

EVALUACIÓN DEL SISTEMA “ADULTO FRÍO” EN EL EMPAQUE PARA LIBERACIÓN DE *DIACHASMIMORPHA LONGICAUDATA* (ASHMEAD) (HYMENOPTERA: BRACONIDAE), PARASITOIDE DE MOSCAS DE LA FRUTA

LÍA RUIZ, JORGE CANCINO, ENOC GÓMEZ y PABLO MONTOYA

Subdirección de Desarrollo de Métodos. Programa Moscamed - Moscafrut, DGSV-SENASICA-SAGARPA. Central Poniente 14, Col. Centro; Tapachula, Chiapas, 30700 México. Tel y Fax: +962 64 35059; e-mail: pmontoya@prodigy.net.mx

EVALUACIÓN DEL SISTEMA “ADULTO FRÍO” EN EL EMPAQUE PARA LIBERACIÓN DE *DIACHASMIMORPHA LONGICAUDATA* (ASHMEAD) (HYMENOPTERA: BRACONIDAE), PARASITOIDE DE MOSCAS DE LA FRUTA

RESUMEN: Se evaluó la técnica “adulto frío” en el empaque para liberación del parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* empleando tres dispositivos de empaque con densidades diferentes. La supervivencia, fecundidad, habilidad de vuelo y el porcentaje de estructuras dañadas (antenas, alas, patas) fueron los parámetros indicativos en las diferentes evaluaciones. Como paso inicial se determinó que los parasitoides sometidos a 3 ± 2 °C durante 45 min, permanecían aletargados (y por consecuencia se facilitaba su manejo durante el empaque) sin que se presentaran efectos significativos. Se observó que la supervivencia, fecundidad, habilidad de vuelo y porcentajes de estructuras dañadas sufrieron un menor impacto conforme se utilizaron densidades menores. Condiciones de mayor aeración en los dispositivos de empaque tuvieron un impacto benéfico en los parámetros bajo estudio. El porcentaje mayor de daño de los parasitoides empacados se presentó en las antenas (~ 70%), por lo que se evaluó su capacidad de búsqueda en comparación con parasitoides sin daño (testigo) y dañados artificialmente (pero sin enfriarse). Los resultados mostraron que los parasitoides enfriados fueron los más lentos en responder ante la presencia de frutos infestados por moscas de la fruta, pero que con el paso del tiempo mostraron una recuperación paulatina y consistente, sin que se presentaran diferencias significativas entre tratamientos durante 60 min de observación. Estos datos indican la conveniencia de utilizar como densidad de empaque 20,000 y 16,500 pupas por caja PARC modificada y Cribas en torres, respectivamente, en aquellos programas de control biológico por aumento que se desarrollen contra moscas de la fruta a nivel regional.

PALABRAS CLAVES: Control biológico por aumento, moscas de la fruta, empaque de parasitoides, técnica del adulto frío, *D. longicaudata*.

EVALUATION OF THE CHILLED ADULT SYSTEM FOR PACKING AND RELEASE OF *DIACHASMIMORPHA LONGICAUDATA* (ASHMEAD) (HYMENOPTERA: BRACONIDAE), A PARASITOID OF FRUIT FLIES

ABSTRACT: We evaluated the chilled adult technique for packing and release of *Diachasmimorpha longicaudata* parasitoids using three different packing devices at different adult densities. Survival, fecundity, flight ability and the percentage of damaged structures (antennas, wings, legs) were the indicative parameters used. As a first step, we determined that parasitoids subjected to 3 ± 2 °C for 45 min, remained knockdown (facilitating their manipulation during the packing time), without negative effects on the evaluated parameters. We observed that survival, fecundity, flight ability, and the percentage of damaged structures were correlated with packing density, where the best values were obtained from the lowest density. The best aeration conditions in the packing disposal used, also showed a positive impact in the parameters under study. The higher percentage of damage in chilled parasitoids was observed in antennae (~ 70%), so we evaluated their searching capacity in comparison with healthy (control) and artificially damaged (but not chilled) parasitoids. The results showed that chilled parasitoids had a weakest response to the presence of fruit fly infested mangos, but showed over time a gradual but consistent recuperation in their searching capacity, so significant differences were not evident among treatments during 60 min of observation. Our results suggested packing densities of 20,000 and 16,500 pupae by modified PARC box and sieve in tower, respectively, in those programs that apply biological control by augmentation against fruit flies at a regional level.

KEY WORDS: Biological control by augmentation, fruit flies, packing of parasitoids, chilled adult technique, *Diachasmimorpha longicaudata*.

INTRODUCCIÓN

La liberación aumentativa de enemigos naturales es uno de los tipos de control biológico con mayor efectividad en los últimos años (Hajek, 2004). Este tipo de control se conoce como Control Biológico por Aumento (CBA), y se define como aquella estrategia donde “un número muy grande de enemigos naturales son criados y liberados en periodos críticos para la supresión de poblaciones plaga a corto plazo” (Greathead y Waage, 1983). Según Montoya y Cancino (2004), el CBA es una alternativa adecuada en el caso de moscas de la fruta porque permite solventar algunas de las deficiencias asociadas con el control biológico clásico, y contribuye de manera importante en la supresión de poblaciones plaga. Algunos autores como Barclay (1987), Knipling (1992), Wong *et al.*, (1991), Montoya *et al.* (2000, 2007), consideran que bajo condiciones específicas, esta estrategia puede ser integrada junto con la Técnica del Insecto Estéril (TIE) en programas que se desarrollen bajo el concepto del “área extensa”.

La aplicación exitosa del CBA requiere de dos requisitos fundamentales. El primero es el establecimiento de la cría masiva de la especie a liberar, la cual debe proporcionar individuos altamente competitivos a costos razonables (Sivinski, 1996). El segundo requisito corresponde al desarrollo de las metodologías de empaque de estos insectos y de su liberación en campo, las cuales deben garantizar el mantenimiento de sus atributos y el desempeño óptimo de los mismos una vez que sean liberados.

La liberación en campo de insectos criados masivamente debe ser aplicada en la mayoría de los casos sobre áreas extensas de manera uniforme (Dowell *et al.*, 2005). En la década de los 70, el sistema predominante fue el empaque en bolsas de papel (Villaseñor, 1985), el cual en el caso de moscas de la fruta resultó conveniente hasta el desarrollo de nuevas tecnologías que permitieron una distribución más homogénea del material

estéril en el campo. Sin embargo, el empaque en bolsas de papel representa actualmente un problema serio en parasitoides como *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead), ya que a diferencia de las moscas, éstos tienen mandíbulas con las cuales rompen las bolsas y escapan, lo que significa una merma importante para alcanzar las densidades de liberación que se requieren en el campo (Ruiz *et al.*, 2007).

El sistema de empaque para liberación de insectos con mayor uso en la actualidad (Ej., moscas de la fruta) es el sistema de adulto frío (Dowell *et al.*, 2005). En este sistema, los adultos emergidos son enfriados durante 45 minutos a 3 ± 2 °C hasta alcanzar un grado de inmovilidad total que permite una manipulación adecuada durante las maniobras de carga, transporte y liberación en campo con el uso de aeronaves (Hernández *et al.*, Sometido). Este sistema es exitoso y utilizado a nivel mundial en diversos programas de supresión/erradicación que aplican la Técnica del Insecto Estéril.

Para el empaque y liberación de parasitoides se han adoptado las tecnologías desarrolladas para moscas de la fruta, sin que se hayan realizado previamente evaluaciones específicas sobre la conveniencia de su utilización, por lo que poco se conoce de la eficiencia de estos métodos y de sus efectos sobre los atributos de los parasitoides a liberar. Existen reportes como los de Sivinski *et al.* (2000) y Baeza *et al.* (2002), que presentan datos sobre la factibilidad de aplicar el enfriamiento para el manejo de los parasitoides antes de su liberación, pero no evalúan esta práctica a un nivel masivo, como suele aplicarse en los programas de control biológico por aumento. Debido a lo anterior, en este estudio se llevaron a cabo una serie de experimentos con los siguientes objetivos: 1) Evaluar la eficiencia de dos sistemas de empaque: empaque en cajas PARC y empaque en Cribas para la aplicación del CBA, y 2) Determinar el efecto de la técnica de adulto frío [con diferentes densidades de empaque] en la longevidad, fecundidad y habilidad de vuelo

de los adultos destinados a liberación. Adicionalmente, en este trabajo se presentan resultados sobre el porcentaje de daño en los insectos sometidos a esta técnica así como recomendaciones que pueden ser aplicadas en programas que utilicen el CBA como una alternativa en la supresión de poblaciones de moscas de la fruta.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Las evaluaciones se realizaron en el laboratorio de Control Biológico del Programa Moscafrut ubicado en Metapa de Domínguez, Chiapas. Los parasitoides sometidos a evaluación fueron proporcionados por la Planta Moscafrut y producidos bajo la metodología descrita por Cancino (2000). Los procedimientos de empaque y enfriado de los insectos se llevaron a cabo en el Centro de Empaque de Adulto Frío (CEAF) del Programa Moscamed DGSV/SENASICA/SAGARPA, ubicado en Tapachula Chiapas.

Los experimentos se desarrollaron en la siguiente secuencia. Primero se estudió de manera exclusiva el efecto del enfriamiento sobre la longevidad (con y sin alimento), fecundidad y habilidad de vuelo de *D. longicaudata*. En el segundo experimento se evaluó el efecto de diferentes densidades en los sistemas de empaque de cajas PARC y Cribas en torres, y el proceso de enfriamiento bajo las condiciones de operación del CEAF Tapachula, sobre los parámetros anteriormente referidos. El tercer experimento consistió en determinar el daño físico causado a los adultos empacados bajo esta metodología, y su posible impacto en su capacidad de búsqueda de hospedero. Enseguida se describen estos experimentos.

2.1. Efecto del tiempo de enfriamiento

En jaulas de acrílico de 30 × 30 × 30 cm se colocaron tres grupos de 500♀ y 500♂ de 7 días de edad, de los cuales dos grupos fueron sometidos por separado a 45 y 90 min a una temperatura promedio de 3 ± 2 °C. El tercer grupo fungió como testigo,

y permaneció a 20 ± 2 °C. Observaciones previas habían indicado que en un tiempo menor de 30 min no se obtenía el 100% de aletargamiento de los insectos. Después de cada periodo se tomaron muestras para evaluar los parámetros de calidad que se describen enseguida, las cuales se realizaron con base en el Manual de Control de Calidad de la Planta Moscafrut (Cancino *et al.*, 2006).

- a) Longevidad con agua y alimento. Se colocaron 30♀ y 30♂ en una jaula con estructura de madera de 27 × 27 × 27 cm y paredes cubiertas con malla de 0.5 mm de luz (jaula modelo "Hawai", Wong y Ramadan 1992). Los parasitoides fueron provistos con miel (mezcla de miel y papel absorbente 17:1 [vol: vol]) como alimento y agua en contenedores de 150 ml con papel filtro). La mortalidad se contabilizó diariamente durante 15 días.
- b) Longevidad sin agua ni alimento. Las evaluaciones se realizaron en la misma forma que en la prueba anterior, excepto que los parasitoides no tuvieron disponibilidad de alimento.
- c) Fecundidad. Este parámetro se determinó por medio de la exposición diaria de 200 larvas de *A. ludens* de 8 días de edad, colocadas en unidades de oviposición tipo caja Petri (base de caja Petri de 10 cm cubierta con tela tricot), a parasitoides (30♀: 15♂) contenidos en jaulas tipo Hawai, con un tiempo de exposición de 2 horas. Posteriormente las larvas expuestas se colocaron en recipientes cilíndricos de plástico (7 × 5 cm [d × h]) con vermiculita húmeda en donde se mantuvieron por 15 días a 26 °C. Con la emergencia se determinó el número de parasitoides adultos emergidos por el número de hembras vivas por día.
- d) Habilidad de vuelo. Se tomó una muestra al azar de 100 parasitoides los cuales se coloca-

ron en el fondo de un tubo negro de PVC (10 × 10.5cm), previamente impregnado con talco neutro en sus paredes internas, para evitar el escape de los parasitoides caminando. Este tubo fue colocado en el interior de una jaula de acrílico con estructura de aluminio (30 × 30 × 30 cm) para contener los adultos que escaparan volando. Durante cinco días se retiraron los parasitoides fuera del tubo. El porcentaje de adultos voladores se obtuvo con la diferencia entre parasitoides que salieron volando fuera del tubo y los contenidos al interior del tubo. Se realizaron 10 repeticiones para cada parámetro con base en un diseño completamente al azar.

2.2 Evaluación de sistemas de empaque

Las pupas de *D. longicaudata* se seleccionaron dos días antes de la emergencia y se colocaron en los dispositivos de empaque bajo evaluación de acuerdo a los siguientes procedimientos.

- a) Caja PARC "Normal": Estas cajas son fabricadas con fibra de vidrio en color gris de 60 × 49 × 33 cm, con ventanas laterales de 28 × 12 cm y en la tapa de 23 × 40 cm cubiertas con malla de 0.1 mm de luz.
- b) Caja PARC "Modificada". Es la misma caja descrita en el párrafo anterior pero con ventanas laterales más amplias (40 × 25 cm), con el objeto de proveer mayor ventilación. En ambos tipos de cajas se evaluaron las densidades de 40,000, 20,000 y 10,000 pupas de *D. longicaudata* por caja, distribuidas equitativamente en seis, cuatro y dos bolsas de papel semigraft no. 20 respectivamente, de donde emergieron los adultos. Las cajas se mantuvieron durante siete días a 24 ± 2 °C, 60-80 % de HR y un fotoperiodo L:O de 12:12 h. Durante este periodo se presentó la emergencia de machos y hembras, y la cópula

entre éstos. Los parasitoides fueron alimentados con miel aplicada sobre la malla de las ventanas. Para cada una de las densidades se apilaron 6 cajas PARC (una estiba) equivalente a un lote de parasitoides.

- c) Cribas en torres: Las torres fueron conformadas por 24 cribas apiladas. Cada criba consistió en dos tapas de marco de aluminio (66 × 72 × 4 cm de grosor) cubiertas de malla plástica de 0.1 mm de luz, lo cual proporciona una superficie interior de reposo de 10,608 cm². Las densidades de empaque correspondieron a 32,900; 16,500 y 8,500 pupas por criba, las cuales fueron equivalentes a las densidades evaluadas en las cajas PARC, tomando como base la superficie de reposo para los insectos que ambos dispositivos presentan. Las pupas permanecieron en estas torres durante siete días hasta completar la emergencia de adultos bajo las condiciones ambientales previamente descritas. El alimento (miel) fue suministrado en la forma previamente descrita.

Una vez que los adultos emergidos alcanzaron la madurez sexual requerida (~ 4-5 días), las torres y las cajas se trasladaron a un cuarto de enfriado con temperatura promedio de 3 ± 2 °C, donde permanecieron por 45 min para inmovilizar a los parasitoides y colocarlos en las cajas para liberación aérea. De estas cajas se tomaron las muestras respectivas para evaluar los parámetros de supervivencia (con y sin alimento), fecundidad y habilidad de vuelo en la forma previamente descrita en el apartado 2.1. El tratamiento testigo consistió de parasitoides mantenidos en las condiciones ambientales previamente descritas pero sin ser sometidos al efecto de la densidad de empaque ni al frío. En este experimento se usó un diseño completamente al azar con 20 lotes de producción evaluados (cada lote = a 1 repetición).

2.3. Determinación del daño y capacidad de búsqueda de los parasitoides empacados

- a) Individuos con daño morfológico: Se tomó una muestra de 100 parasitoides hembra, provenientes de los tratamientos aplicados a las cajas PARC y sistema de cribas en torres que habían sido sometidos al proceso de aletargamiento previamente descrito. Estas hembras fueron inmovilizadas de manera permanente con la ayuda de una cámara seca con acetato de amonio, para posteriormente determinar el daño (estructuras incompletas) en antenas, patas y alas con la ayuda de un estereoscopio. El dato de porcentaje de daño para cada estructura quedó referido al individuo (i.e., porcentaje de individuos con daño en antenas, patas y alas)
- b) Capacidad de búsqueda: Con el objeto de evaluar el efecto del daño sobre las antenas en la capacidad de búsqueda de los parasitoides (~ el 70% del daño de la evaluación anterior se observó sobre las antenas), se evaluaron los siguientes tratamientos: 1) parasitoides empacados y enfriados bajo el sistema de adulto frío, 2) parasitoide no empacados ni enfriados pero con daño artificial en sus antenas y 3) parasitoides no empacados ni enfriados, y sin daño en las antenas (testigo). Para esta evaluación se seleccionaron 30 hembras de cada tratamiento y se colocaron por separado en el interior de una jaula (1 × 1 × 1 m con marco alambón y tela tul de 1mm de luz) ante la presencia de frutos de mango criollos infestados con *Anastrepha ludens* (Loew) y mangos sanos (uno de cada tipo) sostenidos con alambres del techo de cada jaula, con 21 cm de separación entre ambos. Cada 10 min y durante una hora se determinó el número y porcentaje de visitas de cada tipo de parasitoide a cada tipo de mango. Por visita se entendió al arribo y exploración de la hembra sobre el fruto por un tiempo mínimo

de 2 minutos. Se realizaron 10 repeticiones de este procedimiento.

2.4 Análisis de datos

La supervivencia (lx) de los adultos en todos los casos se analizó a través de la prueba de Log-Rank. La fecundidad (mx), habilidad de vuelo (promedios de parasitoides voladores) y los porcentajes de estructuras dañadas fueron analizados con un ANOVA y la prueba de rango múltiple de Tukey. Para el análisis de la capacidad de búsqueda de hospedero se aplicó un ANOVA trifactorial para determinar la interacción entre los factores probados (daño, fruto, tiempo). Los datos en porcentaje fueron normalizados a través de la transformación por arcoseno previo al análisis. En todos los casos se empleó un nivel de significancia de 0.05.

3. RESULTADOS

3.1 Efecto del tiempo de enfriamiento en parasitoides

En el Cuadro 1 se presentan los resultados obtenidos en los parámetros de calidad con los parasitoides adultos sometidos a dos periodos de enfriado. Los porcentajes de parasitoides vivos al día 20 con alimento y al día 7 sin alimento no mostraron diferencia significativa entre el enfriamiento durante 45 min y el testigo, mientras que para el intervalo de 90 min la supervivencia fue menor respecto al tratamiento testigo ($n = 29$; $F = 18.60$, $P = 0.001$). La fecundidad promedio no presentó diferencias a 7 o 20 días entre los tratamientos ($n=29$; $F=0.461$; $P=0.640$). El porcentaje de voladores fue significativamente mayor en el tratamiento testigo ($n = 29$; $F= 38.86$; $P = 0.0001$).

3.2 Empaque de parasitoides y aletargamiento con frío

En la Figura 1 se muestra el efecto de la densidad y el enfriamiento sobre la supervivencia de los parasitoides con alimento (1a) y sin alimento (1b) en los tres sistemas de empaque. Como se puede observar

Cuadro 1

Efecto de dos periodos de enfriamiento en la supervivencia (%), fecundidad (mx = hijos/hembra/día) y habilidad de vuelo (%) de *Diachasmimorpha longicaudata*.

Tratamientos	Supervivencia (%)		Fecundidad (hijos /hembra/día)	Habilidad de vuelo (%)
	Con alimento*	Sin alimento**		
Testigo	85.66 ± 2.86 a	61.42 ± 2.47 a	4.04 ± 0.12 a	88.07 ± 1.59 a
45 min	70.99 ± 3.38 ab	50.50 ± 5.76 ab	3.94 ± 0.11 a	60.72 ± 3.18 b
90 min	59.16 ± 9.05 b	49.49 ± 4.31 b	3.81 ± 0.13 a	57.93 ± 2.94 b

Valores promedio seguidos de letras diferentes entre columnas indican significancia estadística (ANOVA y prueba de Tukey $\alpha = 0.05$); * = determinada a 20° día; ** = determinada al 7° día.

en todos casos la supervivencia de los parasitoides fue menor conforme se incrementó la densidad de parasitoides por unidad de empaque.

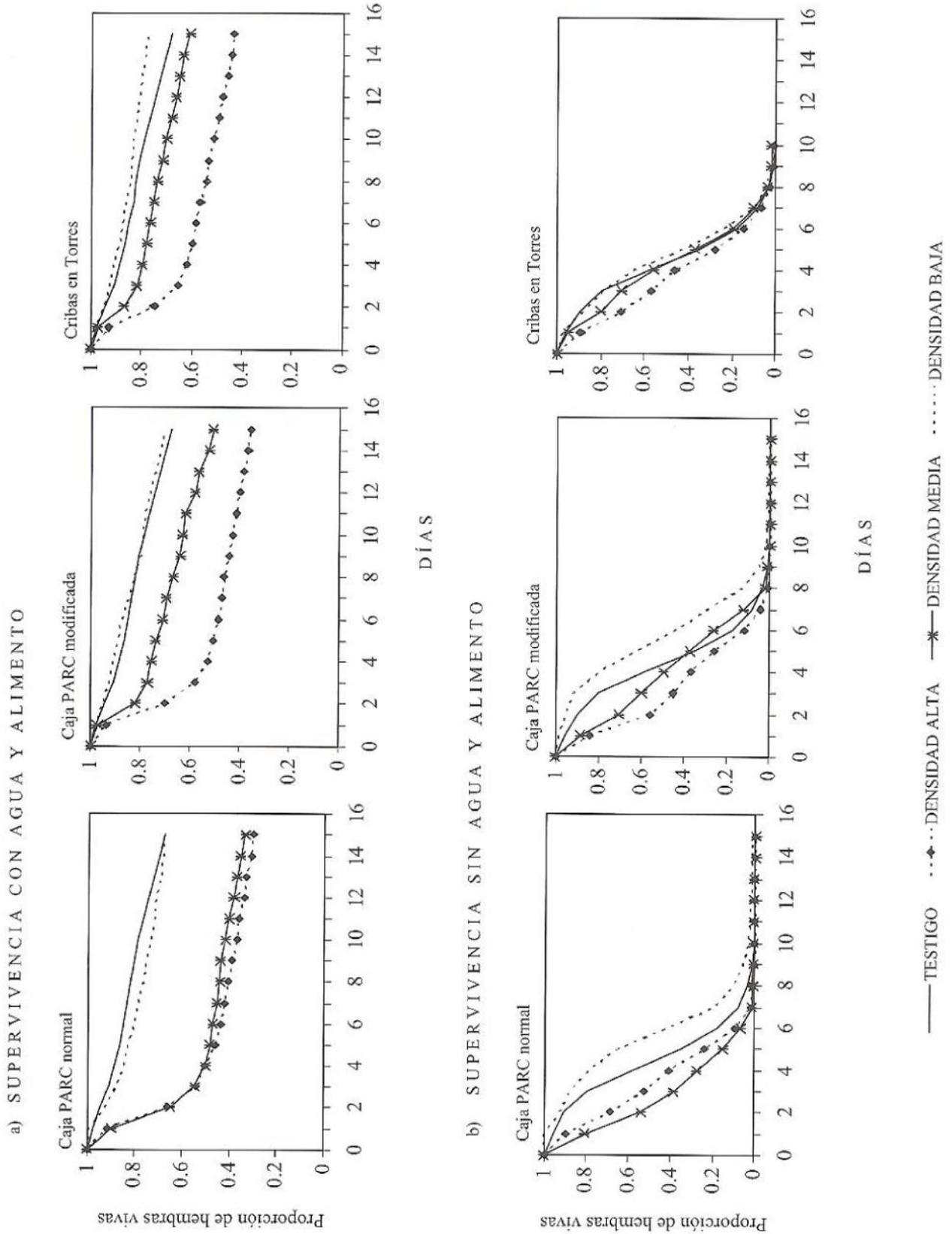
Las curvas de supervivencia con agua y alimento fueron estadísticamente diferentes en todos los sistemas de empaque: caja PARC normal ($\chi^2 = 858.24$, g.l. = 3; $P = 0.0001$), caja PARC modificada ($\chi^2 = 546.16$, g.l. = 3; $P = 0.0001$) y cribas en torres ($\chi^2 = 285.23$, g.l. = 3; $P = 0.0001$). En general los tres tratamientos a densidad baja junto con el testigo presentaron una mayor supervivencia (Fig.1a).

En la supervivencia sin agua ni alimento (Fig. 1b) se observó un decremento más marcado pero más homogéneo en la longevidad de los adultos en los tres métodos de empaque. De manera general se presentaron diferencias significativas entre tratamientos: caja PARC normal ($\chi^2 = 720$, g.l. = 3; $P = 0.0001$), caja PARC modificada ($\chi^2 = 191.80$, g.l. = 3; $P = 0.0001$) y cribas en torres ($\chi^2 = 59.29$, g.l. = 3; $P = 0.0001$), aunque estas diferencias no se perciben gráficamente. Las curvas de supervivencia para el sistema de torres fueron analizadas por separado y se encontró que al comparar el testigo con la densidad baja ($\chi^2 = 3.59$, g.l. = 1; $P = 0.057$), y testigo con la densidad media ($\chi^2 = 0.80$, g.l. = 1; $P = 0.37$), éstos fueron estadísticamente iguales. Para los demás casos sí se presentaron diferencias significativas.

Los resultados sobre fecundidad (progenie/hembra/día) se presentan en la Figura 2. En la mayoría de los casos la fecundidad se incrementó en relación inversa a la densidad. La fecundidad siempre fue mayor en el tratamiento testigo. En la caja PARC normal (Fig. 2a) las diferencias mas notables se presentaron el día 1 con diferencias estadísticas (g.l. 3,163; $F = 45.46$, $P = 0.0001$). La fecundidad a densidad alta siempre fue menor y estadísticamente diferente para los demás tratamientos durante los cinco días de la prueba (día 2: g.l. 3,162; $F = 13.16$, $P = 0.0001$, día3: g.l. 3,157; $F = 29.79$, $P = 0.0001$; día 4: g.l. 3, 160; $F = 21.19$, $P = 0.0001$; día 5: g.l. 3,163; $F = 13.47$, $P = 0.0001$). La fecundidad en caja PARC modificada (Fig. 2b) fue aparentemente mayor que en caja PARC normal (Fig. 2a), y los valores mas altos también correspondieron al tratamiento testigo, seguido de la densidad baja y media. La fecundidad de los parasitoides empacados en Cribas mostró un comportamiento similar a la observada en ambos tipos de cajas PARC (Fig. 2c).

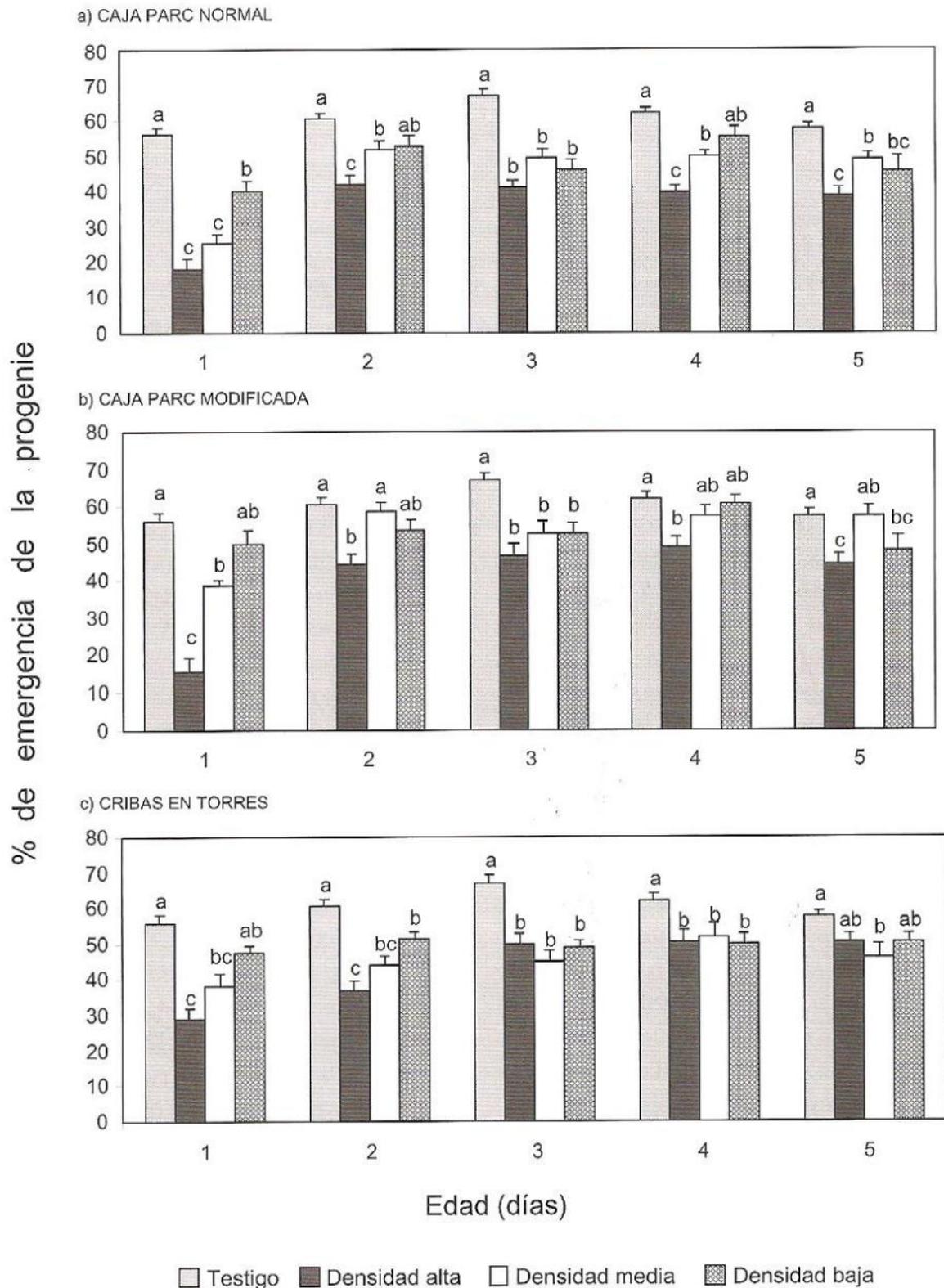
El porcentaje de adultos voladores (Cuadro 2) emergidos de pupas que provinieron del tratamiento testigo fue el mas alto. Se encontraron resultados similares en los tres tratamientos a densidad baja, con diferencias estadísticas entre tratamientos (g.l.= 9, 243; $F = 23.18$; $P = 0.0001$).

FIGURA 1. Supervivencia (con y sin alimento) de *D. longicaudata* empacados en cajas PARC y cribas a densidades diferentes y sometidos a la técnica de adulto frío: Densidad alta (40,000 pupas en cajas PARC y 32,9000 pupas en cribas); Densidad media (20,000 pupas en cajas PARC y 16,500 pupas en cribas); Densidad baja (10,000 pupas en cajas PARC y 8,500 pupas en cribas). Testigo (adultos no sometidos a efecto de densidad ni frío).



Empaque para liberación de *D. longicaudata*

FIGURA 2. Porcentaje de emergencia (progenie) de hembras de *D. longicaudata* empacadas bajo la técnica de adulto frío: Densidad alta (40,000 pupas en cajas PARC y 32,9000 pupas en cribas); Densidad media (20,000 pupas en cajas PARC y 16,500 pupas en cribas); Densidad baja (10,000 pupas en cajas PARC y 8,500 pupas en cribas). Testigo (adultos no sometidos a efecto de densidad ni frío). Las letras marcan diferencias estadísticas dentro de cada edad.



Cuadro 2

Porcentaje ($\bar{x} \pm EE$) de adultos voladores de *D. longicaudata* empacados en diferentes tipos de empaque y a diferente densidad sometidos a la técnica de adulto frío ($3 \pm 2^\circ\text{C}$ por 45 min).

Tipo empaque	Densidad (pupas)	Porcentaje de voladores
Testigo (sin empaque ni frío)	—	89.63 \pm 1.01 a
Caja PARC normal	40,000	53.78 \pm 2.97 f
	20,000	68.19 \pm 2.54 de
	10,000	82.86 \pm 0.82 ab
Caja PARC modificada	40,000	58.13 \pm 3.21 ef
	20,000	70.23 \pm 2.75 cde
	10,000	87.78 \pm 1.57 a
Cribas en torres	32,900	72.59 \pm 4.23 bcd
	16,500	81.92 \pm 2.84 abc
	8,500	88.37 \pm 1.80 a

Valores promedio seguido por letras diferentes implica significancia estadística (Tukey $\alpha = 0.05$)

3.2. Determinación del daño y capacidad de búsqueda

El porcentaje de daño general (adultos con una estructura dañada), mostró diferencias estadísticas entre los tratamientos (g.l.= 8,419; $F=65.28$, $P=0.0001$) (Cuadro 3). Los porcentajes mayores de daño se observaron en la densidad alta para los tres tipos de empaque. Las antenas fueron las estructuras más afectadas, seguidos de alas y patas. El daño en patas fue muy homogéneo sin que se presentaran diferencias estadísticas entre tratamientos (g.l.=8,419; $F=2.40$; $P = 0.0152$). El daño en alas presentó diferencias estadísticas sin que se observara relación directa con la densidad (g.l.= 8,419; $F=11.12$; $P=0.0001$). El daño en antenas también presentó diferencias estadísticas (g.l. 8,419 ; $F = 3.05$; $P = 0.0023$).

La respuesta de parasitoides dañados bajo el sistema de adulto frío, dañados artificialmente y no dañados ante la presencia de frutos infestados se muestra en la Fig. 3. En los diferentes intervalos de observación, la respuesta de los parasitoides no dañados fue mayor numéricamente seguido de los parasitoides dañados artificialmente. Los

parasitoides dañados con frío tuvieron inicialmente una respuesta menor, aunque se observó que éstos tuvieron una recuperación paulatina pero consistente con el paso del tiempo. Sin embargo, solo se presentaron diferencias estadísticas entre tratamientos a los 30 min de observación (g.l. 2, 395; $F= 6.86$, $P = 0.001$).

4. DISCUSIÓN

La combinación de densidades altas de empaque y el proceso de enfriamiento para inmovilizar a los parasitoides, produjo consistentemente un efecto negativo sobre los atributos evaluados de los parasitoides. La supervivencia sin agua y sin alimento fue afectada sustancialmente por las altas densidades de empaque. Se observó que solamente los parasitoides obtenidos de las densidad más bajas tanto en cajas PARC modificada (10,000 pupas) como del sistema de cribas en torres (8,500 pupas/criba), tuvieron un periodo de supervivencia más prolongado que los obtenidos en las densidades media y alta, aunque inferior al tratamiento testigo. La misma tendencia se observó en el caso de la fecundidad y de la habilidad de vuelo, con

Empaque para liberación de *D. longicaudata*

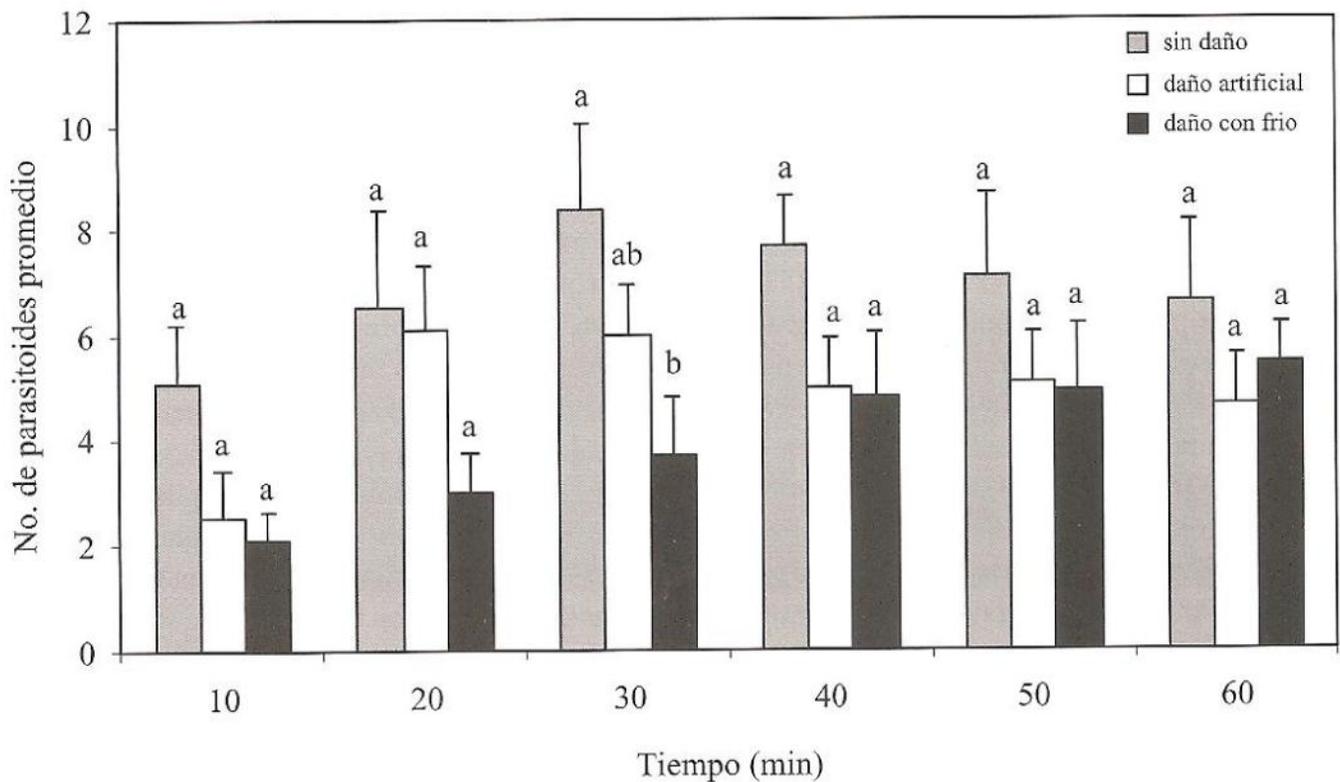
Cuadro 3

Porcentaje total ($\bar{x} \pm EE$) de parasitoides *D. longicaudata* con estructuras dañadas al ser sometidos a la técnica del adulto frío ($3 \pm 2^\circ \text{C}$ por 45 min) en diferentes tipos de empaque y densidades.

Tipo de empaque	Densidad (No. de pupas)	% total de daño	% de daño en estructuras		
			Antenas	Alas	Patas
Caja PARC normal	40,000	62.7 ± 1.8 a	78.0 ± 2.2 a	6.6 ± 1.3 b	7.7 ± 1.2 a
	20,000	44.6 ± 1.1 c	74.8 ± 1.7 ab	8.1 ± 0.8 ab	5.2 ± 0.8 a
	10,000	30.0 ± 0.8 e	69.6 ± 1.7 b	10.3 ± 0.9 ab	6.6 ± 1.1 a
Caja PARC modificada	40,000	38.9 ± 3.1 cd	71.8 ± 2.5 ab	13.3 ± 1.6 a	7.1 ± 0.9 a
	20,000	35.9 ± 1.0 d	71.3 ± 1.7 ab	9.76 ± 1.0 ab	6.7 ± 0.9 a
	10,000	31.7 ± 0.9 de	70.3 ± 1.7 ab	9.9 ± 0.9 ab	3.7 ± 1.0 a
Cribas en torres	32,900	54.4 ± 1.9 b	80.6 ± 2.5 a	24.5 ± 3.1 a	2.4 ± 1.0 a
	16,500	38.9 ± 1.9 cd	76.4 ± 2.8 ab	18.2 ± 2.9 ab	2.8 ± 0.8 a
	8,500	27.6 ± 2.3 e	71.7 ± 3.3 ab	11.4 ± 1.3 bcd	2.4 ± 1.0 a

Valores promedio seguidos de letras diferentes entre columnas implican significancia estadística dentro de cada tratamiento. ANOVA y prueba de Tukey $\alpha = 0.05$.

FIGURA 3. Número promedio de hembras de *D. longicaudata* con respuesta positiva a la presencia de mangos infestados con *A. ludens* durante 60 minutos de observación. Sin daño (= Testigo); Daño artificial (sin empaque ni frío pero con daño artificial en antenas). Daño con frío (provenientes de la técnica del adulto frío con daño en antenas).



mejores resultados en las densidades más bajas. Otro resultado importante fue la diferencia que se detectó entre la caja PARC normal y la caja PARC modificada (con mayor ventilación), con resultados más favorables para esta última, lo cual sugiere que la combinación del hacinamiento (mayor densidad de individuos por caja) y una humedad relativa más alta (cajas con menor ventilación) ejercen un efecto deletéreo cuando los adultos son expuestos al sistema de enfriamiento para su posterior liberación en el campo.

De acuerdo con varios autores (Yonggyun y Song, 2000; Turnock y Fields, 2005), temperaturas bajas en insectos pueden causar daño metabólico si el enfriado se lleva a cabo con temperaturas menores a 0 °C. Este daño se asocia principalmente a: 1) choque a baja temperatura por tiempo de exposición corto (minutos, horas), en el cual las membranas celulares pueden ser dañadas, y 2) daño por tiempo de exposición largo (días) en el cual ocurre la mortalidad (Yonggyun y Song, 2000). En el caso presente se puede inferir que las temperaturas y tiempos de exposición al frío utilizados no causaron un daño metabólico como el que estos autores refieren, aunque si fue posible observar un decremento en algunas capacidades de los parasitoides (e.g., datos de fecundidad, capacidad de búsqueda) que después mostraron una recuperación paulatina.

Los procedimientos de empaque bajo el sistema de adulto frío fueron diseñados para el manejo y liberación de moscas de la fruta estériles. En diversos reportes se demostró que el uso del frío para aletargar a las moscas no presentó efectos deletéreos (Harris *et al.*, 1965; Hooper, 1970; Hernández *et al.* [sometido]). Estos métodos se han depurado con el paso del tiempo y actualmente se aplican en programas operativos a gran escala (Salvato *et al.*, 2004; Shelly *et al.*, 2006). En el caso de los parasitoides de moscas de la fruta, solo se encuentran antecedentes con *Diachasmimorpha tryoni* (Cameron) (Baeza *et al.*, 2002), donde se reportó

que el enfriamiento no afectaba la supervivencia ni la fecundidad de los adultos. Previamente Sivinski *et al.* (2000) reportaron que los adultos enfriados de esa especie mostraron aptitudes para la reducción de poblaciones de *C. capitata*

Los reportes de Baeza *et al.* (2002) y Sivinski *et al.* (2000) no contradicen nuestros resultados. Las diferencias fundamentales entre ambos casos se generaron a partir del uso de densidades altas de empaque bajo condiciones masivas utilizadas en nuestro estudio, donde los problemas en los parámetros evaluados se asocian principalmente a dos circunstancias: 1) el estrés sufrido por los insectos dadas las densidades altas de empaque, y 2) el daño a estructuras derivado del procedimiento de enfriado. Para el primer caso, existen evidencias de que el mantenimiento de los insectos a densidades altas de empaque provoca un grado de estrés que se manifiesta tradicionalmente en la reducción de la aptitud de los insectos (IAEA/FAO/USDA, 1998). En nuestros resultados encontramos que la supervivencia y la fecundidad sufrieron una reducción notable asociada a la densidad de empaque, lo cual resultó más notorio en los primeros días.

El daño en las estructuras de los insectos derivado del procedimiento del enfriado es otra consecuencia negativa del sistema de empaque de adulto frío aplicado a los parasitoides. El problema principal puede radicar en la morfología de estos insectos, los cuales a diferencia de las moscas de la fruta tienen antenas y patas largas que sobresalen notoriamente del resto del cuerpo. Un factor adicional lo constituyó el hecho de que los parasitoides ya aletargados quedaron contenidos por miles (pueden ser millones) en las cajas de liberación, lo cual se tradujo en un "enmarañamiento" de apéndices que incrementó el porcentaje de daño. Sin embargo, en el caso de las antenas pudimos comprobar que el daño fue parcial, pues los parasitoides con daño en esta estructura fueron capaces de detectar y encontrar a su hospedero bajo las condiciones de este estudio. Lo anterior es una evidencia de que

D. longicaudata puede mantener gran parte de su capacidad de búsqueda a pesar de un daño parcial sufrido en las antenas.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran algunas deficiencias que pueden presentarse al usar el sistema de adulto frío para el empaque y liberación de *D. longicaudata*. Sin embargo, la trascendencia de estos resultados dependerá del escenario de liberación que se prevea para una zona de trabajo en particular, donde será necesario realizar un análisis minucioso en cada caso para optar por la alternativa más viable, tomando en cuenta las condiciones agroecológicas prevalentes y la infraestructura disponible. Por un lado, existen condiciones específicas donde la liberación terrestre (que no precisa del enfriamiento previo ni se realiza sobre superficies extensas) puede ser la mejor opción, como lo es el caso de liberaciones que se apliquen sobre huertos de traspacio y/o reservorios que puedan ser alcanzados mediante el uso de vehículos terrestres (Montoya y Cancino, 2004; Montoya *et al.*, 2007). En este caso, el empaque de parasitoides a una densidad de 20,000 pupas en cajas PARC modificadas puede representar una opción altamente conveniente. Por otro lado, las liberaciones aumentativas representan la manera más conveniente de llevar a cabo el control biológico de moscas de la fruta (Knipling, 1992; Wong *et al.*, 1991; Sivinski *et al.*, 1996; Montoya *et al.*, 2000). Esto implica el manejo de grandes cantidades de parasitoides bajo un método de empaque eficiente, mismo que involucra la disponibilidad de aeronaves para su dispersión. Bajo estas condiciones, el uso de densidades de empaque 20,000 y 16,500 pupas (por caja PARC modificada y criba, respectivamente) y un tiempo de enfriamiento de 45 min a temperatura entre 2 a 4 °C, puede considerarse una opción operativamente viable, pues representa el manejo de cantidades adecuadas en el contexto de un programa regional, a la vez que reduce el daño y mantiene en condiciones favorables a los parasitoides.

AGRADECIMIENTOS

A la Biol. Flor de Ma. Moreno (Planta Moscafrut) por proporcionar el material biológico. A la Ing. Lucy Tirado, José Manuel Cruz Abado y Baltasar Ramos por las facilidades otorgadas para el desarrollo de las evaluaciones en el CEAFF Tapachula. Al M. en C. Javier Valle Mora (ECOSUR) por su ayuda en el análisis estadístico. Agradecemos la asistencia técnica de Jorge Pérez, Jimmy Verdugo, Javier Robrero y demás personal del Laboratorio de Control Biológico de la Subdirección de Desarrollo de Métodos, Programa Moscafrut SAGARPA-IIICA.

5. LITERATURA CITADA

- BAEZA, G., J. SIVINSKI, T. HOLLER, AND M. ALUJA. 2002. The effects of chilling on the fecundity and life span of mass-reared parasitoids (Hymenoptera: Braconidae) of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). *Biocontrol Science and Technology* 12: 205-215.
- BARCLAY, H. J. 1987. Models for pest control: Complementary effects of periodic releases of sterile pest and parasitoids. *Theoretical Population Biology* 32: 76-89.
- CANCINO, J. 2000. Procedimientos y fundamentos de la cría masiva de *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead), parasitoide de moscas de la fruta, pp. 415-424. En: Memorias del XIII Curso Internacional sobre Moscas de la Fruta. Programa Moscamed, DGSV-CONASAG-SAGAR, Metapa de Domínguez, Chiapas, México.
- CANCINO, J., O. P. LOPEZ, L. VILLALOBOS, P. HIPOLITO, J. L. QUINTERO Y L. MATTIACCI. 2006. Control de calidad en la cría masiva de *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae). Fundamentos y Procedimientos. DGSV-SAGARPA, México, D.F. 54 p.
- DOWELL, R. V., J. WORLEY, AND P. J. GOMES. 2005. Sterile insect supply, emergence, and release. pp 297-324. En: V.A. Dyck, J. Hendrichs and A.S. Robinson (eds.), *Sterile Insect Technique. Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*. IAEA. Springer. Netherlands.
- IAEA/FAO/USDA. 1998. *A Manual of Quality Control for Fruit Flies*. Viena Austria. 50 p.
- GREATHEAD, D.J. AND J. K. WAAGE. 1983. *Opportunities for Biological Control of Agricultural Pests in Developing Countries*. World Bank Technical Paper Number 11, Washington D.C. USA.
- HAJEK, A. 2004. *Natural enemies*. Cambridge University Press. 407 p.
- HARRIS, R. L., E. D. FRAZAR AND R. A. HOFFMAN. 1965. Chilling and others methods of immobilizing flies. *Journal of Economic Entomology*, 58: 379-380.

- HERNÁNDEZ, E., B. BRAVO, A. LÓPEZ, M. ROMERO Y P. MONTOYA. Efecto del alimento y el tiempo de enfriado en la longevidad y expectativa de vida de tres especies de moscas de la fruta (Diptera: Tephritidae) utilizadas en la Técnica del Insecto Estéril. *Folia Entomológica Mexicana* (Sometido)
- HOOPER, G. H. S. 1970. Use of carbon dioxide, nitrogen, and cold to immobilize adults of the Mediterranean fruit fly. *Journal of Economic Entomology*, 63: 1962-1963.
- KNIPLING, E.F. 1992. *Principles of Insect Parasitism Analyzed from New Perspectives*. Agriculture Handbook No. 693. ARS-UDA. Washington D.C., USA
- MONTOYA, P., P. LIEDO, B. BENREY, J. CANCINO, J.F. BARREIRA, J. SIVINSKI AND M. ALUJA. 2000. Biological control of *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae) in mango orchards through augmentative releases of *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae). *Biological Control* 18: 216-224.
- MONTOYA, P. Y J. CANCINO. 2004. El control biológico por aumento en moscas de la fruta. *Folia Entomológica Mexicana* 43: 257-270.
- MONTOYA, P., J. CANCINO, M. ZENIL, J. M. GUTIÉRREZ AND G. SANTIAGO. 2007. The augmentative biological control component in the Mexican national fruit fly campaign. 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.
- RUIZ, L., J. CANCINO, J. PÉREZ, E. GÓMEZ Y P. MONTOYA. 2007. Evaluación de métodos de empaque para la liberación de *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae), parasitoide de moscas de la fruta. pp. 440-444. In: E. G. Estrada, A. Equihua, C. Luna y J. L. Rosas (eds.). *Entomología Mexicana*, vol 6 (tomo 1).
- SALVATO, M., T. HOLLER, J. WORLEY AND J. STEWART. 2004. Efficacy of tower medfly eclosion systems. *Biocontrol Science and Technology*. 14: 77-80.
- SHELLY, T. E., T. C. HOLLER AND J. L. STEWART. 2006. Mating competitiveness of mass-reared males of the mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) from eclosion towers. *Florida Entomologist* 89 (3): 380-387.
- SIVINSKI, J. 1996. The past and potential of biological control of fruit flies. pp. 369-375. In: McPherson, B. and G. Steck (eds.). *Fruit Fly Pests. A World Assessment of their Biology and Management*. St. Lucie Press, Delray Beach, Florida.
- SIVINSKI, J., C. CALKINS., R. BARANOWSKI, D. HARRIS, J. BRAMBILA, J. DIAZ, R. BURNS, T. HOLLER AND G. DODSON. 1996. Suppression of a Caribbean fruit fly *Anastrepha suspensa* (Loew) (Diptera: Tephritidae) population through augmentative releases of the parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae). *Biological Control* 6: 177-185.
- SIVINSKI, J., F. JERONIMO AND T. HOLLER. 2000. Development of aerial releases of *Diachasmimorpha tryoni* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid that attacks the mediterranean fruit fly, *Ceratistis capitata* (Weidemann) (Diptera: Tephritidae), in the Guatemalan Highlands. *Biocontrol, Science and Technology* 10: 15-25.
- TURNOCK, W. J. AND P. G. FIELDS. 2005. Winter climates and coldhardiness in terrestrial insects. *European Journal of Entomology*, 102: 561-576.
- VILLASEÑOR, C. A. 1985. Comparación de tres sistemas de liberación aérea para mosca del Mediterráneo estéril, *Ceratistis capitata* (Wied.). Tesis. Universidad Autónoma de Chiapas, Área de Ciencias Agrícolas. Huehuetán, Chiapas. 95 pp.
- WONG, T., M. RAMADAN, D. MCINNIS, N. MOCHIZUKI, J. NISHITO AND J. HERR. 1991. Augmentative releases of *Diachasmimorpha tryoni* (Diptera: Tephritidae) populations in Kula, Maui, Hawaii. *Biological Control* 1: 2-7
- WONG, T. AND M. RAMADAN. 1992. Mass-rearing biology of larval parasitoids (Hymenoptera: Braconidae) of tephritid flies in Hawaii. In: Anderson, T. & N. Leppla (Eds.) *Advances in Insect Rearing for Research and Pest Management*. Westview Press, Boulder, Colorado, pp. 405-476.
- YONGGYUN, K. AND W. SONG. 2000. Effect of thermoperiod and photoperiod on cold tolerance of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environmental Entomology*, 29: 868-873.