

**BIOLOGÍA REPRODUCTIVA Y ANÁLISIS
ELECTROFORÉTICO DE *DIADEGMA*
INSULARE Y *DIADEGMA SEMICLAUSUM*
(HYMENOPTERA: ICHNEUMONIDAE)**

María Yolanda Castelo Ipiales

ZAMORANO
Departamento de Protección Vegetal

Abril 1999

**BIOLOGÍA REPRODUCTIVA Y ANÁLISIS
ELECTROFORÉTICO DE *DIADEGMA*
INSULARE Y *DIADEGMA SEMICLAUSUM*
(HYMENOPTERA: ICHNEUMONIDAE)**

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

presentado por

María Yolanda Castelo Ipiales

Zamorano, Honduras

Abril 1999

El autor 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.

María Yolanda Castelo Ipiales

Zamorano, Honduras
Abril, 1999

Biología reproductiva y análisis electroforético de *Diadegma insulare* y *Diadegma semiclausum* (Hymenoptera: Ichneumonidae)

Presentado por:

María Yolanda Castelo Ipiales

Aprobada:

Ronald Cave, Ph. D.
Asesor Principal

Allan Hruska, Ph. D.
Jefe de Departamento

M. Mercedes Doyle, Ph. D.
Asesor

Antonio Flores, Ph. D.
Decano Académico

Allan Hruska, Ph. D.
Asesor

Keith Andrews, Ph. D.
Director

M. Mercedes Doyle, Ph. D.
Coordinador PIA

DEDICATORIA

A mis padres, Aida y Téofilo. A mis hermanos Pepe, Danilo y María Elena , por la confianza y apoyo que me ofrecieron durante mi estadía en Zamorano.

AGRADECIMIENTOS

A mis papis y hermanos gracias por haber estado siempre apoyándome y animándome a continuar.

A Gina por ser mi segunda hermana. Por estar junto a mi en las buenas y en las malas.

A la familia Canales Hernández por haber sido mi familia en Honduras.

A mi asesor principal el Dr. Ronald Cave por la paciencia y confianza que siempre me tuvo.

A mis amigos: Gina, Kenia, Mildrelena, Susana y Jorge, por la amistad sincera y buenos momentos compartidos durante este año.

A Luis y Nuris por ayudarme siempre que lo necesité.

A Julio y doña Marta por el apoyo brindado durante este año de trabajo.

AGRADECIMIENTOS A PATROCINADORES

A mis papis por haber financiado mis estudios durante estos cuatro años.

A la Red Colaborativa para la Investigación y Desarrollo de Hortalizas de Centro América (REDCAHOR) y AGEAP por el financiamiento otorgado para financiar mi cuarto año.

RESUMEN

Castelo, Yolanda. 1999. Biología reproductiva y análisis electroforético de *Diadegma insulare* y *Diadegma semiclausum* (Hymenoptera: Ichneumonidae). Proyecto Especial del Programa de Ingeniero Agrónomo, El Zamorano, Honduras.

Una de las principales plagas del repollo es la palomilla dorso de diamante (PDD), *Plutella xylostella*, que es una plaga cosmopolita defoliadora. Su control se ha basado principalmente en la aplicación de plaguicidas. Una alternativa para su control es el control biológico, con enemigos naturales exóticos y nativos. Los objetivos de la investigación fueron: estudiar la biología reproductiva de los parasitoides *Diadegma semiclausum* y *Diadegma insulare*, originarios de Europa y América, respectivamente, realizar un análisis electroforético y establecer una cría de los parasitoides. Se realizaron cruzamientos reproductivos inter e intraespecíficos. Hembras de *D. insulare* copularon con machos de *D. semiclausum*. Las crías fueron fértiles pero de menor tamaño que sus padres, y no se encontraron diferencias significativas en el tiempo a cópula y el tiempo de cópula de los cruces inter e intraespecíficos. Se encontraron diferencias en el tamaño de los parasitoides, siendo *D. semiclausum* más grande que *D. insulare*. Estos resultados sugieren que poblaciones de este organismo se separaron geográficamente en algún momento, convirtiéndose en dos subespecies que se adaptaron y evolucionaron de acuerdo a las condiciones ambientales de cada zona. Se trataron de establecer y comparar los perfiles de proteína de las dos especies por medio de un análisis electroforético, pero no fue posible por el hecho que no se tiene un protocolo específico y un control positivo para *Diadegma*. Se corrieron ocho geles, en dos de las cuales se observaron bandas que tiñeron levemente, pero no fueron suficientes para llegar a una conclusión. Se intentó establecer una cría de estos parasitoides, pero no fue posible debido a problemas en la cría del hospedero PDD.

Palabras clave: parasitoide, repollo, PDD, control biológico.

NOTA DE PRENSA

Control Biológico: Una alternativa para el control de la palomilla dorso de diamante *Plutella xylostella*

Una de las limitantes del cultivo del repollo es la palomilla dorso de diamante, *Plutella xylostella*, una plaga defoliadora, que es controlada principalmente con insecticidas. Una alternativa para su control es el control biológico con enemigos naturales (parasitoides) nativos y exóticos.

Diadegma insulare es un parasitoide que se encuentra en América, pero no controla eficientemente la plaga. El parasitoide europeo *Diadegma semiclausum*, es capaz de controlar este plaga. En otros continentes se ha introducido y ha tenido éxito.

Observando el éxito que se ha tenido con *D. semiclausum* en otros continentes, hay un interés por introducirlo en América. Por esto se realizó en la Escuela Agrícola Panamericana (Zamorano) un estudio para determinar cual es el comportamiento reproductivo de estas dos especies. Este estudio se llevó a cabo para determinar si es recomendable la introducción de *D. semiclausum*.

Se realizaron cruzamientos reproductivos para determinar el impacto que tendría sobre *D. insulare*. También se intentó comparar perfiles electroforéticos y establecer un sistema de crianza masiva.

Los resultados del estudio nos hacen suponer que *D. insulare* y *D. semiclausum* no son dos especies, sino subespecies. Las crías resultantes de los cruces interespecíficos son fértiles, además, no se encontraron diferencias significativas en el tiempo de cópula y en el tiempo a cópula de los cruces interespecíficos e intraespecíficos. Estos hechos nos hacen pensar que poblaciones de este organismo se separaron geográficamente en algún momento, convirtiéndose en dos subespecies que se adaptaron y evolucionaron de acuerdo a las condiciones climáticas de cada zona. Este hecho pudo dar como resultado las diferencias morfológicas entre ellas.

No se pudieron comparar los perfiles ya que no se tiene un protocolo específico para realizar un análisis electroforético con *Diadegma*.

Para la crianza masiva de los parasitoides primero se tiene que tener una cría del hospedero en este caso *P. xylostella*. No se pudo establecer la cría de parasitoides por problemas en la cría de *P. xylostella*.

CONTENIDO

	página
Portadilla.....	i
Autoria.....	ii
Página de firmas.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Agradecimientos a Patrocinadores.....	vi
Resumen.....	vii
Nota de Prensa.....	viii
Contenido.....	ix
Indice de cuadros.....	xi
Indice de figuras.....	xii
Indice de anexos.....	xiii
 I. INTRODUCCION.....	 1
 II. REVISION DE LITERATURA.....	 5
2.1 Biología de <i>Diadegma insulare</i> (Cresson).....	5
2.1.1 Clasificación y distribución.....	5
2.1.2 Ciclo de vida y comportamiento.....	5
2.2 Biología de <i>Diadegma semiclausum</i> (Hellén).....	6
2.2.1 Clasificación y distribución.....	6
2.2.2 Ciclo de vida y comportamiento.....	7
2.3 Electroforesis.....	8
2.3.1 Gel de poliacrilamida (Polyacrilamide Gel Electrophoresis PAGE).....	9
 III. MATERIALES Y METODOS.....	 10
3.1 Cruces interespecíficos.....	10
3.1.1 Producción de plantas hospederas de PDD.....	10
3.1.2 Preparación de láminas de oviposición.....	10
3.1.3 Preparación de cámara de oviposición.....	11
3.1.4 Producción de larvas de PDD.....	11
3.1.4.1 Obtenidas en laboratorio.....	11
3.1.4.2 Material del campo.....	11

3.1.5	Producción de parasitoides.....	11
3.1.6	Construcción de jaulas Cherry.....	12
3.1.7	Cruces interespecíficos.....	12
3.1.7.1	Hembra <i>D. semiclausum</i> x macho de <i>D. insulare</i>	12
3.1.7.2	Hembra <i>D. insulare</i> x macho <i>D. semiclausum</i>	13
3.1.7.3	Cruces intraespecíficos.....	14
3.1.8	Análisis estadístico.....	15
3.2	Análisis electroforético.....	15
3.2	Crianza masiva.....	16
IV.	RESULTADOS.....	17
4.1	Resultados de los cruces.....	17
4.2	Análisis electroforético.....	22
4.2.1	Discusión.....	22
4.3	Crianza masiva.....	22
4.3.1	<i>Diadegma semiclausum</i>	22
4.3.2	<i>Diadegma insulare</i>	23
4.3.3	Discusión.....	25
V.	CONCLUSIONES.....	26
VI.	RECOMENDACIONES.....	27
VII.	LITERATURA CITADA.....	28
VIII.	ANEXOS.....	31

INDICE DE CUADROS

Cuadro

1.	Cruces interespecíficos e intraespecíficos de <i>Diadegma insulare</i> y <i>Diadegma semiclausum</i>	17
2.	Longitud del ala anterior de machos y hembras de <i>Diadegma insulare</i> y <i>Diadegma semiclausum</i>	18
3.	Comparación de la proporción de hembras que copularon en los cruces interespecíficos e intraespecíficos de <i>Diadegma insulare</i> y <i>Diadegma semiclausum</i>	19
4.	Tiempo en minutos de cópula de cruces de <i>Diadegma insulare</i> y <i>Diadegma semiclausum</i>	20
5.	Tiempo en minutos a cópula de cruces de <i>Diadegma insulare</i> y <i>Diadegma semiclausum</i>	20
6.	Cantidad de pupas de <i>Diadegma insulare</i> recolectadas en Tatumbla.....	24

INDICE DE FIGURAS

Figura

1.	Hembra de <i>Diadegma insulare</i>	3
2.	<i>Diadegma semiclausum</i> adultos. Macho (arriba), hembra (abajo).....	4
3.	Esquema de los cruzamientos reproductivos de hembras de <i>D. semiclausum</i> con machos de <i>D. insulare</i>	13
4.	Esquema de los cruzamientos reproductivos de hembras de <i>D. insulare</i> con machos de <i>D. semiclausum</i>	14

INDICE DE ANEXOS

Anexo

1.	Reactivos utilizados en electroforesis.....	31
----	---	----

I. INTRODUCCIÓN

El repollo (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.), originario del Mediterráneo y de climas templados, es considerado una de las hortalizas básicas de la dieta de un gran sector de la población. En Centro América se ha cultivado por largo tiempo, y en su mayoría ha estado a cargo de pequeños agricultores.

Uno de los principales costos de producción lo constituye el control de plagas, ya que el repollo es atacado por varias plagas, siendo la plaga clave la palomilla dorso de diamante (PDD), *Plutella xylostella* (L.). Es una plaga cosmopolita defoliadora, que en los trópicos se desarrolla rápidamente, lo que ha llevado a los agricultores a realizar un control más estricto basado principalmente en la aplicación de plaguicidas. Sin embargo, el uso ineficiente de plaguicidas ha generado los problemas típicos de residuos químicos en el producto, así como el incremento en la intensidad del ataque de algunas plagas por lo cual se hace necesario poner en marcha programas de manejo integrado de plagas para evitar en lo posible secuelas indeseables del mal uso de plaguicidas (CATIE, 1990). Actualmente, como resultado de una frecuente aplicación de estos productos, la palomilla ha desarrollado resistencia a prácticamente todos los insecticidas, incluyendo algunas variaciones de los últimos insecticidas biológicos: *Bacillus thuringiensis* (AVRDC, REDCAHOR, 1998). Un problema de la aplicación de plaguicidas es que el repollo se consume en forma fresca.

Dada esta situación y su creciente gravedad al utilizar como táctica de control únicamente el control químico, se comprende la necesidad de estudiar más a fondo la naturaleza del problema para poder implementar soluciones estables y duraderas (Andrews y Quezada, 1989).

Según Scholaeen (1997), enemigos naturales juegan un papel muy importante en mantener las poblaciones de plaga por abajo de su daño económico. Dos parasitoides de PDD son *Diadegma insulare* (Cresson) y *Diadegma semiclausum* (Hellén). Son avispas que parasitan las larvas de PDD cuando estas se encuentran en su segundo a tercer estadio. Se encuentran en Centro América y Europa, respectivamente. Ningún parasitoide es capaz de efectuar un control total de PDD por sí mismo a excepción de *Diadegma semiclausum* (Lim, 1985).

En Europa PDD no es un problema ya que *D. semiclausum* ejerce un control eficiente y efectivo sobre las poblaciones de PDD (AVRDC y REDCAHOR, 1998), mientras que en América no se ha tenido el mismo resultado con *D. insulare*. Con *D. insulare* se han tenido niveles de parasitismo de hasta 40% en rastrojos de repollo (Andrews y Quezada, 1989).

Este es uno de los aspectos que requiere más investigación, para detectar el potencial de *D. insulare* y decidir sobre la eventual importación de alguno de los que han tenido buenos resultados en el trópico (Andrews y Quezada, 1989).

En muchos países el parasitoide con el que se ha trabajado y se ha tenido éxito es *D. semiclausum* ya que este parasitoide es más agresivo y se adapta más a zonas templadas que es por lo general donde se siembra el repollo. Se ha podido comprobar que la introducción de *D. semiclausum* a Australia y Nueva Zelanda y a las tierras altas de Indonesia, Malasia, Taiwan y Filipinas ha reducido el daño causado por la palomilla a niveles tolerables (AVRDC y REDCAHOR, 1998).

Según Miranda (1998), en Centro América tal vez *D. semiclausum* puede sobrevivir y conseguir establecerse porque el cultivo de repollo se siembra en altitudes de 1200 msnm (Guatemala, Costa Rica y República Dominicana).

Observando el éxito que se ha tenido con *D. semiclausum* en otros continentes, hay un interés por introducir este parasitoide en América. Alvarez (1997) mencionó que para la liberación de especies exóticas de parasitoides, es necesario conocer su biología, comportamiento reproductivo y otros factores de comportamiento. Es importante realizar estudios previos a la introducción de un enemigo natural exótico. No se sabe cual es el impacto que tendría *D. semiclausum* sobre las poblaciones existentes de *D. insulare*.

Por esto se realizó un estudio para determinar cual es el comportamiento reproductivo de las dos especies. Se estudiaron los cruces interespecíficos donde se observó la copulación y las crías que se obtuvieron de estos, para determinar si era recomendable la liberación de *D. semiclausum*. También se intentó comparar perfiles electroforéticos, los cuales serían útiles para asegurar la identificación de individuos dudosos, en el caso de liberar *D. semiclausum* en el campo. Tradicionalmente la identificación de estas especies se ha hecho morfológicamente, pero existen otros métodos que podrían utilizarse tales como electroforesis.

En la presente investigación se plantearon los siguientes objetivos:

- 1.- Estudiar cruzamientos reproductivos entre los parasitoides *Diadegma insulare* y *Diadegma semiclausum*.
- 2.- Establecer patrones electroforéticos para identificar las dos especies.
- 3.- Instalar un sistema de crianza masiva de acuerdo a los resultados obtenidos en el estudio para una de las dos especies bajo condiciones locales.

Figura 1. Hembra de *Diadegma insulare* (Cave, 1995).

Figura 2. *Diadegma semiclausum* adultos. Macho (arriba) ,
hembra (abajo)(Talekar y Mei-Ying-Lin, 1998)

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 BIOLOGIA DE *DIADAGMA INSULARE* (CRESSON)

2.1.1 Clasificación y distribución.

Diadagma insulare pertenece al orden Hymenoptera, familia Ichneumonidae y subfamilia Campopleginae. Se encuentra desde el sur de Canadá hasta Venezuela y el oeste de Hawaii (Fitton y Walker, 1990)

2.1.2. Ciclo de vida y comportamiento.

Es una avispa que parasita las larvas de *P. xylostella* del segundo y tercer estadio (CATIE, 1990).

La larva parasitoide se desarrolla como un endoparásito solitario. Surgimiento de la larva parasitoide es de la prepupa hospedera que ya ha formado un capullo. La larva parasitoide termina devorando su hospedero externamente y luego forma su propio capullo, en el cual empupa dentro del capullo hospedero (Cave, 1995).

Es fácil de identificar porque la pupa tiene sus extremos redondeados (CATIE, 1990).

Harcourt (1960) reportó que la hembra de este ichneumonido camina rápidamente sobre la planta, usando sus antenas para localizar la larva hospedera. La oviposición es muy rápida una vez que ha sido encontrado un hospedero conveniente. El abdomen se dobla por abajo del tórax y entre las patas y el ovipositor es introducido rápidamente en la larva. La oviposición no dura más de un segundo o dos. No hay ningún saco de veneno asociado con el ovipositor, así es que no ocurre parálisis y muchas larvas, particularmente las de los últimos estadios, escapan a la hembra con movimientos violentos.

Estudios por Bolter y Laing (1983) indicaron que *D. insulare* produce un promedio de 814 huevos por hembra. La hembra pone todos sus huevos en un período de 24 horas cuando dispone de suficientes huéspedes. Sin embargo, la hembra adulta puede producir huevos durante todo su ciclo de vida y comienza a ovipositar 24 horas después de emerger. Los huevos son simétricos y sus dimensiones son 0.28 x 0.06 mm recién ovipositados y 0.6 x 0.13 mm antes de eclosionar. El primer estadio larval es el típico de los ichneumonidos, con una pequeña mandíbula curvada y que termina en una punta en forma de una hoz, y va decreciendo en tamaño con los estadios sucesivos. El desarrollo de *D. insulare* es continuo y el tiempo en llegar de huevo a adulto decrece con altas temperaturas en un rango promedio de 15.6 ± 1.5 días a 25 °C y 42.3 ± 1.7 días a 13 °C.

Altas temperaturas reducen la longevidad de las hembras maduras, la cual en promedio es de 21.2 días a 25 °C y 43.6 días a 17 °C. Adultos miden 3-5 mm y son principalmente negros con anaranjado y marcas amarillas en las patas y el abdomen (Cordero y Cave, 1992). Según Cave (1990)¹ los adultos de *D. insulare* presentan las siguientes características:

Hembra	Macho
- Escapo negro ventralmente (raramente pardo oscuro)	- Escapo negro ventralmente (raramente pardo oscuro)
- Metabasitarso: pálido en basal 1/8-1/10 pardo oscuro en apical 9/10-7/8	- Metabasitarso: pálido en basal 1/8-1/10 pardo oscuro en apical 9/10-7/8
- Metasoma con anaranjado extenso en T2 y T5	- Metasoma con anaranjado extenso en T2 y T5
- Base del metafemur ventralmente no oscuro o casi indistintamente oscuro	- Base del metafemur ventralmente oscuro o casi indistintamente oscuro

En un estudio realizado por Rivas y Secaira (1992) se observó la tendencia de incremento en el porcentaje de parasitismo de *D. insulare* conforme se desarrolla el cultivo, probablemente debido al aumento de la población de larvas de la PDD.

2.2 BIOLOGIA DE *DIADAGMA SEMICLAUSUM* (HELLEN)

2.2.1 Clasificación y distribución

Diadegma semiclausum (Hellén), también conocida en el pasado como *Diadegma cerophaga* (Gravenhorst), *Diadegma eucerophaga* (Horstmann) y *Angitia cerophaga* (Gravenhorst), es originario de Europa (Talekar y Mei-Ying-Lin, 1998).

Este parasitoide ha sido introducido en Sur Africa (Evans 1939), Nueva Zelanda (Robertson, 1948), Australia (Waterhouse y Norris 1989) e Indonesia (Vos, 1953) para el control de PDD. De acuerdo a todos los reportes de inoculaciones realizadas con *D. semiclausum*, la introducción de este parasitoide ha comenzado a establecerse en prácticamente todas las tierras altas productoras de vegetales en Indonesia, Malasia, Filipinas, Taiwan, India y otras partes (Miranda, 1998).

¹ Comunicación Personal, Dr. Ronald Cave, Departamento de Protección Vegetal, Zamorano.

2.2.2 Ciclo de vida y comportamiento.

Ooi (1980) definió el ciclo de vida de *D. semiclausum*: huevo 1.5 – 2 días, larva 5 –8 días y pupa de 6-9 días. Pasa por cuatro estadios larvales y la duración de cada uno depende de la edad del hospedero cuando este es atacado. La duración del estadio larval en promedio es de 6.5 días cuando larvas de uno o dos días son expuestas a *D. semiclausum* y toma cinco días cuando larvas de tres o cuatro días de edad son expuestas. El macho y la hembra pueden vivir por 40 y 73 días, respectivamente, cuando son alimentados con miel diluida.

Talekar y Mei-Ying Ling (1998) mencionan que el huevo mide 0.22 mm de largo por 0.05 mm de ancho; poco después de la oviposición el huevo puede ser encontrado en el tórax y segmento abdominal. Después de eclosionar la larva es transparente. Cuando la larva de PDD llega a ser prepupa, la larva del parasitoide come de la prepupa y la piel larval, y las excretas son empujadas hacia la parte posterior de la prepupa preparándose para que *D. semiclausum* empupe.

Dentro del capullo del hospedero este forma su propia pupa. Al final del periodo de pupa, comienza a morder hasta llegar a la parte final de la pupa por donde sale el adulto. Los adultos de *Diadegma* emergen pocos días después que emergen adultos de PDD provenientes de larvas de la misma generación que no fueron parasitadas (Legaspi, 1984). Según Cave (1990)² los adultos de *D. insulare* presentan las siguientes características:

Hembra	Macho
- Escapo amarillo ventralmente (raramente pardo pálido)	- Escapo amarillo ventralmente (raramente pardo pálido)
- Metabasitarso: pálido en basal 1/3-1/2 pardo pálido en apical 1/2-2/3	- Metabasitarso: pálido en basal 1/4-1/2 pardo pálido en apical 1/2-3/4
- Metasoma con poco anaranjado	- Metasoma con anaranjado lateralmente en T3 únicamente
- Base del metafemur ventralmente oscuro, aunque a veces no muy distintamente	- Base del metafemur ventralmente oscuro, aunque a veces no muy distintamente

Tienen antenas largas, el cuerpo es negro. Las alas frontales son transparentes y tiene marcas oscuras alrededor del margen anterior. El abdomen es delgado, largo y aplanado. La hembra tiene un ovipositor y es más grande que el macho. El cuerpo de la hembra mide 0.9 mm de ancho y el macho 0.87 mm de ancho.

² Comunicación Personal, Dr. Ronald Cave, Departamento de Protección Vegetal, Zamorano.

La hembra del parasitoide copula inmediatamente después de emerger de la pupa (Hardy, 1938). Este parasitoide es capaz de atacar en promedio 117 ± 10 larvas por hembra (Ooi, 1980).

Aparte de la habilidad intrínseca de *D. semiclausum* para evadir y tratar de sobrevivir al super y multiparasitismo, puede ser también capaz de mejorar la eficiencia de búsqueda bajo niveles de población del hospedero y sus competidores (Goodwin, 1979).

D. semiclausum es un parasitoide específico de PDD y no ataca ningún otro insecto benéfico o plaga. Este parasitoide no controla *Plutella* en áreas donde las temperaturas exceden más de 27°C por más de dos semanas. *D. semiclausum* es altamente susceptible a plaguicidas químicos (Talekar y Mei-Ying Ling, 1998).

2.3 ELECTROFORESIS

Es una técnica bioquímica versátil para detectar variación genética, introducida por Tiselius en 1937 (Acquaah, 1992). Electroforesis es un método efectivo para separar proteínas o ácidos nucleicos en una gel, mediante una corriente eléctrica. Las moléculas de proteínas y ácidos nucleicos tienen cargas negativas y son atraídas hacia el polo opuesto (Doyle, 1999)³. Todas migran hacia abajo con diferentes velocidades dependiendo de su carga neta, tamaño, forma o la combinación de estos factores (Crawford, 1989).

La velocidad de migración de una molécula depende de su tamaño (o peso molecular): las moléculas más pequeñas migran más rápidamente que las grandes y así pueden ser separada por una corriente eléctrica. Los factores que afectan la migración de las proteínas en la gel son: pH del buffer, la consistencia (porosidad) del gel y la aplicación de la corriente eléctrica (Doyle, 1999)³.

Según Acquaah (1992), existen dos tipos de electroforesis. El primero es la electroforesis en solución, que no tiene un medio de soporte para las moléculas que se quiere separar. Se colocan las moléculas juntas en una solución en la cual se mueven libremente. El segundo conocido como electroforesis zonal, en este la separación de proteínas es en un medio semisólido (gel). Una de las geles más usadas es la gel de poliacrilamida.

2.3.1 Gel de Poliacrilamida (Polyacrylamide Gel Electrophoresis PAGE)

La electroforesis con gel de poliacrilamida fue introducida por Raymond and Weintraub en 1959 (Acquaah, 1992).

La matriz o soporte en el que se realiza la electroforesis es generalmente un gel de poliacrilamida. El soporte tridimensional de los geles de poliacrilamida consta de polímeros de acrilamida entrecruzados a manera de red por un segundo agente, generalmente denominado 'bis' (N, N' -metilen-bisacrilamida). El tamaño de los poros está determinado por el porcentaje de gel, y éste a su vez depende de la cantidad de acrilamida y de la proporción entre acrilamida y bis (Ramírez *et al*, 1993).

Con este método, no se identifica definitivamente a dos proteínas, solamente se puede observar diferencias (Crawford, 1989).

³ Comunicación personal, Dra. María Mercedes Doyle, Departamento de Protección Vegetal, Zamorano.

III. MATERIALES Y METODOS

El estudio fue dividido en tres partes:

- 1.- Cruces interespecíficos
- 2.- Análisis electroforético
- 3.- Crianza Masiva

Fecha y localización del estudio

Los trabajos se comenzaron en mayo de 1998. Los cruces interespecíficos y la crianza masiva se realizaron en la sala de cuarentena del Centro para el Control Biológico en Centro América y el análisis electroforético en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Protección Vegetal de la Escuela Agrícola Panamericana.

3.1 CRUCES INTERESPECIFICOS

3.1.1 Producción de plantas hospederas de PDD.

Se utilizaron plantas de repollo. Se sembró una bandeja de 96 plantas cada semana. A los 21 días se transplantaron a maceteras plásticas de 7.5 cm de diámetro menor, 19 cm de diámetro mayor y 11 cm de altura, cuya tierra se esterilizó previamente en un autoclave.

Estas plantas se fertilizaron con urea una vez por semana y se las regó tres veces al día. Tres semanas después del transplante estaban listas para ser utilizadas en la alimentación de PDD.

3.1.2 Preparación de láminas de oviposición

Se pesaron 65 g de las hojas de repollo que debían ser sanas y sin plaguicidas, los cuales se licuaron con 500 ml de agua. El jugo que se obtuvo se esterilizó a 120° C y 1.05 kg/cm² durante 20 minutos. Posteriormente se filtró el jugo con el cual se mojaron láminas de papel aluminio de 2 cm x 10 cm que previamente estaban arrugadas. Luego se pusieron las láminas a secar a temperatura ambiente. A estas se les llamó láminas de oviposición, las cuales fueron almacenadas en el refrigerador hasta su posterior uso.

3.1.3 Preparación de cámara de oviposición

Aquí se utilizó un recipiente plástico con capacidad para 1.5 litros con una tapa plástica cubierta de malla para permitir la entrada de aire. En las paredes internas del recipiente se colocó papel con miel de abeja el cual sirvió de alimento. Se colocaron de 100 a 150 pupas de PDD y tres láminas de oviposición, sobre las cuales los adultos de PDD ovipositaron inmediatamente después de emerger. Esta cámara se colocó en un lugar oscuro. Se cambiaron las láminas de oviposición cada dos días.

Después de la oviposición, las láminas se desinfectaron introduciéndolas en una solución de formalina al 10% durante 30 minutos, y luego se enjuagaron durante 15 minutos en agua. Se guardaron las láminas con huevos en el refrigerador a 4 °C hasta su posterior uso. El período recomendable de almacenamiento es de 15 días (Miranda, 1998).

3.1.4 Producción de larvas de PDD

3.1.4.1 Obtenidas en laboratorio: En cajas entomológicas se colocaron seis plantas de repollo, sobre las cuales se colocaron láminas ovipositadas y desinfectadas. Aquí se esperó hasta que salieran las larvas y se alimentaran de las plantas. Se colocaron plantas nuevas de acuerdo a las necesidades de alimento de las larvas.

Las larvas se utilizaron para mantener la cría de PDD en el laboratorio y para el proceso de parasitación de *D. insulare* y *D. semiclausum*. Las pupas de PDD se recolectaron para colocarlas en las cámaras de oviposición.

3.1.4.2 Material del campo: Se hicieron recolecciones semanales en Tatumbla, San Juan del Rancho y Lepaterique. Las larvas recolectadas en el campo se colocaron sobre plantas de repollo dentro de cajas entomológicas en el laboratorio. Aquí también se fueron cambiando las plantas de acuerdo a las necesidades alimenticias de las larvas. Las pupas se recolectaron y colocaron en la cámara de oviposición.

Estas larvas no se pudieron utilizar para el proceso de parasitación puesto que al ser recolectadas en el campo, posiblemente pudieran estar ya parasitadas por *D. insulare*.

Se separaron las pupas de *D. insulare* para utilizar los adultos en los cruces o en la cría.

3.1.5 Producción de parasitoides

Se recolectaron en el campo larvas de PDD parasitadas por *D. insulare*, mientras que *D. semiclausum* fue traído de una cría en Taiwan. Las pupas se colocaron individualmente dentro de frascos de vidrio pequeños con un cm² de hoja de repollo y una gota de miel la cual sirvió de fuente de alimento para el parasitoide, luego que este emergió. Los frascos fueron tapados con algodón para permitir el intercambio de aire.

Se colocaron en cajas entomológicas plantas de repollo infestadas con larvas sanas de PDD en segundo y tercer estadio, dos láminas de 5 cm x 10 cm de papel encerado impregnadas con miel y machos y hembras de *D. insulare* o *D. semiclausum*, una especie por caja. Se cambiaron cada dos días las plantas con larvas nuevas. Posteriormente se recolectaron los capullos de PDD de las plantas. Los que estaban parasitados se colocaron en frascos y se utilizaron para realizar los cruces. Los que no resultaron parasitados se colocaron en las cámaras de oviposición.

3.1.6 Construcción de jaulas Cherry

Se cortó la parte inferior de botellas plásticas de refresco de 1.5 L y 2 L y se les hizo ventanas de 5 cm x 6 cm, las cuales fueron cubiertas por malla.

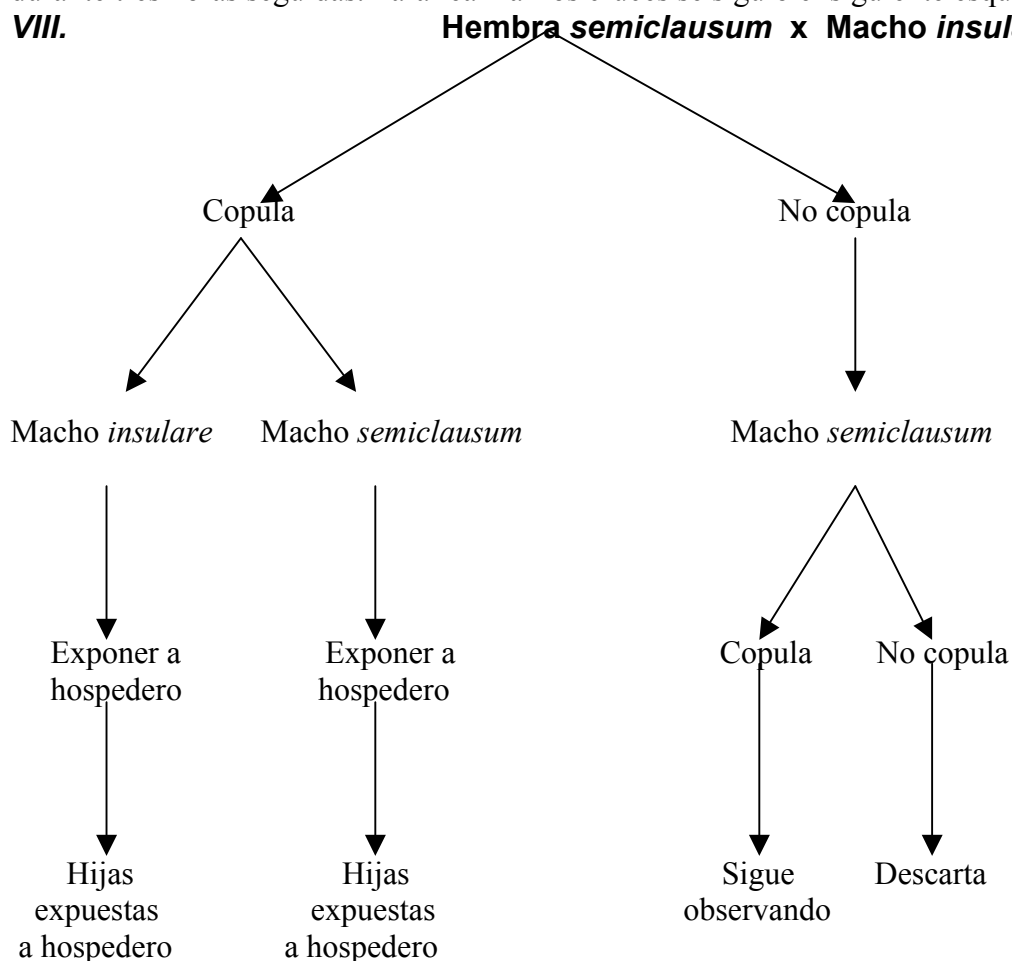
3.1.7 Cruces interespecíficos

3.1.7.1 Hembra *Diadegma semiclausum* x macho *Diadegma insulare*: Para la realización de los cruces se trabajó con dos sistemas:

a) Sobre una planta de repollo en macetera se colocó la jaula Cherry con gotas de miel colocadas en las paredes de la jaula. Dentro de la jaula se colocó una hembra de *D. semiclausum* y tres machos de *D. insulare*.

b) En una caja entomológica se colocaron cuatro plantas de repollo y dos láminas de 5 cm x10 cm de papel encerado impregnado con miel pura que sirvió de fuente de alimento para los parasitoides. Se colocaron hembras de *D. semiclausum* y machos de *D. insulare* con en una proporción de 1:3, respectivamente.

Los cruces se realizaron en la sala de cuarentena, a una temperatura de 22°C. Las horas en que se realizaron los cruces fue en la mañana y en la tarde. Se observarán los parasitoides durante tres horas seguidas. Para realizar los cruces se siguió el siguiente esquema (Figura VIII).



Las hijas que se obtuvieron del cruce de hembras de *D. semiclausum* con machos de *D. insulare* se colocaron con machos de *D. insulare* o *D. semiclausum* en cajas entomológicas que contenían tres plantas de repollo, donde se observó durante tres horas seguidas.

3.1.7.2 Hembra *Diadegma insulare* x macho *Diadegma semiclausum*: Para la realización de los cruces se trabajó con dos sistemas:

a) Sobre una planta de repollo en maceteras se colocó la jaula Cherry con gotas de miel. Dentro de la jaula se colocó una hembra de *D. insulare* y tres machos de *D. semiclausum*.

b) En una caja entomológica se colocaron cuatro plantas de repollo y dos láminas de 5 cm x 10 cm de papel encerado impregnado con miel pura. Se colocaron hembras de *D. insulare* con machos de *D. semiclausum* en una proporción de 1:3, respectivamente. Los cruces se realizaron en la sala de cuarentena, a una temperatura de 22°C. Las horas en que se realizaron los cruces fue en la mañana y en la tarde.

Se observaron los parasitoides durante tres horas seguidas. Para realizar los cruces se siguió el siguiente esquema (Figura 4).

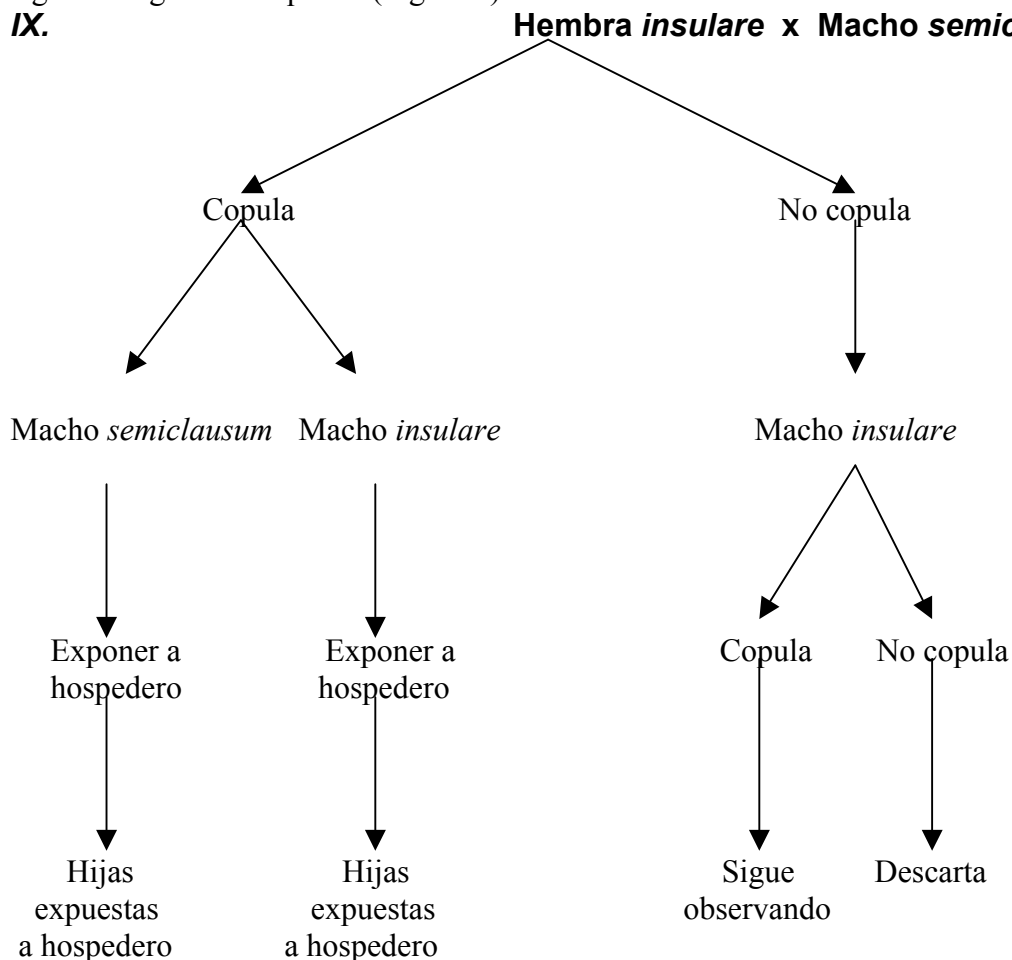


Figura 4. Esquema de los cruzamientos reproductivos de hembras de *D. insulare* con machos de *D. semiclausum*.

Las hijas que se obtuvieron del cruce de hembras de *D. insulare* con machos de *D. semiclausum* se colocaron con machos de *D. insulare* o *D. semiclausum* en cajas entomológicas que contenían tres plantas de repollo, donde se observó durante tres horas seguidas.

3.1.7. 3 Cruces intraespecíficos: Estos cruces se realizaron para tomarlos como testigo contra los cruces interespecífico, se realizaron en las mismas condiciones que los intraespecíficos.

3.1.8 Análisis estadístico

Para comparar las diferencias en proporción de hembras que copularon en cada cruce se realizó una prueba de comparación múltiple de proporciones.

Para la longitud de alas anteriores se realizó una prueba de separación de medias Tukey (Alpha 0.05).

Para analizar el tiempo a cópula y el tiempo de cópula se realizó un ANDEVA.

3.2 ANALISIS ELECTROFORETICO

Hasta el momento no se han realizado análisis utilizando el método de electroforesis para diferenciar a diferentes especies de *Diadegma*, por lo cual se trabajó con el procedimiento utilizado en la Universidad de Arizona para determinar biotipos de la mosca blanca, *Bemisia tabaci* Gennadius.

Adultos muertos de *D. semiclausum* y *D. insulare* provenientes de la cría fueron utilizados para el análisis. Se probó la cantidad de individuos que debían ir por muestra. Se trabajó con uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete individuos por muestra. Estos se colocaron en un mortero esterilizado, junto con 10 µL de buffer de extracción (Anexo 1). Las avispa fueron maceradas completamente con un pistilo. Posteriormente se le agregó 5 µL de azul de bromofenol con el cual mezclaron las muestras maceradas.

Esta solución se colocó en una gel de poliacrilamida. La lámina de la gel consistía de dos tipos de gel. La primera constituyó una capa de Separating Gel, que llegaba hasta la altitud de los casilleros. La segunda que constituyó una capa de Stacking Gel. Esta lámina tiene 28 casilleros; dentro de cada casillero se colocó 10 µL de la muestra.

La gel se colocó en un tanque que contenía aproximadamente 7 L de buffer de corrida (Anexo 1). Sometida durante tres horas a 120 voltios, 250 watts de poder y una corriente de 50 amperios hasta que el colorante descendiera en el primer gel para posteriormente aumentarla a 60 cuando comenzara a pasar al segundo gel.

Después de transcurrido el tiempo de corrida, la gel se colocó en un buffer de tinción (Anexo 1) para esterase durante 30 minutos, después se colocó en una solución de ácido acético al 7 %.

3.3 CRIANZA MASIVA

Para la crianza masiva de los parasitoides se trabajó con el método de Talekar (AVRDC y REDCAHOR, 1998).

Dentro de cajas entomológicas se colocaron dos láminas de papel encerado de 5cm x 10 cm, cubiertas con miel de abeja pura, que sirvió como fuente de alimento a los adultos. Dentro de cada caja se colocaron de 20 – 30 hembras con 40 machos, junto con los cuales se colocaron plantas de repollo infestadas por larvas de PDD de segundo y tercer instar, las cuales se cambiaron cada cinco días. Posteriormente se recolectaron las pupas, y aquellas que eran de *D. insulare* o *D. semiclausum*, se colocaron individualmente dentro de frascos de vidrio.

X.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 RESULTADOS DE LOS CRUCES

En los cruces no se trabajó con el mismo número de hembras ni tampoco se observó igual tiempo para cada caso debido a que la disponibilidad de parasitoides fue muy variable (Cuadro 1).

Cuadro 1. Cruces interespecíficos e intraespecíficos de *Diadegma insulare* y *Diadegma semiclausum*

Cruces	# Hembras observadas	# Hembras que copularon	Proporción que copuló	Horas de observación
Hembra <i>insulare</i> x macho <i>semiclausum</i>	28	6	0.21	93.5
Hembra <i>semiclausum</i> x macho <i>insulare</i>	41	0	0	133.5
Hembra <i>semiclausum</i> x macho <i>semiclausum</i>	37	8	0.27	103
Hembra <i>insulare</i> x macho <i>insulare</i>	25	10	0.32	112

De 28 hembras de *D. insulare* observadas durante 93.5 horas, solamente seis copularon con machos de *D. semiclausum*. Hubo un cortejo marcado en la mayoría de las hembras observadas, aunque no se dio la cópula.

Previo a la cópula, el macho realizó un cortejo, el cual consistió en que el macho buscó a la hembra, se colocó cerca de la ella y comenzó a mover fuertemente las alas. Este cortejo duró aproximadamente un minuto y medio. Luego el macho se colocó en la parte de atrás y sobre la hembra, manteniéndose los dos inmóviles durante el periodo de cópula que duró de 6 a 11 minutos. Al terminar la cópula se separaron y tomaron diferentes direcciones. En dos de las hembras que copularon, se observó una segunda cópula con el mismo macho, en una duró 30 minutos y en la otra duró cinco minutos. En cuatro de las 28 hembras, después del cortejo el macho se colocó sobre la hembra de dos a tres segundos, pero esta lo rechazó y no ocurrió una cópula efectiva.

De estos cruces se obtuvieron cuatro machos y nueve hembras. Las crías de este cruce fueron más pequeñas, la longitud del ala anterior fue 2.36 mm, la cual es inferior al del padre y de la madre (Cuadro 2). También presentaron la coloración del escapo del padre y del metasoma de la madre.

No se observó cópula en ninguna de las 41 hembras de *D. semiclausum* con machos de *D. insulare* observadas durante 133.5 horas. Las hembras se mantuvieron alejadas de los machos. Solamente machos grandes intentaron cortejar a las hembras, las cuales rechazaron al macho.

Al observar la falta de cópula entre hembras de *D. semiclausum* y machos de *D. insulare* se planteó la hipótesis que los machos de *D. insulare* son más pequeños que la hembra de *D. semiclausum*, y debido a esto no se dio la cópula entre estos. Se midió la longitud de las alas anteriores de 20 machos y 20 hembras de cada especie. No se encontró una diferencia significativa entre la longitud de las alas anteriores de machos y hembras de la misma especie. Se encontró una diferencia significativa entre la longitud de las alas anteriores entre las dos especies (Cuadro 2). La diferencia en tamaño entre las dos especies pudo ser uno de los factores por los cuales no se observó cópula en este cruce. Posiblemente el macho no produce suficiente cantidad de feromonas sexuales que atraigan a la hembra. Además las hembras prefieren a los machos más grandes ya que así obtendrán hijas grandes y al existir una relación directa entre el tamaño de la hembra y la producción de huevos, las hijas producirán una mayor cantidad de huevos. Estas hembras se colocaron con machos de *D. semiclausum* y se observó que sí copularon.

Cuadro 2. Longitud del ala anterior de machos y hembras de *Diadegma insulare* y *Diadegma semiclausum*

Especie	Sexo	Alas (mm) $\pm$ EE
<i>Diadegma insulare</i>	Macho	3.01 ± 0.04 a *
	Hembra	3.16 ± 0.04 a
<i>Diadegma semiclausum</i>	Macho	3.42 ± 0.04 b
	Hembra	3.56 ± 0.04 b

*Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Prueba Tukey, $P=0.05$)

Se observaron 25 hembras de *D. insulare* durante 112 horas y se observó cópula con machos de *D. insulare* en 10 de ellas. Se observó un gran porcentaje de machos cortejando a las hembras. De 37 hembras de *D. semiclausum* observadas en un periodo de 103 horas, se observó cópula con machos de *D. semiclausum* en ocho de ellas. Además, se observó que la mayoría de las hembras fueron cortejadas por machos.

Al comparar la proporción de hembras de *D. semiclausum* que copularon con machos de *D. insulare*, contra la proporción de hembras de *D. insulare* que copularon con machos de *D. semiclausum* y las hembras que copularon en los cruces intraespecíficos, se encontró que existe una diferencia significativa (Cuadro 3) ya que ninguna hembra de *D. semiclausum* copuló con un macho de *D. insulare*, mientras que en los otros casos sí se dio cópula. No hubieron diferencias significativas al comparar la proporción de hembras de *D. insulare* que copularon con machos de *D. semiclausum*, contra la proporción de hembras que copularon en los cruces intraespecíficos. Tampoco se encontró una diferencia significativa en la proporción de hembras que copularon al comparar los cruces intraespecíficos.

Cuadro 3. Comparación de la proporción de hembras que copularon en los cruces interespecíficos e intraespecíficos de *Diadegma insulare* y *Diadegma semiclausum*.

Comparación	Diferencia de proporción	XI.	Significancia
Hembra <i>insulare</i> x macho <i>semiclausum</i> versus hembra <i>semiclausum</i> x macho <i>insulare</i>	0.21	0.077	s
Hembra <i>insulare</i> x macho <i>semiclausum</i> versus hembra <i>semiclausum</i> x macho <i>semiclausum</i>	0.06	0.106	ns
Hembra <i>insulare</i> x macho <i>semiclausum</i> versus hembra <i>insulare</i> x macho <i>insulare</i>	0.11	0.121	ns
Hembra <i>semiclausum</i> x macho <i>insulare</i> versus hembra <i>semiclausum</i> x macho <i>semiclausum</i>	0.27	0.073	s
Hembra <i>semiclausum</i> x macho <i>insulare</i> versus hembra <i>insulare</i> x macho <i>insulare</i>	0.32	0.093	s
Hembra <i>semiclausum</i> x macho <i>semiclausum</i> versus hembra <i>insulare</i> x macho <i>insulare</i>	0.05	0.118	ns

Se observaron cuatro hijas del cruce de hembras de *D. insulare* con machos de *D. semiclausum* durante 12 horas; todas copularon con machos de *D. semiclausum*. Posteriormente fueron expuestas a larvas de PDD. Solamente se obtuvo un capullo de *Diadegma*. De este capullo salió una hembra que murió inmediatamente después que eclosionó. El ala anterior tuvo una longitud de 3 mm, la cual es muy similar al tamaño del ala anterior de los machos de *D. insulare* (Cuadro 2). Presentó una coloración igual que la de la madre es decir el escapo amarillo y el metasoma anaranjado. Si del capullo hubiera emergido un macho, se tendría la duda si las hijas del cruce de *D. insulare* con machos de *D. semiclausum* son fértiles o no.

Durante nueve horas se observó a tres hijas del cruce de hembras de *D. insulare* con machos de *D. semiclausum*. En ningún momento se observó cópula con machos de *D. insulare*. Los machos se mantuvieron alejados de las hembras.

El tiempo de cópula es el tiempo transcurrido desde el momento que el macho se coloca sobre la hembra hasta que el se separa de ella. El tiempo de cópula fue variable, desde tres minutos en el cruce de hembras de *D. insulare* con machos de *D. semiclausum*, hasta 30 minutos cuando una hembra de *D. insulare* copuló por segunda ocasión con un machos de *D. semiclausum*. El tiempo de cópula es similar para todos los cruces interespecíficos e intraespecíficos ya que no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.1204$) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Tiempo en minutos de cópula de cruces de *Diadegma insulare* y *Diadegma semiclausum*

Cruce	n	XII. Tiempo de copula ± EE
Hembra <i>insulare</i> x macho <i>semiclausum</i>	6	6.8 ± 1.0 a
Hembra <i>semiclausum</i> x macho <i>semiclausum</i>	8	8.5 ± 0.7 a
Hembra <i>insulare</i> x macho <i>insulare</i>	10	8.0 ± 1.0 a
Hija (hembra <i>insulare</i> x macho <i>semiclausum</i>) x macho <i>semiclausum</i>	3	11.0 ± 0.6 a

*Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Prueba Tukey, P= 0.05)

El tiempo a cópula fue el tiempo que transcurrió desde que se colocaron dentro de la caja entomológica los machos y hembras hasta el momento en que sucedió la cópula. Se observaron diferentes tiempos a cópula, los cuales fueron 10 minutos en los cruces interespecíficos llegando hasta 150 minutos en el cruce de hembra de *D. insulare* por macho de *D. semiclausum*. El tiempo a cópula en los cruces intraespecíficos e interespecíficos fue similar, ya que no se encontraron diferencias significativas ($P>0.0587$) (Cuadro 5).

Cuadro 5. Tiempo en minutos a cópula de cruces de *Diadegma insulare* y *Diadegma semiclausum*

Cruce	n	Tiempo a copula
Hembra <i>insulare</i> x macho <i>semiclausum</i>	6	71 ± 21 a
Hembra <i>semiclausum</i> x macho <i>semiclausum</i>	8	28 ± 5.7 a
hembra <i>insulare</i> x macho <i>insulare</i>	10	29 ± 4.8 a
Hija (hembra <i>insulare</i> x macho <i>semiclausum</i>) x macho <i>semiclausum</i>	3	42 ± 25 a

*Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Prueba Tukey, P= 0.05)

Los resultados del estudio nos hacen suponer que *D. insulare* y *D. semiclausum* no son dos especies, sino subespecies. Las crías resultantes de los cruces interespecíficos son fértiles, además, no se encontraron diferencias significativas en el tiempo de cópula y en el tiempo a cópula de los cruces interespecíficos e intraespecíficos (Cuadros 4 – 5). Estos hechos nos hacen pensar que poblaciones de este organismo se separaron geográficamente en algún momento, convirtiéndose en dos subespecies que se adaptaron y evolucionaron de acuerdo a las condiciones climáticas de cada zona. Este hecho pudo dar como resultado las diferencias morfológicas entre ellas.

Diadegma insulare fue descrito por Cresson en 1865, *Diadegma semiclausum* por Hellén en 1949 (Fitton y Walker, 1990). Según esto el nombre válido para estas subespecies sería *D. insulare*, que fue descrito mucho antes que *D. semiclausum*.

El hecho que hembras de *D. semiclausum* no copularon con los machos de *D. insulare* pudo deberse a la diferencia en el tamaño de dichos individuos (Cuadro 2). Esta diferencia en tamaños pudo haber sido consecuencia de condiciones ambientales diferentes entre las dos subespecies.

La liberación de *D. semiclausum* en los campos de América posiblemente no tendría los mismos resultados que ha obtenido en otros lugares. Debemos tomar en cuenta que en los lugares donde ha introducido *D. semiclausum*, no se encuentra presente *D. insulare*, y por ello va a realizar su trabajo la interferencia. En América, *D. insulare* se encuentra en forma nativa y antes de una posible liberación de *D. semiclausum* se deben tener en cuenta las siguientes interrogantes:

Si machos de *D. semiclausum* copulan con hembras de *D. insulare* y *D. semiclausum*, la cantidad de machos disponibles para copular con hembras de *D. semiclausum* se reduciría en el caso de que estos machos solo copulen una vez. Tal cosa no sucedería si es que los machos copulan más de una vez.

Se desconoce la razón por la cual *D. semiclausum* ejerce un control eficiente y efectivo sobre PDD. Algunas de las razones podrían ser su agresividad y/o su mejor adaptación al ambiente. En el caso de que el gene que transfiere la agresividad fuese dominante, un cruce entre ambas subespecies resultaría benéfico

Las hijas obtenidas del cruce de hembras de *D. insulare* por machos de *D. semiclausum* son más pequeñas, lo que implica menores producciones de huevos y por ende menores niveles de control. Esta disminución en el tamaño es resultado del cruce, ya que se dio en todas las hijas, en contraste con las hijas de los cruces intraespecíficos que fueron de tamaño similar al de los padres.

Se debe considerar también que si *D. semiclausum* es más agresivo, ejercería un buen control al ser liberado en América, pero podría terminar desplazando a *D. insulare* que es nativo de esta región, debido a que *D. semiclausum* atacaría una mayor cantidad de hospederos, disminuyendo los hospederos para que *D. insulare* pueda reproducirse.

En Centro América se siembra el repollo bajo dos sistemas: los de tierras altas (1800 – 2400 m de altura) y los de tierras bajas (450 – 800 m de altura) (CATIE, 1990). Hay que tomar en cuenta que este parasitoide se adapta mejor a climas menores de 27°C; a temperaturas mayores ya no controla PDD (Talekar y Mei-Ying Ling, 1998). Solamente serviría para controlar PDD en sistemas de tierras altas.

4.2 ANALISIS ELECTROFORETICO

Los adultos de *D. semiclausum* y *D. insulare* se analizaron mediante electroforesis para comparar sus perfiles de proteínas. Se corrieron ocho geles. En las seis primeras geles no se observó la presencia de bandas de proteínas en ninguna de las muestras colocadas, y tampoco se trabajó con un control positivo.

En las dos geles restantes se colocó como control positivo un adulto de *Sitotroga* para constatar que la preparación de la gel y los reactivos se realizaron correctamente. En estas geles se observó la presencia de bandas, que tiñeron muy tenuemente. Estas bandas se observaron a la misma altura en todas las muestras de *D. insulare* analizadas. En las geles que contenían muestras de *D. semiclausum* no se logró observar bandas.

Se realizaron algunas modificaciones del buffer de extracción del protocolo original (Anexo 1). Se sustituyó el ácido bórico por ácido cítrico y se eliminó el EDTA, pero estos cambios no tuvieron ningún efecto positivo.

4.2.2 Discusión

Para realizar un análisis electroforético, se debe tener un control positivo y un protocolo específico. Elaborar un protocolo específico para una especie en particular tiene un costo alto y constituye un proceso prolongado que requiere de tiempo y un alto nivel técnico de la o las personas encargadas de desarrollarlo. Una vez que se ha desarrollado el protocolo, este análisis constituye una herramienta muy útil.

Para el análisis de *Diadegma* no se tiene un protocolo establecido por lo cual se tuvo que trabajar con el protocolo para la determinación de biotipos de la mosca blanca, y tampoco se ha establecido un control positivo para *Diadegma*.

Los análisis electroforéticos son caros en comparación a los análisis morfológicos por lo cual no constituyen una herramienta práctica para diferencias a los parasitoides. Para estudios más específicos y encaminados a la determinación de genotipo de los parasitoides constituye una herramienta muy útil.

4.3 CRIANZA MASIVA

4.3.1 *Diadegma semiclausum*

En mayo 21 se recibió el primer bloque de pupas de *D. semiclausum*. Se presentaron algunos problemas. La demora en la llegada de los parasitoides provocó que emergieran y al no encontrar alimento mueran. De este apenas 20 sobrevivieron los cuales fueron expuestos a plantas con larvas de PDD.

El 28 de septiembre se recibió el segundo envío que contenía aproximadamente 80 pupas que eclosionaron y murieron durante el viaje, sobrevivió solamente una hembra.

El 3 de noviembre se recibió el tercer envío que contenía aproximadamente 100 pupas. Ninguna eclosionó y esto se dio a que las pupas ya eran viejas. El 22 de diciembre se recibieron 800 pupas. Al momento de recibirlas habían eclosionado un 90% de ellas, sobreviviendo 160 de las cuales 115 fueron hembras y 45 machos. El 10% de capullos que no eclosionaron durante el viaje fueron colocados en frascos y solamente emergieron ocho hembras y tres machos.

El último envío se recibió el 1 de febrero de 1999. Igual que en ocasiones anteriores los adultos emergieron durante el viaje. Aquí se obtuvieron 115 pupas de las cuales eclosionaron 70 hembras y 45 machos.

En ninguno de los bloques de parasitoides recibidos se observó la presencia de hiperparasitoides; todo el material recibido contenía únicamente *D. semiclausum*.

Dentro de las cajas entomológicas se colocaron hembras y machos de *D. semiclausum* y se les proporcionó larvas de PDD. Solamente un 10% de estas larvas fueron parasitadas. Noventa y cuatro larvas fueron parasitadas, de las cuales emergieron 32 hembras y 27 machos.

No se logró establecer una cría de *D. semiclausum* debido a que los se tuvieron los siguientes problemas con la cría de PDD. Las condiciones climáticas que se presentaron en ciertas ocasiones (las primeras semanas de noviembre, después del Huracán Mitch y las altas temperaturas de los meses de febrero y marzo) no permitieron un buen desarrollo de las plantas de repollo, por lo cual no hubo fuente de alimento para las larvas de PDD, además se produjo una disminución considerable en la cría de PDD ya que el exceso de calor provocó estrés en las larvas, volviéndolas más susceptibles al ataque de algunos entomopatógenos.

Otra de las limitantes para el establecimiento de la cría radica en que al ser *D. semiclausum* un parasitoide exótico, dependemos de los envíos procedentes de Taiwan, que en muchas ocasiones presentaron problemas.

4.3.2 *Diadegma insulare*

La única localidad en que se encontraron cantidades adecuadas de pupas de PDD fue en Tatumbla. En San Juan del Rancho y Lepaterique se encontraron pocas cantidades de PDD y nada de *D. insulare*.

Los resultados de las recolecciones fueron variables de acuerdo a la época en que se realizaron (Cuadro 6).

Cuadro 6. Cantidad de pupas de *D. insulare* recolectadas en Tatumbla

Fecha	Pupas recolectadas	Hembras	Machos	No emergidas
26/09/98	5	2	2	1
13/11/98	95	41	24	30
20/11/98	50	20	13	17
12/12/98	94	54	20	20
17/12/98	137	80	34	23
23/12/98	107	46	23	38
22/01/99	5	2	1	2
19/02/99	8	3	2	3
5/03/99	1	0	0	1

En los meses de noviembre y diciembre las recolecciones fueron buenas. Esto se dio por el hecho que durante el Huracán Mitch se suspendieron las aplicaciones de insecticidas, permitiendo que las poblaciones de PDD incrementaran, y junto con esta la población de *D. insulare*. Por el hecho que se dejó de aplicar, el ataque de PDD fue tan severo que los campos fueron abandonados y por esta razón estos dos meses fueron excelentes para recolectar.

Las principales razones porque las cantidades de parasitoides recolectados resultaron variables fueron:

Las aplicaciones calendarizadas de insecticidas realizadas por los agricultores principalmente en la zona de San Juan del Rancho.

En la época lluviosa las poblaciones de la plaga disminuyen y por ende las poblaciones de *D. insulare*.

Además de obtener *D. insulare* en el campo, se recibieron tres envíos proveniente de Nicaragua. El primero se recibió en 3 de Octubre de 1998, que contenía 80 pupas. El segundo envío fueron 180 pupas recibidas el 18 de Diciembre de 1998. El último se recibió el febrero y en esta ocasión fueron 360 pupas. Con estas pupas se tuvo el problema que al eclosionar las un 90% resultaron machos.

Al tratar de establecer la cría en el laboratorio no se obtuvieron buenos resultados ya que solamente 23 larvas fueron parasitadas de las cuales emergieron 11 machos y una hembra.

Al igual que con *D. semiclausum*, no se logro establecer la cría de *D. insulare*, debido a que se tuvieron problemas con la cría de PDD.

4.3.3 Discusión

Para establecer una cría de *Diadegma*, se debe tener una excelente cría de PDD, y suficiente material (parasitoides) para iniciarla.

La cría de PDD es uno de los factores claves para establecer una cría de *Diadegma*, ya que se debe tener suficientes hospederos para que los parasitoides se reproduzcan. Para tener una cría de PDD se debe contar con plantas de buen tamaño y calidad, lo cual no sucedió en este caso, ya que en diversas ocasiones se presentaron problemas con las plantas de repollo. Estos problemas se dieron debido a las condiciones ambientales que se presentaron, así tenemos que después del Huracán Mitch hubieron días nublados, los cuales no fueron favorables para el crecimiento de las plantas. También se dio lo contrario, durante el mes de febrero y marzo se tuvieron días demasiado calientes, los cuales también han influido en el crecimiento de las plantas, tenemos que tomar en cuenta que el repollo se cultiva en regiones templadas.

Para incrementar el porcentaje de cópula de los parasitoides se tendría que simular un ambiente adecuado, es decir incrementar la flora dentro de las cajas entomológicas, introduciendo ciertas malezas, para que de esta manera los parasitoides se tengan de una manera similar a la que se comportarían en el campo.

Con el material inicial para comenzar las crías se tuvieron muchos problemas en especial con el de *D. semiclausum*, ya que se dieron muchos problemas en el envío de este. Con el material de Nicaragua el principal problema fue la proporción excesiva de machos que eclosionaron con respecto a las hembras.

V. CONCLUSIONES

Para realizar un estudio de este tipo se debe contar con el material necesario el cual constituyen: *D. insulare*, *D. semiclausum* y una cría de PDD.

Las crías obtenidas de los cruces de hembras de *D. insulare* con machos de *D. semiclausum* son fértiles.

Diadegma semiclausum es más grande que *Diadegma insulare*.

Hembras copulan solamente con machos de igual tamaño o más grandes que ellas.

Los tiempos de cópula y los tiempos a cópula son iguales en cruces intraespecíficos e interespecíficos.

Diadegma insulare y *Diadegma semiclausum* no son dos especies diferentes, pero son dos subespecies.

No es fácil una crianza de *D. semiclausum*, ya que el material inicial para iniciar una cría proviene de Taiwan, el cual es enviado por correo, y la mayoría de las veces no llega al lugar de destino en condiciones adecuadas.

Se necesita un protocolo específico para el análisis de proteínas de *Diadegma* para poder realizar un análisis electroforético de estos parasitoides, y también un control positivo para tener contra que comparar los perfiles que se pudieran obtener.

XIII.

Una liberación de *Diadegma semiclausum* no es recomendable en estos momentos ya que se deben realizar más estudios para comprobar la biología reproductiva de estos parasitoides. Se debe observar una mayor cantidad de hembras para realizar los cruces. También se deberían evaluar las progenies que se obtengan de estos cruces, y determinar si hablamos de dos especies diferentes o son subespecies una que se encuentra en Europa y la otra en América.

Sería bueno realizar un estudio para determinar la adaptación de *D. semiclausum* en el campo.

Realizar estudios para evaluar la efectividad de *D. semiclausum* y las crías de los cruces en el control de PDD .

Se debería estudiar otros parasitoides exóticos y nativos de PDD.

Las plantas para la cría de PDD deben mantenerse bajo un invernadero donde se pueda tener un control de la temperatura (20 – 24 °C).

Sembrar un parcela de repollo y no aplicar productos químicos, de esta manera tendremos una gran incidencia de PDD, y por ende de *D. insulare*, para contar con una fuente de parasitoides para mantener una cría de los mismos en el laboratorio.

La crianza masiva se debe realizar bajo condiciones de temperatura controladas, siendo la temperatura óptima 22°C para la cría.

Buscar otra herramienta aparte de la morfología para determinar diferencias entre los dos parasitoides. La electroforesis en la actualidad no opción, ya que no se tiene un protocolo y controles positivos para *Diadegma*. Sería bueno realizar estudios para establecer un protocolo y obtener un control positivo. Además este análisis es caro y requiere de equipo especial que solamente vamos a encontrar en laboratorios especializados en biología molecular. Una alternativa sería PCR (Polimerasa Chain Reaction), para lo cual se tendría que secuenciar el genoma de *Diadegma* y construir imprimidores específicos.

XIV.

XV.

XVI.

XVII.

XVIII.

VII. LITERATURA CITADA

- ACQUAAH, G. 1992. Practical protein electrophoresis for genetic research. Discorides Press. Portland, Oregon. 131
- ALVAREZ, D. R. 1997. Biología reproductiva y método de crianza en el laboratorio de *Admontia sp.* (Diptera: Tachinidae), parasitoide de *Metamasius quadrilineatus* Champion (Coleoptra: Curculionidae). Tesis Ing. Agr. EAP. El Zamorano, Honduras. 41
- ANDREWS, K. L. y QUEZADA, J. R. 1989. Manejo integrado de plagas insectiles en la agricultura: Estado actual y futuro. Escuela Agrícola Panamericana. El Zamorano, Honduras. 623
- AVRDC y REDCAHOR. 1998. Crianza de los parasitoides de *Plutella* en *Brassicas*. Shanhua, Tainan, Taiwan. 16
- BOLTER, C. J. y LAING, J. E. 1983. Competition between *Diadegma insulare* (Hymenoptera: Ichneumonidae) and *Microplitis plutellae* (Hymenoptera: Braconidae) for larvae of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). Proceedings of the Entomological Society of Ontario 114, 1-10
- CATIE. 1990. Guía para el manejo integrado de plagas del cultivo del repollo. Editorama S.A. Costa Rica. 80
- CORDERO, J. y CAVE, R. D. 1992. Natural enemies of *Plutella xylostella* (Lep.:Plutellidae) on crucifers in Honduras. Entomophaga 37 (3), 397-407
- CAVE, R. D. 1995. Manual para el reconocimiento de parasitoides de plagas agrícolas en América Central. Primera edición, Zamorano, Honduras: Zamoran Academic Press. 202
- CRAWFORD, J. D. 1990. Plant molecular systematics: Molecular approaches. Department of Botany, Ohio State University, Columbus, Ohio. 388
- EVANS, I. B. P. 1939. Solving the Union's pasture, crop and insect problems. Annual Report of the Division of Plant Industry FMG. South Africa. 117: 22
- FITTON, M. y WALKER, A. 1990. Hymenopterous parasitoids associated with diamondback moth: the taxonomic dilemma. Pp. 225-243. In Diamondback moth and other crucifer pests. N. S. Talekar. (Ed.) Proceedings of the Second International Workshop. Asian Vegetable Research and Development Center. Tainan, Taiwan
- GOODWIN, S. 1969. Changes in numbers in the parasitoid complex associated with the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera) in Victoria. Aust. J. Zool., 27: 981-989

- HARCOURT, D. G. 1960. Biology of the diamondback moth *Plutella maculipennis* (Curt) (Lepidoptera: Plutellidae) in eastern Ontario. III. Natural Enemies. Can. Entomol. 92: 419-428
- HARDY, J. E. 1938. *Plutella maculipennis* CURT, its natural and biological control in England. Bull. Entomol. Res., 29, 343-372
- LEGASPI, B. 1984. A comparative study of the foraging behaviour of two species of *Diadegma* (Hymenoptera: Ichneumonidae) attacking the diamondback moth. Ph. D. Thesis. University of London. Ascot, Berkshire, London
- LIM, G. S. 1985. Biological control of diamondback moth. Pp. 159-171. In Diamondback moth management. N. S. Talekar y T. D. Briggs. (Ed) Proc. First International Workshop, Taiwan
- MIRANDA, 1998. Mass rearing of diamondback moth and its parasites. National Agriculture University, Managua, Nicaragua. 24
- MIRANDA, F. O.; BENES, J. y PEREZ, H. 1998. Reproducción de parasitoides *Cotesia plutellae* y *Microplites plutella* de la palomilla del repollo *Plutella xylostella*, durante la etapa de cuarentena. Universidad Nacional Agraria, Facultad de Agronomía, Escuela de Sanidad Vegetal, Managua, Nicaragua
- OOI, P. A. C. 1980. Laboratory studies of *Diadegma cerophagus* (Hymenoptera: Ichneumonidae), a parasite introduced to control *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) in Malaysia. Entomophaga 25 (3) 2249-259
- RAMIREZ, H.; CALDERON, A. y ROCA W. M. 1993. Técnicas moleculares para evaluar y mejorar el germoplasma vegetal. Pp. 825-856. En Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. W. M. Roca y L. A. Mroginski (Ed.) Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia
- RIVAS, V. y SECAIRA, E. 1992. Sondeo de parasitoides de palomilla dorso de Diamante *Plutella xylostella* (L.) en las principales zonas productoras de repollo en Honduras. Ceiba, 33 (2), 335-338
- ROBERTSON, P. L. 1948. *Eupteromalilus* sp. as a hyperparasite some of influence on the establishment of *Angitia cerophaga* in New Zeland. N. Z. J. Sci. Technol., 29, 257-265
- SCHOLAEN, S. 1997. Manejo integrado de plagas en hortalizas. GTZ, Honduras. 156
- TALEKAR y MEI LING LIN. 1998. Training manual on IPM of diamondback moth. AVRDC. Shanhua, Taiwan. 67
- VOS, H. C. A. 1953. Introduction in Indonesia of *Angitia cerophaga* Grav. A parasite of *Plutella maculipennis* Curt. Contr. Cen. Agric. Res. Sta. Bogor, N. 134,32
- WATERHOUSE, D. F. y NORRIS, K. R. 1989. Biological control: Pacific Prospects Supplement 1. Australian Center for International Agricultural Research, Camberra, Australia. 123

XIX. VIII. ANEXOS

Anexo 1: REACTIVOS UTILIZADOS EN ELECTROFORESIS

- **Buffer de corrida Tris-Glycine 10X**

Agua destilada	1.0 L
Trizma base	45.0 g
Glycina	212.5 g

Disolver la glycina y el trizma base en 750 ml de agua destilada; se le puede aplicar calor para disolver los ingredientes. Una vez diluidos, se afora hasta llegar a 1 L. De esta solución se hacen diluciones al 1X tomando 100 ml de buffer de corrida con 900 ml de agua destilada, y luego se le agrega 1 ml de Triton-X 10%.

- **10% Triton-X**

Agua destilada	90 ml
Triton-X	10 ml

- **Buffer de Extracción**

Agua destilada	100.00 ml
Trizma base	1.21 g
Ácido bórico	0.62 g
EDTA	3.36 g

Se mezclan todos los reactivos y luego se ajusta la solución a un pH de 7.0 con HCl o NaOH.

- **Gel Buffer**

A. 1.5 M Tris-HCL, pH 8.8

Para preparar 150 ml de solución:

Agua destilada	75.000 ml
Tris base	27.225 g

Se disuelve y se ajusta la solución al pH indicado. Se agrega agua hasta llegar a 150 ml, luego se filtra a través de un papel filtro Watman # 1. Luego se agregan 600 µL de 10% Triton-X.

B. 0.5 M Tris-HCL, pH 6.8

Para preparar 100 ml de solución:

Agua destilada	60 ml
Tris base	6 g

Se disuelve y se ajusta la solución al pH indicado. Posteriormente se lleva la solución a 100 ml, se filtra a través de un papel filtro Watman # 1 y se agregan 400 μ L de 10% Triton-X.

- **Solución de Acrilamina/Bis**

Acrilamida	36.6 g
Bis-methylene-crilamida	1.0 g

Generalmente para hacer 125 ml de solución. En 75 ml de agua destilada agregue los dos ingredientes. Luego que se han disuelto filtrarlos a través de un papel filtro Watman #1. Esta solución es neurotóxica por lo cual se debe manejar con cuidado y hay que almacenarla en un lugar oscuro a 4° C.

- **10% Persulfato de Amonio (APS) (w/v)**

Agua destilada	1.0 ml
Persulfato de amonio	0.1 g

Se mezclan y se disuelven. Esta solución se debe preparar en el momento que se utiliza.

- **Preparación del Gel**

1. Separating Gel

Agua destilada	17.4 ml
Gel buffer pH 8.8	10.0 ml
Acrilamida	12.0 ml
10% APS	240 μ L
TEMED	20 μ L

Los ingredientes se deben ir agregando en el orden indicado, se mezclan rápidamente y se deben colocar rápidamente en el molde.

2. Stacking Gel

Agua destilada	6.10 ml
Gel buffer pH 6.8	2.50 ml
Acrilamida	1.30 ml
10% APS	120 μ L
TEMED	20 μ L

Los ingredientes se deben ir agregando en el orden indicado, se mezclan rápidamente y se deben colocar rápidamente en el molde.

- **Buffer de Tinción de esterasa**

Solución A

Agua destilada	480.0 ml
Fosfato de sodio dibásico	6.8 g

Solución B

Agua destilada	320.0 ml
Fosfato de sodio monobásico	4.4 g

Se disuelve cada solución por separado. Luego se mezclan y se ajusta el pH a 6.5.

Colorante de esterasa

Buffer de tinción de esterasa	100.0000 ml
Alpha naphthyl acetato	0.0250 g
Beta naphthyl acetato	0.1250 g
Fast blue RR salt	0.0370 g

En 5 ml de agua destilada se disuelve alpha y beta naphthyl acetato. Luego se le agrega el buffer de tinción y por último se agregó fast blue RR salt.