ha resultado ser efectivo mostrando potencial en el control de la plaga con aplicaciones en el área de goteo de los árboles, con la liberación de insectos estériles tratados con conidios, o con el empleo de dispositivos auto-inoculadores, que usa como principios la atracción, impregnación y transmisión a otros conoespecíficos (Novelo-Rincón et al. 2009, Toledo et al. 2010, Flores et al. 2013).

Dado el potencial de control de poblaciones que ha exhibido tanto el parasitoide *C. haywardi* como el hongo entomopatógeno *B. bassiana* de manera independiente, se considera que su uso simultáneo podría reforzar el control biológico y contribuir a la supresión de las poblaciones de moscas de la fruta, como es el caso de *A. obliqua*. Para determinar las estrategias de uso más adecuadas, es necesario conocer el tipo de interacción que ocurre en su liberación y aplicación conjunta, y si afecta de manera adversa al parasitoide *C. haywardi* por lo que se evalúa la susceptibilidad de los diferentes estados biológicos del parasitoide, su fecundidad, además de su capacidad de discriminación cuando el hongo está presente.

OBJETIVOS

General:

Caracterizar el tipo de interacción entre *Beauveria bassiana* y *Coptera haywardi*, para desarrollar una estrategia de supresión de la mosca de la fruta *Anastrepha obliqua*.

Específicos

- Determinar la susceptibilidad a la infección por *B. bassiana* de los estados inmaduros y adultos de *C. haywardi* y su efecto en la fecundidad.
- Caracterizar la capacidad de discriminación de *C. haywardi* hacia pupas de *A. obliqua* no tratadas y tratadas con *B. bassiana*.
- Evaluar el efecto de la interacción entre la liberación de adultos de *C. haywardi* y la aplicación de *B. bassiana* al suelo para suprimir la población *A. obliqua* en condiciones de campo semi-protegidas.

CAPITULO 1

Does *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae) affect the survival and fecundity of the parasitoid *Coptera haywardi* (Hymenoptera: Diapriidae)?

Olga Yaneth Martínez-Barrera¹, Jorge Toledo¹, Pablo Liedo¹, Jaime Gómez¹,
Javier Valle-Mora¹, Jorge Cancino² and Pablo Montoya².

¹Departamento de Agricultura, Sociedad y Ambiente. El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Carretera Antiguo Aeropuerto Km. 2.5, C.P. 30700. Tapachula, Chiapas, México.

²Programa Moscafrut SAGARPA-IICA, Camino a los Cacaotales S/N, C.P. 30860. Metapa de Domínguez, Chiapas, México.

Publicado en *Environmental Entomology*. 2019. 48(1): 156-162. doi: 10.1093/ee/nvy182
([Anexo 2](#): Portada publicación)

Abstract

The effect of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin on the development of immature stages, and survival and fecundity of *Coptera haywardi* (Oglobin) adults was studied under laboratory conditions. The fungus was applied as dry conidia on parasitized pupae of *Anastrepha obliqua* (Macquart) (Diptera: Tephritidae) and on parasitoid adults of two different age groups (1-4 d-old, and 5-10 d-old). The fungus caused no negative effects on the development of the immature stages, since there were no differences on the emergence of adults compared with the untreated control. Adults were susceptible to the fungus on both sexes and age groups. Males showed shorter lifespan than females, even in untreated individuals. Despite the increased adult mortality produced by the fungus there was no effect on fecundity during first 18 days of adult life, as the net fecundity was 26.7 and 26.3 parasitoids per female treated and untreated, respectively. Our results suggest that, given the low susceptibility of parasitized pupae and the no effect on fecundity during the first 18 days of adult life, it is possible to develop management strategies using these two natural enemies in the biological control against *A. obliqua*.

Key words: Endoparasitoid, entomopathogenic fungus, interaction, *Anastrepha* spp., biological control, susceptibility.

Resumen

Se estudió bajo condiciones de laboratorio el efecto del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin sobre el desarrollo de estados inmaduros, supervivencia y fecundidad de los adultos de *Coptera haywardi* (Oglobin). El hongo se aplicó como conidio seco sobre pupas de *Anastrepha obliqua* (Macquart) (Diptera: Tephritidae) parasitadas y en adultos de dos grupos de edad (1-4 d y 5-10 d). El hongo no ocasionó efectos negativos en el desarrollo de los estados inmaduros, dado que en la emergencia de adultos no hubo diferencias con el testigo. Ambos sexos y grupos de edades de los adultos fueron susceptibles al hongo. Los machos tuvieron una vida más corta que las hembras incluso en los individuos no tratados. La infección del hongo incrementó la mortalidad, pero no hubo efecto sobre la fecundidad durante los primeros 18 días de vida adulta, ya que la fecundidad neta fue de 26.3 y 26.7 parasitoides por hembra tratada y no tratada, respectivamente. Nuestros resultados sugieren que dada la baja susceptibilidad de la pupa parasitada y el no efecto sobre la fecundidad neta durante los primeros 18 días de vida adulta, es posible desarrollar estrategias de manejo usando estos dos enemigos naturales en el control biológico de *A. obliqua*.

Palabras clave: Endoparásitoide, hongo entomopatógeno, interacción, *Anastrepha* spp., control biológico, susceptibilidad.

Introduction

Fruit flies (Diptera: Tephritidae) are pests that limit the development of fruit growing worldwide. *Anastrepha obliqua* (Macquart) is a native species of great economic importance in the tropical countries of the American continent. It is a major pest of mango (*Mangifera indica* L.) (Hernández-Ortíz 1992, Aluja 1996, Castañeda et al. 2015). Currently, in order to produce the healthy fruits demanded by international markets, an integrated pest management (IPM) program is in operation in Mexico. This program is focused on wide areas, and features biological control as a technique of great importance (Montoya et al. 2007).

Implementation of biological control programs in fruit flies requires a complete analysis and evaluation of potential biocontrol agents (Montoya and Toledo 2010). Fruit flies have a wide range of natural enemies, where larval and pupal parasitoids represent the most prominent (Ovruski et al. 2000, 2009, Vayssières et al. 2011). Among them, the pupal endoparasitoid *Coptera haywardi* (Oglobin) (Hymenoptera: Diapriidae), stand out by its high host searching capacity (Guillén et al. 2002), high ability to discriminate pupae previously parasitized by the larval parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Cancino et al. 2012), and a strong preference to attack tephritid flies (Sivinski et al. 1998). According to Cancino et al. (2014), both parasitoid species can be used as a complementary approach for fruit fly biocontrol.

Entomopathogenic microorganisms are another group that also is gaining importance in the control of these pests (Debouzie 1989, Toledo et al. 1999, 2008). *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin has been reported as a generalist fungus (Bruce et al. 1997) with a pathogenicity that varies according to the origin of its strains and is

infective for a wide range of hosts that includes ~700 insect species (Goettel et al. 1990, Lacey et al. 1997, Yeo et al. 1998). From these, ~3% are estimated to be non-target arthropods (Bruce et al. 1997), including the natural enemies of other pests, limiting its action as a control agent (Feng et al. 1994, Danfa and Van der Valk 1999). However, there are natural enemies that are resistant to the mycosis (Goettel et al. 1990) or their susceptibility varies according to the life stage or age (Castillo et al. 2009, Martins et al. 2014).

This fungal species has shown potential to control different fruit fly species (De la Rosa et al. 2002, Dimbi et al. 2003, Konstantopoulou and Mazomenos 2005, Toledo et al. 2007, Sookar et al. 2008, Hernández-Díaz-Ordaz et al. 2010). Its application has been directed to the soil to control the larvae entering to the pupal state (Montoya and Toledo 2010), or directed towards young adults at the time of their emergence (Wilson et al. 2017). However, other applications to control adults include the use of sterile insects as conidia vectors or the use of autoinoculation devices (Novelo-Rincón et al. 2009, Flores et al. 2013, Toledo et al. 2017). This suggests that under certain conditions, both types of biological control agents, parasitoids and entomopathogenic fungi, can be used simultaneously (Fatiha et al. 2008, Rashki et al. 2009).

Independent studies to evaluate *B. bassiana* and *C. haywardi* have demonstrated that these are natural enemies with potential for biological control of fruit flies (Toledo et al. 2007, Hernández-Díaz-Ordaz 2010, Cancino et al. 2012, 2014). In order to determine the feasibility of using these two natural enemies for the control of *A. obliqua*, here we evaluated, under laboratory conditions, the effect of *B. bassiana* on *C. haywardi* survival and fecundity.

Materials and Methods

Experimental site. Bioassays were carried up in the Department of Detection and Control of the Methods Development Unit, of the Programa Moscafrut SAGARPA-IICA, located in Metapa de Dominguez, Chiapas, Mexico. The experimental chamber was maintained at 24 ± 1 °C, 60-80% RH, and 12:12 h light: dark photoperiod.

Biological material. The *B. bassiana* Bb-Et strain, isolated by in the Laboratory of Beneficial Organisms, Fungi, Insects and Nematodes, located in Tuxtla Chico, Chiapas, Mexico was used throughout this study. The fungus strain was formulated with celite 400 dust, with a concentration of 2.9×10^9 conidia/g, and an initial viability $\geq 90\%$. Adults of *C. haywardi* came from the colony established for over ~240 generations in the biological control laboratory of the Methods Development Unit. *Anastrepha obliqua* pupae were provided by the Moscafrut Facility, where they have been mass-reared for more than 174 generations according to Artiaga-López et al. (2004), with a reintroduction of wild populations in 2011 (Orozco-Dávila et al. 2017).

Selection of application method of *B. bassiana*. Three methods of conidia application were evaluated to determine which was more effective for the next tests. Our criterion was to select the method resulting in the highest mortality rates. The methods were: 1) spraying, 2) immersion, and 3) application of dry conidia. These were tested on 30 *C. haywardi* 4-7 d-old adult pairs, and 5-6 d-old *A. obliqua* adults. For the first two methods, a 1% stock suspension of *B. bassiana* was made at concentration of 2.9×10^7 conidia/ml. One part of this suspension (30 ml) was placed in a small sprayer, and 3 sprays were

applied on the adult parasitoids previously sorted by sex, and placed in 2 cm diameter by 4 cm height sterile glass bottles and subsequently deposited the parasitoids on a paper towel in a Petri dish (diameter: 9 cm) by a dry blow. For the immersion method, the males and females of both parasitoids and flies were placed separately into vials with 0.5 ml of stock suspension for 10 s and then were placed on paper towels to eliminate excess moisture. In the final method, the insects were placed in the base of a Petri dish containing 0.1 g and 2 g of dry conidia corresponding to 2.9×10^8 and 5.8×10^9 conidia, for application to *C. haywardi* and *A. obliqua* adults, respectively. The difference in the amount of conidia was due to the difference in size of these two species. After placement, the dish was gently agitated for 8 s to homogenize. Over a period of 15 days, the parasitoids were maintained in $16.5 \times 11 \times 11$ cm plastic cages with food (toilet tissue mixture with honey (Montoya et al. 2012) and water in plastic bottles with filter paper. Observations were made daily and dead specimens were collected, disinfected by 30 s with 1% sodium hypochlorite, after washed with sterile water and placed in a moist chamber (Petri dish with a wet filter paper and sealed with Parafilm®) to promote growth of the mycelium to confirm infection by the fungus as the cause of death. For the method that caused the highest mortality, conidia counts were conducted in the parasitoids, separately submerging a female and a male, one hour after application of the fungus, in 1 ml of distilled water placed in an Eppendorf tube, which was subsequently vortexed and centrifuged. Finally, 10 μ L of the suspension was placed in a Neubauer Hemacytometer chamber in order to count the number of conidia. Each count was considered as a replicate and six replicates were carried out.

Susceptibility of immature stages. Samples of 50 *A. obliqua* pupae 3 days after pupation were exposed for 72 h to parasitism by *C. haywardi* at a 3:1 parasitoid: pupa ratio. Three days later the parasitized pupae of *A. obliqua* were placed in a Petri dish containing 0.16 g of dry conidia (equivalent to 0.1 g of dry conidia per 30 individuals) and, with light agitation, the fungus was applied to the pupae such that they were totally covered with conidia. The parasitized pupae were then placed on a layer of coconut fiber (1 cm) (50% RH), within a plastic container (6 × 8 cm height × diameter) where they remained until parasitoid adult emergence (33 ± 2 d). Untreated controls were agitated but not exposed to *B. bassiana*. The assay was repeated seven times.

Susceptibility of adults. Groups of 25 males and 25 females of *C. haywardi* of two age groups, 1-4 d-old and 5-10 d-old were treated with 0.1 g of dry conidia, as was described in the preliminary test. The adults parasitoids were maintained with food and water, in 16.5 × 11 × 11 cm plastic cages. Mortality was recorded daily over a period of 15 consecutive days or until the last one died. Dead specimens were placed in a moist chamber, as previously described. The control group was agitated but not exposed to *B. bassiana*. Five replicates were done.

Effect of *B. bassiana* on the fecundity of *C. haywardi*.

Adult parasitoid survival and net fecundity rate (number of offspring per female per day) were determined applying 10 mg of *B. bassiana* dry conidia to 5 d-old *C. haywardi* pairs (1♀ and 1♂). After one hour of treatment, the parasitoids were released into a plastic container (4 × 8 cm, height × diameter) provided with food and water as described above.

In this container, 10 3-6 d-old *A. obliqua* pupae were placed on a 3 mm layer of coconut fiber in a plastic base (3 cm in diameter), which was covered with thin cardboard to provide shade and foster parasitism. Every day, the exposed pupae were collected and replaced with new pupae of the same age, until adult parasitoids died, or for a maximum of 14 d. The exposed pupae were placed in containers (3.5 × 4.5 cm, height × diameter) and covered with coconut fiber until adult emergence. The number of parasitoid offspring was recorded. A sample of these dead parasitoids from both the untreated and the treated ones was disinfected and placed in a moist chamber to verify fungal infection. Thirty-two replicates were made using parasitoids from different batches.

Data analysis. Differences in the number of conidia per adult parasitoid were analyzed by a *t* test. Survival data in the application method tests, and in that of susceptibility test were analyzed using an asymptotic Log rank test for interval-censored data and multiple comparisons were conducted using orthogonal contrasts with Bonferroni correction (Fay and Shaw 2010). Mortality due to the fungus was corrected by Abbott equation (Abbott 1925), and analyzed using a Probit model (Fox 2005). Mortality comparisons were made by a three-way ANOVA with age, sex and treatment as factors, each with two levels, by box-cox transformation with a previous addition of 0.5 because there were mortalities of zero in the controls. Differences in mortality between treated and untreated groups were analyzed by a Welch Two Sample *t*-test. The effect of *B. bassiana* on parasitized pupae of *A. obliqua* was analyzed using an association test between the two criteria of classification: F1 (with and without *B. bassiana*) and F2 (with and without emergence). Due to low infection, the Fisher exact test was applied. The data on the effect of the fungus

on *C. haywardi* female fecundity was analyzed by a one-way ANOVA. *Coptera haywardi* offspring sex ratios (♀: ♂) were compared using a *t* test. The number of treated and untreated adult parasitoids that survived to the end of the test was analyzed using a test of homogeneity of proportions. All data analyses were conducted using the statistical program R x64 3.2.4 (R Core Team 2016).

Results

Selection of the application method of *B. bassiana*

Application of dry conidia caused the highest *C. haywardi* adult mortality (87.5%), with a LT₅₀ of 4.5 d for males and 8.5 d for females. Application of conidia by immersion caused 71.9% mortality in males and 31.2% in females, while spraying caused 68.7 and 43.7% mortality for males and females, respectively. Application of dry conidia in adults of *A. obliqua* produced 100 and 91% mortality in males and females, respectively, and a TL₅₀ of 3.5 d. The quantity of conidia that adhered to the bodies of *C. haywardi* adults was 5.8×10^5 conidia/insect in females, and 5.4×10^5 conidia/insect in males ($t = 0.38$; $df = 7$; $P = 0.708$).

Effect of *B. bassiana* conidia on the emergence of *C. haywardi* when applied to parasitized pupae of *A. obliqua*. Emergence of *C. haywardi* from treated and untreated parasitized pupae of *A. obliqua* was 72 and 75%, respectively. The difference was not significant ($F = 0.04$; $df = 1, 12$; $P = 0.839$). There was not significant difference in *A. obliqua* emergence (4.0% for treated and 3.7% for untreated pupae) ($F = 0.03$; $df = 1, 12$; $P = 0.860$). The sex ratio in both treatments showed a greater emergence of females than

males for *C. haywardi*, but differences were not significant ($F = 0.231$; $df = 1, 12$; $P = 0.639$) (Table 1).

Susceptibility of *C. haywardi* adults. *Beauveria bassiana* was found to be pathogenic to adults of *C. haywardi*. All groups showed significant difference with respect to their controls (Table 2 and 3). There were interactions between age and sex, age and treatment, sex and treatment, and age by sex by treatment (Table 3). We used the Abbott correction (Abbott 1925) since in the 5-10 d-old males control mortality was $> 20\%$. The LT_{50} in these males was 5.5 days, whereas in 1-4 d-old males and 5-10 d-old females it was 8.5 days. In 1-4 day-old females, mortality was lower than 50% (46.4%), so LT_{50} was undefined (Table 2). Figure 1 shows the cumulative mortality for treated and untreated adult parasitoid, for each sex and age group.

Fecundity of *C. haywardi* treated with *B. bassiana*.

Fecundity of *C. haywardi* over 18 day-old was 1.9 parasitoids/female/day, regardless of whether or not they were treated with *B. bassiana* ($\chi^2 = 0.027$, $df = 1$; $P = 0.871$). In general, high fecundity was observed during the first four days, with maximum activity recorded at eight days of age and a subsequent gradual decrease, for both treated and untreated females ($\chi^2 = 7.15$; $df = 1$; $P = 0.007$) (Fig. 2A).

Application of *B. bassiana* did not affect the sex ratio of the offspring. An average rate of 1♀:2.1♂ was observed for the treated parasitoids and 1♀:1.6♂ for untreated parasitoids ($t = 6.96$; $df = 1$; $P = 0.090$) (Fig. 2B). Fungus treated females produced 841 adults, with 32% of females, while the untreated (control) produced 858 adults with 38.6% females.

At the end of the 18 d observations period, the survival of the parasitoids differed significantly among treated parasitoids (68.7% ♀ and 59.4% ♂) and the untreated ones (93.72% ♀; 90.6% ♂) ($\chi^2 = 15.72$; $df = 3$; $P = 1.29 \times 10^{-3}$) (Fig. 3). In the offspring, 41.7% males and 66.3% females were recorded, with infection evident in 10.2% and 12.9%, respectively.

Discussion

The emergence of *C. haywardi* adults was not affected when the application of *B. bassiana* was done on parasitized pupae of *A. obliqua*. Studies conducted in others tephritids such as *A. ludens* and *Ceratitis capitata* (Weid.) (Diptera: Tephritidae) have reported that the fungus did not affect adult emergence in pupae older than 2 d-old (De la Rosa et al. 2002, Toledo et al. 2008), although Ekesi et al. (2002) and Quesada-Moraga et al. (2006) reported that application of *B. bassiana* to larvae of *C. capitata* prior to pupation and to pupae younger than 24 h affected the development and emergence of the adults. Cossentine et al. (2010) also observed that this fungus infected final instar larvae and early formed pupae of *Rhagoletis indifferens* Curran (Diptera: Tephritidae). As pupae develops, the formation of the cuticle is completed, preventing the germination of the fungus spores and the hyphae penetration (St Leger 1993). This make older pupae less susceptible to the fungus attack, which could be a possible explanation why in this study there was no infection in 6 d-old treated pupae and was not effect on the parasitoids.

However, it is necessary to consider that the fungus infection also is affected by factors such as the specificity of the strain, virulence, host defenses, environmental conditions, as well as physiological interactions with the host (Castrillo et al. 2005).

This tolerance to fungal infection on mature pupae of *A. obliqua* represents an advantage for *C. haywardi*, since it prefers to parasitize 3 to 5 d-old pupae of *A. ludens* (Aluja et al. 2009, López-Arriaga et al. 2014). When the parasitoid begins its development, the fruit fly pupae is less susceptible to fungal infection, contributing to parasitoid survival.

The observed mortality of *C. haywardi* adult parasitoids after treated with *B. bassiana* spores varied according to age and the sex and their interactions (Table 3), being more susceptible older and male parasitoids, respectively. This open a window for the foraging activity by younger and mature females, since they are less susceptible to the presence of *B. bassiana* spores in the soil.

Males of 5-10 d-old were more susceptible to infection by the fungus followed by females of the same age group. However, male mortality data of the untreated control was already high (73.6%), suggesting that males, under these conditions (only males in the cage) have a shorter lifespan than females (but see below on the effect of the bioassay conditions). Shorter male longevity has already been reported for other species of braconid parasitoids of fruit fly larvae (Pemberton and Willard 1918, Boush and Baerwald 1967, Martínez et al. 1993, Ramadan et al. 1991). This short longevity has been associated with intense reproductive activity, which in turn has been associated with weaker immune response. This could explain the high mortality observed in *C. haywardi* males, both in the untreated control, and in the fungal treated individuals in the susceptibility test.

However, our results on the fecundity test (Fig. 3) showed greater male survival. This contradictory result could be explained by the different methods used in the two assays. For the susceptibility test, males were in group cages (25 males per cage) without

the presence of females. In the fecundity test, each male was placed with a female in individual pair cages. The high mortality observed in the untreated control of the susceptibility test at 5-10 d could be attributed to male-male competitive interactions. Despite this high mortality in the control, it is important to note that the effect of the fungal treatment was significant.

In *C. haywardi* females, mortality greater than 50% was observed at 8.5 d post-treatment with fungal application (Fig.1, Table 2). The period of greatest fecundity (6-8 d-old) was almost not affected (Fig. 2). Other studies report that some Hymenoptera species are slightly susceptible to fungus infection, such as *Tetrastichus planipennis* Yang (Hymenoptera: Eulophidae), *Spathius agrili* Yang (Hymenoptera: Braconidae) (Dean et al. 2012), and *Habrobracon hebetor* (Say) (Hymenoptera: Braconidae), all attacking Lepidoptera larvae. In these species, from several evaluated strains of *B. bassiana* and *M. anisopliae*, only one caused a low level of mortality (Mahdavi et al. 2013). One case of high susceptibility to *B. bassiana* are the parasitoids of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae), *Cephalonomia stephanoderis* Betrem (Hymenoptera: Bethylidae), *Prorops nasuta* Waterston (Hymenoptera: Bethylidae) (De la Rosa et al. 1997, 2000), and females of *Phymastichus coffea* LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae) (Castillo et al. 2009). This variation in response depends largely on the virulence of the strain. When parasitoids are more susceptible, in order to reduce the antagonistic effect between both organisms, there should be no simultaneous application of the fungus and release of parasitoids (King and Bell 1978, De la Rosa et al. 2000, Roy and Pell 2000, Castillo et al. 2009).

Beauveria bassiana did not affected the fecundity of *C. haywardi* females (1.9 parasitoids/female/day) when was reared on pupae of *A. obliqua*, and this fecundity rate was greater than that reported when *A. ludens* was used as a host for parasitoid mass-rearing (1.58 parasitoids/female/day) (López-Arriaga et al. 2014). High variability in fecundity and sex-ratio could be related to the increase of mortality after 12 days. In *Aphidius matricariae* Haliday (Hymenoptera: Braconidae), another endoparasitoid, application of *B. bassiana* did not reduced the reproductive rate (Rashki et al. 2009). In contrast, in *P. coffea*, reproduction was drastically affected by the action of *B. bassiana* (Castillo et al. 2009).

Regarding the possible use of the two natural enemies for the control of fruit flies, we identified two scenarios. When *B. bassiana* is applied to control adult populations, using autoinoculation devices or sterile insects as vectors (Toledo et al. 2017), or applying *B. bassiana* conidia to the soil.

In the first case, since *C. haywardi* adults are not attracted to fruit flies of fruit fly traps, the possibility for *C. haywardi* parasitoids to be infected with *B. bassiana* conidia is minimized.

In the second case, the lack of effect of fungal treatment on the fecundity of *C. haywardi* females can suggest a potential integration of these two biocontrol agents. However, there is a low risk of females being infected by the fungus conidia when foraging for host pupae in the soil, since females can reach depths of 5 cm in order to locate and parasitize pupae (Goettel and Hajek 2001, Guillén et al. 2002). For this scenario, strategies should consider measures to minimize this risk, such as applying the two control

methods at different timing, or in different areas. Further research would be necessary to find out which biocontrol agent is better, and under which conditions.

Under natural conditions, interaction between *B. bassiana* and *C. haywardi* should be rare because of the different niches that they occupy. The fungus is only reported to affect fruit fly adults (Hernández-Díaz-Ordaz et al. 2010) while the parasitoid attacks the pupal stage (Guillén et al. 2002). In addition, environmental conditions may act to reduce the negative effects caused by the fungus, since laboratory evaluations do not always reflect the levels of interaction that take place under natural conditions (Goettel et al. 1990). Environmental factors such as humidity, temperature and solar radiation can reduce the survival and virulence of *B. bassiana* (Shipp et al. 2003, Labbé et al. 2009, Castrillo et al. 2010).

In conclusion, our results, demonstrated that *B. bassiana* did not affect the development and emergence of *C. haywardi* in previously parasitized *A. obliqua* pupae. The fungus resulted pathogenic to adult parasitoids, but it did not affected their fecundity during the first 18 days of adult life. The relatively long lethal time, and the no effect on reproduction suggests that these two natural enemies could be used for the biocontrol of *A. obliqua*.

Acknowledgements

The Programa Moscafrut SAGARPA-IICA for the use of their facilities and providing the biological material (*C. haywardi* and *A. obliqua*), as well as materials, equipment and technical and administrative support. To the Laboratory of Beneficial Organisms, Fungi, Insects and Nematodes for providing of the Bb-Et strain of *B. bassiana*. Thanks to the

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for the postgraduate scholarship No. 405982 awarded to Olga Yaneth Martínez Barrera.

References Cited

- Abbott, W.S. 1925.** A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18: 265-267.
- Aluja, M. 1996.** Future trends in fruit fly management, pp. 309–320. *In* McPheron, B.A., and G.J. Steck (eds.). *Fruit fly pests: A world assessment of their biology and management.* St. Lucie Press, Delray Beach, FL., U.S.A.
- Aluja, M., J. Sivinski, S. Ovruski, L. Guillén, M. López, J. Cancino, A. Torres-Anaya, G. Gallegos-Chan, and L. Ruiz. 2009.** Colonization and domestication of seven species of native New World hymenopterous larval-prepupal and pupal fruit fly (Diptera: Tephritidae) parasitoids. *Biocontrol Sci. Technol.* 19: 49–79.
- Artiaga-López, T., E. Hernández, J. Domínguez-Gordillo, D.S. Moreno, and D. Orozco-Dávila. 2004.** Mass-production of *Anastrepha obliqua* at the Moscafrut fruit fly facility, México. pp. 389–392. *In* B. N. Barnes (ed.). *Proc. of 6th International Fruit Fly Symposium.* 6-10 May 2002. Stellenbosch, South Africa.
- Boush, G.M., and R.J. Baerwald. 1967.** Courtship behavior and evidence for a sex pheromone in the apple maggot parasite, *Opius alloeus* (Hymenoptera: Braconidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 60: 865–866.
- Bruce, L. P., M. Skinner, V. Gouli, and M. Brownbridge. 1997.** Impact of soil applications of *Beauveria bassiana* and *Mariannaea* sp. on nontarget forest arthropods. *Biol. Control.* 8: 203–206.

- Cancino, J., P. Liedo, L. Ruiz, G. López, P. Montoya, J.F. Barrera, J. Sivinski, and M. Aluja. 2012.** Discrimination by *Coptera haywardi* (Hymenoptera: Diapriidae) of host previously attacked by conspecifics of by the larval parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae). *Biocontrol Sci. Technol.* 22: 899–914.
- Cancino, J., P. Montoya, J.F. Barrera, M. Aluja, and P. Liedo. 2014.** Parasitism by *Coptera haywardi* and *Diachasmimorpha longicaudata* on *Anastrepha* flies with different fruits under laboratory and field cage conditions. *BioControl.* 59: 287–295.
- Castañeda, M.R., D. Selivon, V. Hernández-Ortiz, A. Soto, and N.A. Canal. 2015.** Morphometric divergence in populations of *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae) from Colombia and some Neotropical locations. *Zookeys.* 540: 61–81.
- Castillo, A., J. Gómez, F. Infante, and F. Vega. 2009.** Susceptibilidad del parasitoide *Phymastichus coffea* LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae) a *Beauveria bassiana* en condiciones de laboratorio. *Neotrop. Entomol.* 38: 665–670.
- Castrillo, L.A., D.W. Roberts, and J.D. Vandenberg. 2005.** The fungal past, present, and future: Germination, ramification, and reproduction. *J. Invertebr. Pathol.* 89: 46–56.
- Castrillo, L.A., M.H. Griggs, H. Liu, L.S. Bauer, and J.D. Vandenberg. 2010.** Assessing deposition and persistence of *Beauveria bassiana* GHA (Ascomycota: Hypocreales) applied for control of the emerald ash borer, *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae), in a commercial tree nursery. *Biol. Control.* 54: 61–67.
- Cossentine, J., H. Thistlewood, M. Goettel, and S. Jaronski. 2010.** Susceptibility of preimaginal western cherry fruit fly, *Rhagoletis indifferens* (Diptera: Tephritidae) to

Beauveria bassiana (Balsamo) Vuillemin Clavicipitaceae (Hypocreales). J. Invertebr. Pathol. 104: 105–109.

Danfa, A., and H.C.H.G. Van der Valk. 1999. Laboratory testing of *Metarhizium* spp. and *Beauveria bassiana* on Sahelian non-target arthropods. Biocontrol Sci. Technol. 9: 187–198.

Dean, K., J. Vandenberg, M. Griggs, L. Bauer, and M. Fierke. 2012. Susceptibility of two hymenopteran parasitoids of *Agilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae) to the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). J. Invertebr. Pathol. 109: 303–306.

Debouzie, D. 1989. Biotic factors in tephritid populations, pp: 221–227. In A. Robinson and G. Hooper (eds.), Fruit Flies: Their Biology, Natural Enemies and Control. Elsevier, Amsterdam.

De la Rosa, W., J.A. Godínez, R. Alatorre, and J. Trujillo. 1997. Susceptibilidad del parasitoide *Cephalonomia stephanoderis* a diferentes cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. Southwest. Entomol. 22: 233–242.

De la Rosa, W., H.R. Segura, J.F. Barrera, and T. Williams. 2000. Laboratory evaluation of the impact of entomopathogenic fungi on *Prorops nasuta* (Hymenoptera: Bethyridae), a parasitoid of the coffee berry borer. Environ. Entomol. 29: 126–131.

De la Rosa, W., F.L. López, and P. Liedo. 2002. *Beauveria bassiana* as a pathogen of the Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae) under laboratory conditions. J. Econ. Entomol. 95: 36–43.

Dimbi, S., N.K. Maniania, S.A. Lux, S. Ekesi, and M. Mueke. 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.

Ekesi, S., N.K. Maniania, and S.A. Lux. 2002. Mortality in three African tephritid fruit fly puparia and adults caused by entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *Biocontrol Sci. Technol.* 12: 7–17.

Fatiha, L., Z. Huang, S.X. Ren, and S. Ali. 2008. Effect of *Verticillium lecanii* on biological characteristics and life table of *Serangium japonicum* (Coleoptera: Coccinellidae), a predator of whiteflies under laboratory conditions. *Insect Sci.* 15: 327–333.

Fay, M., and P. Shaw. 2010. Exact and asymptotic weighted Logrank tests for interval censored data: The interval R package. *J. Stat. Softw.* 36: 1–34.

Feng, M.G., T.J. Poprawski, and G.G. Khachatourians. 1994. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: Current status. *Biocontrol Sci. Technol.* 4: 3–34.

Flores, S., S. Campos, A. Villaseñor, A. Valle, W. Enkerlin, J. Toledo, P. Liedo, and P. Montoya. 2013. Sterile males of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) as disseminators of *Beauveria bassiana* conidia for IPM strategies. *Biocontrol Sci. Technol.* 23: 1186–1198.

Fox, J. 2005. The R commander: A basic statistics graphical user interface to R. *J. Stat. Softw.* 14: 1–42.

Goettel, M.S. and A.E. Hajek. 2001. Evaluation of nontarget effects of pathogens used for management of arthropods, pp. 81–97. *In* E. Wajnberg, J.K. Scott, and P.C.

Quimby (eds.). Evaluating indirect ecological effects of biological control. CABI Press, Wallingford, UK.

Goettel, M.S., T.J. Poprawski, J.D. Vanderberg, Z. Li, and D.W. Roberts. 1990. Safety to nontarget invertebrates of fungal biocontrol agents, pp. 209-232. *In* M. Lard, L.A. Lacey, and E.W. Davidson (eds.), Safety of microbial insecticides. CRC Press. Boca Raton, FL.

Guillén, L., M. Aluja, M. Equihua, and J. Sivinski. 2002. Performance of two fruit fly (Diptera: Tephritidae) pupal parasitoids (*Coptera haywardi* (Hymenoptera: Diapriidae) and *Pachycrepoideus vindemiae* (Hymenoptera: Pteromalidae) under different environmental soil conditions. *Biol. Control.* 23: 219–227.

Hernández-Díaz-Ordaz, N., N. Pérez, and J. Toledo. 2010. Patogenicidad de tres cepas de hongos entomopatógenos a adultos de *Anastrepha obliqua* (Macquart) (Diptera: Tephritidae) en condiciones de laboratorio. *Acta Zool. Mex.* 26: 481–494.

Hernández-Ortíz, V. 1992. El género *Anastrepha* Schiner en México (Diptera: Tephritidae). Taxonomía, distribución y sus plantas huéspedes. Instituto de Ecología, A. C. y Sociedad Mexicana de Entomología. Xalapa, Ver. México.

King, E.G., and J.V. Bell. 1978. Interactions between a braconid, *Microplitis croceipes*, and a fungus, *Nomuraea rileyi*, in laboratory-reared bollworm larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 31: 337–340.

Konstantopoulou, M., and B. Mazomenos. 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.

- Labbé, R.M., D.R. Gillespie, C. Cloutier, and J. Brodeur. 2009.** Compatibility of an entomopathogenic fungus with a predator and a parasitoid in the biological control of greenhouse whitefly. *Biocontrol Sci. Technol.* 19: 429–446.
- Lacey, L.A., L.M. Mesquita, G. Mercadier, R. Debire, D.J. Kazmer, and F. Leclant. 1997.** Acute and sublethal activity of the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) on adult *Aphelinus asychis* (Hymenoptera: Aphelinidae). *Environ. Entomol.* 26: 1452–1460.
- López-Arriaga, F., P. Montoya, J. Cancino, J. Toledo, and P. Liedo. 2014.** Female pupae of the genetic sexing strain “Tap-7” of *Anastrepha ludens* as hosts of *Coptera haywardi*. *BioControl.* 59: 149–157.
- Mahdavi, V., M. Saber, H. Rafiee-Dastjerdi, and A. Mehrvar. 2013.** Susceptibility of the hymenopteran parasitoid, *Habrobracon hebetor* (Say) (Braconidae) to the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* Vuillemin and *Metarhizium anisopliae* Sorokin. *Jordan J. Biol. Sci.* 6: 17–20.
- Martins, I.C.F., R.J. Silva, J.R.D.C.C. Alencar, K. Silva, F.C. Cividanes, R.T. Duarte, L.T. Agostini, and R. Polanczyk. 2014.** Interactions between the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) and the aphid parasitoid *Diaeretiella rapae* (Hymenoptera: Braconidae) on *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *J. Econ. Entomol.* 107: 933–938.
- Martínez, L., J.L. Leyva, and H. Bravo. 1993.** Utilización del esperma en hembras de *Diachasmimorpha longicaudata*. *Southwest. Entomol.* 18: 293–299.
- Montoya, P., J. Cancino, M. Zenil, G. Santiago, and J.M. Gutiérrez. 2007.** The augmentative biological control component in the Mexican Campaign against

Anastrepha spp. fruit flies, pp. 661–670. In M.J.B. Vreysen, A.S. Robinson and J. Hendrichs (eds.). Area-Wide Control of Insect Pests: From Research to Field Implementation. Springer. Dordrecht, The Netherlands.

Montoya, P., and J. Toledo. 2010. Estrategias de control biológico, pp: 169-182. In P. Montoya, J. Toledo, and E. Hernández (eds.), Moscas de la fruta: Fundamentos y procedimientos para su manejo. S y G editores. México City.

Montoya, P., J. Cancino, and L. Ruiz. 2012. Packing of fruit fly parasitoids for augmentative releases. *Insects*. 3: 889–899.

Novelo-Rincón, L.F., P. Montoya, V. Hernández-Ortiz, P. Liedo, and J. Toledo. 2009. Mating performance of sterile Mexican fruit fly *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) males used as vectors of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *J. Appl. Entomol.* 133: 702–710.

Orozco-Dávila, D., L. Quintero, E. Hernández, E. Solís, T. Artiaga, R. Hernández, C. Ortega, and P. Montoya. 2017. Mass rearing and sterile insect releases for the control of *Anastrepha* spp. pests in Mexico - a review. *Entomol. Exp. Appl.* 164: 176–187.

Ovruski, S.M., M. Aluja, J. Sivinski, and R. Wharton, R. 2000. Hymenopteran parasitoids on fruit-infesting Tephritidae (Diptera) in Latin America and the southern United States: Diversity, distribution, taxonomic status and their use in fruit fly biological control. *Integrated Pest Manag. Rev.* 5: 81–107.

Ovruski, S.M., P. Schliserman, S.R. Nuñez-Campero, L.E. Oroño, L.P. Bezdjian, P. Albornoz-Medina, and G.A. Van Nieuwenhove. 2009. A survey of hymenopterous larval-pupal parasitoids associated with *Anastrepha fraterculus* and

Ceratitis capitata (Diptera: Tephritidae) infesting wild guava (*Psidium guajava*) and peach (*Prunus persica*) in the southernmost section of the Bolivian Yungas forest. Fla. Entomol. 92: 269–275.

Pemberton, C.E. and H.F. Willard. 1918. A contribution to the biology of fruit fly parasites in Hawaii. J. Agric. Res. 25: 419–465.

Quesada-Moraga, E., A. Ruiz-García, and C. Santiago-Álvarez. 2006. Laboratory evaluation of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against puparia and adults of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). J. Econ. Entomol. 99: 1955–1966.

R Core Team. 2016. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Ramadan, M.M., T.T. Wong, and M.A. Wong. 1991. Influence of parasitoid size and age on male mating success of opiinae (Hymenoptera: Braconidae), larval parasitoids of fruit flies (Diptera: Tephritidae). Biol. Control. 1: 248–255.

Rashki, M., A. Kharazi-pakdel, H. Allahyari, and J.J.M. van Alphen. 2009. Interactions among the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales), the parasitoid, *Aphidius matricariae* (Hymenoptera: Braconidae), and its host, *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). Biol. Control. 50: 324–328.

Roy, H., and J. Pell. 2000. Interactions between entomopathogenic fungi and other natural enemies: Implications for biological control. Biocontrol Sci. Technol. 10: 737–752.

- Shipp, J.I., Y.Q. Zhang, D.W.A. Hunt, and G. Ferguson. 2003.** Influence of humidity and green house microclimate on the efficacy of *Beauveria bassiana* (Balsamo) for control of greenhouse arthropod pest. *Environ. Entomol.* 32: 1154–1163.
- Sivinski, J., K. Vuline, E. Meneses, and M. Aluja. 1998.** The bionomics of *Coptera haywardi* (Oglobin) (Hymenoptera: Diapriidae) and the other pupal parasitoids of tephritid fruit flies (Diptera). *Biol. Control.* 11: 193–202.
- Sookar, P., S. Bhagwant, and E.A. Ouna. 2008.** Isolation of entomopathogenic fungi from the soil and their pathogenicity to two fruit fly species (Diptera: Tephritidae). *J. Appl. Entomol.* 132: 778–788.
- St Leger, R.J. 1993.** Biology and mechanisms of insect-cuticle invasion by Deuteromycete fungal pathogens, pp. 211–229. *In* N.E. Beckage, S.N. Thompson, and B.A. Federici (eds), *Parasites and Pathogens of Insects*, Academic Press Inc., San Diego, CA.
- Toledo, J., S. Campos, S. Flores, P. Liedo, J.F. Barrera, A. Villaseñor, and P. Montoya. 2007.** Horizontal transmission of *Beauveria bassiana* in *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) under laboratory and field cage conditions. *J. Econ. Entomol.* 100: 291–197.
- Toledo, J., S. Flores, S. Campos, A. Villaseñor, W. Enkerlin, P. Liedo, A. Valle, and P. Montoya. 2017.** Pathogenicity of three formulations of *Beauveria bassiana* and efficacy of autoinoculation devices and sterile fruit fly males for dissemination of conidia for the control of *Ceratitis capitata*. *Entomol. Exp. Appl.* 164: 340–349.

- Toledo, J., P. Liedo, T. Williams, and J. Ibarra. 1999.** Toxicity of *Bacillus thuringiensis* β -exotoxin to three species of fruit flies (Diptera: Tephritidae). *J. Econ. Entomol.* 99: 1052–1056.
- Toledo, J., P. Liedo, S. Flores, S. Campos, A. Villaseñor, and P. Montoya. 2008.** Use of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for fruit fly control: A novel approach, pp. 127–132. *In* R. L. Sugayama, R. A. Zucchi, S. M. Ovruski, and J. Sivinski (eds.). *Fruit flies of economic importance: From basic to applied knowledge. Proc. of the 7th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance.* 10 – 15 September 2006. Press Color Graficos Especializados Ltda. Salvador, Brazil.
- Vayssières, J-F., R. Wharton, A. Adandonon, and A. Sinzogan. 2011.** Preliminary inventory of parasitoids associated with fruit flies in mangoes, guavas, cashew pepper and wild fruit crops in Benin. *BioControl.* 56: 35–43.
- Wilson, W.M., J. E. Ibarra, A. Oropeza, M.A. Hernández, R.A. Toledo-Hernández, and J. Toledo. 2017.** Infection of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) adults during emergence from soil treated with *Beauveria bassiana* under various texture, humidity, and temperature conditions. *Fla. Entomol.* 100: 1–6.
- Yeo, H., J.K. Pell, B.J. Pye and P.G. Alderson. 1998.** A biorational approach to selecting mycoinsecticides for aphid management, pp. 307–308. *In* Conference Proceedings: The 1998 Brighton Conference Pests and Diseases. British Crop Protection Council Brighton. 16 – 19 November 1998, Farnham, Surrey, UK.

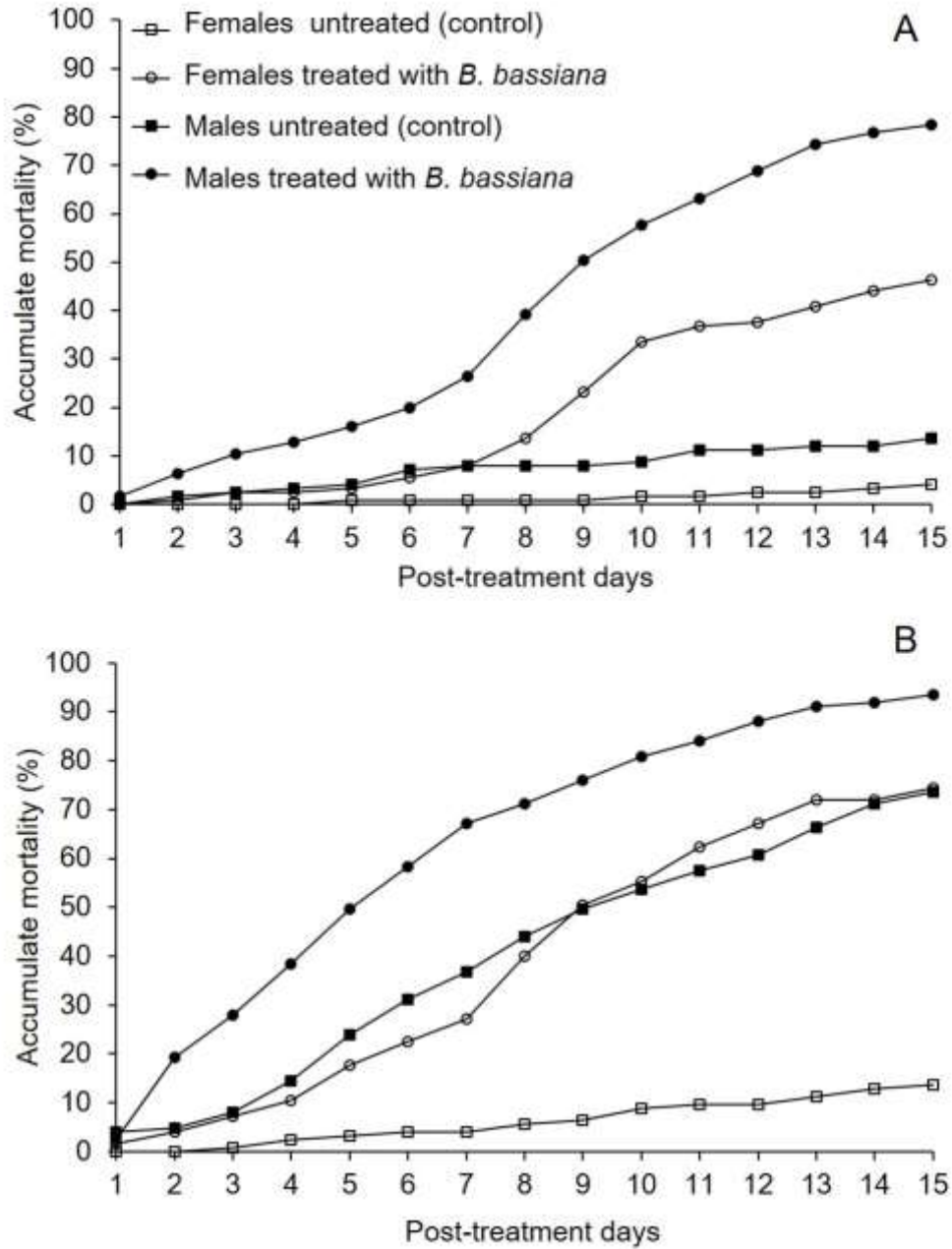


Fig. 1. Accumulated mortality percentage of *Coptera haywardi* over 15 days, caused by *Beauveria bassiana*, in males and females of two ages: **A** 1-4 d-old, and, **B** 5-10 d-old (n=125) in the susceptibility test.

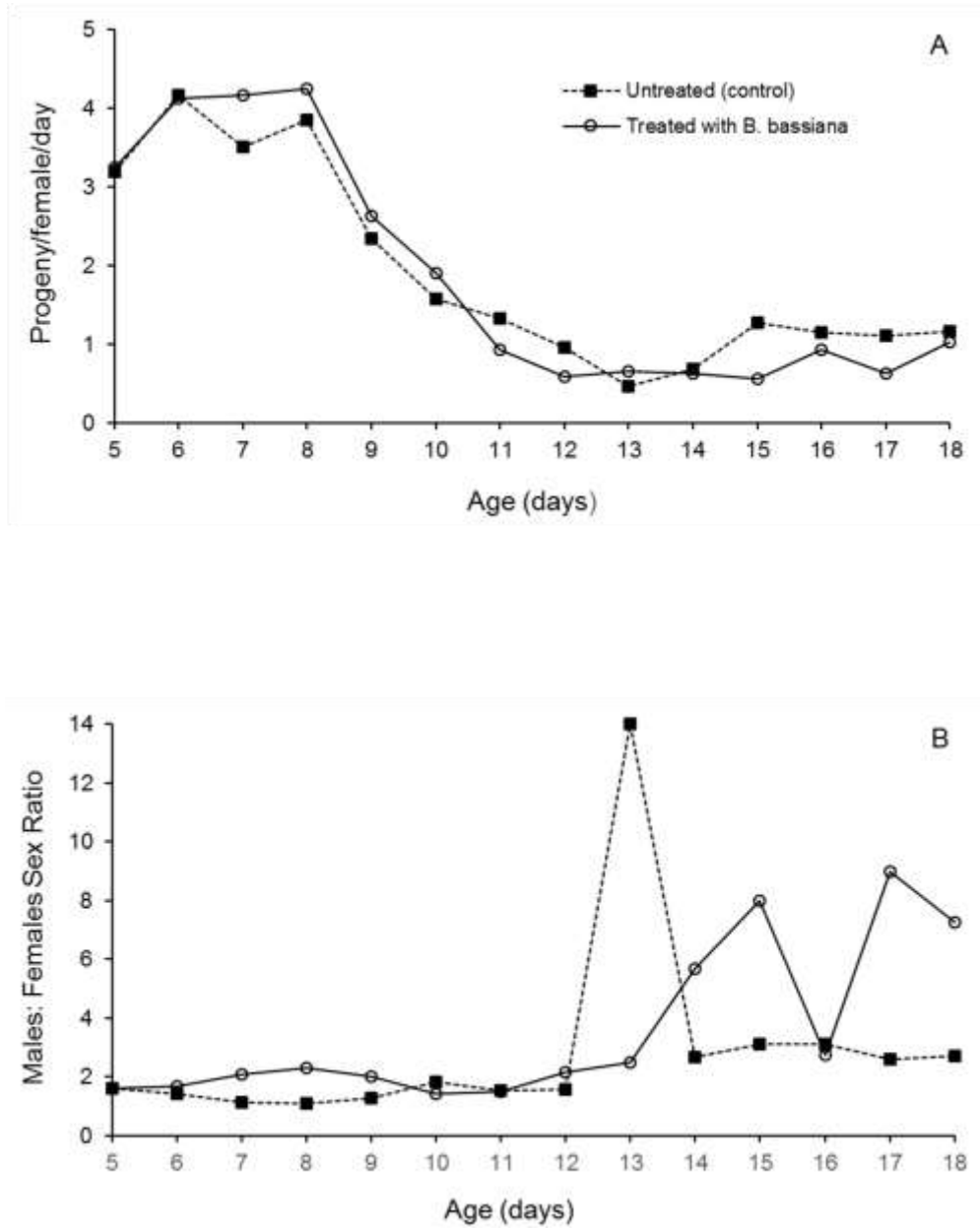


Fig. 2. A. *Coptera haywardi* net fecundity (parasitoids/female/day) from *Beauveria bassiana* treated and untreated adults pairs (1♀ and 1♂) using *Anastrepha obliqua* pupae of 3-6 days as host (n=32). **B.** Offspring age-specific sex ratio, expressed as Males: Female.

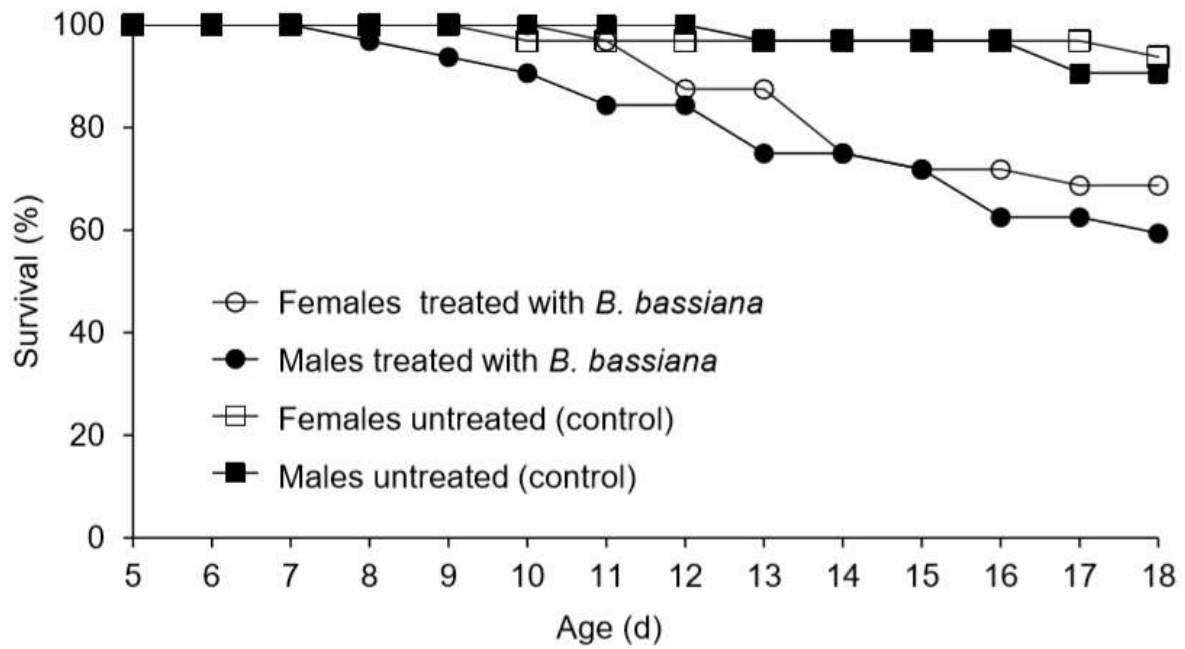


Fig. 3. Percentage of survival in male and female parasitoids *Coptera haywardi* treated with *Beauveria bassiana*, and their respective controls, over a total period of 18 days during the fecundity test.

Table 1. Percentage emergence (%±SD) of *Coptera haywardi* adults developed in pupae of *Anastrepha obliqua* treated and untreated with *Beauveria bassiana* (n=350), percent of emergence or *Anastrepha obliqua* flies and percent of pupae that did not emerge.

Treatment	<i>C. haywardi</i> emergence			Emerged	Non
	Total	Male	Female	<i>A. obliqua</i> adults	emerge pupae
Treated	72.3±15.7a	34.3±7.4a	38.0±9.2a	4.0±3.8a	23.7±18.0a
Untreated	75.4±14.8a	34.6±7.4a	40.8±8.6a	3.7±3.5a	20.9±17.2a

Means followed by similar letter in the same column indicate non-significant differences (p<0.05). Fisher exact test (p<0.05).

Table 2. Percentage of mortality (means \pm SD) and LT₅₀ of *Coptera haywardi* caused by *Beauveria bassiana*.

Sex	Age (Days)	Mortality treated ^a (%)	Mortality untreated (Control) (%)	Statistic analysis ^b	LT ₅₀ of mortality treated (Days)
Male	1-4	78.4 \pm 17.6a	13.6 \pm 7.8b	$t = -7.54$; $df = 5$; $P = 0.0004$	8.5 (8.5-10.5)
	5-10	93.6 \pm 5.3a	73.6 \pm 13.1b	$t = -3.16$; $df = 5$; $P = 0.0235$	5.5 (4.5-6.5)
Female	1-4	46.4 \pm 31.1a	4.0 \pm 4.9b	$t = -3.01$; $df = 4$; $P = 0.037$	Undefined
	5-10	74.4 \pm 28.6a	13.6 \pm 10.0b	$t = -4.48$; $df = 5$; $P = 0.006$	8.5 (8.5-10.5)

Undefined: due to the fact that the mortality caused by *B. bassiana* did not exceed 50% of the population evaluated. Means followed by different letters in each column indicate significant differences ($P < 0.05$)

^aMortality corrected by Abbott formula

^bWelch Two Sample t -test.

Table 3. ANOVA results on the mortality of *C. haywardi* caused by *B. bassiana* as affected by age (1-4 d and 5-10 d), sex (female and male), and *B. bassiana* treatment and their interactions.

Effect	F	P
Age	17.88	1.83×10^4 ***
Sex	23.20	3.37×10^5 ***
Treatment	49.63	5.4×10^8 ***
Age: Sex	0.42	0.51
Age: Treatment	5.42	0.02 *
Sex: Treatment	4.95	0.03 *
Age: Sex: Treatment	5.90	0.02 *

Signif. Codes: 0 ***, 0.001 **, 0.01*, 0.05+, 0.1, 1.

CAPITULO 2

Discriminación de *Coptera haywardi* (Hymenoptera: Diapriidae) hacia pupas de *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae) tratadas con *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae)

Olga Yaneth Martínez-Barrera¹, Jorge Toledo¹, Jorge Cancino², Pablo Liedo¹, Jaime Gómez¹, Javier Valle-Mora¹, Pablo Montoya².

¹El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Carretera Antigua Aeropuerto Km. 2.5, C.P. 30700 Tapachula, Chiapas, México.

oymartinez@ecosur.edu.mx; jtoledo@ecosur.mx; jorge.cancino.i@senasica.gob.mx; pliedo@ecosur.mx; jgomez@ecosur.mx; jvalle@ecosur.mx; pablo.montoya.i@senasica.gob.mx

²Programa Moscafrut SADER-SENASICA, Camino a los Cacahotales S/N, C.P. 30860 Metapa de Domínguez, Chiapas, México.

Resumen

La capacidad de discriminación de un parasitoide puede favorecer el éxito en su desarrollo y en su eficiencia como agente de control biológico cuando se combina con otro enemigo natural, ya que significaría un mayor control de la población plaga. En este estudio se buscó caracterizar la capacidad de discriminación de hembras de *Coptera haywardi* hacia pupas de *Anastrepha obliqua* no tratadas (control) y tratadas con *Beauveria bassiana* bajo tres condiciones: a) Sin elección, exponiendo por separado pupas de *A. obliqua* tratadas con diferentes tiempos de aplicación del hongo (0, 24, 48 y 72 h) y sin aplicación del hongo (control absoluto). b) Con elección: 5 pupas sin tratar y 5 pupas tratadas con el mismo tiempo de aplicación del hongo, y c) Con opción de elegir entre pupas tratadas con los diferentes tiempos de aplicación del hongo, colocando 2 pupas de cada tratamiento. Adicionalmente, se realizaron 14 observaciones para determinar el comportamiento de discriminación y los tiempos de oviposición de cada hembra. Se observó que las hembras de *C. haywardi* presentan diferente capacidad de discriminación dependiendo de la prueba: En la prueba sin elección no se observó discriminación. En la elección de dos opciones, las hembras discriminaron significativamente las pupas que fueron tratadas con 0, 24 y 72 h previo a su exposición. En la opción de elección de todos los tiempos de aplicación, las hembras prefirieron parasitar pupas no tratadas, comportamiento que se corroboró con los resultados obtenidos en las observaciones directas. Los tiempos de oviposición fueron de entre 9 a 86 min. La capacidad de discriminación de *C. haywardi* puede mejorar la supresión de la mosca si se usa simultáneamente con *B. bassiana*, ya que evitará interferir con la acción ejercida por el hongo al prefiriendo pupas sin el hongo. Es necesario mayor investigación.

Palabras clave: Parasitoides, Entomopatógenos, Control biológico múltiple, Preferencia oviposición.

1. Introducción

Dentro de la economía fisiológica de los parasitoides, la capacidad de discriminación primero reduce el riesgo de realizar una mala inversión de recursos cuando los hospederos están parasitados y existe un ambiente de alta competencia o un riesgo de eliminación, y al mismo tiempo se incrementa la posibilidad de proporcionar mejores condiciones para el desarrollo de una progenie de mejor calidad al ovipositar en hospederos no parasitados (van Lenteren 1981, Godfray 1994, Rosenheim y Mangel 1994, Quicke 1997, Agboka et al. 2002, Adams y Six 2007, van Baaren et al. 2009). Esta habilidad de los parasitoides puede tener un papel importante en programas de control biológico, ya que la capacidad de búsqueda es más eficiente, lo que se debe manifestar en un efecto más notable en la regulación de la población plaga (van Dijken y van Alphen 1998, Cusson et al. 2002).

Con el objeto de maximizar el control de la población plaga se ha propuesto el uso combinado de dos enemigos naturales. Los casos más comunes son la integración de un parasitoide y un entomopatógeno en el control de una especie, en donde se ha considerado fundamental conocer el tipo de interacción que se presenta entre ambos para definir la efectividad de su aplicación (Reyes et al. 1995, Labbé et al. 2009, Baverstock et al. 2009, Zhu y Jun, 2012, Martins et al. 2014). Estas interacciones pueden depender en ocasiones de la capacidad de discriminación de los parasitoides cuando el hospedero está infectado, ya que esto evitará una duplicidad en el ataque de la plaga y protegerá al parasitoide de una posible infección con los microorganismos entomopatógenos que tienen una acción generalista. Un ejemplo de esta capacidad de discriminación se reporta con el parasitoide *Encarsia formosa* (Gahan) (Hymenoptera: Aphelinidae), dado a que no oviposita sobre ninfas de mosquitas blancas (*Trialeurodes vaporariorum*) (Westwood) (Hemiptera: Aleyrodidae) previamente tratadas con *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Hypocreales: Cordycipitaceae), prefiriendo hospederos sanos, lo que induce a hacer más eficiente el control hacia esta plaga (Labbé et al. 2009). Sin embargo, esta capacidad de discriminación puede aumentar o disminuir en relación

con el tiempo transcurrido después de la aplicación del hongo (Fransen y van Lenteren 1993, Mesquita y Lacey 2001).

En el control biológico de moscas de la fruta (Diptera: Tephritidae) la combinación de un parasitoide y un entomopatógeno pueden plantearse como una opción viable de manejo. Diversos estudios han demostrado de manera independiente que el hongo entomopatógeno *B. bassiana* y el parasitoide de pupas *C. haywardi* tienen un alto potencial de ataque de esta plaga por lo que se consideran buenos candidatos para este fin (De la Rosa et al. 2002, Toledo et al. 2007, Hernández Díaz-Ordaz et al. 2010, Cancino et al. 2012). *Beauveria bassiana* se destaca como un patógeno natural de insectos, cuyos hospederos incluyen diferentes plagas de importancia agrícola, cuyo efecto patogénico varía de acuerdo al origen de las cepas que se utilicen (Yeo et al. 1998, Money 2016). Por otro lado, *C. haywardi* (Oglobin), es un endoparasitoide solitario de pupas cuya principal característica es su alta especificidad y capacidad de búsqueda hacia moscas de la familia Tephritidae (Sivinski et al. 1998, Guillén et al. 2002). Adicionalmente se ha reconocido su capacidad de discriminación hacia pupas que han sido parasitadas tanto por sus conoespecíficos como por un heteroespecífico (*Diachasmimorpha longicaudata*) (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae) (Cancino et al. 2012).

Se considera que el uso combinado de estos enemigos naturales podría reforzar el control biológico de pupas de moscas de la fruta mediante un efecto complementario. El planteamiento inicial considera que las pupas infectadas con *B. bassiana* serán discriminadas por *C. haywardi*, por lo que la oviposición de pupas no infectadas tendría un efecto complementario en la reducción de la población de pupas. El estado de pupa tiene alta relevancia en el control de moscas de la fruta debido a que, a) la población de pupas es el estado final antes de la emergencia en donde la población de moscas ha invertido sus recursos para la nueva progenie y puede representar entre el 5 al 11% de la población de moscas de la fruta para las especies de ciclo corto (Liedo et al. 2010); b) es un estado refugiado en el suelo y con una distribución difícil de ubicar y c) es el período más variado en cuanto al periodo de duración se refiere, comprendiendo para especies multivoltinas entre 7 a 25 d (Arredondo et al. 2010).

En este trabajo se evaluó la capacidad de *C. haywardi* para discriminar pupas de *Anastrepha obliqua* (Macquart) (Diptera: Tephritidae), infectadas con *B. bassiana*. Las evaluaciones se realizaron sobre *A. obliqua* debido a su importancia como plaga en el cultivo del mango (*Mangifera indica* L.) (Hernández-Ortiz 1992, Aluja 1996, Castañeda et al. 2015). Los resultados obtenidos son de interés para el manejo de dicha plaga utilizando ambos agentes de control biológico.

2. Materiales y Métodos

2.1. Sitio de estudio

La evaluación de la capacidad de discriminación del parasitoide se realizó bajo condiciones controladas de laboratorio ($24\pm 1^\circ\text{C}$, 60-80% de humedad relativa y un fotoperiodo de 12:12 h de luz: oscuridad) en el Departamento de Detección y Control de la Subdirección de Desarrollo de Métodos del Programa Moscafrut (SADER-SENASICA), ubicado en Metapa de Domínguez, Chiapas, México.

2.2. Material biológico

La cepa Bb-Et de *B. bassiana* que se utilizó fue producida en el Laboratorio de Organismos Benéficos, Hongos, Insectos y Nemátodos, ubicado en Tuxtla Chico, Chiapas, México (formulado con celite 400, en una concentración de 5×10^{11} conidios/g, y una viabilidad $> 85\%$, 4.25×10^{11} UFC). Los adultos de *C. haywardi* procedieron de una colonia mantenida por ~250 generaciones en el laboratorio de Control Biológico, y las larvas de *A. obliqua* fueron proporcionadas por la Planta Moscafrut donde se mantiene una cría, de acuerdo a la metodología descrita por Artiaga-López et al. (2004).

2.3. Discriminación de *C. haywardi* en pupas de *A. obliqua* tratadas con *B. bassiana*.

En el interior de un contenedor de plástico (8×12 cm, alto \times diámetro) se colocaron de forma homogénea, 10 pupas de *A. obliqua* de 4-5 días de edad, cada una de ellas separadas a una distancia de ~ 1 cm, sobre sustrato de fibra de coco que se depositó en una caja Petri (1×4 cm, alto \times diámetro) y protegidas de la luz con un cartón de color negro para promover la búsqueda y forrajeo de *C. haywardi*. Posteriormente se introdujo una hembra de *C. haywardi* de 5-6 días de edad durante 24 horas, con previa experiencia

de parasitismo (24 horas previas se le expusieron pupas sin tratar de 3 a 4 días de edad). Las pupas fueron tratadas con el hongo *B. bassiana* a diferentes tiempos (0, 24, 48 y 72 h) previamente antes de la exposición ante la hembra parasitoide. Para la aplicación del hongo, se ubicó grupos de 30 pupas de *A. obliqua* de diferentes edades (2, 3, 4 y 5 días) en cajas Petri que contenían 0.1 gr de conidio seco (de acuerdo al tratamiento, con el fin que cumpliera el tiempo previo de aplicación) y las pupas fueron cubiertas con los conidios por medio con una leve agitación. Para estimar los tipos de discriminación, el experimento se realizó en tres escenarios: a) Prueba sin elección, b) Prueba con dos opciones de elección, y c) Prueba con opción de elección de hospederos tratados con el hongo a diferentes tiempos. Cada tratamiento fue repetido 10 veces.

a) Pruebas sin elección. Todas las 10 pupas expuestas a la hembra de *C. haywardi* tenían la misma condición de tiempo de aplicación del hongo de los diferentes tratamientos (10 pupas tratadas a 0 h; 10 pupas tratadas a 24 h; 10 pupas tratadas a 48 h y 10 pupas tratadas a 72 h). Cada tratamiento se expuso por separado. Se empleó como control 10 pupas de *A. obliqua* sin tratar con el hongo. Este control fue usado como control absoluto de todas las pruebas. b) Prueba con dos opciones de elección. En este caso, la hembra de *C. haywardi* tuvo dos opciones para ovipositar, entre 5 pupas sin aplicación de *B. bassiana* (Control), y 5 pupas tratadas con *B. bassiana*. La distribución fue aleatoria entre tratadas y no tratadas. Se realizaron cuatro tratamientos: 0 h + control, 24 h + control, 48 h + control, y 72 h + control. Y, c) Prueba con opción de elección de todos los tiempos de aplicación del hongo. La hembra de *C. haywardi* tuvo opción de elegir al mismo tiempo y en un mismo espacio todas las pupas tratadas con *B. bassiana* a diferentes tiempos. Se emplearon dos pupas por cada tiempo de aplicación del hongo (0, 24, 48, y 72 h) más dos pupas sin aplicación del hongo. Para su identificación, cada pupa fue etiquetada en el exterior de la caja Petri.

De esta etapa se realizaron tres repeticiones más, con el propósito de comprobar el parasitismo mediante la disección de pupas, y observar el estado de desarrollo después de 3 días de la exposición al parasitoide.

Después de la exposición a las hembras parasitoides, las pupas de cada tratamiento se mantuvieron separadas en contenedores de plásticos (4 × 8 cm, alto × diámetro) con

sustrato de fibra de coco como medio de pupación hasta la emergencia de los parasitoides (~ 33 d).

2.4. Descripción del comportamiento de discriminación de *C. haywardi*.

Se realizaron 14 observaciones de la búsqueda y elección de *C. haywardi* de pupas tratadas, tal cual como se hizo la prueba con opción de elección de todos los tiempos de aplicación con el hongo. Las observaciones iniciaron en el momento en el que se liberó la hembra del parasitoide entre las 12 y 13 horas con seguimiento de 3 horas aproximadamente. En la primera hora la observación fue directa y se realizó un registro videográfico (Cámara integrada a un teléfono celular Marca Samsung Modelo SM-J700M, China); posteriormente, solo se observó cada hora la actividad de la hembra. Se registró la hora en que inició y terminó la oviposición. Al finalizar la exposición por 24 horas, las pupas se depositaron de forma individual en contenedores de plástico (3 × 3 cm, alto × diámetro) y 72 horas después, se disectó cada una de las pupas bajo observación utilizando un microscopio estereoscopio (Marca Carl Zeiss® Modelo Stereo Discovery V8, Alemania), para comprobar el parasitismo, observar el estado de desarrollo del parasitoide y relacionar el número de cicatrices con la presencia de inmaduros.

En estas observaciones se contabilizaron dos eventos: oviposición, y tiempo refractario. La oviposición fue tomada como el tiempo en que la hembra estuvo estática por un período mayor a 8 min, con su ovipositor insertado dentro de la pupa, con una posición en general paralela sobre la pupa. El tiempo refractario, se consideró al periodo comprendido entre el fin de una oviposición el inicio de otra. Adicionalmente se registró la secuencia en que el parasitoide eligió las pupas para ovipositar.

2.5. Mortalidad de *C. haywardi* por infección de *B. bassiana*.

Las 120 hembras de *C. haywardi* usadas en todas las pruebas de los tres escenarios, se mantuvieron en jaulas de plástico (11 × 11 × 16.5 cm) durante 15 días, con alimento (miel) y agua (en frasco de vidrio, con un papel filtro insertado en un orificio de la tapa), para verificar la mortalidad causada por la infección de *B. bassiana* adquirida durante el forrajeo de las pupas. Diariamente se registró la mortalidad de las hembras, los cuerpos muertos se desinfectaron mediante enjuagues en una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 5 seg, y después se lavaron con agua destilada estéril, siguiendo la metodología descrita en Wilson et al. (2017). Para obtener evidencia de infección por *B.*

bassiana, los especímenes fueron colocados en una cámara húmeda formadas por papel filtro humedecido con agua destilada estéril en cajas Petri (diámetro: 11 cm) y aquellos que presentaron signos de crecimiento del hongo fueron consideradas como casos positivos de muerte por infección de *B. bassiana*.

2.5. Análisis de datos

Los datos expresados en porcentaje de parasitismo de cada tratamiento fueron calculados a partir de la emergencia de los parasitoides adultos, tomando como base el número total de pupas expuestas, cuyo promedio se obtuvo de los datos obtenidos de las 10 repeticiones. Para los resultados de las pruebas sin elección, con dos opciones de elección de tratamiento del hongo fueron evaluados mediante un Modelo Lineal Generalizado MLG con respuesta Binomial. Y en la prueba con opción de elección de diferentes tiempos de aplicación del hongo se analizó mediante un ANOVA con comparación de medias Tukey. Un MLG con respuesta Poisson fue aplicado para analizar el parasitismo y la relación del número de cicatrices con la cantidad de inmaduros presentes en las pupas expuestas al parasitoide en la prueba con opción de elección de diferentes tiempos que usadas en las observaciones. Los tiempos de parasitismo de las pupas en los diferentes tratamientos en la observación, se compararon con una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Los análisis se realizaron con el programa estadístico R x64 3.2.4 (Fox y Bouchet-Valat 2019, Fox 2005, 2017, R Core Team 2019).

3. Resultados

3.1. Discriminación de *C. haywardi* en pupas de *A. obliqua* tratadas con *B. bassiana*.

En las pruebas sin elección, el parasitoide *C. haywardi* no mostró mayor propensión a parasitar pupas tratadas o no tratadas en los diferentes tiempos previos a su exposición ($\chi^2 = 1.934$; $df = 4$; $p = 0.748$). Los porcentajes de emergencia del parasitoide fueron de 65, 68, 59, 61 y 61%, correspondientes a pupas sin aplicación de *B. bassiana* y aquellas con aplicación previa del hongo a 0, 24, 48 y 72 h, respectivamente. La relación sexual de los parasitoides emergidos en cada tratamiento fue de ~1:1 (Fig. 1).

En las pruebas de elección con dos opciones, se observó que *C. haywardi* discrimina las pupas tratadas con *B. bassiana* a diferentes tiempos, con excepción de las pupas tratadas a 48 h previas a la exposición del parasitoide. En las pupas tratadas a 0 h el porcentaje de parasitismo fue de 22%, y de 36% en pupas sin hongo con diferencia significativa ($\chi^2 = 7.597$; $df = 1$; $p = 0.006$), para un total de parasitismo de 58%. En pupas tratadas a 24 h fue de 23% y en pupas sin hongo del 33% ($\chi^2 = 4.088$; $df = 1$; $p = 0.043$), para un total de parasitismo de la hembra del 56%. En pupas con 48 h de aplicación del hongo el parasitismo fue de 26% y en pupas sin hongo fue de 30% ($\chi^2 = 0.650$; $df = 1$; $p = 0.420$) (Total parasitismo: 56%) y en las pupas con 72 h de aplicación del hongo el parasitismo fue del 20% y en las pupas no tratadas fue de 30% ($\chi^2 = 6.864$; $df = 1$; $p = 0.008$) para un total de parasitismo del 50% (Fig. 2).

Cuando las hembras *C. haywardi* tuvieron la oportunidad de elegir entre pupas que fueron tratadas a diferentes tiempos previos a la exposición del parasitoide, el parasitismo en las pupas sin tratamiento del hongo fue del 16.3%, valor que fue mayor que en las pupas tratadas con *B. bassiana* a 0, 24 y 48 h previas, que presentaron parasitismos de 11.7, 10.0, 11.3%, respectivamente, evidenciando la discriminación debido a su diferencia significativa ($\chi^2 = 15.56$; $df = 4$; $p = 0.004$). La única excepción fue con las pupas tratadas 72 h antes, cuyo parasitismo fue de 12.3%. El parasitismo promedio en esta prueba correspondió al 61.7% (Fig. 3).

3.2. Observación del comportamiento de discriminación de *C. haywardi*.

Se observó un total de 44 eventos donde la hembra estuvo en un tiempo mayor de 8 min sobre las pupas de *A. obliqua*, y en las disecciones se comprobó que 32 fueron oviposiciones tras encontrar estados inmaduros del parasitoide. En el cuadro 1 se indican estos tiempos de parasitismo por tratamiento registrados, el menor tiempo promedio de parasitismo fue en pupas con 48 h después de la aplicación del hongo *B. bassiana* (16 min), y el mayor fue de 37.2 min en las pupas expuestas inmediatamente después de la aplicación del hongo (24 h). Las diferencias en los tiempos de parasitación resultaron no significativas ($\chi^2 = 3.721$; $df = 4$; $p = 0.445$). El tiempo promedio de oviposición en general fue de 24.6 min, con un mínimo de 9 y un máximo de 73 min. El tiempo refractario entre

los parasitismos fue en promedio de 10.6 min, con un mínimo de 2 y un máximo de 36 min.

En el cuadro 2 se presenta la secuencia en la actividad de elección de la pupa de *A. obliqua* no tratadas y tratadas con *B. bassiana* que se presentó durante tres horas de observación. Durante este tiempo una hembra de *C. haywardi* presentó comportamiento de oviposición hasta 6 veces (7.14%), aunque la moda fue de 2 (42.8%). La secuencia de elección mostró que la hembra de *C. haywardi* se dirige primero a pupas sin tratar con el hongo (42.9%), seguido de las pupas tratadas con *B. bassiana* 24 h previas a la prueba (28.6%), posteriormente pupas tratadas con 72 h (14.3%), y en la misma preferencia las tratadas 48 y 0 h antes de la prueba (7.1%). Además, se observó que las hembras *C. haywardi* puede parasitar dos veces la misma pupa, aunque este evento solo ocurrió 2 veces en pupas sin aplicación del hongo.

La disección de las 140 pupas de *A. obliqua* que se expusieron a *C. haywardi* en las pruebas de observación, evidenció la presencia de estados inmaduros del parasitoide solamente en 45 pupas (32.1%). Se encontró la presencia de huevos y larvas de primer instar, en algunos casos solitarios y en otros compartiendo el mismo hospedero. La distribución fue de la siguiente manera: en 25 pupas se encontró una larva de primer instar de *C. haywardi*, en ocho pupas hubo la presencia de un huevo del parasitoide, dos larvas del primer instar de *C. haywardi* se encontraron en una frecuencia de seis pupas, en tres pupas se repitió el evento de la presencia de un huevo próximo a eclosionar con una larva de primer instar del parasitoide, en dos pupas se repitió la presencia de dos huevos y sólo en una pupa se encontraron cinco huevos (Figura 4). De acuerdo a estas observaciones y las disecciones, se puede considerar que *C. haywardi* tiene preferencia por pupas no infectadas por *B. bassiana* en comparación con las pupas tratadas previamente ($\chi^2 = 29.753$; $df = 4$; $p = 0.5496e-05$). Por otra parte, no hubo evidencia de una relación directa entre el número de cicatrices observadas con el número de inmaduros encontrados ($\chi^2 = 1.196$; $gl = 1$; $p = 0.274$).

3.3. Mortalidad de *C. haywardi* por infección de *B. bassiana*.

Un total de 61 hembras murieron, de las cuales 32.8% ($n = 20$) fue por infección por *B. bassiana*, y 67.2% ($n = 41$) por otras causas naturales. La mortalidad provocada por el

hongo ocurrió alrededor de ~3.5 días después que las pupas tratadas tuvieron contacto con el hongo.

4. Discusión

Los resultados obtenidos indicaron que *C. haywardi* discrimina pupas de *A. obliqua* tratadas con *B. bassiana* cuando tuvo la oportunidad de elegir entre pupas con diferente tiempo de haber sido tratadas con pupas sin tratar. Cuando se evaluaron sin opción a elección no se observaron diferencias en el parasitismo de pupas tratadas con el hongo a diferentes tiempos previos a la exposición y no tratadas. Esto sugiere que ante la falta de opciones, las hembras prefieren parasitar, que no hacerlo. Cuando las hembras tuvieron como opción de elegir entre dos opciones, no presentaron ninguna preferencia únicamente entre pupas tratadas con 48 h previas y no tratadas. Cuando las hembras tuvieron la oportunidad de elegir entre las pupas tratadas con todos los tiempos de aplicación del hongo, fueron capaces de discriminar las pupas tratadas previamente de 0, 24 y 48 h. En la prueba de todas las opciones donde se realizó la observación directa, se corroboró la discriminación hacia pupas tratadas con el hongo.

Coptera haywardi es una especie que se ha catalogado con una alta capacidad de discriminación, tanto para pupas atacadas por conoespecíficos como por heteroespecíficos cuando existe una alta proporción de pupas sin atacar (Cancino et al., 2012). Sin embargo, cuando *C. haywardi* no tiene opción para elegir, el porcentaje de parasitismo es similar tanto en pupas parasitadas como no parasitadas (Cancino et al., 2012). Lo anterior coincide con lo obtenido en nuestra prueba sin elección, cuando la hembra no tuvo opción de elegir entre pupas tratadas y no tratadas, su parasitismo fue similar al control, debido a que parasitó en una pupa con presencia del hongo que abstenerse de parasitar, lo que representaría una mala inversión de recursos debido a que esto puede disminuir la calidad del hospedero. Se considera que toma esta decisión principalmente por la necesidad de liberar la carga de sus huevos, o la influencia de otros factores como la edad de la hembra, la experiencia previa o la disponibilidad del hospedero como lo describen Visser et al. (1992), Islam y Copland (2000) y Outreman et al. (2001).

Rashki et al. (2009), encontraron que la discriminación del parasitoide *Aphidius matricariae* (Haliday) (Hymenoptera: Braconidae) aumentó significativamente en relación al tiempo de aplicación de *B. bassiana*, donde los pulgones *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) tratados con 72 h registraron el menor parasitismo. Brobyn et al. (1988) demostraron que en áfidos (*Metopoplophium dirhodum* (Walker) (Hemiptera: Aphididae)) con 72 h tratados con *Erynia neoaphidis* (Entomophthorales: Entomophthoraceae) fueron menos parasitados por *Aphidius rhopalosiphi* (DeStefani-Perez) (Hymenoptera: Aphidiidae) que en áfidos no tratados con el hongo, coincidiendo que con este tiempo de aplicación del hongo es mayor la discriminación de los parasitoides. En estos reportes se observa que a un mayor tiempo de aplicación y desarrollo del hongo entomopatógeno el parasitoide logra discriminar el hospedero infectado.

Aunque se evidenció una capacidad de *C. haywardi* para discriminar pupas tratadas con el hongo a 0, 24 y 72 h previas a exponerse a los parasitoides con dos opciones de elección, este comportamiento no fue consistente como cuando tuvo la posibilidad de elegir entre pupas tratadas con el hongo a diferentes tiempos, dado que solo discriminó pupas con 0, 24 y 48 h después de tratadas. No se observó una tendencia de aumentar su discriminación a medida que incrementa el tiempo de aplicación del hongo a las pupas. Una posible explicación es que las metodologías empleadas en las pruebas con opción de elección hayan provocado confusión por la corta distancia de ubicación en que se encontraban las pupas tratadas a diferentes tiempos en su exposición simultánea.

Reportes de parasitoides de hemípteros muestran una fuerte tendencia a evitar atacar hospederos infectados con hongos (Powell et al. 1986, Brobyn et al. 1988, Fransen y van Lenteren 1993, Mesquita y Lacey 2001), donde se menciona como principal causa de esta discriminación, la presencia de cuerpos hifales o metabolitos fúngicos en la hemolinfa del hospedero que el parasitoide puede detectar durante los intentos de oviposición (Fransen y van Lenteren 1993, Brobyn et al. 1988, Mesquita y Lacey 2001). Sin embargo, en *C. haywardi* no se ha estudiado con profundidad los tipos de mecanismos que utiliza en la búsqueda y discriminación de sus hospederos (Cancino et al. 2012).

El tiempo de reconocimiento de hospedero invertido por el *C. haywardi* fue corto. De acuerdo con Cancino et al. (2012), este parasitoide presenta un periodo definido de inspección donde aparentemente se guía por la forma y el contorno del hospedero, lo cual parece ser un mecanismo característico de los parasitoides de pupa (Vinson 1976, Romani et al. 2002, Goubault et al. 2004). Los periodos de oviposición que registraron las hembras de *C. haywardi* se caracterizan por ser prolongados en comparación con otros parasitoides, lo cual también se considera típico de esta especie (Cancino et al. 2012). Se observó que el mayor tiempo de oviposición fue en pupas recién tratadas con el hongo (*Bb-0h*, ~86 min), pero consideramos que éste no fue el factor determinante, ya que en pupas no tratadas con el hongo el tiempo de parasitismo también fue prolongado (~71 min). Estos tiempos son diferentes a los reportados en parasitoides que atacan plagas hemípteras, donde el tiempo de oviposición en hospederos tratados con el hongo fue significativamente menor que el registrado en hospederos sin aplicación del hongo entomopatógeno (Fransen y van Lenteren 1993, Mesquita y Lacey 2001).

En conclusión, se demostró que *C. haywardi* discrimina pupas tratadas con *B. bassiana*, lo cual puede favorecer a un efecto complementario si ambos enemigos naturales se usaran simultáneamente para el control de *A. obliqua*, ya que las hembras enfocarían su parasitismo hacia pupas sin presencia del hongo. Sin embargo, se requieren evaluaciones adicionales para validar el uso simultáneo o secuenciado de ambos agentes de control pueden generar resultados prometedores para el control de este tipo de plagas.

Agradecimientos

Al Programa Moscafrut (SADER-SENASICA) por las facilidades brindadas para trabajar en sus laboratorios y por el suministro de material biológico (*C. haywardi* y *A. obliqua*), además de materiales, equipos y el apoyo del personal técnico, investigador y administrativo. De la misma forma se agradece al laboratorio de organismos benéficos, hongos, insectos y nemátodos por el suministro del hongo *B. bassiana*. Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de posgrado No. 405982 otorgada a Olga Yaneth Martínez Barrera.

Bibliografía

- Adams AS, Six DL. 2007. Detection of host habitat by parasitoids using cues associated with mycangial fungi of the mountain pine beetle, *Dendroctonus ponderosae*. Canadian Entomology 140: 124-127.
- Agboka K, Schulthess F, Chabi-Olaye A, Labo I, Gounou S, Smith H. 2002. Self-intra, and interspecific host discrimination in *Telenomus busseolae* Gahan and *T. isis* Polaszek (Hymenoptera: Scelionidae), sympatric egg parasitoids of the African Cereal Borer *Sesamia calamistis* Hampson (Lepidoptera: Noctuidae). Journal of Insect Behavior 15: 1-12.
- Aluja M. 1996. Future trends in fruit fly management. pp. 309-320. En: McPheron, B.A. y G.J. Steck (eds.). Fruit fly pests. A world assessment of their biology and management. Delray St. Lucie Press, Beach, FL.
- Arredondo J, Díaz-Fleischer F, Pérez-Staples D. 2010. Biología y Comportamiento. En: Montoya P, Toledo J, Hernández E. eds. Moscas de la fruta: Fundamentos y Procedimientos de Manejo. S y G editores, México, D.F. p. 91-106.
- Artiaga-López T, Hernández E, Domínguez-Gordillo J, Moreno DS, Orozco-Dávila D. 2004. Mass-production of *Anastrepha obliqua* at the Moscafrut fruit fly facility, México. Proc. 6th International Fruit fly Symposium. 2002. South Africa. Pp. 389-392.
- Baverstock J, Clark SJ, Alderson PG, Pell JK. 2009. Intraguild interactions between the entomopathogenic fungus *Pandora neoaphidis* and aphid predator and parasitoid at the population scale. Journal of Invertebrate Pathology 102:167-172.
- Brobyn PJ, Clark SJ, Wilding N. 1988. The effect of fungus infection of *Metopolophium dirhodum* (Hom.: Aphididae) on the oviposition behaviour on the aphid parasitoid *Aphidius rhopalosiphi* (Hym.: Aphidiidae). Entomophaga 33: 333-338.
- Cancino J, Liedo P, Ruiz L, López G, Montoya P, Barrera JF, Sivinski J, Aluja M. 2012. Discrimination by *Coptera haywardi* (Hymenoptera: Diapriidae) of host previously attacked by conspecifics of by the larval parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae). Biocontrol Science and Technology 22: 899-914.
- Castañeda M del R, Selivon D, Hernández-Ortiz V, Soto A, Canal NA. 2015. Morphometric divergence in populations of *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae) from Colombia and some Neotropical locations. In: De Meyer M, Clarke AR, Vera MT, Hendrichs J (eds). Resolution of Cryptic Species Complexes of Tephritid Pests to Enhance SIT Application and Facilitate International Trade. Zookeys 540: 61-81.
- Cusson M, Laforge M, Régnière J, Béliveau C, Trudel D, Thireau J, Ballemare G, Keirstead N, Stolz D. 2002. Multiparasitism of *Chorisoneura fumiferana* by the Ichneumonid *Tranosema rostrale* and the Tachinid *Actia interrupta*: Occurrence in the Field and Outcome of Competition under Laboratory Conditions. Entomologia Experimentalis et Applicata 102: 125-133.
- De la Rosa W, López FL, Liedo P. 2002. *Beauveria bassiana* as a pathogen of the Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae) under laboratory conditions. Journal of Economic Entomology 95(1): 36-43.

- Fox J. 2005. The R Commander: A Basic Statistics Graphical User Interface to R. *Journal of Statistical Software* 14(9): 1-42.
- Fox J. 2017. *Using the R Commander: A Point-and-Click Interface to R*. Boca Raton FL: Chapman and Hall/CRC Press.
- Fox J, Bouchet-Valat M. 2019. Rcmdr: R Commander. R package version 2.5-3.
- Fransen JJ, van Lenteren JC. 1993. Host selection and survival of the parasitoid *Encarsia formosa* on greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*, in the presence of hosts infected with the fungus *Aschersonia aleyrodalis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 69: 239-249.
- Godfray HJC. 1994. *Parasitoids: behavioral and evolutionary ecology*. Princeton University Press, New Jersey.
- Goubault M, Krespi L, Boivin G, Poinot D, Nenon JP, Cortesero M. 2004. Intraspecific variation in host discrimination behaviour in the pupal parasitoid *Pachycrepoideus vindemmiae* Rondani (Hymenoptera: Pteromalidae). *Environmental Entomology* 33: 362-369.
- Guillén L, Aluja M, Equihua M, Sivinski J. 2002. Performance of two fruit fly (Diptera: Tephritidae) pupal parasitoids (*Coptera haywardi* (Hymenoptera: Diapriidae) and *Pachycrepoideus vindemmiae* (Hymenoptera: Pteromalidae) under different environmental soil conditions. *Biological Control* 23: 219-227.
- Hernández Díaz-Ordaz N, Pérez N, Toledo J. 2010. Pathogenicity of three strains of entomopathogenic fungus on *Anastrepha obliqua* adults (Macquart) (Diptera: Tephritidae) under laboratory conditions. *Acta Zoológica Mexicana* 26(3): 481-494.
- Hernández-Ortíz V. 1992. El género *Anastrepha* Schiner en México (Diptera: Tephritidae). En: *Taxonomía, distribución y sus plantas huéspedes*. Instituto de Ecología Publicación No. 33. Xalapa, Ver. México. 162 pp.
- Islam KS, Copland MJW. 2000. Influence of egg load and oviposition time interval on the host discrimination and offspring survival of *Anagyrus Pseudococci* (hymenoptera: encyrtidae), a solitary endoparasitoid of citrus mealybug, *Planococcus citri* (Hemiptera: Pseudococcidae). *Bulletin of Entomological Research* 90: 69-75.
- Labbé RM, Gillespie DR, Cloutier, Brodeur J. 2009. Compatibility of an entomopathogenic fungus with a predator and a parasitoid in the biological control of greenhouse whitefly. *Biocontrol Science and Technology* 19 (4): 429-446.
- Liedo P, Oropeza A, Carey JR. 2010. Demografía y sus Implicaciones en los Programas de Control. En: Montoya P, Toledo J, Hernández E. eds. *Moscas de la fruta: Fundamentos y Procedimientos de Manejo*. S y G editores, México, D.F. p. 81-90.
- Martins ICF, Silva RJ, Alencar J, Silva K, Cividanes R, Duarte, Agostini LT, Polanczyk R. 2014. Interactions between the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) and the aphid parasitoid *Diaeretiella rapae* (Hymenoptera: Braconidae) on *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Journal of Economic Entomology* 107(3): 933-938.
- Mesquita AL, Lacey L. 2001. Interactions among the Entomopathogenic Fungus, *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes), the Parasitoid,

- Aphelinus asychis* (Hymenoptera: Aphelinidae), and Their Aphid Host. *Biological Control* 22: 51-59.
- Money N. 2016. Fungi and biotechnology. En: Watkinson S, Boddy L, Money N. Academic press. 2016. *The Fungi*. Pp: 401-424.
- Outreman Y, Le Ralec A, Wajnberg E, Pierre JS. 2001. Can imperfect host discrimination explain partial patch exploitation in parasitoids?. *Ecological Entomology* 26: 271-280.
- Powell W, Wilding N, Brobyn PJ, Clark SJ. 1986. Interference between parasitoids (Hym.: Aphidiidae) and fungi (Entomophthorales) attacking cereal aphids. *Entomophaga* 31: 293-302.
- Quicke DLJ. 1997. *Parasitic wasps*, London: Chapman & Hall. 470 pp.
- R Core Team. 2019. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL. <https://www.R-project.org/>.
- Rashki M, Kharazi-pakdel A, Allahyari H, van Alphen JJM. 2009. Interactions among the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales), the parasitoid, *Aphidius matricariae* (Hymenoptera: Braconidae), and its host, *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). *Biological Control* 50(3): 324-328.
- Reyes IC, Bustillo AE, Chaves B. 1995. Efecto de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre el parasitoide de la broca del café, *Cephalonomia stephanoderis*. *Revista Colombiana de Entomología* 21(4): 199-204.
- Romani R, Isidoro N, Bin F, Vinson S.B. 2002. Host recognition in the pupal parasitoid *Trichopria drosophilae*: a morpho-funtional approach. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 105: 119-128.
- Rosenheim JA, Mangel M. 1994. Patch-leaving rules for parasitoids with imperfect host discrimination. *Ecological Entomology* 19: 374-380.
- Sivinski J, Vuline K, Meneses E, Aluja M. 1998. The bionomic of *Coptera haywardi* (Oglobin) (Hymenoptera: Diapriidae) and the other pupal parasitoids of tephritid fruit flies (Diptera). *Biological Control* 11: 193-202.
- Toledo J, Campos S, Flores S, Liedo P, Barrera JF, Villaseñor A, Montoya P. 2007. Horizontal transmission of *Beauveria bassiana* in *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) under laboratory and field cage conditions. *Journal of Economic Entomology* 100(2): 291-197.
- van Baaren J, Le Lann C, Pichenot J, Pierre JS, Krespi L, Outreman Y. 2009. How Could Host Discrimination Abilities Influence the Structure of a Parasitoid Community?. *Bulletin of Entomological Research* 99: 299-306.
- van Dijken, MJ, van Alphen, JM. 1998. The ecological significance of differences in host detection behaviour in coexisting parasitoids species. *Ecological Entomology* 23: 265-270.
- van Lenteren, JC. 1981. Host discrimination by parasitoids. In: Nordlung, NA, Jones, RL and Lewis, WJ (Eds.), *Semiochemicals: their role in pest control*, John Wiley, New York, pp. 153-179

- Vinson SB. 1976. Host Selection by Insect Parasitoids. *Annual Review of Entomology* 21:109-133.
- Visser ME, Luyckx B, Nell HW, Boskamp, GJF. 1992. Adaptive Superparasitism in Solitary Parasitoids: Marking of Parasitized Hosts in Relation to the Pay-off from Superparasitism. *Ecological Entomology* 17: 76-82.
- Wilson WM, Ibarra J, Oropeza A, Hernández MA, Toledo-Hernández R, Toledo J. 2017. Infection of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) adults during emergence from soil treated with *Beauveria bassiana* under various texture, humidity, and temperature conditions. *Florida Entomologist* 100(3): 1-6.
- Yeo H, Pell J, Pye B. 1998. A biorational approach to selecting mycoinsecticides for aphid management. The 1998 Brighton Conference pests and diseases. pp 307-308.
- Zhu H, Jun J. 2012. Target-oriented dissemination of *Beauveria bassiana* by the predators, *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) and *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae) for biocontrol of *Myzus persicae*. *Biocontrol Science and Technology* 22(4): 393-406.

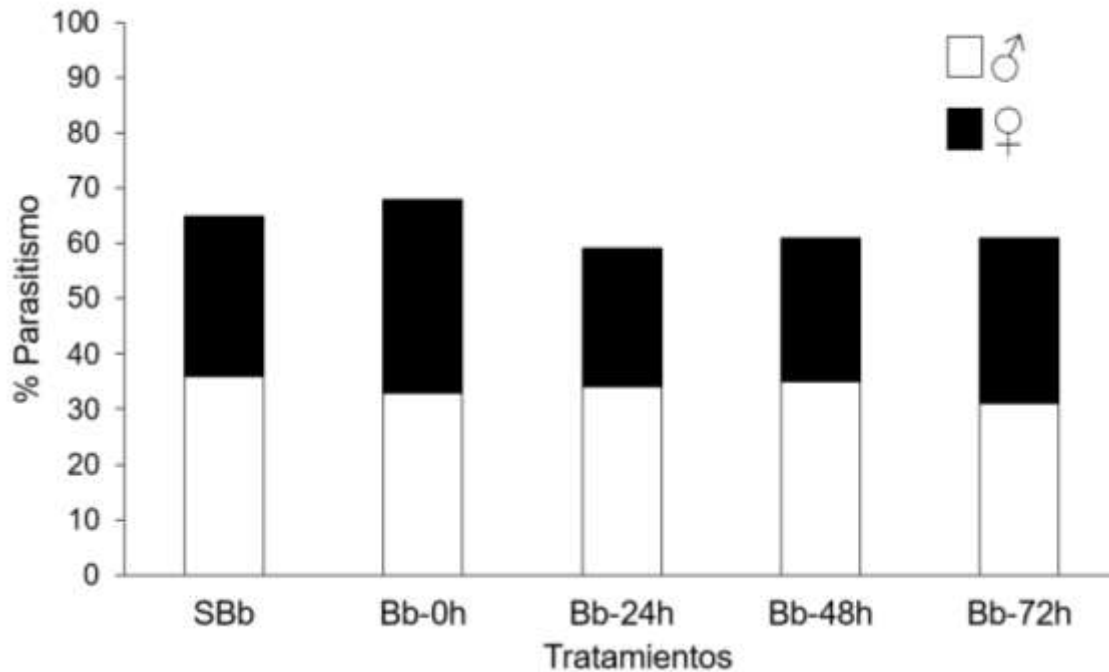


Fig. 1. Discriminación de *Coptera haywardi* evaluado a partir del porcentaje de parasitismo en la prueba sin opción a elegir en pupas de *Anastrepha obliqua*. Control: sin *Beauveria bassiana* (SBb), y tratadas con *B. bassiana* (Bb) a diferentes tiempos de aplicación previos a la exposición del parasitoide (0, 24, 48 y 72 h). Barras blancas corresponden a los machos y barras negras a las hembras. Modelo Lineal Generalizado con respuesta Binomial ($\chi^2 = 1.934$; df = 4; p = 0.748).

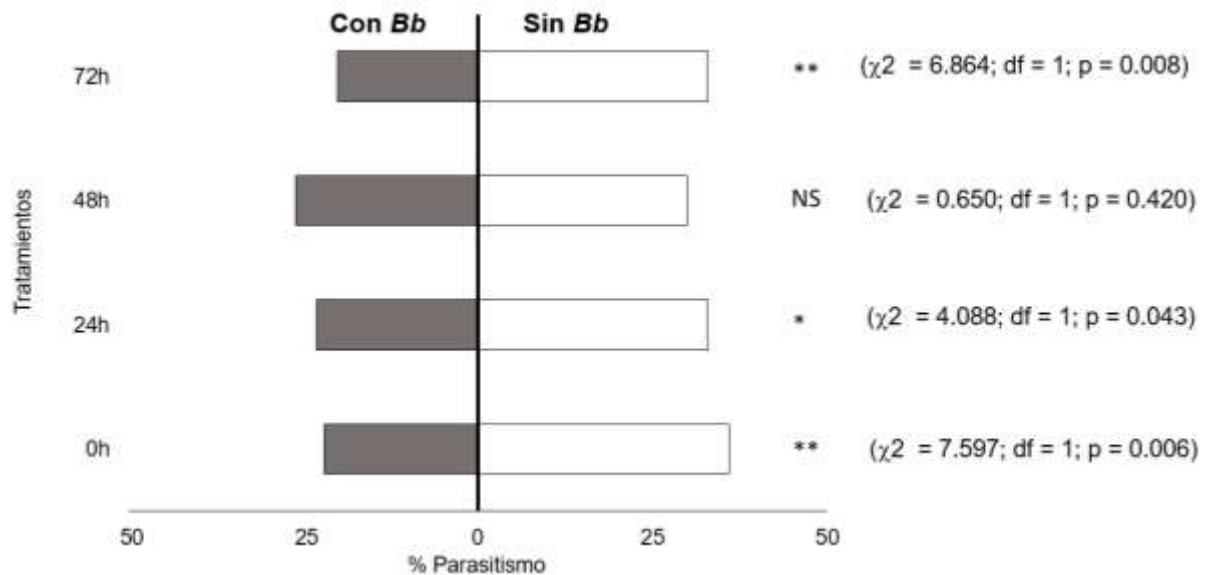


Fig. 2. Discriminación de *Coptera haywardi* en la prueba de dos opciones de elección, determinada a partir del parasitismo de pupas de *A. obliqua* tratadas (gris) y no tratadas (blanco) con *B. bassiana* a diferentes tiempos (0, 24, 48 y 72 h) previos a la exposición. Prueba de MLG con respuesta Binomial. NS = No significativa, y Con diferencia significativa de acuerdo a los códigos de significancia 0 ****0.001 ***0.01 **0.05 *0.1 ' 1.

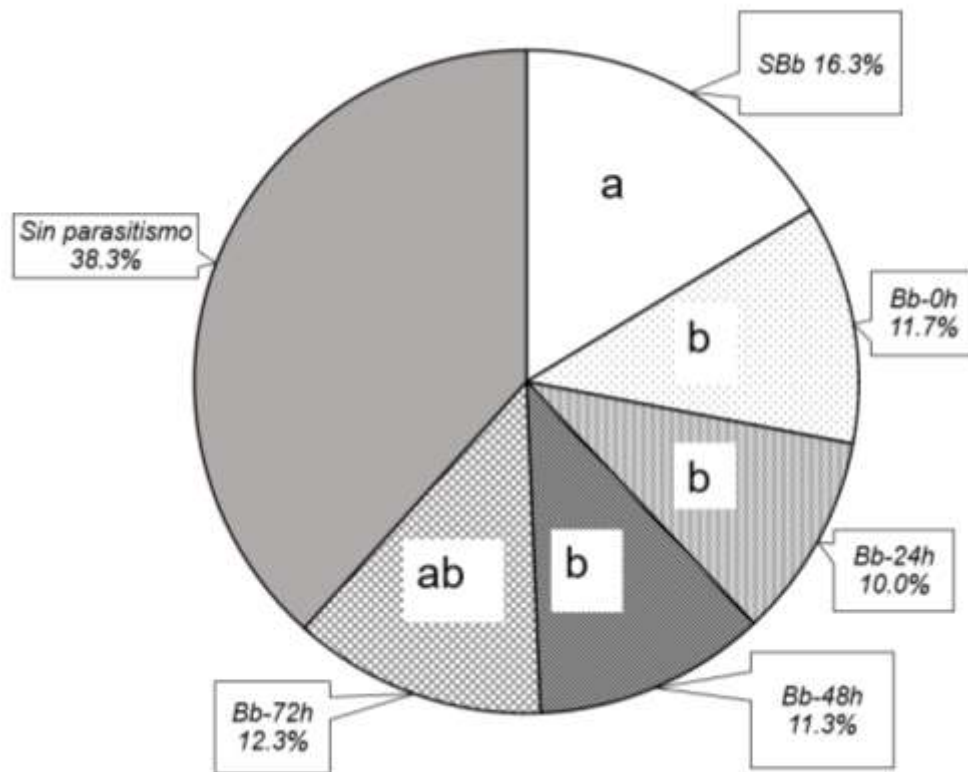


Fig. 3. Discriminación de *C. haywardi* en prueba de elección determinada a partir del parasitismo de pupas de *A. obliqua* sin *B. bassiana* SBb y tratadas con *B. bassiana* (Bb) a diferentes tiempos (Bb-0h, Bb-24, Bb-48 y Bb-72 h) previos a su exposición. Letras similares indican que no tienen diferencia estadística. ANOVA con prueba de comparación de medias Tukey ($\chi^2 = 15.565$; $df = 4$; $p = 0.004$).

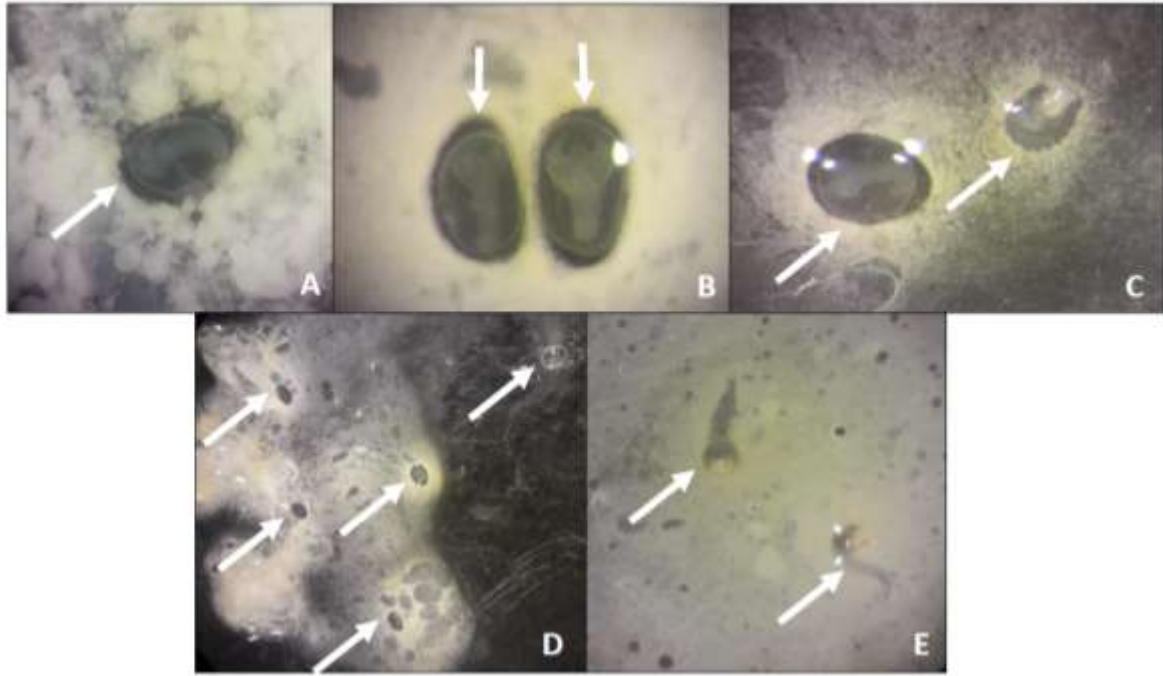


Fig. 4. Estados inmaduros de *C. haywardi* en una pupa de *A. obliqua*. A. Presencia de huevo próximo a eclosionar. B. Presencia de dos huevos próximos a eclosionar. C. Presencia de un huevo próximo a eclosionar y una larva de primer instar. D. Presencia de cinco huevos próximos a eclosionar. E. Presencia de dos larvas de primer instar.

Cuadro 1. Tiempo parasitismo de *Coptera haywardi* en pupas de *Anastrepha obliqua* tratadas y no tratadas con *Beauveria bassiana*.

Tratamiento	Tiempo min y máximo de parasitismo (min)	Tiempo promedio de parasitismo (min) + EE	<i>n</i> (Cantidad de parasitismos)
Sin <i>B. bassiana</i>	10 - 71	23.4 ± 3.5	16
0 h	14 - 86	23.2 ± 3.5	5
24 h	16 - 73	37.2 ± 11.9	4
48 h	16		1
72 h	9 - 34	22.4 ± 4.1	5

Letras similares indican que no hay diferencia estadística. Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis ($\chi^2 = 3.721$; df = 4; p = 0.445)

Cuadro 2. Comportamiento de elección de *Coptera haywardi* en pupas de *Anastrepha obliqua* no tratadas y tratadas con *Beauveria bassiana* en diferentes tiempos de aplicación, durante las 3 primeras horas de observación.

No. parasitismos	Secuencia de elección de <i>C. haywardi</i> en pupas de <i>A. obliqua</i>	No. eventos
2	Sin <i>Bb</i> - Sin <i>Bb</i> ^(*)	3
2	Sin <i>Bb</i> – 0h	1
2	Sin <i>Bb</i> – 48h	1
2	72h – 0h	1
3	Sin <i>Bb</i> – 72h – 0h	1
3	0h – 48h – Sin <i>Bb</i>	1
3	24h – 72h – 72h [*]	1
3	24h – Sin <i>Bb</i> – Sin <i>Bb</i> [*]	1
4	24h – Sin <i>Bb</i> – Sin <i>Bb</i> [*] – 48h	1
5	48h – Sin <i>Bb</i> – 72h – Sin <i>Bb</i> [*] – 24h	1
5	72h – 0h – 72h [*] – 24h – Sin <i>Bb</i>	1
6	24h – 0h – Sin <i>Bb</i> – 72h – 72h [*] – 48h	1

Total observaciones n=14. *Parasitismo en diferente pupa con la misma condición. ^(*) El parasitismo ocurrió en la misma pupa.

CAPITULO 3

Interaction between *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae) and *Coptera haywardi* (Hymenoptera: Diapriidae) for the management of *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae)

Olga Yaneth Martínez-Barrera¹, Jorge Toledo¹, Jorge Cancino², Pablo Liedo¹, Jaime Gómez¹, Javier Valle-Mora¹, Pablo Montoya²

¹El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Carretera Antiguo Aeropuerto Km. 2.5, C.P. 30700 Tapachula, Chiapas, México.

²Programa Moscafrut SADER-SENASICA, Camino a los Cacahotales S/N, C.P. 30860 Metapa de Domínguez, Chiapas, México.

oymartinez@ecosur.edu.mx; jtoledo@ecosur.mx; jorge.cancino.i@senasica.gob.mx;
pliedo@ecosur.mx; jgomez@ecosur.mx; jvalle@ecosur.mx;
pablo.montoya.i@senasica.gob.mx

Sometido a: Biological Control ([Anexo 3](#))

Abstract

The interaction between the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and the parasitoid *Coptera haywardi*, as potential biological control agents for *Anastrepha obliqua* fruit flies was evaluated under laboratory and field cage conditions. First, adult fruit flies mortality was assessed when exposed as pupae to soil treated with *B. bassiana* under laboratory conditions. Then, the effect the parasitoid, the fungi, and both of them was assessed in Plexiglas cages located under semi protected field conditions. Application of *B. bassiana* dry conidia to the soil resulted in 40% mortality of *A. obliqua* adults in laboratory. However, when evaluated under semi protected field conditions, mortality was lower (21.2%). According to a multiple decrement life table analysis, the probability of death of *A. obliqua* was 0.88 when *C. haywardi* parasitoids were released and *B. bassiana* conidia were applied in conjunction. When only *C. haywardi* parasitoids were released, the probability of death was 0.89. When only *B. bassiana* conidia were applied, the probability of death was 0.23. These results show that the simultaneous use of these natural enemies does not produce a synergistic, additive or antagonistic interaction, since the presence of *B. bassiana* had no effect on the parasitism by *C. haywardi*. These results indicate that the parasitoid is a better natural enemy for the control of *A. obliqua*, which means that both biological control agents might be used simultaneously, but this will not result in an increasing control.

Key words: Parasitoids, Entomopathogens, Multiple biological control, Fruit flies, Intraguild interactions.

1. Introduction

Natural enemy reduces the density of its hosts or prey in various ways depending on the ecological conditions and the interactions that take place with their environment. For example, in some cases the effect caused by entomopathogens can be considered greater than that of predators and/or parasitoids (Baverstock et al., 2009).

The diversity and density of natural enemies determine their effect in regulating host populations (Bianchi et al., 2006). A classic proposal in biological control is to combine the action of two or more natural enemies with the aim of increasing control efficacy. However, pest population regulation through multiple agents will depend on the intraguild interactions presented during the action of the natural enemies. These interactions are based on the division or overlap of the ecological niches of each species (Pedersen and Mills, 2004). Ferguson and Stiling (1996) state that these interactions can be synergistic, additive or antagonistic in nature. Therefore, their characterization is important in order to define the strategies to optimize the multiple uses of natural enemies (Roy and Pell, 2000; Straub et al., 2008).

The ideal scenario is one in which a synergistic or additive interaction occurs between the natural enemies, since this would translate into a greater mortality in the pest population. In contrast, if an antagonistic interaction is presented, suppression of the pest population could be lower than that estimated, possibly as a result of interference between the regulatory organisms, which could be detrimental for control purposes (Ferguson and Stiling, 1996; Roy and Pell, 2000).

The most frequently cited cases of antagonism are those of the interaction between entomopathogenic fungi and parasitoids (Baverstock et al 2009; Martins et al 2014). Most entomopathogenic fungi are considered to be generalists and opportunists. For this reason they can easily be antagonistic for many insects, including the parasitoids. Technical adjustments using specific criteria, such as the time of application and dose management, are important for the integrated use of fungi and parasitoids (Brodeur and Rosenheim, 2000). Different studies have shown encouraging results in terms of management involving entomopathogenic fungi and an insect (parasitoid or predator) as control agents. The use of the parasitoid *Encarsia formosa* Gahan (Hymenoptera:

Aphinidae) with *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin has been shown to be worth for the control of the greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* (West.) (Hemiptera: Aleyrodidae) (Labbé et al., 2009). Applying this same fungus along with the predators *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) and *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae) resulted in better control of the aphid *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae), than any single natural enemy (Zhu and Jun, 2012).

Fruit flies (Diptera: Tephritidae) are a group of pest species of great economic importance. For efficient control, the area-wide integrated pest management approach is recommended (Vargas et al., 2003). In this integrated management, biological control appears as the most commonly researched strategy (Dias et al., 2018). However, its application is limited by the need of a thorough analysis and evaluation of the available potential natural enemies, as well as application costs (Montoya and Toledo, 2010). *Anastrepha obliqua* (Macquart) (Diptera: Tephritidae) is a native polyphagous species, it is prominent in the Neotropical region for its wide distribution. It is the main pest of mango (*Mangifera indica* L.) (Hernández-Ortiz, 1992; Aluja, 1996; Castañeda et al., 2015).

Parasitoids are the most common natural enemies used for the biological control of fruit flies (Ovruski et al., 2000; Wharton and Gilstrap, 1983). One group of interest are the pupae parasitoid species, which were the first parasitoids of fruit flies to be described, but they are little used (Sivinski et al., 1997). This group includes the solitary endoparasitoid *Coptera haywardi* (Oglobin), which is highly specific for Tephritidae species. It has high searching capacity and discrimination ability (Sivinski et al., 1998; Guillén et al., 2002; Cancino et al., 2012). Another group of organisms used for biocontrol are the entomopathogenic fungi. *Beauveria bassiana* is a natural inhabitant of the soil that has demonstrated great potential for the control of adults of different fruit fly species (De la Rosa et al., 2002; Dimbi et al., 2003; Konstantopoulou and Mazomenos, 2005; Toledo et al., 2007; Sookar et al., 2008; Hernández Díaz-Ordaz et al., 2010).

Considering that these two natural enemies occupy different ecological niches, and act upon two different developmental stages of the pest, theoretically, their combined use for the control of *A. obliqua* is feasible. The population of not parasitized flies during the pupal phase can then be infected by the fungus in their adult stage, allowing greater regulation

of the pest population. A previous study showed that *B. bassiana* does not affect the fecundity of *C. haywardi* and that the females of this species have a low susceptibility to the fungus (Martínez - Barrera et al., 2019), suggesting the possible simultaneous use of both organisms for the control of *A. obliqua*.

Our aim in this study was to characterize the type of interaction of the parasitoid *C. haywardi* with the fungus *B. bassiana*, as biocontrol agents of *A. obliqua*.

2. Materials and Methods

2.1. Study site

The study was carried out in two phases. The first was conducted under laboratory conditions (24 ± 1 °C, 60-80% RH and 12:12 h L:D photoperiod) at Methods Development laboratories of the Moscafrut Program (SADER-SENASICA), located in Metapa de Dominguez, Chiapas, Mexico. This phase determined the method of application of *B. bassiana* that caused the greatest infection of *A. obliqua* adults.

The second phase was carried out under semi protected field conditions, in the municipality of Cacahoatán, Chiapas ($15^{\circ}0'15.0''$ N: $92^{\circ}9'28.0''$ W; 549 m elevation), in a mixed orchard of tomato (*Solanum lycopersicum* L.), rambutan trees (*Nephelium lappaceum*), banana (*Musa paradisiaca*), avocado (*Persea Americana* Mill) and coconut (*Cocos nucifera* L.). Cubic Plexiglas® cages of 27 dm³ were placed on a metal table. The legs of the table were covered with glue to avoid predation by ants. The cage was placed under an aluminum roof for protection against the rain. Environmental conditions were 23.7 ± 2.4 °C temperature and $89\pm 16.1\%$ RH. In this site we evaluated the interaction between *B. bassiana* and *C. haywardi*.

2.2. Biological material

The *B. bassiana* strain Bb-Et, locally collected was used. This was produced in the Laboratory of Beneficial Organisms, Fungi, Insects and Nematodes, located in Tuxtla Chico, Chiapas, Mexico. This was formulated with Celite 400, at a concentration of 5×10^{11} conidia/g, with a viability > 85%, 4.25×10^{11} CFU. Adults of *C. haywardi* were obtained from a colony with ~260 generations in the Laboratory of Biological Control of the

Moscafrut Program in Metapa de Dominguez, Chiapas, México. *A. obliqua* larvae were provided by the Moscafrut facility (SADER-SENASICA) where they were reared following the procedures described by Artiaga-López et al. (2004) and Orozco-Davila et al. (2017).

2.3. Soil preparation

Sandy loam soil, with 3.10% organic material, pH of 6.32, 47.12% sand, 33.00% silt and 19.88% clay (Soils laboratory of the Faculty of Agricultural Sciences of the Autonomous University of Chiapas), was obtained from a mango orchard in the municipality of Tuxtla Chico, Chiapas, Mexico (14°53'00.3" N, 92°13'23.2" W; elevation 169 masl).

The soil was exposed to the sunlight for 24 h in order to dehydrate, then sieved with a No. 10 sieve and packed into 1 kg aluminum bags for sterilization in an autoclave (AESAR[®] Model CV300, México) at 15 psi (15 min) (Trevors, 1996). Finally, it was placed in a drying oven at 95 °C for 24 h until reaching 1-2% humidity. Moisture content was determined by weight using an OHAUS[™] moisture analyzer (Model MB45, Switzerland) at 100 °C for 10 min. Subsequently, 130 - 150 ml of distilled water was applied per kg of soil (volume/ weight) in order to bring its moisture content up to a uniform 14% (Wilson et al., 2017).

Selection of the method for application of *Beauveria bassiana* on *A. obliqua*.

Two methods of fungus application were evaluated in plastic containers (4 × 2 cm: diameter × height) containing 90 g of the prepared soil. The first was direct application of 0.072 g of dry conidia (~3.6 × 10¹⁰ conidia) (equivalent to 0.8 g of formulate/kg soil), which was weighed on an analytical balance and distributed evenly with a plastic fork directly on the soil. The second method consisted of spraying 5 ml of a stock solution at 1% (5 × 10¹¹ conidia/100 ml distilled water) over the soil. In the control, 5 ml of distilled water was applied by spraying over the soil but without *B. bassiana*. One hour after application, 20 *A. obliqua* larvae of 8-9 days of old were placed in each container. The soil was moistened with 2 – 3 ml of distilled water daily, according to its moisture content, until emergence of the flies. The containers of each treatment were maintained in 11 × 11 × 16.5 cm (height × width × depth) plastic containers until fly emergence. Five replicates were performed per treatment.

Emerged adults were transferred to similar containers and provided with water and food (mixture of hydrolyzed yeast with sugar at a 1:3 ratio). Every day, the number of dead flies was recorded over a period of 15 consecutive days or until the last one died, and these individuals were collected and subjected to a process of disinfection, initially by rinsing in a 1% solution of sodium hypochlorite for 5 s, and washed with sterile distilled water. Then, the dead disinfected flies were placed in moist chambers, formed by filter paper moistened with sterile distilled water in Petri dishes (11 cm diameter). These conditions allowed fungus growth and, through observation of the mycelium, the cause of death was confirmed as infection by *B. bassiana*. The treatment with the highest mortality was selected as inoculation method for subsequent test.

2.4. Interaction of *Beauveria bassiana* and *Coptera haywardi*.

The treatments in this test were: a) release of *C. haywardi*, with application of *B. bassiana* (*Ch + Bb*), b) release of *C. haywardi*, with no application of *B. bassiana* (*Ch*), c) no release of *C. haywardi*, with application of *B. bassiana* (*Bb*), and d) no release of *C. haywardi*, with no application of *B. bassiana* (Control). Five replicates of each treatment were done.

One kg of soil was placed in a plastic tray (5 × 18 × 25 cm: height × width × depth) and 100 late third instar larvae *A. obliqua* (~8-9 days old) were added. Each tray per treatment was placed inside a cubic Plexiglass cage (27 dm³), maintaining soil moisture by spraying 2-4 ml of distilled water every day, according to the soil humidity. A mango branch of ~35 cm in length with foliage was placed inside cage to promote a semi-natural condition. Every four days, 50 adults of *C. haywardi* (25♀:25♂) between 3 - 4 d old were released inside the cage, provided with water and food (mixture of honey and toilet tissue).

From 11 and 14 days after the introduction of larvae, 0.8 g of formulate of *B. bassiana* were uniformly applied over 1 kg of soil and homogenized with a plastic fork (Wilson et al., 2017). Every day, the emerged flies and parasitoids were collected, transferred to plastic containers (11 × 11 × 16.5 cm) and provided with water and food. A daily record of mortality was kept for 15 consecutive days. The dead insects were collected, disinfected as above and transferred to moist chambers to confirm fungal infection. Those who were negative for *B. bassiana* infection were determined as natural mortality or death by others causes.

Twenty-five days after the release of the parasitoids, the cages were moved to the laboratory where the number of live and dead parasitoids was recorded. The death bodies were disinfected and placed in a moist chamber. The soil was then sieved to collect remaining pupae, which were maintained until the emergence of the adults in order to determine the percentage of parasitism. The pupae were placed in the base of Petri dishes (diameter: 5 cm), with 10 g of the soil used in the test, and stored in a plastic container (10 × 8 cm: diameter × height). Parasitoid emergence was recorded daily, and the adults separated into another container and provided with water and food. Finally, those pupae where no flies or parasitoids emerge were classified as dry mass, other deformities (pupae of unusual size or of gelatinous content) or possible parasitism. These pupae were included as death by other causes or natural mortality. Five replicates were conducted in each treatment.

2.5. Data analysis

In the test of interaction, the data were initially evaluated separately and then their interaction evaluated in a multiple decrement life table. The first evaluation was of the emergence of *A. obliqua* using a Generalized Linear Model (GLM) with Poisson response and means comparison through the Tukey test. Parasitism, expressed in percentages, was analyzed using a *t* test, and its sex ratio (♀:♂) was evaluated using a GLM with binomial response. Time of emergence was analyzed through a Welch *t* test.

The data of *A. obliqua* mortality by *B. bassiana* and by other causes were evaluated using a GLM with binomial response and overdispersion correction. The different characteristics (dry mass, other deformities and possible parasitism) observed in the dissection of the pupae that did not present emergence were evaluated using a GLM with negative binomial response. Where differences were found among treatments, means comparisons were conducted using the Tukey test. The analyses were performed with the statistical program R x64 3.2.4 (R Core Team, 2017).

The mortality data were analyzed by a multiple decrement life table (Carey, 1993). In this study was for to determine the effects of the parasitoid and the entomopathogenic fungus as causes of mortality of *A. obliqua*, as well as their interaction. The total number of treated

insects included in this table was 500, which corresponded to the five conducted replicates. Recording of mortality began from *A. obliqua* third instar larvae (8-9 days old).

The death probability of *A. obliqua* was estimated when the exposure was separated and sequential to the two natural enemies. In the table 3, analysis of the multiple decrement life table was conducted in four sections. In the section 1, the total number of deaths (D_x) where those caused by parasitism of *C. haywardi* (D_{x1}), infection by the fungus *B. bassiana* (D_{x2}), and other causes (D_{x3}) (unviable pupae and natural mortality in adults) in the different fruit fly life stages as larvae, pupae and adult are described (raw and independent data). The second section describes the probability of dying from a given cause, from one life stage to the next, including all of the causes: total (aq_x), those caused by *C. haywardi* parasitism (aq_{x1}), *B. bassiana* infection (aq_{x2}) and other causes (aq_{x3}). Subsequently, a column with the fraction of surviving individuals (al_x) is included considering all causes of death. The complementary part describes the death fraction in two groups: The first is when all causes of death are included, starting with the total (ad_x), followed by death from parasitism (ad_{x1}), fungal infection (ad_{x2}) and other causes (ad_{x3}). The second group is when the causes are considered separately in the same evaluated order: by parasitism (q_{x1}), fungal infection (q_{x2}) and other causes (q_{x3}).

3. Results

3.1. Selection of the application method of *Beauveria bassiana* on adults of *A. obliqua*.

In laboratory conditions *A. obliqua* mean emergence was 98% with a sex ratio of 1♀:1♂. The mortality caused for *B. bassiana* in the application of dry conidia was 40%, compared to only 1% caused by spraying. Given the absence of data variation in this treatment, statistical analysis was not possible. Application of the fungus by dry conidia caused deaths in adults from 3 to 10 days old, with no statistical difference between females (52.5%) and males (47.5%) ($t = 0.221$; $df = 6$; $p = 0.8324$) (Fig. 1).

3.2. Interaction of *Beauveria bassiana* and *Coptera haywardi*

Emergence of *A. obliqua* adults from larvae placed in trays with soil occurred from 17 to 21 days. Emergence of flies decreased from 92.2% to 6.6% when the pupae were exposed to *C. haywardi* only ($\chi^2 = 185.52$; $df = 3$; $p = 2.2 \times 10^{-16}$) (Table 1). The percentage of mortality of *A. obliqua* caused by the fungus and other causes was calculated from the

percentage of emerged flies. In the treatment in which the parasitoid and the fungus were both used, the adult mortality caused by *B. bassiana* was 7.7%, which is lower than the 21.25% mortality caused with application of *B. bassiana* alone, although no significant difference was observed ($\chi^2 = 1.501$; $df = 1$; $p = 0.220$). Mortality by other causes was greater in the treatments with no release of *C. haywardi* ($\chi^2 = 214.93$; $df = 3$; $p = 2.2 \times 10^{-16}$).

The parasitism of *C. haywardi* was unaffected by *B. bassiana*, presenting $68.6 \pm 3.2\%$ compared to the $68.2 \pm 2.8\%$ recorded in the treatment in which only parasitoids were released ($t = -0.093$; $df = 8$; $p = 0.928$). However, a greater proportion of females parasitoids (1.5:1 female: male ratio) was observed when the fungus was applied alone than when only parasitoids were released (1:1) ($\chi^2 = 5.299$; $df = 1$; $p = 0.021$) (Fig. 2).

The mean time for *C. haywardi* male offspring to emerge from fungus treated pupae was 36.1 ± 1.8 days after the release of the parasitoid (DARP), which was similar when only the parasitoid was released (36.7 ± 2.6 DARP) ($t = -2.475$; $df = 292$; $p = 0.014$) ($n = 304$). The mean time of emergence for *C. haywardi* female offspring was greater when the fungus was applied (41.85 ± 3.38 DARP), but did not differ statistically when only the parasitoid was released (41.87 ± 3.63 DARP) ($t = 0.135$; $df = 359$; $p = 0.89$).

The released parasitoids had a 62% mortality during the test when they acted alone. When released together with the application of *B. bassiana*, the mortality of *C. haywardi* was 66.4%, which was not significantly different ($\chi^2 = 0.0533$; $df = 1$; $p = 0.817$). Of this mortality, only 7.2% was due to *B. bassiana* infection (Fig 3).

The proportion of pupae of *A. obliqua* that do not emerged was greater when only the parasitoids were released (17.4%) than when applied together with the fungus (14.4%) (Table 3). In the treatment with fungus application only, this proportion was 4.0%, while in the control it was 4.2% (Table 2). Different dry mass contents were observed in the pupae of the flies that did not emerged, in addition to other deformities (pupae of unusual size or of gelatinous content) and what was considered a possible parasitism due to the fact that there was formation of the pupae of the parasitoid although no development to adult (Fig. 4).

The presence of pupae with dry mass content differed significantly among treatments where the parasitoid was released alone and with the fungus, compared to that in which only the fungus was applied, or the control treatment ($\chi^2 = 47.684$; $df = 3$; $p = 2.486 \times 10^{-10}$) (Table 2). In contrast, there were no significant differences among the treatments in terms of the quantity of deformed fly pupae ($\chi^2 = 2.6519$; $df = 3$; $p = 0.4485$).

According to the multiple decrement data (Table 3) the parasitoid caused the greatest mortality fraction, with values of 0.68 and 0.69 when used alone and in combination with *B. bassiana*, respectively. The lowest proportion of mortality was caused by *B. bassiana* in the adult stage, and was lower when used with the parasitoid (0.01), than when applied alone (0.06). Death by other causes was 0.18, 0.21 and 0.19, when applying the fungus and parasitoid together, the parasitoid alone and the fungus alone, respectively. The total mortality caused was very similar when the two natural enemies were used in combination, compared to release of the parasitoid alone.

When all of the causes of death were included as a factor, the parameters indicated that the reduction of the population of flies was similar to that which occurred when the parasitoid was released alone (0.89), compared to when the parasitoid and fungus were used together (0.88), which caused a greater suppression of pupae in both cases, compared to the control (Table 1). Application of *B. bassiana* generated lower mortality (0.25), mainly in the adult stage of the fly. Natural *A. obliqua* mortality recorded with no treatment was 0.04 (Fig. 5).

4. Discussion

Our results suggest that *C. haywardi* and *B. bassiana* could be used simultaneously for the control of *A. obliqua* since no antagonistic interaction was observed between them, although it was also not possible to evidence an additive effect when the fungus was applied to the soil. Analysis of the multiple decrement life table of *A. obliqua* showed that *C. haywardi* was the organism that caused the greatest mortality, followed by other causes (unviable pupae and natural mortality in adults), and finally by infection caused by *B.*

bassiana, in which a significant decrease in the number of *A. obliqua* adults was not observed. The data also show no antagonistic interaction, since no interference was observed between the two control agents, as *B. bassiana* alone caused a mortality of $7.20 \pm 4.1\%$ in *C. haywardi*.

The high percentages of parasitism presented by *C. haywardi* are indicators of its potential for regulation of the population of *A. obliqua*, regardless of the *B. bassiana* utilized application method. Some reports indicate that some parasitoids, such as *Ascogaster quadridentatus* Wesm. (Hymenoptera: Braconidae) and *Aphelinus asychis* (Hymenoptera: Aphelinidae), can produce a fungistatic substance in the hemolymph of the host that impedes the successful development of pathogenic fungi, thus favoring the development and emergence of adults (El-Sufty and Führer, 1985; Mesquita and Lacey, 2001), although this is influenced by the time interval between the parasitism and the presence of the fungus in the insect (Powell et al., 1986). It is probable that this inhibitor effect was present in our study, preventing the development of *B. bassiana*, but further research is required in order to determine whether *C. haywardi* secretes this type of substance.

When *C. haywardi* was released, the reduction in the emergence of flies was higher, presenting a high proportion of unviable pupae that were possibly parasitized but had suffered the effects of defense reactions on the part of *A. obliqua*, a fly species typified by a high capacity for antagonistic reaction to parasitism (Silva et al., 2002; Carton et al., 2008). These reactions could be physiological (Carton and Nappi, 1997), biochemical (Kohler et al., 2007), genetic and ecological (Carton and Nappi, 2001; Carton et al., 2005; Dubuffet et al., 2007) in type. However, this mortality is important in terms of control since it induces a decline in the pest population.

When *B. bassiana* was applied using the dry conidia method, the *A. obliqua* mortality was much lower than this caused by the parasitoid. There are reports indicating that this fungus generates a high mortality in *A. ludens* when applied as dry conidia under controlled conditions (Wilson et al., 2017). In our case, the percentage of mortality caused by *B. bassiana* in *A. obliqua* was similar to that reported under natural conditions (~25%),

but with the use of disseminator devices of *B. bassiana* conidia (Campos et al., 2017), which confirms the susceptibility of adults *A. obliqua* to this entomopathogenic fungi (Hernández Díaz-Ordaz et al., 2010; Osorio-Fajardo and Canal, 2011).

One cause of an antagonistic interaction between an entomopathogenic and a parasitoid is the degree of virulence presented by the fungus (Feng et al., 1994; Danfa and Van der Valk, 1999; Roy and Pell, 2000), given that *B. bassiana* is a generalist fungus that can affect non-target arthropods (Bruce et al., 1997). However, the mortality presented in this study under semi-protected conditions was much lower than that observed under laboratory conditions (Martínez-Barrera et al., 2019), which could be due in part to the fact that environmental factors, such as temperature, humidity and solar radiation, could act to reduce the survival and virulence of *B. bassiana* (Shipp et al., 2003; Labbé et al., 2009; Castrillo et al., 2010).

Nevertheless, the interaction that takes place between the parasitoid and the fungus could also depend on the time elapsed between the applications of both organisms. Different cases have been reported in the control of aphids (Hemiptera: Aphididae) in which a reduced impact has been observed when the parasitoid is released first and the entomopathogenic fungus applied afterwards (Rashki et al., 2009). It has also been documented that, with short time intervals between applications, the parasitoids cannot complete their development, evidencing an antagonistic interaction that diminishes when the time interval between application of the fungus and release of the parasitoid is greater (Powell et al., 1986; Askary and Brodeur, 1999; Emami et al., 2013; Martins et al., 2014). In this study, it was observed that early release of the parasitoids (7-10 days) before application of the fungus could represent a suitable time interval in which to avoid an antagonistic interaction.

Previous studies indicate that *B. bassiana* does not affect the development, survival or fecundity of *C. haywardi* (Martínez-Barrera et al., 2019), which could allow an additive interaction. However, the results revealed a neutral interaction. This type of interaction is presented when the mortality of the pest population does not increase following an increase in the number of natural enemies, for which reason biological control agents can

sometimes be equally effective alone and/or functionally redundant (Straub et al., 2008). In this case, it was found that both natural enemies did not produce a functional redundancy, since the mortality caused by *B. bassiana* in adults of *A. obliqua* was lower than that caused by *C. haywardi* in the pupae. The neutral interaction can be favorable in terms of proposing the use of these natural enemies in an independent manner. For example, *C. haywardi* could be used as a pupae biocontrol agent, whereas *B. bassiana* could be used for adult control in conidia disseminating devices.

Peterson et al. (2009) reported a compilation of 73 life tables of 28 insect species belonging to 5 orders, including the Diptera. In one of their findings, the mortality caused by other factors was greater than that caused by the natural enemies, with the parasitoids and predators contributing least to the accumulated mortality compared to entomopathogenic microorganisms. However, it should be noted that these life tables were obtained under different circumstances, in which some studies included the release of parasitoids. In the case of the fruit fly *Rhagoletis pomonella* (Walsh) (Diptera: Tephritidae), the life table revealed that mortality due to other causes was also greater than that caused by the natural enemies. However, in this case, the parasitoids caused a greater decline in the pest population than the predators and the pathogens (Cameron and Morrison, 1977).

We conclude that the combination of the parasitoid *C. haywardi* and fungi *B. bassiana* for the control of *A. obliqua*, was not a synergistic, additive or antagonistic interaction. There was no interference in the control by each of these natural enemies. This suggests that both control agents could be used simultaneously. However, is necessary to search for other more effective application methods of *B. bassiana* to develop strategies to strengthen their effect under field conditions.

Acknowledgements

We thank José Ernesto Sanchez for allowing us to work in his field facilities. To the Moscafrut Program SADER-SENASICA for the use of their facilities and providing the biological material (*C. haywardi* and *A. obliqua*), as well as materials, equipment and technical and administrative support. To the Laboratory of Beneficial Organisms, Fungi,

Insects and Nematodes for providing of the Bb-Et strain of *B. bassiana*. Thanks to the National Council for Science and Technology (CONACYT) for the postgraduate scholarship No. 405982 awarded to Olga Yaneth Martínez Barrera.

References Cited

- Aluja, M., 1996. Future trends in fruit fly management. pp. 309-320. In: McPherson, B.A. y G.J. Steck (eds.). Fruit fly pests. A world assessment of their biology and management. Delray St. Lucie Press, Beach, FL.
- Artiaga-López, T., Hernández, E., Domínguez-Gordillo, J., Moreno, D.S., Orozco-Dávila, D., 2004. Mass-production of *Anastrepha obliqua* at the Moscafrut fruit fly facility, México. Proc. 6th International Fruit fly Symposium. 2002. South Africa. Pp. 389-392.
- Askary, H., Brodeur, J., 1999. Susceptibility of larval stages of the aphid parasitoid *Aphidius nigripes* to the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. J. Invertebr. Pathol. 73, 129-132.
- Baverstock J, Clark SJ, Alderson PG, Pell JK. 2009. Intraguild interactions between the entomopathogenic fungus *Pandora neoaphidis* and aphid predator and parasitoid at the population scale. J. Invertebr. Pathol. 102,167-172.
- Bianchi, F.J.J.A., Booij, C.J.H., Tschamntke, T., 2006. Sustainable pest regulation in agricultural landscapes: a review on landscape composition biodiversity and natural pest control. Proc Biol Sci. 273, 1715-1721.
- Brodeur, J., Rosenheim, J.A., 2000. Intraguild interactions in aphid parasitoids. Entomol. Exp. Appl. 97, 93-108.
- Bruce, L. P., Skinner, M., Gouli, V., Brownbridge, M., 1997. Impact of soil applications of *Beauveria bassiana* and *Mariannaea* sp. on nontarget forest arthropods. Biol. Control 8, 203-206.
- Cameron, P.J., Morrison, F.O., 1977 Analysis of mortality in the apple maggot, *Rhagoletis pomonella* (Diptera: Tephritidae), in Quebec. Can. Entomol. 109, 769-788
- Campos, S.E., Toledo, J., Montoya, P., Gómez, J., 2017. Infección de adultos de *Anastrepha ludens* y *A. obliqua* con diseminadores de conidios de *Beauveria bassiana* en campo. Tesis – Maestría. El Colegio de la Frontera Sur ECOSUR. Tapachula, Chiapas, México
- Cancino, J., Liedo, P., Ruiz, L., López, G., Montoya, P., Barrera, J.F., Sivinski, J., Aluja, M., 2012. Discrimination by *Coptera haywardi* (Hymenoptera: Diapriidae) of host previously attacked by conspecifics of by the larval parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae). Biocontrol Sci. Techn. 22, 899–914.
- Carey, J.R., 1993. Applied demography for biologists. Oxford University Press, New York, 206 pp.
- Carton, Y., Nappi, A., 1997. *Drosophila* cellular immunity against parasitoids. Parasitol. Today 13, 218-227.

- Carton, Y., Nappi, A.J., 2001. Immunogenetic aspects of the cellular immune response of *Drosophila* against parasitoids. *Immunogenetics*. 52, 157-164.
- Carton, Y., Nappi, A., Poirié, M., 2005. Genetics of antiparasite resistance in invertebrates. *Dev. Comp. Immunol.* 29, 9-32
- Carton, Y., Poirié M., Nappi A., 2008. Insect immune resistance to parasitoids. *Insect Sci.* 15, 67-87.
- Castañeda, M. del R., Selivon, D., Hernández-Ortiz, V., Soto, A., Canal, N.A., 2015. Morphometric divergence in populations of *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae) from Colombia and some Neotropical locations. In: De Meyer, M., Clarke, A.R., Vera, M.T. & Hendrichs, J. (Eds) Resolution of Cryptic Species Complexes of Tephritid Pests to Enhance SIT Application and Facilitate International Trade. *Zookeys*, 540, 61–81.
- Castrillo, L.A., Griggs, M.H., Liu, H., Bauer, L.S., Vandenberg. J.D., 2010. Assessing deposition and persistence of *Beauveria bassiana* GHA (Ascomycota: Hypocreales) applied for control of the emerald ash borer, *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae), in a commercial tree nursery. *Biol. Control* 54, 61-67.
- Clark, S.J., Alderson, P.G., Pell J.K., 2009. Intraguild interactions between the entomopathogenic fungus *Pandora neoaphidis* and aphid predator and parasitoid at the population scale. *J. Invertebr. Pathol.* 102, 167-172.
- Danfa, A., Van der Valk, H.C.H.G., 1999. Laboratory testing of *Metarhizium* spp. and *Beauveria bassiana* on Sahelian non-target arthropods. *Biocontrol Sci. Techn.* 9, 187-198.
- De la Rosa, W., López, F.L., Liedo, P., 2002. *Beauveria bassiana* as a pathogen of the Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae) under laboratory conditions. *J. Econ. Entomol.* 95(1), 36–43.
- Dias, N.P., Zotti, M.J., Montoya, P., Carvalho, I.R., Nava, D.E., 2018. Fruit fly management research: A systematic review of monitoring and control tactics in the world. *Crop Prot.* 112, 187-200.
- Dimbi, S., Maniania, N.K., Lux, S.A., 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.
- Dubuffet, A., Dupas, S., Frey, F., Drezen, J.-M., Poirié, M., Carton, Y., 2007. Genetic interactions between the parasitoid wasp *Leptopilina boulardi* and its *Drosophila* hosts. *Heredity*. 98, 21-27.
- El-Sufty, R., Führer, E., 1985. Interrelationships between *Cydia pomonella* L. (Lep., Tortricidae), *Ascogaster quadridentatus* Wesm. (Hym., Braconidae) and the fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Z. Angew. Entomol.* 99, 504–511.
- Emami, F., Alichí, M., Minaei, K., 2013. Interaction between the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* (Ascomycota:Hypocreales) and the parasitoid wasp, *Aphidius colemani* Viereck (Hymenoptera: Braconidae). *J. Entomol. Acarol. Res.* 45, 14-17.

- Feng, M.G., Poprawski, T.J., Khachatourians, G.G., 1994. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. *Biocontrol Sci. Techn.* 4, 3-34.
- Ferguson, K.I., Stiling, P., 1996. Non-additive effects of multiple natural enemies on aphid populations. *Oecologia* 108, 375- 379.
- Guillén, L, Aluja, M, Equihua, M. Sivinski, J., 2002. Performance of two fruit fly (Diptera: Tephritidae) pupal parasitoids (*Coptera haywardi* (Hymenoptera: Diapriidae) and *Pachycrepoideus vindemiae* (Hymenoptera: Pteromalidae) under different environmental soil conditions. *Biol. Control* 23, 219-227.
- Hernández Díaz-Ordaz, N., N. Pérez, J. Toledo., 2010. Pathogenicity of three strains of entomopathogenic fungus on *Anastrepha obliqua* adults (Macquart) (Diptera: Tephritidae) under laboratory conditions. *Acta Zool. Mex.* (n. s.), 26(3), 481-494.
- Hernández-Ortiz V. 1992. El género *Anastrepha* Schiner en México (Diptera: Tephritidae). Taxonomía, distribución y sus plantas huéspedes. Instituto de Ecología Publicación No. 33. Xalapa, Ver. México, 162 pp.
- Kohler, L.J., Carton, Y., Mastore, M., Nappi, A.J., 2007. Parasite suppression of the oxidations of eumelanin precursors in *Drosophila melanogaster*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 66, 64-75.
- 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.
- Labbé, R.M., Gillespie, D.R., Cloutier, C., Brodeur J., 2009. Compatibility of an entomopathogenic fungus with a predator and a parasitoid in the biological control of greenhouse whitefly. *Biocontrol Sci. Techn.* 19 (4), 429-446.
- López-Arriaga, F., Montoya, P., Cancino, J., Toledo, J., Liedo, P., 2014. Female pupae of the genetic sexing strain “Tap-7” of *Anastrepha ludens* as hosts of *Coptera haywardi*. *BioControl* 59 (2), 149-157.
- Martínez-Barrera, O., Toledo, J., Liedo, P., Gómez, J., Cancino, J., Montoya, P., 2019. Does *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae) affect the survival and fecundity of the parasitoid *Coptera haywardi* Hymenoptera: Diapriidae)?. *Environ. Entomol.* 48(1), 156-162.
- Martins, I.C.F., Silva, R.J., Alencar, J., Silva, K., Cividanes, R., Duarte, Agostini LT, and Polanczyk R., 2014. Interactions between the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) and the aphid parasitoid *Diaeretiella rapae* (Hymenoptera: Braconidae) on *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *J. Econ. Entomol.* 107(3), 933-938.
- Mesquita, A.L.M., Lacey, L.A., 2001. Interactions among the entomopathogenic fungus, *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes), the parasitoid, *Aphelinus asychis* (Hymenoptera: Aphelinidae), and their aphid host. *Biol. Control* 22, 51-59.

- Montoya, P., Toledo, J., 2010. Estrategias de control biológico. En: P. Montoya, J. Toledo y E. Hernández (eds.). Moscas de la fruta: Fundamentos y Procedimientos para su Manejo. S y G editores. México D.F. pp: 169-182.
- Orozco-Dávila, D., Quintero, L., Hernández, E., Solís, E., Artiaga, T., Hernández, R., Ortega, C., Montoya, P. 2017. Mass rearing and sterile Insect releases for the control of *Anastrepha* spp. pests in Mexico. A review. Entomol Exp Appl 164, 176-187.
- Osorio-Fajardo, A., Canal, N., 2011. Selección de cepas de hongos entomopatógenos para el manejo de *Anastrepha obliqua* (Macquart, 1835) (Diptera: Tephritidae) en Colombia. Rev. Fac. Nat. Agro. Medellín 64(2), 6129-6139.
- Ovruski, S., Aluja, M., Sivinski, J., Wharton, R., 2000. Hymenopteran parasitoids on fruit infesting Tephritidae (Diptera) in Latin America and the Southern United States: Diversity, distribution, taxonomic status and their use in fruit fly biological control. J. Integr. Pest Manag. Reviews 5, 81-107.
- Pedersen, B.S., Mills, N.J., 2004. Single vs. multiple introduction in biological control: the roles of parasitoid efficiency, antagonism and niche overlap. J. Appl. Ecol. 41, 973-984.
- Peterson, R.K., Davis, R., Higley, L., Fernandes, O., 2009. Mortality risk in insects. Environ. Entomol. 38(1), 2-10.
- Powell, W., Wilding, N., P. J. Brobyn, S. J. Clark., 1986. Interference between parasitoid (Hym: Aphidiidae) and fungi (Entomophthorales) attacking cereal aphids. Entomophaga. 31, 293-302.
- R Core Team, 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rashki, M., Kharazi-pakdel, A., Allahyari, H., van Alphen JJM., 2009. Interactions among the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales), the parasitoid, *Aphidius matricariae* (Hymenoptera: Braconidae), and its host, *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). Biol. control 50, 324-328.
- Roy, H., Pell, J., 2000. Interactions between entomopathogenic fungi and other natural enemies: Implications for biological control. Biocontrol Sci. Techn. 10, 737-752.
- Shipp, J.I., Zhang, Y.Q., Hunt, D.W.A., Ferguson, G., 2003. Influence of humidity and green house microclimate on the efficacy of *Beauveria bassiana* (Balsamo) for control of greenhouse arthropod pest. Environ. Entomol. 32, 1154-1163.
- Silva, J.E.B., Bolelli, I.C., Simões, Z.L.P., 2002. Hemocyte types and total and differential counts in unparasitized and parasitized *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae) larvae. Braz. J. Biolo. 62(4A), 689-699.
- Sivinski, J., Aluja, M., Lopez, M., 1997. Spatial and temporal distribution of parasitoids of Mexican *Anastrepha* species (Diptera: Tephritidae) within the canopies of fruit trees. Ann. Entomol. Soc. Am. 90, 604-618.
- Sivinski, J., Vuline, K., Meneses, E., Aluja M., 1998. The bionomics of *Coptera haywardi* (Oglobin) (Hymenoptera: Diapriidae) and the other pupal parasitoids of tephritid fruit flies (Diptera). Biolog. Control 11, 193-202.

- Sookar, P., Bhagwant, S., Ouna, E.A., 2008. Isolation of entomopathogenic fungi from the soil and their pathogenicity to two fruit fly species (Diptera: Tephritidae). *J. Appl. Entomol.* 132, 778-788.
- Straub, C.S., Finke, D.L., Snyder, W.E., 2008. Are the conservation of natural enemy biodiversity of natural enemy biodiversity and biological control compatible goals? *Biolog. control* 45(2), 225-237.
- Toledo, J., Campos, S., Flores, S., Liedo, P., Barrera, J.F., Villaseñor, A., Montoya, P., 2007. Horizontal Transmission of *Beauveria bassiana* in *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) Under Laboratory and Field Cage Conditions. *J. Econ. Entomol.* 100(2), 291-197.
- Trevors, J.T., 1996. Sterilization and inhibition of microbial activity in soil. *J. Microbiol. Methods* 26, 53-59.
- Vargas, R. I., Jang, E. B., Klungness, L. M. (2003). Area-wide pest management of fruit flies in Hawaiian fruits and vegetables. In: Inamine K (ed) Recent trends on sterile insect technique and area wide integrated pest management. Research Institute for Subtropics, Okinawa, pp 37-46.
- Wharton, R.A., Gilstrap, FE., 1983. Key to and status of Opiine Braconid (Hymenoptera) parasitoids used in biological control of *Ceratitis* and *Dacus* s.l. (Diptera: Tephritidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 76, 721-742.
- Wilson, W.M., Ibarra, J., Oropeza, A., Hernández, M.A., Toledo-Hernández, R., Toledo, J., 2017. Infection of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) adults during emergence from soil treated with *Beauveria bassiana* under various texture, humidity, and temperature conditions. *Fla. Entomol.* 100(3), 1-6.
- Zhu, H., Jun, J., 2012. Target-oriented dissemination of *Beauveria bassiana* by the predators, *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) and *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae) for biocontrol of *Myzus persicae*. *Biocontrol Sci. Techn.* 22(4), 393-406.

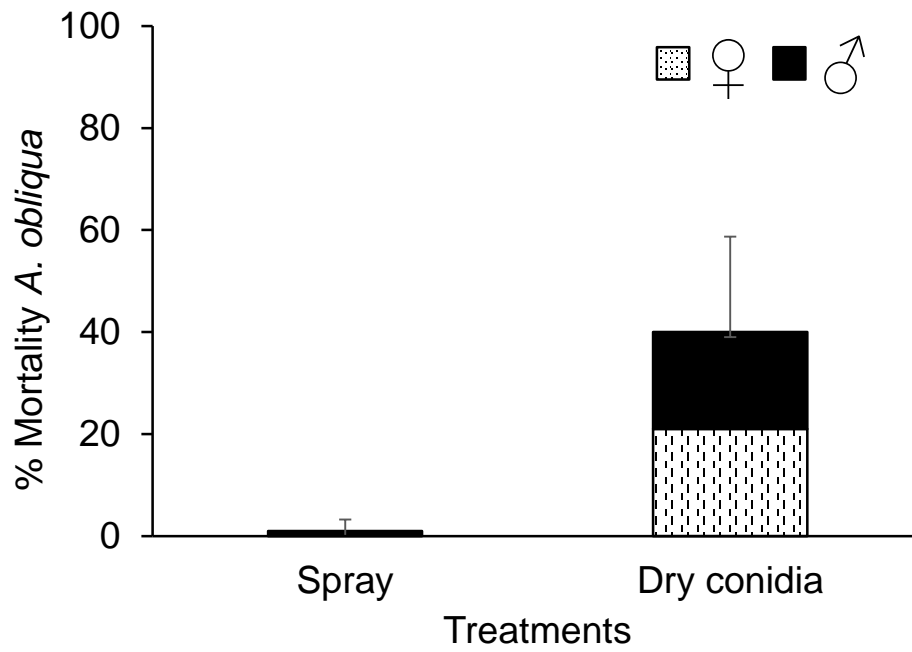


Fig. 1. Mortality ($\% \pm \text{SD}$) of *Anastrepha obliqua* adults produced by *Beauveria bassiana* applied by spray or dry conidia to the soil (n=20).

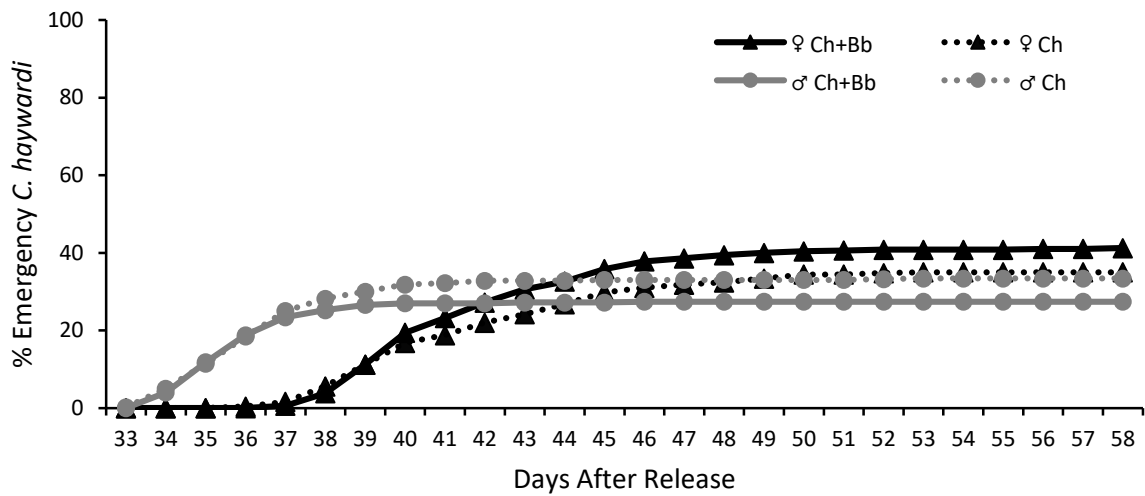


Fig. 2. *Coptera haywardi* (Ch) cumulative emergence from *Anastrepha obliqua* pupae when released alone and when released together with the application of *Beauveria bassiana* (Bb).

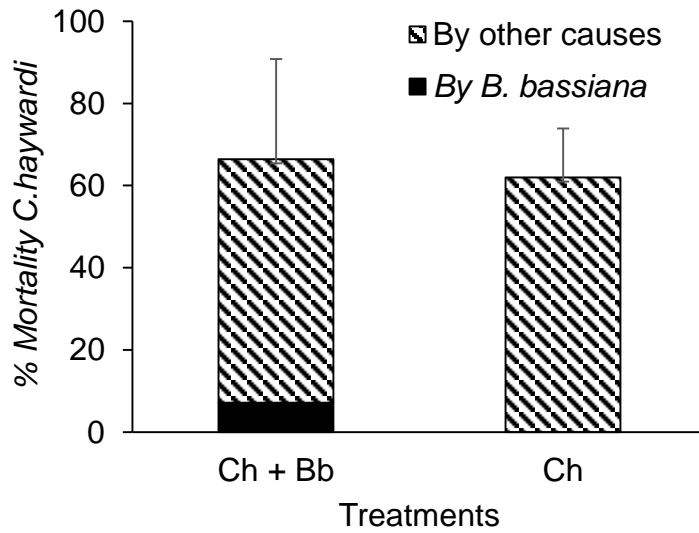


Fig. 3. *Coptera haywardi* (Ch) mortality when released alone and with application of *Beauveria bassiana* (Bb) on *Anastrepha obliqua* pupae.



Fig. 4. Pupae of *Anastrepha obliqua* possibly parasitized by *Coptera haywardi* but without adult development.

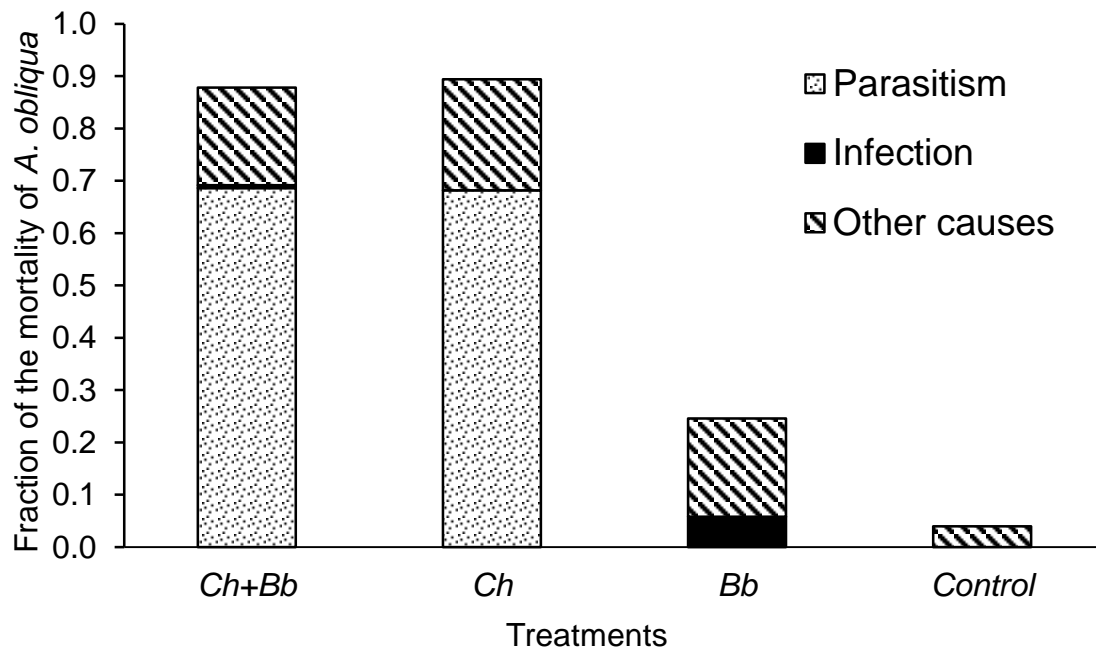


Fig. 5. Fraction of the mortality of *Anastrepha obliqua* by *Coptera haywardi* (*Ch*) parasitism, *Beauveria bassiana* (*Bb*) infection, and other causes, when they acted alone or together.

Table 1. *Anastrepha obliqua* emergence and mortality (% \pm SD) exposed to *Coptera haywardi* and *Beauveria bassiana*, separately and absolute control (n=500).

Treatments	<i>A. obliqua</i> Mortality %*		
	<i>A. obliqua</i> Emergence % ¹	By <i>B. bassiana</i> ²	Others causes ³
<i>Coptera haywardi</i> + <i>Beauveria bassiana</i>	7.80 \pm 7.59 a	7.69 \pm 43.46 a	2.57 \pm 2.35 a
<i>Coptera haywardi</i>	6.60 \pm 7.66 a		6.06 \pm 4.38 a
<i>Beauveria bassiana</i>	96.0 \pm 8.94 b	21.25 \pm 5.72 a	16.00 \pm 5.79 b
Control	92.2 \pm 16.88 b		20.82 \pm 8.63 b

*Mortality's percentage calculated from the emergence's percentage. Different letters show significant differences with a level of 0.05.

Statistical analysis performed using a ¹Generalized Linear Model with binomial response with overdispersion correction, and with comparison of means by means of linear ANOVA hypothesis, Tukey test;

²Generalized Linear Model with quasibinomial response;

³Generalized Linear Model with Poisson response with comparison of means with linear hypothesis.

Table 2. Inviable pupae of *Anastrepha obliqua* with dry masses and other deformities (% ± SD) in when exposed to *Beauveria bassiana* and *Coptera haywardi*, separately, in combinations and the absolute control.

Treatments	Initial number of <i>A. obliqua</i> larvae	% Emergency <i>C. haywardi</i> ¹	Dry mass ²	Inviable pupae	
				Other deformities ³	Possible parasitism ⁴
<i>Coptera haywardi</i> + <i>Beauveria bassiana</i>	100	68.6 ± 3.21 a	12.4 ± 10.31a	2.00 ± 1.00 a	4.00 ± 4.24 a
<i>Coptera haywardi</i>	100	68.2 ± 2.85 a	17.0 ± 7.96 a	0.40 ± 0.54 a	3.40 ± 4.39 a
<i>Beauveria bassiana</i>	100		0.20 ± 0.44 b	3.80 ± 8.49 a	0
Control	100		1.60 ± 3.56 b	2.60 ± 5.81 a	0

Different letters indicate significant differences with a level of 0.05. Analysis performed by *t* test¹Generalized Linear Model (GLM) with quisipoisson response, with mean comparison by means of linear ANOVA hypothesis, Tukey test. ²GLM with negative binomial response. ³GLM with quisipoisson response

Table 3. Multiple decrement life table of *Anastrepha obliqua*. Cause of death factors were parasitism by *Coptera haywardi* and infection by *Beauveria bassiana* entomopathogen fungi. Mature larvae were exposed separated and sequential to each cause of death.

Stage	K _x Number beginning stage	D _x Total deaths	Number Death from				Cause-specific probability of death from specified causes in the presence of all causes				Fraction living		Fraction death of						
			Parasitism			Infection	Other causes	Total aq _x	Parasitism aq _{x1}	Infection aq _{x2}	Other causes aq _{x3}	a _{lx}	ad _x Total	Including all causes			Separated causes		
			D _{x1}	D _{x2}	D _{x3}									Parasitism ad _{x1}	Infection ad _{x2}	Other causes ad _{x3}	Parasitism q _{x1}	Infection q _{x2}	Other causes q _{x3}
Exposed to <i>Coptera haywardi</i> + <i>Beauveria bassiana</i>																			
Larvae (8-9 d)	500	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
Pupae	500	435	343	0	92	0.87	0.69	0.00	0.18	1.00	0.87	0.69	0.00	0.18	0.69	0.00	0.18		
Adult (1-7 d)	65	1	0	0	1	0.02	0.00	0.00	0.02	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02		
Adult (8-15 d)	64	3	0	3	0	0.05	0.00	0.05	0.00	0.13	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00	0.05	0.00		
											0.88	0.69	0.01	0.18	0.69	0.05	0.20		
Exposed to <i>Coptera haywardi</i>																			
Larvae (8-9 d)	500	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
Pupae	500	445	341	0	104	0.89	0.68	0.00	0.21	1.00	0.89	0.68	0.00	0.21	0.68	0.00	0.21		
Adult (1-7 d)	55	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
Adult (8-15 d)	55	2	0	0	2	0.04	0.00	0.00	0.04	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03		
											0.89	0.68	0.00	0.21	0.68	0.00	0.24		
Exposed to <i>Beauveria bassiana</i>																			
Larvae (8-9 d)	500	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
Pupae	500	20	0	0	20	0.04	0.00	0.00	0.04	1.00	0.04	0.00	0.00	0.04	0.00	0.00	0.04		
Adult (1-7 d)	480	50	0	14	36	0.10	0.00	0.03	0.08	0.96	0.10	0.00	0.03	0.07	0.00	0.03	0.07		
Adult (8-15 d)	430	53	0	15	38	0.12	0.00	0.03	0.09	0.86	0.11	0.00	0.03	0.08	0.00	0.03	0.09		
											0.25	0.00	0.06	0.19	0.00	0.06	0.20		

CAPITULO 4

Discusión general y conclusiones

Se investigó el tipo de interacción que ocurre cuando se combina dos enemigos naturales con potencial para la supresión de moscas de la fruta. El estudio se enfocó al endoparásitoide *Coptera haywardi* y el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, considerando los efectos del hongo sobre el parasitoide y la capacidad que tiene el parasitoide para discriminar hospederos tratados con el hongo. El propósito fue generar conocimiento básico para el diseño de estrategias del control biológico que contribuya a la supresión de moscas de la fruta.

A continuación, se discuten los principales resultados obtenidos en esta investigación, donde se evidencia que la interacción del parasitoide y del hongo entomopatógeno fue neutra, a pesar que en condiciones de laboratorio el hongo *B. bassiana* no afectó el desarrollo de los estados inmaduros de *C. haywardi* cuando estaba en desarrollo dentro de pupas hospederas tratadas. Aunque los adultos fueron susceptibles, la longevidad de los machos no fue afectada, ya que fue similar a los machos del grupo control, y no se observó un efecto negativo en la fecundidad de las hembras tratadas. Además, las hembras del parasitoide discriminaron pupas tratadas de las no tratadas con el hongo cuando tuvieron la posibilidad de elegir. Sin embargo, en condiciones de campo semi-protégidas el parasitoide fue el organismo que mayor supresión causó en pupas de *A. obliqua* y la infección causada por *B. bassiana* en adultos fue baja y esta mortalidad no fue significativa para disminuir su población cuando se combinó con el parasitoide y generar así una interacción aditiva o sinérgica.

La determinación de los efectos que provoca *B. bassiana* sobre *C. haywardi* fue el primer objetivo de esta investigación, ya que de acuerdo con Martins et al. (2014) es trascendente identificar el posible estado biológico del entomófago (parasitoide o depredador) más susceptible al ataque del hongo, para mitigar un posible efecto negativo entre los enemigos naturales y prevenir una interacción antagónica. En condiciones de laboratorio se demostró que *B. bassiana* no afectó el desarrollo de los estados inmaduros de *C. haywardi* cuando se encuentran sobre pupas tratadas, ni afecta la emergencia de los adultos del parasitoide. La característica endoparasítica de *C. haywardi* puede ser importante en este caso, dado a que cuando el hospedero es atacado, la cutícula ya está formada y esto confiere una ventaja de protección porque puede evitar la germinación de las esporas del hongo y la penetración de las hifas (St Leger 1993). Además, actualmente no existen reportes de aislados de *B. bassiana* que afecten el estado de pupa de *A. obliqua*. Otros estudios demuestran que

la aplicación de *B. bassiana* en pupas mayores de 2 d de *A. ludens* y *Ceratitis capitata* (Weidemann) (Diptera: Tephritidae) no afecta la emergencia de adultos (De la Rosa et al. 2002, Toledo et al. 2008). Un aspecto de gran importancia que se observó en el presente trabajo, es que *B. bassiana* no repercutió negativamente en la fecundidad de las hembras de *C. haywardi* (1.9 parasitoides/hembra/día). Este hecho indicó que el hongo no interfiere con la acción del parasitoide hacia la plaga, considerándose un dato positivo debido a que existen reportes donde se menciona efectos variables en donde el hongo puede no afectar la fecundidad (Rashki et al. 2009), o puede disminuir drásticamente la reproducción del parasitoide (Castillo et al. 2009).

Los parasitoides machos entre 5-10 d de edad, fueron más susceptibles a la infección del hongo, pero el efecto de *B. bassiana* sólo redujo tres días su supervivencia con respecto a la longevidad que se observó en los machos control (15-18 d de vida). Se considera que la corta longevidad de los adultos es similar a otras especies de parasitoides, que nacen maduros sexualmente y debido a que tienen una alta actividad sexual en los primeros días de su vida (Ramadan et al. 1991), presentan un desgaste energético (Himuro y Fujisaki 2010, Hou y Amunugama 2015, Metzler et al. 2016), que afecta su sistema inmune y ocasiona una corta longevidad y mayor susceptibilidad (Schneider 2009). A pesar que las hembras adultas (5-10 d de edad) de *C. haywardi* fueron susceptibles al hongo, registró una mortalidad lenta que se reflejó en un mayor tiempo letal medio ($TL_{50} = 8.5$ d) sin haber sido afectada su etapa de mayor fecundidad (6 a 8 d de edad). Razón por la cual las hembras usadas en la evaluación de interacción, tenían entre 3 a 4 d de edad próximas a iniciar su mayor fecundidad

La susceptibilidad de los parasitoides a los hongos entomopatógenos es variable y está asociada a la virulencia de la cepa evaluada (De la Rosa et al. 1997, 2000, Bustillo et al. 1998, Castillo et al. 2009, Dean et al. 2012, Mahdavi et al. 2013). Cuando se determina que el parasitoide es susceptible, una estrategia es no realizar su aplicación y liberación simultánea (King y Bell 1978, De la Rosa et al. 2000, Roy y Pell 2000, Castillo et al. 2009). Aunque la susceptibilidad puede cambiar de acuerdo a la forma de aplicación y la frecuencia de uso del hongo. En este contexto, en el control de áfidos (Hemiptera: Aphididae) el menor impacto ocurre cuando se libera el parasitoide y posteriormente se aplica el hongo entomopatógeno, que cuando se realiza de manera inversa (Rashki et al. 2009).

Otro aspecto que aporta al éxito en la aplicación simultánea de dos enemigos naturales, es conocer la capacidad de discriminación de los parasitoides hacia hospederos infectados por el hongo, debido a que en términos de supresión se obtiene un mayor rango de acción con los dos enemigos naturales y garantiza una progenie más robusta y de mayor calidad (van Lenteren 1981, Godfray 1994, Rosenheim y Mangel 1994, Agboka et al. 2002, Adams y Six 2007, Labbé et al. 2009). En este estudio se evidenció que la capacidad de discriminación de *C. haywardi* hacia pupas de *A. obliqua* tratadas con *B. bassiana* está influenciada del ambiente en que se encuentre. Cuando la hembra no tiene elección, no se evidenció preferencia hacia pupas no tratadas en relación a las tratadas con el hongo a diferentes tiempos previos a la exposición. Pero en la prueba de dos elecciones, las pupas tratadas al mismo tiempo mezcladas con pupas sin tratar, discriminó pupas con 0, 24 y 72 h de aplicación del hongo previas a la exposición al parasitoide. En la prueba de elección donde se expusieron a la hembra las pupas tratadas con diferentes tiempos de aplicación (0, 24, 48 y 72 h), incluyendo pupas sin tratar, estas prefirieron las pupas no tratadas con el hongo, y entre las pupas tratadas tuvo mayor aceptación a pupas con 72 h después de haberse aplicado el hongo.

Coptera haywardi es un parasitoide considerado con alta capacidad de discriminar pupas de *A. ludens* parasitadas previamente por *D. longicaudata*, aunque cuando el parasitoide no tiene oportunidad de elección, el porcentaje de parasitismo es similar tanto en pupas parasitadas como no parasitadas (Cancino et al. 2012). Este comportamiento coincidió con los resultados de nuestro estudio.

En relación a la combinación de parasitoides con hongos, Rashki et al. (2009) evaluaron los mismos tiempos de aplicación que este estudio de *B. bassiana* sobre el áfido *Myzus persicae* y demostraron que *A. matricariae* aumenta la discriminación al hospedero tratado a medida que incrementa el tiempo de aplicación del hongo, donde los áfidos con 72 h después de ser tratados con el hongo, registraron un menor parasitismo. Sin embargo, la discriminación de *C. haywardi* hacia pupas tratadas con *B. bassiana* a 0, 24 y 72 h previas a la exposición, no fue consistente en las pruebas de elección, debido a que esta discriminación se observó solo cuando tuvo dos opciones de elección y no en la prueba cuando se expusieron todas las pupas con todos los tiempos de aplicación del hongo, dado que en esta condición discriminó las pupas con 0, 24 y 48 h previas a su exposición. No se evidenció la tendencia de un

aumento en su discriminación en relación a un mayor tiempo de aplicación del hongo. Es posible que la corta distancia en espacio entre tratamientos no favoreció la discriminación de parte del parasitoide. La tendencia a evitar parasitar pupas tratadas con el hongo, coincide con reportes de parasitoides de hemípteros que evitan atacar hospederos infectados con hongos (Powell et al. 1986, Brobyn et al. 1988, Fransen y van Lenteren 1993, Mesquita y Lacey 2001).

Durante las pruebas de discriminación, *B. bassiana* causó 32.8% de mortalidad en las hembras parasitoides, a través de la infección adquirida durante el forrajeo de pupas. Este porcentaje fue menor a la mortalidad que se observó en la primera prueba de susceptibilidad, lo que incentiva el uso simultáneo de estos dos enemigos naturales.

Con el fin de obtener mejores resultados enfocando a la acción de cada enemigo natural a su mejor control en los estados biológicos de pupa y adulto, en la tercera fase experimental, en la prueba de interacción, se decidió liberar primero parasitoides entre 7 a 10 días antes de la aplicación del hongo. De esta forma, *C. haywardi* pudo actuar primero que el hongo sobre *A. obliqua* atacando pupas entre 3 a 5 d de edad, reportadas de preferencia para el parasitismo en *A. ludens* (López-Arriaga et al. 2014), y la posterior aplicación del hongo al suelo, enfocado al control de los adultos que emergen que escaparon del parasitismo.

Esta metodología quizás permitió que se registrara unos altos porcentajes de parasitismo en condiciones semi-protegidas, lo que es un buen indicador del potencial que ofrece para la regulación de la población de *A. obliqua*, independientemente del método de aplicación que se utilice de *B. bassiana*. Por lo contrario, para *B. bassiana* el control que ejerció sobre la mosca fue bajo, quizás porque no pudo desarrollarse en las condiciones donde se desarrolló el estudio, o, la forma de aplicación (conidio seco sobre el suelo), no permitieron un mejor contacto y/o desarrollo de los conidios en los adultos de *A. obliqua* durante la emergencia. Se considera que el alto porcentaje de parasitismo puede ser por un efecto inhibitor del desarrollo exitoso de hongos patógenos, que describe que los parasitoides producen una sustancia fungistática en la hemolinfa del hospedero, favoreciendo así su desarrollo y emergencia de los adultos parasitoides (El-Sufty y Führer, 1985; Mesquita y Lacey, 2001). Este sería un tema interesante para futuras investigaciones en determinar si *C. haywardi* secreta este tipo de sustancias.

Los adultos *C. haywardi* son susceptibles a *B. bassiana*. Sin embargo, cuando las pruebas se realizaron en condiciones de campo semi-protegidas la mortalidad provocada por el hongo en los parasitoides fue menor (7.20%) a la que se observó bajo condiciones de laboratorio (73.2%), quizás porque los factores ambientales como la humedad, la temperatura y la radiación pueden reducir la sobrevivencia y virulencia de *B. bassiana*, tal como lo señalan Shipp et al. (2003), Labbé et al. (2009), Castrillo et al. (2010). Esta tendencia también se evidenció en el control de *A. obliqua* por parte de *B. bassiana*, en condiciones de laboratorio la mortalidad de adultos fue del 95.5% pero en campo en condiciones semi-protegidas fue menor (21.2%), aunque este porcentaje de mortalidad fue similar al reportado cuando se aplicó en condiciones naturales con el uso de dispositivos de auto-inoculadores de *B. bassiana* (~25%) (Campos-Carbajal 2017). Debido a este efecto, es necesario mejorar la estrategia de aplicación del hongo en campo para garantizar sus condiciones óptimas y pueda ejercer su potencial de control sobre la mosca, sin afectar la acción del parasitoide.

En el análisis de la tabla de decremento múltiple de *A. obliqua*, donde se relacionó la probabilidad de muerte cuando fue expuesta por separado y con exposición secuencial a ambos enemigos naturales en campo bajo condiciones semi-protegidas, se demostró que *C. haywardi* fue el organismo que ocasionó mayor mortalidad seguido de otras causas (pupas inviábiles y mortalidad natural en adultos), y la infección provocada por *B. bassiana* no fue significativa, siendo la última causa de muerte en la disminución del número de adultos de *A. obliqua*. Cuando las moscas se expusieron secuencialmente a ambos enemigos naturales la mortalidad no fue mayor que cuando actuó sólo el parasitoide, aunque en la clasificación descrita por Ferguson y Stiling (1996) podría asemejarse a una interacción no aditiva, se consideró como una interacción neutra, que de acuerdo con Straub et al. (2008), ocurre cuando no se incrementa la mortalidad de la población plaga después de adicionar enemigos naturales, debido a que son igualmente efectivos por sí solos, es decir que la mortalidad provocada por ambos, es similar a la que ocasiona sólo la acción de un enemigo natural.

El hongo no afectó el desarrollo ni la capacidad de parasitismo de *C. haywardi* y esto condujo que en el uso simultáneo no se presentara una interacción antagónica. Sin embargo, de acuerdo con los resultados se demostró una interacción neutra, que a nivel de control de plagas, no resulta muy efectiva para suprimir las poblaciones de

A. obliqua pero se considera un buen indicio para continuar evaluando su uso simultáneo que permita mejorar las estrategias en condiciones de campo que promueva una interacción aditiva o sinérgica, debido al potencial biocontrolador del parasitoide y su capacidad de discriminar pupas tratadas. Por lo que se considera prioritario continuar explorando para generar mejores resultados en el uso de *B. bassiana* que aumente la mortalidad sobre adultos, ej. el uso de dispositivos auto-inoculadores o de insectos estériles como vectores de conidios (Campos-Carbajal 2017, Toledo et al. 2017); además, de implementar técnicas que incrementen su presencia y permanencia de los conidios en el suelo considerando que es su hábitat natural. Esto fortalecería las estrategias para el uso simultáneo de enemigos naturales con el fin de incrementar la eficacia del control biológico de *A. obliqua* y de otras especies de moscas de la fruta presentes en condiciones y hábitats similares.

CONCLUSIONES GENERALES

- Bajo condiciones de laboratorio *B. bassiana* no afectó el desarrollo, ni la emergencia de *C. haywardi* cuando estaba en desarrollo en pupas de *A. obliqua* previamente parasitadas, tampoco alteró la supervivencia de machos de *C. haywardi* ni la fecundidad de hembras mayores a 5 d de edad.
- Los adultos de *C. haywardi* fueron susceptibles a la acción de *B. bassiana*. Se observó que en condiciones de laboratorio (prueba de susceptibilidad) la mortalidad causada por el hongo fue notoriamente mayor que en condiciones de campo semi-protegidas (prueba de interacción).
- *Coptera haywardi* discrimina pupas tratadas con *B. bassiana* sólo cuando se exponen simultáneamente con pupas no tratadas a diferentes tiempos de aplicación.
- Se comprobó el potencial que tiene *C. haywardi* como agente de control de pupas de *A. obliqua* en condiciones de campo semi-protegidas.
- La aplicación de *B. bassiana* en conidio seco sobre adultos de *A. obliqua* fue eficaz en la supresión de población en condiciones de laboratorio, pero este control disminuyó notoriamente en condiciones de campo semi-protegidas, sin presentar un aporte de control significativo cuando se evaluó en combinación con el parasitoide.

- En el uso simultáneo de *C. haywardi* y *B. bassiana* para suprimir *A. obliqua* en condiciones de campo semi-protegidas, no ocurrió una interacción sinérgica, ni aditiva, pero no se presentó una interacción antagónica, indicando que no hubo una interferencia que afectara la acción que ejerce el parasitoide y el hongo entomopatógeno, presentando así una interacción neutra.
- Debido a que la aplicación de *B. bassiana* por conidio seco sobre el suelo, no aportó significativamente a la supresión de los adultos de la mosca, se recomendaría sólo la liberación del parasitoide, o investigar otros métodos de uso del hongo, como uso de dispositivos auto-inoculadores, o con insectos estériles como vectores además de la implementación de técnicas que incrementen su población y permitan la permanencia de los conidios en el suelo, como su hábitat natural y de esta manera mejorar las estrategias del uso simultáneo de enemigos naturales sobre *A. obliqua* y otras especies e moscas de la fruta que afectan diversos agroecosistemas del sector frutícola.

REFERENCIAS

- Adams AS, Six DL. 2007. Detection of host habitat by parasitoids using cues associated with mycangial fungi of the mountain pine beetle, *Dendroctonus ponderosae*. *Canadian Entomology* 140: 124-127.
- Agboka K, Schulthess F, Chabi-Olaye A, Labo I, Gounou S, Smith, H. 2002. Self-intra, and interspecific host discrimination in *Telenomus busseolae* Gahan and *T. isis* Polaszek (Hymenoptera: Scelionidae), sympatric egg parasitoids of the African Cereal Borer *Sesamia calamistis* Hampson (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Insect Behavior* 15: 1-12.
- Aluja M. 1996. Future trends in fruit fly management. pp. 309-320. En: McPheron, B.A. y G.J. Steck. eds. *Fruit fly pests. A world assessment of their biology and management*. Delray St. Lucie Press, Beach, FL.
- Bautista R, Harris EJ. 1997. Effects of multiparasitism on the parasitization behavior and progeny development of oriental fruit fly parasitoids (Hymenoptera: Braconidae). *Journal of Economic Entomology* 90: 757-764.
- Baverstock J, Clark SJ, Alderson PG, Pell JK. 2009. Intraguild interactions between the entomopathogenic fungus *Pandora neoaphidis* and aphid predator and parasitoid at the population scale. *Journal of Invertebrate Pathology* 102:167-172.
- Birke A, Guillen L, Midgarden D, Aluja M. 2013. Fruit flies *Anastrepha ludens* (Loew), *A. obliqua* (Macquart) and *A. grandis* (Macquart) (Diptera: Tephritidae): Three pestiferous tropical fruit flies that could potentially expand their range to temperate areas, pp. 192–213. En: Peña JE. ed. *Potential invasive pests of agricultural crops*. CAB International, Boston. p. 496
- Brodeur J, Rosenheim JA. 2000. Intraguild interactions in aphid parasitoids. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 97: 93-108.
- Bustillo A, Cardenas R, Villalba D, Benavides P, Orozco J, Posada FJ. 1998. Manejo integrado de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) en Colombia. CENICAFE, Chinchiná, Colombia, 134 p.
- Campos-Carbajal SE. 2017. Infección de adultos de *Anastrepha ludens* y *A. obliqua* con diseminadores de conidios de *Beauveria bassiana* en campo. [Tesis de Maestría]. El Colegio de la Frontera Sur ECOSUR, 37 p.
- Cancino J, Liedo P, Ruiz L, López G, Montoya P, Barrera JF, Sivinski J, Aluja M. 2012. Discrimination by *Coptera haywardi* (Hymenoptera: Diapriidae) of host previously attacked by conspecifics of by the larval parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae). *Biocontrol Science and Technology* 22: 899–914.
- Cancino J, Montoya P, Barrera JF, Aluja M, Liedo P. 2014. Parasitism by *Coptera haywardi* and *Diachasmimorpha longicaudata* on *Anastrepha* flies with different fruits under laboratory and field cage conditions. *BioControl* 59: 287-295.

- Castañeda M del R, Selivon D, Hernández-Ortiz V, Soto A, Canal NA. 2015. Morphometric divergence in populations of *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae) from Colombia and some Neotropical locations. In: De Meyer M, Clarke AR, Vera MT, Hendrichs J (Eds). Resolution of Cryptic Species Complexes of Tephritid Pests to Enhance SIT Application and Facilitate International Trade. Zookeys 540: 61–81.
- Castillo A, Gómez J, Infante F, Vega F. 2009. Susceptibilidad del parasitoide *Phymastichus coffea* LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae) a *Beauveria bassiana* en condiciones de laboratorio. Neotropical Entomology 38: 665-670.
- Castrillo LA, Griggs MH, Liu H, Bauer LS, Vandenberg JD. 2010. Assessing deposition and persistence of *Beauveria bassiana* GHA (Ascomycota: Hypocreales) applied for control of the emerald ash borer, *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae), in a commercial tree nursery. Biological Control 54: 61-67.
- Dean K, Vandenberg J, Griggs M, Bauer L, Fierke M. 2012. Susceptibility of two hymenopteran parasitoids of *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae) to the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). Journal of Invertebrate Pathology 109: 303-306.
- De la Rosa W, Godíne, JA, Alatorre R, Trujillo J. 1997. Susceptibilidad del parasitoide *Cephalonomia stephanoderis* a diferentes cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. Southwestern Entomology 22: 233-242.
- De la Rosa W, Segura HR, Barrera JF, Williams T. 2000. Laboratory evaluation of the impact of entomopathogenic fungi on *Prorops nasuta* (Hymenoptera: Bethyridae), a parasitoid of the coffee berry borer. Environmental Entomology 29: 126-131.
- De la Rosa W, López FL, Liedo P. 2002. *Beauveria bassiana* as a pathogen of the Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae) under laboratory conditions. Journal of Economic Entomology 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.
- Duffy JE, Cardinale BJ, France KE, McIntyre PB, Thébault E, Loreau M. 2007. The functional role of biodiversity in ecosystems: Incorporating trophic complexity. Ecology Letters 10: 522–538.
- Eilenberg J, Hajek A, Lomer C. 2001. Suggestions for unifying the terminology in biological control. BioControl 46: 387-400.
- EI-Sufty R, Führer E. 1985. Interrelationships between *Cydia pomonella* L. (Lep., Tortricidae), *Ascogaster quadridentatus* Wesm. (Hym., Braconidae) and the

- fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Zeitschrift. Fuer Angewandte Entomologie 99: 504–511.
- Ferguson KI, Stiling P. 1996. Non-additive effects of multiple natural enemies on aphid populations. *Oecologia* 108: 375- 379.
- Flores S, Campos S, Villaseñor A, Valle A, Enkerlin W, Toledo J, Liedo P, Montoya P. 2013. Sterile males of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) as disseminators of *Beauveria bassiana* conidia for IPM strategies. *Biocontrol Science and Technology* 23: 1186-1198.
- Godfray, HJC. 1994. Parasitoids: behavioral and evolutionary ecology. Princenton University Press, New Jersey.
- Guillén L, Aluja M, Equihua M, Sivinski J. 2001. Performance of two fruit fly (Diptera: Tephritidae) pupal parasitoids (*Coptera haywardi* (Hymenoptera: Diapriidae) and *Pachycrepoideus vindemiae* (Hymenoptera: Pteromalidae) under different environmental soil conditions. *Biological Control* 23: 219-227.
- Gutiérrez JM. 2010. El programa Moscas de la Fruta en México. En: Montoya P, Toledo J, Hernández E. eds. Moscas de la fruta: Fundamentos y Procedimientos de Manejo. S y G editores, México, D.F. p. 3-10.
- Hernández Díaz-Ordaz N, Pérez N, Toledo J. 2010. Pathogenicity of three strains of entomopathogenic fungus on *Anastrepha obliqua* adults (Macquart) (Diptera: Tephritidae) under laboratory conditions. *Acta Zoologica Mexicana* 26: 481-494.
- Hernández-Ortiz V. 1992. El género *Anastrepha* Schiner en México (Diptera: Tephritidae). Taxonomía, distribución y sus plantas huéspedes. Instituto de Ecología Publicación No. 33. Xalapa, Ver. México, 162 pp.
- Himuro C, Fujisaki K. 2010. Mating experience weakens starvation tolerance in the seed bug *Togo hemipterus* (Heteroptera: Lygaeidae). *Physiological Entomology* 35: 128–133.
- Hou C, Amunugama K. 2015. On the complex relationship between energy expenditure and longevity: Reconciling the contradictory empirical results with a simple theoretical model. *Mechanisms of Ageing and Development* 149: 50–64.
- [IPBES] Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and (UN) Ecosystem Services– United Nations Environment Programme. mayo de 2019. [consultada 2019 mayo 25]. <https://www.ipbes.net/news/ipbes-global-assessment-preview>. <https://www.unenvironment.org/es/news-and-stories/comunicado-de-prensa/la-naturaleza-esta-en-un-declive-peligroso-y-sin-precedentes>
- Janzen DH, Hallwachs W. 2019. Perspective: Where might be many tropical insects?. *Biological conservation* 233: 102-108.

- King EG, Bell JV. 1978. Interactions between a Braconid, *Microplitis croceipes*, and a fungus, *Nomuraea rileyi*, in laboratory-reared bollworm larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* 31: 337- 340.
- Kogan M. 1998. Integrated pest management. Historical perspectives and contemporary developments. *Annual Review of Entomology* 43: 243-270
- 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.
- Labbé RM, Gillespie DR, Cloutier C, Brodeur J. 2009. Compatibility of an entomopathogenic fungus with a predator and a parasitoid in the biological control of greenhouse whitefly. *Biocontrol Science and Technology* 19: 429-446.
- Lacey LA, Mesquita LM, Mercadier G, Debire R, Kazmer DJ, Leclant F. 1997. Acute and sublethal activity of the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) on adult *Aphelinus asychis* (Hymenoptera: Aphelinidae). *Environmental Entomology* 26: 1452-1460.
- López-Arriaga F, Montoya P, Cancino J, Toledo J, Liedo P. 2014. Female pupae of the genetic sexing strain “Tap-7” of *Anastrepha ludens* as hosts of *Coptera haywardi*. *BioControl* 59 (2): 149-157.
- Mahdavi V, Saber M, Rafiee-Dastjerdi H, Mehrvar A. 2013. Susceptibility of the hymenopteran parasitoid, *Habrobracon hebetor* (Say) (Braconidae) to the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* Vuillemin and *Metarhizium anisopliae* Sorokin. *Jordan Journal of Biological Sciences* 6: 17-20.
- Martin EA, Reineking B, Seo B, Steffan-Dewenter I. 2013. Natural enemy interactions constrain pest control in complex agricultural landscapes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110: 5534-5539.
- Martins ICF, Silva RJ, Alencar J, Silva K, Cividanes R, Duarte, Agostini LT, Polanczyk R. 2014. Interactions between the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) and the aphid parasitoid *Diaeretiella rapae* (Hymenoptera: Braconidae) on *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Journal of Economic Entomology* 107: 933-938.
- Mejía JW, Bustillo AE, Orozco J, Cháves B. 2000. Efecto de cuatro insecticidas y de *Beauveria bassiana* sobre *Prorops nasuta* (Hymenoptera: Bethyridae), parasitoide de la broca del café. *Revista Colombiana de Entomología* 26: 117-12.
- Mesquita AL, Lacey L. 2001. Interactions among the entomopathogenic fungus, *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes), the parasitoid, *Aphelinus asychis* (Hymenoptera: Aphelinidae), and their aphid host. *Biological control* 22: 51-59.

- Metzler D, Jordan F, Pamminer T, Foitzit S. 2016. The influence of space and time on the evolution of altruistic defense: the case of ant slave rebellion. *Journal of Evolutionary Biology* 29: 874-886.
- Money N. 2016. Fungi and Biotechnology. In: Watkinson S, Boddy L, and Money N. Academic press. 2016. *The Fungi*. Pp: 401-424.
- Montoya P, Gálvez C, and Díaz-Fleischer F. 2018. Host availability affects the interaction between pupal parasitoid *Coptera haywardi* (Hymenoptera: Diapriidae) and larval-pupal parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae). *Bulletin of Entomological Research* 109: 15-23.
- Montoya P, Cancino J. 2004. Control biológico por aumento en moscas de la fruta (Diptera: Tephritidae). *Folia Entomológica Mexicana* 43(3): 257-270.
- Montoya P, Toledo J. 2010. Estrategias de control biológico. En: Montoya P, Toledo J, Hernández E. eds. *Moscas de la fruta: Fundamentos y Procedimientos de Manejo*. S y G editores, México, D.F. p. 169-182.
- Nicholls C. 2008. *Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico*. Editorial Universidad de Antioquia. ISBN 978-958-714-186-3. Medellín, Colombia.
- Nicholls CI, MA Altieri. 1996. Control biológico en agroecosistemas mediante el manejo de insectos entomófagos, pp. 7-31. En *Memorias del XX Congreso Nacional de Control Biológico*. Guadalajara, Jalisco, México.
- Novelo-Rincón LF, Montoya P, Hernández-Ortiz V, Liedo P, Toledo J. 2009. Mating performance of sterile Mexican fruit fly *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) males used as vectors of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Journal of Applied Entomology* 133: 702-710.
- Polis GA, Myers CA, Holt RD. 1989. The ecology and evolution of intraguild predation: potential competitors that eat each other. *Annual Review of Ecology and Systematic* 20: 297-330.
- Ramadan MM, Wong TT, Wong MA. 1991. Influence of parasitoid size and age on male mating success of opiinae (Hymenoptera: Braconidae), larval parasitoids of fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Biological Control* 1: 248-255.
- Rashki M, Kharazi-pakdel A, Allahyari H, van Alphen JJM. 2009. Interactions among the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales), the parasitoid, *Aphidius matricariae* (Hymenoptera: Braconidae), and its host, *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). *Biological Control* 50: 324-328.
- Reyes IC, Bustillo AE, Chaves B. 1995. Efecto de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre el parasitoide de la broca del café, *Cephalonomia stephanoderis*. *Revista Colombiana de Entomología* 21: 199-204.
- Rosenheim JA, Mangel M. 1994. Patch-leaving rules for parasitoids with imperfect host discrimination. *Ecological Entomology* 19: 374-380.

- Roy H, Pell J. 2000. Interactions between entomopathogenic fungi and other natural enemies: Implications for biological control. *Biocontrol Science and Technology* 10: 737-752.
- Sánchez-Bayo, F., & Wyckhuys, K. A. 2019. Worldwide decline of the entomofauna: A review of its drivers. *Biological Conservation* 232: 8-27
- Schneider D. 2009. Physiological integration of innate immunity. En: Rolff J, Reynolds SE. Eds. *Insect infection and immunity: Evolution, ecology, and mechanisms*. Oxford: Oxford University Press.
- Shipp JI, Zhang YQ, Hunt DWA, Ferguson G. 2003. Influence of humidity and green house microclimate on the efficacy of *Beauveria bassiana* (Balsamo) for control of greenhouse arthropod pest. *Environmental Entomology* 32: 1154-1163.
- Simmons BI, Balmford A, Bladon AJ, Christie AP, De Palma A, Dicks LV, Gallego-Zamorano J, Johnston A, Martin P, Purvis A, Rocha R, Wauchope H, Wordley C, Worthington T, Finch T. 2019. Worldwide insect declines: An important message, but interpret with caution. *Ecology and Evolution* 9: 3678-3680.
- Sivinski J, Vuline K, Meneses E, Aluja M. 1998. The bionomic of *Coptera haywardi* (Oglobin) (Hymenoptera: Diapriidae) and the other pupal parasitoids of tephritid fruit flies (Diptera). *Biological Control* 11: 193-202.
- Sookar P, Bhagwant S, Ouna EA. 2008. Isolation of entomopathogenic fungi from the soil and their pathogenicity to two fruit fly species (Diptera: Tephritidae). *Journal of Applied Entomology* 132: 778-788.
- Stark JO, Vargas RI, Thalman RK. 1991. Diversity and abundance of oriental fruit fly parasitoids (Hymenoptera: Braconidae) in guava orchards in Kauai, Hawaii. *Journal of Economic Entomology* 84: 1460-1467.
- Straub CS, Finke DL, Snyder WE. 2008. Are the conservation of natural enemy biodiversity of natural enemy biodiversity and biological control compatible goals? *Biological Control* 45: 225-237.
- St Leger RJ. 1993. Biology and mechanisms of insect-cuticle invasion by Deuteromycete fungal pathogens, pp. 211–229. En: Beckage NE, Thompson SN, Federici BA. Eds. *Parasites and Pathogens of Insects*. Academic Press Inc., San Diego, C.A.
- Thies C, Roschewitz I, Tscharncke T. 2005. The landscape context of cereal aphid parasitoid interactions. *Proceedings of the Royal Society B. Biological Sciences* 272: 203–210.
- Toledo J, Campos S, Flores S, Liedo P, Barrera JF, Villaseñor A, Montoya P. 2007. Horizontal Transmission of *Beauveria bassiana* in *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) under laboratory and field cage conditions. *Journal of Economic Entomology* 100: 291-197

- Toledo J, Liedo P, Flores S, Campos S, Villaseñor A, Montoya P. 2008. Use of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for fruit fly control: A novel approach, pp. 127–132. En Sugayama RL, Zucchi RA, Ovruski SM, Sivinski J. eds. Fruit flies of economic importance: from basic to applied knowledge. Proc. of the 7th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance, 10–15 September 2006. Press Color Graficos Especializados Ltda., Bahía, Salvador, Brazil.
- Toledo J, Flores S, Montoya P. 2010. Insectos estériles como vectores de patógenos. pp: 369-376. En: Montoya P, Toledo J, Hernández E. eds. Moscas de la fruta: Fundamentos y Procedimientos de Manejo. S y G editores, México, D.F. p. 369-376.
- Toledo, J., S. Flores, S. Campos, A. Villaseñor, W. Enkerlin, P. Liedo, A. Valle, and P. Montoya. 2017. Pathogenicity of three formulations of *Beauveria bassiana* and efficacy of autoinoculation devices and sterile fruit fly males for dissemination of conidia for the control of *Ceratitidis capitata*. Entomol. Exp. Appl. 164: 340–349.
- Van Hook, T. 1994. The conservation challenge in agriculture and the role of entomologists. Florida Entomologist 77: 42-73.
- van Lenteren, JC. 1981. Host discrimination by parasitoids. En: Nordlung NA, Jones RL, Lewis WJ. eds. Semiochemicals: their role in pest control, John Wiley, New York, pp. 153-179.
- Vargas RI, Stark JD, Uchida GK, Purcell M. 1993. Opiine parasitoids (Hymenoptera: Braconidae) of oriental fruit fly (Diptera: Tephritidae) on Kauai, Island, Hawaii: Islandwide relation abundance and parasitism rates in wild and orchard guava habitats. Environmental Entomology 21: 246-253.
- Vargas RI, Leblanc L, Putoa R, Piñero JC. 2012. Population dynamics of three *Bactrocera* spp. fruit flies (Diptera: Tephritidae) and two introduced natural enemies, *Fopius arisanus* (Sonan) and *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae), after an invasion by *Bactrocera dorsalis* (Hendel) in Tahiti. Biological Control 60: 199-206.
- Wang X, Messing R. 2003. Intra- and interspecific competition by *Fopius arisanus* and *Diachasmimorpha tryoni* (Hymenoptera: Braconidae) parasitoids of the Tephritid fruit flies. Biological Control 27: 251-259.
- Yeo H, Pell JK, Pye BJ, Alderson PG. 1998. A biorational approach to selecting mycoinsecticides for aphid management. Proceedings Brighton Crop Protection Conference – Pest and Diseases. Brighton Conference pests and diseases. pp 307-308.
- Zhu H, Jun J. 2012. Target-oriented dissemination of *Beauveria bassiana* by the predators, *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) and *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae) for biocontrol of *Myzus persicae*. Biocontrol Science and Technology 22: 393-406.

ANEXOS

Anexo 1.

Plaga control	Enemigos naturales	Tipo de Interacción	Referencia
<i>Hypothenemus hampei</i> (Coleoptera: Curculionidae)	<i>Beauveria bassiana</i> (Ascomycetes: Hypocreales) (HE) y <i>Metarhizium anisopliae</i> (HE) - <i>Cephalonomia stephanoderis</i> (Hymenoptera: Bethyridae) (P)	Sinérgica	Reyes et al. (1995)
<i>H. hampei</i>	<i>B. bassiana</i> (HE) - <i>Prorops nasuta</i> (Hymenoptera: Bethyridae) (P)	Sinérgica	Mejía et al. (2000)
<i>Myzus persicae</i> (Hemiptera: Aphididae)	<i>B. bassiana</i> (HE), con <i>Harmonia axyridis</i> (Coleoptera: Coccinellidae) (P) y <i>Chrysoperla carnea</i> (Neuroptera: Chrysopidae) (P)	Sinérgica	Zhu y Jun (2012)
<i>H. hampei</i>	<i>B. bassiana</i> (HE) - <i>Physmastichus coffea</i> (Hymenoptera: Eulophidae) (P)	Antagónica	Castillo et al. (2009)
<i>Trialeurodes vaporariorum</i> (Hemiptera: Aleyrodidae)	<i>B. bassiana</i> - <i>Encarsia formosa</i> (Hymenoptera: Aphelinidae) (P)	Antagónica	Labbé et al. (2009)
<i>Trialeurodes vaporariorum</i> (Hemiptera: Aleyrodidae)	<i>B. bassiana</i> (HE) - <i>Dicyphus hesperus</i> (Hemiptera: Miridae: Bryocorinae) (D)	Antagónica	Labbé et al. (2009)
<i>M. persicae</i>	<i>B. bassiana</i> (HE) - <i>Diaeretiella rapae</i> (Hymenoptera: Braconidae) (P)	Antagónica	Martins et al. (2014)
<i>Acyrtosiphon pisum</i> (Hemiptera: Aphididae)	<i>Pandora neoaphidis</i> (Zygomycetes: Entomophthorales) (HE)- <i>Aphidius ervi</i> (Hymenoptera: Aphidiidae) (P) <i>Pandora neoaphidis</i> (HE) - <i>Coccinella septempunctata</i> Coleoptera: Coccinellidae (D)	Antagónica	Baverstock et al. (2009)

P= Parasitoide; D: Depredador; HE: Hongo Entomopatógeno.

Anexo 2

Portada del artículo publicado en *Environmental Entomology*

Environmental Entomology, 48(1), 2019, 156–162

doi: 10.1093/ee/hvy182

Advance Access Publication Date: 8 January 2019

Research

Biological Control – Microbials

OXFORD

Does *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae) Affect the Survival and Fecundity of the Parasitoid *Coptera haywardi* (Hymenoptera: Diapriidae)?

Olga Yaneth Martínez-Barrera,^{1,3} Jorge Toledo,¹ Pablo Liedo,¹ Jaime Gómez,¹ Javier Valle-Mora,¹ Jorge Cancino,² and Pablo Montoya²

¹Departamento de Agricultura, Sociedad y Ambiente, El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Carretera Antigua Aerpuerto Km. 2.5, C.P. 90700, Tapachula, Chiapas, México, ²Programa Moscafrut SAGARPA-ILCA, Camino a los Cacocotales S/N, C.P. 30860, Metapa de Domínguez, Chiapas, México, and ³Corresponding author, e-mail: oymartinez@ecosur.edu.mx

Subject Editor: Rosalind James

Received 17 February 2018; Editorial decision 25 November 2018

Abstract

The effect of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin on the development of immature stages, and survival and fecundity of *Coptera haywardi* (Oglobin) adults was studied under laboratory conditions. The fungus was applied as dry conidia on parasitized pupae of *Anastrepha obliqua* (Macquart) (Diptera: Tephritidae) and on parasitoid adults of two different age groups (1- to 4-d-old, and 5- to 10-d-old). The fungus caused no negative effects on the development of the immature stages, since there were no differences on the emergence of adults compared with the untreated control. Adults were susceptible to the fungus on both sexes and age groups. Males showed shorter lifespan than females, even in untreated individuals. Despite the increased adult mortality produced by the fungus there was no effect on fecundity during first 18 d of adult life, as the net fecundity was 26.7 and 26.3 parasitoids per female treated and untreated, respectively. Our results suggest that, given the low susceptibility of parasitized pupae and the no effect on fecundity during the first 18 d of adult life, it is possible to develop management strategies using these two natural enemies in the biological control against *A. obliqua*.

Resumen

Se estudió bajo condiciones de laboratorio el efecto del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin sobre el desarrollo de estados inmaduros, supervivencia y fecundidad de los adultos de *Coptera haywardi* (Oglobin). El hongo se aplicó como conidio seco sobre pupas de *Anastrepha obliqua* (Macquart) (Diptera: Tephritidae) parasitadas y en adultos de dos grupos de edad (1–4 d y 5–10 d). El hongo no ocasionó efectos negativos en el desarrollo de los estados inmaduros, dado que en la emergencia de adultos no hubo diferencias con el testigo. Ambos sexos y grupos de edades de los adultos fueron susceptibles al hongo. Los machos tuvieron una vida más corta que las hembras incluso en los individuos no tratados. La infección del hongo incrementó la mortalidad, pero no hubo efecto sobre la fecundidad durante los primeros 18 días de vida adulta, ya que la fecundidad neta fue de 26.7 y 26.3 parasitoides por hembra tratada y no tratada, respectivamente. Nuestros resultados sugieren que dada la baja susceptibilidad de la pupa parasitada y el no efecto sobre la fecundidad neta durante los primeros 18 días de vida adulta, es posible desarrollar estrategias de manejo usando estos dos enemigos naturales en el control biológico de *A. obliqua*.

Key words: endoparasitoid, entomopathogenic fungus, *Anastrepha* spp., biological control, susceptibility

Anexo 3

Constancia del segundo artículo sometido para su publicación en *Biological Control*.

Manuscript Details

Manuscript number	BCON_2019_420
Title	Interaction between <i>Beauveria bassiana</i> (Hypocreales: Cordycipitaceae) and <i>Coptera haywardi</i> (Hymenoptera: Diapriidae) for the management of <i>Anastrepha obliqua</i> (Diptera: Tephritidae)
Article type	Research Paper

Abstract

The interaction between the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and the parasitoid *Coptera haywardi*, as potential biological control agents for *Anastrepha obliqua* fruit flies was evaluated under laboratory and field cage conditions. First, adult fruit flies mortality was assessed when exposed as pupae to soil treated with *B. bassiana* under laboratory conditions. Then, the effect of both, the fungi and the parasitoid was assessed in Plexiglas cages located under semi protected field conditions. Application of *B. bassiana* dry conidia to the soil resulted in 40% mortality of *A. obliqua* adults in laboratory. However, when evaluated under semi protected field conditions, mortality was lower (21.2%). According to a multiple decrement life table analysis, the probability of death of *A. obliqua* was 0.88 when *C. haywardi* parasitoids were released and *B. bassiana* conidia were applied in conjunction. When only *C. haywardi* parasitoids were released, the probability of death was 0.89. When only *B. bassiana* conidia were applied, the probability of death was 0.23. These results show that the simultaneous use of these natural enemies does not produce a synergistic, additive or antagonistic interaction, since the presence of *B. bassiana* had no effect on the parasitism by *C. haywardi*. These results indicate that the parasitoid is a better natural enemy for the control of *A. obliqua*, that the two biological control agents might be used simultaneously, but this will not result in a better control.

Keywords	Parasitoids, Entomopathogens, Multiple biological control, Fruit flies, Intraquid interactions.
Corresponding Author	Olga Yaneth Martinez Barrera
Corresponding Author's Institution	ECOSUR
Order of Authors	Olga Yaneth Martinez Barrera, Jorge Toledo, Jorge Cancino, Pablo Liedo, Jaime Gomez, Javier Valle Mora, Pablo Montoya

Anexo 4. Constancias de participación en eventos académicos





ATTENDANCE CERTIFICATE

This is to certify that

The work titled:

Interaction of *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae) and *Coptera haywardi* (Hymenoptera: Diapriidae) for the management of *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae)

has been presented by:

Olga Yaneth Martínez-Barrera, Jorge Toledo, Jorge Cancino, Pablo Liedo, Jaime Gómez & Pablo Montoya

as POSTER presentation in the
10th International Symposium
on Fruit Flies of Economic Importance
held at Tapachula, Chiapas, México; from 23th to 27th april 2018

Pablo Liedo
Chairman of the Local
Organizing Committee

Rui Cardoso Pereira
Chairman of the Steering
Committee

10th International Symposium on **Fruit Flies** of Economic Importance
Tapachula, Chiapas April 23-27 2018 MEXICO