

**Fecundidad de cf. *Lixophaga* (Diptera:
Tachinidae) y parasitismo artificial de
Metamasius quadrilineatus (Coleoptera:
Dryophthoridae) como forma alterna para su
producción masiva**

Margarita Susana García Gavilánez

ZAMORANO
Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria
Noviembre, 2005

ZAMORANO

Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria

**Fecundidad de cf. *Lixophaga* (Diptera:
Tachinidae) y parasitismo artificial de
Metamasius quadrilineatus (Coleoptera:
Dryophthoridae) como forma alterna para su
producción masiva**

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero Agrónomo en el Grado
Académico de Licenciatura

Presentado por

Margarita Susana García Gavilánez

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2005

La autora concede a Zamorano permiso para reproducir y distribuir copias de este trabajo para fines educativos. Para otras personas físicas o jurídicas se reservan los derechos de autor.

Margarita Susana García Gavilánez

Honduras
Noviembre, 2005

**Fecundidad de cf. *Lixophaga* (Diptera: Tachinidae) y
parasitismo artificial de *Metamasius quadrilineatus*
(Coleoptera: Dryophthoridae) como forma alterna para su
producción masiva**

Presentado por:

Margarita Susana García Gavilánez

Aprobado:

Alonso Suazo, Ph.D.
Asesor Principal

Abelino Pitty, Ph.D.
Encargado del Área de Fitotécnia

Ronald D. Cave, Ph.D.
Asesor

Abelino Pitty, Ph.D.
Director Interino de la Carrera de
Ciencia y Producción Agropecuaria

J. Howard Frank, Ph.D.
Asesor

George Pilz, Ph.D.
Decano Académico

Kenneth L. Hoadley, D.B.A.
Rector

DEDICATORIA

A Dios por haberme dado la fortaleza para siempre seguir adelante y la oportunidad de cumplir una de mis metas.

A mis padres Reynaldo y Margarita.

A mis hermanas Ingrid y Gaby.

AGRADECIMIENTOS

A Dios y mi Angelito que está en el cielo por guiar mi camino a cada instante y enseñarme a darle el verdadero valor a la vida.

A mis padres Reynaldo y Margarita por sus oraciones, apoyo, consejos, enseñanzas brindadas y por depositar toda su confianza en mí. Por que son un ejemplo de lucha, amor y humildad. Por nunca dejarme sola.

A mis hermanas Ingrid y Gaby por su amistad, cariño, palabras de aliento y por ayudarme a poner de pie cuando más lo necesité.

Al Dr. Alonso Suazo por su apoyo, dedicación y paciencia durante la elaboración de la investigación. Por ser un modelo de perseverancia y dedicación.

Al Dr. Ron Cave y al Dr. Howard Frank por permitirme trabajar en este proyecto. También a “Florida Bromeliad Society y Florida Park Services” por proporcionar el financiamiento.

Al equipo del laboratorio entomológico Dña. Rosa y Julio por su apoyo y amistad.

A Marlon por todo el tiempo compartido, las experiencias vividas, el apoyo, el cariño y amistad. Por dejar conmigo lo mejor de él.

A Karla Tinoco y Mariel Lezama, por su amistad incondicional.

A Verónica, Cristina y Andrea por todas esas cosas que nos hicieron aprender juntas y nos sacaron adelante. Por su amistad y comprensión.

A José María, Ma. Dolores, Ma. Eugenia, Ana Gissel, Rocío, Paola, Odelys, Ronald, Mario G., Esteban V. y Olban por todos los consejos, llantos, las risas y aventuras vividas.

A mis amigos de Zamorano por haber compartido conmigo parte de su vida, sus penas y alegrías durante estos cuatro años. Por que indudablemente son parte de una experiencia inolvidable.

RESUMEN

García, M. 2005. Fecundidad de cf. *Lixophaga* (Diptera: Tachinidae) y parasitismo artificial de *Metamasius quadrilineatus* (Coleoptera: Dryophthoridae) como forma alterna para su producción masiva. 19p.

En Florida existen 12 especies nativas de bromeliáceas, en su mayoría del género *Tillandsia*, que han sido declaradas en peligro de extinción por el ataque del picudo mexicano de las bromeliáceas, *Metamasius callizona* (Chevrolat) (Coleoptera: Dryophthoridae). En los bosques nublados aledaños a la Escuela Agrícola Panamericana El Zamorano, Honduras, se encontró a cf. *Lixophaga* (Diptera: Tachinidae) parasitando larvas de su hospedero natural *Metamasius quadrilineatus* Champion. La formación de un número de larvas neonatas activas en el tracto reproductivo de las moscas hembras puede ser observado a partir del sexto día después de su copulación, e indica que a partir del día 10 éstas se encuentran en mayor cantidad y libres del corion. El objetivo de esta investigación fue realizar un estudio de la fecundidad de cf. *Lixophaga* y realizar pruebas de parasitismo artificial de *M. quadrilineatus* como alternativa para producción masiva de cf. *Lixophaga*. El apareo de cf. *Lixophaga* ocurre en promedio a los 2.3 ± 1.3 días ($n=28$) después del nacimiento de los adultos. El 89% de parejas que copularon lo hicieron entre las 7:00 a.m. y las 13:00 p.m. Cuando se expuso larvas de *M. quadrilineatus* a moscas que tenían 2, 4, 6 u 8 días después de haber copulado, el parasitismo fue del 57% en la exposición a los 8 días de edad después de la cópula. Luego de disectar moscas a los 2, 4, 6 u 8 días después de haber copulado, se contabilizó los huevos y las larvas neonatas con y sin corión. La mayor cantidad de huevos estuvieron en moscas con 6 días después de cópula y a partir de los 8 días se observó presencia de larvas neonatas y menor número de huevos. Se evaluaron cuatro posibles formas de parasitismo artificial mediante la inoculación a larvas de picudo con una larva neonata, inoculación a larvas de picudo en alimento, inoculación mediante gotas de solución de 300 larvas neonatas 500 μ L de agua destilada, e inoculación por inmersión en solución de larvas neonatas.. El mayor parasitismo (73%) se observó en el tratamiento en el que se inocularon larvas de *M. quadrilineatus* con una larva neonata y se esperó hasta que penetraron para colocar al hospedero en el alimento. El parasitismo más bajo (27%) se obtuvo en el tratamiento en el que se colocó la larva neonata en el alimento o cerca de la larva del hospedero. El tiempo promedio de penetración de la larva neonata en la larva de picudo fue de 7.7 min. Pese a obtener un 73% de éxito el tratamiento de parasitismo artificial con una larva neonata, el tiempo promedio de realización por larva fue de 30 minutos.

Palabras clave: Bromeliáceas, corión, larva, *Metamasius callizona*, larva neonata,, parasitismo.

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Autoría.....	ii
Página de firmas.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Resumen.....	vi
Contenido.....	vii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1 General.....	3
2.2 Específicos.....	3
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	4
3.1. Localización.....	4
3.2. Colonias.....	4
3.2.1. Colonia de <i>M. quadrilineatus</i>	4
3.2.2. Colonia de cf. <i>Lixophaga</i>	5
3.3. Procedimientos.....	6
3.3.1 Fecundidad de cf. <i>Lixophaga</i>	6
3.3.1.1 Determinación del tiempo óptimo para larvipositar.....	6
3.3.1.2 Curva de gestación.....	7
3.3.2 Parasitismo artificial de cf. <i>Lixophaga</i> a <i>M. quadrilineatus</i>	8
3.4. Variables analizadas.....	10
3.4.1 Fecundidad de cf. <i>Lixophaga</i> :.....	10
3.4.2 Parasitismo artificial de cf. <i>Lixophaga</i> a <i>M. quadrilineatus</i>	10
3.5. Análisis estadístico.....	10
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	11
4.1 Fecundidad de cf. <i>Lixophaga</i>	11
4.1.1 Tiempo promedio de inicio de cópula.....	11
4.1.2. Porcentaje de parasitismo.....	12
4.1.3 Tiempo de desarrollo de larvas neonatas.....	12

4.1.4 Promedio de planidias por mosca.....	13
4.2 Parasitismo artificial de cf. <i>Lixophaga</i> a <i>M. quadrilineatus</i>	13
4.2.1 Porcentaje de parasitismo	13
4.2.2 Tiempo promedio de penetración de las larvas neonatas en larvas de picudo	14
4.2.3 Tiempo de realización de cada tratamiento para parasitismo artificial	15
5. CONCLUSIONES	16
6. RECOMENDACIONES	17
7. BIBLIOGRAFÍA	18
8. ANEXOS	19

INDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
Cuadro 1. Porcentaje de parasitismo en larvas de III estadio de <i>M. quadrilineatus</i> expuestas a los 2, 4, 6 y 8 días después de cópula de cf. <i>Lixophaga</i>	12
Cuadro 2. Porcentaje de parasitismo en cuatro tratamientos de parasitismo artificial a <i>M. quadrilineatus</i>	14

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Larvas neonatas de cf. <i>Lixophaga</i> vista en estereoscopio.....	7
Figura 2. Larvas neonatas de cf. <i>Lixophaga</i> penetrando en cutícula de una larva de III estadio de <i>M. quadrilineatus</i>	9
Figura 3. Frecuencia de apareamiento de cf. <i>Lixophaga</i>	11
Figura 4. Número de huevos y larvas neonatas de cf. <i>Lixophaga</i> a los 2, 4, 6 y 8 días después de cópula.....	13
Figura 5. Penetración de larva neonata de cf. <i>Lixophaga</i> en larva de <i>M. quadrilineatus</i> .	14
Figura 6. Tiempo de realización y porcentaje de parasitismo obtenido en cada tratamiento.....	15

INDICE DE ANEXOS

Anexo	Página
Anexo 1. Larvipositor de hembra cf. <i>Lixophaga</i>	19
Anexo 2. Larva neonata de cf. <i>Lixophaga</i> saliendo de larva de <i>M. quadrilineatus</i> para empupar.....	20
Anexo 3. Desarrollo del aparato reproductor de cf. <i>Lixophaga</i> a los 0 y 8 días después de cópula.....	21

1. INTRODUCCIÓN

En los parques y áreas naturales del sur de Florida existen 12 especies nativas de bromeliáceas, en su mayoría del género *Tillandsia*, de las cuales cinco han sido declaradas en peligro de extinción debido al ataque del picudo mexicano de las bromeliáceas, *Metamasius callizona* (Chevrolat) (Coleoptera: Dryophthoridae). Originario de México y Guatemala, fue reportado en Florida por primera vez en 1989 (Frank 1994). Desde entonces, se ha convertido en una plaga de importancia para las bromeliáceas de los parques y reservas del sur de Florida.

En los bosques nublados de las reservas biológicas de Uyuca, Montserrat y El Aguacate, aledaños a la Escuela Agrícola Panamericana El Zamorano, Honduras, se encontró una mosca, cf. *Lixophaga* (Díptera: Tachinidae) parasitando diferentes estadios larvales de su hospedero natural *Metamasius quadrilineatus* Champion, un picudo que ataca a las bromeliáceas nativas de Honduras.

La biología de *M. quadrilineatus* y *M. callizona* es parecida (Frank 1997). La hembra coloca los huevos en el parénquima de las hojas de las bromeliáceas de los cuales salen las larvas después de 8–10 días para posteriormente realizar un túnel en el tallo de la planta. El tiempo que transcurre en el desarrollo de los seis estadios larvales hasta llegar a la etapa de pupa es de ocho a diez semanas. Al llegar a la etapa de pupa la larva forma un capullo con material de la bromeliácea pasando alrededor de 14 días para que el adulto emerja (Álvarez 1997).

En estudios previos se realizaron pruebas de especificidad, y se determinó que la mosca cf. *Lixophaga*, parasita a *M. callizona* y por lo tanto, puede ser utilizada como un agente potencial de control biológico. En estos estudios también se determinó que los niveles de parasitismo gregario (más de una larva de mosca por larva de picudo) de cf. *Lixophaga* en *M. callizona* son significativamente superiores a los encontrados en *M. quadrilineatus* (Suazo 2004)¹.

Las hembras adultas de cf. *Lixophaga* se sienten atraídas a bromeliáceas dañadas por larvas del picudo y no por bromeliáceas sanas. Para la búsqueda de sus hospederos los parasitoides buscan huellas asociadas a estos, por lo general estas señales son químicas, como el olor de la planta o del huésped, olor del excremento liberado por el huésped (Cave 1995).

Chinwada *et al* (2004), determinaron que la formación de un número de larvas neonatas activas en el tracto reproductivo de las moscas puede ser observado a partir del sexto día

¹ Suazo A. 2004. Estimulación de *Lixophaga* sp. (entrevista personal). Zamorano, Honduras.

después de su copulación, y también indican que a partir del día 10 estas se encuentran en mayor cantidad y se han liberado del corion.

Todas las especies de tachínidos son endoparasitoides, principalmente de insectos que se encuentran expuestos al medio sobre follaje (Belshaw 1993). Las larvas de primer estadio con la facultad de moverse y buscar al hospedero hacen posible que las moscas parasiten a insectos ocultos (Gauld y Bolton 1988). Las hembras nunca llegan a tener contacto directo con el hospedero durante la oviposición o larviposición, estén o no ocultos sus hospederos. Esto incrementa la posibilidad de parasitismo gregario (Feener y Brown 1997).

La etapa larval de cf. *Lixophaga* se desarrolla dentro de la larva de *M. quadrilineatus* (endoparasitismo). En el campo larvas de picudo de III, IV y V estadio son parasitadas. El tiempo de permanencia dentro del hospedero es de 14–16 días; la etapa de pupa es de 18–21 días. En condiciones de laboratorio los adultos de cf. *Lixophaga* viven 20-22 días alimentadas con néctar de colibrí. Las hembras de cf. *Lixophaga* larvipositan posiblemente en la entrada del túnel hecho por las larvas de *M. quadrilineatus* para que posteriormente la o las larvas neonatas busquen a su huésped (Álvarez 1997).

En la mayoría de las especies las larvas parasitoides se ubican en tejidos específicos como ganglios nerviosos, cuerpo graso, glándulas, músculos, la hipodermis o entre membranas. Permanecen en contacto con el aire exterior por medio de su espiráculo en la parte posterior de la larva, formando un túnel respiratorio. Este túnel respiratorio se forma por la reacción de esclerotización de las células afectadas en el proceso de alimentación de la larva neonata (Salt 1968).

En realidad se conoce muy poco sobre la biología reproductiva de la mosca y su potencial reproductivo, así como la relación que existe entre la madurez reproductiva y el parasitismo. Convirtiéndose esto en punto clave para lo que se pretende lograr con el establecimiento de métodos de crianza masiva para la posible liberación de este parasitoide.

Tomando como base lo anterior, el objetivo de esta investigación fue realizar un estudio de la fecundidad de cf. *Lixophaga* y realizar pruebas de parasitismo artificial a *M. quadrilineatus* como forma alternativa para producción masiva de cf. *Lixophaga*; todo esto mediante la determinación de las tasas de parasitismo, tiempo de desarrollo de planidias y midiendo la eficiencia de los distintos métodos.

2. OBJETIVOS

2.1 GENERAL

Estudiar la fecundidad de cf. *Lixophaga* y parasitismo artificial a *M. quadrilineatus* como forma alterna para producción masiva de moscas.

2.2 ESPECÍFICOS

Establecer la curva de gestación de cf. *Lixophaga* para determinar el momento adecuado de mayor producción de larvas neonatas.

Determinar la concordancia de los datos de la curva de gestación con parasitismo real.

Evaluar cuatro métodos de parasitismo artificial a *M. quadrilineatus* para la producción masiva de cf. *Lixophaga*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LOCALIZACIÓN

La investigación fue realizada durante los meses de agosto a octubre de 2005 en las instalaciones del laboratorio de entomología de la Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, Honduras. Con un ambiente controlado, a una temperatura de 21 ° C y 78 % de humedad relativa.

3.2. COLONIAS

Para todas las pruebas se utilizó material de las colonias establecidas en el laboratorio, tanto del picudo como de las moscas; con un ambiente controlado, a una temperatura de 21° C, 78% de humedad relativa y un periodo aproximado de 12 horas luz.

3.2.1. Colonia de *M. quadrilineatus*

Para el establecimiento de la colonia de *M. quadrilineatus*, se emplearon huevos, larvas y adultos. Una parte del material fue tomado de las colonias establecidas en el laboratorio y otra parte fue material recolectado en los bosques nublados de Uyuca, Montserrat y El Aguacate aledaños a la Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano.

Los huevos se buscaron en las hojas de las plantas y se aislaron con una porción de hoja de bromeliácea de 5 × 5 mm. Los huevos en el pedazo de hoja fueron colocados en vasos de crianza (vasos de plástico transparente de 1 oz. capacidad) de forma individual, cubiertos con tapaderas plásticas selladas para evitar la deshidratación. Las larvas recién emergidas eran alimentadas con pequeñas porciones de tallo de bromeliácea (*Tillandsia standleyi* L.B. Smith) de 1 cm de grosor aproximadamente y se usó tapadera sellada con malla metálica para evitar la acumulación de líquido y proliferación de hongos dentro de los vasos.

Para los ensayos, se usaron larvas criadas en el laboratorio y larvas de 1 y 2° estadio del campo (larvas de 1 y 2° estadio no son parasitadas en el campo) Todas las larvas fueron alimentadas con porciones de tallo de *T. standleyi* de 1 cm. de grosor, colocados en vasos de crianza (vasos de plástico transparente de 1 oz. capacidad) de forma individual, cubiertos con tapaderas selladas con malla metálica

Al llegar al tercer estadio las larvas fueron pesadas de forma individual e inmediatamente empleadas en las pruebas respectivas.

Los adultos de *M. quadrilineatus* fueron separados en jaulas con plantas enteras de *T. standleyi* (lavadas con agua potable) para que se alimentaran y ovipositaran, y así mantener la colonia de picudos. De igual manera los adultos recién nacidos fueron colocados en una jaula, donde se les agregó bromeliáceas enteras (*C. floribunda*), se los dejó por dos semanas para que se aparearan y a partir de la semana 4 se empezó a coleccionar huevos de las hojas de las bromeliáceas, esto se hizo hasta la semana 12.

El alimento de los picudos se recolectó en los bosques nublados aledaños a la Escuela Agrícola Panamericana El Zamorano; consistía en plantas enteras de *T. standleyi* que se encontraban en el suelo y que no presentaban daño o síntomas de ataque del picudo. Al llegar al laboratorio eran debidamente lavadas con agua potable para eliminar suciedad y otros organismos. Para alimentar los adultos, se dejaban las plantas enteras; para alimentar las larvas se quitaban todas las hojas hasta dejar el tallo desnudo y se cortaban en porciones de 1 cm de grosor aproximadamente. Los tallos sin hojas fueron puestos en bolsas plásticas y almacenados a 4° C en un refrigerador.

3.2.2. Colonia de cf. *Lixophaga*

Para el establecimiento de la colonia de cf. *Lixophaga*, se recolectaron larvas en los bosques nublados aledaños a la Escuela Agrícola Panamericana El Zamorano, que se encontraran en III, IV y V estadio. Las larvas parasitadas fueron separadas de forma individual en vasos de crianza (vasos de plástico transparente de 1 oz. capacidad) con tapadera completamente cerrada para evitar deshidratación. Se esperó que las larvas de cf. *Lixophaga* salieran de la larva del picudo y empuparan para luego poner las pupas en platos petri (8 pupas/día por 20 días) cubierta con discos de papel toalla humedecido con agua.

Adultos recién emergidos fueron introducidos en una jaula grande de 1.5 × 1.5 × 1.2 m. En esta jaula se introducía cada dos días una bandeja con 30 larvas de *M. quadrilineatus* de III, IV y V estadio en tallos de bromeliáceas de 5 cm de grosor aproximadamente listas para exponerlas a las moscas y ser parasitadas, las bandejas se mantenían por 12 días.

De la producción de pupas de moscas, se tomaban los adultos recién emergidos, se procedía a sexarlas según la forma de su abdomen y de acuerdo a la cantidad de moscas (hembras y machos en igual cantidad) que se necesitaba para cada prueba o tratamiento se liberaban en jaulas entomológicas de 35 × 35 × 35 cm.

Las moscas de la colonia establecida y las utilizadas en las distintas pruebas eran alimentadas con néctar para colibrí y agua colocados de forma separada en vasos de crianza con mechas de algodón.

Es importante mencionar que para todos los tratamientos al cabo del tiempo de exposición de las larvas de picudo a las moscas, se sacaban las larvas de la jaula y cada dos días se cambiaron los alimentos observando y monitoreando los cambios en las larvas.

Según el desarrollo del estudio las larvas que no resultaron parasitadas fueron colocadas según su estadio (por lo general V, VI estadio o pupa) con el resto de la colonia de *M. quadrilineatus* que se mantiene en el laboratorio.

Las larvas que resultaron parasitadas fueron separadas, se les retiró el alimento y se cambió la tapadera cubierta de malla por una completamente cerrada para evitar deshidratación; al momento en que empuparon las planidias (color anaranjado) se las colocó de forma individual en un plato petri cubierta con papel toalla humedecido con agua. Se registraron fechas de emergencia de la planidia, empupado y emergencia del adulto, también el peso de la pupa y el sexo de la mosca.

3.3. PROCEDIMIENTOS

3.3.1 Fecundidad de cf. *Lixophaga*

Para determinar la edad óptima de cf. *Lixophaga* para parasitismo, se emplearon larvas de *M. quadrilineatus* y adultos de cf. *Lixophaga* de las colonias establecidas. Para establecer la curva de fecundidad se elaboraron dos pruebas:

3.3.1.1 Determinación del tiempo óptimo para larvipositar

Se utilizaron seis moscas (3 hembras y 3 machos) de la misma edad que fueron colocadas al nacer en una jaula entomológica con marcos de madera y paredes de malla metálica (35 × 35 × 35 cm). En cada réplica se tomaron datos de las fechas en que las parejas se apareaban después de nacer.

A los 2, 4, 6 y 8 días después del día de copula (DDC), se introdujeron en la jaula entomológica 6 larvas de picudo de tercer estadio. Al llegar al tercer estadio las larvas previamente pesadas de forma individual fueron separadas y colocadas en el alimento (porciones de tallo de *T. standleyi* de 1 cm. de grosor) por tres días en vasos de crianza con tapaderas selladas con malla metálica para después ser expuestas sin tapaderas por dos días a las moscas en una jaula entomológica de 35 × 35 × 35 cm. Se realizaron dos réplicas por cada tratamiento (2, 4, 6 y 8 DDC).

Las larvas parasitadas fueron separadas, se les retiró el alimento y se cambió la tapadera cubierta de malla por una completamente cerrada para evitar deshidratación; al momento en que empuparon las larvas de las moscas (color anaranjado) se las colocó de forma individual en un plato petri cubierta con papel toalla humedecido con agua. Se registraron fechas de emergencia de la larva neonata, empupado y emergencia del adulto, también el peso de la pupa y el sexo de la mosca.

3.3.1.2 Curva de gestación

Para esta segunda prueba, se utilizaron seis moscas (3 hembras y 3 machos) de la misma edad tomadas de la colonia establecida en el laboratorio, dichas moscas fueron colocadas al nacer en una jaula entomológica similar a la anteriormente descrita. A los 2, 4, 6 y 8 días después del día de copula (DDC) se disectó a las hembras bajo un estereoscopio. Con mucho cuidado se mato cada hembra sin destruir su abdomen, se colocó la mosca en un plato de disección con un poco de agua para evitar la deshidratación de los órganos. Se separó delicadamente el abdomen del resto del cuerpo y luego con la ayuda de pinzas finas se extrajo todo el tracto reproductivo quedando expuestos los huevos y las larvas neonatas. Se procedió a contar el número de huevos y larvas neonatas presentes en cada hembra según el tratamiento (2, 4, 6 y 8 DDC), para de esta manera observar el desarrollo reproductivo de las moscas (Figura 1).

Para el conteo se definió como larva neonata a la larva que ya presentaba mandíbula y ésta podía estar aún o no en el corion (membrana que cubre al huevo).

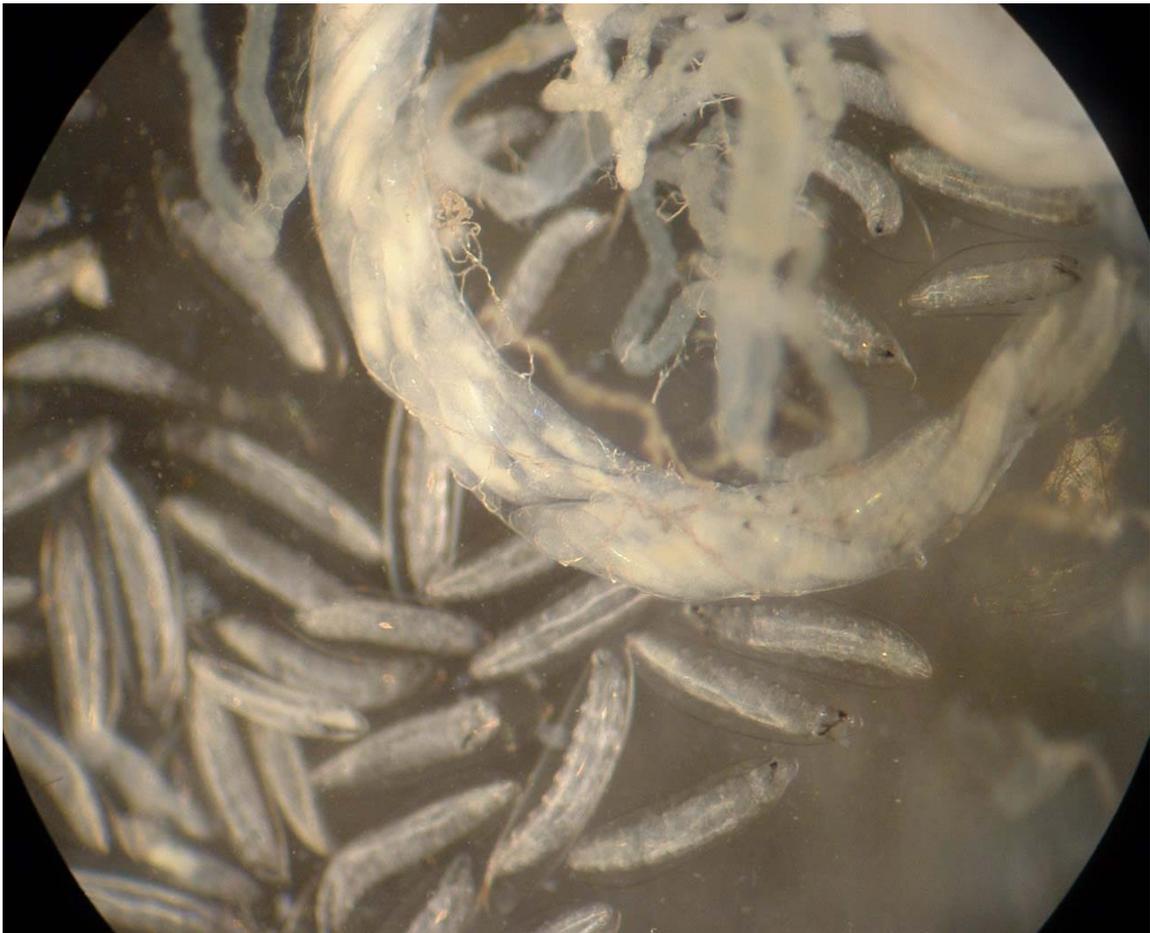


Figura 1. Larva neonata de cf. *Lixophaga* vista en estereoscopio.

3.3.2 Parasitismo artificial de cf. *Lixophaga* a *M. quadrilineatus*

Ha sido difícil asegurar tasas altas de parasitismo para mantener una colonia estable de moscas, ya que se desconocía con exactitud cuál era el mecanismo que utilizaba la larva neonata para ingresar a la larva de picudo y cuánto tiempo luego de ser larvopositada, la larva de picudo era parasitada. Con base en esto, se decidió utilizar los resultados obtenidos en la prueba de fecundidad, de esta manera conociendo la edad óptima en las cuales las moscas alcanzan la mayor producción de larvas neonatas se realizaron cuatro tratamientos, con 15 repeticiones. Al igual que las pruebas anteriormente descritas se utilizaron larvas de tercer estadio de *M. quadrilineatus* y hembras grávidas de cf. *Lixophaga* de las colonias establecidas en el laboratorio, las moscas tenían 8 días de edad después de observada la cópula. Para cada tratamiento se utilizaron 15 larvas de tercer estadio de *M. quadrilineatus* previamente pesadas en una balanza de precisión de forma individual.

Las larvas neonatas utilizadas para todos los tratamientos fueron extraídas de las moscas grávidas. Con la ayuda de un estereoscopio se disectaron las moscas con pinzas de disección se las mató con mucho cuidado, luego en un plato de disección se colocaron unas gotas de agua destilada para evitar la deshidratación de los órganos y así se precedió a separar el abdomen del resto del cuerpo para luego quitar todo el exoesqueleto y dejar expuesto el tracto reproductivo. A continuación se extrajeron las larvas neonatas activas con y sin corion. Así:

Tratamiento 1: Inoculación individual de larvas de picudo con una larva neonata de cf. *Lixophaga*.

Cada larva de picudo fue colocada bajo el estereoscopio y con un pincel muy fino se tomó una larva neonata y se la colocó sobre la cutícula de la larva de picudo. Se tomó el tiempo que tardó en introducirse en el hospedero y al mismo tiempo se humedecía con el pincel la larva de picudo sin tocar el sector donde se encontraba la larva neonata para que el agua llegara por capilaridad y la planidia no se deshidrate. Debido a su tamaño, las planidias se deshidratan muy fácilmente cuando no se les provee agua y son expuestas a las cutículas de las larvas de picudo. Una vez que la larva neonata se introducía (Figura 2), la larva de picudo era colocada en un tallo de bromelia de 5 cm de ancho aproximadamente en un vaso de crianza que luego era cubierto con una tapadera plástica sellada con malla metálica para evitar acumulación de líquidos y proliferación de hongos. El procedimiento se realizó para cada larva.



Figura 2. Larva neonata de cf. *Lixophaga* penetrando la cutícula de una larva de III estadio de *M. quadrilineatus*.

Tratamiento 2: Inoculación individual de larvas de picudo en tallos de bromelia con una larva neonata de cf. *Lixhopaga*.

Se colocó las larvas de picudos en tallos de bromeliácea de 5 cm aproximadamente de grosor, en vasos de crianza de manera individual. Cuando las larvas habían comenzado a realizar la galería en el tallo, y se encontraban prácticamente dentro del tallo, se colocó una larva neonata con un pincel muy fino en cada larva de picudo. Las larvas neontas fueron puestas directamente encima de la larva o en el tallo al lado de la larva. Inmediatamente después de esto se cubrió los vasos con tapaderas selladas con malla metálica. Con esto se pretendía simplificar el procedimiento de parasitismo al no tener que aplicar agua alrededor de la planidia para evitar deshidratación.

Tratamiento 3: Inoculación de larvas de picudo con gotas de solución de de larvas neonatas.

Con las larvas neonatas obtenidas de aproximadamente cinco moscas grávidas (300 aproximadamente) se hizo una solución de planidias en 500 μ L de agua destilada. Con la ayuda de una pipeta se puso una gota de la solución en cada larva de picudo. Las larvas se encontraban en tallos de bromeliácea en vasos de crianza individuales. Una vez depositada la gota se cubrió los vasos con tapaderas selladas con malla metálica.

Tratamiento 4: Inoculación de larvas de picudo por inmersión en solución de Larvas neonatas.

Al igual que el tratamiento anterior con las larvas neonatas obtenidas (300 aproximadamente) se realizó una solución de larvas neonatas en 500 μ L de agua destilada. Las larvas de picudo se sumergieron en esta solución de forma individual por 5 segundos, luego con la ayuda de pinzas suaves las larvas fueron colocadas en pedazos de tallo de

bromeliácea en vasos de crianza y posteriormente cubiertos con tapaderas selladas con malla metálica.

En todos los tratamientos cada tres días se observó las larvas bajo el estereoscopio y se cambió el alimento, esto se realizó hasta observar parasitismo. Se determinó el tiempo total para parasitar a las 15 larvas de picudos en cada método y se usó esto para estimar un promedio de tiempo invertido por larva de picudo como medida de eficiencia del método.

3.4. VARIABLES ANALIZADAS

3.4.1 Fecundidad de cf. *Lixophaga*:

- Tiempo promedio de inicio de cópula
- Porcentaje de parasitismo
- Tiempo de desarrollo de larvas neonatas
- Promedio de planidias por mosca

3.4.2 Parasitismo artificial de cf. *Lixophaga* a *M. quadrilineatus*

- Porcentaje de parasitismo
- Tiempo promedio de penetración de las larvas neonatas en larvas de picudo
- Tiempo de realización de cada tratamiento para parasitismo artificial

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa estadístico SAS (Statistical Analysis System 2003). Con un Diseño Completamente al Azar (DCA) con cuatro tratamientos y 15 repeticiones para cada tratamiento. Para la separación de medias se realizó la prueba DUNCAN con una probabilidad ≤ 0.05 .

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 FECUNDIDAD DE cf. *Lixophaga*:

4.1.1 Tiempo promedio de inicio de cópula

El apareo de cf. *Lixophaga* ocurre en promedio a los 2.3 ± 1.3 días ($n=28$) después del nacimiento de los adultos. En el laboratorio, el 89% de parejas copularon entre las 7:00 am y las 13:00 pm (Figura 3). Si se compara este resultado con los obtenidos por Álvarez (1997) se puede ver que indica datos de horas de cópula a las 9:30 am con una duración de 23 minutos de cópula. Lo que indica que este dato está dentro del rango obtenido en este estudio.

Álvarez (1997) también señala que durante el cortejo el macho realiza vuelos cortos alrededor de la hembra, moviendo sus patas y alas constantemente, el macho se ubica sobre la hembra por dos segundos repetidamente hasta que finalmente copulan.

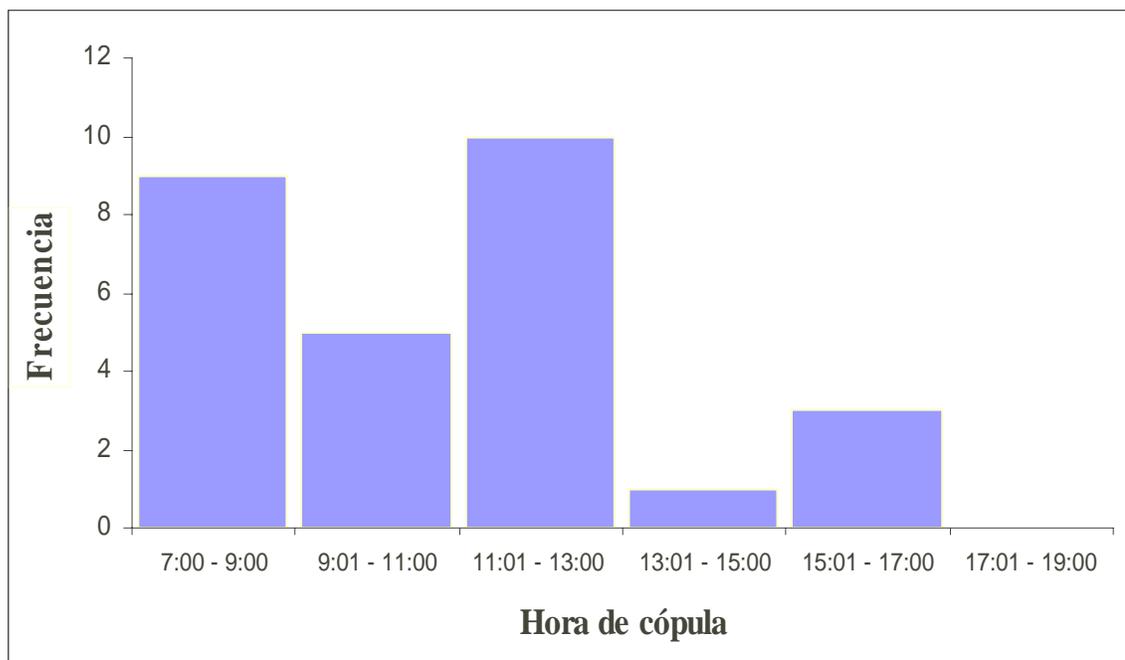


Figura 3. Frecuencia de apareamiento de cf. *Lixophaga*.

4.1.2. Porcentaje de parasitismo

En la primera prueba, en la que se expuso larvas de *M. quadrilineatus* a moscas que tenían 2, 4, 6 y 8 días después de haber copulado, el parasitismo fue del 57 % (n=6) cuando las larvas fueron expuestas a moscas que tenían 8 días de edad después de cópula. No se encontró parasitismo cuando las moscas tenían 2, 4 y 6 días después de copula (Cuadro 1).

Cuadro 1. Porcentaje de parasitismo en larvas de III estadio de *M. quadrilineatus* expuestas a los 2, 4, 6 y 8 días después de cópula de cf. *Lixophaga*.

Días después de cópula (DDC)	Larvas (n)	Peso larva de picudo (mg)	Parasitismo (%)
2	12	36.1	0 ^{b∞}
4	12	25.2	0 ^b
6	12	24.9	0 ^b
8	12	22.2	57 ^a

[∞] Letras distintas en la misma columna muestran diferencia estadística.

Un sin número de razones pueden ser la causa para que cf. *Lixophaga* presente este patrón en el desarrollo de su vida reproductiva, siendo talvez los estímulos que reciben las hembras al estar en contacto con los machos, el estímulo por parte del hospedero y/o los volátiles de las plantas descompuestas los que aceleran la producción de huevos y/o la maduración de las planidias.

Anzaldo (2004) señala que observó parasitismo cuando expuso las larvas de picudo a los 4 y 5 después de cópula, sin embargo indica también que uno de los motivos por los que no se obtuvo el parasitismo esperado fue talvez porque un día de exposición no era suficiente y/o por el estrés al que las moscas eran sometidas al ser sexadas y transferidas a las jaulas entomológicas. El periodo de ocho días es por lo tanto necesario para que un huevo llegue a desarrollarse en una larva neonata activa, lista para parasitar larvas de picudos.

4.1.3 Tiempo de desarrollo de larvas neonatas

En las moscas disectadas en el laboratorio se observó huevos en moscas de hasta 6 días después de cópula y se tuvo la presencia de larvas neonatas en el día 8 con y sin corion (listas para ser larvipositadas).

Según Clausen (2004), el período de gestación de algunos tachínidos es de 8 a 14 días. Al final del período de gestación, la mayoría de larvas neonatas pueden estar listas para ser

larvipositadas o bien el desarrollo embrionario puede ser bajo y solo las larvas neonatas que están cerca de la abertura genital (larvipositor) se encuentren maduras (Chinwada *et al* 2004).

4.1.4 Promedio de planidias por mosca

En la segunda prueba, en la que se disectó moscas a los 2, 4, 6 y 8 días después de haber copulado y se contabilizó tanto los huevos como las larvas neonatas con y sin corion, se observó que la mayor cantidad de huevos están en moscas con 6 días después de cópula y a partir de los 8 días se observó presencia de larvas neonatas disminuyendo el número de huevos (Figura 4).

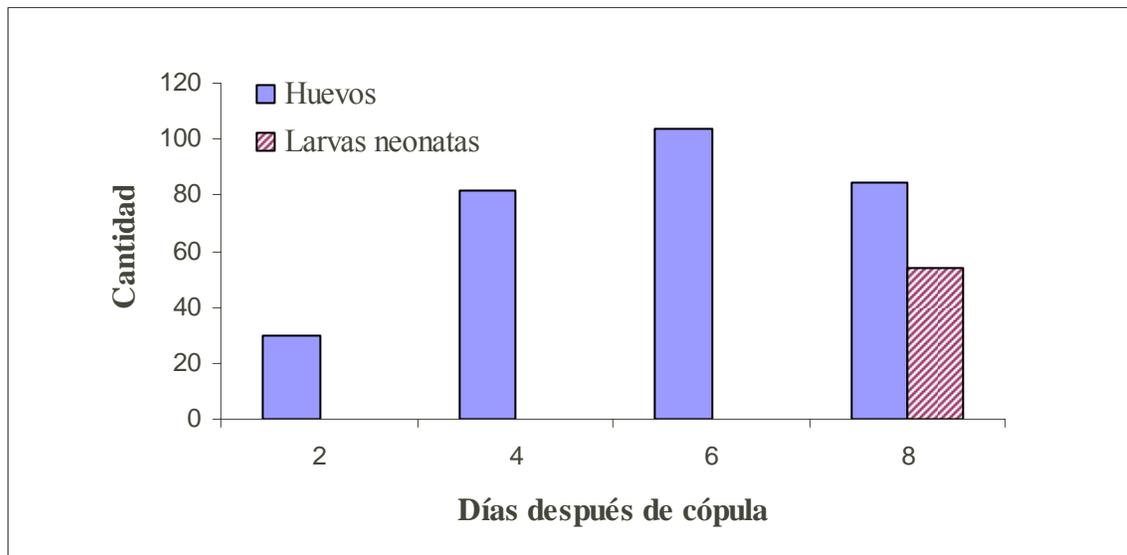


Figura 4. Número de huevos y larvas neonatas de cf. *Lixophaga* a los 2, 4, 6 y 8 días después de la cópula.

4.2 PARASITISMO ARTIFICIAL DE cf. *Lixophaga* a *M. quadrilineatus*

4.2.1 Porcentaje de parasitismo

Se encontró el mayor parasitismo (73.3%) en el tratamiento 1, donde se inoculó larvas de *M. quadrilineatus* con una larva neonata y se esperó hasta que esta penetre para colocar al hospedero en el alimento. Mientras que el parasitismo más bajo (26.7%) se obtuvo en el segundo tratamiento en el que se colocó la larva neonata en el alimento o cerca de la larva del hospedero. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($P < 0.05$) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Porcentaje de parasitismo en cuatro tratamientos de parasitismo artificial a *M. quadrilineatus*.

Tratamientos (TRT)	Larvas (n)	Peso (mg)	Parasitismo (%)
1	13	39.3 ^{a∞}	76.9 ^{a∞}
2	15	31.2 ^b	26.6 ^b
3	13	27.6 ^b	69.2 ^a
4	14	19.4 ^c	57.1 ^{ab}

[∞] Letras distintas en la misma columna muestran diferencia estadística.

TRT 1. Inoculación individual de larvas de picudo con una larva neonata de cf. *Lixophaga*.

TRT 2. Inoculación individual de larvas de picudo en tallos de bromeliácea con una planidia de cf. *Lixhopaga*.

TRT 3. Inoculación de larvas de picudo con gotas de solución de larvas neonatas.

TRT 4. Inoculación de larvas de picudo por inmersión en solución de larvas neonatas.

4.2.2 Tiempo promedio de penetración de las larvas neonatas en larvas de picudo

El tiempo promedio de penetración de la larva neonata en la larva de picudo fue de 7.7 ± 4.7 minutos ($n = 15$). Es importante mencionar que en algunas de las replicas se tuvo que esperar más de 10 minutos para que estas ingresen el tiempo osciló entre 3 a 30 minutos. (Figura 5).



Figura 5. Penetración de larva neonata de cf. *Lixophaga* en larva de *M. quadrilineatus*.

4.2.3 Tiempo de realización de cada tratamiento para parasitismo artificial

Para la elaboración de cada tratamiento se observó una mayor eficiencia en los tratamientos 3 y 4 los que requieren 10 y 9 minutos por larva, comparado con el tratamiento 1 donde se necesitó un promedio de 30 minutos por larva, siendo éstas diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, pese a obtener un 73% de éxito en el tratamiento 1 el tiempo promedio de realización por larva fue de 30 minutos, lo que hace pensar que tan rentable puede ser usar este método para producción a gran escala, así como la posibilidad de buscar nuevas opciones de parasitismo artificial, en los que se puedan integrar eficiencia en tiempo de realización y en larvas parasitadas por tratamiento (Figura 6).

La razón del parasitismo artificial es abrir la puerta ante la posibilidad de realizar pruebas que verifiquen que la mosca parasita a *M. callizona* criado en piña. Ya que lo que se busca es implementar criaderos masivos en Florida para el control del picudo.

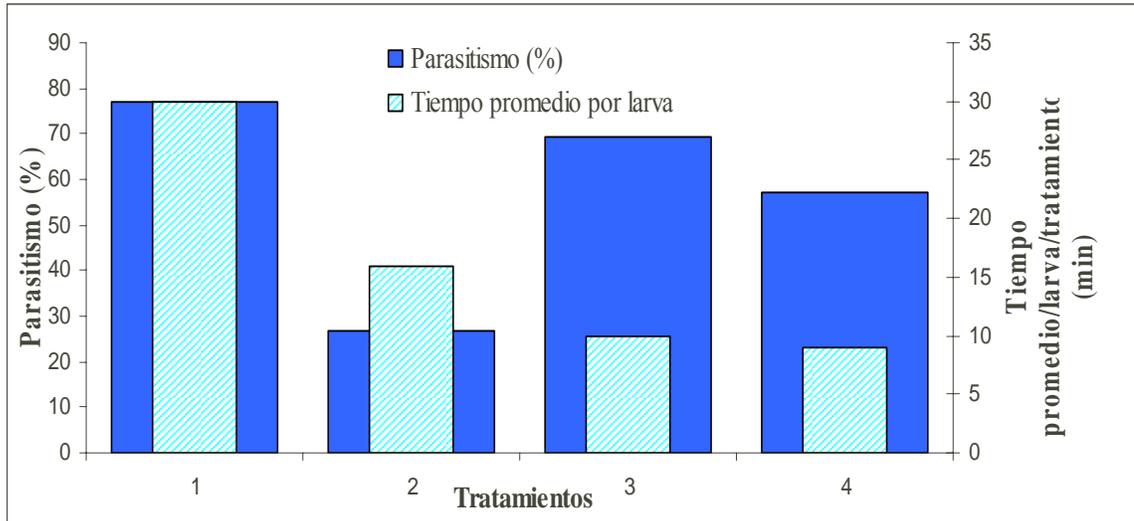


Figura 6. Tiempo de realización y porcentaje de parasitismo obtenido en cada tratamiento. Tratamiento 1. Inoculación individual de larvas de picudo con una larva neonata de cf. *Lixophaga*. Tratamiento 2. Inoculación individual de larvas de picudo en tallos de bromeliácea con una larva neonata de cf. *Lixhopaga*. Tratamiento 3. Inoculación de larvas de picudo con gotas de solución de larvas neonatas. Tratamiento 4. Inoculación de larvas de picudo por inmersión en solución de larvas neonatas.

5. CONCLUSIONES

Se determinó que el tiempo promedio de cópula de cf. *Lixophaga* es de 2.3 días, así como las horas que prefieren los adultos para aparearse es entre las 7:00 am y las 13:00 pm.

Se encontraron larvas neonatas en las hembras de cf. *Lixophaga* a los 8 días después de la cópula, al día 6 sólo se encontraron huevos.

La mayor producción de huevos en hembras de cf. *Lixophaga* se observan en el día 6 después de la cópula.

La inoculación de larvas de *M. quadrilineatus* con una larva neonata de cf. *Lixophaga* en la cutícula fue el tratamiento que tuvo mayor parasitismo (73%).

El tiempo promedio de penetración de una larva neonata en su hospedero es de 7.7 minutos.

La inoculación de *M. quadrilineatus* con gotas de solución de larvas neonatas mostró ser el tratamiento más eficiente en cuanto a tiempo de realización.

6. RECOMENDACIONES

Utilizar hembras con un mínimo de 8 días de edad después de cópula para incrementar y asegurar parasitismo así como para extraer larvas neonatas e inocular larvas de picudo para la producción masiva de cf. *Lixophaga*.

Estudiar el efecto de la concentración de larvas neonatas en la solución de larvas neonatas para parasitismo artificial.

Estudiar la eficacia de estos métodos en *M.callizona* y en otras especies de picudos.

Estudiar capacidad de penetración de larvas neonatas en larvas de picudo de diferentes estadios.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez, D. 1997. Biología reproductiva y métodos de crianza en laboratorio de *Admontia* sp. (Diptera: Tachinidae) parasitoide de *Metamasius quadrilineatus* champion (Coleoptera: Curculionidae). Tesis Ing Agr. Escuela Agrícola Panamericana. Honduras. 41p
- Anzaldo, A. 2004. Biología de *Lixophaga* sp. (Diptera: Tachinidae), un agente de control biológico del picudo de las bromelias *Metamasius quadrilineatus* (Coleoptera: Curculionidae). Tesis Ing. Agr. Escuela Agrícola Panamericana. Honduras. 17p
- Belshaw, R. 1968. Life history characteristics of Tachinidae (Diptera) and their effect on polyphagy. *In*: Hawkins, B.A; Sheehan, W. (eds.). Parasitoid Community Ecology. Oxford University Press, Oxford, G.B. 145:162p
- Cave, R. 1995. Manual para la enseñanza del control Biológico en América Latina. Zamorano – Honduras. 187 p
- Chinwada, P., Overholt, W., Omwega, C. y Mueke, J. 2004. Biology of *Sturmiopsis* parasitica (Diptera: Tachinidae) and Suitability of Three Cereal Stem Borers (Lepidoptera: Crambidae, Notuidae) for its Development. *Annals of the Entomological Society of America*. 97.(1): 153-160
- Clausen, C. 1940. Entomophagous Insects. McGraw-Hill. New York, NY. 688p
- Feener, D. y Brown, B. 1997. Diptera as Parasitoids. *Annual Review of Entomology*. 42: 97-73p
- Gauld, I. y Bolton, B. 1988. The Hymenoptera. Oxford University Press. London.
- Frank, J.H. 1994. *Metamasius callizona* (a Status Report) Florida Council of Bromeliad Societies Newsletter. 14 (1): 2-3
- Frank, J.H. 1997. Protection of Florida native bromeliads by control of *Metamasius callizona*. *Journal of the Bromeliad society* 47: 60-64
- Salt, G. 1968. The resistance of insect parasitoids to the defence reactions of their hosts. *Biological Reviews*. 43: 200-232p

8. ANEXOS

Anexo 1. Larvipositor de hembra cf. *Lixophaga*.



Anexo 2. Larva neonata de cf. *Lixophaga* saliendo de larva de *M. quadrilineatus* para empupar.



Anexo 3. Desarrollo del aparato reproductor de cf. *Lixophaga* a los 0 y 8 días después de cópula.

