



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA

MÁSTER EN PRODUCCIÓN ANIMAL

Evaluación de distintos parámetros de calidad de un parasitoide comercial (*Muscidifurax raptorellus*) y su adaptación a distintos dípteros hospedadores (*Musca domestica*, *Ceratitis capitata*, *Muscina stabulans*) en condiciones experimentales.

Tesis de Máster
Valencia, septiembre 2017

Angela María Guzmán Sánchez

Directores:

Bernat Peris Palau
Francisco Beitia Crespo
José Tormos Ferrando

AGRADECIMIENTOS

Llegar hasta aquí ha sido un camino duro y por ello quiero agradecer a esas personas que me han acompañado durante este tiempo y dándome empujones de aliento para llegar hasta el final. En primer lugar, a Dios, por darme la fortaleza para poder lograr esta meta planteada, a mis padres José Guzmán y Magaly Sánchez y hermanas Alba y Wanda Guzmán, que siempre han estado conmigo y me han llenado de valor para no desistir en cumplir esta meta, dándome el apoyo con cada palabra de aliento y transmitiéndome su amor en cada momento. Y a todos mis amigos que me han apoyado incondicionalmente.

Durante este camino también he encontrado personas invaluableles que me han ayudado a las cuales quiero agradecerles su apoyo. Gabriela Rodríguez, Abraham Martínez, Alejandro Orosco y Yolvi López, gracias por hacer este año más divertido y gracias porque con ustedes descubrí puedo sentirme en casa, aunque esté lejos de ella, se han vuelto mi segunda familia.

A nuestros docentes, gracias por transmitir sus conocimientos de la forma en que lo han hecho.

Quiero agradecer a la empresa Bioteknia Servicios Ambientales, y en particular a su Director Técnico, Francisco J. Calatayud, por el apoyo en la realización de este trabajo y el haberme provisto desinteresadamente de los ejemplares de *Muscidifurax raptorellus* utilizados en el mismo.

Finalmente, a los directores de este proyecto: Dr. Francisco Beitia (investigador del IVIA), Dr. José Tormos (catedrático de la Universidad de Salamanca) y Dr. Bernat Peris (profesor asociado del Departamento de Ciencia Animal de la Universitat Politècnica de Valencia), que sin su guía y apoyo no hubiera sido posible realizar este proyecto.

RESUMEN

Muscidifurax raptorellus (Hymenoptera, Pteromalidae) es un himenóptero que se utiliza, en establos y galpones avícolas, con objeto de llevar un control biológico adecuado de dípteros molestos, o perjudiciales, para los animales estabulados. En el presente estudio, se evalúan los parámetros de calidad de este parasitoide comercial, así como su adaptación a distintas especies de dípteros hospedadores -perjudiciales tanto desde el punto de vista agrícola como ganadero- en condiciones de laboratorio. Los resultados obtenidos muestran que *M. raptorellus* presenta un parasitismo más acentuado ("preferencia innata") en hospedadores pertenecientes a la familia de los múscidos (perjudiciales al ganado), frente a hospedadores tefrítidos (perjudiciales a cultivos), y dentro de aquellos por la especie *M. stabulans*. Independientemente del hospedador natal (*Musca domestica* o *Ceratitiscapitata*) utilizado en la cría de este pteromárido, y en ensayos "sin condicionamiento (=aprendizaje)", parámetros dependientes del potencial biótico, como la fecundidad y fertilidad, son más elevados cuando se expone este parasitoide a pupas de *M. domestica*, o *Muscina stabulans*, que a pupas de *C. capitata*. No obstante, a pesar de la menor longevidad que presentan las hembras de *M. raptorellus* cuando son criadas sobre *C. capitata*, así como la menor fecundidad de las mismas antes de condicionarse a esta especie de tefrítido y, adicionalmente, la preferencia innata que muestra este parasitoide por hospedadores de gran tamaño (múscidos), *M. raptorellus* presenta unos parámetros de potencial biótico: fecundidad, fertilidad y "sex ratio", cuando se cría a partir de pupas muertas de *C. capitata* por congelación semejantes a los que presenta cuando se cría sobre múscidos. En cuanto a la calidad de los productos comercializados, con base de *M. raptorellus*, por la empresa Koppert Biological Systems, los resultados obtenidos muestran que tanto fertilidad como el "sex ratio" presentan unos valores que se podrían considerar dentro de un rango de calidad aceptable.

ABSTRACT

Muscidifurax raptorellus (Hymenoptera: Pteromalidae) is a hymenopteran used in poultry sheds and stables, in order to carry out a suitable biological control of diptera annoying or harmful to animals. In the present study, assesses the quality parameters of this commercial parasitoid, as well as their adaptation to different species of Diptera hosts - detrimental to both from the point of view agricultural and livestock- in laboratory conditions. The results obtained show that *M. raptorellus* parasitism presents a more pronounced ("innate preference") in hosts belonging to the family of the muscids (harmful to livestock), compared to tephritids hosts (harmful to crops), and within those for the species *Muscina stabulans*. Regardless of the host natal (*Musca domestica* or *Ceratitis capitata*) used in the breeding of this pteromalid, and in trials "without conditions (= learning)", dependent parameters of the biotic potential, such as fecundity and fertility, are higher when exposed this parasitoid to pupae of *M. domestica*, or *M. stabulans*, to pupae of *C. capitata*. However, despite the lower longevity that present the females of *M. raptorellus* when they are reared on *C. capitata*, as well as reduced fertility before conditional to this kind of tephritid and, in addition, the innate preference that shows this parasitoid by hosts of great size (muscids), *M. raptorellus* presents a few parameters of biotic potential: fecundity, fertility and "sex ratio", when one grows up from dead pupae of *C. capitata* by freezing similar to those presented when breeding on muscids. With regard to the quality of marketed products, on the basis of *M. raptorellus*, by the company Koppert Biological Systems, the results show that both fecundity as the "Sex ratio" values that might be considered within a range of acceptable quality.

RESUM

Muscidifurax raptorellus (Hymenoptera, Pteromalidae) és un himenòpter que s'utilitza, en estables i coberts avícoles, a fi de portar un control biològic adequat de dípters molestos, o perjudicials, per als animals estabulats. En el present estudi, s'avaluen els paràmetres de qualitat d'este parasitoide comercial, així com la seua adaptació a distintes espècies de dípters allotjadors -perjudicials tant des del punt de vista agrícola com a ramader- en condicions de laboratori. Els resultats obtinguts mostren que *M. raptorellus* presenta un parasitisme més accentuat ("preferència innata") en allotjadors pertanyents a la família dels múscids (perjudicials al ramat), enfront d'allotjadors tefrítidos (perjudicials a cultius), i dins d'aquells per l'espècie *M. stabulans*. Independentment de l'allotjador natal (*Musca domestica* o *Ceratitis capitata*) utilitzat en la cria d'este pteromàlido, i en assajos "sense condicionament (=aprenentatge)", paràmetres dependents del potencial biòtic, com la fecunditat i fertilitat, són més elevats quan s'exposa este parasitoide a pupes de *M. domestica*, o *Muscina stabulans*, que a pupes de *C. capitata*. No obstant això, a pesar de la menor longevitat que presenten les femelles de *M. raptorellus* quan són criades sobre *C. capitata*, així com la menor fecunditat de les mateixes abans de condicionar-se a esta espècie de tefrítido i, addicionalment, la preferència innata que mostra este parasitoide per allotjadors de grans mides (múscids), *M. raptorellus* presenta uns paràmetres de potencial biòtic: fecunditat, fertilitat i "sex ràtio", quan es cria a partir de pupes mortes de *C. capitata* per congelació semblants a què presenta quan es cria sobre múscids. Quant a la qualitat dels productes comercialitzats, amb base de *M. raptorellus*, per l'empresa Koppert Biological Systems, els resultats obtinguts mostren que tant fertilitat com el "sex ràtio" presenten uns valors que es podrien considerar dins d'un rang de qualitat acceptable.

INDICE DE CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN	1
2	JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	11
3	OBJETIVOS	12
4	MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
6	CONCLUSIONES	38
7	BIBLIOGRAFÍA	40

1 INTRODUCCIÓN

El ganado contribuye de una manera evidente a la producción de alimentos y progreso del mundo agrario y representa un elemento transcendental para la satisfacción de las necesidades nutricionales globales futuras, y para optimizar la calidad de la vida en muchas sociedades rurales.

Uno de los mayores inconvenientes que se presentan en la actividad pecuaria está causado por los parásitos externos. Las poblaciones altas de estos organismos causan incomodidades a los animales, pudiendo provocar enfermedades, molestia, e incluso ocasionar una disminución de su producción debido al estrés producido por estos parásitos.

Entre los insectos, los dípteros y, en particular, aquellos conocidos vulgarmente como “moscas, son de gran interés médico sanitario, y su presencia, distribución y abundancia en las áreas metropolitanas son factores de gran importancia en salud pública (Marchiori y Silva, 2001). Así, por ejemplo, los imagos de *Fannia pusio* Wiedemann, 1830 (Díptera: Fanniidae) se encuentran frecuentemente asociados en ambientes modificados por el hombre, y sus larvas se desarrollan en materia orgánica en descomposición (Pont, 1977).

La distribución de las moscas es cosmopolita, ya que están ausentes sólo en la Antártida. La península ibérica presenta unas características biogeográficas, que unidas a las variaciones de sus variables ambientales, permiten que la fauna dipterológica sea muy abundante (López y Molina, 2005).

Entre los parásitos externos que afectan a la ganadería destacan los dípteros cliclorrafos, entre los cuales podemos mencionar a los múscidos: *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758), (mosca de los establos), *Musca domestica* (Linnaeus, 1758) (mosca común) y *Muscina stabulans* (Fallén, 1817) (falsa mosca de los establos). Estos dípteros plaga son vectores de patógenos que pueden traer como consecuencia merma en la productividad y rendimiento en animales de granja.

La ganadería intensiva, las industrias alimentarias, los productos industriales y los cultivos hortícolas son afectados por plagas de estas especies de moscas. De su nociva acción, cabe destacar el estado de estrés que producen, tanto en las personas como en los animales, que conlleva una merma en la productividad y rendimiento del ganado (López y Molina, 2005).

El hombre ha utilizado fundamentalmente el control químico para combatir a estas especies, lo que ha desembocado en problemas de resistencia, así como en un incremento de los costes de producción. Por estas razones, se vienen buscando métodos alternativos de control, como la lucha biológica con parasitoides pupales generalistas pertenecientes a la familia de los pteromálidos y a los géneros *Pachycrepoideus*, *Spalangia* y *Muscidifurax* (Ortiz y Torres, 1983; Zamora, 1996).

En lo que respecta al último de los géneros mencionados en el párrafo anterior, la especie: *Muscidifurax raptorellus* (Kogan y Legner, 1970) –objeto de estudio en el presente TFM es un himenóptero parasitoide de la familia de los pteromálidos común en establos y galpones avícolas en el neotrópico sudamericano, de hábitos nocturnos, cuya actividad se evidencia al ovipositar en el interior de los puparios de *M. domestica*. Mediante su actividad parasitaria, reduce las poblaciones de sus hospedadores hasta niveles bastante significativos, llevando a cabo, por tanto, un control biológico adecuado de: *M. domestica*, *S. calcitrans* y *Haematobia irritans* (Linnaeus, 1758) (Díptera: Muscidae) (Rutz y Scoles 1989; Antolin *et al.*, 1996; Zamora, 1996; Geden, 1998; Floate y Fox, 1999; Lysyk, 2001; Inciso e Iannacone, 2008).

El control biológico aceptable, mediante incremento, que puede llevar a cabo *M. raptorellus* contra dípteros molestos al ganado y teniendo en cuenta la falta de estudios sobre los parámetros de calidad en las crías, sobre todo con los referentes al potencial biótico, nos han conducido a realizar este estudio.

En la actualidad se están desarrollando programas de control biológico con estos insectos parasitoides, tanto en América como en algunos países europeos, como Noruega y

Dinamarca (Skovgard y Jespersen, 1999). Sin embargo, en España la aplicación de estas estrategias de control biológico se está implementando en fase inicial, obteniendo ya buenos resultados.

1.2 Aspectos taxonómicos, morfológicos, ecológicos y biológicos de las especies de *Muscidifurax*

Los pteromálidos se pueden encontrar en todo el mundo bajo una amplia gama de condiciones ambientales. Dentro de esta familia, el género *Muscidifurax* está representado por tres especies con importancia desde el punto de vista de la lucha biológica: *Muscidifurax raptor* (Girault y Sanders, 1910) *M. raptorellus* y *M. zaraptor* (Kogan y Legner, 1970). Cada una de estas especies difiere en cierto grado en la elección del hábitat, la especie de hospedador y el comportamiento. Algunas de las especies de *Muscidifurax* muestran un comportamiento gregario en las fases inmaduras, mientras que son solitarias en fase de imago. Del mismo modo, algunas especies prefieren los hábitats constantemente húmedos, como el estiércol, mientras que otros prefieren las zonas más secas, como lecho de paja con manchas de estiércol. La abundancia y la preferencia del hábitat de cada especie del parasitoide pueden variar según la región y la estación. Las larvas maduras de las especies encuadradas en este género son de tipo himenopteriforme, mientras que los imagos son macrópteros y de pequeño tamaño (1-3 mm de longitud) (Rueda y Axtell, 1985). Debido a que sólo atacan a las pupas de dípteros, son inofensivas para los seres humanos.

La especie de *Muscidifurax* objeto de estudio en el presente TFM: *M. raptorellus* es un reconocido parasitoide de pupas de múscidos (Morgan *et al.*, 1979) y se utiliza para el control de estos dípteros en sistemas de producción animal en confinamiento.

1.3 Ciclo biológico y descripción de *M. raptorellus*

El adulto de *M. raptorellus* es una avispa minúscula y negra, con estilo de vida parasitoide, lo que significa que en su fase larvaria se alimenta y mata a su hospedador. El imago es la única fase durante su ciclo de vida donde su presencia es obvia para los seres humanos, ya que las fases preimaginales de huevo, larva y pupa se desarrollan dentro del pupario del hospedador al que ataca. *M. raptorellus* experimenta metamorfosis completa, lo que significa que se desarrolla de huevo a larva, atraviesa varios estadios larvarios, se transforma en pupa y luego emerge como adulto (Fig. 1) El ciclo de vida de este parasitoide se completa en 15-20 días a 25°C y en 13-15 días a 27,8°C (Rueda y Axtell, 1985). La vida media del adulto es de 26 días y depende fundamentalmente de la temperatura; a medida que aumenta la temperatura (desde 15,5 °C a 32 °C), disminuye la longevidad del adulto. La mayor fertilidad se da a 25 °C.

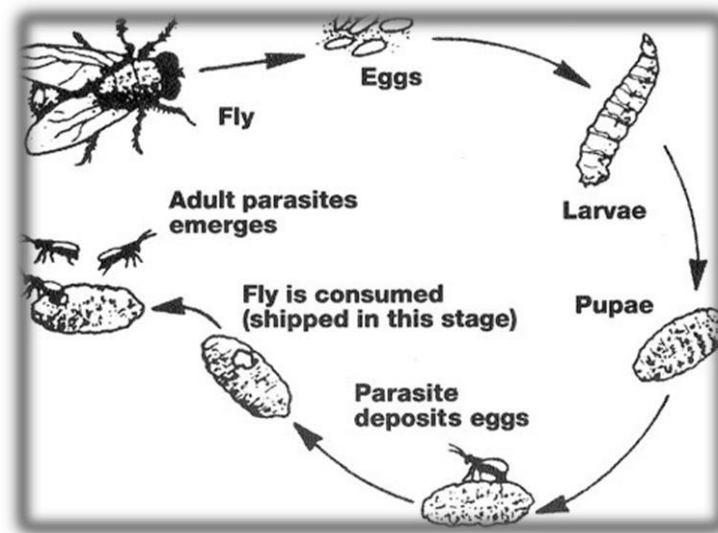


Fig. 1. Ciclo biológico de *Musca* sp y *Muscidifurax raptorellus*
Fuente: <http://www.capricorn-it.co.za/biofly.co.za/the%20wasp.htm>

Fase de huevo

El huevo de *M. raptorellus* es opaco, oblongo y de aproximadamente 0,4 mm de longitud (Fig. 2). Los huevos son depositados en el interior del pupario de la mosca (Fig. 3).



Fig. 2. Huevo *Muscidifurax raptorellus*



Fig. 3. Huevos de *Muscidifurax raptorellus* sobre larva de *Muscina stabulans*

Fase larvaria

Las larvas de *M. raptorellus* son himenopteriformes con coloración blanco-cremosa (Fig. 4) a oscura (Fig. 5) y con una longitud que oscila entre 0,5 y 2,5mm. Inmediatamente emergen del huevo se adhieren a la pupa del hospedador con sus piezas bucales con el fin de alimentarse, siendo capaces de moverse a lo largo del pupario durante toda la fase larvaria.



Fig. 4 Larvas de diferentes estados de *Muscidifurax raptorellus*



Fig. 5. Larva madura postdefecante de *Muscidifurax raptorellus*

Fase de pupa

Las pupas de *M. raptorellus* son muy semejantes al imago. No construyen pupario al estar protegidas en el interior del pupario del hospedador y durante su desarrollo su coloración cambia de blanco cremosa (Fig. 6) a negra (Fig. 7).



Fig. 6. Pupas, en vista ventral, de *Muscidifurax raptorellus* escasamente tonificadas



Fig. 7. Pupas, en vista dorsal, de *Muscidifurax raptorellus* tonificadas

Adultos

La longitud del imago oscila entre 1,7 y 2,5 mm. Son negros, excepto las alas que son incoloras (Fig. 8). Cuando se les molesta, realizan cortos vuelos. Las hembras están receptivas al apareamiento inmediatamente emergen del pupario del hospedador (Morgan, 1981).



Fig. 8. Adultos de *Muscidifurax raptorellus*, vista ventral (A: macho, B: hembra)

La localización del mismo y la posterior oviposición se lleva a cabo siguiendo las siguientes pautas comportamentales: a) localización de su hábitat, b) localización del hospedador y c) aceptación del mismo y oviposición (Ridgway y Vinson, 1977). Esta secuencia puede tardar entre 10 y 15 minutos (Morgan 1981), pudiendo penetrar los adultos, en el estiércol, hasta 5 cm en busca de pupas de moscas (Rueda y Axtell, 1985).

Los huevos eclosionan a los dos o tres días después de ser depositados y la larva pasa por tres estados larvarios durante un período de 10-13 días, seguido por una etapa pupal de 8- 12 días, con la emergencia del adulto cerca de tres semanas después de que el huevo fue puesto. Los machos suelen emerger 12-48 horas antes que las hembras.

Hospedadores

La hembra deposita sus huevos (Fig. 9) en las pupas de varias especies de dípteros, fundamentalmente de la familia de los múscidos, siendo las más comunes las siguientes: la mosca doméstica (*M. domestica*); la mosca de la cara (*Musca autumnalis*) (DeGeer, 1776); la mosca del cuerno (*H. irritans*); y la mosca de los establos (*S. calcitrans*).



Fig. 9. Hembra de *Muscidifurax raptorellus* ovipositando

La familia Muscidae es una de las familias más diversas dentro de los dípteros muscoideos. Contiene alrededor de 4500 especies y su distribución abarca desde ambientes tropicales hasta zonas frías, pasando por áreas costeras hasta los 5000 metros de altura (Skidmore, 1985). La ecología comportamental de las especies de múscidos es extremadamente variada. La mayoría de sus larvas son carroñeras y tienen un profundo impacto en todos los hábitats donde se presentan, ya que favorecen la descomposición de la materia orgánica. Fundamentalmente se suelen desarrollar en materia orgánica en descomposición, tanto de origen animal como vegetal (Skevington y Dang, 2002).

Otra particularidad de esta familia es la asociación de sus especies con el hombre, lo que se traduce en un perjuicio para éste. Algunas especies de *Muscidae*, como *M. domestica* (Fig. 10) o *M. stabulans* (Fig. 11), tienen importancia médica y veterinaria, siendo vectores de un variado tipo de agentes patógenos, tales como virus, bacterias y protozoos (Graczyk *et al.*, 2005), o ser productoras de miasis (Oliva, 2001). Otras especies por sus características hematófagas, como *S. calcitrans* y *H. irritans* se encuentran asociadas a animales de cría (bovinos, porcinos y aves de corral) afectando a su producción (Torres *et al.*, 1992).



Fig. 10. Adultos de *Musca domestica* en vista dorsal y ventral



Fig. 11. *Muscina stabulans* en vista dorsal

2 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Los múscidos son un inconveniente en granjas de la Comunidad Valenciana, España y el resto del mundo. El control biológico de éstos es necesario en ganadería ya que de esta manera evitamos el uso de pesticidas en presencia de los animales, se evitan posibles contactos de éstos en comederos, bebederos y camas, así como el contacto de dichos compuestos con los productos destinados para el consumo.

Debido al aceptable control biológico llevado a cabo por *M. raptorellus*, tanto sobre múscidos presentes en ganado estabulado (Morgan *et al.*, 1979) como sobre mosca de la fruta atacando a la vid (Kapongo y Kevan, 2007), así como por la práctica ausencia de parámetros de calidad en los productos de comercialización de este parasitoide, nos propusimos evaluar en el laboratorio la actividad parasitaria de *M. raptorellus* sobre pupas de *M. stabulans*, *M. domestica* y *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) (Fig. 12) a través de parámetros esenciales de su potencial biótico: fecundidad, fertilidad y "sex ratio".

El desarrollo de esta propuesta se ha podido llevar a cabo gracias al Convenio establecido entre la Universitat Politcnica de Valencia (UPV) y el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (I.V.I.A.).



Fig. 12. Adulto de *Ceratitis capitata* en vista dorsal

3 OBJETIVOS

El objetivo general de este Trabajo de Fin de Máster radica en determinar la versatilidad de *M. raptorellus* para ser empleado como agente de control biológico de diferentes especies de dípteros. Para ello, se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar la calidad de los individuos de *M. raptorellus*, producidos y comercializados por Koppert Biological Systems, a través de los siguientes parámetros del potencial biótico: porcentaje de emergencia desde los puparios de mosca y razón sexual de los individuos emergidos.
2. Establecimiento de una cría de *M. raptorellus* sobre *C. capitata*, con el fin de valorar la posibilidad de criar este parasitoide sobre la mosca de la fruta. La valoración se realizará a través de la evaluación de factores del potencial biótico, así como de su preferencia innata de hospedador.
3. Análisis del comportamiento de *M. raptorellus* en función del hospedador usado en su cría y del díptero sobre el que actúa: determinar la capacidad de su adaptación y parasitismo sobre diferentes especies de dípteros.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Insectos empleados

Para llevar a cabo el presente trabajo se han empleado cuatro especies diferentes de insectos: Tres dípteros, que pueden ser considerados como organismos-plaga (*M. stabulans*, *M. domestica* y *C. capitata*), y una especie de himenóptero, considerado como un agente de control biológico de plagas, *M. raptorellus*, que es el objeto principal de este estudio.

4.2 Obtención del parasitoide

Para la obtención de *M. raptorellus* se estableció un contacto con la empresa Bioteknia. Servicios Ambientales, ubicada en Valencia y que recientemente está iniciando la aplicación práctica del control biológico de moscas de los establos por medio de este parasitoide. Esta empresa nos proporcionó pupas de una especie indeterminada de múscido parasitadas por *M. raptorellus*, recibidas como envíos comerciales de la empresa Koppert Biological Systems, y que formaban parte del material que Bioteknia está empleando actualmente en sus trabajos de control biológico de dípteros. De dichas pupas, transcurridos 2 o 3 días posteriores a su entrega, empezaban a emerger los parasitoides adultos.

4.3 Obtención de pupas de los hospedadores

Muscina stabulans

Los individuos de este múscido se obtuvieron en las granjas experimentales de cabras de la Universidad Politécnica de Valencia (Fig. 13). La búsqueda de larvas y pupas de esta especie se realizó desde mediados de abril hasta principios de julio; con anterioridad a

esta fecha fue imposible localizar larvas o pupas del díptero, debido a las bajas temperaturas propias del fin de invierno e inicio de la primavera.



Fig. 13. Lugar de obtención de las larvas de *M. stabulans*

Con el inicio del buen tiempo se recogieron larvas de la mosca con un poco de materia orgánica (Fig. 14), se llevaron al I.V.I.A. -donde se mantuvieron en condiciones ambientales controladas- con objeto de que evolucionaran a pupas en 2 o 3 días y poder utilizarlas en nuestros ensayos.



Fig. 14. Larvas obtenidas de la granja de la Universidad Politécnica de Valencia

Ceratitis capitata

La obtención de pupas de *C. capitata* se realizó a partir de una cría de este díptero ubicada en el Laboratorio de Entomología del Centro de Protección Vegetal y Biotecnología del I.V.I.A.

Los adultos se mantienen en cajas de cría de metacrilato, de dimensiones de 40x30x30 cm, con una tela de muselina en la parte frontal (Fig. 15), en la que depositan los huevos las hembras del díptero. Éstos se recolectan en bandejas con agua destilada en la base de la caja. En la parte superior hay dos orificios para instalar los comederos, donde se sitúa una mezcla de proteína hidrolizada y azúcar en proporción 1:4. En el interior de la caja se colocan dos bebederos, consistentes en dos botellas de plástico de 500 ml en las que se introduce una mecha confeccionada a partir de una bayeta Spontex.

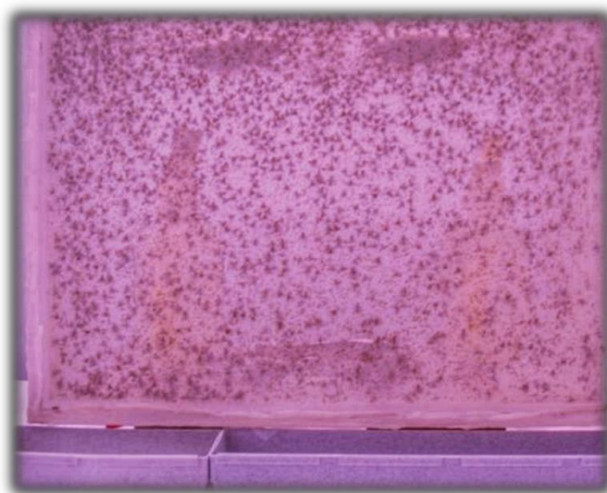


Fig. 15. Caja de cría de *Ceratitis capitata*.

Los huevos, una vez obtenidos, 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 la cantidad de pupas (unas 3000) que se utilizan tanto para mantener la cría como para realizar los ensayos.

Estas pupas previamente a su utilización en el mantenimiento de crías de hospedador y parasitoides, son expuestas durante 60' a -20°C. (Tormos *et al.*, 2009). 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. Aunque para el desarrollo de la cría IVIA de *M. raptorellus* se emplearon pupas congeladas de *C. capitata*, en los ensayos del presente estudio se utilizaron pupas del díptero frescas (vivas) de 2 o 3 días.

Musca domestica

Las larvas de *M. domestica* proceden de la granja “Ganadería de Reses Bravas” Raúl Monferrer ubicada en Teruel, España. Se recolectaron junto con materia orgánica (Fig. 16) y se dejaron evolucionar, durante 4 días y hasta que puparon, en las instalaciones de la granja de la Universidad Politécnica de Valencia. Transcurridos 3 días, desde la pupación, se utilizaron para el ensayo.



Fig. 16. Larvas obtenidas de la granja “Ganadería de Reses Bravas”

4.4 Estructura de los ensayos.

Se diseñaron tres grupos de ensayos, para dar respuesta a los tres objetivos planteados en este TFM.

1) Evaluar la calidad de los envíos comerciales del parasitoide, mediante el análisis del porcentaje de emergencia de los puparios recibidos, en tres envíos diferentes, de manera que se evidenciara también la regularidad de dicha calidad en la producción comercial del insecto. Adicionalmente, al ser *M. raptorellus* un parasitoide gregario, se analizó también el número medio de individuos que emergen por pupario de mosca, al igual que la razón sexual de esta descendencia.

2) Los ejemplares procedentes de la cría de laboratorio de *M. raptorellus* sobre *C. capitata*, sirvieron para confirmar la posibilidad de la cría del parasitoide sobre esta especie de díptero fitófago, y adicionalmente se utilizaron en el tercer grupo de ensayos.

3) Determinar la plasticidad parasitaria y adaptación de *M. raptorellus* a distintas especies de hospedadores, en función de su hospedador natal y de su capacidad de condicionamiento.

Para ello se estudió la fecundidad, la fertilidad y el “sex-ratio” del parasitoide en cuatro supuestos: **1)** parasitoides comerciales, criados sobre una especie indeterminada de múscido, a los que se ofrecían pupas de *M. stabulans* (Muscidae), **2)** parasitoides comerciales a los que se ofrecía pupas de *C. capitata* (Tephritidae), **3)** parasitoides criados en IVIA sobre *C. capitata* a los que se ofrecía pupas de *C. capitata* y **4)** parasitoides criados en IVIA sobre *C. capitata* a los que se ofrecía pupas de *M. domestica* (Muscidae), usando como control parasitoides comerciales a los que se ofrecía pupas de la misma especie de múscido.

4.5 Ejecución de los ensayos.

Determinación de la calidad de los envíos comerciales del parasitoide.

Se trabajó con tres diferentes envíos comerciales de *M. raptorellus*, recibidos por la empresa Bioteknia. Cada envío consistía en diferentes botes con pupas de mosca parasitadas. Se tomaban muestras de 100 pupas de 10 botes diferentes, lo que constituían 10 repeticiones de este ensayo. Estas pupas se colocaban en placas Petri, ventiladas y bien cerradas (Fig. 17), que se mantenían en una cámara climática SANYO (MLR350) en condiciones controladas a $24 \pm 1^\circ\text{C}$, con una humedad de $65 \pm 5\%$, y fotoperiodo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad; estas condiciones fueron monitoreadas con un data logger modelo HD226-1, DELTA OHM (Padova, Italia). Las pupas se dejaban evolucionar hasta la emergencia de los adultos del parasitoide.

Se determinó el porcentaje de pupas que permanecían cerradas, comparándolo entre los tres envíos analizados.

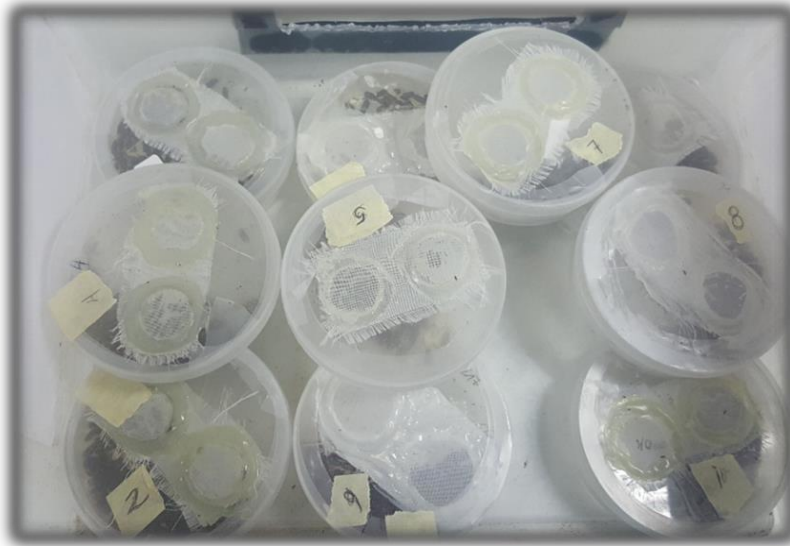


Fig. 17. Muestras de pupas parasitadas de los envíos comerciales de *M. raptorellus*, tomadas por lotes

Por otra parte, de los mismos 10 botes de pupas parasitadas por envío, se separaban 5 pupas por bote, con un total de 50 pupas, que se colocaban en tubos de plástico ventilados (Fig. 18) y mantenidos en las mismas condiciones controladas, comentadas anteriormente, para determinar la cantidad y sexo de los parasitoides que emergían de los puparios.

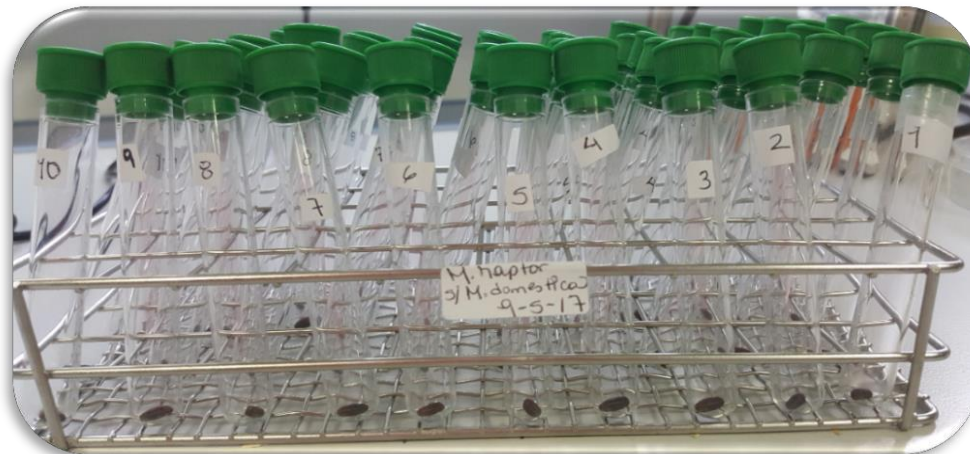


Fig. 18. Pupas individualizadas

Cría de M. raptorellus con C. capitata como díptero hospedador.

La cría de *M. raptorellus* se empezó el 20 de abril del 2017. Se llevó a cabo en una caja de metacrilato (caja de cría) (40x30x30 cm.), con abertura lateral protegida con una manga de muselina (que reduce posibles escapes durante el manejo de los himenópteros), y con la parte superior cubierta con una tela de muselina que favorece la ventilación. En el interior de la caja de cría se colocaron un bebedero con agua y mechas de bayeta Spontex, una placa con azúcar y otra con miel untada en papel (Fig. 19). En la caja se introdujeron dos placas con pupas recibidas del primer envío y se dejaron emerger los parasitoides, a los cuales se les ofrecieron dos placas con pupas congeladas de *C. capitata* para su parasitación. Las pupas del díptero se colocaban en placas Petri, éstas se dejaron 2 o 3 días y luego se les cambian las pupas, probablemente parasitadas, por pupas nuevas

sin parasitar. Este sistema se ha establecido para poder obtener y mantener la cría, que a su vez hemos utilizado para algunos de los ensayos.

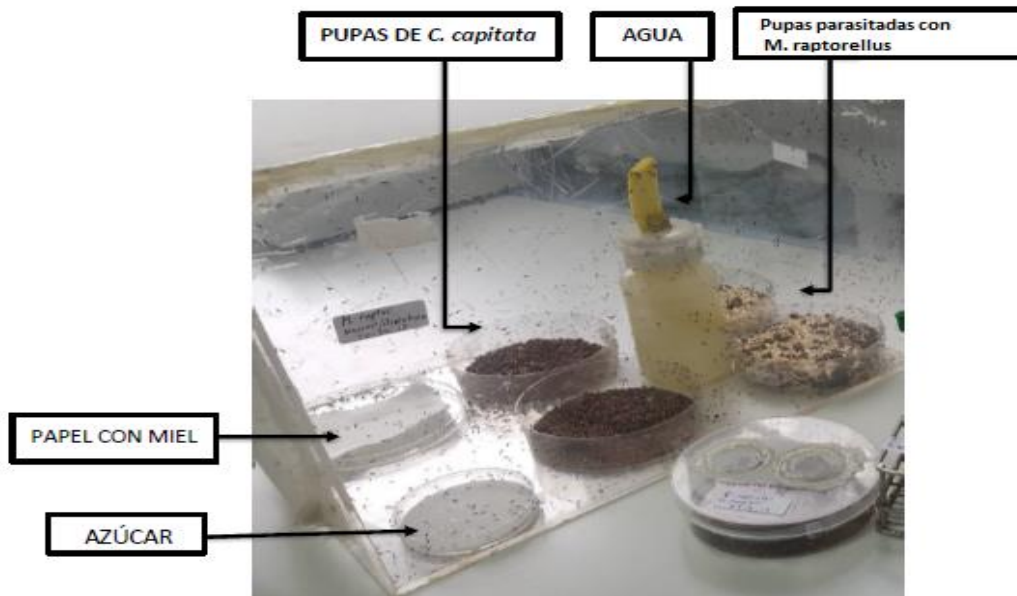


Fig. 19. Caja de cría utilizada para el desarrollo de *M. raptorellus* sobre *C. capitata*

Cuando se obtuvo una gran cantidad de pupas parasitadas procedimos a limpiar la caja de cría para prepararla para nuestros nuevos adultos de primera generación de *M. raptorellus* sobre *C. capitata*, y así con las generaciones sucesivas y utilizadas para los ensayos.

Para evaluar el gregarismo y razón sexual del himenóptero sobre *C. capitata*, se procedió a seleccionar al azar 50 pupas de las 1ra, 2da y 3ra generaciones (50 de cada generación), colocándolas individualmente -en la cámara Sanyo- en tubos de ensayo con tapones que permitieran ventilación, hasta su emergencia, 18 a 22 días después de ser parasitadas.

Fecundidad y fertilidad de M. raptorellus sobre diferentes dípteros hospedadores.

Para analizar el efecto-del hospedador sobre la fecundidad, la fertilidad y el "sex ratio" del parasitoide se realizó un ensayo con 4 supuestos, como se ha indicado anteriormente.

Los tres primeros tuvieron idéntica estructura, variando sólo el origen de los parasitoides y los hospedadores que se les ofrecía.

El proceso de los 3 primeros supuestos consistió en:

Para cada uno de ellos se seleccionaron parasitoides de los dos sexos y se establecieron 20 parejas (en cada supuesto), permaneciendo juntos los dos sexos durante 24 horas (Fig. 20), con objetivo de que las hembras fueran fecundadas.

En los 3 supuestos, la actividad parasitaria de 10 parejas se utilizó para evaluar la fecundidad, mientras que con las otras 10 se evaluó la fertilidad y el "sex ratio". El ensayo se llevó a cabo en unidades experimentales constituidas por un envase de plástico transparente (tipo tupperware, 15x10x10 cm), con tela de muselina para facilitar la aireación, y en cuyo interior se depositaba una base de placa Petri (3x3 cm) con 10 pupas del hospedador correspondiente, miel impregnada en papel secante y un recipiente con agua (Fig. 21 y 22). Las unidades experimentales se depositaban en la cámara SANYO (MLR350), con las condiciones climáticas indicadas anteriormente. En todos los casos se emplearon pupas vivas como hospedadores.

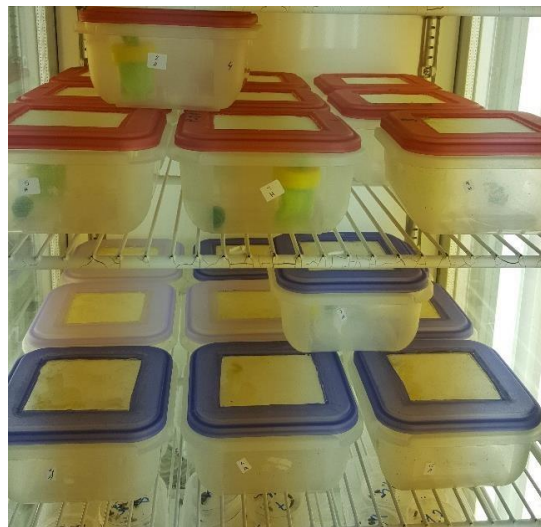


Fig. 20. Unidades experimentales en incubadora



Fig. 21. Unidades experimentales de ensayo fecundidad/fertilidad con *C. capitata*

Cada supuesto tuvo una duración total de dos semanas, con objeto de analizar la influencia de la edad de las hembras (de 4 y 11 días de edad), a las que se ofrecía las pupas de los hospedadores respectivos, en las variables estudiadas. En cada supuesto, se ofreció 10 pupas a las hembras de cada edad por 24 horas; las pupas ofrecidas para la evaluación de la fecundidad se abrieron bajo el binocular (Leica MZ8), con la ayuda de agujas enmangadas y pinzas blandas (Tormos *et al.*, 2009), para determinar la presencia de huevos del parasitoide en el interior de los puparios. El resto de pupas, para el análisis de fertilidad y “sex-ratio”, se dejaron evolucionar hasta la emergencia de los adultos del parasitoide.

La estructura del cuarto supuesto consistió en:

Se tomaron 20 parejas de adultos, 10 de un cuarto envío recibido comercialmente y 10 de los parasitoides de tercera generación de la cría IVIA sobre *C. capitata*, que constituían los dos tests a analizar. En cada test, parejas de los parasitoides con 4 días de edad, que habían permanecido juntas desde su emergencia, se depositaban en unidades experimentales idénticas a las anteriormente citadas, en cuyo interior se depositaba igualmente una base de placa Petri con 10 pupas del hospedador correspondiente. Cada pareja de parasitoides se expuso, durante 24 horas, al bloque con 10 pupas y, en esta

ocasión, solamente se analizó la fecundidad de los parasitoides, utilizando el mismo proceso ya descrito.



Fig. 22. Unidades experimentales de ensayo fecundidad/fertilidad con *M. stabulans*.

En esta ocasión también se trabajó con la cámara climática Sanyo (MLR350), con las condiciones controladas previamente citadas e igualmente se ofreció a los parasitoides siempre pupas vivas de las dos especies de dípteros utilizadas como hospedadores.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Análisis de la calidad de los envíos comerciales.

Una ANOVA de una vía mostró que para la variable “pupas cerradas” con respecto al factor “envío”, se debe rechazar la hipótesis nula ($F_{2, 29} = 5, 25; p \leq 0,0118$) (Fig. 23).

La presencia de diferencias significativas entre los envíos indica que no hay uniformidad total en la calidad de las pupas recibidas. Distintos envíos pueden tener diferente porcentaje de pupas cerradas, lo que influirá en el número efectivo de adultos del parasitoide que emerjan. Hay otros casos de enemigos naturales que son producidos “en masa” comercialmente y en los que se ha observado esta variabilidad en sus parámetros biológicos principales, dependiendo de la empresa productora y del envío concreto (Garzón y Beitia, 2009). Este aspecto del uso de enemigos naturales en control biológico de plagas puede tener una influencia, generalmente negativa, en la aplicación de este sistema de control de plagas, al impedir una adecuada introducción de dichos enemigos naturales en un cultivo; en nuestro caso, puede implicar lo mismo, en cuanto a una inadecuada introducción en granjas del número adecuado de individuos de un parasitoide para el control de moscas de animales.

Por otra parte, aún con las diferencias estadísticas mencionadas, si obtenemos una media con los datos de los tres envíos, se obtiene que el porcentaje global de puparios cerrados de los envíos ronda el 30%. Este valor es bastante alto para una cría masiva de calidad de un enemigo natural, pero hay que considerar que en la viabilidad de los parasitoides no sólo influye el proceso mismo de cría masiva, sino también todo el proceso de preparación de los organismos, empaquetado, embalaje y transporte hasta destino, que pueden influir muy negativamente en dicha viabilidad. Incluso estos factores pueden ser también responsables, en gran medida, de la variabilidad observada entre envíos. Y finalmente, la calidad de los envíos depende de la coincidencia entre los adultos que una empresa indica que se van a recibir y los que efectivamente se reciben; en este caso, no se ha podido

comprobar este aspecto, puesto que no se han analizado envíos completos de la empresa productora, pero cabe pensar que dicha empresa tenga en cuenta todo lo señalado y envíe suficiente número de pupas parasitadas como para obtener el número final deseado de adultos emergidos.

Un aspecto adicional, a tener en cuenta, respecto a la efectividad del control biológico de *M. raptorellus*, radica en el hecho de que este parasitoide puede tener una acción de mortalidad sobre las pupas del hospedador, añadido al propio efecto del parasitismo, como ocurre en otra especie de pteromárido parasitoide de pupas de dípteros, *Spalangia cameroni* Perkins (Pérez-Hinarejos y Beitia, 2008).

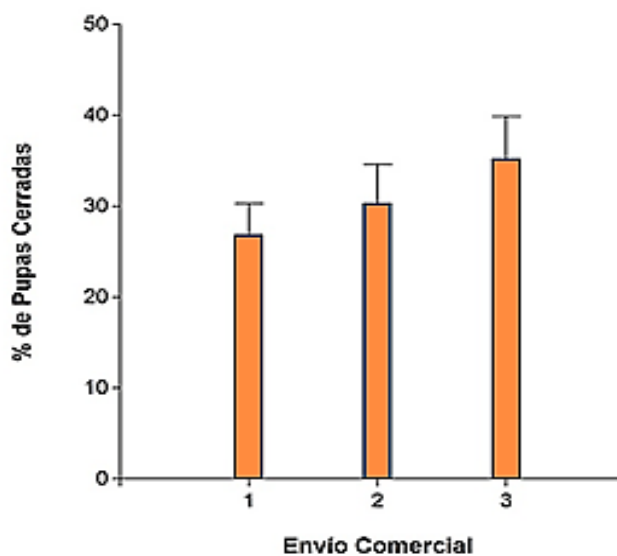


Fig. 23. Porcentaje de pupas cerradas del múscido hospedador, en tres envíos distintos en el tiempo, cada uno con 10 botes de pupas parasitadas.

En cuanto a la proporción de sexos obtenida en los diferentes envíos, una prueba de Chi-cuadrado mostró que no se presentan diferencias significativas en el "sex ratio" ($X^2=1,783$, g.l.= 2, $p = 0.189$).

Sin embargo, en los envíos 1º y 2º se observó que no existían diferencias significativas en el "sex ratio" respecto a una proporción hipotética de 1:1 (envío 1: $X^2= 3,365$, g.l.=1, $p = 0.182$), (envío 2: $X^2= 2,483$, g.l.=1, $p = 0.115$). No obstante, en el envío 3º la proporción hembras/machos + hembras, se separó de la proporción hipotética 1/2 (envío 3: $X^2= 6,734$, g.l.=1, $p = 0.009$).

Aunque la proporción de sexos, en los envíos 1º y 2º respondió a la esperada de 1:1, se debe indicar que, en ambos casos, al igual que se presentó en el envío 3º (donde la diferencia en la proporción de sexos se mostró significativa), la desviación se inclinó hacia los machos.

Respecto al número medio de parasitoides emergidos por pupa, de los envíos de Bioteknia, una ANOVA de una vía mostró que no existían diferencias entre los mismos ($F_{2, 100} = 2,47$; $p \leq 0,0894$) (Tabla 1).

Serie envío	Variable	n	Media	E.E.	Mín	Máx
1º	Adultos	37	7,8	0,8	1,0	20,0
2º	Adultos	38	6,2	0,6	2,0	17,0
3º	Adultos	28	5,7	0,6	1,0	14,0

Tabla 1. Media de parasitoides emergidos, por pupa de hospedador, a partir de los envíos de Bioteknia.

N: número de individuos, E.E.: error estándar

No obstante, el análisis del número medio de individuos emergidos por pupa en generaciones diferentes de la cría del IVIA de *M. raptorellus* sobre *C. capitata*, mostró diferencias significativas ($F_{2, 94} = 14,22$; $p \leq 0,0001$) (Tabla 2).

Generación	Variable	n	Media	E.E.	Mín	Máx
1ª	Adultos	24	1,9	0,3	1,0	7,0
2ª	Adultos	46	4,9	0,4	1,0	10,0
3ª	Adultos	27	3,7	0,4	1,0	10,0

Tabla 2. Parasitoides emergidos, por pupa de hospedador, a partir de la cría del IVIA.

N: número de individuos, E.E.: error estándar

En la primera generación hubo una emergencia aproximada de 2 adultos por pupario, es decir *M. raptorellus* actuó prácticamente como un parasitoide no gregario, debido posiblemente a su falta de adecuación al hospedador. En la segunda generación ya se detecta una actividad claramente gregaria, con una media de más de 4 adultos emergidos por pupario. No obstante, en la tercera generación hay una pequeña disminución en este gregarismo, pasándose a la emergencia media de unos tres individuos y medio por pupario.

El análisis de la razón sexual de los adultos emergidos en los puparios de las tres generaciones de cría sobre *C. capitata*, mediante la prueba de Chi-cuadrado, mostró diferencias significativas entre las mismas ($X^2= 15,590$, g.l.=2, $p \leq 0,0001$). Adicionalmente, las generaciones 1ª y 3ª no mostraron diferencias en el "sex ratio", respecto a la proporción hipotética de 1:1 (generación 1, $X^2=0,270$, g.l.=1, $p = 0.604$), generación 3, $X^2 = 0,046$, g.l.=1, $p = 0.831$), mientras que sí que se mostraron en la segunda ($X^2 = 14,617$, g.l.=1, $p \leq 0,0001$).

Aunque la proporción de sexos, en las generaciones 1ª y 3ª respondió a la esperada de 1:1, se debe indicar que, en ambos casos, y a diferencia de la segunda (donde la diferencia en la proporción de sexos se mostró significativa), la desviación se inclinó hacia las hembras; lo cual difiere de la desviación de la razón sexual que se encontró en los envíos comerciales.

La comparación entre el número medio de adultos que emergen por pupario entre los envíos comerciales y la cría IVIA, mostró diferencias significativas ($F_{1, 198} = 33,49$; $p \leq 0,0001$) (Fig. 24).

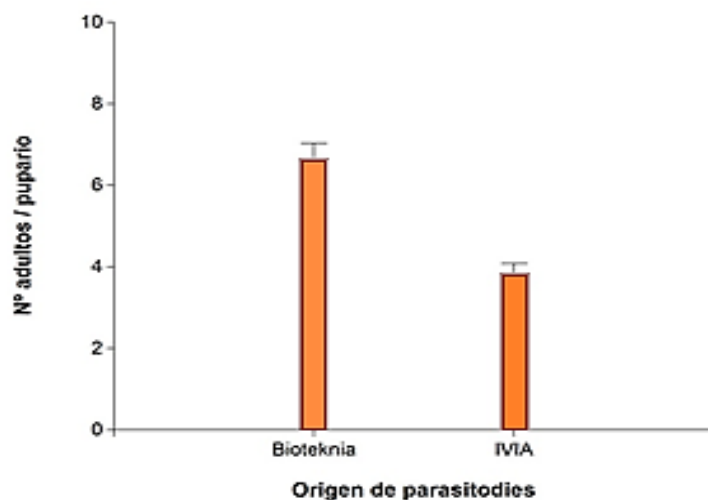


Fig. 24. Parasitoides emergidos, por pupa de hospedador, en los envíos comerciales y la cría IVIA.

Como cabía esperar, existen diferencias significativas en esa emergencia de adultos por pupario entre ambos supuestos. En la población comercial del parasitoide existe casi el doble de emergencias de adultos por pupario que en la cría IVIA. Lógicamente esta diferencia debe achacarse a la diferencia de tamaño del pupario que existe entre los múscidos y el tefrítido utilizado en este trabajo, más allá incluso de la adecuación al hospedador, puesto que en la 3ª generación de la cría IVIA, el parasitoide ya está habituado a su nueva especie hospedadora, pero, sin embargo, se mantiene esa diferencia.

Con respecto a la mayor aceptación innata de *M. raptorellus* por pupas de dípteros múscidos, se puede aducir, que himenópteros parasitoides y, por tanto, representantes de la familia de los pteromálicos, escogen para llevar adelante a su progenie hospedadores de mayor tamaño, mostrando sobre los mismos una mayor fecundidad. Por ejemplo, *M. zaraptor* presenta, en función del tamaño, una mayor “aceptación” por las pupas de *M.*

domestica que por las de *Fannia canicularis* (Linnaeus, 1761) (Mandeville y Mullens, 1990). Este hecho se traduce, en ocasiones, en un mayor tamaño de las hembras de los parasitoides desarrollados en hospedadores de mayor envergadura, lo que redundaría en que las mismas presenten un mayor éxito reproductivo (Charnov *et al.*, 1981). A este respecto, se puede mencionar que las hembras de *M. raptorellus*, obtenidas a partir de *C. capitata*, eran, aparentemente, de un tamaño menor que las obtenidas a partir de mosca doméstica (*M. domestica*) o de la falsa mosca de los establos (*M. stabulans*). Este hecho, que no ha podido ser abordado en el presente trabajo de iniciación a la investigación por no estar contemplado en los objetivos, sería conveniente que fuese incluido en futuros estudios sobre los parámetros de calidad de *M. raptorellus*.

2. Establecimiento de una cría de *M. raptorellus* sobre *C. capitata*.

En el momento de la redacción de este TFM, la cría iniciada en IVIA se encuentra ya en su 7ª generación, lo que evidencia el éxito del sistema de cría desarrollado, así como de la viabilidad en usar *C. capitata* como hospedador de *M. raptorellus*.

A pesar de la menor longevidad que presentan las hembras de *M. raptorellus* cuando son criadas sobre *C. capitata*, así como la menor fecundidad de las mismas antes de condicionarse a esta especie de tefrítido y, adicionalmente, la preferencia innata que muestra este parasitoide por hospedadores de gran tamaño (múscidos), *M. raptorellus* presenta unos parámetros de potencial biótico, fecundidad, fertilidad y "sex ratio", cuando se cría a partir de pupas muertas de *C. capitata* por congelación -tal y como se deduce de los resultados derivados del tercer objetivo (ver, a continuación: Fecundidad y fertilidad de *M. raptorellus* sobre diferentes dípteros hospedadores)-, semejantes a los que presenta cuando se cría sobre múscidos.

No obstante, y a pesar de lo indicado anteriormente, con objeto de mejorar las condiciones de cría en especies de Pteromalidae pertenecientes a los géneros *Muscidifurax* y *Nasonia*, habría que tener en cuenta que a diferencia de lo que ocurre, por

ejemplo, en el género *Spalangia*, el hospedador, a partir del que emerge el parasitoide, condiciona –aunque sólo sea levemente- la posterior “preferencia o elevado parasitismo” del mismo por el parasitoide (Ohgushi, 1960). Adicionalmente, el condicionamiento (=aprendizaje) también se muestra sólo en especies de los géneros mencionados en primer lugar y, en ningún caso, en representantes del género *Spalangia* (Tormos *et al.*, en prensa). Por tanto, con objeto de mejorar el sistema de cría de este parasitoide y su posterior utilización en sueltas inundativas, sería conveniente abordar, en un futuro, la repercusión que tiene en su potencial biótico el hospedador natal, así como el papel que juega en su preferencia de hospedador (a través de ensayos en los que se ofrecieran, al mismo tiempo, más de un hospedador a *M. raptorellus*) el condicionamiento (=aprendizaje) o no condicionamiento del parasitoide. Al igual que ya se ha indicado anteriormente. Estos objetivos no han podido ser asumidos en el presente estudio por no sobrecargar la cantidad de ensayos a realizar.

3. Fecundidad, fertilidad y parasitismo de *M. raptorellus* sobre diferentes dípteros hospedadores.

Del análisis de la varianza de la puesta de huevos de *M. raptorellus* (hembras provenientes de la cría de Koppert) sobre *M. stabulans*, en función de la edad del parasitoide: 4/11 días, se obtuvieron diferencias significativas ($F_{1,18} = 5,00$; $p \leq 0,0383$) (Tabla 3).

Edad	Variable	n	Media	E.E.	Mín	Máx
11 días	nº huevos	10	2,4	0,4	0,0	4,0
4 días	nº huevos	10	5,1	1,1	0,0	12,0

Tabla 3. Fecundidad media, en función de la edad de la hembra, mostrada por *M. raptorellus* sobre *M. stabulans*.

N: número de individuos, E.E.: error estándar

Es probable que al encontrarse *M. raptorellus* con un hospedador de gran tamaño y similar al hospedador natal, lleve cabo a cabo una elevada oviposición.

Una Anova de una vía mostró que la emergencia de adultos del parasitoide, a partir de pupas de *M. stabulans* parasitadas por hembras de dos edades (4/11 días) y procedentes de Koppert, no mostró diferencias significativas ($F_{1,18} = 0,27$; $p \leq 0,6097$) (Tabla 4).

Edad	Variable	n	Media	E.E.	Mín	Máx
11 días	Adultos	10	8,8	1,9	0,0	21,0
4 días	Adultos	10	7,6	1,2	1,0	13,0

Tabla 4. Fertilidad media, en función de la edad de la hembra, mostrada por *M. raptorellus* sobre *M. stabulans*.

N: número de individuos, E.E.: error estándar

El hecho de que emerja un mayor número de adultos que huevos previamente depositados, es posible que se deba a la presencia de poliembrionía, fenómeno que, aunque suele ir ligado a viviparidad, es común en himenópteros parasitoides. Este fenómeno consiste en que todos los individuos provienen de las divisiones mitóticas de una sola célula huevo. Se constituye, por tanto, un grupo de embriones (clon), idénticos entre sí, que difieren exactamente en la misma proporción genética de sus progenitores (Tormos *et al.*, 2014).

El análisis de la varianza del parasitismo (porcentaje de pupas con emergencia de adultos de parasitoide más pupas cerradas, que se considera que ha sido por efecto de la acción de los parasitoides) de *M. raptorellus* sobre *M. stabulans*, en función de la edad del parasitoide, no mostró diferencias significativas ($F_{1,18} = 0,26$; $p \leq 0,6164$) (Tabla 5).

Edad	Variable	n	Media	E.E.	Mín	Máx
11 días	Parasitismo	10	39,0	5,9	0,0	60,0
4 días	Parasitismo	10	35,0	5,2	10,0	60,0

Tabla 5. Parasitismo medio (%), en función de la edad de la hembra, mostrado por *M. raptorellus* sobre *M. stabulans*.

N: número de individuos, E.E.: error estándar

Este dato está en consonancia con la similitud entre edades del parasitoide en cuanto a la fertilidad media de la hembra. Es decir, que a pesar de la menor puesta de huevos por parte de hembras de 4 días (resultado obtenido en el ensayo de puesta), el efecto de fertilidad y de parasitismo es similar para las dos edades, lo que implica que en ambos momentos las hembras tienen una eficacia final similar en el control del hospedador.

La puesta de huevos de *M. raptorellus* -provenientes de la cría de Koppert- sobre *C. capitata*, en función de la edad del parasitoide (Tabla 6), no se pudo testar con una ANOVA puesto que la puesta de hembras de 4 días fue prácticamente inexistente: sólo una hembra realizó puesta y de 1 sólo huevo.

Edad	Variable	n	Media	E.E.	Mín	Máx
11 días	nº huevos	10	4,9	1,4	0,0	12,0

Tabla 6. Fecundidad media de hembras de *M. raptorellus* -provenientes de la cría de Koppert- sobre *C. capitata*, en función de la edad del parasitoide (la puesta de las hembras de 4 días no se refleja porque fue prácticamente inexistente).

N: número de individuos, E.E.: error estándar

Es evidente que las hembras del parasitoide, cuando se enfrentan por primera vez a un hospedador nuevo y de peor “calidad” que el hospedador natal, no se comportan normalmente y no realizan una puesta adecuada. Por el contrario, cuando se les ofrece por segunda vez ese mismo hospedador, evidencian una buena adecuación al mismo (característica comportamental bien conocida en esta especie) y efectúan una puesta acorde con la de las hembras jóvenes del ensayo anterior.

Estos resultados están de acuerdo con los previamente obtenidos por otros autores, como por ejemplo Enciso y Iannacone (2008), que establecieron que la capacidad de oviposición de *M. raptorellus*, al igual que ocurre en otros pteromálidos como *Spalangia endius* Walker, 1839, tiende a disminuir con la edad.

La emergencia de adultos de *M raptorellus* -provenientes de la cría de Koppert- sobre *C. capitata*, en función de la edad del parasitoide (Tabla 7), no se pudo testar tampoco con una ANOVA puesto que de las hembras de 4 días se obtuvo fertilidad sólo en un caso (1 hembra), lo cual coincide totalmente con el caso de puesta.

<u>Edad</u>	<u>Variable</u>	<u>n</u>	<u>Media</u>	<u>E.E.</u>	<u>Mín</u>	<u>Máx</u>
11 días	Adultos	10	2,2	1,0	0,0	8,0

Tabla 7. Fertilidad media de hembras de *M. raptorellus* -provenientes de la cría de Koppert- sobre *C. capitata*, en función de la edad del parasitoide (la fertilidad de las hembras de 4 días no se refleja porque fue prácticamente inexistente).

N: número de individuos, E.E.: error estándar

Aunque es posible, como ya se ha indicado anteriormente, que en *M. raptorellus* se presente el fenómeno de la poliembrionía, este fenómeno se podría ver muy atenuado por el tamaño del hospedador. Así, en hospedadores de pequeño tamaño (tefrítidos) podría, o no, producirse este fenómeno, e incluso en el caso de producirse los descendientes podrían abortar por falta de alimento.

El parasitismo producido por hembras de *M raptorellus* -provenientes de la cría de Koppert- sobre *C. capitata*, en función de la edad de la hembra, no se pudo testar tampoco con una ANOVA puesto que las hembras de 4 días produjeron un % de parasitismo (puparios con emergencia de parasitoides y cerrados) insignificante. Sólo hubo parasitismo por parte de 1 hembra.

Con hembras de 11 días sí que se produjo un parasitismo bajo, aunque en relación con la puesta y la fertilidad de las hembras, y al igual que en el ensayo anterior, superior a estos valores, lo que indica la acción de los parasitoides sobre las pupas del hospedador (Tabla 8).

Variable	n	Media	E.E.	Mín	Máx
Parasitismo	10	7,0	2,6	0,0	20,0

Tabla 8. Parasitismo medio (%) de hembras de *M. raptorellus* -provenientes de la cría de Koppert- sobre *C. capitata*, en función de la edad del parasitoide (el parasitismo de las hembras de 4 días no se refleja porque fue prácticamente inexistente).

N: número de individuos, E.E.: error estándar

La puesta de huevos de *M. raptorellus* -con hembras provenientes de la cría IVIA (2ª Generación)- sobre *Ceratitis capitata*, en función de la edad del parasitoide, no se pudo testar con una ANOVA porque, aunque que sí que hubo puesta de hembras jóvenes (Tabla 9), las hembras murieron con 11 días de edad. Las Tablas 10 y 11 muestran la fertilidad y parasitismo, respectivamente, de las hembras de 4 días de edad.

Variable	N	Media	E.E.	Mín	Máx
nº huevos	10	4,9	1,3	0,0	13,0

Tabla 9. Fecundidad media de hembras de *M. raptorellus*, de 11 días de edad, provenientes de la cría IVIA (2ª Generación)- sobre *C. capitata*.

N: número de individuos, E.E.: error estándar

Este hecho puede ser debido a la “calidad” de los individuos de la cría IVIA sobre *C. capitata*. Con un hospedador más pequeño, la alimentación recibida por las larvas es menor y consecuentemente, las características biológicas de los adultos que emergen puede verse afectada; una de estas características puede ser la longevidad de los adultos. Por ello, en la 2ª generación de cría sobre mosca de la fruta, la longevidad de los adultos del parasitoide se ha reducido frente a la que se obtiene sobre un múscido y ello impide el desarrollo de la segunda fase de este ensayo, pues las hembras del parasitoide no alcanzan los 11 días de edad.

Variable	N	Media	E.E.	Mín	Máx
Adultos	10	4,3	1,3	0,0	12,0

Tabla 10. Fertilidad de hembras de *M. raptorellus*, de 11 días de edad -provenientes de la cría IVIA (2ª Generación)- sobre *C. capitata*,

N: número de individuos, E.E.: error estándar

Tal y como se aprecia observando en conjunto las tablas 9 y 10, la fertilidad de *M. raptorellus* de 11 días de edad -provenientes de la cría IVIA (2ª Generación)- sobre *C. capitata*, es menor que la fecundidad, como en el caso anterior. Por tanto, aunque es posible, como ya se ha indicado anteriormente, que en *M. raptorellus* se presente el fenómeno de la poliembrionía, este fenómeno se podría ver muy atenuado por el tamaño del hospedador.

El parasitismo de *M. raptorellus* de 11 días de edad -provenientes de la cría IVIA (2ª Generación)- sobre *C. capitata*, se muestra en la Tabla 11. Como se puede observar, la tasa de parasitismo es superior, de nuevo, a la puesta y fertilidad, lo que indica la amplitud de acción del parasitoide sobre las pupas del hospedador.

Variable	N	Media	E.E.	Mín	Máx
Parasitismo	10	15,0	3,4	0,0	30,0

Tabla 11. Parasitismo medio (%) de hembras de *M. raptorellus*, de 11 días de edad -provenientes de la cría IVIA (2ª Generación)- sobre *C. capitata*.

N: número de individuos, E.E.: error estándar

Un análisis global (casos analizables) de la fecundidad, fertilidad y parasitismo de *M. raptorellus* sobre diferentes dípteros hospedadores, mostró diferencias significativas para la fertilidad ($F_{3,36} = 4,60$; $p = 0,0080$) (Tabla 12) y el parasitismo ($F_{3,36} = 11,93$; $p \leq 0,0001$) (Tabla 13). No obstante, no se mostraron diferencias significativas para la fecundidad ($F_{2,27} = 0,01$); $p = 0,9919$).

Supuesto	Variable	n	Media	E.E.	Mín	Máx
Bio_M11	Adultos	10	8,8	1,9	0,0	21,0
Bio_M4	Adultos	10	7,6	1,2	1,0	13,0
Bio_C11	Adultos	10	2,2	1,0	0,0	8,0
IVIA_C2G4	Adultos	10	4,3	1,3	0,0	12,0

Tabla 12. Fertilidad media de hembras de *M. raptorellus* de diferente origen, sobre diferentes hospedadores (casos analizables).

Bio_M11: Parasitoides de Bioteknia de 11 días de edad, con *M. stabulans* de hospedador.

Bio_M4: Parasitoides de Bioteknia de 4 días de edad, con *M. stabulans* de hospedador.

Bio_C11: Parasitoides de Bioteknia, de 11 días de edad, con *C. capitata* de hospedador.

IVIA_C2G4: Parasitoides de cría IVIA (2ª generación), de 4 días de edad, con *C. capitata* de hospedador.

N: número de individuos, E.E.: error estándar

Hay diferencias significativas. Los parasitoides comerciales actuando sobre un múscido tienen una fertilidad superior a la de los parasitoides comerciales sobre *C. capitata* y los de cría IVIA de 2ª generación en *C. capitata* y también sobre este mismo hospedador.

Supuesto	Variable	n	Media	E.E.	Mín	Máx
Bio_M11	Parasitismo	10	39,0	5,9	0,0	60,0
Bio_M4	Parasitismo	10	35,0	5,2	10,0	60,0
Bio_C11	Parasitismo	10	7,0	2,6	0,0	20,0
IVIA_C2G4	Parasitismo	10	15,0	3,4	0,0	30,0

Tabla 13. Parasitismo medio (%) de hembras de *M. raptorellus* de diferente origen, sobre diferentes hospedadores (casos analizables).

Bio_M11: Parasitoides de Bioteknia de 11 días de edad, con *M. stabulans* de hospedador.

Bio_M4: Parasitoides de Bioteknia de 4 días de edad, con *M. stabulans* de hospedador.

Bio_C11: Parasitoides de Bioteknia, de 11 días de edad, con *C. capitata* de hospedador.

IVIA_C2G4: Parasitoides de cría IVIA (2ª generación), de 4 días de edad, con *C. capitata* de hospedador.

N: número de individuos, E.E.: error estándar

En cuanto al porcentaje de parasitismo, existen diferencias significativas, similares a los del análisis de fertilidad. Se evidencia que los parasitoides al actuar sobre un múscido, hospedador natal y más óptimo que un tefrítido, generan una mayor fertilidad y, aún más importante, parasitismo, es decir la reducción de la población del hospedador sobre el que actúan.

Y en el cuarto supuesto de este apartado, un Análisis de la varianza entre la fecundidad producida por *M. raptorellus* procedente de Koppert (Bioteknia) y *M. raptorellus* procedente de la 3ªG (tercera generación) de *C. capitata*, sobre *M. domestica*, no mostró diferencias significativas ($F_{1, 18} = 1,25$; $p = 0,2790$) (Tabla 14).

Parasitoide	Variable	n	Media	E.E.	Mín	Máx
IVIA 3ªG	nº huevos	10	1,6	0,6	0,0	5,0
Bioteknia	nº huevos	10	2,8	0,9	0,0	7,0

Tabla 14. Fecundidad de hembras de *M. raptorellus* procedentes de Bioteknia y hembras de *M. raptorellus* procedentes de la cría IVIA (3ª generación), sobre *M. domestica*.

N: número de individuos, E.E.: error estándar

Al ofrecer pupas de un múscido (*M. domestica*) a adultos de *M. raptorellus* de cría comercial (sobre otra especie de múscido) y de cría IVIA (tercera generación sobre *C. capitata*), a hembras jóvenes (4 días de edad), no se observan diferencias estadísticas en la puesta producida. Aunque hay una ligera tendencia a una puesta mayor por parte de las hembras procedentes de la cría comercial, ya habituadas al hospedador.

El resultado anterior implica que este parasitoide puede no necesitar ese periodo de adaptación ante un nuevo hospedador (diferente al usado en su cría), observado en el segundo supuesto del ensayo, y es capaz de realizar puesta de forma normal desde el principio, si este nuevo hospedador es más adecuado que el de la cría (mosca doméstica es más grande que mosca de la fruta).

6 CONCLUSIONES

1. Respecto a la calidad de los parasitoides obtenidos a partir de los productos comercializados por la empresa Koppert Biological Systems:

No hay uniformidad en la calidad de las pupas recibidas. Existen diferencias significativas, en función de los envíos, del número de pupas cerradas, lo que podría influir en el número efectivo de adultos del parasitoide que emerjan y, por tanto, en la efectividad de una actuación de suelta práctica en una granja, por ejemplo, inundativa. Adicionalmente, el número de pupas cerradas es alto (alrededor del 30%), aunque este factor puede considerarse que es tenido en cuenta a la hora de la comercialización del parasitoide. La fertilidad y el sex ratio son adecuados.

Los parasitoides criados sobre *C. capitata* muestran una fertilidad menor (probablemente debido al tamaño del hospedador) que los criados sobre múscidos.

2. Respecto al establecimiento de la cría utilizando como hospedador *C. capitata*:

A pesar de la menor longevidad y fertilidad que presentan las hembras de *M. raptorellus* cuando son criadas sobre *C. capitata*, así como la menor fecundidad de las mismas antes de condicionarse a esta especie de tefrítido y, adicionalmente, la preferencia innata que muestra este parasitoide por hospedadores de gran tamaño (múscidos), *M. raptorellus* presenta unos parámetros de potencial biótico: fecundidad, fertilidad y "sex ratio", cuando se cría a partir de pupas muertas de *C. capitata* por congelación, semejantes a los que presenta cuando se cría sobre múscidos.

3. Respecto a la fecundidad, fertilidad y parasitismo de *M. raptorellus* sobre diferentes dípteros hospedadores.

M. raptorellus presenta condicionamiento y "aprendizaje", así como una preferencia innata por dípteros hospedadores de gran tamaño (múscidos), con una pauta de puesta en la que la capacidad de oviposición tiende a disminuir con la edad. De los parámetros, relacionados con el potencial biótico, y evaluados en el presente estudio: fecundidad, fertilidad, longevidad y "sex ratio", cabe indicar que todos ellos -a excepción del "sex ratio"- están en función del tamaño de hospedador, siendo mayores cuando más grande es la pupa del díptero al que atacan. El "sex ratio" suele escorarse hacia los machos.

Como **conclusión final**, se puede inferir que los atributos biológicos, ecológicos y comportamentales mostrados por *M. raptorellus*, lo facultan para ser considerado un enemigo natural de recomendada utilización en sueltas inundativas contra dípteros molestos a animales estabulados, así como contra tefrítidos (como la mosca de la fruta) perjudiciales a plantas cultivadas. Adicionalmente, se puede añadir que el producto comercializado por empresas como Koppert Biological Systems y aplicado por Bioteknia presenta unos parámetros de calidad (emergencia, sex ratio; fecundidad, fertilidad y sex ratio de la primera y siguientes generaciones) adecuados. A este respecto, únicamente puntualizar que sería conveniente, en un futuro, analizar el posible "pseudoparasitismo" presente en las pupas de hospedador, que procedentes de los envíos permanecen cerradas. Igualmente, cabe resaltar que las connotaciones particulares de este parasitoide, con respecto al hospedador natal, hace que el mismo sea fácil de criar sobre diversos hospedadores e incluso ser condicionado (presentar "aprendizaje"), lo que facilita enormemente su cría y posterior utilización en ámbitos tanto ganaderos como agrícolas.

7 BIBLIOGRAFÍA

- 1) **Antolin, M.F., Guertin, D.S., Petersen, J.J. (1996).** The origin of gregarious *Muscidifurax* (Hymenoptera: Pteromalidae) in North America: an analysis using molecular markers. *Biological Control*, 6: 76-82.
- 2) **Charnov, E.L., Losden Hartogh, R.L., Jones, W.T., Assem, J.V.D. (1981).** Sex ratio evolution in a variable environment. *Nature*, 289:27–33.
- 3) **Floate, K.D., Fox, A.S. (1999).** Indirect effects of ivermectin residues across trophic levels: *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) and *Muscidifurax zaraptor* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Bulletin Entomology Research*, 89: 225-229
- 4) **Garzón, E., Beitia, F. (2009).** Quality control in the production of beneficials used in biological control of pests: is it a real need? *Pest Technology*, 3(1):22-24.
- 5) **Geden, C.J., Hogsette, J.A. (2001).** Research and extension needs for integrated pest management for arthropods of veterinary importance: Proceedings of a workshop in Lincoln, Nebraska. <http://www.ars.usda.gov/sp2userfiles/place/66151020/downloads/lincoln.pdf> (acceso mayo. 10, 2017).
- 6) **Graczyk, T.K., Knight, R., Tamang, L. (2005).** Mechanical transmission of human Protozoan Parasites by Insects. *American Society for Microbiology*, 18: 128-132.
- 7) **Inciso, E., Iannacone, J. (2008).** Actividad parasitaria de *Spalangia endius* Walker y *Muscidifurax raptorellus* Kogan y Legner (hymenoptera: Pteromalidae) sobre *Musca domestica*. *Acta Zoológica Mexicana*, 24: 79.

- 8) **Kapongo, J.P., Kevan P.G. (2007).** Control of Mediterranean Fruit Fly *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) with the Parasitoid *Muscidifurax raptor* (Hymenoptera: Pteromalidae) in Vineyards. *Hortscience*, 42:1400–1404.
- 9) **López, R., Molina, R. (2005).** Cambio climático en España y riesgos de enfermedades infecciosas y parasitarias transmitidas por artrópodos y roedores. *Revista España de Salud Pública*, 79: 177-190
- 10) **Lysyk, T.J. (2001).** Relationships between temperature and life history parameters of *Muscidifurax raptorellus* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Environmental Entomology*, 30: 983-992.
- 11) **Mandeville, J.D., Mullens, A.B. (1990).** Host Preference and Learning in *Muscidifurax zaraptor* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 83: 1203-1209.
- 12) **Marchiori, C.H., Silva, C.G. (2001).** Dípteros sinantrópicos asociados a restos alimentares e seus parasitoides. *Neotropical Entomology*, 30:187-189.
- 13) **Morgan, P.B. (1981).** The potential use of parasites to control *Musca domestica* L. and other filth flies and other filth breeding flies at agricultural installations in the southern United States. United States Department of Agriculture Science and Education Administration. Washington (USA).
- 14) **Morgan, P.B., Weidhass, D.E., LaBrecque, G.C. (1979).** Host- parasite relationship of the house fly, *Musca domestica* L., and the microhymenopteran pupal parasite, *Muscidifurax raptor* Girault and Sanders (Diptera: Muscidae and Hymenoptera: Pteromalidae). *Journal of the Kansas Entomological Society*, 52: 276–281.

- 15) **Oliva, A. (2001).** Insects of forensic significance in Argentina. *Forensic Science International*, 120: 145-154.
- 16) **Ohgushi, R. (1960).** Studies on the host selection by *Nasonia vitripennis* (Wlk.), parasitic on housefly pupae. *Physiological Ecology*, 9: 11-31.
- 17) **Ortiz, R., Torres, J. (1983).** Ciclo de vida y hábitos de *Spalangia cameroni* PERKINS (Hymenoptera: Pteromalidae) en condiciones de laboratorio. Tesis de pre grado. Pro-Perkins Ltda. Palmira Colombia.
- 18) **Pérez-Hinarejos, M., Beitia, F. (2008).** Parasitism of *Spalangia cameroni* (Hymenoptera, Pteromalidae), an idiobiont parasitoid on pupae of *Ceratitis capitata* (Diptera, Tephritida). *IOBC/WOPRS Bulletin*, 38: 130-133.
- 19) **Pont, A.C. (1977).** A revision of Australian Fanniidae (Diptera: Calyptrate). *Australian Journal of Zoology*, 1: 1-60.
- 20) **Ridgway, R.L., Vinson, S.B. (1977).** *Biological Control by Augmentation of Natural Enemies*. Plenum Press. New York: 480 pp
- 21) **Rueda, L.M., Axtell, R.C. (1985).** Guide to common species of pupae parasites (Hymenoptera: Pteromalidae) of the house fly and other muscoid flies associated with livestock and poultry manure. North Carolina Agricultural Experiment Station Technical Bulletin, 128: 1-88.
- 22) **Rutz, D.A., Scoles, G.A. (1989).** Occurrence and seasonal abundance of parasitoids attacking Muscoid flies (Diptera: Muscidae) in caged-layer poultry facilities in New York. *Environmental Entomology*, 18: 51–55.

- 23) **Skidmore, P. (1985).** The biology of the Muscidae of the world, Junk Publishers, Dordrecht [xiii] +550 pp.
- 24) **Skevington, J.H., Dang, P.T. (2002).** Exploring the diversity of flies (Diptera). Biodiversity, 3:1-27
- 25) **Skovgard, H., Jespersen, J.B. (2000).** Seasonal and spatial activity of hymenopterous pupal parasitoids (Pteromalidae and Ichneumonidae) of the house fly (Diptera: Muscidae) on Danish pig and cattle farms. Environmental Entomology, 29: 630-637.
- 26) **Tormos, J., Beitia, F., Asís, J.D., de Pedro, L. (en prensa).** Natal host and learning as factors in host preference by *Spalangia cameroni* (Hymenoptera: Pteromalidae). Agricultural and Forest Entomology.
- 27) **Tormos, J., Beitia, F., Bockmann, E.A., Asís, J.D. (2009).** The preimaginal stages and development of *Spalangia cameroni* Perkins (Hymenoptera: Pteromalidae) on *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). Microscopy and Microanalysis, 40: 646-658.
- 28) **Tormos, J., Portillo, M., Asís, J.D. (2014).** Entomología y control biológico. Salamanca: Cajaduero; Paiporta (Valencia): Sendemà. ISBN e-book 978-84-694-0797-4. Libro en línea, <http://prisma.usal.es/libros/Entomologia>.
- 29) **Torres, P.R., Naveiro, D., Cicchino, A.C., Abrahamovich, A.H., Romano, A. (1992).** Estudio de la eficacia de la ciflutrina “pour on” contra *Haematobia irritans* (L. 1758) (Diptera: Muscidae) en bovinos bajo condiciones de pastoreo en el norte de la pcia. de Santa Fe (Argentina). Veterinaria Argentina, 9: 394–398.

30) **Zamora, E. (1996).** Técnica de producción masiva de *Spalangia endius* (Walker). II Curso de Actualización en Control Biológico. Centro Nacional de Referencia de Control Biológico. México.