

Veterinaria México

Volumen 35
Volume

Número 4
Number

Octubre-Diciembre 2004
October-December

Artículo:

Estudios preliminares con nematodos entomo-patógenos para el control biológico de la mosca del cuerno, *Haematobia irritans* L. (Diptera: Muscidae)

Derechos reservados, Copyright © 2004:
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

Otras secciones de
este sitio:

- 👉 [Índice de este número](#)
- 👉 [Más revistas](#)
- 👉 [Búsqueda](#)

*Others sections in
this web site:*

- 👉 [Contents of this number](#)
- 👉 [More journals](#)
- 👉 [Search](#)



www.Medigraphic.com

Estudios preliminares con nematodos entomopatógenos para el control biológico de la mosca del cuerno, *Haematobia irritans* L. (Diptera: Muscidae)

Entomopathogenic nematodes for biological control of horn fly, *Haematobia irritans* L. (Diptera: Muscidae), preliminary studies

Rubén Rodríguez Solano*
Consuelo Almazán García*
Ignacio Armendáriz González*

Abstract

Nine populations of entomopathogenic nematodes belonging to seven species of *Steinernema* and *Heterorhabditis* genera were tested against horn fly (*Haematobia irritans* L.). The study was carried out under laboratory conditions in three experiments: fly larvae in Petri dish, pupae in soil and pupae in manure. Eight nematode populations showed infectivity against larvae or adult fly in the Petri dish test but only *S. carpocapsae* showed infectivity in the soil and in the manure tests. Soil pastures sampled from Tamaulipas did not show presence of any natural entomopathogenic nematode population.

Key words: BIOLOGICAL CONTROL, ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES, *STEINERNEMA CARPOCAPSAE*, *S. ARENARIUM*, *S. FELTIAE*, *S. GLASERI*, *S. LONGICAUDATUM*, *S. RIOBRAVE*, *HETERORHABDITIS BACTERIOPHORA*, *HAEMATOBIA IRRITANS*, HORN FLY.

Resumen

Se probaron nueve poblaciones de nematodos entomopatógenos pertenecientes a siete especies de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis* contra la mosca del cuerno (*Haematobia irritans* L.). El estudio se realizó en condiciones de laboratorio mediante tres tipos de experimentos: Larvas de la mosca en placas de Petri, pupas en suelo y pupas en estiércol. Ocho de las poblaciones de nematodos demostraron infectividad en larvas o adultos en placa de Petri, pero sólo la especie *S. carpocapsae* demostró infectividad en suelo y estiércol. Un muestreo de suelos de pastos en Tamaulipas a la búsqueda de nuevas poblaciones de nematodos no produjo resultados positivos.

Palabras clave: CONTROL BIOLÓGICO, NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS, *STEINERNEMA CARPOCAPSAE*, *S. ARENARIUM*, *S. FELTIAE*, *S. GLASERI*, *S. LONGICAUDATUM*, *S. RIOBRAVE*, *HETERORHABDITIS BACTERIOPHORA*, *HAEMATOBIA IRRITANS*, MOSCA DEL CUERNO.

Recibido el 28 de agosto de 2003 y aceptado el 24 de febrero de 2004.

* Laboratorio de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Ciudad Victoria, Tamaulipas, Carretera Ciudad Mante, km 5.5, Tel. 01-834-3125078, E mail: inaquí27@yahoo.com

Introduction

Horn fly, *Haematobia irritans* (L), was introduced from Europe to America around 1880. Today the fly is widely dispersed in America.¹ Although the fly may occasionally have a different animal hostess such as equine, dogs, etc., it has a preference for bovine. Both male and female adults are hematophagous and remain on the host, except for short periods of time in which they lay their eggs in fresh manure. The larvae evolve to pupae in this environment, and the emerged adults seek bovine for feeding. The biological cycle duration depends on temperature; it can be as short as two weeks.² In cold conditions the fly gets into diapauses and the population temporarily disappears. However, in some areas in the state of Tamaulipas this phenomena does not occur since adults are present throughout the year.¹

Economical losses are related to loss of weight, loss of blood, stress and digestive problems. It is thought that in field conditions each adult fly feeds 24 to 38 times per day.² Some reproductive problems have been recorded as well, associated to stress, loss of milk, predisposition to certain diseases³ and skin damage.⁴

Normal control measures for the horn fly rely on chemical insecticides such as piretroids, organophosphorades, organochlorides and avermectines, which are directly poured on the animal, through aspersion, immersion baths or on ear tags. Unfortunately resistance to these insecticides has evolved rapidly in Mexico and other countries.⁵ Due to this resistance it is advisable to deploy other integrated control systems in order to decrease fly populations to acceptable levels and reduce the harm in cattle. Of these integrated control systems, biological control does not harm the environment, nor man feeding from cattle by-products or living in this environment.

For research and control programs, entomopathogenic nematodes^{6,7} are of special interest because they are easy to use, generally diluted in water, and they are commercially available. They are harmless, do not interact with man nor with other superior animals or vegetables. After a massive application and in absence of a suitable host, they remain in operative populations for months. Nematodes reproduce and their populations increase when a host becomes available. They are host specific, therefore undesirable collateral damage is almost nonexistent and they are capable of parasitize in a wide temperature range.

Several nematode species show insecticide potential. They induce a bacterial infection (species of *Xenorhabdus* and *Protorhabdus* genera) as they penetrate into the host which dies and consequently stops the biological cycle of the harmful species. The nematodes feed from the remains and they can originate a

Introducción

La mosca del cuerno o de la paleta, *Haematobia irritans* (L), fue introducida de Europa a Estados Unidos hacia 1880, en la actualidad presenta amplia distribución en América.¹ Muestra preferencia por el ganado bovino, aunque puede tener otros huéspedes ocasionales, como equinos, perros, etc. Ambos adultos, machos y hembras, son hematófagos, y permanecen en el huésped, salvo por breves intervalos de oviposición en estiércol reciente. Las larvas se desarrollan en este medio, pupan en él y los adultos recién emergidos buscan bovinos para su alimentación. La duración del ciclo biológico depende de la temperatura, y puede ser de tan sólo dos semanas.² En condiciones frías la especie entra en diapausa, con desaparición temporal de las poblaciones. Sin embargo, en algunas zonas de Tamaulipas no se observa este fenómeno, pues los adultos están presentes todo el año.¹

Las pérdidas económicas se refieren a la disminución de peso de los bovinos, ocasionada por pérdida de sangre, estrés y problemas digestivos. Se estima que cada mosca adulta se alimenta entre 24 y 38 veces por día en condiciones de campo.² Igualmente se han registrado problemas en la reproducción, asociados con el estrés, pérdida de leche, facilitación de ciertas enfermedades³ y daños en la piel.⁴

Los procedimientos normales de control son: el uso de insecticidas químicos, como piretroides, organofosforados, organoclorados y avermectinas, aplicados directamente al animal por aspersion, baño o mediante aretes. Desafortunadamente la resistencia a estos insecticidas se ha desarrollado rápidamente en México y en otros países.⁵ Debido a estos fenómenos de resistencia se aconseja instrumentar urgentemente otros sistemas de control integrado que permitan reducir las poblaciones de la mosca a niveles aceptables, y minimizar el daño ejercido sobre el ganado bovino. Dentro de un control integrado, el denominado control biológico ofrece la ventaja de su inocuidad para el ambiente y, en consecuencia, para el hombre, consumidor de los productos ganaderos y habitante del entorno.

Dentro de la experimentación y de los programas ya en funcionamiento, los nematodos entomopatógenos^{6,7} presentan una especial importancia por sus posibilidades, ya que son de fácil aplicación, normalmente diluidos en agua, y están disponibles comercialmente en diferentes empresas; son inocuos, pues no presentan interacciones ni con el hombre ni con especies animales superiores, ni afectan a los cultivos vegetales; tras una aplicación masiva y a falta del huésped, permanecen en poblaciones operativas durante meses, y en presencia del huésped,

second nematode generation capable of causing new infections. A single nematode is capable of killing the host, but in normal conditions and due to other factors, such as host size, more than one nematode penetrates the host at a given time. The two most used genera for this purpose are *Steinernema* and *Heterorhabditis*.⁷

The horn fly lay their eggs and their larvae develop in manure as part of its biological cycle. Conditions in manure are generally speaking, restrictive for commercial available nematodes due to anoxia and high nitrogenated derivative content. Therefore, a first step in this study was the search for autochthonous species resistant to this environment and which show infectivity.

The project "Biological control of horn fly, *Haematobia irritans*", was funded by The National Council of Science and Technology of Mexico, through UCMEXUS-Conacyt 2001. Research work was carried out between the Autonomous University of Tamaulipas (UAT) and the University of California at Davis. The aims of this work were to search for natural populations of entomopathogenic nematodes in Tamaulipas and California and to perform *in vitro* testing of the nematodes. Populations previously collected were kept in the UAT parasitology laboratory in order to know their infectivity against *Haematobia*.

Material and methods

Field search of nematodes

In order to search for autochthonous species of entomopathogenic nematodes, six samplings of grass from the state of Tamaulipas were carried out between November 2001 and September 2002. The 50 chosen sampling sites were always grass or cattle resting places from the Ciudad Victoria Municipality. During the rainy season three soil samples were taken 30 cm deep from a 10 m² area in two different places of the selected grass land. Samples were identified and taken to the laboratory in coolers. After manually homogenizing the samples, approximately 250 g were taken. Dry soil samples were soaked in 20 ml of water. These samples were poured into plastic containers with six wax moth larvae, *Galleria mellonella*, for nematode isolation.⁷ Wax moth larvae were purchased at Rainbow Mealworms, Inc., California. They were used within the first month of storage. After five days at room temperature, dead *Galleria* larvae were introduced in White⁸ traps to wait for the exit of the entomopathogenic nematodes. The same procedure was carried out for all 100 samples.

se reproducen y aumentan sus poblaciones; son muy específicos en sus huéspedes, por lo que se minimizan los daños secundarios; actúan en un rango amplio de temperaturas.

Son varias las especies de nematodos con potencial insecticida. La entrada de éstos en el huésped provoca una infección bacteriana (especies de los géneros *Xenorhabdus* y *Protorhabdus*) que provoca la muerte del huésped y, en consecuencia, detienen el ciclo biológico de la especie dañina. Los nematodos continúan alimentándose en el cadáver y son capaces de originar una segunda generación pronta para nuevas infecciones. La entrada de un solo nematodo origina la muerte del huésped, pero en condiciones normales, y debido a otros factores como el tamaño del huésped, entra un número mayor. Los dos géneros más usados son *Steinernema* y *Heterorhabditis*.⁷

El ciclo biológico de la mosca del cuerno utiliza el estiércol como el lugar de puesta y desarrollo de larvas. Las condiciones propias de este medio son, en general, restrictivas para las especies comerciales de nematodos, por la anoxia y la fuerte cantidad de derivados nitrogenados. Por ello, y sin descartar las pruebas con estas especies, un primer paso en la investigación fue la búsqueda de especies autóctonas resistentes a este medio y con capacidad infectiva.

En esta tesitura, el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, de México, mediante la convocatoria UCMEXUS-Conacyt 2001, financió el proyecto "Control biológico de la mosca del cuerno, *Haematobia irritans*", realizado entre la Universidad Autónoma de Tamaulipas (UAT) y la Universidad de California, Davis. Los objetivos fueron la búsqueda de poblaciones naturales de nematodos entomopatógenos en Tamaulipas y en California, así como pruebas de laboratorio con los insectos encontrados y las poblaciones previamente albergadas en el Laboratorio de Parasitología de la UAT para comprobar su infectividad en *Haematobia*.

Material y métodos

Búsqueda de especies en campo

Entre noviembre de 2001 y septiembre de 2002 se efectuaron seis muestreos en pastos de Tamaulipas, México, para buscar especies autóctonas de nematodos entomopatógenos. Los 50 lugares elegidos fueron siempre pastos o sesteaderos de bovinos del municipio de Ciudad Victoria. En época de lluvias se tomaron tres muestras de suelo con una profundidad de 30 cm, en un área de 10 m², en dos puntos diferentes del pasto. Las muestras etiquetadas se llevaron en hieleras al laboratorio. Después de homogeneizarlas manualmente se tomaron alrededor de 250 g de

Fly colony set up

To avoid genetic variability of field populations and to ensure enough material availability (larvae and pupae) for the experiment, a stable fly colony was set up. Advisory and pupae material of *Haematobia* was kindly provided by researchers from the National Center of Confirmation in Animal Science in Jiutepec, Morelos, Mexico. Colony conservation between October 2001 and March 2003 occasionally affected our investigation due to a low number of available fly larvae and pupae.

Nematode tests

In this research project nine nematode populations were evaluated in three different tests: larvae in Petri dishes, pupae in soil and pupae in manure (Table 1). Nematodes were reproduced regularly in the laboratory using *Galleria* and White traps.^{7,8} The use of populations for our study was restricted to those younger than one month old in order to avoid a loss in their infectivity.

Larvae in Petri dishes

For this preliminary test nine nematode populations kept in the laboratory were used. Ten *Haematobia* larvae two to three-day-old, were placed in 9 cm Petri dishes with wet paper towel and 3-4 g of fresh manure were added to preclude their growth. A thousand nematodes were introduced in the Petri dish and kept at room temperature in dark conditions. After three days, the dish was opened to evaluate pupation or infected larvae (dead larvae were dissected). Enough time was given to allow adults to emerge. These adults were introduced in new Petri dishes every 24 hours and were dissected two days later. Pupae which did not

suelo. En caso de que estuvieran en suelo seco, se añadieron 20 ml de agua. Después se introdujeron en un recipiente de plástico con seis larvas de la mariposa de la cera, *Galleria mellonella*, para aislar los nematodos;⁷ las larvas de mariposas se adquirieron en la Rainbow Mealworms, Inc., en California, y se utilizaron antes del primer mes de su almacenaje. Después de cinco días a temperatura ambiente se sacaron las larvas de *Galleria* muertas y se colocaron en trampas de White⁸ para esperar la salida de los nematodos entomopatógenos. Este proceso se realizó con las 100 muestras.

Establecimiento de una colonia de moscas

Con el propósito evitar la variabilidad genética con poblaciones de campo y disponer de suficiente material (larvas y pupas) para la experimentación, se constituyó una colonia estable de la mosca. Para ello se contó con el apoyo de investigadores del Centro Nacional de Constatación en Salud Animal de Jiutepec, Morelos, México, quienes brindaron asesoramiento y material de pupas de *Haematobia*. El mantenimiento de la colonia, entre octubre de 2001 y marzo de 2003, tuvo altibajos y en ocasiones limitó la investigación por carecer de un número suficiente de larvas y pupas de la mosca para realizar los experimentos.

Pruebas con nematodos

Nueve poblaciones de nematodos fueron usadas en la investigación en tres tipos de pruebas; larvas en placas de Petri; pupas en suelo y pupas en estiércol (Cuadro 1). Los nematodos fueron reproducidos regularmente en el laboratorio mediante *Galleria* y trampas de White.^{7,8} Las poblaciones usadas en la experimentación no excedían de un mes de antigüedad para evitar disminución en su capacidad infectiva.

Larvas en placas de Petri

En esta prueba preliminar se usaron las nueve poblaciones de nematodos albergadas en el Laboratorio. Se colocaron diez larvas de *Haematobia* de entre dos y tres días de edad en placa de Petri de 9 cm de diámetro con papel húmedo y con tres a cuatro gramos de estiércol fresco, para permitir su desarrollo. Se añadieron mil nematodos y la placa se guardó a temperatura ambiente en una cámara oscura. Tres días después se abrió la placa para comprobar la pupación o presencia de larvas infectadas (para ello se disecaron todas las larvas muertas). Se esperó el tiempo necesario para la emergencia de los adultos

Cuadro 1

ESPECIES DE NEMATODOS Y PRUEBAS

NEMATODE SPECIES AND TESTS

	Larvae	Soil	Manure
<i>H. bacteriophora</i> California	* +		
<i>S. arenarium</i> California	*		
<i>S. carpocapsae</i> California	* +	* +	* +
<i>S. feltiae</i> Hawaii	* +		
<i>S. feltiae</i> Mexico	* +	*	*
<i>S. feltiae</i> SN	* +		*
<i>S. glaseri</i> California	* +	*	
<i>S. longicaudatum</i> California	* +	*	*
<i>S. riobrave</i> Texas	* +		

*Done

+Infectivity

emerge were dissected as well. A control without nematodes was used to test for adult fly emergence.

Soil testing

Plastic containers with a 500 cc capacity containing 250 g of sterilized soil (15% humidity) and 10 fly pupae each, were inoculated with zero, 1 500 and 3 000 nematodes (Table 1). The containers were kept at room temperature and covered with a piece of fabric in order to detect adult emergence. Adults were collected every 24 hours, introduced in Petri dishes and dissected at two days of age.

Manure testing

A similar design to that previously described was set up. Containers in this case were of a 1 000 cc capacity with 700 g of bovine manure (manure was collected freshly and frozen to get rid of the faunae content). Higher nematode dosages of 2 000 and 4 000 were used for each bottle (Table 1). One container was kept without nematodes.

Results

Field search of nematodes

None of the 100 samples showed entomopathogenic nematode content. These results are in agreement with those reported by the University of California at Davis.

Larvae in Petri dishes

Table 2 shows results from three assays carried out with fly larvae in Petri dishes. Infective nematodes average and infectivity frequency refer to larvae dissections and fly adult totals. The non emerged pupae were dissected. They were not infested in the first two assays. Nematodes were only able to infest adults but not larvae, most of which pupated. Regarding the third assay, some nematode species showed mainly larval rather than adult infective capacity (seven out of ten Petri dishes showed larvae infection and only two infected adults; in the second assay, zero and eight were infected respectively). Some of the pupae were infected (four with *S. carpocapsae*, one with *S. feltiae* Mexico, and three with *S. feltiae* Hawai). These last infestations were not recorded in the table due to pupae breaking during the manipulation of the plates. Occasionally larvae tend to pupate between glass borders and when the adhesive tape is torn apart the pupae may break. Only one nematode species, *S. arenarium*, did not show any infective capacity to any

que cada 24 horas eran pasados a nuevas placas de Petri y diseccionados a los dos días; las pupas que no emergieron también se disecaron. Se estableció un testigo sin nematodos para comprobar la emergencia de moscas adultas.

Pruebas en suelo

Se colocaron 250 g de suelo esterilizado (15% de humedad) en recipientes de plástico de 500 cc y en ellos se introdujeron diez pupas de mosca. Se aplicaron dos dosis de nematodos: 1 500 y 3 000 y uno sin ninguno (Cuadro 1). El conjunto se mantuvo a temperatura ambiente. Los recipientes se cubrieron con tela que permitía comprobar la emergencia de los adultos. Cada 24 horas, éstos eran trasladados a placas de Petri y diseccionados a los dos días.

Pruebas con estiércol

Se aplicó un diseño semejante al anterior pero en recipientes de 1 000 cc con masas de estiércol de bovino de 700 g (el estiércol fue colectado en fresco y congelado para eliminar su fauna) y dosis más altas de nematodos, 2 000 y 4 000 por bote (Cuadro 1). Se estableció uno sin nematodos.

Resultados

Búsqueda de especies en campo

Ninguna de las 100 muestras mostró tener nematodos entomopatógenos; el resultado es semejante al encontrado en la Universidad de Davis, en California.

Larvas en placas de Petri

En el Cuadro 2 se indican los resultados de las tres experimentaciones hechas con larvas de mosca en placas de Petri. La media de nematodos infectantes y la frecuencia de infectividad se refieren al total de disecciones de larvas y adultos de la mosca. Se diseccionaron las pupas no emergidas y no aparecieron parasitadas en los dos primeros ensayos. Los nematodos son capaces de infectar únicamente a los adultos y no a las larvas cuya inmensa mayoría puparon. En el tercer ensayo algunas especies de nematodos son capaces de infectar de forma predominante a las larvas de la mosca sobre los adultos (de las diez placas, siete infectaron a las larvas y tan sólo dos a los adultos, frente a cero y ocho, respectivamente, en el segundo experimento). Algunas pupas aparecieron parasitadas (cuatro con *S. carpocapsae*, una con *S. feltiae* México, y tres con *S. feltiae* Hawai); estas últimas infestaciones no se reflejan en

Cuadro 2
PRUEBAS EN PLACAS DE PETRI CON LARVAS DE *Haematobia*

TESTS WITH <i>Haematobia</i> LARVAE IN PETRI DISHES						
	<i>Pupae</i>	<i>Adults</i>	<i>Larvae</i>	<i>Infectivity</i>	<i>Nematodes average</i>	<i>Infectivity frequencies (%)</i>
<i>First trial</i>						
<i>S. arenarium</i>		1		No		
	1			No		
<i>S. carpocapsae</i>	1	9		Yes	6.71	77.77
		10		Yes	0.11	22.22
<i>S. glaseri</i>		8		Yes	2.75	75.00
	9			No		
<i>S. riobrave</i>	8		2	No		
	6		4	No		
<i>H. bacteriophora</i>	5	2		No		
	3	5		Yes	19.20	60.00
<i>Second trial</i>						
<i>S. arenarium</i>	2	8		No		
		10		No		
<i>S. carpocapsae</i>		10		Yes	6.11	90.00
		7		Yes	10.86	100.00
<i>S. glaseri</i>	2	8		Yes	0.63	60.00
		10		Yes	1.38	37.50
<i>S. riobrave</i>		9		Yes	1.60	70.00
		10		Yes	7.00	87.50
<i>H. bacteriophora</i>		10		Yes	17.3	70.00
		9		Yes	0.89	11.11
Control		10				
		10				
<i>Third trial</i>						
<i>S. carpocapsae</i>	2	3	4	Yes	5.43	71.43
	3	3	1	Yes	15.50	25.00
<i>S. longicaudatum</i>	1	9		Yes	0.50	50.00
	1		7	No		
<i>S. felitae Hawaii</i>	5	1	1	Yes	15.75	25.00
	4	3	1	Yes	3.00	50.00
<i>S. felitae Mexico</i>		2	7	Yes	10.88	87.50
	2	2	6	Yes	11.38	75.00
<i>S. felitae NS</i>	2	5	3	Yes	37.50	50.00
	1		5	No		
Control	1	9				
	4	4				

Bold numbers indicate infectivity

of the fly forms (larvae, pupae nor adult). The most versatile species was *S. carpocapsae*, since it infected with high frequency both adults and larvae. *H. bacteriophora* and the three varieties of *S. feltiae* performed well. The controls yielded good fly emergence in nematode absence (in the first assay the control was omitted). Results from the three Petri dish assays differ among each other regarding larvae, pupae and adult final presence as well as in the infectivity achieved in the same developmental stages. Regarding the organisms final number, adults were a majority, followed by pupae and larvae. In the second assay there were only adults at the end (96%) with no larvae present. In the third assay there were more larvae present than pupae (34% and 26%, respectively). Regarding infectivity the main variation was observed with *S. riobrave*, since infection was observed in the second but not in the first assay, and larvae were infected only in the third assay.

Soil testing

Due to time and material limitations only four of the available nematode populations were tested (Table 1). A total of fifteen assays were carried out. Only *S. carpocapsae* showed infective capability (Table 3). In a broad sense, infective nematode media and infectivity frequency were less than that showed in larvae in Petri dish for the same nematode species. On the other hand, there was not a clear influence in the infectivity in relation to nematode dosage since results from assay two showed the same infectivity at both the 1 500 and 3 000 dose. It should be noted that adult emergence is variable and control group emergences are higher than that observed in the treated groups. If the first 11 assays are to be considered, they showed an acceptable emergence (= 70%), ten of them showed an emergence higher than that of the control (Table 4). The median comparison test yields a value for $P = 0.0006$ with a confidence interval of 95% which is significant for values of $P < 0.05$. Only results from the second assay (Table 3) showed infectivity and a high frequency in all treatments (41.67% of the total dissected adults were infected).

Manure testing

Nematodes from five populations were tested (Table 1). Again, only *S. carpocapsae* showed infectivity at very low levels. Only one of the adults was infected (Table 5).

Discussion

Climatic conditions could explain the absence of

el cuadro porque se debieron a la rotura de las pupas en la manipulación de las placas, ya que en ocasiones las larvas tienden a pupar entre los bordes del cristal, y al desprender el adhesivo que actúa como aislante pueden romperse. Sólo una especie de nematodo, *S. arenarium*, no mostró infectividad en ninguna de las formas de la mosca (larva, pupa o adulto). La especie más versátil fue *S. carpocapsae*, ya que infectó adultos y larvas con alta frecuencia. *H. bacteriophora* y las tres variedades de *S. feltiae* tuvieron un buen comportamiento. Los testigos presentaron una buena emergencia de las moscas en ausencia de nemátodos (en el primer ensayo se omitió el testigo). Los resultados de las tres pruebas en placa de Petri difieren entre sí en cuanto a la presencia final de larvas, pupas y adultos, y en cuanto a la infectividad lograda en estos mismos estadios. Respecto del número final los adultos son mayoritarios, seguidos por las pupas y larvas, pero en el segundo experimento hay casi sólo adultos (96%) y no se encuentran larvas, y en el tercero hay más larvas que pupas (34% y 26%, respectivamente). Respecto de la infectividad, la mayor variación se refiere a *S. riobrave*, que infectó en el segundo experimento y no en el primero, y a que las larvas son infectadas sólo en el tercer experimento.

Pruebas en suelo

Por limitaciones de tiempo y de material, esta segunda fase se aplicó únicamente a cuatro de las poblaciones de nematodos disponibles (Cuadro 1) y se realizaron 15 ensayos. Sólo *S. carpocapsae* mostró capacidad infectiva (Cuadro 3). En general la media de nematodos infectantes y la frecuencia de infectividad fue menor a la presentada en larvas en placa de Petri para la misma especie de nematodo. Asimismo, no se observó influencia clara de la dosis de nematodos, ya que en el ensayo dos, las dosis de 1 500 se mostraron tan efectivas como las de 3 000. Se debe destacar que la emergencia de adultos es variable, y que en los testigos es mayor que en los tratamientos; si se consideran los 11 primeros ensayos que tuvieron una emergencia aceptable (= 70%), diez de ellos presentaron una emergencia mayor en los testigos (Cuadro 4). La prueba de comparación de medias arroja un valor de $P = 0.0006$ para un intervalo de confianza del 95%, que es significativo para valores de $P < 0.05$. Sólo el segundo ensayo (Cuadro 3) mostró infectividad en todos los tratamientos y con alta frecuencia (41.67% del total de adultos diseccionados estaban infectados).

Pruebas con estiércol

En ellas se emplearon cinco poblaciones de nematodos (Cuadro 1) y de nuevo únicamente *S. carpocapsae*

Cuadro 3

INFECTIVIDAD DE LOS NEMATODOS EN ENSAYOS DE SUELO

NEMATODES INFECTIVITY IN SOIL TESTS

<i>S1 treatment</i>	<i>S. carpocapsae fly emergence (%)</i>	<i>Nematodes average</i>	<i>Infectivity frequencies (%)</i>
Control	70		
Control	80		
1 500	70		
1 500	70	0.71	14.29
3 000	50		
3 000	50		
<i>S2 treatment</i>			
Control	100		
Control	80		
1 500	70	1.00	14.29
1 500	70	1.29	71.43
3 000	50	6.6	20
3 000	80	18.12	37.50
<i>S11 treatment</i>			
Control	80		
1 500	40		
1 500	40		
3 000	80	0.50	12.50
3 000	80	0.12	12.50

entomopathogenic nematodes in all 100 samples. It is usual to find these kind of nematodes in at least some percentage of the samples.⁹ Coincidentally these results were similar to those reported in California. High temperatures (soil mean temperature was 26.8°C) and a dry environment previous to November 2001 could explain the absence of nematodes. There are some species such as *Steinernema riobrave* which may adapt to high temperatures.¹⁰

Results from the three Petri dish tests (Table 2) dissented regarding to final presence of larvae, pupae and adults, and the achieved infectivity in the same stages. All tests were carried out throughout ten days of February 2002. Therefore, notable changes in environmental temperature as well as a notable decrease in the nematode infective capacity are factors not to be considered as an explanation to these results. Possible explanations could be variation of the manure used (cool but not frozen) or the fly colony strength,

mostró infectividad, aunque de forma muy baja; sólo uno de los adultos apareció infectado (Cuadro 5).

Discusión

La ausencia de nematodos entomopatógenos en las 100 muestras podría ser consecuencia de las condiciones climáticas. Es común que al menos en cierto porcentaje de las muestras se presentan este tipo de nematodos.⁹ Coincidentemente, los resultados fueron semejantes en California. La ausencia de nematodos podría ser explicada, en parte, por las altas temperaturas (la media de temperatura del suelo fue 26.8°C) y las condiciones de sequedad ambiental previas a noviembre de 2001. Hay especies, como *Steinernema riobrave*, que se adaptan a altas temperaturas.¹⁰

Los resultados de las tres pruebas en placa de Petri (Cuadro 2) difieren entre sí en cuanto a la presencia final de larvas, pupas y adultos, y en cuanto a la

Cuadro 4

PORCENTAJES DE EMERGENCIA DE ADULTOS POR ENSAYO
ADULT EMERGENCE PERCENTAGES PER TRIAL

<i>Trial</i>	<i>Species</i>	<i>Control (%)</i>	<i>Treatment (%)</i>
S1	<i>S. carpocapsae</i>	75	60.0
S2	<i>S. carpocapsae</i>	90	68.0
S3	<i>S. feltiae</i> Mexico	80	70.0
S4	<i>S. feltiae</i> Mexico	95	82.5
S5	<i>S. feltiae</i> Mexico	90	70.0
S6	<i>S. longicaudatum</i>	80	70.0
S7	<i>S. longicaudatum</i>	80	47.5
S8	<i>S. feltiae</i> Mexico	90	75.0
S9	<i>S. feltiae</i> Mexico	70	82.5
S10	<i>S. carpocapsae</i>	90	60.0
S11	<i>S. carpocapsae</i>	80	60.0
S12	<i>S. longicaudatum</i>	10	17.5
S13	<i>S. longicaudatum</i>	0	22.5
S14	<i>S. glaseri</i>	20	17.5
S15	<i>S. carpocapsae</i>	10	20.0

which when decreased makes larvae infection possible and in consequence the final number of adults decrease as well.

While results from larvae tested in Petri dishes probed to be good (from nine nematode populations tested, eight infected larvae and adults), those from subsequent tests were notably worst. Conditions are more advantageous to infection in Petri dishes, where nematodes can be anywhere. While conditions in containers with soil and manure are similar to the fly field conditions. Nematodes are more disperse in a higher volume and flies are much less exposed to nematode action. At emergence, adults tend to fly towards the light, which irradiates from the fabric that covers the container and is free of nematodes due to dryness; therefore, adults are free from infection. These results differ from those obtained by Poinar and Boxler,¹¹ in which they reported that stable fly larvae (*Stomoxys calcitrans*) are very susceptible (67% of infection) to *S. feltiae* (*Neaplectana bibionis*). Although *S. carpocapsae* did not infected larvae of this species, about 20% of adult flies were infected at emergence from pupae in manure. On the other hand, probability of infection of flies at ovoposition time in the field is nill. This is because they ovoposit

infectividad lograda en estos mismos estadios. Todas las pruebas fueron realizadas en el transcurso de diez días de febrero de 2002, por lo que no cabe suponer variaciones notables en la temperatura ambiental ni disminución notable de la capacidad infectiva de los nematodos. Como explicación puede aducirse la variación de estiércol empleado (fresco, pero no congelado) o la vitalidad de la colonia de moscas, que por disminuir posibilite la infección de larvas y disminuya el número final de adultos.

Mientras que los resultados en las pruebas con larvas en placa de Petri fueron buenos (de nueve poblaciones de nematodos probadas, ocho infectaban larvas y adultos), en las siguientes pruebas empeoraron notablemente. Las condiciones son más favorables a la infección en la placa de Petri, donde los nematodos pueden estar en cualquier punto. Los contenedores con suelo y estiércol se asemejan más a las condiciones de campo de la mosca; los nematodos están dispersos en un mayor volumen y las moscas están bastante menos expuestas a la acción de los nemátodos. Los adultos que emergen en los botes tienden hacia la luz, que coincide con la tela que tapa el bote, donde los nematodos no tienen acceso por sequedad, y allí están libres de infección. Los resultados son divergentes

Cuadro 5
INFECTIVIDAD DE LOS NEMATODOS EN ENSAYOS
CON ESTIERCOL

NEMATODES INFECTIVITY IN MANURE TESTS			
Trial	Species	Nematodes average	Infectivity frequencies (%)
1	<i>S. carpocapsae</i>	0.12	12.50
2	<i>S. feltiae</i> Mexico		
3	<i>S. feltiae</i> Hawai		
4	<i>S. feltiae</i> SN		
5	<i>S. longicaudatum</i>		

in fresh manure, which can not be infected by entomopathogenic nematodes.

Limitation in material and time prevented the use of all populations in all three tests. It would be interesting in further studies to dilucidate whether or not other nematode species show infectivity in soil and manure.

The pupae infection case looks uncertain. It can be proposed *a priori* that the strong cuticle prevents any infection, such as is the case in other diptera.¹² Another point of interest to determine would be if the infected larvae with nematodes are capable of pupating or the nematodes are able to penetrate during the pupation process, when the cuticle is still not fully formed. This could be confirmed using five to six day old larvae. The fact that adult emergency was significantly higher in the control groups would support the hypothesis of pupae infection. The presence of nematodes in the soil would eliminate some flies which would not merge, therefore, they would not be counted. This research should be repeated to check the state of non emerged pupae. With the last four assays (S12 to S15) there was an apparent decrease in the colony strength or the beginning of the diapause phenomenon which, in turn caused very little emergence.

S. carpocapsae was the species which showed the best results. It was the only one that showed activity against both larvae and adults, in soil and in manure. It looks the most convenient for a further field trial. Its "ambusher"⁷ behavior increases the possibility of emerged adult infection, since juveniles wait for their prey with a vibration movement that allows their location. The better efficiency in soil as compared to manure is related to anoxia and nitrogenated by-products, which difficult their performance. However, presence of manure in Petri dishes did not totally paralyze their action. Many of the research studies that are reported used chicken manure but not bovine manure, therefore, more specific studies on this matter are suggested. On the other hand, new field samplings could discover new candidate nema-

de los de Poinar y Boxler,¹¹ quienes encontraron que las larvas de la mosca del establo (*Stomoxys calcitrans*) son muy susceptibles (67% de infección) a *S. feltiae* (*Neoplectana bibionis*). Aunque *S. carpocapsae* no infectó las larvas de esta especie, cerca de 20% de moscas adultas se infectaron al emerger de las pupas en el estiércol. Por otra parte, la probabilidad de infección de las moscas a la hora de la oviposición en campo es nula, debido a que la hacen en estiércol recién puesto que no puede estar infectado por nematodos entomopatógenos.

La limitación de tiempo y material impidió usar todas las poblaciones en las tres pruebas; cuestión interesante para futuras investigaciones es dilucidar si otras especies de nematodos presentan o no infectividad en suelo y estiércol.

El caso de la infección de pupas parece dudoso. *A priori*, es de suponer que la fuerte cutícula que presentan impide toda infección, como en el caso de otros dípteros.¹² Otro punto sería saber si las larvas infectadas con nematodos son capaces de pupar, o si en el proceso de pupación, cuando la cutícula no está aún del todo constituida, los nematodos son capaces de entrar; el uso de larvas de cinco o seis días permitiría comprobarlo. El hecho de que la emergencia de adultos sea significativamente mayor en los testigos apoyaría la hipótesis de una infección en las pupas; la presencia de nematodos en el suelo eliminaría a algunas moscas que, al no emerger, no son contabilizadas. Resta repetir la experimentación y comprobar el estado de las pupas no emergidas. En los cuatro últimos ensayos (S12 a S15) cabe suponer una disminución de la vitalidad de la colonia o el comienzo de un fenómeno de diapausa, lo cual ocasionó emergencias muy pequeñas.

La especie con mejores resultados fue *S. carpocapsae*, única con infectividad en suelo y estiércol contra larvas y adultos; es la más conveniente para una prueba posterior de campo. Su comportamiento de "emboscador"⁷ favorece la posibilidad de infección de los adultos emergentes, pues los juveniles esperan a sus presas con un movimiento de vibración que permite su localización. La mejor eficiencia en suelo frente al estiércol se relaciona con las condiciones de anoxia y abundancia de productos nitrogenados que dificultan su desempeño. Sin embargo, la presencia de estiércol en las placas de Petri no paralizó totalmente su acción y muchos de los estudios realizados han sido en pollinaza y no en estiércol de bovino, por lo que se sugieren estudios más específicos sobre este factor. Por otro lado, nuevos muestreos de campo podrán arrojar otros nematodos candidatos, bajo la suposición de que las especies presentes serán las mejor adaptadas a este medio.

En la literatura consultada aparecen casos exitosos

todes, under the supposition that the current species would be better adapted to this environment.

Reviewed articles report successful cases of fly control in field conditions. *S. feltiae* showed to be successful against champignon fly, *Lycoriella auripila* (Sciaridae), in champignon rearing units¹³ and in greenhouses.¹⁴

Various entomopathogenic nematodes have been used against fly species in manure locations.¹⁵ When *S. carpocapsae* and *H. bacteriophora* were used against larvae from four fly species in chicken manure, there was no observed reduction in fly density.^{16,17} As opposed, Belton *et al.*¹⁸ reported significant reduction in adult domestic flies (*Musca domestica*) after manure treatment with *H. bacteriophora*. Renn¹⁹ showed that chicken manure treated with *S. feltiae* or *H. megidis* encapsulated in calcium alginate, causes a good reduction of adult domestic flies. In porcine intensive production units, Renn²⁰ found a domestic fly reduction with the use of *S. feltiae* and *H. megidis*. In this study, traps with fly attractants loaded with nematodes were used. The use of an attractant for the horn fly, may be a blood derivative which could be another line of work in which the infective nematodes would be multiplied and dispersed by the adults.

Hopefully further investigations will answer some of the questions encountered in this project.

Acknowledgements

The collaboration in this project, as well as suggestions and materials provided, particularly the nematodes by Dr. Harry Kalla, from California University, Davis fully acknowledged. We also acknowledge Dr. Enrique Cabanillas who provided the *S. riobrave*, as well as Conacyt which funded this project. Finally we are grateful to the Autonomous University of Tamaulipas, Veterinary School, where this research was carried out. Technician Cruz Armida Olmeda efficiently collaborated in the laboratory work. Dr. Andrew Snyderlaar Hardwicke and MSC Felix Acosta Martinez are acknowledged by the English translation.

Referencias

1. Almazán C, Castillo S, Loredó J, García Z. Dinámica poblacional de *Haematobia irritans* en un hato de bovinos de Soto la Marina, Tamaulipas México. Vet Méx 2000;32:149-152.
2. Chihu AD, Chihu AL. Biología y comportamiento de las moscas *Haematobia irritans* y *Stomoxys calcitrans*. Tópico Parasitol Animal 1996;3: 98-114.
3. Cantú A. Epidemiología de la resistencia de la mosca del cuerno (*Haematobia irritans*) a los insecticidas en Tamaulipas. En: Curso Diagnóstico y Control de las

de control en condiciones de campo. *S. feltiae* se mostró eficaz contra la mosca del champiñón, *Lycoriella auripila* (Sciaridae), en criaderos de champiñón¹³ y en invernaderos.¹⁴

Se han aplicado diversos nematodos entomopatógenos contra especies de mosca en zonas de estiércol.¹⁵ Cuando se aplicaron *S. carpocapsae* y *H. bacteriophora* contra larvas de cuatro especies de mosca en estiércol de pollo no se observó reducción en la densidad de moscas.^{16,17} En contraste, Belton *et al.*¹⁸ encontraron reducción significativa de adultos de la mosca doméstica (*Musca domestica*) después de tratar el estiércol con *H. bacteriophora*. Renn¹⁹ demostró que la pollinaza tratada con *S. feltiae* o *H. megidis* encapsulado con alginato de calcio produce buena reducción de los adultos de mosca doméstica. En explotaciones intensivas de ganado porcino, Renn²⁰ encontró reducción de la mosca doméstica usando *S. feltiae* y *H. megidis*; en este estudio se emplearon trampas con atrayentes de moscas cebadas con nematodos. El uso de un atrayente para la mosca del cuerno, quizás algún derivado sanguíneo, puede ser otra línea de trabajo en la cual los nematodos infectantes serían reproducidos y dispersados por los adultos.

Ojalá que futuras investigaciones aclaren alguno de los puntos pendientes en este proyecto.

Agradecimientos

Se agradece al Dr. Harry Kalla, de la Universidad de California, Davis, su participación en el proyecto, así como sus sugerencias y facilitación de material, especialmente los nematodos; reconocemos la aportación de *S. riobrave* al Dr. Enrique Cabanillas, así como al Conacyt por financiar el proyecto. Finalmente, debemos gratitud a la Universidad Autónoma de Tamaulipas, Escuela de Veterinaria, en cuyo seno se ha realizado la investigación. La técnica Cruz Armida Olmeda colaboró con eficacia en los trabajos de laboratorio. Al Dr. Andrew Snyderlaar Hardwicke y al MSC Félix Acosta Martínez por su traducción al inglés, igualmente gracias.

Principales Enfermedades Parasitarias en Tamaulipas. 1988, 16-18 Octubre, Ciudad Victoria, Tamaulipas. Universidad Autónoma de Tamaulipas, Lapisa y Gobierno del Estado. Ciudad Victoria, Octubre de 1988. P. 55-59.

4. Guglielmone AA, Gimeno E, Idiart J, Fisher WF, Volpogny MM, Quaino O, *et al.* Skin lesions and cattle damage from *Haematobia irritans* infestations. Med Vet Entomol 1999;13:324-329.
5. Kunz SE, Schmidt DCh. The pyrethroid resistance

- problem in the horn fly. *J Agric Entomol* 1985;2: 358-363.
6. Kaya HK, Stock SP. Techniques in insect nematology. In: L. A. Lacey, ed., *Manual of Techniques in Insect Pathology*, London, Academic Press: 1997: 281-324
 7. Kaya HK, Gaugler R. Entomopathogenic nematodes. *Annu Rev Entomol* 1993;38:181-206.
 8. White GF. A method for obtaining infective nematodes larvae from culture. *Science* 1924;66: 302-303.
 9. Stock SP, Pryor BM, Kaya HK. Distribution of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) in natural habitats in California, USA. *Biod Conser* 1999;8:535-549.
 10. Cabanillas HE, Poinar GO, Raulston JR. *Steinernema riobravis* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae) from Texas. *Fundam Appl Nemat* 1994;17:123-131.
 11. Poinar GO, Boxler DJ. Infection of *Stomoxys calcitrans* (Diptera) by neoaplectanid nematodes (Steinernematidae). *Inter Res Comm Syst Medi Sci: Microb, Paras and Infect Dis.* 1984;12:481.
 12. Ghally SE, Kamel EG, Nasr NM. Comparative studies on the production of invasive larvae of *Steirnerma felitiae* Filipjeij nematodes within insect host. *J Egypt Soc Parasitol* 1992;22:683-692.
 13. Grewal PS. Mushroom pests. In: Lacey and H. K. Kaya, eds., *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. L. A. Dordrecht, The Netherlands. Kluwer Academic Publishers. 2000. Pp. 497-503.
 14. Burges HD. Techniques for testing microbials of arthropod pests in greenhouses. In: L. A. Lacey and H. K. Kaya, eds. *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. Dordrecht, The Netherlands. Kluwer Academic Publishers. 2000. Pp. 505- 526
 15. Begley JW. Efficacy against insects in habitats other than soil. In: R. Gaugler and H. K. Kaya, eds. *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. Boca Raton FL., CRC Press 1990. Pp. 215-231.
 16. Mullens BA, Meyer JA, Cyr TL. Infectivity of insect-parasitic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae) for larvae of some manure-breeding flies (Diptera: Muscidae). *Envirom Entomol* 1987;16: 769-773.
 17. Mullens BA, Meyer JA, Georgis R. Field tests of insect-parasitic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae) against larvae of manure-breeding flies (Diptera: Muscidae) on caged-layer poultry facilities. *J Econ Entomol* 1987;80: 438-442.
 18. Belton P, Rutherford TA, Trotter DB, Webster JM. *Heterorhabditis heliothidis*: a potential biological control agent of houseflies in caged-layer poultry barns. *J Nematol* 1987;19: 253-266.
 19. Renn N. Mortality of immature houseflies (*Musca domestica* L.) in artificial diet and chicken manure after exposure to encapsulated entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae). *Biocontr Sci Technol* 1995;5:349-359.
 20. Renn N. The efficacy of entomopathogenic nematodes for controlling housefly infestations of intensive pig units. *Med Vet Entomol* 1998;12: 46-51.