



UNIVERSIDAD  
POLITECNICA  
DE VALENCIA

## MÁSTER EN PRODUCCIÓN ANIMAL

**Fecundidad, fertilidad y sex-ratio de  
*Spalangia cameroni* Perkins  
(Hymenoptera, Pteromalidae) sobre  
*Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Díptera,  
Tephritidae) y *Musca domestica*  
Linnaeus (Díptera, Muscidae)**

Tesis de Máster

Valencia, Junio 2013

**Erik Sandor Valencia Kanut**

Bernard Peris Palau	Director:
Francisco Beitia Crespo	Director:
José Tormos Ferrando	Director:

## **Dedicatoria**

A mis hijos Haydin-Alexander y Ania-Lucena Valencia Reinado, principal estímulo de mi vida. A mi madre, Lucena Knuth, quien a lo largo de mi vida me ha dado su apoyo en todos mis proyectos y de quien, sin su sacrificio de madre seguramente no hubiese podido completar ninguno de mis sueños.

## **Agradecimientos**

A Francisco Beitia y José Tormos, investigador del IVIA y catedrático de Zoología de la Universidad de Salamanca, respectivamente, que me guiaron y me dieron su apoyo para la realización de este trabajo. Igualmente, agradezco a Bernat Peris, profesor asociado del Departamento de Ciencia de la Universidad Politécnica de Valencia, sin cuyo concurso no hubiese podido posible realizar este proyecto. Agradecimiento fraterno a Amparo Duato, técnico del IVIA, y Montse Sánchez Perelló por su gentil ayuda en diferentes fases de mi estancia. Por último, agradezco a Cristofol Peris, director del Departamento de Ciencia Animal de la UPV, por su desinteresada ayuda durante mi estancia en dicha universidad. .

Al Senescyt, ente del estado Ecuatoriano, que, bajo la visión de futuro del presidente Rafael Correa, fue creado para dar apertura al desarrollo del Ecuador y que a través de su financiamiento permite el desarrollo y culminación de las metas académico-profesionales de sus becarios.

# Índice

1. Resumen.....	5
2. Introducción.....	7
3. Objetivo.....	12
4. Material y métodos.....	12
5. Resultados y discusión.....	22
6. Conclusión.....	28
7. Bibliografía citada.....	29

## Resumen

Entre los parásitos externos que afectan a la ganadería se encuentra los dípteros cliclorrafos, entre los cuales podemos mencionar a la mosca de los establos (*Stomoxys calcitrans*) y la mosca común (*Musca domestica*). Desde hace varios años se está estudiando el control biológico de estos parásitos, utilizando parasitoides de pupas, como la *Spalangia cameroni*.

En las relaciones parasitoide-hospedador, este último representa el recurso más importante para las hembras del primero y, si se elige el más adecuado, ello redundará directamente en su éxito reproductor. A este respecto, la utilización de pupas congeladas de dípteros, con objeto de mantener crías de laboratorio de himenópteros parasitoides, se ha manifestado, recientemente, como adecuada. Al ser *Spalangia cameroni* Perkins un parasitoide comercialmente utilizado contra dípteros perjudiciales, incluyendo la mosca doméstica y potencialmente la mosca de la fruta, en el presente proyecto se analizan parámetros fundamentales de su potencial biótico, cuando se utilizan como hospedadores pupas congeladas de *Ceratitis capitata* (Wiedemann) y *Musca domestica* (Linnaeus). Los resultados obtenidos indican que hay diferencias estadísticas significativas entre la fecundidad y la fertilidad, al utilizar uno u otro hospedador. Las pupas de mosca domestica representan la mejor opción, para llevar a cabo crías de laboratorio y probablemente semi-masivas y masivas, siempre y cuando se disponga de una cría factible de esta especie de hospedador. Por último, los resultados obtenidos son discutidos.

Palabras clave: *Spalangia cameroni*, *Ceratitis capitata*, *Musca doméstica*, pupas congeladas, cría de laboratorio, fecundidad, fertilidad, sex-ratio.

## Abstract

Among external parasites affecting livestock is cliclorrafos Diptera, among which we can mention the stable fly (*Stomoxys calcitrans*) and house fly (*Musca domestica*). For several years studying the biological control of these pests, using pupal parasitoids such as *cameroni* *Spalangia*.

In host-parasitoid relationships, hosts are the most important resource for the females of the parasitoids and if chosen the right one, this will result directly in the reproductive success. In this regard, the use of frozen flies pupae, in order to maintain Hymenoptera laboratory parasitoid colonies has appeared recently as appropriate. *Spalangia cameroni* Perkins is sold commercially as a biocontrol agent against filth flies, including the house fly, *Musca domestica* Linnaeus and potentially Medfly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann). Here, we report on the use of frozen pupae of *C. capitata* and *M. domestica* to keep a stable laboratory colony of *S. cameroni*, with a view to setting up a mass-rearing protocol. Fecundity, fertility and sex-ratio are the main factors analysed. The results indicate that there are statistical differences in the fecundity and fertility between the use of pupae of Housefly and Medfly pupae. The best option is to use housefly pupae if it has a feasible breeding of this host . Finally, the results are discussed.

Keywords: *Spalangia cameroni*, *Ceratitis capitata*, *Musca domestica*, pupae frozen laboratory breeding, fecundity, fertility, sex ratio.

## 2. Introducción

Entre los parásitos externos que mayores perjuicios ocasionan en las explotaciones ganaderas se encuentran los dípteros cliclorrafos. Entre los mismos se pueden mencionar a la *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus), *Musca domestica* Linnaeus, *Calliphora* spp, *Sarcophaga* spp...,mereciendo especial atención la Mosca doméstica y la Mosca de los establos.

Una de las prácticas habituales en el manejo de granja es el control de estos parásitos, de tal manera que si no se realizan pueden alcanzar elevadas densidades en los periodos estivales, ocasionando cierto malestar entre los animales, personal de trabajo y vecinos de las proximidades

En este sentido estos parásitos, además pueden producir bajas económicas y perdidas económicas, actuando como vectores de enfermedades [la influenza aviar (Wanaratana, A et al. 2013), el bacilo, *Campylobacter fetus* jejuni (Rosef et al. 1983), la enfermedad de Newcastle ( revisado por Chakrabarti, S y col 2008), diversas coccidiosis (Miloushev 1978), cestodosis (Abrams 1976)]. La picadura dolorosa que causa la mosca de los establos (tobillera) incide directamente en la producción láctea y ganancia de peso.

El control de la mosca está basado principalmente en la aplicación de insecticidas, bajo la presentación de cebos, spray y rociados de contacto o residual, y larvicidas. Sin embargo en las últimas tres décadas se han empleado métodos alternativos y complementarios para el control de moscas, fundamentalmente debido al riesgo primario de los residuos de insecticidas en productos animales y estiércol (Birkemoe,T. et tal 2008; Skowgard, H 2006), el riesgo para el personal y animales y sobre todo por el rápido desarrollo de la resistencia a los insecticidas por las moscas.

Un método alternativo es el control biológico donde parasitoides de pupas (hymenoptera Pteromelidae) son puestas en libertad (seltas) en las granjas para minimizar los perjuicios económicos y el nivel de fastidio que ocasionan. La manipulación directa y dirigida de enemigos naturales, mediante incremento, juega un

papel fundamental. Por tanto, en la actualidad se están desarrollando metodologías que permitan optimizar la producción y posterior suelta de parasitoides con objeto de paliar los daños ocasionados por dípteros (ver Tabla 1; Perkins Ltda, <http://perkinsltda.com.co/>).

Tipo de explotación	Avispas/animal/mes	Nº trampas*/animales
Ganado Estabulado	4000	1/10
Ganado en Pastoreo	2000	1/15
Caballerizas	4000	1/10
Porquerizas	1000	1/15
Aves en Jaulas	30	1/2000
Aves en piso	15	1/3000
Basureros o residuos de cosecha	200/m2 o 5000 avispas por TM	1 x 200 m2

Tabla 1. Protocolo de sueltas inundativas de *Spalangia cameroni* Perkins para el control de dípteros. \*trampas de los adultos de mosca que emergen de la pupas no parasitadas.

De entre las especies de dípteros ciclorrhafos anteriormente mencionadas, podemos destacar a la mosca doméstica (*M. domestica*) (Fig. 1) es una especie molesta para los animales y el ser humano y, en ocasiones, puede ser vector de enfermedades. Es la especie más común en granjas, en establos, pudiendo llegar a completar su ciclo biológico, en verano, en 7-10 días y tener, por tanto, sólo en esta estación de 10 a 12 generaciones. Los adultos suelen vivir de 10 a 25 días y su potencial biótico es muy alto.

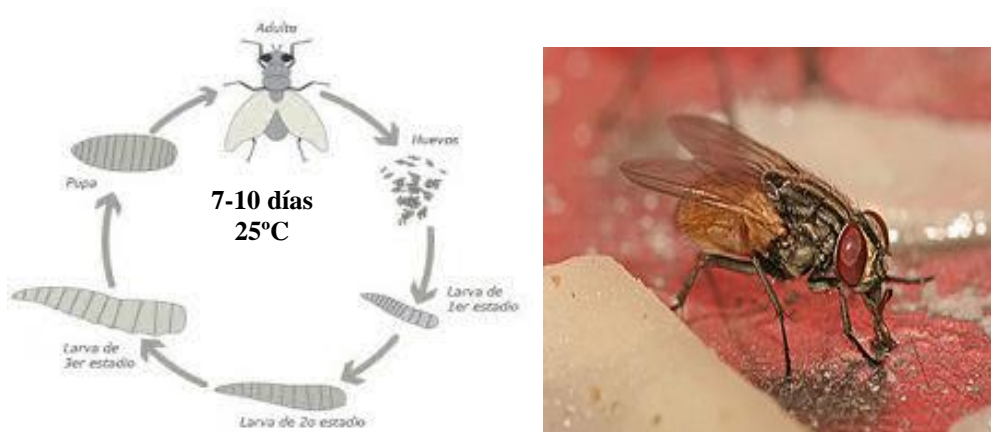


Fig. 1. Ciclo biológico y vista anterior de *Musca domestica* Linnaeus.

Con objeto de actuar contra dípteros plaga, desde la vertiente del control biológico *sensu stricto*, se mantiene, desde hace una década, en el IVIA una cría de



laboratorio del pteromárido *Spalangia cameroni* Perkins usando como hospedador a *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera, Tephritidae).

*Spalangia cameroni* (Fig. 2) es un ectoparasitoide primario solitario de pupas de



Fig. 2. Adultos de *Spalangia* sp; a) macho; b) hembra.

varias especies de dípteros nocivos a la sanidad animal y vegetal. Actualmente, es uno de los parasitoides más utilizados, a escala mundial, en el control biológico de *Musca domestica* Linnaeus “mosca doméstica” y *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus) “mosca de los establos”, especies ambas nocivas para la producción intensiva ganadera y aviar (Novartis Animal Health Inc., Perkins Ltda; Protecnet). Especies de este género, así como del género *Muscidifurax* Girault y Sanders están siendo empleadas en numerosos países, como Dinamarca, Estados Unidos, Australia, Costa Rica, Colombia y Argentina, mediante sueltas inundativas, alcanzando altas tasas de parasitoidismo (hasta del 40%), adecuadas para situar las poblaciones de estos dípteros en niveles sostenibles (Morgan y Patterson 1990, Geden et al. 1992, Crespo et al. 1998, Kaufmann et al. 2001, Steenberg et al. 2001, Skovgard y Nachman 2004, Geden y Hogsette 2006). Recientemente, en España, desde el año 2003, los directores de este estudio están criando a este parasitoide de forma semimasiva, utilizando como hospedador a *Ceratitis capitata* (Wiedemann) “mosca de la fruta”, con objeto de considerar su utilización en la lucha biológica contra dípteros nocivos.

*Ceratitis capitata* es una especie muy polífaga que ataca prácticamente a cualquier tipo de fruta, realizando la puesta sobre los frutos. Debido a su origen norteafricano (macaronésico), también se la conoce como mosca del Mediterráneo, siendo en

los países de esta cuenca donde se citó por primera vez como plaga de los frutales (Moner et al. 1988). De la morfología de sus diferentes fases de su ciclo biológico, cabe destacar: a) Huevo: Alargado y curvado, de 1 mm longitud x 0,2 mm de anchura. De color blanco cremoso y brillante, con su superficie ventral algo aplanada y el corion liso, sin ningún tipo de relieve. En la región anterior se presenta un micrópilo con forma tuberculada; Fase larvaria: Con 3 estados. La morfología (Fig. 3) de esta fase es la típica

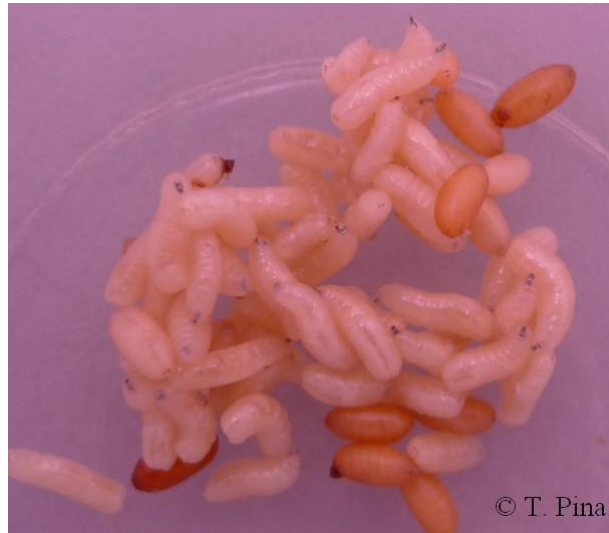


Fig. 3. Larvas de *Ceratitidis capitata* (Wiedemann).

que exhiben los dípteros braquíceros: ápodas, alargadas y ahusadas, translúcidas en sus dos primeros estados, adquiriendo una coloración blanco cremosa en el último. En su extremo anterior (que coincide con la zona más aguda) pueden observarse los garfios bucales de color oscuro. Cuando completan su desarrollo, alcanzan entre 7 y 9 mm de longitud y 2 mm de anchura, aunque este tamaño depende de la dieta y tipo de fruto del que se ha alimentado. Se distinguen de las larvas de otros tefrítidos por el número de túbulos (7-11) que portan los espiráculos anteriores o torácicos; Pupa (Fig. 4): Se



Fig. 4. Pupas de *Ceratitidis capitata* (Wiedemann).

encuentra en el interior de un puparium, cilíndrico y con forma de barrilete, con la superficie lisa y de color marrón oscuro. Sus dimensiones oscilan entre 3,5 y 5 mm de longitud y entre 2 y 2,5 mm de ancho; Adulto: El adulto mide entre 4 y 5,5 mm de longitud y presenta una envergadura alar que alcanza los 9 mm. El cuerpo es de color marrón claro o amarillento, en especial, el abdomen, patas y algunas zonas alares. La cabeza es de color amarillo ocre, con los ojos de color rojo-púrpura brillante. El tórax es convexo, con manchas negras y con setas numerosas; este tagma, presenta una serie de bandas transversales características de color castaño. Las alas presentan irisaciones, con un dibujo abigarrado de manchas grises, amarillas y negras. El abdomen es ovalado, cubierto por encima de setas finas y con dos bandas transversales claras en su mitad basal. La hembra se distingue del macho por la presencia de una ovicauda (Fig. 5) bien diferenciada provista de numerosas setas, amarillas y negras, de naturaleza sensorial. Adicionalmente, el macho (Fig. 6) presenta en la frente un par de largas setas



Fig. 5-6. Hembra (5) y macho (6) de *Ceratitidis capitata* (Wiedemann).

espatuladas, de color negro. Este carácter, además, permite distinguir los machos de esta especie de los del resto de especies de tefrítidos.

Actualmente, con el fin de mejorar el bienestar y el rendimiento en producción animal, se está investigando el control biológico de dípteros nocivos como sustituto del control químico. El control químico implica el uso de sustancias que actúan como contaminantes de los diferentes productos ganaderos y como potenciales alérgenos causantes de diferentes alteraciones patológicas en la población humana. Debido a este hecho, se está iniciando el uso del control biológico *sensu stricto* en ganadería, basado fundamentalmente en el uso de depredadores y parasitoides, aunque también se utilizan patógenos como diversas especies de nematodos de los géneros *Heterorhabditis* Poinar y *Steinernema* Travassos -por ejemplo, contra la mosca causante de la miasis en ovejas, *Lucilia sericata* (Meigen)- (Toth et al. 2005), o bien hongos de los géneros

*Metarhizium* Sorokin, *Beauveria* Vuillemin, o *Lecanicillium* Roberts contra dípteros ceratopogónidos (Ansari et al. 2010). A este respecto, existen estudios que indican que en ambientes tales como las unidades de producción pecuaria los enemigos naturales de las “moscas” rara vez alcanzan los niveles suficientes como para ejercer un control efectivo. Esta falta de eficiencia (propia, en muchas ocasiones, de la especie de enemigo natural, por ejemplo de presentar un menor potencial biótico que la especie nociva), indica que una solución obvia radica en el aumento de parasitoides y depredadores mediante liberaciones masivas durante las diferentes generaciones del insecto nocivo (Skovgård y Nachman, 2004). Por tanto, aunque actualmente ya hay información que avala la efectividad del uso de parasitoides contra dípteros nocivos, es necesario optimizar recursos económicos de cara a una posible producción masiva de *S.cameroni* de los mismos. Este es el motivo por el que se planteó el siguiente objetivo en este trabajo fin de máster:

### **3. Objetivo**

Optimización de una cría de laboratorio de *Spalangia cameroni* Perkins con la finalidad de utilizar dicho parasitoide, mediante liberaciones inundativas, contra dípteros presentes en ganado estabulado. Comparación de parámetros biológicos fundamentales obtenidos a partir de dos hospedadores: *Musca domestica* Linnaeus y *Ceratitis capitata* (Wiedemann).

### **4. Material y Métodos**

Las de pupas del hospedador, *C. capitata*, se obtuvieron a partir de una cría de este díptero ubicada en el Laboratorio de Entomología del Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología del I.V.I.A. (Instituto Valenciano de Investigaciones Agrícolas). La metodología utilizada, en dicha cría, sigue con ciertas modificaciones a Albajes, R y Santiago-Álvarez (1980).

Los imagos se mantienen en cajas de cría de metacrilato, de dimensiones de 40x30x30 cm, con una tela de muselina en la parte frontal, en la que se depositan los huevos que se recolectan en bandejas con agua destilada en la base de la jaula. En la parte superior hay dos orificios para instalar el comedero, donde se sitúa una mezcla de proteína hidrolizada y azúcar en proporción 1:4. En el interior se colocan dos bebederos, consistentes en dos botellas de plástico de 500 ml donde se introduce una mecha confeccionada a partir de una bayeta Spontex (Fig. 7).

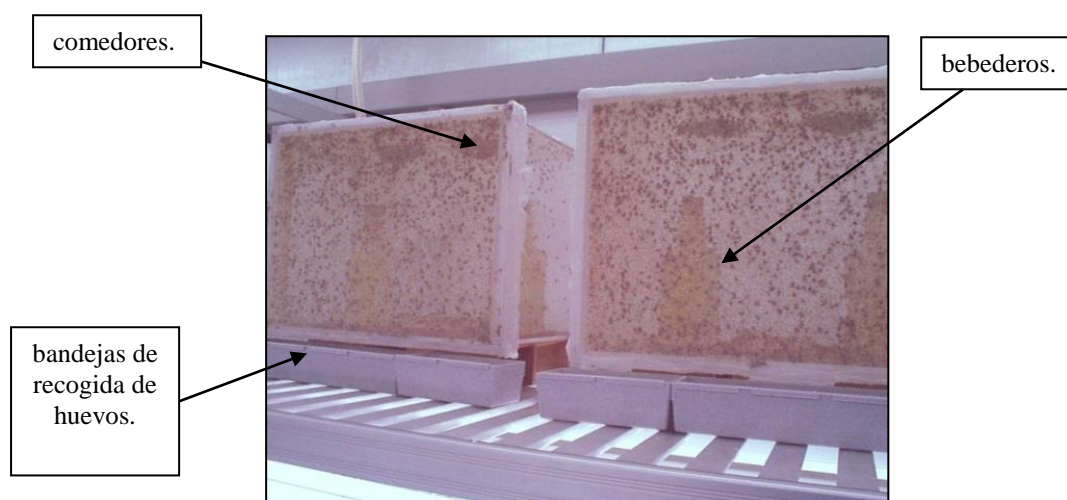


Fig. 7. Caja de cría de *C. capitata* Wiedemann.

Tras la emergencia, alimentación y apareamiento de los adultos, las hembras ovipositan en la tela de muselina, donde quedan los huevos. Éstos son retirados diariamente mediante barrido con un pincel, haciendo que caigan a la bandeja con agua. Posteriormente, se separan mediante la filtración del agua de la bandeja con un embudo de tela fina para, a continuación, con ayuda de un pincel, mezclarlos con una determinada cantidad de solución salina fisiológica. De esta mezcla se siembra un volumen de 0,5 ml en una bandeja de dieta larvaria de 30x20x4 cm, a razón de 4 huevos por gramo de dieta, lo que originará unas 3000 pupas.

La dieta larvaria está compuesta por salvado de trigo (250g), azúcar (70g), levadura de cerveza Sorribas (36,3g), metil paraben Nipagin (2,8g), propil paraben Nipasol (2,8g), ácido benzoico Panreac (2,5g) y agua (600ml). Estos ingredientes,

excepto el agua y el benzoico, se mezclan en una centrifugadora a 90 revoluciones por minutos durante una hora y media, hasta obtener una mezcla homogénea. Posteriormente se añade el agua con el benzoico ya disuelto.

En cada bandeja se colocan 800 g de dieta y se siembran los 0,5ml de huevos de *C. capitata* y se cubre con papel de aluminio para evitar la desecación de la mezcla y proporcionar la ausencia de luz necesaria para el desarrollo de las larvas, debido a su fototropismo negativo. La bandeja se sitúa dentro de otra de mayores dimensiones (60x40x30 cm) cerrada en su parte superior con muselina para permitir la aireación (Fig. 8a). Al cabo de 7-8 días alcanzan las larvas el estado 3 y saltan desde la dieta de la primera bandeja para pupar en el fondo del recipiente mayor (Fig. 8b). Estas pupas son recogidas con ayuda de un pincel y se introducen en las “cajas de emergencia” a la espera de la aparición de los adultos.

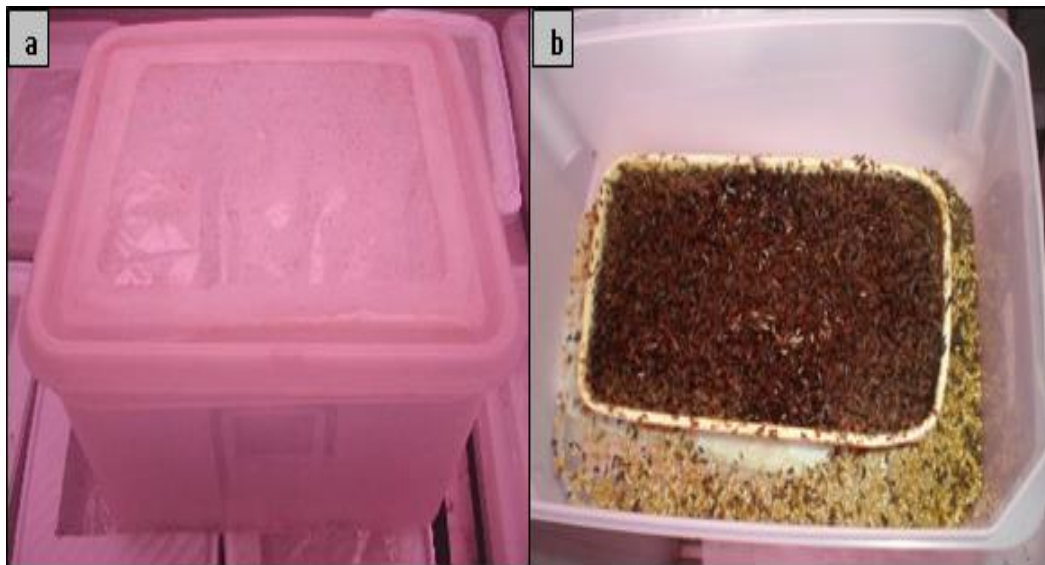


Fig. 8. Bandejas de avivamiento de huevos (a) y obtención de pupas (b).

El mantenimiento de los adultos se lleva a cabo, dentro de las cámaras climáticas (Fig. 9), en las mismas condiciones ambientales que las de las larvas.



Fig. 9. Cámara climática.

Las pupas que se utilizan en la cría del parasitoide, *S. cameroni*, previamente a su utilización son expuestas durante 60' a  $-20^{\circ}\text{C}$ . (Tormos et al. 2008). Este tratamiento conlleva la muerte del 100% de las pupas y, por consiguiente, el que no emerjan adultos de díptero de aquellas pupas que, después de haber sido sometidas a los parasitoides, no hayan sido parasitadas.

Para el mantenimiento de una población estable de *S. cameroni*, se introducen periódicamente nuevos individuos en las cajas de cría provenientes de las cajas de emergencia (una vez por semana). La cría de este parasitoide se lleva a cabo en cajas de metacrilato, con una abertura lateral protegida con una manga de muselina que protege frente a posibles escapes el manejo de los himenópteros, de 40x30x30 cm, con la parte superior cubierta con una tela muselina, que favorece la aireación. Adicionalmente, sobre ésta se restriega miel para la alimentación de los individuos. En el interior se colocan dos bebederos con agua y mechas de bayeta Spontex y una placa Petri con azúcar (Fig. 10). Cada mes aproximadamente se limpia la caja para eliminar a los insectos muertos (la vida media es de 34 días para las hembras y 37 para los machos).

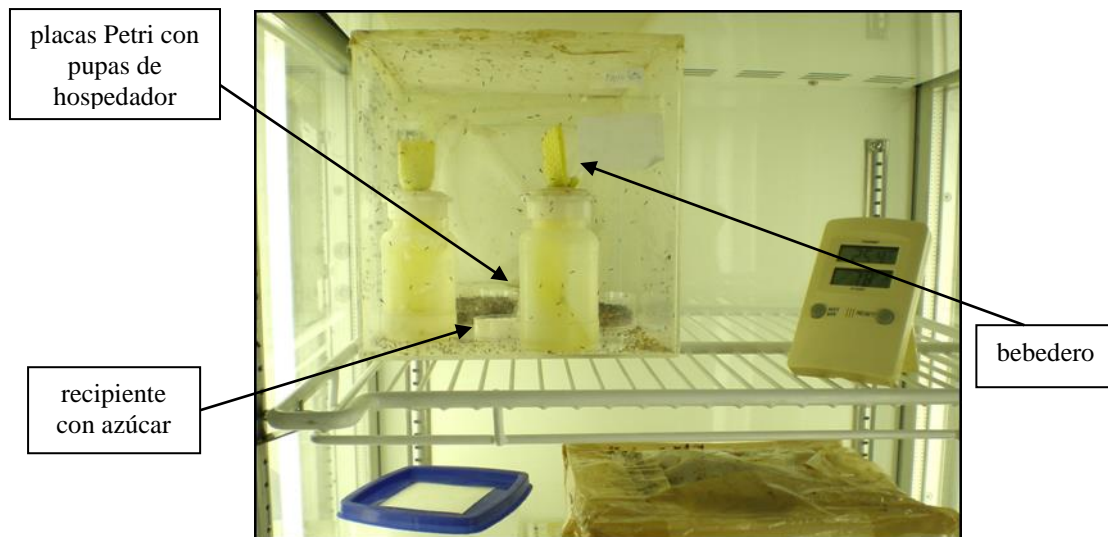


Fig. 10. Caja de cría de *S. cameroni*

La caja de cría del parasitoide se mantiene, dentro de una hot-cold, en condiciones controladas de fotoperiodo, temperatura y humedad. El fotoperiodo es de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. La temperatura y la humedad responden a los siguientes parámetros:  $24\pm 1^{\circ}\text{C}$  de temperatura y 55-65% de humedad relativa durante las horas de luz y  $21\pm 1^{\circ}\text{C}$  de temperatura y 70-80% de HR durante las horas de oscuridad.

Tres veces por semana (lunes, miércoles y viernes) se coloca en la caja de cría de *S. cameroni* una placa Petri con una cantidad de 2.000 pupas de hospedador de unos dos días de edad y que previamente han sido congeladas. Igualmente tres veces por semana se sacan las placas Petri con pupas de díptero, expuestas durante 48 horas a los parasitoides, y probablemente parasitadas. Con motivo de evitar posibles errores en el posterior manejo de las pupas, las fechas de exposición y de recolección de las mismas se anotan en la parte basal de las placas.

Los adultos de *S. cameroni* se recogen en otras cajas de emersión a las que se trasladan las pupas expuestas. En estas cajas (Fig. 11) y a una temperatura que oscila entre  $25-28^{\circ}\text{C}$ , humedad 60-70% y fotoperiodo 16:8, permanecen éstas alrededor de 30 días, periodo necesario para que se desarrollen los adultos del parasitoide. Todos los parasitoides proceden de pupas congeladas.





Fig. 11. Cajas de emersión de *Spalangia cameroni* Perkins. Las placas Petri se tamizan con objeto de obtener los adultos.

Para analizar el efecto, sobre la fecundidad, fertilidad y sex ratio, de la especie a la que pertenece el hospedador, se seleccionaron pupas de *C. capitata* y *M. domestica* de unos dos días de edad. Las pupas de la mosca doméstica fueron proporcionadas por BioFlyTech UA y, previamente a su utilización, se determinó el menor tiempo que producía la muerte del 100% de las pupas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Con este tratamiento se conseguía que no emergieran adultos de díptero de aquellas pupas que, después de haber sido expuestas a los parasitoides, no hubieran sido parasitadas. Las pupas de *C. capitata*, como ya se ha indicado anteriormente, habían sido congeladas previamente a su utilización. En ambos casos las pupas, después de haber sido congeladas, se utilizaban durante 3 exposiciones (de 24 h cada una de ellas) a parasitoides, por lo que eran almacenadas a  $5^{\circ}\text{C}$  durante un período de 6-7 días.

Se llevaron a cabo 2 ensayos, simultáneos (como apéndice de este apartado se describe pormenorizadamente el protocolo seguido), difiriendo cada uno de ellos en la especie de hospedador expuesta. Cada ensayo constó de 30 repeticiones en las cuales la unidad experimental estuvo constituida por una caja de plástico transparente (tipo tuperware,  $15 \times 10 \times 10$  cm), en cuyo interior se depositaban una base de placa Petri ( $3 \times 3$  cm) con 10 pupas de hospedador, una cubierta de placa Petri con azúcar, un recipiente con agua, miel impregnada en papel secante y una pareja de parasitoides de 4-5 días de edad, que habían permanecido juntos desde su emergencia. Cada pareja de parasitoides se expuso, durante 24 horas, al bloque con 10 pupas. En total, cada pareja, se expuso durante 3 días a 3 bloques. Cada ensayo tuvo por tanto una duración total de tres semanas. El número total de huevos depositados por hembra, así como el número total

de emergencias, constituyeron los datos analizados estadísticamente. En cada ensayo, las pupas de 15 repeticiones se abrieron bajo el binocular (Leica MZ8), con la ayuda de agujas enmangadas y pinzas blandas (Tormos et al. 2009), con el objeto de determinar la fecundidad realizada y el superparasitoidismo (Fig. 12). El resto de repeticiones de cada ensayo se dejó evolucionar con objeto de obtener la fertilidad (progenie de adultos). Las unidades experimentales, durante todo el período que duraron los ensayos, permanecieron en una cámara climática Sanyo (MLR350), a  $24\pm 1^\circ\text{C}$  de temperatura y 55-65% de humedad relativa durante las horas de luz y  $21\pm 1^\circ\text{C}$  de temperatura y 70-80% de HR durante las horas de oscuridad. Los datos fueron analizados usando el paquete estadístico SPSS (15.0). A efectos de análisis estadísticos se consideró una única réplica ya que un análisis de varianza (ANOVA), utilizando con factor aleatorio un periodo semanal de exposición no porto ninguna variabilidad adicional. En ningún caso se precisó ninguna transformación antes del análisis, al presentarse los datos normalizados.

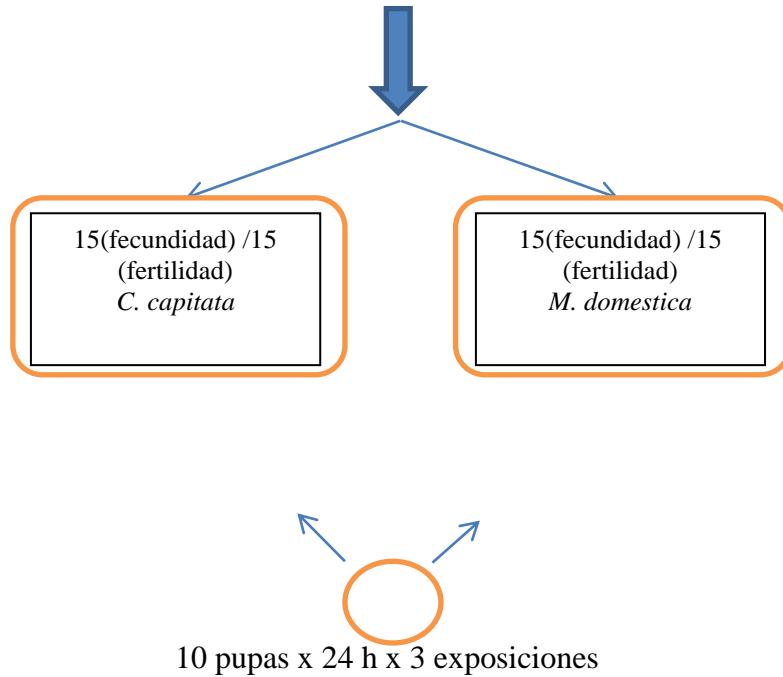


Fig.12. Superparasitismo en pupa de *Ceratitidis capitata*

## <sup>1</sup>Protocolo

### Ensayo<sup>1</sup> de Fecundidad/Fertilidad

30 unidades experimentales<sup>2</sup>/ensayo



<sup>1</sup> Dos ensayos idénticos, uno utilizando como hospedador a *Musca doméstica* y otro utilizando a *Ceratitis capitata*,

<sup>2</sup>unidad experimental: pareja de parasitoides + bloque de pupas (depositadas dentro de la base de una placa Petri) + alimento (azúcar, miel) + agua. Todo contenido en una caja de plástico transparente)

El proceso consistió en:

1. De uno a cinco días antes de la exposición de las pupas a las parejas de *Spalangia cameroni*, se recogían (con aspirador bucal) individuos recién emergidos y se los colocaba en una caja de metacrilato vacía y preparada con agua y azúcar. Esto permitió utilizar adultos jóvenes y aptos para la reproducción, evitando de esta manera usar individuos que pudieran estar en sus últimos días de vida y/o reproducción.

2. Así mismo, un día antes de la exposición por primera vez de pupas a las parejas parasitoides, se preparaban las cajas de experimentación (Fig.13), con tela de muselina (aireación), una placa Petri con azúcar y un bote con agua.



Fig. 13. Caja de experimentación.

3. El día 1 del ensayo todos los individuos, contenidos en la caja de metacrilato usada para recoger individuos jóvenes, se aspiraban y se colocaban individualmente en un tubo con tapa de goma (micro perforada). Una vez recogidos se los observaba bajo la lupa y se los separaba en machos y hembras. Luego de la clasificación se tomaba un macho y una hembra con el fin de formar las parejas, y se colocaban en las cajas de experimentación.

4. El día de 1 del ensayo se colocaban 10 pupas congeladas en una placa Petri de 5x3 cm (Fig. 14), para posteriormente dejar/colocar esta placas en la cajas de experimentación. Finalmente, las cajas de experimentación se depositaban en una hot-cold (MLR350), a  $24\pm 1^{\circ}\text{C}$  de temperatura y 55-65% de humedad relativa durante las horas de luz y  $21\pm 1^{\circ}\text{C}$  de temperatura y 70-80% de HR durante las horas de oscuridad.



Fig. 14. 2 Cajas Petri con 10 de *Ceratitidis* y *Mosca Domestica*

5. Al siguiente día, es decir el día 2 del ensayo se reemplazaba las pupas y se verificaba la presencia de los parasitoides. En el supuesto que hubieran muerto, o no se los localizaba...se reemplazaban.

6. El mismo día 2 del ensayo se abrían las pupas destinadas al estudio de la fecundidad, tanto de *Musca domestica* como de *Ceratitidis capitata*, bajo el binocular con la ayuda de agujas minúsculas. Las pupas destinadas al estudio de la fertilidad y se-ratio se las depositaba en estufa de cultivo hasta su posterior emergencia (+/-30 días). (Fig.15)



Fig.15. Cajas de experimentación en estufa de cultivo para desarrollo

8. Estas tareas se realizaron durante todo el tiempo que duró la realización de los dos ensayos.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La temperatura y tiempo de exposición mínimo que originaron una mortalidad del 100% de las pupas de *M. domestica* fue de -20°C en 120' (Tabla 2). Geden y Kaufman (2007) obtuvieron, para esta especie, un umbral de -80°C en 10'. Con respecto a *C. capitata*, Tormos et al. (2008) obtuvieron una mortalidad del 100% de las pupas tras una exposición de 60' a -20°C.

Exposición a -20°C	Emersión/Total	% Emersión	% Mortalidad
15'	62/65	95,38%	4,61%
30'	18/65	27,69%	72,31%
60'	3/65	4,61%	95,39%
90'	2/65	3,07%	96,93%
120'	0/65	0,00%	100,00%

Tabla 2: Mortalidad de pupas de  $\approx$  2 días de edad por exposición a frío [12.04.13 (exposición)/17.04.13 (inicio emergencia)]. Hasta esta fecha permanecieron en placas Petri en una cámara climática Sanyo MLR350, T°: 21-26°C , HR: 55-85%, fotoperíodo: 16:8 (L:O)]. Por cada tiempo de exposición se dejaron, como testigo, 8 pupas, produciéndose una emergencia de imagos del 100%.

En lo que respecta a los parámetros biológicos presentados por *S. cameroni* a partir de las pupas de cada una de las dos especies de dípteros, se debe indicar que en lo que respecta a la fecundidad, ésta es mayor sobre *M. domestica* que sobre *C. capitata* (Tabla 3). Un ANOVA de una vía reveló que sobre la pupa de *M. doméstica*, *S. cameroni* realiza una mayor oviposición ( $F_{1,28} = 6,71$ ;  $p = 0,01$ ).

	Rango	$\bar{x}$	SE
<i>C. capitata</i>	(0-24)	6,60	6,97
<i>M. domestica</i>	(4-20)	11,86	3,64

Tabla 3. Fecundidad realizada por *S. cameroni*, sobre *C. capitata* y *M. doméstica*, en un período de 6-7 días.

## ANOVA

Fecundidad

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	208,033	1	208,033	6,716	,015
Intra-grupos	867,333	28	30,976		
Total	1075,367	29			

La tasa de parasitoidismo (número de pupas parasitadas, Tabla 4), así como el superparasitoidismo (Tabla 5) presentado por *S. cameroni* también presenta diferencias significativas entre *M. doméstica* y *C. capitata*. En ambos casos es mayor en *M. doméstica* (en lo que respecta a la tasa de parasitoidismo,  $F_{1,28} = 8.97$ ;  $p = 0,006$ ), aunque las diferencias respecto del superparasitoidismo son débilmente significativas ( $F_{1,28} = 4.53$ ;  $p = 0,04$ ).

Fecundidad N° pupas parasitadas

	Rango	$\bar{x}$	SE
<i>C. capitata</i>	(0-11)	5	4,56
<i>M. doméstica</i>	(4-14)	9	2,60

Tabla 4. Tasa de parasitoidismo presentada por *S. cameroni*, sobre *C. capitata* y *M. doméstica*, en un período de 6-7 días.

## ANOVA

n° pupas parasitadas

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	124,033	1	124,033	8,976	,006
Intra-grupos	386,933	28	13,819		
Total	510,967	29			

	<b>Rango</b>	$\bar{x}$	SE
<i>C. capitata</i>	(0-4)	0,86	1,24
<i>M. domestica</i>	(0-6)	1,93	1,48

Tabla 5. Tasa de superparasitoidismo presentada por *S. cameroni*, sobre *C. capitata* y *M. doméstica*, en un período de 6-7 días.

### ANOVA

#### Superparasitismo

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	8,533	1	8,533	4,537	,042
Intra-grupos	52,667	28	1,881		
Total	61,200	29			

La fertilidad, así como la proporción de hembras obtenidas (Tabla 6) ( $F_{1,28} = 9,84$ ;  $p = 0,004$ ), es mayor utilizando como hospedador *M. domestica* (Tabla 7) ( $F_{1,28} = 15,55$ ;  $p = 0,0001$ ),..

	<b>Rango</b>	$\bar{x}$	SE
<i>C. capitata</i>	(0-7)	1,06	1,98
<i>M. domestica</i>	(0-9)	3,66	2,52

Tabla 6. Proporción de hembras obtenidas por *S. cameroni*, sobre *C. capitata* y *M. doméstica*, en un período de 6-7 días.



## ANOVA

Hembras obtenidas

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	50,700	1	50,700	9,840	,004
Intra-grupos	144,267	28	5,152		
Total	194,967	29			

	Rango	$\bar{x}$	SE
<i>C. capitata</i>	(0-4)	0,93	1,38
<i>M. domestica</i>	(0-7)	3,20	1,93

Tabla 7. Fertilidad presentada por *S. cameroni*, sobre *C. capitata* y *M. doméstica*, en un período de 6-7 días.

## ANOVA

Fertilidad total

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	177,633	1	177,633	15,556	,000
Intra-grupos	319,733	28	11,419		
Total	497,367	29			

Una prueba Ji-cuadrado (Tabla 8) mostró que no se presentan diferencias significativas entre el sex-ratio obtenido de pupas de ambas especies ( $X^2=1,03$ , d.f.=1,  $p=0,308$ ).

Tabla 8. Tabla de contingencia 1 (macho) 2 (hembra) 1 (*C. capitata*), 2 (*M. domestica*)

			1 ( <i>C. capitata</i> ), 2 ( <i>M. domestica</i> )		Total
			1,00	2,00	
1 (macho)	1,00	Recuento	14	48	62
2 (hembra)		% de 1 (macho) 2 (hembra)	22,6%	77,4%	100,0%
		% de 1 ( <i>C. capitata</i> ), 2 ( <i>M. domestica</i> )	45,2%	55,8%	53,0%
		% del total	12,0%	41,0%	53,0%
	2,00	Recuento	17	38	55
		% de 1 (macho) 2 (hembra)	30,9%	69,1%	100,0%
		% de 1 ( <i>C. capitata</i> ), 2 ( <i>M. domestica</i> )	54,8%	44,2%	47,0%
		% del total	14,5%	32,5%	47,0%
Total		Recuento	31	86	117
		% de 1 (macho) 2 (hembra)	26,5%	73,5%	100,0%
		% de 1 ( <i>C. capitata</i> ), 2 ( <i>M. domestica</i> )	100,0%	100,0%	100,0%
		% del total	26,5%	73,5%	100,0%

### Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral )
Chi-cuadrado de Pearson	1,038(b)	1	,308		
Corrección por continuidad(a)	,654	1	,419		
Razón de verosimilitudes	1,037	1	,308		
Estadístico exacto de Fisher				,402	,209
Asociación lineal por lineal	1,029	1	,310		
N de casos válidos	117				

a Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 14,57.

A pesar de que resultados previos indican que el parasitoidismo obtenido a partir de *S. cameroni*, utilizando hospedadores muertos por frío y almacenados a 4-5°C, es significativamente diferente del obtenido utilizando pupas vivas (Floate 2002), los resultados de este estudio están de acuerdo con lo conseguido por Geden y Kaufman (2007), Tormos et al. (2008) y Ogawa et al. (2012). Dichos autores obtuvieron, utilizando pupas muertas y almacenadas a 4-5°C durante un período, en ocasiones de hasta 2 meses, un parasitoidismo bastante similar al obtenido por *S. cameroni* sobre pupas vivas. Adicionalmente, cabe mencionar que los directores del presente trabajo no han obtenido diferencias significativas en lo que respecta a la fertilidad, fecundidad, sex-ratio y niveles de superparasitoidismo, presentados por adultos de *S. cameroni* obtenidos de pupas vivas o congeladas, parasitando a su vez pupas tratadas y no tratadas (Beitia et al. datos no publicados).

En cuanto a la especie de hospedador utilizada, los resultados obtenidos indican –que siempre que se disponga de un gran número de pupas de pupas de *M. domestica* a bajo coste- es más beneficioso utilizar como hospedador, en crías de laboratorio de *S. cameroni*, la mosca doméstica. A este respecto, se puede indicar que hay estudios realizados en explotaciones de ganado lechero y porcino que indican que *S. cameroni* es un parasitoide que actúa eficazmente en el control biológico de la *M. doméstica*, dando lugar a supresiones significativas de la población de las mismas hasta el punto de disminuir los niveles de molestia (Skovgård & Nachman 2004). Adicionalmente, existen casas comerciales, como por ejemplo Productos biológicos Perkins Ltda (<http://perkinsltda.com.co/>) que utilizan *S. cameroni* contra dípteros presentes en ganado estabulado, caballerizas, ganado en pastoreo, porquerizas...teniendo establecidos unos protocolos de actuación precisos. Los resultados dados a conocer en este estudio probablemente podrían mejorar dichos protocolos. Por ejemplo, sino evitar, minimizar, el empleo de trampas para la captura de imagos de díptero.

## 6. CONCLUSIONES

- 1.- La utilización de pupas de *Musca domestica* Linnaeus, sometidas durante un período de 2 horas a – 20°C, son aptas para ser utilizadas en la cría de laboratorio del pteromárido: *Spalangia cameroni* Perkins.
- 2.- En la cría de laboratorio de *Spalangia cameroni* Perkins, los parámetros biológicos fundamentales del potencial biótico, como son la fecundidad y la fertilidad, se ven favorecidos cuando se utiliza, como hospedador, pupas congeladas de *Musca domestica* Linnaeus frente a las de *Ceratitis capitata* (Wiedemann). El sex-ratio no varía.
- 3.- El hospedador más adecuado, para las cría de laboratorio de *S. cameroni* Perkins, entre *Musca domestica* Linnaeus y *C. capitata* (Wiedemann), es a priori *M. domestica* Linnaeus, siempre que se disponga de una cría factible de la misma.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- 1 ABRAMS, L. 1976. Cestodosis en gallinas ponedoras alojadas en baterías. *JS Afr. Vet.Assoc*, V 47, p. 171-173
2. ALBAJES, R; SANTIAGO-ÁLVAREZ, C. 1980a. Efectos de la densidad larvaria y de la alimentación en la proporción de sexos de *Ceratitis capitata* (diptera/ trypetidae). *Anales del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Serie Agrícola*, 13: 175-182.
3. ALBAJES, R; SANTIAGO-ÁLVAREZ, C. 1980. Influencia de la temperatura en el desarrollo de *Ceratitis capitata* (Diptera/trypetidae.). *Anales del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Serie Agrícola*, 13: 183-190.
4. ANSARI, MA; CARPENTER, S; BUTT, TM. 2010. Susceptibilidad de larvas de jején Culicoides que muerden a los hongos patógenos de insectos, *Metarhizium anisopliae*: Perspectivas para el control de la lengua azul vector. *Acta Tropical* 113 (1), pp 1-6.
5. BIRKEMOE, T; SOLONG, A; AAK. 2008. Biological control of musca domestica and stomoxys calcitrans by mass releases of the parasitoid *Spalangia cameroni* on two Norwegia pig farms. *Bio control*, vol 54, pp, 425-436
6. CHAKRABARTI, S; KING, D.J; CARDONA, CJ. 2008.Persistencia del virus de la enfermedad exótica de Newcastle (ENDV) en laboratorio infectados Musca domestica y Fannia canicularis. *Enfermedades aviares(avian Diseases)*, vol 52, N ° 3, pp 375-379.
7. CRESPO, D.C., LECUONA, R.E; HOGSSETTE, J.A. 1998. Biological control: an important in integrated management of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) incaged-layer poultry houses in Buenos Aires, Argentina. *Biological Control*, 13: 16-24.

8. CHINERY, M. 1980. Guía de campo de los insectos de España y Europa. Barcelona: Omega, pp. 402.
9. CHINERY, M. 1986. *Guía de los insectos de Europa*. Barcelona: Omega. pp. 320.
10. FLOATE, K.D. 2002. Production of Filth Fly Parasitoids Hymenoptera: Pteromalidae) on Fresh and on Freeze-killed and Stored House Fly Pupae. *Biocontrol Science and Technology*, 12: 595-603.
11. GEDEN, C.J. 1996. Modeling host attacks and progeny production of *Spalangia gemina*, *Spalangia cameroni*, and *Muscidifurax raptor* (Hymenoptera: Pteromalidae) at constant and variable temperatures. *Biological Control*, 7: 172-178.
12. GEDEN, C.J. Y HOGSETTE, J.A. 2006. Supression of haouse flies (Diptera: Muscidae) in Florida poultry houses by sustained releases of *Muscidifurax raptorellus* and *Spalangia cameroni* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Enviromental Entomology*, 35 (1): 75-82.
13. KAUFMAN P.E; LONG, S.J; RUTZ, D.A. 2001. Impact of exposure length and pupal source on *Muscidifurax raptorellus* and *Nassonia vitripennis* (Hymenoptera: Pteromalidae) parasitism in a New York poultry facility. *Journal of Economic Entomology*, 94: 998-1003.
14. LERAUT, P. 2007. Insectos de España y Europa. Barcelona: Lynx Edicions. pp. 528.
15. MILUSHEV, I. 1978. Role of flies in the epizootiology of coccidiosis in poultry. *Vet Med Nauki*, 15 (8): 26-9.

16. MONER, J.P; PETIT V.R; BERNAT J. 1988. La mosca de las frutas, (*Ceratitis capitata* Wied.). Ed: Generalitat Valenciana, Conselleria d'Agricultura i Pesca. Servei de Protecció dels Vegetals. 60 pp. Almassora, Castelló. España.
17. MORGAN, P.B. Y PATTERSON, R.S. 1990. Efficiency of target formulations of pesticides plus augmentative releases of *Spalangia endius* Walker (Hymenoptera: Pteromalidae) to suppress populations of *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) at poultry ranches in the southeastern United States. In D. A. Rutz and R. S. Patterson (eds.), *Biocontrol of arthropods affecting livestock and poultry*. Westview, Boulder, CO, pp69-78
18. NOVARTIS ANIMAL HEALTH INC, PERKINS LTDA; PROTONET. [http://www.ah.novartis.com/fhp/en/fly\\_control.shtml](http://www.ah.novartis.com/fhp/en/fly_control.shtml). 2013, 26-06, 10:57.
19. OGAWA, K; KATSURA, I; TATSUYA, F; shin-ichi, T. AND RYO, A. 2012. Host Suitability of House Fly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae), Pupae Killed by High or Low Temperature Treatment for a Parasitoid, *Spalangia endius* (Hymenoptera: Pteromalidae). *The Scientific world Journal*, Volume, Article ID 214907, 4 pages doi:10.1100/2012/214907.
20. PRODUCTOS BIOLÓGICOS PERKINS. LTDA. <http://perkinsltda.com.co/>. 2013,15-06.20:30.
21. REICHOLF, H; DE KARLSRUGE, G,J. 1990. Insectos y arácnidos. Barcelona: Blume. pp, 287.
22. ROSEF, O; AND KAPPERUD, G. 1983. House flies (*Musca domestica*) as possible vectors of *Campylobacter fetus* subsp.jejuni.. *Applied Environmental Microbiology*, Vol 45, No 1, pp 381–383.

23. SKOVBGARD, H. Y NACHMAN, G. 2004. Biological control of house fly *Musca domestica* and stable flies *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) by means of inundative releases of *Spalangia cameroni* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Bulletin of Entomological Research*, 94: 555-567.
24. SKOVBGARD, H. 2006. Search efficiency of *Spalangia cameroni* and *Mucoides furax* on *Musca domestica* pupae in dairy cattle farms in Denmark. *Bio control*, Vol. 51: 49-64
25. STEENBERG, T., SKOVBGARD, H. Y KALSBECK, A. 2001. Microbial and biological control of flies in stables. *DJF Rapport, Markbrug*, n° 49: 91-94.
26. TORMOS, J; POLIDORI, C; ASIS, J.D Y GAYUBO, S.F. 2008. Description of mature larvae of *Allodynerus rossii* (Lepeletier), *Ancistrocerus auctus* (Fabricius), *Euodynerus dantici* (Rossi) and *Symmorphus murarius* (Linnaeus) (Hymenoptera, Vespidae). *Zootaxa*, 1946: 42–54.
27. TORMOS, J; BEITIA, F; BOCKMANN, E.A Y ASIS, J.D. 2009. The preimaginal stages and development of *Spalangia cameroni* Perkins (Hymenoptera: Pteromalidae) on *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). *Micron*, 40: 646-658.
28. TOTH, EM; MARIALIGETI, K; FODOR, A; LUCSKAI, A; FARKAS, R.2005. Evaluación de la eficacia de los nematodos entomopatógenos contra larvas de *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) (Diptera: Calliphoridae) *Acta Veterinaria Hungarica*, 53 (1), pp 65-71.
29. WANARATANA, A; AMONSIN, A; CHAISING, S; PANYING, J; SASIPREEYAJAN; PAKPINYO, S. 2013. Experimental Assessment of Houseflies as Vectors in Avian Influenza Subtype H5N1 Transmission in Chickens. *Avian Diseases*. June 2013, Vol. 57, No. 2, pp. 266-272.



